

東海大學環境科學與工程研究所

碩士論文

嗜熱厭氧菌 *Clostridium thermocellum* strain TCW1 水
解纖維素產氫之研究

Study of hydrogen production from cellulose hydrolysis
by thermophilic anaerobe *Clostridium thermocellum*

strain TCW1

指導老師：黃啟裕 博士

研究生：鍾承翰

中華民國 九十八年六月

June 2009

東海大學碩士班研究生
論文指導教授推薦書

環境科學與工程學系鍾承翰君所提之論文

題目：嗜熱厭氧菌 *Clostridium thermocellum* strain
TCW1 水解纖維素產氫之研究

係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授：黃啓裕 (簽章)

98 年 6 月 19 日

東海大學環境科學系碩士班

論文口試委員審定書

環境科學與工程學系碩士班鍾承翰君所提之論文

題目：嗜熱厭氧菌 *Clostridium thermocellum* strain TCW1
水解纖維素產氫之研究

經本委員會審議，認為符合碩士資格標準。

論文口試委員召集人 顏良偉 (簽章)

委員 鄭幸雄

張志竹

黃啟裕

中華民國 98 年 6 月 19 日

摘要

隨著科技快速發展，人類對於乾淨能源的需求將更為迫切，近年來各式各樣的替代能源發展中，利用纖維性廢棄物產生生質燃料的方式已受到各國矚目。生質燃料中，氫氣具有高能量及不會造成二次污染的特性，利用厭氧微生物產氫除了是潔淨能源的生產外，亦具有資源再利用的優勢，極具發展潛力。本研究利用本實驗室所分離出來的纖維水解產氫菌株*Clostridium thermocellum* strain TCW1進行纖維素產氫試驗。經由實驗結果strain TCW1之最適水解纖維素產氫溫度為60°C；最適產氫pH為6.99；最適基質添加量為5 g/L；最適亞鐵(Fe^{2+})離子及鎳(Ni^{2+})離子添加量分別為5 mg/L及0.01 mg/L。在以上最適條件下配合160 rpm之震盪培養，strain TCW1最高氫氣產量可達462.3 mL/L · liquid，在36 hr氫氣濃度可達34.12%，氫氣產率(H_2 yield)可達106.7 mL/g · cellulose。以最適條件進行天然纖維物質粉末(稻桿、狼尾草、橘子皮及蔬菜葉)之產氫試驗，可得以狼尾草粉末及稻桿粉末時，最佳氫氣產量分別可達416.0及358.1 mL/L · liquid，產氫濃度分別為27.73及23.88%，氫氣產率(H_2 yield)可達83.20及71.63 mL/g · substrate。以橘子皮及蔬菜葉粉末為基質時，氫氣產率分別為42.51及11.12 mL/g · substrate，可知天然纖維性物質中以狼尾草粉末及稻桿粉末較適合*Clostridium thermocellum* strain TCW1產氫。

關鍵字：*Clostridium*、暗發酵、纖維素、氫氣

Abstract

As technology is developed fast, there is an urgent need for development of renewable energy source. Among different kinds of renewable energy, biofuels produced by conversion of cellulosic materials have attracted attention worldwide in recent years. Hydrogen is considered a clean and efficient energy among renewable energy and will not cause the secondary pollution. Hydrogen can be produced from organic wastes by fermentative microorganisms. Therefore, hydrogen has the potential for replacing conventional fossil fuels. The purpose of this study was to find the optimal conditions for a thermophilic anaerobic isolate *Clostridium thermocellum* strain TCW1 for its conversion of cellulosic materials to hydrogen gas. The experimental results showed the optimal temperature of strain TCW1 for hydrogen production was 60°C, optimal pH was 6.99, optimal substrate concentration was 5 g/L and Fe²⁺ concentration and Ni²⁺ concentration were 5 mg/L and 0.01 mg/L, respectively. The highest quantity of hydrogen production was 462.3 mL/L • liquid under optimal conditions with 160 rpm agitation. Hydrogen concentration produced by strain TCW1 could reach 34.12%, and H₂ yield could reach 106.7 mL/g • cellulose. Strain TCW1 could also produce H₂ by fermenting different natural cellulosic materials such as rice straw, napier grass, orange peel and vegetable leaf. Cumulative hydrogen produced from natural substrates could reach 416.0(napier grass) and 358.1(rice straw) mL H₂/L, respectively. Hydrogen concentration were 27.73(napier grass) and 23.88(rice straw)%, and H₂

yield were 83.20 and 71.63 mL/g • substrate.

Keyword : *Clostridium*, dark fermentation, cellulose, hydrogen

目 錄

第一章 前言.....	1
1.1 研究動機.....	1
1.2 研究目的.....	3
第二章 文獻回顧	4
2.1 能源現況.....	5
2.1.1 能源發展.....	5
2.1.2 現今生質能之發展與應用.....	6
2.2 氫能.....	9
2.2.1 熱化學法.....	10
2.2.2 電化學法.....	11
2.2.3 生物法.....	12
2.2.3.1 產氫微生物.....	12
2.2.3.2 光醱酵.....	14
2.2.3.3 暗醱酵.....	14
2.2.3.4 厭氧產氫機制.....	18
2.3 纖維素與厭氧纖維水解微生物	22
2.3.1 纖維素結構(Cellulose).....	22
2.3.2 纖維水解微生物種類.....	24

2.3.3 厭氧水解纖維素機制.....	24
2.4 厭氧微生物產氫影響因子	27
2.4.1 溫度.....	27
2.4.2 pH 值	28
2.4.3 基質	28
2.4.4 營養鹽.....	29
第三章 實驗方法與材料	32
3.1 實驗流程設計.....	32
3.2 菌種來源.....	33
3.3 菌種培養.....	33
3.3.1 厭氧操作.....	33
3.3.2 嗜熱厭氧培養基.....	34
3.4 產氫反應最適化探討.....	38
3.4.1 生長溫度.....	38
3.4.2 基質濃度.....	38
3.4.3 pH.....	39
3.4.4 微量元素	40
3.4.5 震盪培養(Agitation)對產氫的影響.....	41
3.5 分析方法.....	42
3.5.1 蛋白質分析.....	42

3.5.2 纖維素濃度測定.....	43
3.5.3 還原糖濃度測定.....	45
3.5.4 氫氣濃度分析.....	46
3.5.5 高效液相層析(HPLC)分析代謝產物.....	47
3.5.6 產氫能力分析.....	47
3.6 天然纖維基質測試.....	49
第四章 結果與討論	51
4.1 纖維水解產氫菌株.....	51
4.2 溫度之影響.....	52
4.2.1 溫度因子對生長、纖維素水解及產氫之影響	52
4.2.2 溫度因子綜合討論.....	57
4.3 pH 之影響.....	59
4.3.1 pH 因子對生長、纖維素水解及產氫之影響	59
4.3.2 pH 因子綜合討論.....	65
4.4 基質濃度之影響.....	67
4.4.1 基質濃度因子對生長、纖維素水解及產氫之影響	67
4.4.2 基質濃度因子綜合討論.....	72
4.5 微量元素對產氫的影響	75
4.5.1 不同種類亞鐵離子先期測試.....	75

4.5.2 亞鐵(Fe^{2+})離子對產氫之影響	78
4.5.3 微量元素鎳(Ni^{2+})離子測試	81
4.5.4 金屬離子濃度因子綜合討論	84
4.6 震盪培養之影響	88
4.6.1 震盪混合(Mixing)對生長、纖維素水解及產氫之影響 ..	88
4.6.2 震盪培養因子綜合討論	98
4.7 天然基質產氫測試	100
4.7.1 菌體生長分析	100
4.7.2 天然基質之液相產物分析	102
4.7.3 天然基質之氣相產物分析	105
4.7.4 產氫能力分析	108
4.8 不同菌株水解纖維素產氫能力比較	109
第五章 結論與建議	111
5.1 結論	111
5.2 建議	113
參考文獻	115
附錄	125

圖 目 錄

圖 2-1 生質能源轉換技術總覽.....	8
圖 2-2 自各種能源資源中生產氫氣的主要替代方法.....	9
圖 2-3 傳統厭氧消化流程圖.....	16
圖 2-4 <i>Clostridium acetobutylicum</i> 的發酵途徑。.....	21
圖 2-5 纖維素結構.....	23
圖 2-6 纖維二糖經由水解轉化為兩個葡萄糖分子.....	25
圖 2-7 <i>Clostridium cellulolyticum</i> 之纖維寡糖代謝途徑.....	26
圖 3-1 實驗設計流程.....	32
圖 3-2 Hungate 厭氧加氣站示意圖。.....	34
圖 3-3 生物產氫實驗反應設置.....	42
圖 4-1 Strain TCW1 分別培養在 50-70°C 情況下之生長、纖維水解及 產氫濃度時間曲線圖.....	54
圖 4-2 Strain TCW1 培養在不同溫度(50-70°C)情況下的累積生物氣體 及累積氫氣產量表示圖.....	55
圖 4-3 Strain TCW1 培養在不同溫度(50-70°C)情況下的氫氣產率及纖 維降解量示意圖.....	56
圖 4-4 Strain TCW1 分別培養在 pH 為 5.01-7.86 情況下之生長、纖維 水解及產氫濃度時間曲線圖.....	61

圖 4-5 Strain TCW1 培養在不同 pH(5.01-7.86)情況下的累積生物氣體 及累積氫氣產量表示圖	63
圖 4-6 Strain TCW1 培養在不同 pH(5.01-7.86)情況下的氫氣產率及纖 維降解量示意圖.....	64
圖 4-7 Strain TCW1 分別培養在不同基質濃度為 5 g/L-25 g/L 情況下 之生長、纖維水解及產氫濃度時間曲線圖	69
圖 4-8 Strain TCW1 培養在不同基質濃度(5 g/L-25 g/L)情況下的累積 生物氣體及累積氫氣產量表示圖	70
圖 4-9 Strain TCW1 培養在不同基質濃度(5 g/L-25 g/L)情況下的氫氣 產率及纖維降解量示意圖	71
圖 4-10 Strain TCW1 以不同基質濃度(5 g/L- 25 g/L)之還原糖濃度產 生曲線.....	74
圖 4-11 Strain TCW1 在以不同種類之亞鐵離子(FeCl_2 , FeSO_4)培養時， 氣體產物中氫氣含量變化曲線圖	76
圖 4-12 Strain TCW1 培養在不同種類亞鐵離子(FeCl_2 , FeSO_4)下的累 積生物氣體及累積氫氣產量表示圖	77
圖 4-13 Strain TCW1 在不同濃度之 FeCl_2 離子(0-50 mg/L)培養時，氣 體產物中氫氣含量變化曲線圖	79
圖 4-14 Strain TCW1 培養在不同濃度之 FeCl_2 離子(0-50 mg/L)下的累	

積生物氣體及累積氫氣產量表示圖	80
圖 4-15 Strain TCW1 在以不同濃度之 NiCl ₂ 離子(0-100 mg/L)培養時， 氣體產物中氫氣含量變化曲線圖	82
圖 4-16 Strain TCW1 培養在不同濃度之 NiCl ₂ 離子(0-100 mg/L)下的累 積生物氣體及累積氫氣產量表示圖	83
圖 4-17 Strain TCW1 分別培養在震盪及無震盪情況下之生長、纖維水 解及產氫濃度時間曲線圖	92
圖 4-18 震盪及未震盪情況下 strain TCW1 之還原糖產生速率圖	93
圖 4-19 Strain TCW1 分別培養在震盪及未震盪情況下的累積生物氣 體及累積氫氣產量表示圖	94
圖 4-20 Strain TCW1 分別以震盪及未震盪的情況下培養時，其氫氣產 率表示圖.....	95
圖 4-21 Strain TCW1 以 160 rpm 震盪的情況下進行醱酵培養時，其 pH 曲線表示圖.....	96
圖 4-22 Strain TCW1 以 α-cellulose 為碳源之乙醇及乙酸濃度比較圖	97
圖 4-23 Strain TCW1 以不同天然纖維基質為碳源之生長比較圖	101
圖 4-24 Strain TCW1 以不同天然纖維基質為碳源之還原糖比較圖	103
圖 4-25 Strain TCW1 以不同天然纖維基質為碳源之乙醇及乙酸濃度 比較圖.....	104

圖 4-26 Strain TCW1 以 4 種不同種類之天然纖維基質粉末震盪培養於
高溫 60°C、起始 pH 6.99 的情況下，生物氣體及氫氣累積產量表
示圖.....106

圖 4-27 Strain TCW1 以 4 種不同種類之天然纖維基質粉末(稻稈、狼
尾草、橘子、蔬菜葉)，震盪培養於高溫 60°C、起始 pH 6.99 的情
況下，氣體產物中氫氣含量之時間變化曲線圖107

表 目 錄

表 2-1 自然界中代謝產氫之微生物群	13
表 2-2 微生物產氫過程的優點和缺點	17
表 3-1 TA 培養基成分	36
表 3-2 Trace element solution 成分	37
表 3-3 Vitamin solution 成分	37
表 3-4 DNS 試劑成分(3,5-二硝基水楊酸試劑).....	45
表 4-1 Strain TCW1 在不同溫度下之纖維水解產氫潛力比較表	58
表 4-2 Strain TCW1 在不同 pH 下之纖維水解產氫潛力比較表	66
表 4-3 Strain TCW1 在不同基質濃度下之纖維水解產氫潛力比較表	73
表 4-4 Strain TCW1 在不同亞鐵離子(Fe^{2+})濃度下之產氫潛力比較表	86
表 4-5 Strain TCW1 在不同鎳離子(Ni^{2+})濃度下之產氫潛力比較表 ..	87
表 4-6 Strain TCW1 在震盪培養下之纖維水解產氫潛力比較表	99
表 4-7 Strain TCW1 利用 Gompertz equation 推估之氫氣生產參數	108
表 4-8 Strain TCW1 之氫氣產率能力與前人文獻比較	110

第一章 前言

1.1 研究動機

從 20 世紀工業革命以來，由於人類科技快速地進步發展，為人類生活帶來許多便利，但相對的對於石化燃料(Fossil fuel)的依賴及需求也與日俱增。石化燃料是無法再生之能源資源，且燃燒石化燃料排放大量的一氧化碳、二氧化碳、氮氧化物和硫化物等各種污染物導致全球的氣候快速變遷，以及造成嚴重的環境汙染(韓氏，2003)。因此，為了解決能源短缺和環境惡化的問題，各國近年來積極地開發對環境較友善且無污染之替代能源(Lo *et al.*, 2008)。然而，台灣屬於海島型國家，土地面積不大，自然資源較為貧瘠，大部分能源需仰賴外國進口，因此，更需要對再生能源之利用加以開發，如太陽能、地熱能、水力、風力、生質能及潮汐能(王氏，2005)。

生質能(Bioenergy)在能源供應上扮演著非常重要的角色，由於生質能源可經由廢棄物轉化而得，以取代目前所使用之石化燃料，並可達到減廢的目的。台灣以農立國，由農業所生產之農業廢棄物產量相當可觀，每年皆可達到數百萬噸的農業廢棄物，而這些廢棄物中之成分又以纖維素為主，纖維素中含有許多未被利用之能源，作為生質能源之來源最適合不過。利用微生物如細菌 *Clostridium* 屬之桿菌類能

將廢棄物轉化成能源，這是對環境較友善且較無害的，由於是利用自然界中的微生物進行這些轉化過程，因此不需投入大量的能源。根據國際能源總署(International Energy Agency)的統計資料(IEA, 2003；吳及李，2004)表示，目前生質能為全球第四大能源，僅次於石油、煤及天然氣，供應了全球約 14%的初級能源需求，同時也是目前最廣泛使用的一種再生能源。

在各種替代能源燃料中，氫氣具有潔淨、可循環使用及高效率等特性而被認為是最具發展前景的燃料。由於氫的熱值為甲烷的 2.4 倍、石油的 3 倍；而燃燒的最終產物為水，且不會釋放造成溫室效應的氣體，因此，氫已被視為 21 世紀有效的乾淨能源。雖然目前氫氣的製造可藉由化學程序(Chemical processes)：如蒸氣重組法(steam reforming)、煤氣化法(coal gasification)、部分氧化法(partial oxidation)或電解法(electrolysis)等，予以大量生產(Das and Veziroglu, 2001)，但是這些製程卻需要消耗大量的石化燃料(fossil fuel)，因此對於能源供應的發展並無助益。反觀，生物法產氫以光合菌(photosynthetic bacteria)或厭氧菌(anaerobic bacteria)所進行之光醱酵(light fermentation)或暗醱酵(dark fermentation)作用，能將有機物降解並轉化為氫氣，若應用於有機廢水或廢棄物處理則兼具環境改善及能源再生之功能(張等，2002)，因此生物產氫為兼具綠色環保與永續發展之產氫程序。

1.2 研究目的

本研究乃由前人研究中取得已經過鑑定之乳牛纖維水解產氫菌株 *Clostridium thermocellum* strain TCW1，該菌株可在五天內完全降解 5 g/L 之纖維素，並產生替代能源“氫氣”。為了使該菌株能夠更有效地直接水解纖維並生產氫氣，進行各項優化探討測試後能有更佳之產氫效率，其主要的實驗進行條件如下：

1. 溫度。
2. pH。
3. 基質濃度。
4. 不同種類之金屬離子。
5. 不同濃度之金屬離子。
6. 震盪測試。

就以上條件探討及研究該菌株之最佳產氫條件範圍，最後以該菌株最佳產氫之條件範圍探討在此環境下，可應用於生質能源產出之效用探討。

第二章 文獻回顧

隨著科技提升及快速發展，能源的需求量逐年增加。大量使用化石燃料做為能源，提升了人類的物質文明，卻也對環境造成巨大的衝擊。過度地使用能源，帶來許多負面之影響，如燃燒化石燃料所排放之廢氣造成全球溫室效應。而現今所使用之能源並非取之不盡、用之不竭，為了兼顧經濟的發展，又不為環境造成破壞，發展新的替代能源便成為目前的重點之一。氫氣因符合替代能源的條件而受到重視，且將於未來逐漸成為主要能源之一，所以如何開發與利用此一新的替代能源，就成為現今所面臨的課題。

產生氫能的方式很多，其中以生質氫能最受到重視，生物產氫主要是藉光合作用或醱酵反應的微生物來進行。自然環境中之產氫微生物如梭狀芽胞桿菌(*Clostridium* sp.)，在生長代謝過程中會產生氫氣，此現象早已備受矚目並深入研究；近年來在有關 *Clostridium* 屬細菌的研究中發現其族群普遍存在於農業廢棄物、都市廢水污泥與垃圾掩埋場等環境中，其中有某些種類的微生物具有分解纖維素的能力 (VanDyke and McCarthy, 2002)。若能針對具有產氫和分解纖維素功能族群進行研究，進而發展出一套利用富含碳水化合物之有機固體廢棄物產氫系統，將可兼具潔淨能源生產與資源再生功能，且符合綠色生

產與永續發展的理念。近年來有許多關於這些微生物產氫的生理、生化及分子生物學方面的研究已被發表。但對於將直接利用纖維素產氫的研究較少人提及，並希望能由菌種培養的研究提供做為未來醱酵產氫系統的一個控制指標，以利未來生質能源之開拓與發展。

2.1 能源現況

2.1.1 能源發展

全球在 1970 年代發生了第一次石油危機，石油價格逐漸地飆漲，從 1970 年的每桶約 3 美元一直飆漲到每桶約 10.5 美元，許多以工業為主的國家都開始出現景氣衰退的現象。1978 年底，當時世界第二大石油出口國伊朗發生政變，每天 580 萬桶石油輸出量中斷，打破了當時全球原油市場上供需的平衡機制，加上 1980 年的兩伊戰爭，造成了第二次的石油危機，石油價格從 1978 年每桶 14 美元漲到 1981 年的每桶 35 美元，同樣使全球經濟呈現衰退的現象(郭氏，2003)。直到最近，2008 年六月，石油價格飆破每桶 140 美元，創下石油史上的天價。

在能源價格高漲以及需求大增的時代，預期全球能源需求將持續成長，世界各國之能源政策已開始極力尋找可替代石化燃料之能源資源，如太陽能、水力能、風力能、潮汐能、地熱能及生質能。

2.1.2 現今生質能之發展與應用

生質能(Bio-energy)係指含有大量有機物的生物質(Biomass)，經直接或間接轉換成可用的能源，目前主要以生質作物或廢棄物經過轉換程序後能夠獲得能源，其中廢棄物包含都市垃圾、一般性事業廢棄物、汙泥、廢輪胎、有機廢液、農業廢棄物等以碳氫化合物為主的物質，在這些廢棄物中，纖維素又是含量最多的物質，使用廢棄物的生質能，更兼具處理廢棄物與回收能源的雙重效益。生質能源轉換技術相當的廣泛如圖 2-1 所示，經過轉換程序之後，最後所獲得的產品為電能、熱能、生化產品及燃料，而產生之燃料包含生質柴油、生質酒精、甲烷或是氫氣等。

一般處理生質能轉換成能源之方式大致可分為直接燃燒、物理轉換、熱轉換以及化學/生物轉換。其技術如下：

- (1)直接燃燒技術：將生物質或廢棄物直接燃燒以轉換成熱能或電力，如現有的大型垃圾焚化廠，以焚化垃圾進行發電。
- (2)物理轉化技術：將生物質或廢棄物經過破碎、分選、乾燥、混合劑添加及成型等過程而製成品質良好，易於運輸及儲存之固態衍生燃料，作為鍋爐、水泥窯的燃料，如以紙廠廢棄物製成錠型之固態燃料作為燃煤氣電鍋爐之輔助燃料。

(3)熱化學(thermochemical)轉換技術：將生物質或廢棄物利用汽化(gasification)、裂解(pyrolysis)或液化(liquefaction)等熱轉換程序產生合成燃油或燃氣(天然氣)，當作燃燒以及發電設備之燃料，如廢保麗龍或廢塑膠經裂解反應可回收燃油做為鍋爐之燃料；又如稻殼、能源作物或廢紙渣可利用氣化程序製造合成燃氣，進行燃氣發電。

(4)化學/生物轉換技術：將生物質或廢棄物經由醱酵、轉酯化等生物化學之程序，轉換產生甲烷、氫氣、乙醇、生質柴油等，以作為引擎、發電機或燃料電池之燃料(吳及李，2004)，如垃圾掩埋場廢棄物經發酵產生之沼氣可進行發電利用；又如利用廢食用油進行酯化反應可產製生質柴油，作為汽車之替代燃料。將生質物轉化為類似煤、油、天然氣的衍生燃料，易於儲運並可擴大應用範圍，提高能源效率，降低污染，同時可與資源回收再利用系統結合，並節省廢棄物處理成本，使生質能技術極具市場競爭力。

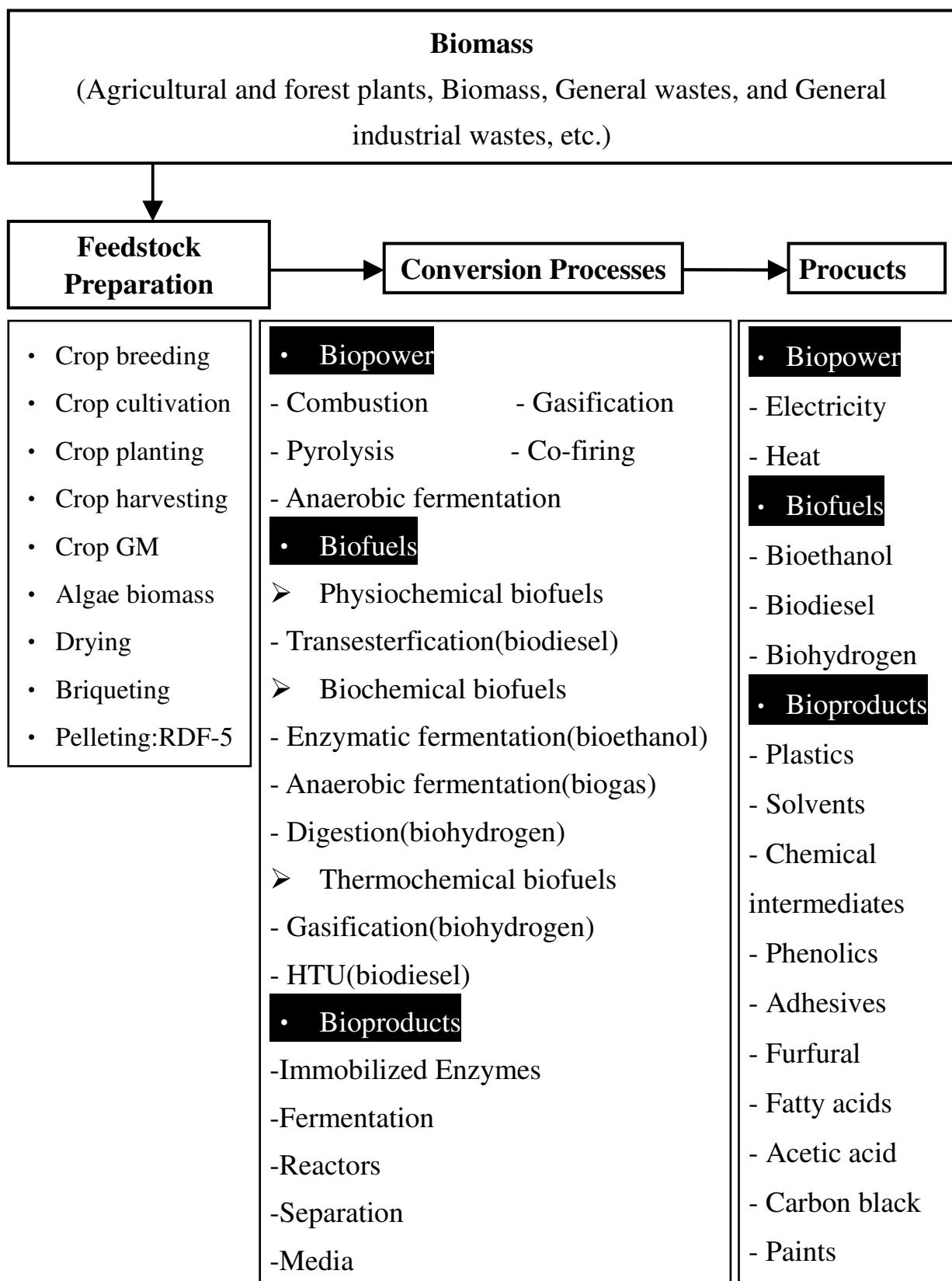


圖 2-1 生質能源轉換技術總覽 (吳及李, 2007)。

2.2 氫能

氫氣在近年來備受國際矚目，主要是因為氫氣具有潔淨無污染、永續供應及高熱能值等三項特質。氫氣在燃燒使用時不會釋放二氧化碳，其主要的產物只有水，並無污染之虞，因此被譽稱為綠色能源。氫氣每單位重量產生之熱能產率為122 MJ/kg，約為甲烷的2.5 倍，汽油的3 倍，高於其他碳氫化合物，因此氫氣被視為目前最有潛力的替代能源(Lo *et al.*, 2008)。氫氣可由再生或非再生的來源獲得，然而製造氫氣的方法有很多種，主要製造氫氣的方法大致可分為下列五大類，分別為熱化學法、電化學法、光化學法、光催化法以及生物法製氫，如圖2-2所示(Balat, 2008)，下面將介紹較常見的工業製氫方法。

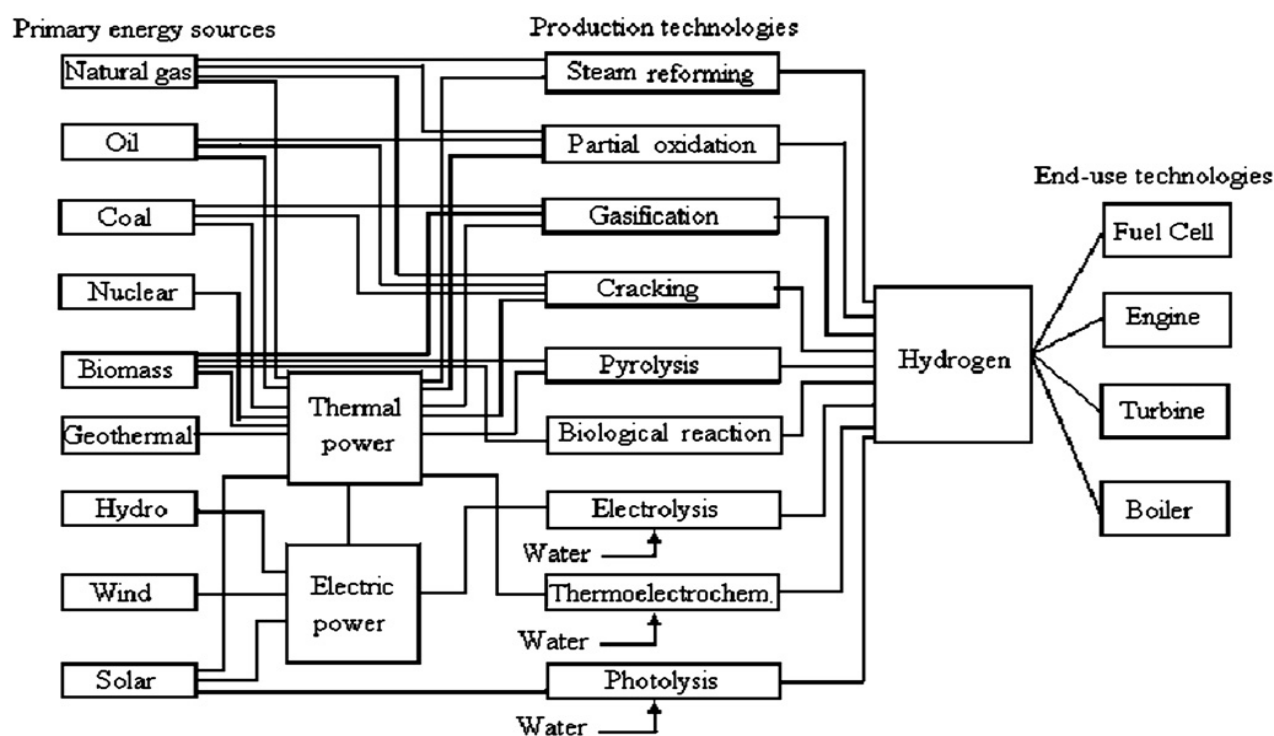


圖 2-2 自各種能源資源中生產氫氣的主要替代方法(Balat, 2008).

2.2.1 熱化學法

熱化學法產氫主要包含以下幾種方法：(羅氏，2005；曲等，2007)

- (1) 蒸氣重組法(steam reforming)：將高溫(650-700°C)水蒸氣與低碳數石化燃料(一般為甲烷)反應，可產生氫氣以及二氧化碳，其化學反應如2-1、2-2及2-3式：

※ 合成氣(synthesis gas)生成反應



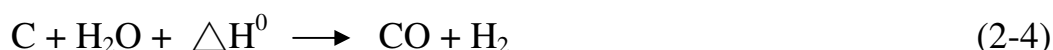
※ 水氣轉移(water-gas shift)反應



※ 總反應



- (2) 煤炭的氣化(gasification)：將高溫(1000°C)之煤炭通以水蒸氣，產生氫氣以及一氧化碳，其化學反應如2-4式：



ΔH^0 ：138.7 KJ/mol。

- (3) 裂解(pyrolysis)：將廢棄物直接經過無氧高溫(>500 °C)之處理，可產生氫氣，如高溫裂解水的製氫反應，其反應方程式如2-5式：



ΔH ：241.8 kJ/mol。

(4) 部份氧化作用(partial oxidation)：碳氫化合物在氧氣不足之情況下，

經過燃燒可產生氫氣、一氧化碳及二氧化碳，其化學反應如2-6

式：



※ 其中n及m之值視進料烴的成分而定。

以上方法目前最主要產氫氣的方式是使用蒸氣重組法，但製造氫氣之過程會釋放出二氧化碳，且這些方法是需要較高之能源及成本，相對增加使用氫氣對環境及經濟所造成之負擔(Ferchichi *et al.*, 2005)。

2.2.2 電化學法

電化學法包含以下二種主要的方法：(羅氏，2005；曲等，2007)

(1) 電化學法：以直流電電解水(通常加入鹼性物質如氫氧化鉀以成為電解液)，可分別於陰極及陽極收集到高純度之氫氣以及氧氣。

(2) 光電解法：利用光觸媒(例如二氧化鈦)，利用光線激發觸媒表面產生光電解反應，可將水分解成氫氣及氧氣。

以電化學法可獲得純度較高之氫氣，且生產過程中不會有二氧化碳等溫室氣體之排放，但是其成本較蒸氣重組法昂貴，且反應進行時也需消耗大量的燃料以維持電化學反應，過程中也會放出廢熱使能量散失(Ferchichi *et al.*, 2005)。

2.2.3 生物法

2.2.3.1 產氫微生物

生物法產氫分為光合作用、醱酵作用兩種，其中光合作用產氫乃藉由光能進行水之光解作用而產生氫氣，而醱酵作用則是以有機質為電子提供者，經由需光源(光合細菌)或不需光源(厭氧細菌)的醱酵作用將有機質分解，並將伴隨產生的部分電子，由特定之電子傳遞系統將電子傳送給水體中的質子(H^+)而產生氫氣。

以生物作用產生氫氣所需之成本較少，也不需投入大量能源(Das and Veziroğlu, 2001)。特別是以厭氧微生物醱酵方式產生氫氣不需要複雜的技術及設備，以現行已有之醱酵設備即可進行，且可以利用多種不同的碳水化合物作為產氫之基質，是對環境友善的產氫程序，在未來氫氣供應上扮演關鍵性的角色(Lo *et al.*, 2008)。表 2-1 所示為目前已知可產氫之微生物種類。

表 2-1 自然界中代謝產氫之微生物群

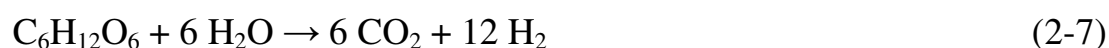
Classification	Name of the micororganisms	
Green algae	<i>Scenedesmus obliquus</i>	
	<i>Chlamydomonas reinhardii</i>	
	<i>C. moewusii</i>	
Cyanobacteria Heterocystous	<i>Anabaena azollae</i>	
	<i>A. variabilis</i>	
	<i>A. cylindrical</i>	
	<i>Nostoc muscorum</i>	
	<i>N. spongiaeforme</i>	
	<i>Westiellopsis prolifica</i>	
	Nonheterocystous	<i>Plectonema boryamvn</i>
<i>Aphanothece halophytico</i>		
<i>Mastidocladus laminosus</i>		
<i>Phormidium valderianum</i>		
Photosynthetic bacteria	<i>Rhodobater sphaeroides</i>	
	<i>R. capsulatus</i>	
	<i>R. sulidophilus</i>	
	<i>Rhodopseudomonas</i> <i>sphaeroides</i>	
	<i>R. palustris</i>	
	<i>R. capsulata</i>	
	<i>Rhodospirillum rubnum</i>	
	<i>Chlorobium limicola</i>	
	<i>Chloroflexu aurantiacus</i>	
	<i>Thiocapsa roseopersicina</i>	
	<i>Halobacterium halobium</i>	
	Fermentative bacteria	<i>Enterbacter aerogenes</i>
		<i>E. cloacae</i>
		<i>Clostridium butyricum</i>
<i>C. pastrurianum</i>		
<i>Desulfovibrio vulgaris</i>		
<i>Magashaera elsdenii</i>		
<i>Citrobacter intermedius</i>		
<i>Escherichia coli</i>		

(Das & Veziroğlu, 2001)

2.2.3.2 光醱酵

光合細菌如*Rhodobacter sphaeroides* 並不利用水當作產氫基質，卻能將有機物質(如有機酸、醣類)分解，並藉由固氮酵素之作用而產生氫氣，此作用稱為光醱酵作用。理論上分解1 mole 的glucose 可生成12 mole的氫氣，比厭氣細菌產氫之理論轉化率高出8 mole 之多；但是由於光合細菌大多利用固氮酵素產氫，因此產氫步驟的活化能較高，以致影響其產氫速率，如公式2-7(Wang *et. al.*, 2006)。文獻更指出光醱酵產氫菌若能成功固定化於載體能提升其產氫效能，乃為深具潛力的產氫生物觸媒(Sarker *et al.*, 1992; Calvin and Taylor, 1989; Kumar and Kumar, 1991; Stewar, 1980; Lambert and Smith, 1981)。

光合菌產氫之化學計量方程式如下：



2.2.3.3 暗醱酵

暗醱酵產氫乃指厭氧微生物對有機質之醱酵所伴隨之產氫作用，因不需光源而命名。傳統有機物厭氧消化處理過程中，產酸代謝過程會伴隨氫氣的產生，但由於醋酸菌與甲烷生成菌會消耗氫氣，因此氫氣在有機物甲烷化代謝路徑中的角色僅為一中間產物，如圖2-3所示，故在傳統的厭氧消化過程中，氫氣之累積濃度通常十分低，而系統中氫氣分壓也常成為判斷厭氧消化程序甲烷化效率指標之一，因此，在

分離產氫菌前通常會先利用熱篩前處理，將甲烷菌篩除，以免實驗過程中氫氣被甲烷菌消耗掉(Wang and Wan, 2008)。許多產酸菌具有產氫能力，如 *Clostridium* 菌屬便是常見的產氫菌；此外，尚有 *Enterobacter* 菌屬也是文獻中常被提及的產氫菌 (Yokoi *et al.*, 1998)。

在各種生物產氫的方法上皆有許多的優缺點，其產氫過程的優缺點如表 2-2 所示。因此，利用微生物暗醱酵產氫會比其他的生物產氫方法更有發展的潛力。

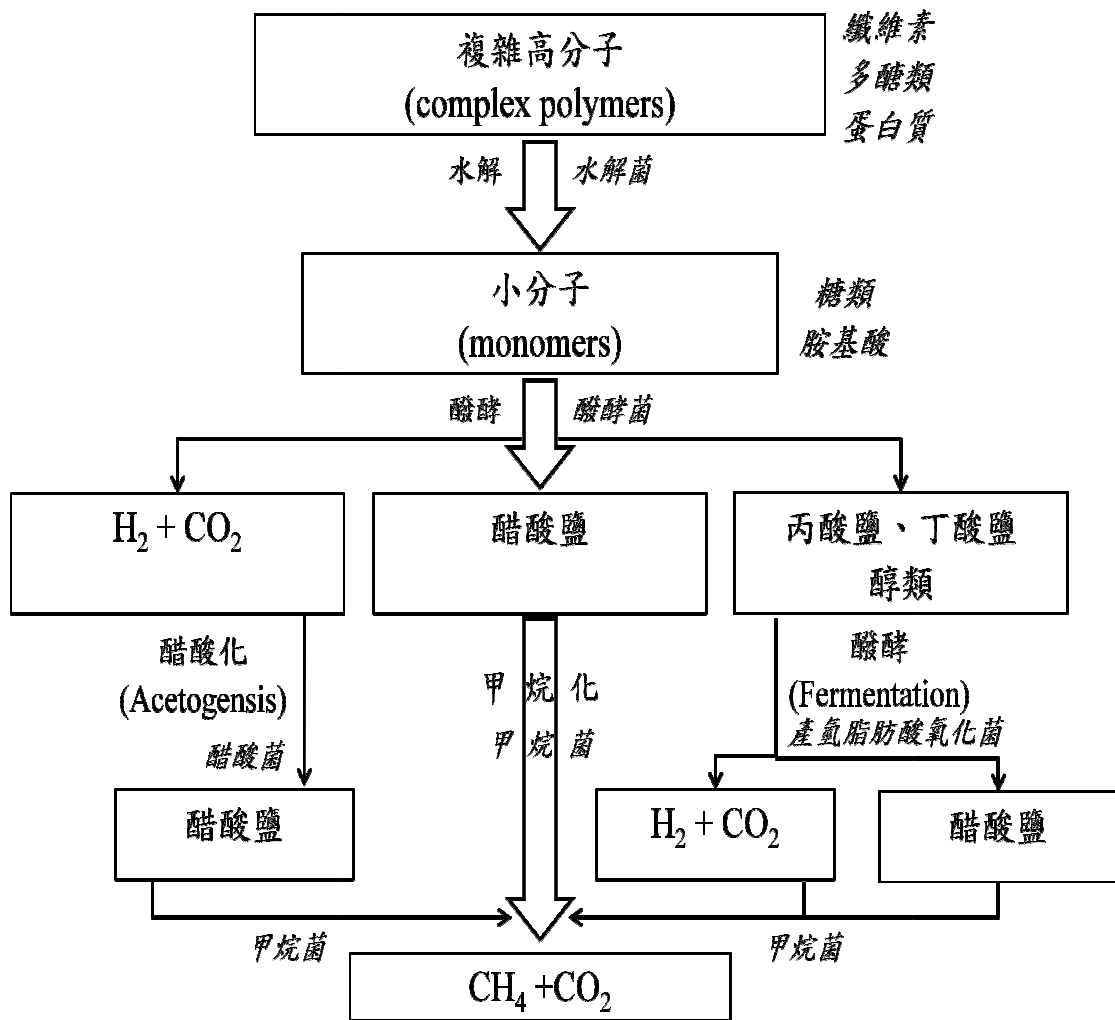


圖 2-3 傳統厭氧消化流程圖(張等，2002)

表 2-2 微生物產氫過程的優點和缺點

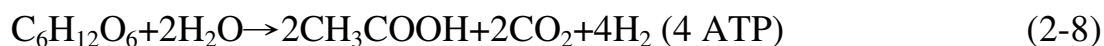
Type of microorganism	Merits	Demerits
Green algae	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Can produce hydrogen from water ➤ Solar conversion energy increased by 10 folds as compared to trees crop 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Require light for hydrogen production
Cyanobacteria	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Can produce hydrogen from water ➤ Nitrogenase enzyme mainly Produces H₂ ➤ Has the ability to fix N₂ from the atmosphere 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ About 30% O₂ present in the gas mixture with H₂ ➤ O₂ has inhibitory effect on nitrogenase ➤ CO₂ present in the gas
Photosynthetic bacteria	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Can use different waste materials like whey, distillery effluents, etc. ➤ Can use wide spectrum of light 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Fermented broth will cause water pollution problem ➤ Require light for hydrogen production ➤ CO₂ present in the gas
Fermentative bacteria	<ul style="list-style-type: none"> ➤ It can produce hydrogen all day long without light. ➤ It can utilize different carbon sources like starch, cellobiose sucrose, xylose, etc. and thus different type of raw materials can be used. ➤ It produces valuable metabolites such as butyric acid, lactic acid, acetic acid, etc as by products ➤ It is an anaerobic process, so there is no oxygen limitation problems 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ The fermented broth is required to undergo further treatment before disposal otherwise it will create water pollution problem ➤ CO₂ present in the gas

(張，2001)

綜觀上述之產氫方法，熱化學法產氫雖早已工業化，但在製程中卻需消耗大量的資源及能源，且在過程中會同時產生汙染物(如 CO₂)造成溫室效應之氣體排放，因此不利於未來的發展與利用。電化學法產氫雖無污染之虞，且製得的氫氣純度較高，但效率低、耗能高及電極穩定性欠佳等問題致使應用上不符合經濟成本。反觀以生物法產氫具有乾淨、節能及不消耗大量資源等優點，為一種符合持續發展的策略，因此已引起世界各國的重視。

2.2.3.4 厭氧產氫機制

有機物(碳水化合物)對於厭氧醱酵產氫是個很好的基質，主要的醱酵產物以各種揮發酸(乙酸、丙酸、丁酸)、醇類(乙醇、丁醇)、氫氣及二氧化碳為主。以最大理論產氫量而言，每莫耳的葡萄糖可產生4 莫耳的氫氣，此時乙酸是醱酵的副產物，而當醱酵的副產物為丁酸時，理論的產氫量則僅為產乙酸時的一半，如公式2-8及2-9。



Girbal *et al.*(1995)年提出*Clostridium acetobutylicum* 分解葡萄糖的厭氧醱酵路徑，微生物以 Embden-Meyerhof-Parnas pathway (EMP pathway)進行糖解作用，將六碳糖轉化成兩個pyruvate，過程中會釋

出NADH並消耗ATP，接著如圖2-4所示，pyruvate 繼續進行生化反應成acetyl-CoA 時，會釋放出二氧化碳及還原態ferredoxin，後者若經hydrogenase 氧化，則會有分子態的氫釋出；大部分的醱解Clostridia 會藉由lactic dehydrogenase 將丙酮酸轉化為乳酸，部分中高溫Clostridia 還會藉pyruvate-formate lyase 將丙酮酸裂解為acetyl-CoA 及甲酸，如*Clostridium thermosuccinoges* (Canganella and Wiegel, 1993)。接著acetyl-CoA 可經不同途徑轉化成各項終產物釋出至細胞外，上游途徑釋出的NADH 被轉化成能量以供細胞生長及活動外，在不同的下游代謝過程中可能又被利用轉化為NAD⁺，剩餘的NADH 可經由hydrogenase 及ferredoxin 的作用下轉回NAD⁺並釋出氫氣，其中以乙酸生成的路徑最有利於能量(ATP)及還原能(NADH)的生成。

氫氣的生成與ATP 的獲得量具有直接的相關性，clostridia 利用Ferrodoxin-dependent hydrogenase reaction 可將EMP pathway 途中生成的還原能以氫氣生成的方式氧化，越多的氫氣生成，就會有越少的還原性終產物生成，例如乙醇或乳酸，若氫氣的生成受到任何壓制，就會觀察到代謝途徑移轉至還原性產物的生成(Gottschalk, 1985)。根據文獻指出，*Clostridium* 屬中，可將碳水化合物分解並產生氫氣的種類有下列幾種：*C. acetobutylicum*(McCoy and Fred,1941)、*C. barkeri* (Häggröm, 1986)、*C. beijerinckii* (George *et al.*, 1983)、*C. butyricum*

(Kutzenock and Aschner, 1952 ; Sjolander and McCoy, 1973) 、
C.innocuum (Cato *et al.*, 1986) 、*C. pasteurianum* (Jungermann *et al.*,
1973) 、 *C.tetanomorphum*(Wachsman and Barker, 1955) 、 *C.*
thermobutyricum (Wiegel *et al.*, 1989) 、*C. tyrobutyricum* (Michel-Savin
et al., 1990)等，其產物主要為乙酸、丁酸及乙醇。

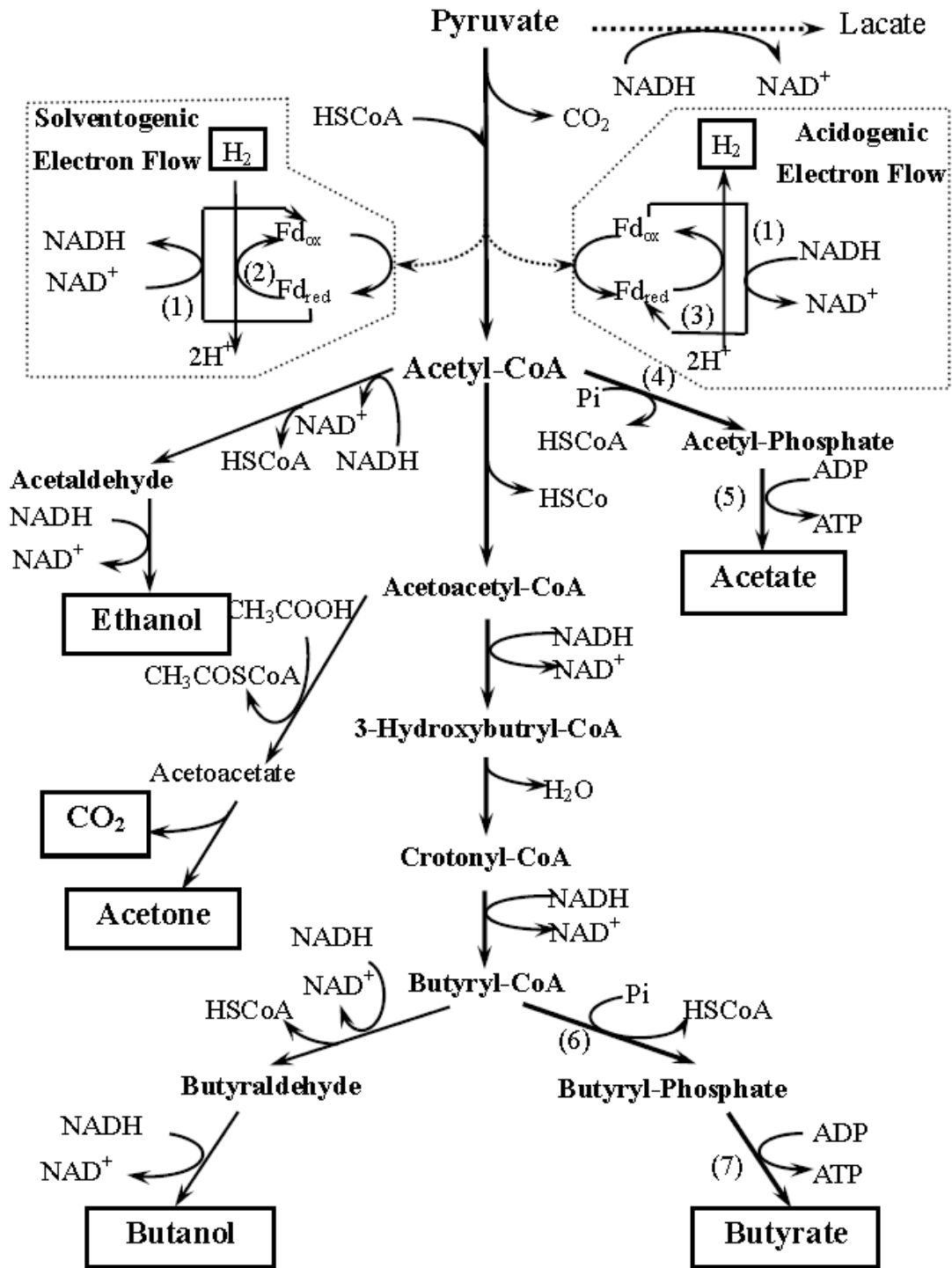


圖 2-4 *Clostridium acetobutylicum* 的醱酵途徑。

- (1)hydrogenase, (2)ferredoxin-NAD reductase,
 (3)NADH-ferredoxin reductase, (4)phosphotransacetylase,
 (5)acetate kinase, (6)phosphotransbutyrylase, (7)butyrate kinase.
 (Girbal *et al.*, 1995)

2.3 纖維素與厭氧纖維水解微生物

2.3.1 纖維素結構(Cellulose)

纖維素為地球上極為豐富的資源，廣泛地存在植物體中，是構成植物細胞壁的主要成分，纖維素結構鍵結之方式如圖 2-5(A)，由 100 ~ 10,000 個葡萄糖單體以 β -1,4 鍵結的方式連結而成的直鏈聚合物 (Beguin and Aubert, 1994)，其分子量範圍介於 200,000 ~ 2,000,000 之間，這些葡萄糖分子鏈之間的鍵結，是由一個葡萄糖分子上的第一號碳，連接另一個葡萄糖分子上的第四號碳。在植物組織中如圖 2-5(B)，纖維素分子以平行排列方式群聚成微纖維(microfibrils)結構，直徑約 5 ~ 12 nm，含有接近 50 ~60 個纖維素分子，在相鄰的微纖維以氫鍵相互鍵結，使纖維素產生規則排列的結晶型結構(crystalline domain)，其中也有些排列不規則的區域，稱為非結晶型結構(amorphous domain)。

纖維素主要被包覆於半纖維素以及木質素之中，稱之為木質纖維素 (Lignocellulose)，其結構非常地緊密堅固，陸生植物細胞藉此獲得保護。木質纖維素大量存在於地表，是地球上極為豐富的聚合物 (Rani *et al.*, 2004)，估計纖維素與半纖維素每年約有 8.9×10^{10} 噸透過光合作用被製造出來 (Wiegel, 1982)，在如此大量的纖維素物質中，

大多數的纖維素是無法被人類直接利用的，因此有許多的纖維素成了廢棄物而直接焚化處理。許多文獻在進行木質纖維素水解程序之前，先以理化方式如濕式氧化法 (Wet Oxidation)、酸鹼處理、和氨爆破 (AFEX) 方式去除堅固的木質素 (Bjerre *et al.*, 1996; Holtzapple *et al.*, 1991; Mosier *et al.*, 2005)，使纖維晶體露出以利於後續之水解作用。纖維素晶體本身不溶於水且架構穩定，使得自然界的木質纖維素很難被一般生物所直接分解利用，同時在纖維素衍生生質燃料之程序中，水解步驟不單只是速率決定步驟，亦為關鍵技術所在 (Lai *et al.*, 2001; Noike *et al.*, 1985)。

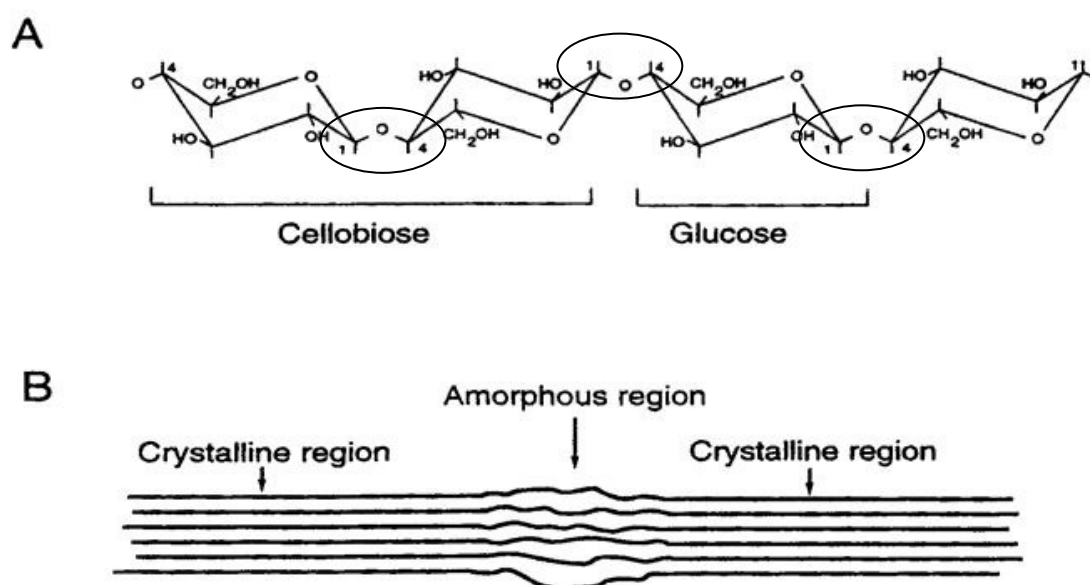


圖 2-5 纖維素結構(A)纖維素纖維是由許多葡萄糖分子所構成，圈起來的部分為 β -1,4 糖苷鍵 (B)纖維素纖維的結構 (Beguin and Aubert, 1994)。

2.3.2 纖維水解微生物種類

在厭氧環境下的纖維水解生物常見於動物消化道、淡水底泥、堆肥、廢水處理污泥等，而像是腸胃道中的纖維水解生物在草食動物營養吸收上就扮演著重要角色，可將固態纖維素轉化為可吸收的醣類。厭氧環境下的纖維素可被厭氧纖維水解生物醣化而醱酵，可藉由甲烷菌對於醱酵後酸產物的消耗（如甲酸、乙酸...），以延續纖維素的共醣化醱酵反應（Simultaneous saccharification and fermentation, SSF）。常見厭氧性纖維水解生物如*Fibrobacter succinogenes*，可水解纖維素及半纖維素，或是瘤胃中的*Ruminococcus albus*及*Ruminococcus flaufaciens*，亦有真菌如*Neocallimastix patriciarum*。

2.3.3 厭氧水解纖維素機制

水解反應（hydrolysis）指的是將所有的化學物質(如 NaOH)中的氫氧原子鍵結以加入水的方式裂解，在多醣類物質的水解過程中，例如：纖維素單個葡萄糖分子中間以氧原子組成 β -1, 4-D-糖苷鍵（ β -1, 4-D-glycosidic bond），水解後兩端各形成 OH 基，圖 2-6 所示為纖維二糖水解為兩個葡萄糖單體。自然情況下纖維素的水解反應難以自行發生，因此常見水解反應需透過酸或鹼處理，或是以纖維水解酵素做為催化劑，而生物水解同樣也是以纖維水解酵素來達成。

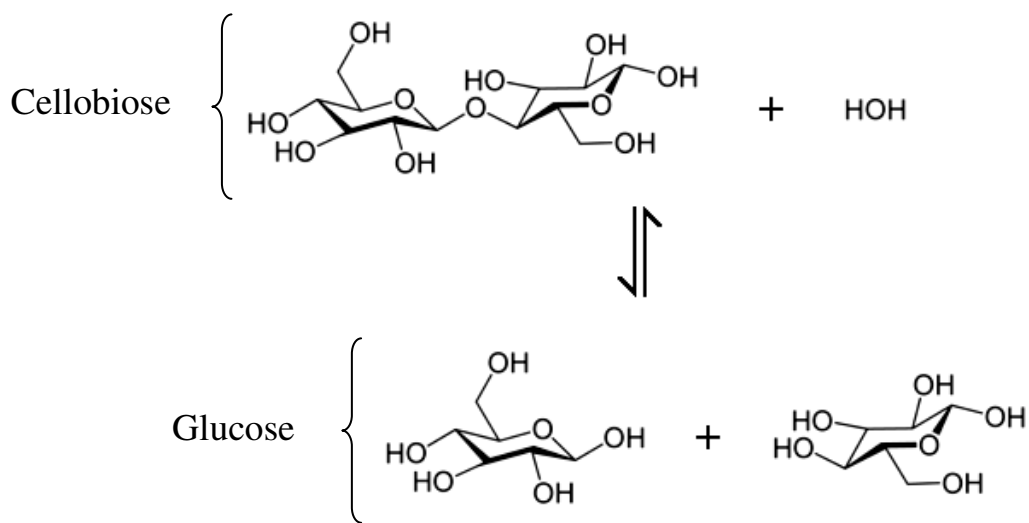


圖 2-6 纖維二糖經由水解轉化為兩個葡萄糖分子。

纖維素不溶於水，當被水解為可溶性醣類時稱為醣化 (Saccharification)，指的是多醣水解為更小的醣類如：寡糖、雙糖或單糖的過程，也是生物在利用不可溶性醣類時所必經的途徑。例如纖維水解生物利用多種纖維酵素，先將纖維素轉為可溶性多醣類 (Polysaccharide)，再轉化為寡糖類 (Oligosaccharide)，最後分解為單醣 (Monosaccharide)，可以藉主動運輸或擴散作用進入細胞的代謝途徑，達到利用纖維素的目的 (Desvaux *et al.*, 2000)。圖 2-7 即為已知纖維水解菌 *Clostridium cellulolyticum* 的葡萄糖代謝途徑。

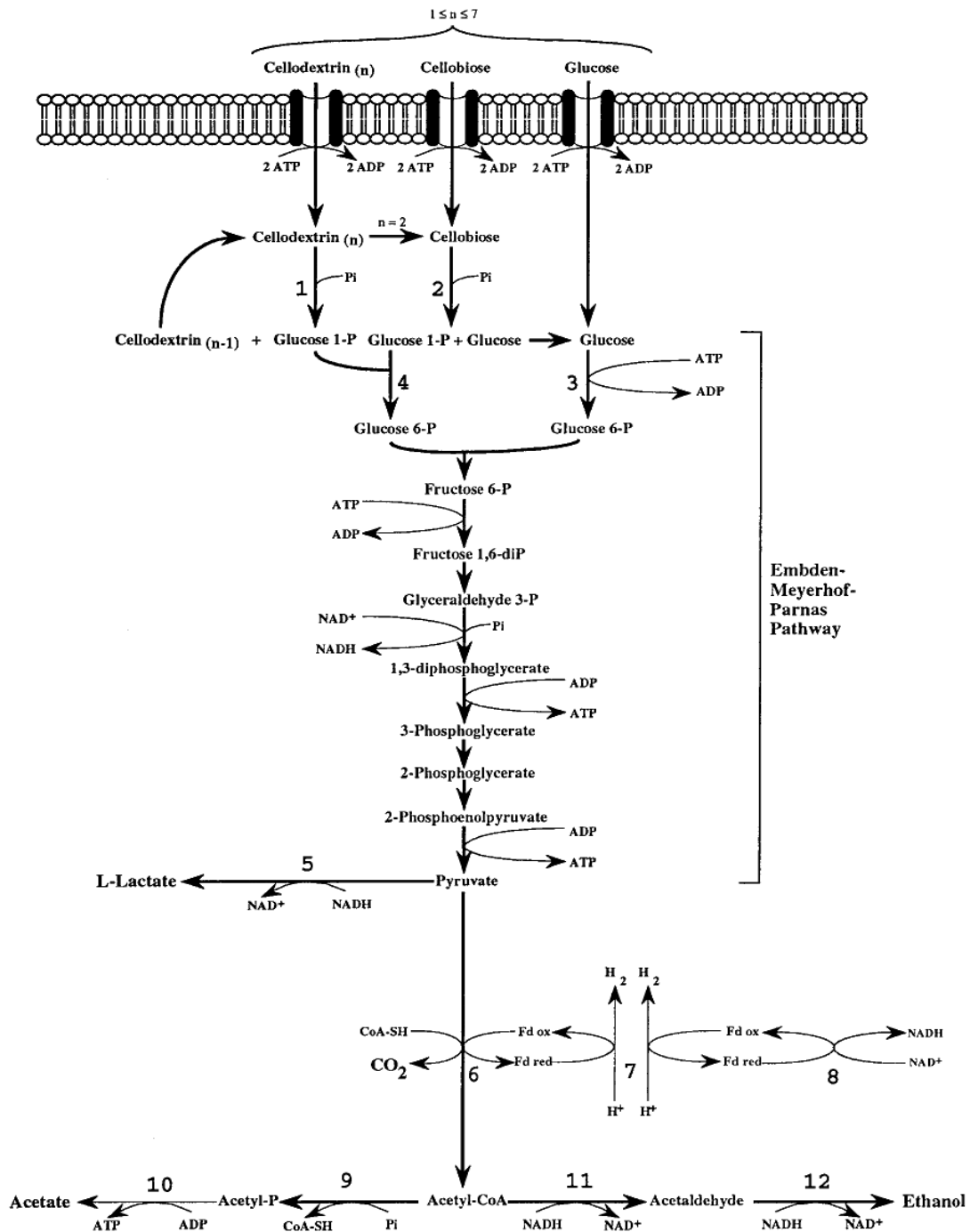


圖 2-7 *Clostridium cellulolyticum* 之纖維寡糖代謝途徑

(1, cellodextrin phosphorylase; 2, cellobiose phosphorylase; 3, glucokinase; 4, phosphoglucomutase; 5, L-lactate dehydrogenase; 6, pyruvate-Fd oxidoreductase; 7, hydrogenase; 8, NADH-Fd reductase; 9, phosphotransacetylase; 10, acetate kinase; 11, acetaldehyde dehydrogenase; 12, Alcohol dehydrogenase. CoA-SH, coenzyme A; ox, oxidized; red, reduced. Fd, ferredoxin) (Desvaux et al., 2000)。

2.4 厭氧微生物產氫影響因子

在不同之環境下，細菌的產氫機制會因環境條件不同而改變。環境因子包含許多種類，其中有基質濃度、溫度、pH 值、營養鹽和震盪影響等，以下就幾種影響因素整理說明。

2.4.1 溫度

生物的生長過程，有賴於體內的化學反應，而此化學反應速率則可受部分溫度的影響。細菌同樣也受溫度的作用，而影響到其生長量，型態或代謝作用。因此，所有生物(包括細菌)必須生存在它們所適合的溫度範圍中，細菌生長所需溫度各有不同，對於每種細菌而言，在其最適生長溫度時，繁殖增生之速率最快，酵素也能夠發揮最大的作用。若在最低或最高溫度時，細菌之生長繁殖會有顯著的降低。有些細菌在低溫時，可產生色素，高溫時，則不明顯。其它譬如在營養需求與形態之變化上，亦可受溫度之影響。溫度之提高可增進微生物對有機物之分解；中溫操作有利於脂質之分解，高溫則有利於有機物質之去除(Lo *et al.*, 2008)。所有微生物的生長過程均與其體內之生化反應息息相關，而此等反應速率受到溫度的控制，根據凡得霍夫定律，在一定的溫度範圍內，每升高 10°C 反應速率增加一倍，因此微生物

生長的狀態極受溫度影響。除了生長速率外，營養需求、化學組織、細胞形態的變化等均會受溫度之影響(Rheinheimer, 1992)。

2.4.2 pH 值

大多數的細菌所生長的pH值範圍約為5~9 之間，最適合生長的pH值則是近中性的6.5~7.5之內，此pH值愈與其生長所在之酸鹼度相近者愈佳(王及張, 1993)。少數細菌可生長於極酸或極鹼的環境中，因此又有嗜酸菌、嗜中性菌及嗜鹼菌之分。在厭氧生物產氫程序中，由於大量的酸生成將形成一個低pH的酸性環境，酸性的環境將造成hydrogenase的活性下降或微生物代謝途徑的改變，甚至在極端的環境下，會直接毒害微生物。環境的酸化主要影響微生物的增殖，對於有機物的裂解及攝取影響則較小。實際上，對於厭氧產氫微生物而言，最佳的生長pH值範圍為pH=4 ~ 9(張, 2001)。所以，當以混合菌群進行生物產氫時，由於每種微生物對於環境的需求不同，因此，當環境有微小變化時，對於系統的穩定性並不會有明顯的影響。

2.4.3 基質

基質之種類對於產氫菌有極大的影響，每種菌所擁有的酵素及代謝途徑不同，所以對於各種基質的利用力不同。由之前研究可知，利用不同種類基質在馴養汙泥時，同一批汙泥可馴養出之菌種也不同，

基質的濃度會對於產氫菌種造成影響(徐氏，2007)。當基質濃度過低時，細菌會因碳源過少而生長受到限制，代謝降低，造成產氫效果降低；當濃度過高時可能使微生物有機負荷過高，且代謝產物大量累積，造成抑制，而導致產氫效果減低。

2.4.4 營養鹽

微生物藉代謝有機或無機化合物而獲取能量，而為了微生物代謝所需，通常都需要添加N、C、P等主要營養鹽，及微量的Ca、Mg、S、Fe...等元素。各種細菌對於營養物質的需要不盡相同，某些細菌可以利用硝酸鹽，某些細菌則是需要有機氮化合物。碳為有機物的基本元素，而且所有的生物循環都含碳素循環，如果有某處碳循環受阻礙，則無法保持正常運行而使整個循環系統混亂。一般細菌最適當之碳源為單糖類如葡萄糖或果糖、雙糖類如蔗糖、麥芽糖或乳糖、多糖類如澱粉、纖維素。少量的無機鹽類也是微生物生存所需要的，如磷、硫及鐵等元素。磷在生物體內是構成蛋白質、磷脂質、磷酸脂等重要的成分，尤其是對於醱酵及呼吸作用而言，磷酸鹽類是能量代謝之核心；而微生物細胞內有許多成分是有機硫化物，像硫胺素、半胱胺酸等，所以對微生物來說，硫是一種必需性元素；鐵為還原性的無機物，可作為電子的供應者，其藉由一連串複雜的酵素反應，將能量傳遞給生物以作為合成細胞及維持生命所需(楊氏，2004)。

在厭氧生物產氫反應中，產氫酵素(hydrogenase)為其重要酵素之一，此重要酵素又可區分為兩大類，分別為nickel-iron (Ni-Fe) hydrogenases 和 iron-iron (Fe-Fe) hydrogenases (Wang and Wan, 2008 ; Alshiyab *et. al.*, 2008)。厭氧產氫菌利用hydrogenase 和 ferredoxin的作用，將體內氧化有機物多餘的電子經由此酵素系統轉移給氫離子形成氫氣而排除體外(Chen *et al.*, 1974 ; Adams *et al.*, 1980)，減少體內多餘電子的壓力。鐵離子為構成hydrogenase(E.C. 1.12.7.1)重要金屬元素之一，每分子的hydrogenase中含有12 個原子的鐵離子。Peguín and Soucaille (1995)等人提出，當環境中缺乏鐵離子時，*C. acetobutylicum* 胞內的hydrogenase 活性會降低，且鐵離子的濃度低於 $25 \mu\text{mol l}^{-1}$ 時，*C. acetobutylicum* 的生長是受到限制的，當鐵離子的濃度低於 $0.7 \mu\text{mol l}^{-1}$ 時，*C. acetobutylicum* 的hydrogenase 活性會下降(Junelles *et al.*, 1988)。Schoenheit(1979)等人則指出當環境中，鐵離子濃度低於 $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ 時，*C. pasteurianum* 的生長是受到限制的。Dabrock(1992)等人則提出，雖然 $10 \mu\text{mol l}^{-1}$ 的鐵離子濃度會影響*C. pasteurianum* 的生長，但並不會影響氫氣的生成。由以上得知，不同的*Clostridium* 種類對於鐵離子濃度的需求是不同的，但鐵離子的存在是必須的。

Wang and Wan (2008)等人指出，當環境中有 Ni^{2+} 存在時，累積產氫量確實會受到影響，當 Ni^{2+} 濃度從 0 mg/L 增加至 0.1 mg/L 時，氫氣的產量可上升至最大 288.6 mL 及氫氣產率可上升至最大 296.1 mL/g glucose，當 Ni^{2+} 濃度高於 0.1 mg/L 之後，氫氣產量及產率便會逐漸地下降至鎳離子濃度 50 mg/L 約 120 mL 的產氫量及 124 mL/g glucose 的產率，這指出適當的鎳離子濃度能夠高氫氣的產量，但 Ni^{2+} 濃度過高反而會造成抑制，導致產氫量降低。

第三章 實驗方法與材料

3.1 實驗流程設計

本研究乃由前人(傅氏, 2009)研究中取得已經過鑑定之乳牛纖維水解產氫菌株 *Clostridium thermocellum* strain TCW1, 利用 α -cellulose 為基質, 測試其對環境及替代能源供應有特殊貢獻之能力, 並探討最佳生長及產氫因素包括最佳溫度、基質濃度、pH、不同種類之微量元素及其濃度及震盪搖瓶測試, 以便進行未來之發展與應用。實驗設計流程如圖 3-1 所示。

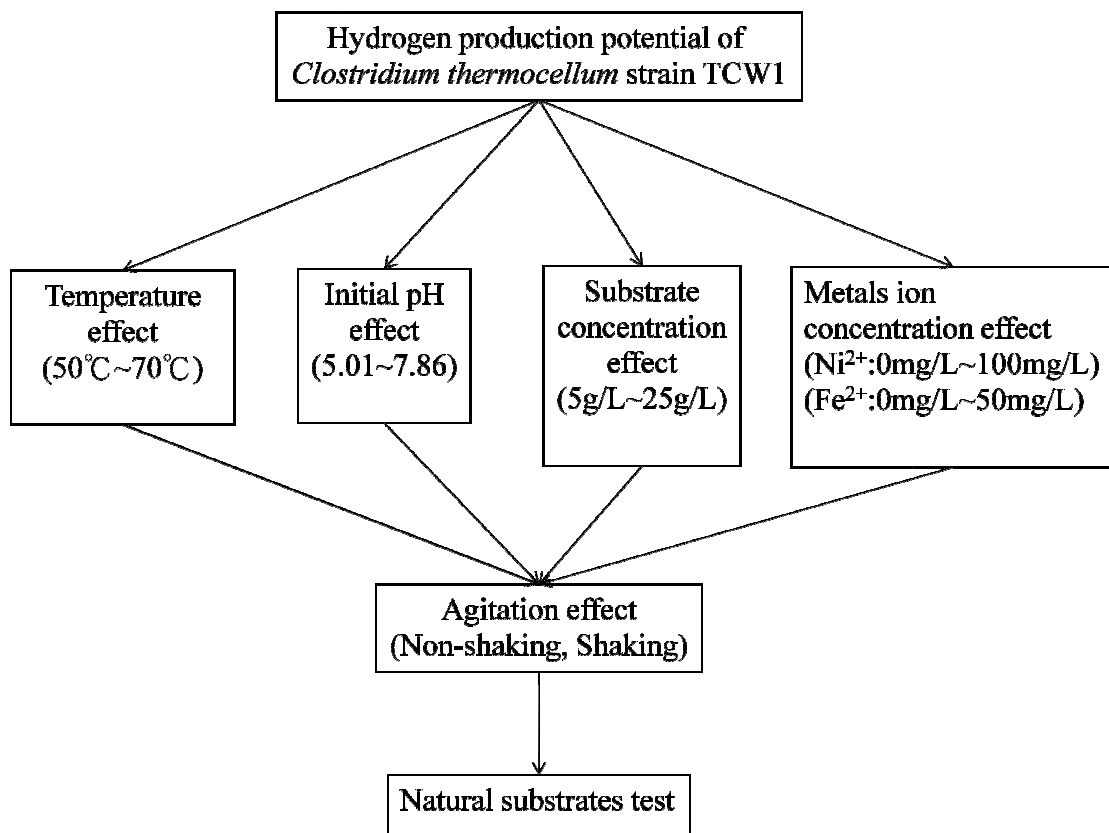


圖 3-1 實驗設計流程

3.2 菌種來源

本研究所使用之微生物樣本為經前人自東海大學之乳牛糞肥中所分離，經前人之篩選及研究中發現此菌株經馴養後可於五天內完全降解 5 g/L 之纖維濾紙產生並累積醣類及大量氣體，以此菌株之還原醣產生速率而言，strain TCW1 最大可達到約 72.9 mg/L · hr，且以纖維水解速率來比較 strain TCW1 也是有較佳的表現(傅氏，2009)。整體而言，此菌株之纖維水解速率及還原醣產率較其他所共同分離之菌株為佳，且在水解纖維產醣之同時也會產生大量之氣體，因此便以此菌株做為後續產氣實驗菌株。

3.3 菌種培養

3.3.1 厭氧操作

本研究利用 Hungate 厭氧操作程序(Hungate, 1969; Macy *et al.*, 1972)以維持培養基及實驗過程時絕對厭氧情況，主要的操作設施—厭氧加氣站如圖 3-2 所示。主體為三種不同之氣體鋼瓶，氣體分別為氫氣、氮氣及混合氣(20% CO₂ + 80% N₂)，加上銅絲加熱包並以高氣密性之銅管或軟管連接，以供應配製培養基或植種過程所需之氣體。使用前須先將加熱包升溫至約 200 ~ 250 °C，通氫氣約 5 分鐘，使氫氣與 CuO 反應將加熱包中之銅絲還原，還原完成時銅絲會呈現亮銅

色，此過程讓銅絲還原，可捕捉後續使用氣體中剩餘之氧氣形成 CuO 而達到厭氧之目的，經除氧之氣體以滅菌針頭來使用。

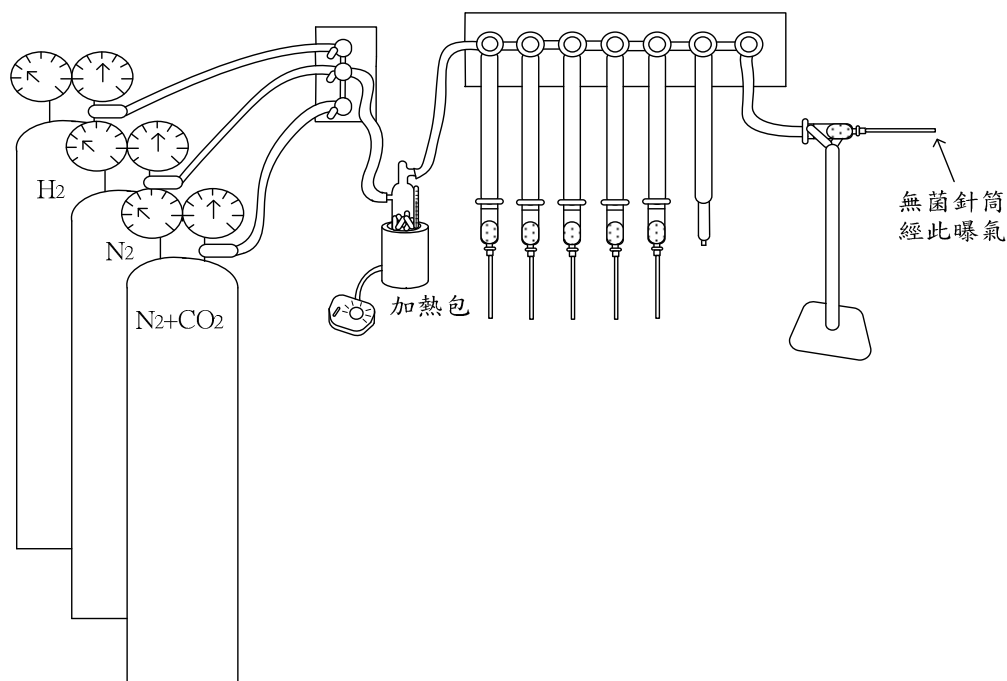


圖 3-2 Hungate 厭氧加氣站示意圖。

3.3.2 嗜熱厭氧培養基

研究過程中所使用之培養基為嗜熱厭氧 (Thermophilic anaerobic, TA) 培養基(Huang *et al.*, 1998)將配合厭氧操作來配製，其基本成分如表 3-1 所示。配置培養基時先曝以氮氣，加入去離子水，然後將無機鹽類、微量元素儲備溶液(如表 3-2)分別以定量加入，隨後加入氧氣指示劑 resazurin 並煮沸之，待沸騰後去除溶氧後冷卻至 50~60°C 左右。此時，將所曝之氮氣轉換為混合氣(20% CO₂ + 80% N₂)繼續曝氣，

加入 L-Cysteine hydrochloride 用以還原培養基以及 NaHCO_3 提供鹼度，最後待培養基冷卻至室溫或轉為透明無色時便完成培養基之除氧過程，再分裝 50 mL 至已加入纖維碳源之總體積為 125 mL 厭氧血清瓶後滅菌，以上培養基配置全程皆以厭氧加氣站曝氣，以維持培養基中絕對厭氧之情形。完成上述之步驟後，將培養基置入滅菌釜以高溫高壓滅菌，經滅菌後之培養基在植菌前會先加入 Na_2S ，以避免培養基中含有氧氣，之後並依序加入 1% vitamin solution(如表 3-3)、1% yeast extract 和 1% peptone，最後接種以植入 10 % 體積之菌液後，便開始實驗。

表 3-1 TA 培養基成分

Component	Content (L ⁻¹)	Source
Carbon source		
Cellulosic materials ¹		
K ₂ HPO ₄	0.40g	和光試藥
CaCl ₂	0.05g	和光試藥
MgCl ₂	0.10g	Riedel-de Haën
(NH ₄)Cl	1.00g	Riedel-de Haën
Trace element solution ²	1.00mL	
Resazurin	0.0005g	Sigma
L-Cysteine hydrochloride*	0.50g	Sigma
NaHCO ₃ *	4.00g	Riedel-de Haën
Na ₂ S**	0.25g	Sigma
Yeast extract**	1.00g	CONDA
Peptone**	1.00g	Difco
Vitamin solution ^{3**}	10.0mL	

1: 視實驗之需要配以不同成分及濃度之纖維性碳源，

2: Trace element solution 成分如表 3-2，

3: Vitamin solution 成分如表 3-3，

*: 煮沸後加入，

** : 滅菌後植菌前加入。

表 3-2 Trace element solution 成分

Component	Content (L ⁻¹)	Source
Conc. HCl*	1.0ml	Riedel-de Haën
NiCl ₂	0.05g	Riedel-de Haën
H ₃ BO ₃	0.05g	Riedel-de Haën
FeCl ₂	2.00g	Riedel-de Haën
CuCl ₂	0.03g	Riedel-de Haën
ZnCl ₂	0.05g	Riedel-de Haën
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	0.05g	Riedel-de Haën
MnCl ₂	0.05g	Riedel-de Haën
CoCl ₂	0.05g	Riedel-de Haën
AlCl ₃	0.05g	Riedel-de Haën
Na ₂ SeO ₃	0.10g	Riedel-de Haën

*: 先以少許水稀釋濃鹽酸後再分別加入各微量金屬。

表 3-3 Vitamin solution 成分

Component	Content (L ⁻¹)	Source
Biotin	2.0mg	Sigma
Thiamine-HCl	5.0mg	Sigma
Pyridoxine-HCl	10.0mg	Sigma
Nicotinic acid	5.0mg	Sigma
Riboflavin	5.0mg	Sigma
Vitamin B12	0.1mg	Sigma
DL-Ca-pantothenate	5.0mg	Sigma
Lipoic acid	5.0mg	Sigma
P-aminobenzoic acid	5.0mg	Sigma
Folic acid	2.0mg	Sigma

3.4 產氫反應最適化探討

針對 strain TCW1 水解纖維素並產生氫氣的最適化條件進行探討。程序最適條件探討包括溫度、基質濃度、pH 值、微量元素及搖瓶等測試，每隔固定反應時間檢測其氣體產量及氫氣濃度、蛋白質濃度、纖維素濃度及還原糖濃度。每一培養條件為一組，每一組至少為 2 個血清瓶，每瓶之培養液體積皆為 50mL，並進行二重覆。各批次實驗皆以菌液培養至纖維素開始明顯降解，約培養 48 小時後，作為植種來源以進行下列各項實驗。

3.4.1 生長溫度

對於微生物的生長，溫度是一個相當重要的影響因子，當培養於適當之溫度條件下，菌株之生長量及氫氣產量會有正向的結果。實驗選定以 α -cellulose 作為纖維碳源之代表，由於牛糞混菌時期馴養溫度為 55°C，上下調整溫度測試範圍，分別為 50、55、60、65、70°C，並監測其生長、水解纖維素及產氫的情形。

3.4.2 基質濃度

基質為微生物的碳源來源，而碳為有機體(Organism)的主要組成元素，因此基質濃度便直接關係著微生物的生長、代謝及產物。以 α

-cellulose 為單一碳源，選取 5、10、15、20、25 g/L 之不同添加量至培養基中，監測細胞之還原糖產率、纖維水解速率、氫氣產量及液相產物。

3.4.3 pH

對於產氫，pH 是一個決定性的因子，酸鹼度會影響菌株生長速率甚至會抑制生長，在 pH 值過高或過低的環境下，會影響酵素或代謝系統，降低微生物生長的活性(Fang and Liu, 2002 ; Khanal *et .al.*, 2004 ; 王氏，2008)，因此，pH 對於纖維水解或產氫來說皆有重大的影響。故為測試此菌株之最適產氫 pH 範圍，利用 TA 培養基中本身含有 NaHCO_3 與瓶頂所填充的 CO_2 之交互作用而形成封閉的碳酸緩衝系統，因此本實驗藉由調整 NaHCO_3 含量來改變初始 pH 值，此做法與添加酸性或鹼性緩衝溶液來說，並不會對培養基之組成有任何影響，實驗較具一致性。實驗之配置初始 pH 範圍自 5.01~7.86，培養基經滅菌後，加入營養物質並植菌後，實際值會比原先所測量略低，培養時監測其生長、還原糖產率、氫氣濃度、纖維素降解量及液相產物。

3.4.4 微量元素

在厭氧生物產氫的反應中，微量元素扮演著舉足輕重的角色，僅需非常少量就能夠對產氫量有明顯之影響，本次試驗分為兩種不同的微量元素，分別為亞鐵離子(Fe^{2+})及鎳離子(Ni^{2+})。由於文獻(Alshiyab *et al.*, 2008 ; Wang and Wan, 2008)中所提及之 Fe^{2+} 皆為 FeSO_4 ，與本實驗室所使用的 FeCl_2 有所差異，因此必須先以 FeSO_4 及 FeCl_2 進行先前試驗，比較這兩種亞鐵離子是否會對培養基或菌體產生影響，以利後續進行不同濃度之亞鐵(Fe^{2+})離子試驗。實驗前需先調配不含 Fe^{2+} 之微量元素 solution，並與之前泡製培養基時一同加熱煮沸並除氧。另外再調配單獨含有 FeSO_4 及 FeCl_2 之儲備溶液各一瓶，以便後續泡製培養基時方便調整 Fe^{2+} 之濃度，此部分之兩種不同亞鐵離子之儲備溶液，分別以不同的量加入血清瓶中，其中亞鐵離子的濃度就會依加入的量而不同。

在鎳離子方面，由於 TA 培養基中原本就含有鎳離子，因此僅需重新調配微量元素(無 NiCl_2)之儲備溶液，將 NiCl_2 另外配置為單獨之儲備溶液，其餘做法與亞鐵離子相同。

整個實驗過程皆是以最佳之產氫溫度 60°C、pH 7.0 及 5 g/L 之基質進行，每隔 12 小時以排水集氣法收集所產生之生物氣體，進行氫氣含量分析。

3.4.5 震盪培養(Agitation)對產氫的影響

為探討本研究菌株產氫潛能，採用批次震盪培養產氫測試，震盪培養是利用培養箱(TKS, Orbital shaking incubator OSI-500-H)，來達成批次血清瓶培養無法做到的攪拌效果。由於纖維基質為固態且易沉澱，因此在培養之過程中為非均質態，以化學反應而言，反應劑若能有充足的機會與反應物(基質)接觸，將對反應速率有利，且可將易溶於培養液中之氫分子驅趕至瓶頂空間，此論點在許多文獻中(Lejeune and Baron, 1995 ; Freier *et al.*, 1988)也有所探討。

實驗之反應容器為 125 mL 厭氧血清瓶，總反應體積為 50 mL，培養於菌株之最佳生長情況，以 160 rpm 搖晃血清瓶，高於此轉速可使纖維素基質完全懸浮而不發生沉澱。yeast extract 和 peptone 濃度皆為 1 g/L，pH 控制於 7.00 左右，基質濃度為 5 g/L，培養溫度為 60 °C。氣體採樣及液體採樣由頂部橡膠塞部份以注射針抽取，氣體產生量以間斷式排氣方式計算，以排水集氣法計算單位時間中所產生之總氣體體積量，反應瓶之設置如圖 3-5。

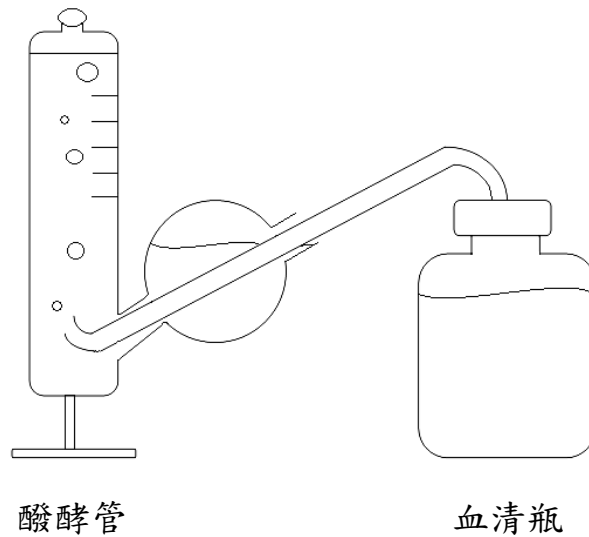


圖 3-3 生物產氮實驗反應設置

3.5 分析方法

3.5.1 蛋白質分析

蛋白質為構成細胞之主要成分，因此細胞的多寡可利用蛋白質來測定。由於不可溶的基質會使培養基成混濁狀，無法以 OD_{600} 分析，於是改以蛋白質總量用以分析培養基中微生物生長之情況。本實驗以 Bradford 測量細胞蛋白質方法(Bradford, 1976)，使用市售之蛋白質分析套件(Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA)進行分析，此方法原理為 Coomassie Brilliant Blue G-250 會與蛋白質結合的特性，在 G-250 與蛋白質結合後，G-250 的顏色會從紅色轉變成為藍色，此時在 595 nm 波長下會有較高的吸收度以便測定。以牛血清蛋白作為標準品配置檢量線(如附錄一)，即可推算出樣品中之蛋白質濃度。其實驗步驟

為先取 0.5 mL 的培養液，離心(13,300 g；10 min)後去除上澄液。之後再加入 1 mL Tris buffer (pH 7.6)懸浮細胞，離心後去除上澄液，再重覆此步驟一次。經離心去除上澄液後之沉澱物再加入 0.9 mL Tris buffer (pH 7.6)及 0.1 mL 1N NaOH，以懸浮細胞。以 100°C 沸騰水加熱 10 分鐘，離心並經稀釋後取 0.8 mL 上澄液，加入 0.2 mL Bio-Rad Protein Assay dye reagent 染色。最後以分光光度計(spectrophotometer；SHIMADZU, UVmini-1240)在 595 nm 波長下測量吸收值。使用牛血清蛋白(Bovine serum albumin)作為檢量線之標準品，以內插法求得菌液中樣品之蛋白質量。

3.5.2 纖維素濃度測定

纖維素含量乃是以恩酮比色法(Colorimetric method)測定，因纖維素為多醣類，雖然糖分子間的鍵結非常穩定，但經強酸破壞下可水解成葡萄糖，再以特定化學物與糖分子結合並且呈色達到定量之目的。醣類(carbohydrate)與恩酮試劑(anthrone reagent， $C_{14}H_{10}O$)反應後會呈現深綠色(Updegraff，1969)。本研究中便是先以弱酸配合加熱去除培養液中細胞的干擾，再用濃硫酸水解纖維素，最後以恩酮試劑呈色而有深綠色產生並以分光光度計 (spectrophotometer) 在波長 620 nm 之下定量之 (Viles and Silverman, 1949)。

實驗前須先配置醋酸：硝酸溶液：將濃醋酸（80 %）與濃硝酸（65 %）以 10:1 (v/v) 比例混合而得。恩酮試劑：將 0.2 g anthrone (Sigma) 直接溶於 96 % 濃硫酸並定量至 100 ml 後冷藏 2 小時方可使用。以 α -cellulose (Sigma) 作為纖維素標準品配製檢量線（附錄二）。其詳細實驗步驟為先取 1 ml 含纖維素之培養液樣本，以 13,300 g \times 10 min 離心後除去上澄液。加入 0.3 ml 預先配置好的醋酸：硝酸溶液均勻混合，置於沸水浴 30 min 破除細胞。經沸水浴後以 13,300 g \times 10 min 離心後除去上澄液。之後以去離子水清洗剩餘纖維素，再以 13,300 g \times 10 min 離心後除去上澄液。將上澄液完全去除之後再加入 0.2 mL 濃硫酸（96 % ; v/v）混合均勻，以 Vortex-Mixer 震盪直至纖維素水解完全，如有沉澱則較多需較久的反應時間。取 0.1 mL 經硫酸混合均勻之溶液稀釋至 10mL。再取 1mL 之稀釋溶液加入 2 mL 預先冷藏過的恩酮試劑，混合均勻。以沸水浴 16 min 反映後會呈現黃綠色，再用冰水冷卻 (2-3 min)，放置室溫 (5-10 min)。最後以分光光度計（UV/visible Spectrophotometer, Shimadzu, UV mini-1240）在 620 nm 波長光下測其吸收值，將所得之值代入檢量線求出纖維素濃度，纖維素濃度檢量線如附錄二。

3.5.3 還原糖濃度測定

還原糖濃度測定主要是利用 DNS 法(Miller, 1959), 並加以修改之(吳氏, 2006)。含有醛基(CHO)的糖類具有還原力, 能將 3,5-二硝基-水楊酸(3,5-Dinitrosalicylic acid)還原成 3-氨基-5-硝基-水楊酸(3-amino-5nitro-salicylic acid)。而纖維素水解所產生的寡糖類、纖維雙糖及葡萄糖等含有醛基, 因此而具有還原力, 將其他物種還原而使自身氧化成有機酸。DNS 法最主要是利用 DNS 試劑(表 3-4 所示)中的 3,5-二硝基-水楊酸與還原糖之間所引起的呈色反應, 作為判斷還原糖量多寡的依據。其 DNS 試劑(100 mL)配置步驟為先將 1.6 g NaOH 利用少量之去離子水溶解, 將溶液調整至鹼性。待 NaOH 完全溶解後加入 30 g 酒石酸鉀鈉(K-Na-tartrate-4H₂O), 再加入 1 g 3,5-二硝基水楊酸(3,5-Dinitrosalicylic acid ; E. Merck 試藥級), 使其完全溶解於溶液中。最後再以去離子水定量至 100 mL, 保存於 4°C 陰暗處。

表 3-4 DNS 試劑成分(3,5-二硝基水楊酸試劑)

成分	濃度(g/100 mL)
NaOH	1.6
K-Na-tartrate-4H ₂ O	30
3,5-Dinitrosalicylic acid	1.0

欲測定還原糖之實驗步驟如下所示：先取 1 mL 培養菌液，經 13,300 g × 5 min 離心沉澱細胞，上清液移至乾淨之離心管，細胞沉澱(pellet)丟棄或做總蛋白質分析。接著取 0.5 mL 已移至乾淨離心管之上清液或經適量稀釋之上清液置於玻璃試管中，再加入 0.5 mL 先前已配置好的 DNS 試劑，經均勻震盪後，以隔水加熱法將玻璃試管置於沸水浴中反應 10 min。待反應 10 min 後，將反應之玻璃試管自沸水浴中取出，以冷水迅速將其冷卻至室溫，使其達到終止反應的效果，以分光光度計 (UV/visible Spectrophotometer, Shimadzu, UV mini-1240) 在波長 540 nm 下測定其吸光值，將所得之值代入檢量線求出還原糖濃度，還原糖檢量線以葡萄糖為標準，檢量線如附錄三。

3.5.4 氫氣濃度分析

常見厭氧菌如本研究中之 *Clostridium* 屬菌種，其主要的氣相產物為氫氣和二氧化碳，氫氣濃度分析以 SHIMADZU GC-14B Gas Chromatograph with thermal conductivity detector (TCD)，其所使用之管柱為玻璃管柱(長度 2.1 m，內徑 3.2 mm)，填充物為 Molecular Sieve 5A 60/80 mesh，以氫氣為載流氣體(流速為 25 mL/min)，注入之樣本體積為 0.2 mL，分析條件設定為管柱溫度為 50°C、injection temperature 120°C、TCD temperature 140°C、current 60 mA。實驗設計以批次培養方式，以固定間隔之時間點利用排水集氣法來蒐集培養瓶中所產生之

氣體，監測其氣體量並分析其中之氫氣含量，氫氣濃度檢量線如附錄五。

3.5.5 高效液相層析(HPLC)分析代謝產物

為了解纖維素物質經由 strain TCW1 水解後之產物，包括寡糖、單糖以及代謝後的揮發性脂肪酸，以高效液相層析儀 (Shimadze) 測定其種類及濃度。注射量為 20 μl ，移動相為 0.008N H_2SO_4 溶液 (流速為 0.6 mL/min)，分析管柱為 *Transgenomic* COREGEL 87H3 (300 mm \times 7.8 mm)，偵測器為 RI-detector (Shimadze, RID-10A)。根據 strain TCW1 可能產生之中間醣類以及代謝產物物質，選定之標準品包含葡萄糖、纖維二糖、木糖、乳酸、乙酸、乙醇，分別配製檢量線以定量 (附錄四)。

3.5.6 產氫能力分析

微生物代謝過程之變化，會先有一段遲滯期(λ)的產生，再進入對數生長期，也就是最大反應速率(R_m)，然後進入穩定期，此時所對應的結果則為成長或代謝反應的平衡點，本文對於產氣數據的整理是使用 Gompertz Model (Zwietering *et al.*, 1990)，將累積產氣量時間圖中的變化曲線以 Gompertz equation 迴歸。該式最早為人口成長模式，後來被應用於細菌成長模式。其原方程式如 3-1 式：

$$y = a \times \exp[-\exp(b - ct)] \quad (3-1)$$

此模式僅描述細菌數目，並不如 Monod model 一樣包括基質 (substrate) 的消耗問題。方程式中之 a、b、c 等參數並無生物上的意義，因此須將模式做適當修正，使模式更利於對生物生長的描述。其修正式如 3-2 式：

$$H = H_{max} \times \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_{max,H_2} \times e}{H_{max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (3-2)$$

H = 累積產氣量 (mL)

H_{max} = 平衡時產氣量 (mL)

λ = 遲滯期 (hr) (lag phase)

t = 反應時間 (hr)

R_{max,H_2} = 最大產氫速率 (mL/hr)

將實驗數據代入修正式中可迴歸得到 λ 、 H 及 R_{max} 三參數； λ 為產氫菌的適應期，隨植入的菌種來源而有差異； R_m 為最大產氫速率，除以菌量可得單位菌量產氫速率； H 為最終產氣量，受基質量及菌種的產氫能力影響 (白，1999)。

3.6 天然纖維基質測試

纖維素為陸生植物組成之一，為了測試 strain TCW1 能否實際利用天然纖維素基質產氫，分別選擇了狼尾草、稻桿、橘子皮、菜葉為單一碳源進行測試，監測其生長、還原糖濃度、液相產物及氫氣濃度。

狼尾草 (Napier grass，學名為 *Pennisetum purpureum*) (台畜草二號)

一般廣稱為象草(elephantgrass)，是原產於非洲的多年生C4型植物，具有生產快速、產量高、無病蟲害、耐高溫等特性。目前台灣推廣的品種-台畜二號，是農委會畜產所成游貴博士團隊經多年努力育成之優良牧草品種。年乾物質產量每公頃高達50-80噸（隨季節、地區及管理方式而異），纖維素含量高達40-45%，極有潛力成為熱帶與亞熱帶地區之新興纖維能源作物(古氏，2008)。狼尾草是目前極受注目的生質作物之一，雖然糖分相較其他種類之作物低，但可從育種族群中選育高產量與高糖度的狼尾草。本研究以自國立成功大學環境工程學系所取得之狼尾草乾粉末，作為培養碳源。

稻桿來自台灣中部地區某農田，經由破碎機破碎之後，以 50 mash 的篩網過篩後，作為培養碳源。

橘子皮及蔬菜葉都來自台灣中部某傳統市場，蔬菜葉以高麗菜為代表，兩者以清水洗淨去除表面髒污之後，將其以果汁機(Super Mum, Hi-Fiber Nutrition Processor, HF-2002P)破碎後直接作為培養碳源。

上述所有天然纖維性碳源配置於培養基之最終濃度皆為 5 g/L，以利與先前最適化產氫之條件相比較。

第四章 結果與討論

4.1 纖維水解產氫菌株

本實驗室先前已自乳牛糞肥中篩選出一株高效纖維水解產氫菌株 strain TCW1，此菌株經與 NCBI 生物資料庫之 16S rDNA 序列比對分析判定為 *Clostridium* 屬，與 strain TCW1 最接近之菌株為 *Clostridium thermocellum* 標準菌株 DSM 1237 (DSM 1237=ATCC 27405=JCM 12338)，而根據 NCBI 比對 16S rDNA 相似度為 96 % (傅氏，2009)。

在前人之纖維水解醱化試驗中，可知 strain TCW1 培養在 65°C 時，可將 5 g/L 纖維素在 48 小時內快速水解並累積量醱類，其還原醱累積產量約 3870 mg/L，同時也會產生生物氣體約 1500 mL/L · liquid，經分析後，發現此菌株有同時水解纖維素並產氫的能力，顯示此菌株仍有進一步研究其水解纖維素之價值，期望未來可利用天然纖維廢棄物進行廢棄物轉化為再生能源之功效。

由於 strain TCW1 能夠利用纖維素直接產氫，將原本需設置兩個反應槽(纖維水解槽和產氫反應槽)之二階段步驟縮短為單一反應槽產氫的一階段步驟，在未來將更具有生物產氫之經濟價值。因此本研究以直接利用纖維素產生生物氫氣最適化條件之探討為研究目標。

4.2 溫度之影響

4.2.1 溫度因子對生長、纖維素水解及產氫之影響

溫度對於細菌生長有著直接的影響，本實驗為了測試 strain TCW1 在較佳的水解纖維產氫之條件時的情況，以對往後 strain TCW1 在進行直接利用纖維素產氫應用時有所依據。實驗進行時利用不同溫度以 α -cellulose 為單一碳源進行測試，並以蛋白質量監測細胞生長。結果如圖 4-1(A)所示，strain TCW1 於 70°C 時無生長現象，strain TCW1 可生長之範圍介於 50 至 65°C，其蛋白質量最高可達 373.6 mg/L，可判定為嗜熱菌種。

在纖維生物質產能的製程中，纖維素的水解是速率決定步驟(Lai *et al.*, 2001; Noike *et al.*, 1985)，因此本實驗利用不同培養溫度，比較 strain TCW1 水解纖維素之能力，以了解溫度對纖維水解反應之影響。圖 4-1(B)可以看出 strain TCW1 的纖維水解反應在 55~60°C 是無差異的，均可將培養液中 5 g/L 之纖維素完全降解。在 70°C 時，纖維素水解的速度明顯較其他溫度慢了許多，若與生長溫度相比較，細胞在 70°C 時的生長情況不佳，菌體少相對的也會影響到水解速率。

溫度不僅僅會影響細胞的生長，也會影響產物的產出，若以生長趨勢相比較，其生長會與氫氣濃度的趨勢相類似(圖 4-1C)，僅在 65

°C時會有所差異，strain TCW1 的生長雖然沒有與其他溫度類似，但其產氫濃度則是與其他溫度相類似，推測可能是因為溫度雖然影響了細胞的生長，但對產氫酵素的作用影響不大，而在 60°C 時的產氫酵素活性可能為最佳，因此在此溫度培養下的氫氣濃度能有較好的表現，最高氫氣濃度可達 19.56 %，所有產氫反應幾乎都在 48 小時左右便逐漸趨於平緩，推測可能是培養基中的酸含量逐漸升高，導致對產氫反應開始有所抑制，而使產氫量逐漸減少。

當溫度從 50°C 升高到 60°C 時，生物氣體的產量會逐漸地上升，超過 60°C 之後生物氣體產量便開始往下降，而其中氫氣產量也會因溫度的變動而有些微的差異，在溫度為 60°C 時產氫量會有一個較佳的表現，可達 287.9 mL/L · liquid，但溫度達到 70°C 時幾乎沒有氫氣的產生，僅只有 8.13 mL/L liquid 的氫氣產出(圖 4-2)。

以氫氣產率來說，結果如圖 4-3 所示，溫度自 50-65°C 的氫氣產率相當接近，但在 60°C 時能有較佳的產氫及纖維水解表現，其氫氣產率可達 57.75 mL/g cellulose，且在此溫度細胞也可以將培養基中之纖維素完全利用，因此後續之產氫試驗培養溫度均維持 60°C。

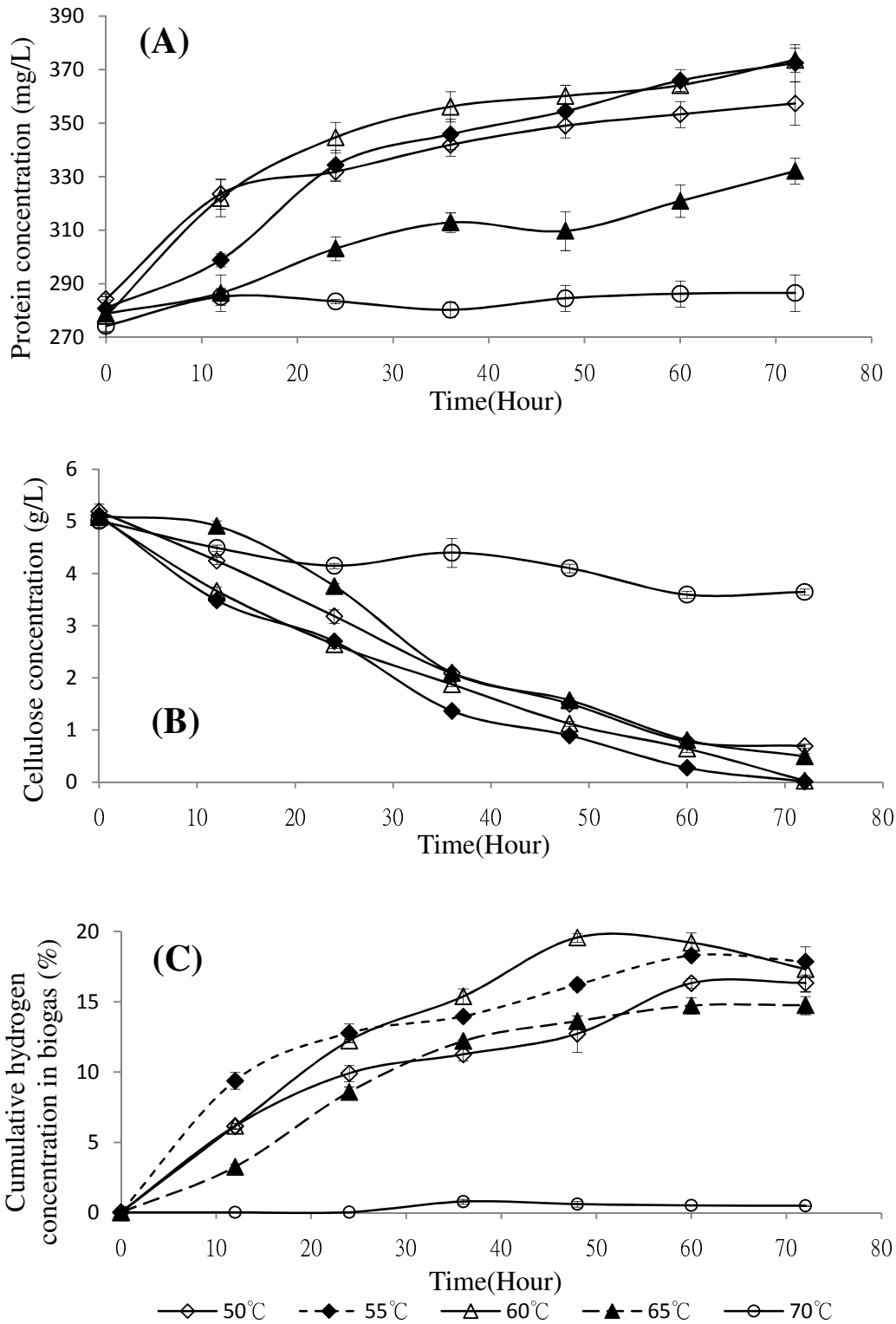


圖 4-1 Strain TCW1 以 5 g/L α -cellulose 為單一碳源，分別培養在 50-70°C 情況下之(A)生長、(B)纖維水解及(C)產氫濃度時間曲線圖，每組實驗皆以二重複表示其再現性。

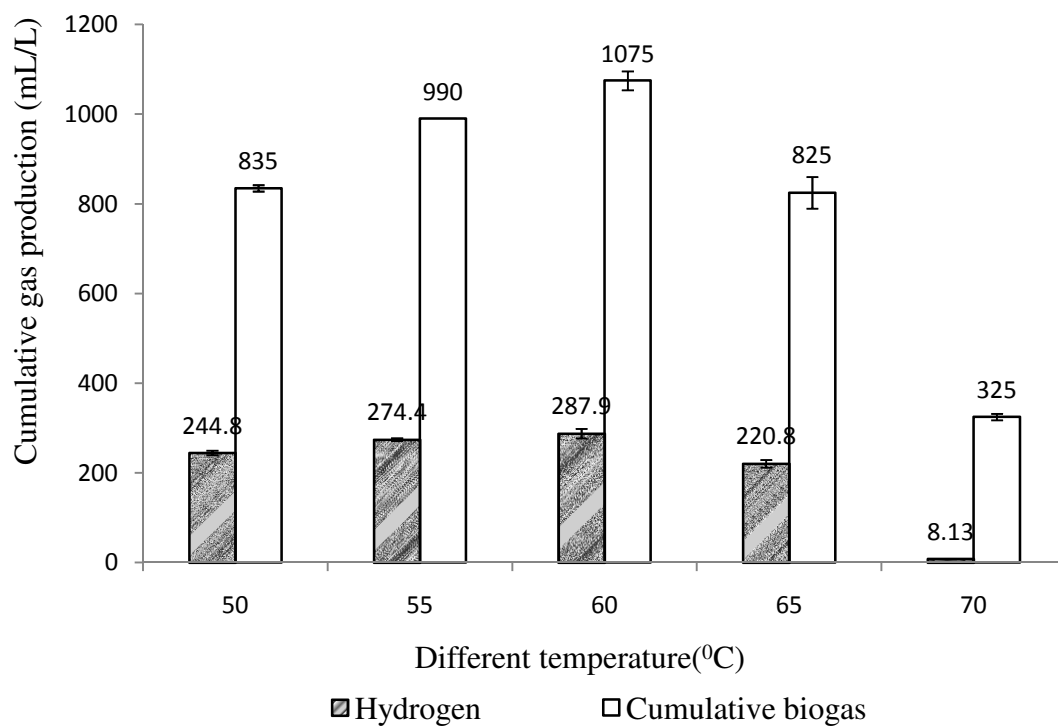


圖 4-2 Strain TCW1 以 5 g/L α -cellulose 培養在不同溫度(50-70 °C)情況下的累積生物氣體及累積氫氣產量表示圖。

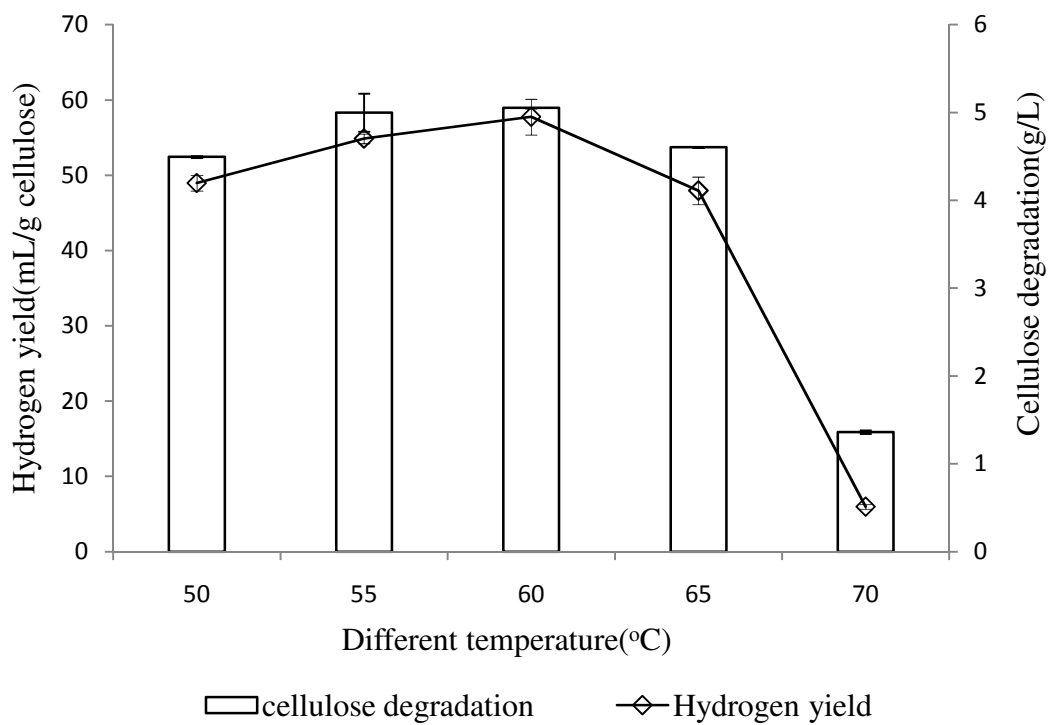


圖 4-3 Strain TCW1 以 5 g/L α -cellulose 培養在不同溫度(50-70 °C)情況下的氫氣產率及纖維降解量示意圖。

4.2.2 溫度因子綜合討論

將上述之溫度實驗結果匯整為表 4-1，比較不同溫度對 *Clostridium thermocellum* strain TCW1 纖維水解產氫能力之影響，由此表可看出 strain TCW1 最大比生長速率是以 60°C 為最佳，在此溫度下細胞能有最佳的生長結果。以基質水解速率而言，以 55°C 及 60°C 有較佳的表現，但 60°C 稍微比 55°C 更佳，最佳可達 2.437 g/L · day，以還原糖產率而言，在 60°C 及 65°C 皆有不錯的表現，皆可達到 500 mg/L · day，但在 65°C 的情況下表現又比 60°C 時更佳，最高可達 579.3 mg/L · day。以生物氣體累積產量及氫氣產率方面，皆是在溫度 60°C 時有最佳的表現，最高分別可達到 1075 mL/L · liquid 及 57.75 mL/g · cellulose。綜合上述以 strain TCW1 來生產氫氣的溫度條件，其生長、纖維水解速率、氣體產量及氫氣產率皆是在 60°C 時的表現最佳。

表 4-1 Strain TCW1 在不同溫度下之纖維水解產氫潛力比較表

Temperature (°C)	Specific growth rate (day ⁻¹)	Cellulose degradation rate(g/L · day)	Reducing sugar production rate(mg/L · day)	Total gas production (mL/L)	Hydrogen yield (mL/g · cellulose)
50	0.1574	2.008	285.3	835	48.95
55	0.1747	2.414	425.9	990	54.87
60	0.2154	2.437	537.1	1075	57.75
65	0.0834	1.340	1075	825	47.96
70	0.0330	0.8619	57.75	325	5.968

4.3 pH 之影響

4.3.1 pH 因子對生長、纖維素水解及產氫之影響

pH 測試對 strain TCW1 生長的影響，是以改變培養基中既有成分 NaHCO_3 的方式來調整鹼度，由於培養瓶之瓶頂空間填充有 CO_2 ，因此可利用此方法來達成培養基不同起始 pH。結果如圖 4-4(A)所示，TCW1 較不適於過酸或過鹼之環境生長，當 pH 小於 5.57 或大於 7.86 時的生長情況明顯不佳，最適 strain TCW1 之生長 pH 範圍介於 5.99 至 7.49 之間。就實驗結果來看，pH 對 strain TCW1 生長影響頗大，當 pH 為 6.99 時，其生長情況的蛋白質累積最高可達 339.5 mg/L，而 pH 分別為 5.01、5.57 及 7.86 的情況下則幾乎沒有生長的情況，相較於先前文獻，*C. thermocellum* 有較寬的 pH 耐受性約 6.1-7.5，與 strain TCW1 之 pH 耐受性相類似，可知 strain TCW1 較喜好於中性環境，並受 pH 變動影響較大。

本次實驗中分別測試不同起始 pH 情況下纖維水解的效率，可看出當 pH 介於 6.51-6.99 之間有較佳的水解效率，在此範圍內 5 g/L 纖維素幾乎能夠被完全降解，當 pH 高於 6.99 或低於 6.51 時則無法完全被降解，與細胞生長相比較可得知，過高或過低的 pH 不僅會對細胞生長產生影響，也會對纖維水解有所影響(圖 4-4 B)。由此可知 strain

TCW1 的生長及纖維水解在 60°C 時皆偏於中性的環境。以產氫濃度而言，pH 6.99 與 7.49 之時間曲線並無太大的差異，最高產氫濃度可達到 18.99 % (圖 4-4 C)，由此可知其產氫與生長之表現會相類似，當細胞生長越好時，產氫濃度便會越高，纖維水解量也會跟著提高；相反若細胞生長情況不佳，則其纖維水解量及產氫濃度也會跟著降低。

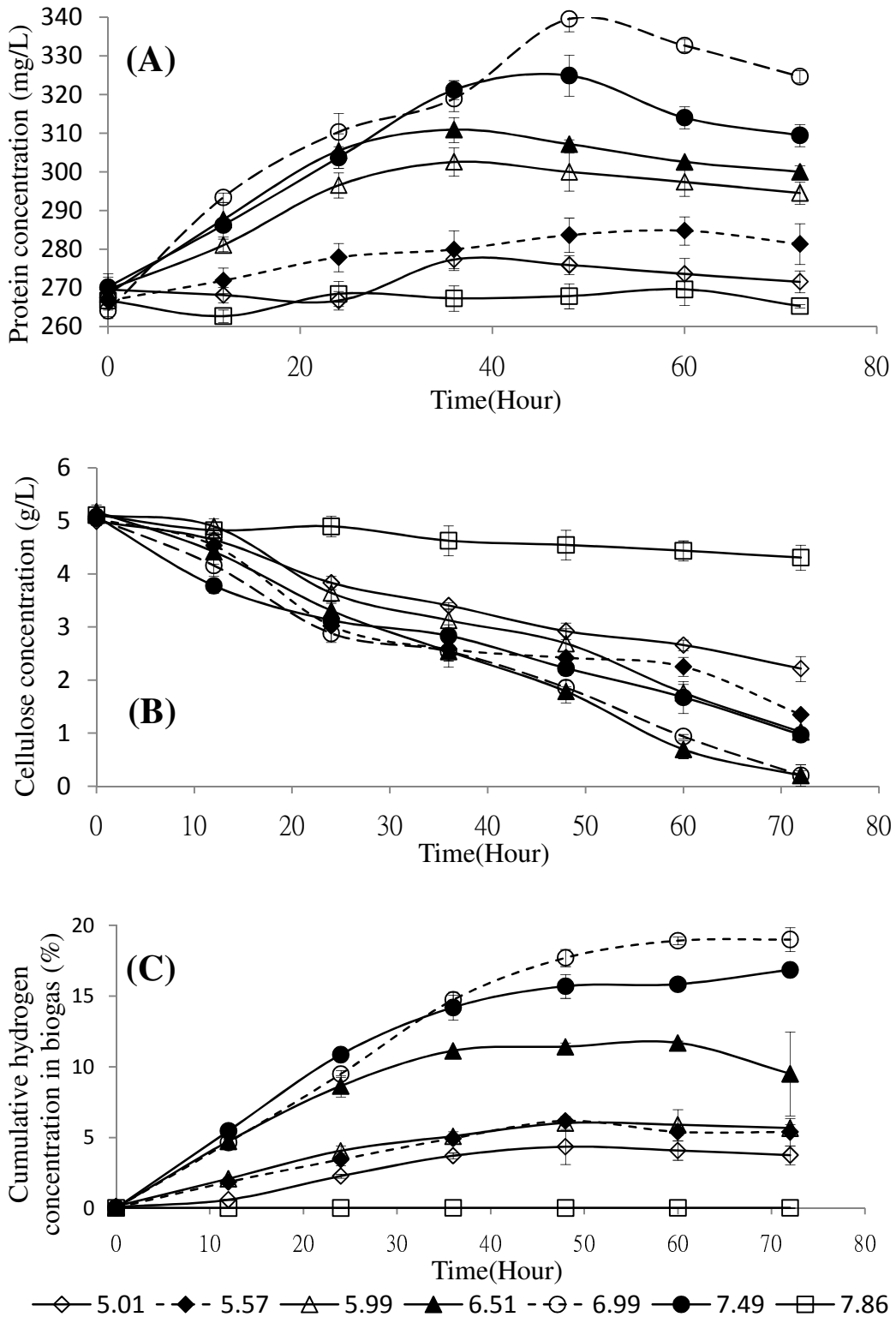


圖 4-4 Strain TCW1 以 5 g/L α -cellulose 為單一碳源，分別培養在 pH 為 5.01-7.86 情況下之(A)生長、(B)纖維水解及(C)產氫濃度時間曲線圖，每組實驗皆以二重複表示其再現性，培養溫度固定為 60°C。

pH 的變動能夠對產氣有明顯的影響，結果如圖 4-5 所示，可看到當 pH 為 7.86 時，strain TCW1 雖然有產生生物氣體(可產生 565 mL/L · liquid)的能力，但幾乎完全沒有產生氫氣，推測可能是因為在 pH 過高或過低的情況下，細胞生長不佳以及產氫酵素完全被抑制而無法作用，導致產氫量降低，而當 pH 為 6.99 時，有較佳的生物氣體及氫氣的產量表現，最高可累積達 1190 mL/L · liquid(生物氣體)及 284.9 mL/L · liquid(氫氣)。以氫氣產率與纖維素降解量而言，結果如圖 4-6 所示，當 pH 介於 6.99 至 7.49 之間時，其產率的差異性不大，但若以纖維素的降解量來看，pH 為 7.49 時無法完全降解利用，因此雖然 strain TCW1 在 pH 7.49 時的產氫速率與 pH 6.99 時相似，其產氫量並不同於 pH 6.99 時的產氫量，推測可能為纖維素降解量較少而導致在計算上使 pH 7.49 之氫氣產率與 pH 6.99 之產率相似。因此，可知 strain TCW1 的生長與產氫反應都是偏好中性環境，往後的試驗可依然維持原本的鹼劑添加量(3.9 g NaHCO₃/L)配置培養基，使起始 pH 達到 6.99。

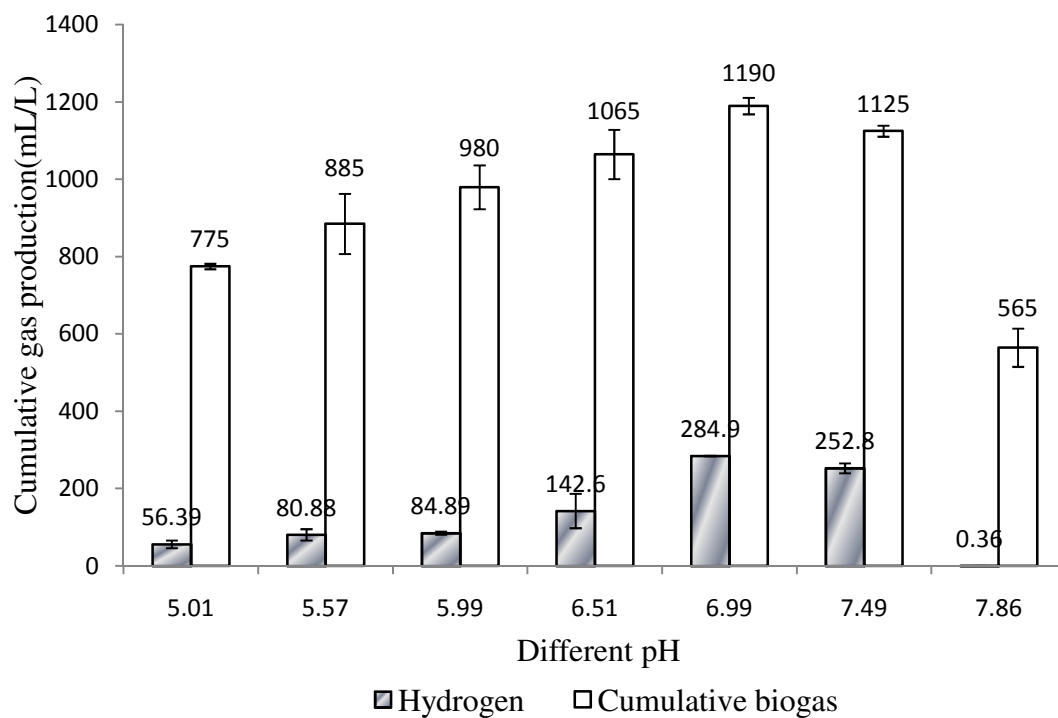


圖 4-5 Strain TCW1 以 5 g/L α -cellulose、高溫 60°C，培養在不同 pH(5.01-7.86)情況下的累積生物氣體及累積氫氣產量表示圖。

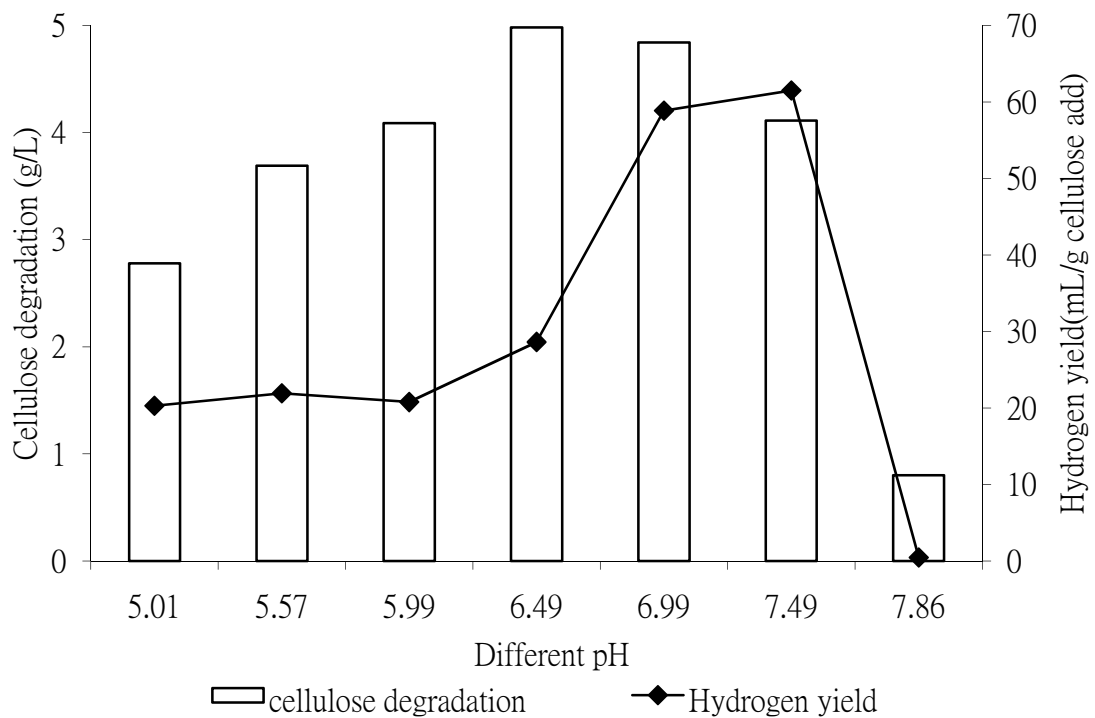


圖 4-6 Strain TCW1 以 5 g/L α -cellulose、高溫 60°C，培養在不同 pH(5.01-7.86)情況下的氫氣產率及纖維降解量示意圖。

4.3.2 pH 因子綜合討論

利用上述之 pH 實驗結果匯整為表 4-2，比較不同 pH 對 strain TCW1 纖維水解產氫能力之影響，由此表可看出 strain TCW1 的最大比生長速率在起始 pH 為 6.99 時，可達 0.1609 day^{-1} ，在此 pH 之條件下細胞的生長能有最佳的表現，以基質水解速率來看，當 pH 為 6.51-6.99 時有較佳的表現，皆可達到 $2 \text{ g/L} \cdot \text{day}$ 以上，但 pH 為 6.51 稍微會比 6.99 的水解效率更佳一點，可達 $2.175 \text{ g/L} \cdot \text{day}$ 。以還原糖產率而言，pH 介於 5.99-6.99 之間時，皆至少能有 $800 \text{ mg/L} \cdot \text{day}$ 的表現，最高之還原糖產率則出現在 pH 為 6.51 時，可達 $1224 \text{ mg/L} \cdot \text{day}$ 。以氣體累積產量及氫氣產率而言，當 pH 介於 6.99-7.49 之間會有最佳之表現，但 pH 為 7.49 時的氣體累積量稍微低於 pH 為 6.99 時之氣體累積產量，最佳表現可達 $1190 \text{ mL/L} \cdot \text{liquid}$ ，又以氫氣產率來比較，雖然 pH 7.49 時的氫氣產率看似較 pH 6.99 時的要佳，但在實驗中 pH 7.49 的纖維素無法完全水解，推測是因為以纖維被水解的量當作分母，而 pH 7.49 的纖維水解量較少，導致計算上的差異，因此使的氫氣產率在 pH 7.49 時看似高於 6.99 的氫氣產率，而在 pH 6.99 的情況下，氫氣產率可達 $58.87 \text{ mL/L} \cdot \text{cellulose}$ ，且纖維素能夠完全被水解轉化為液相及氣相產物。因此，綜合上述以 strain TCW1 來生產氫氣的 pH 條件，其生長、氣體產量及氫氣產率皆是在 pH 6.99 時的表現最佳。

表 4-2 Strain TCW1 在不同 pH 下之纖維水解產氫潛力比較表

pH	Specific growth rate (day ⁻¹)	Cellulose degradation rate(g/L · day)	Reducing sugar production rate (mg/L · day)	Total gas production (mL/L)	Hydrogen yield(mL/g · cellulose)
5.01	0.0338	1.159	449.1	775	20.29
5.57	0.0411	1.643	757.8	885	21.92
5.99	0.0952	1.770	826.7	980	20.77
6.51	0.1290	2.175	1224	1065	28.63
6.99	0.1609	2.167	889.7	1190	58.87
7.49	0.1170	1.952	363.8	1125	61.49
7.86	0.0086	0.2143	31.03	565	0.4529

4.4 基質濃度之影響

4.4.1 基質濃度因子對生長、纖維素水解及產氫之影響

本實驗以不同濃度之 α -cellulose 為單一碳源在高溫(60°C)下進行厭氧醱酵培養的試驗，其細胞生長以胞內總蛋白質量表示。結果如圖 4-7(A)所示，可看到基質濃度對生長之影響並不大，當基質濃度為 10 g/L 時能有較佳的生長表現，蛋白質量可達 353.9 mg/L，而當基質濃度越高，則生長呈現逐漸降低之趨勢，推測基質濃度的影響不同於溫度或 pH 的影響，溫度及 pH 可能會對菌體的代謝機制產生影響，基質濃度則無法影響代謝機制，實質上基質濃度增加對菌體本身的生長及代謝機制並無加速效果，因此而使整體趨勢相類似。

實驗中將不同濃度之纖維素降解含量做分析，由圖 4-7(B)可知，5 g/L 和 10 g/L 之纖維素可幾乎達到完全降解，但 15 g/L 以上之纖維素便無法被完全降解，推測可能為培養基中之酸含量越來越高，導致菌株生長遭到抑制，而無法繼續降解多餘的纖維素。經過 72 小時的監測纖維素含量可分別由 5 g/L 降解至 0.03 g/L、10 g/L 降解至 1.11 g/L、15 g/L 降解至 7.14 g/L、20 g/L 降解至 11.30 g/L、25 g/L 降解至 13.25 g/L。由結果來看，當基質濃度為 5 g/L 時的降解率可達 99.4%，當基質濃度超過 10 g/L 時，其降解比例便逐漸降低。

在培養的同時也進行產氫測試，以氫氣濃度隨時間變化之結果如圖 4-7(C)，可看到氫氣濃度在培養初始 24 小時會快速地累積，而在大約 60 個小時可達到最大累積產氫濃度約 24.27%，而不論基質濃度為多少，其最終產氫濃度幾乎沒有差異，均為 17% 左右。其生物氣體及氫氣累積量結果如圖 4-8 所示，當纖維素濃度增加時，氫氣累積量也會明顯增加從(5g)309.9 mL/L · liquid 增加至(15g/L)364.1 mL/L · liquid，當纖維素濃度增加到 20 g/L 以上時，氫氣累積量反而會有些微降低，這或許是因為基質濃度或反應後之液相產物過高反而對產氫反應機制有所影響，由此推測基質濃度對產氣影響並不大。

以氫氣產率與纖維素降解量來看，結果如圖 4-9 所示，當纖維素濃度越高時，strain TCW1 能降解的纖維素便越多，但若以氫氣產率而言，纖維素雖然降解量多，但其產氣量並沒有與纖維降解量成正比，最佳的產氫速率在基質濃度為 5 g/L 時，氫氣產率可達到 49.15 mL/L · liquid，因此往後的產氫實驗之起始基質濃度以原本的添加量 5 g/L 來配置培養基。

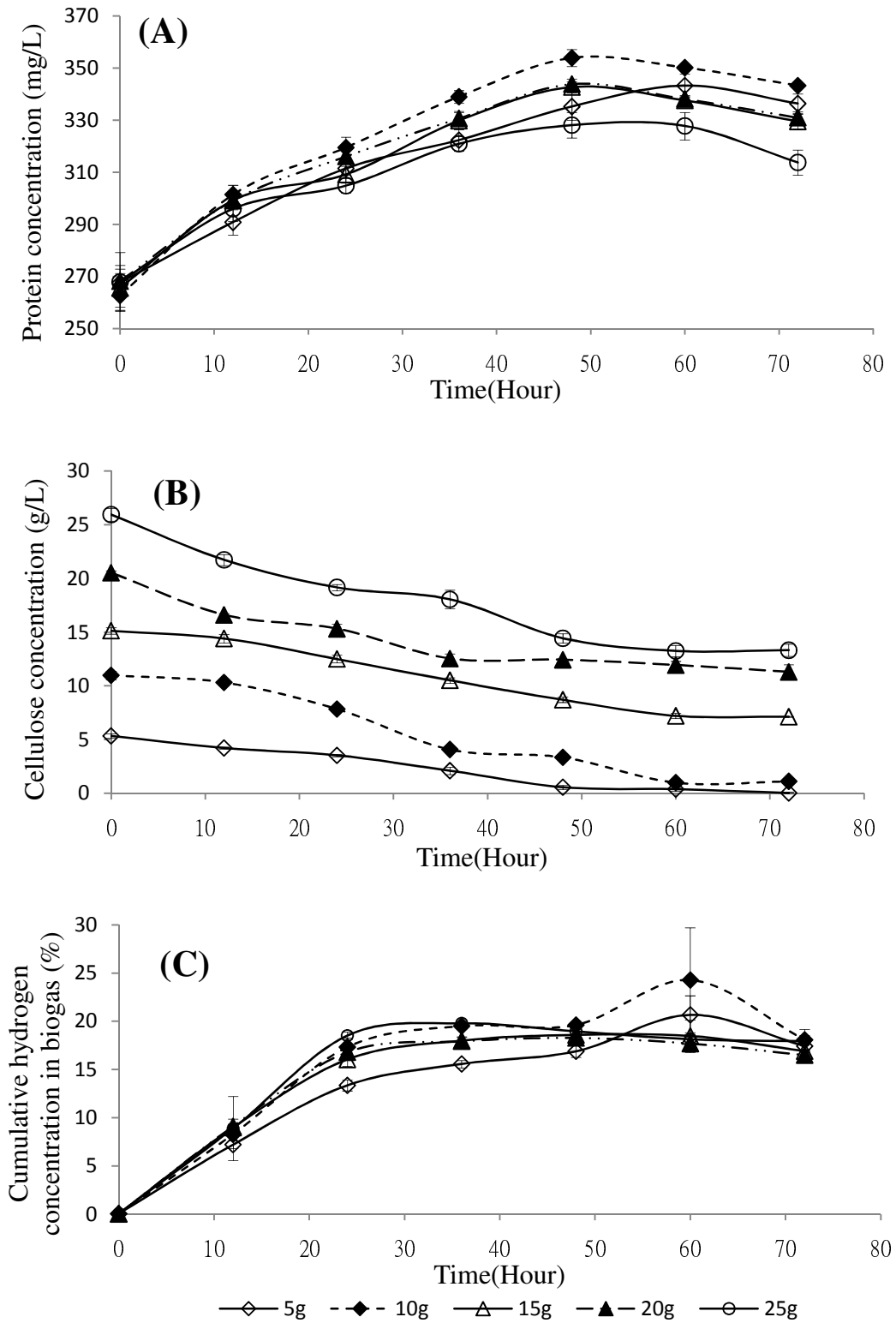


圖 4-7 Strain TCW1 以 α -cellulose 為單一碳源，分別培養在不同基質濃度為 5 g/L-25 g/L 情況下之(A)生長、(B)纖維水解及(C)產氫濃度時間曲線圖，每組實驗皆以二重複表示其再現性。

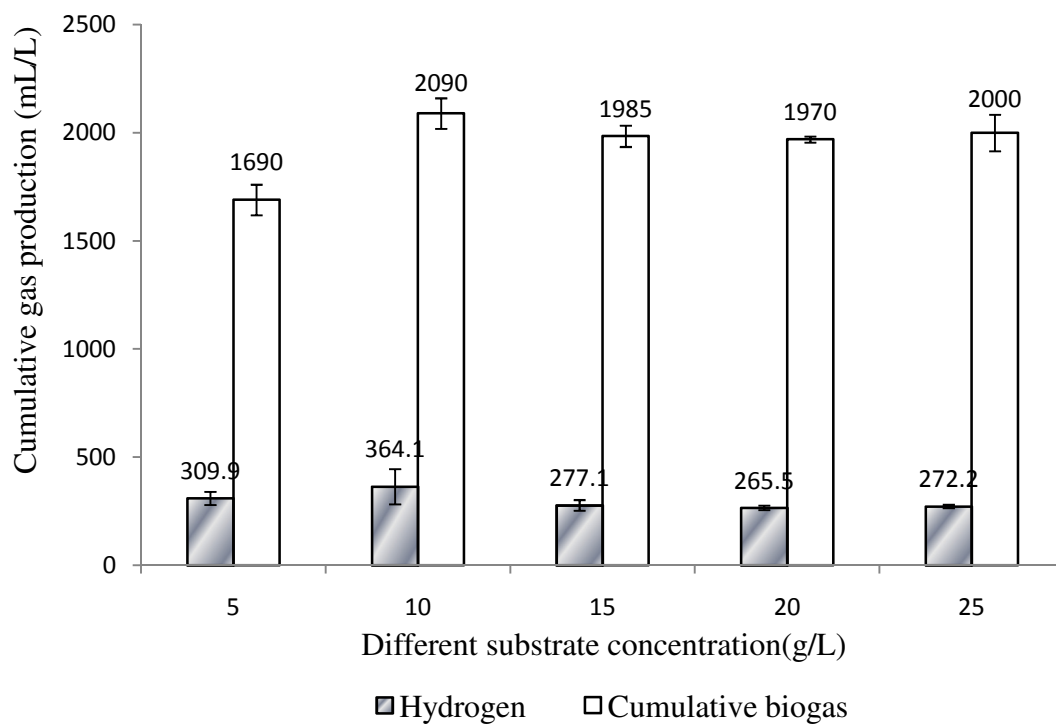


圖 4-8 Strain TCW1 以 α -cellulose 為單一碳源、高溫 60°C，培養在不同基質濃度(5 g/L-25 g/L)情況下的累積生物氣體及累積氫氣產量表示圖。

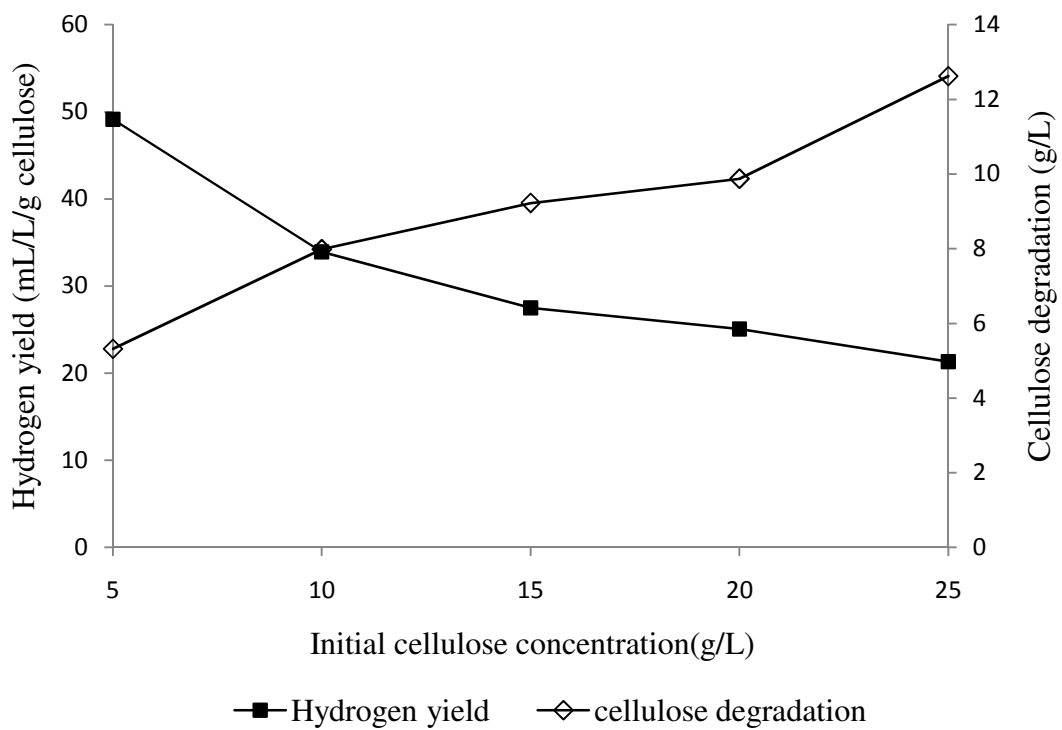


圖 4-9 Strain TCW1 以 α -cellulose 為單一碳源、高溫 60°C，培養在不同基質濃度(5 g/L-25 g/L)情況下的氫氣產率及纖維降解量示意圖。

4.4.2 基質濃度因子綜合討論

將上述之基質濃度實驗結果匯整為表 4-3，比較不同基質濃度對 strain TCW1 纖維水解產氫能力之影響，由此表可看出 strain TCW1 的纖維素水解量會依基質濃度的提升而增加，當基質濃度為 5 g/L 時，細胞可將其完全利用，但當基質濃度提升，其利用比例便會逐漸降低，由原先之 100 % 之利用率降低至大約 50 %。以還原糖累積量而言，當基質濃度越高時，其還原糖累積量便會隨之逐漸變高，由 5 g/L 所累積 860.9 mg/L 之還原糖提高至 25 g/L 累積約 4673 mg/L 之還原糖，由結果圖 4-10 可見，細胞能利用的基質越多時，醣類便會大量地累積。以氣體累積產量及氫氣產率而言，當基質濃度從 5 g/L 提升至 10g/L 時，其氣體累積產量也會跟著提升，但當濃度達到 15 g/L 後，氣體產量反而有些微下降的趨勢，推測可能是因為基質濃度過高所造成的抑制現象。在氫氣產率方面，當基質濃度越高時，其產率反而逐漸降低，而不是可利用的基質越多，可產生之氫氣便會越多，而產率則是以基質濃度 5 g/L 時能夠有最佳的表現，可達 49.15 mL/g · cellulose。因此，可知雖然基質濃度高可明顯提高還原糖之產量及纖維降解量，但卻無法提高氣體產量及氫氣產率。

表 4-3 Strain TCW1 在不同基質濃度下之纖維水解產氫潛力比較表

Substrate concentration (g/L)	Specific growth rate (day ⁻¹)	Cellulose degradation (g/L)	Cellulose degradation ratio (C/C0 %)	Reducing sugar production (mg/L)	Reducing sugar yield (mg/L · day)	Total gas production (mL/L)	Hydrogen yield(mL/g · cellulose)
5	0.0735	5	100	860.9	172.2	1690	49.15
10	0.1022	7.984	79.8	2176	272.7	2090	33.93
15	0.1030	9.222	61.5	3580	388.3	1985	27.49
20	0.0843	9.873	49.4	3761	381.1	1970	25.07
25	0.0733	12.61	50.4	4673	370.6	2000	21.33

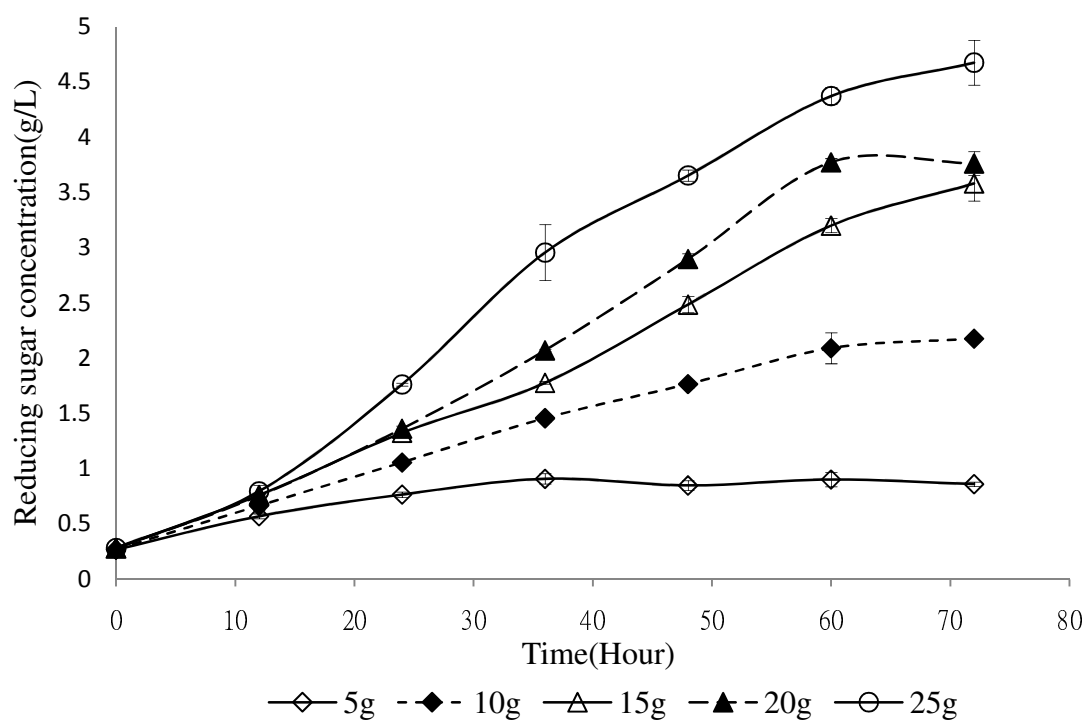


圖 4-10 Strain TCW1 以不同基質濃度(5 g/L- 25 g/L)之還原糖濃度產生曲線。

4.5 微量元素對產氫的影響

4.5.1 不同種類亞鐵離子先期測試

文獻中(Wang and Wan, 2008)所提及使用之 Fe^{2+} 離子皆為 FeSO_4 ，而在我們原本所使用的 TA 培養基中之 Fe^{2+} 離子為 FeCl_2 。因此，在測試亞鐵離子對 strain TCW1 的產氫影響前，先以 FeSO_4 及 FeCl_2 分別測試培養基中之不同 Fe^{2+} 來源是否會影響此菌株的產氫能力。以氫氣濃度上升趨勢來判斷，結果如圖 4-11，可知 FeSO_4 與 FeCl_2 對 strain TCW1 的產氫能力的影響並無顯著差異，strain TCW1 使用 FeCl_2 有較佳產氫結果，氫氣濃度最高可達 17.47 %。以生物氣體產量及產氫量來看，其結果如圖 4-12 所示， FeCl_2 之生物氣體產量稍微比 FeSO_4 大約多 40 mL/L · liquid，在氫氣產量方面則也是以 FeCl_2 的產量比 FeSO_4 多出大約 29 mL/L · liquid。因此，後續之產氫試驗皆以 FeCl_2 為 Fe^{2+} 來源配置培養基。

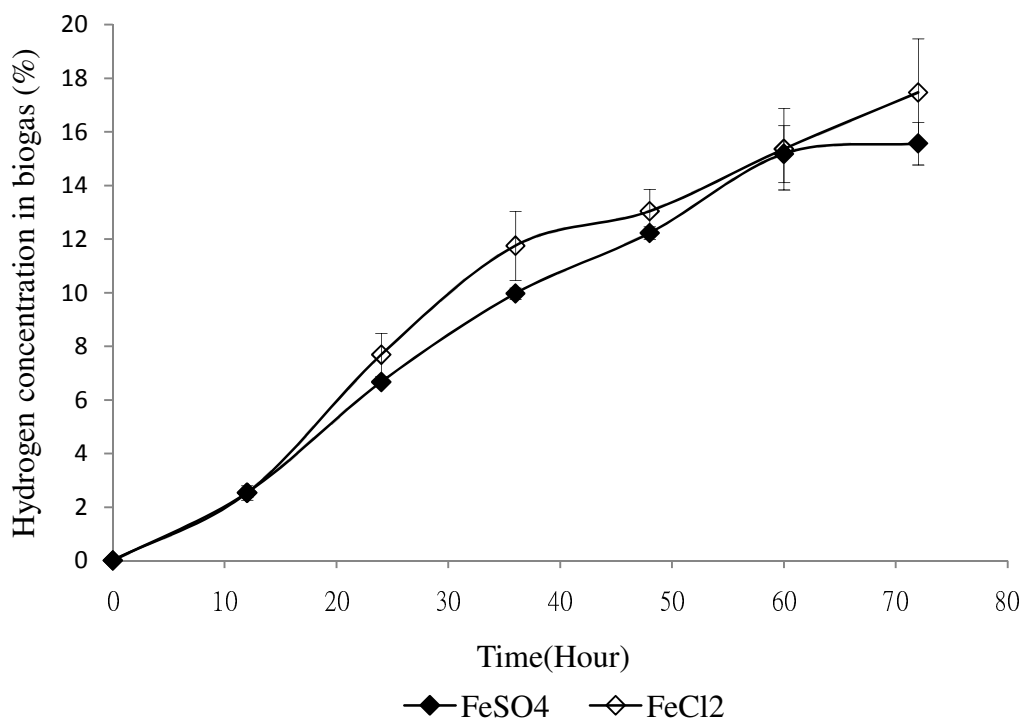


圖 4-11 Strain TCW1 在以不同種類之亞鐵離子(FeCl_2 , FeSO_4)進行醱酵培養時，其氣體產物中氫氣含量之時間變化曲線圖。

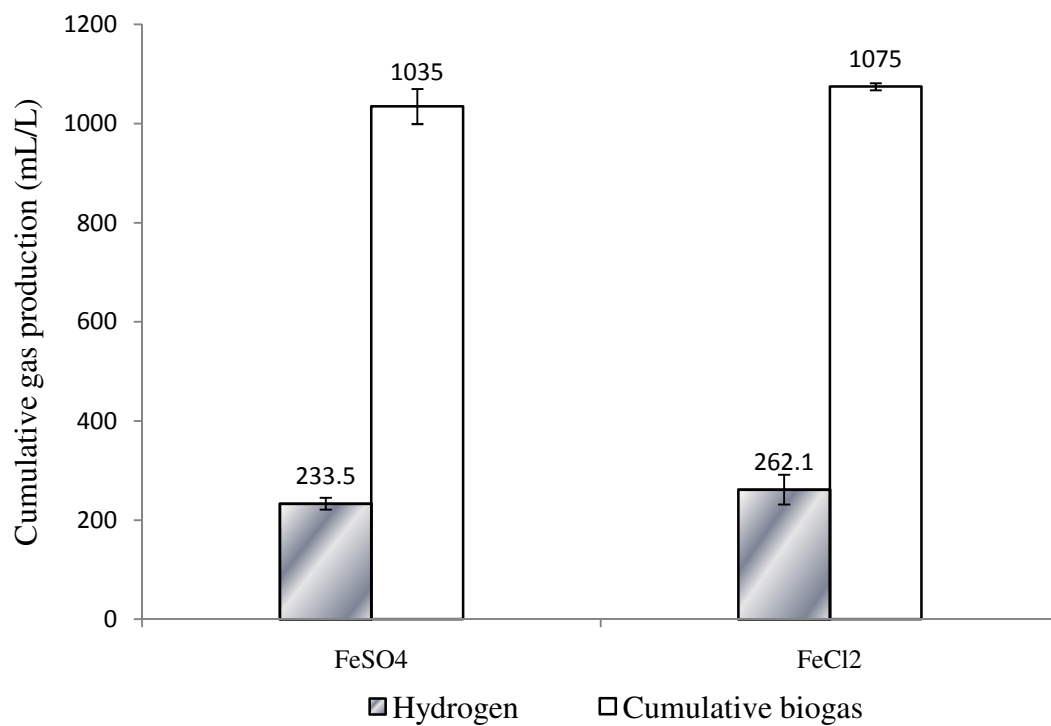


圖 4-12 Strain TCW1 以 5 g/L α -cellulose、高溫 60°C，培養在不同種類之亞鐵離子(FeCl₂, FeSO₄)情況下的累積生物氣體及累積氫氣產量表示圖。

4.5.2 亞鐵(Fe^{2+})離子對產氫之影響

本實驗分別以不同濃度(0-50 mg/L)之 FeCl_2 來進行對產氫的影響測試，其結果如圖 4-13 所示，以氫氣濃度而言，可看到整體產氫濃度的趨勢非常相近，但若以最終 72 小時來做比較，其最高濃度可達 23.16 % (5 mg/L 之 FeCl_2)，最低濃度則為 16.05 % (40 mg/L 之 FeCl_2)，兩者相差了近 7 % 的氫氣濃度，因此推測在 5 mg/L 的 FeCl_2 能夠使產氫酵素的活性最佳，而使產氫量最多，若以生物氣體累積量及氫氣產量來比較，結果如圖 4-14 所示，可知當 FeCl_2 濃度為 5 mg/L 時，其生物氣體產量雖非最佳情況，但其氫氣產量卻是在 FeCl_2 所有濃度中產氫量最佳的，可達約 347.4 mL/L · liquid，因此往後的試驗便以 5 mg/L 之 FeCl_2 來配置培養基。Wang and Wan(2008)等人指出，在醱酵產氫上，產氫酵素(hydrogenases)中的電子傳遞者 ferredoxin 扮演著非常重要的角色，由於鐵在 ferredoxin 中是個十分重要的組成元素，只有在某些適當的 Fe^{2+} 濃度範圍， Fe^{2+} 才能夠提升產氫酵素的活性，增加氫氣產量。與本研究相較之下，當 Fe^{2+} 的濃度逐漸增加時，氫氣產量也會逐漸地自(0 mg/L) 285.8 mL/L · liquid 增加至(5 mg/L) 347.4 mL/L · liquid，而後當 Fe^{2+} 濃度高於 5 mg/L 後，氫氣產量便逐漸降低至(40 mg/L) 240.8 mL/L · liquid。

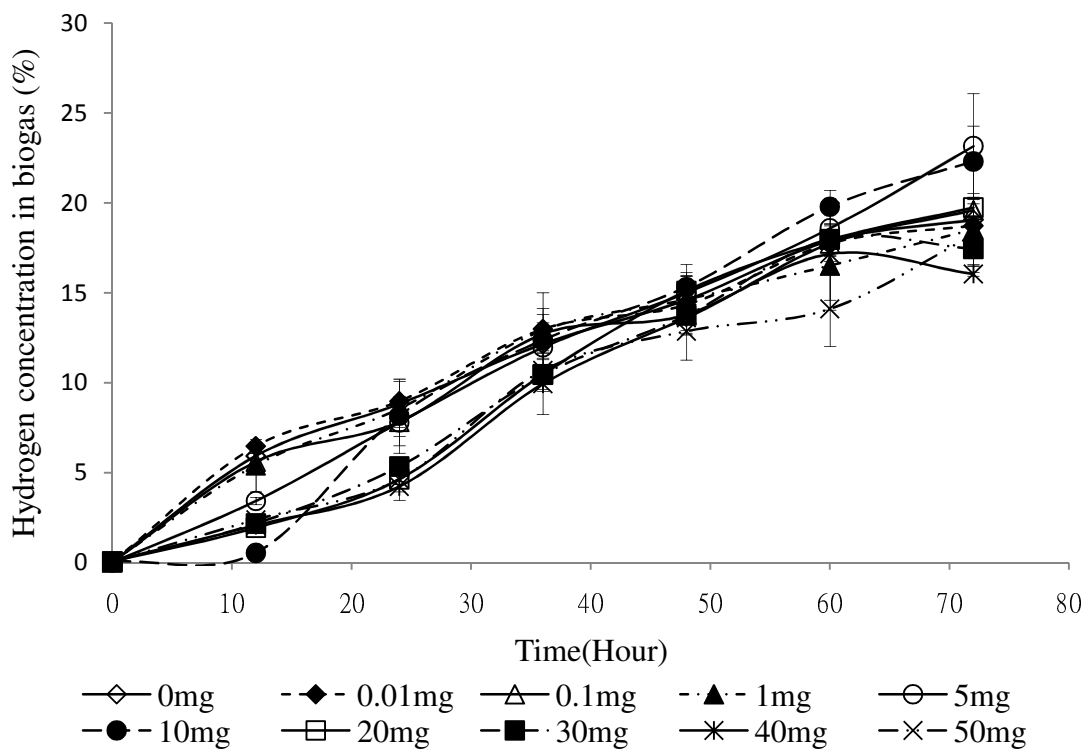


圖 4-13 Strain TCW1 在不同濃度之 FeCl_2 離子(0-50 mg/L)進行醱酵培養時，其氣體產物中氫氣含量之時間變化曲線圖。

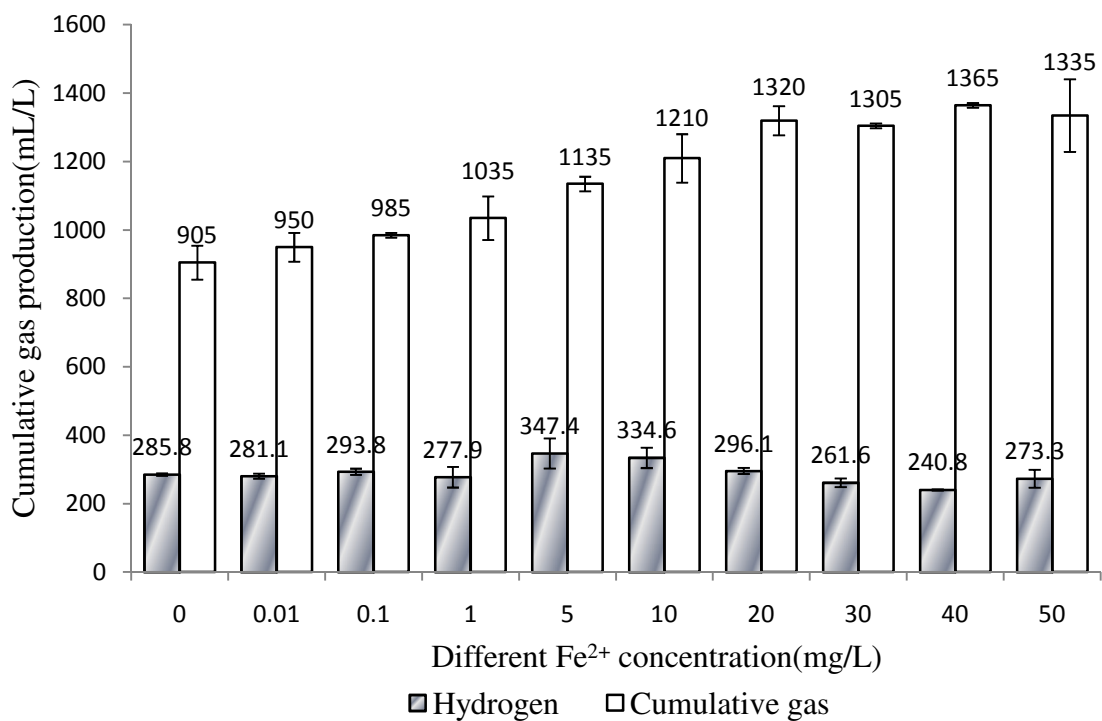


圖 4-14 Strain TCW1 以 5 g/L α -cellulose、高溫 60°C，培養在不同濃度之 FeCl₂ 離子(0-50 mg/L)情況下的累積生物氣體及累積氫氣產量表示圖。

4.5.3 微量元素鎳(Ni^{2+})離子測試

文獻中(Wang and Wan, 2008)提及鎳離子能夠對菌株之產氫量會有所影響，因此實驗以不同濃度(0-100 mg/L)之鎳離子來測試其對 strain TCW1 產氫之影響，其結果如圖 4-15，可知當鎳離子濃度為 0.01 mg/L 時，產氫濃度能有最佳的表現可達約 27.12 %，當鎳離子濃度超過 10 mg/L，產氫濃度會有明顯的下降，推測是高濃度的鎳離子會使產氫酵素的活性遭到抑制，而導致產氫濃度降低。在 Wang and Wan (2008)的文獻中指出，在適當的濃度範圍， Ni^{2+} 能夠增加氫氣產率及氫氣濃度，是由於[Ni-Fe] hydrogenases 這個酵素存在於大部分的產氫菌上，因為 Ni^{2+} 會影響[Ni-Fe] hydrogenases 酵素的作用， Ni^{2+} 濃度過高時便會對產氫酵素產生抑制作用，此論點也曾經在 Lin and Lay (2005)的文獻中被證明過。相較於本研究之情況，也確實有相類似的情況，當鎳離子濃度高於 0.05 mg/L 時，其生物氣體之累積產量便逐漸下降，由原本最高產量之 1510 mL/L (0.01 mg/L)降至 665 mL/L (10 mg/L)，而氫氣累積產量也會依相同的趨勢逐漸下降，由最高之 406.9 mL/L (0.01 mg/L)降至 147.8 mL/L (10 mg/L)(圖 4-16)。因此，往後的產氫實驗皆以 0.01 mg/L 之鎳離子濃度來配置培養基。

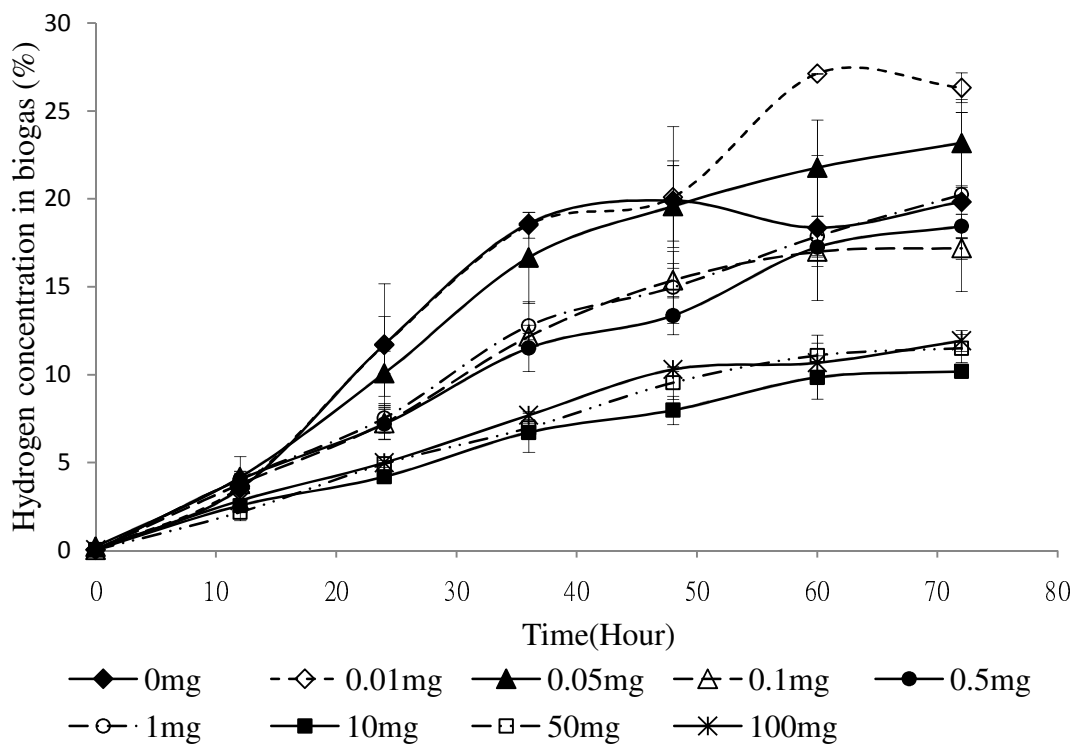


圖 4-15 Strain TCW1 在以不同濃度之 NiCl₂ 離子(0-100 mg/L)進行醱酵培養時，其氣體產物中氫氣含量之時間變化曲線圖。

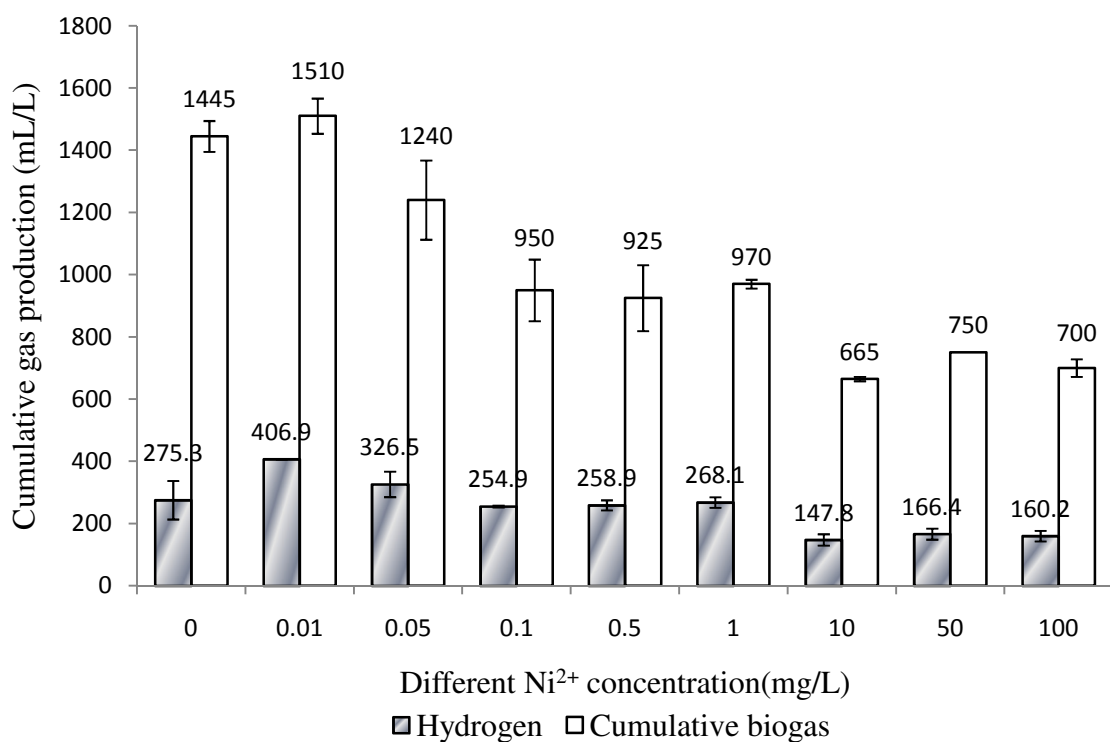


圖 4-16 Strain TCW1 以 5 g/L α -cellulose、高溫 60°C，培養在不同濃度之 NiCl₂ 離子(0-100 mg/L)情況下的累積生物氣體及累積氫氣產量表示圖。

4.5.4 金屬離子濃度因子綜合討論

將上述之不同金屬離子之實驗結果匯整為表 4-4 及表 4-5，比較不同種類金屬離子對 strain TCW1 纖維水解產氫能力之影響，由表 4-4 可知 strain TCW1 在不同亞鐵離子濃度產氫測試中，其氣體產量會由亞鐵離子濃度 0 mg/L 的氣體累積量約 905 mL/L · liquid 逐漸地升高至 40 mg/L · liquid 的累積量約 1365 mL/L · liquid，而當亞鐵離子濃度為 5-10 mg/L 時有較佳的氫氣產量，至少皆達 330 mL/L · liquid，仔細比較下來可知當亞鐵離子濃度為 5 mg/L 時會有最佳的產氫量表現，可達 347.4 mL/L · liquid，由此可見，雖然氫氣之產量並無明顯之差別，但依然會有高峰出現，即使微量元素在培養液中之含量相當地低，但還是可看出其產氫的差異，離子濃度過高時，可能會對產氫酵素(hydrogenases)造成抑制，卻不會對細胞之產氣反應有所影響，其依然可在相同環境下產生大量之二氧化碳，推測可能是亞鐵離子濃度過高而導致代謝途徑改變所造成。

由表 4-5 可看出 strain TCW1 以不同濃度之鎳離子濃度之培養產氫結果，其氣體累積量可由濃度為 0 mg/L 之鎳離子濃度產生 1445 mL/L · liquid，提高至最高氣體產量為 0.01 mg/L 的 1510 mL/L · liquid，而當鎳離子濃度逐漸升高，其產氣量卻逐漸下降，而在氫氣產量方面，其趨勢也是與氣體累積產量相同，由此可見，此種微量元素不僅僅影

響了產氫量，同時也影響了氣體的累積產量，推測可能為鎳離子濃度過高時，可能對細胞及產氫或水解酵素產生抑制的效果。

由以上兩種不同種類之微量元素來比較，亞鐵離子僅對於產氫酵素有所影響，因為在亞鐵離子產氫的實驗中，其生物氣體的產量是一直持續上升的，但在鎳離子的產氫試驗中，其生物氣體卻隨著微量元素濃度升高而降低。以產氫量來比較，鎳離子確實影響較大，其氫氣產量有一明顯的高峰，而在亞鐵離子中，氫氣產量之高峰就沒有那麼地明顯了。

表 4-4 Strain TCW1 在不同亞鐵離子(Fe^{2+})濃度下之潛力比較表

Fe^{2+} concentration (mg/L)	Total gas production (mL/L)	Hydrogen production(mL/L)
0	905	285.8
0.01	950	281.1
0.1	985	293.8
1	1035	277.9
5	1135	347.4
10	1210	334.6
20	1320	296.1
30	1305	261.6
40	1365	240.8
50	1335	273.3

表 4-5 Strain TCW1 在不同鎳離子(Ni^{2+})濃度下之產氫潛力比較表

Ni^{2+} concentration (mg/L)	Total gas production (mL/L)	Hydrogen production(mL/L)
0	1445	275.3
0.01	1510	406.9
0.05	1240	326.5
0.1	950	254.9
0.5	925	258.9
1	970	268.1
10	665	147.8
50	750	166.4
100	700	160.2

4.6 震盪培養之影響

4.6.1 震盪混合(Mixing)對生長、纖維素水解及產氫之影響

在實驗前培養 strain TCW1 的過程中，若以靜置的方式培養，發現到固體型態的纖維素基質在培養基中會有明顯的沉澱，而以肉眼觀察時，往往只有最上層的纖維素有變黃的現象，推測是由於細胞僅能與最上層之纖維素接觸，因此纖維水解之反應僅發生在纖維素最上層部分，若是能夠使細胞與基質有充份的接觸，能夠提升水解纖維的效率。

本實驗以批次震盪之培養方式，分別監測震盪(160 rpm)及無震盪情況下之生長，此轉速剛好可將固體型態之纖維素完全懸浮起來，使培養基內達到均質狀態，讓細胞能夠更充分地與基質接觸，增加反應效率，培養條件為以 α -cellulose 為單一碳源之 TA 培養基，並以先前 4.2 至 4.5 章節所提及的最適生長溫度 60°C 、pH 6.99、基質濃度 5 g/L、亞鐵離子濃度 5 mg/L 及鎳離子濃度 0.01 mg/L 之情況下培養。實驗結果如圖 4-17 所示，可看出在震盪的情況下，生長會明顯比未震盪的效果好，有震盪情況下之比生長速率可達到 0.2315 day^{-1} ，而無震盪之情況下比生長速率僅只有 0.1136 day^{-1} ，在震盪情況下第 36 小時便達到穩定期，而未震盪則持續生長至 72 小時，推測是由於震盪使固

體纖維素基質懸浮於培養液中，使菌體與基質的接觸機會增加，因而加速分解基質的效率，培養液中所分解的纖維素多，培養液中之糖類也會明顯增加，因此，菌體也會較容易利用培養液中的醣類，而造成快速之生長情況。

以纖維素水解量而言，並不會受到震盪與否而有相當大的差異，但在有震盪的情況，纖維素能夠在第 60 小時完全被水解，兩者皆能夠有相似的趨勢。然而值得注意的是，纖維素水解量方面相對於靜置的培養並沒有明顯的提升或下降，此現象說明了基質的均質化對於細胞雖然與基質充分接觸，但卻並未明顯提高纖維水解的速率，兩者纖維水解的速率依然均可達到 2.5 g/L · day。依前人之試驗，基質的均質化僅對細胞能有更多捕捉基質的機會(傅氏，2009)，然而均質化攪拌不同於溫度或 pH 影響，均質化對菌體本身的代謝機制並無加速或抑制效果，因此水解速率並無相當大的差別，皆能達到 2.5 g/L · day 以上，根據結果可知震盪培養的纖維水解量會與靜置培養的纖維水解量相似。以氫氣濃度來說，有震盪的情況下氫氣濃度明顯高於未震盪的狀況，且產氫反應可在 36 小時即達到穩定，最高之產氫濃度為 34.12 %，而未震盪的狀況則須至 60 小時之後，產氫反應才會趨於平穩。

還原醣濃度隨時間變化之結果如圖 4-18(A)所示，可看出在有震盪的情況下，還原醣濃度在前 12 小時便開始產出，但到了第 12 小時還原醣濃度開始下降，推測有此情況發生是由於細胞進入對數生長期快速生長(圖 4-17A)，而將培養液中之醣類先行利用，導致測得還原醣曲線下降之趨勢，而後菌體生長趨於穩定便開始有明顯的還原醣濃度累積達 693.6 mg/L。以還原醣產率之結果，可看出有震盪會明顯的比無震盪的效果更佳，最高可達 429.3 mg/L · day(圖 4-18B)。

在生物氣體及氫氣之累積產量方面，實驗結果如圖 4-19 所示，可明顯看出有震盪的情況下，生物氣體及氫氣累積量明顯高於未震盪的狀況，推測由於氫及二氧化碳的水溶性相當高，因此以震盪的方式培養能夠減低溶於液體中的氫分壓，以增加氫氣濃度，在此狀況下其最高產出之生物氣體及氫氣累積量分別為 2680 mL/L · liquid 及 462.3 mL/L · liquid。以氫氣產率來比較，結果如圖 4-20 所示，震盪情況下的產率也是明顯高於未震盪的情況，最高可達 106.7 mL/g · cellulose。由此可知，培養時是否震盪(攪拌)對產氫的影響相當地大。

實驗中之 pH 變化曲線如圖 4-21 所示，以有震盪的情況進行測試，其 pH 值在實驗前期 36 小時內會有明顯的下降，從初始值約 7.0 降至 5.9，在第 36 小時之後其下降曲線則趨於平緩，最低 pH 值降至 5.7

後曲線便持平，由此結果可知 strain TCW1 在實驗前期 36 小時內反應快速，使培養基內的乙酸(圖 4-22 B)在 24 小時內累積至 9.1 mM 後持平，進而逐漸對產氫產生抑制作用。乙醇(圖 4-22 A)方面則是在第 36 小時達到最高累積量 28.9 mM 後開始持平。由 pH 監測曲線可知，當培養基中之酸類開始明顯累積時，其代謝途徑便開始轉向產生乙醇等較為中性的產物，以減低不利環境對於細胞的生存壓力。

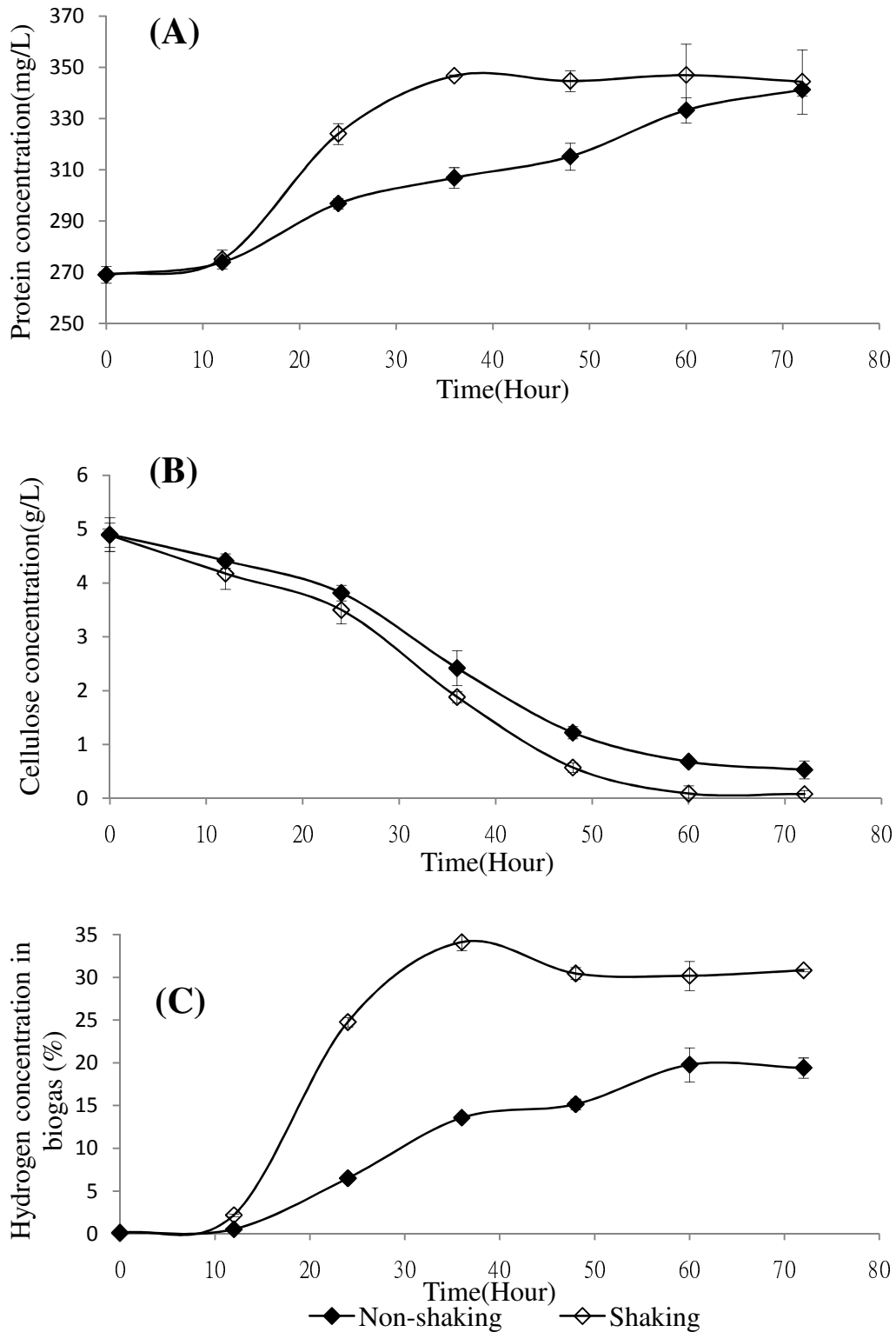


圖 4-17 Strain TCW1 以 5 g/L α -cellulose 為單一碳源，分別培養在震盪及無震盪情況下之(A)生長、(B)纖維水解及(C)產氫濃度時間曲線圖，每組實驗皆以二重複表示其再現性。

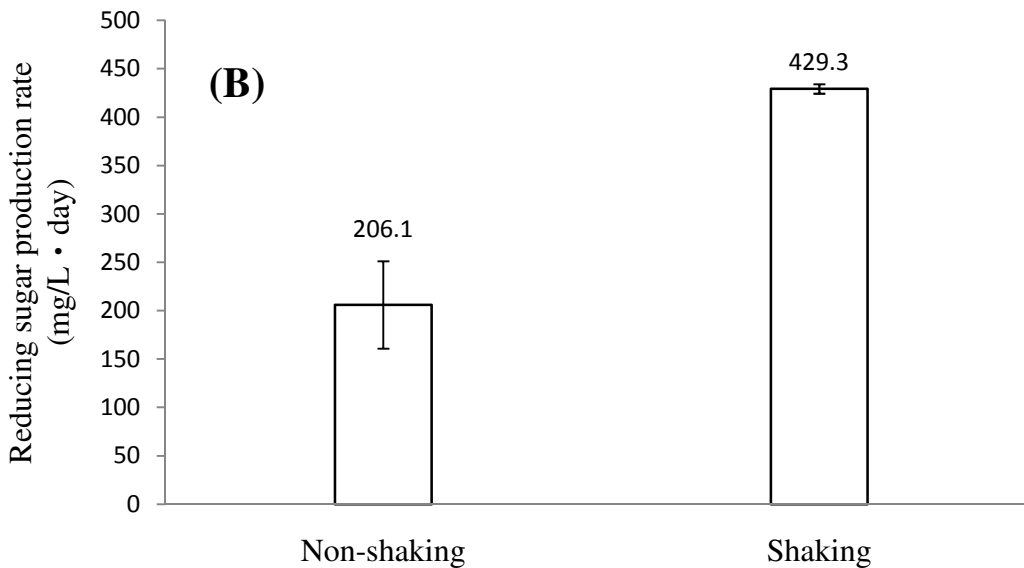
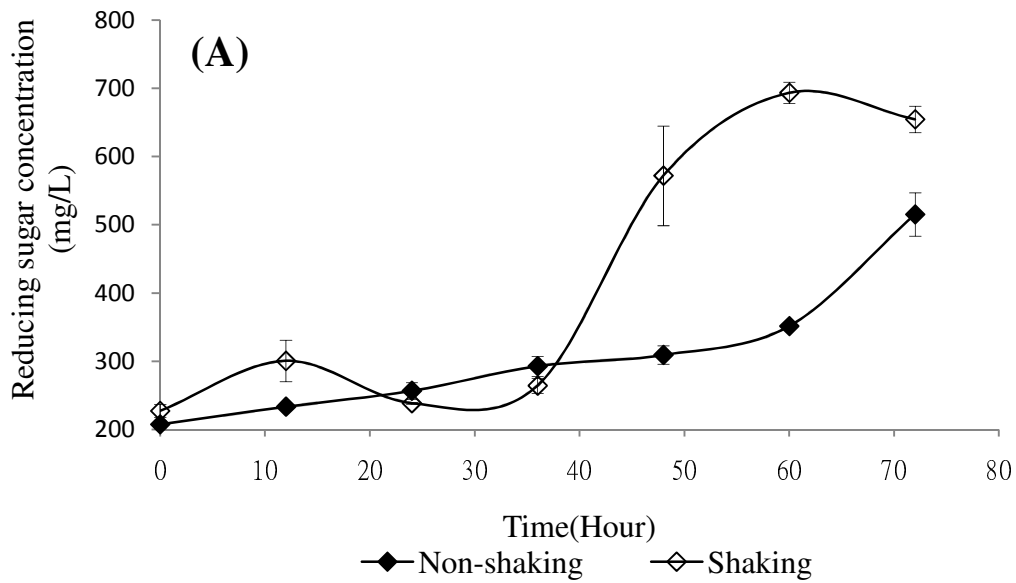


圖 4-18 震盪及未震盪情況下 strain TCW1 之還原糖產生速率圖。(A)菌株以 5 g/L α -cellulose 為基質培養於 60°C、pH6.99 情況下，並於震盪及未震盪情況下之還原糖產生時間曲線圖。(B)經由上述之還原糖產生時間曲線圖，換算後的還原糖產生速率圖。

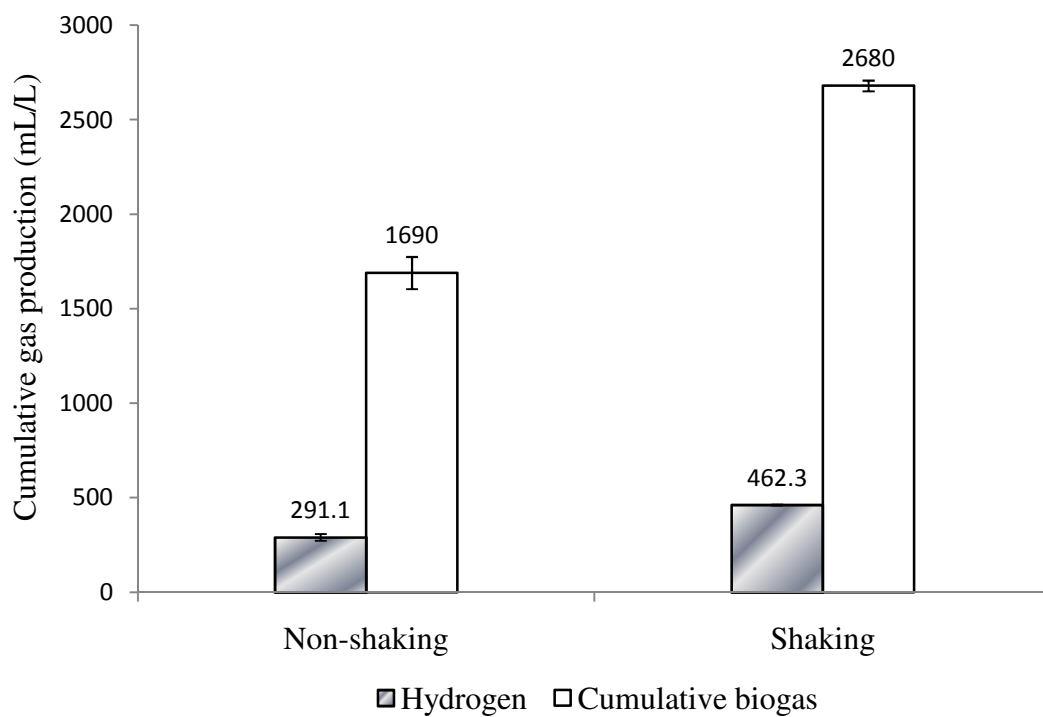


圖 4-19 Strain TCW1 以 5 g/L α -cellulose、高溫 60°C，分別培養在震盪及未震盪情況下的累積生物氣體及累積氫氣產量表示圖。

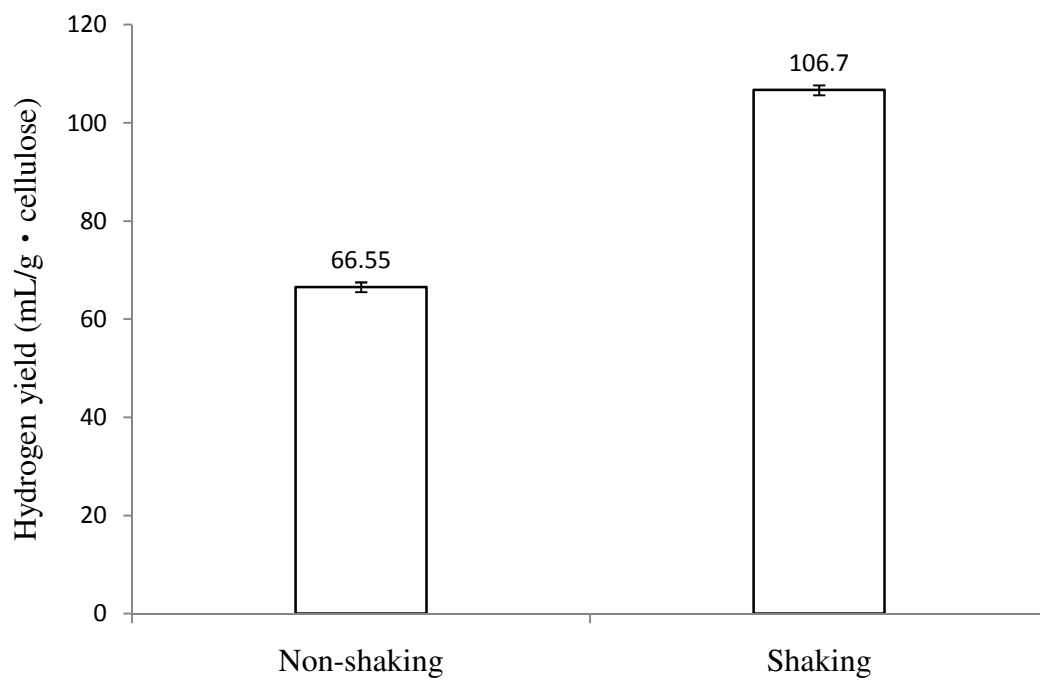


圖 4-20 Strain TCW1 以 5 g/L α -cellulose、高溫 60°C，分別以震盪及未震盪的情況下進行醱酵培養時，其氫氣產率表示圖。

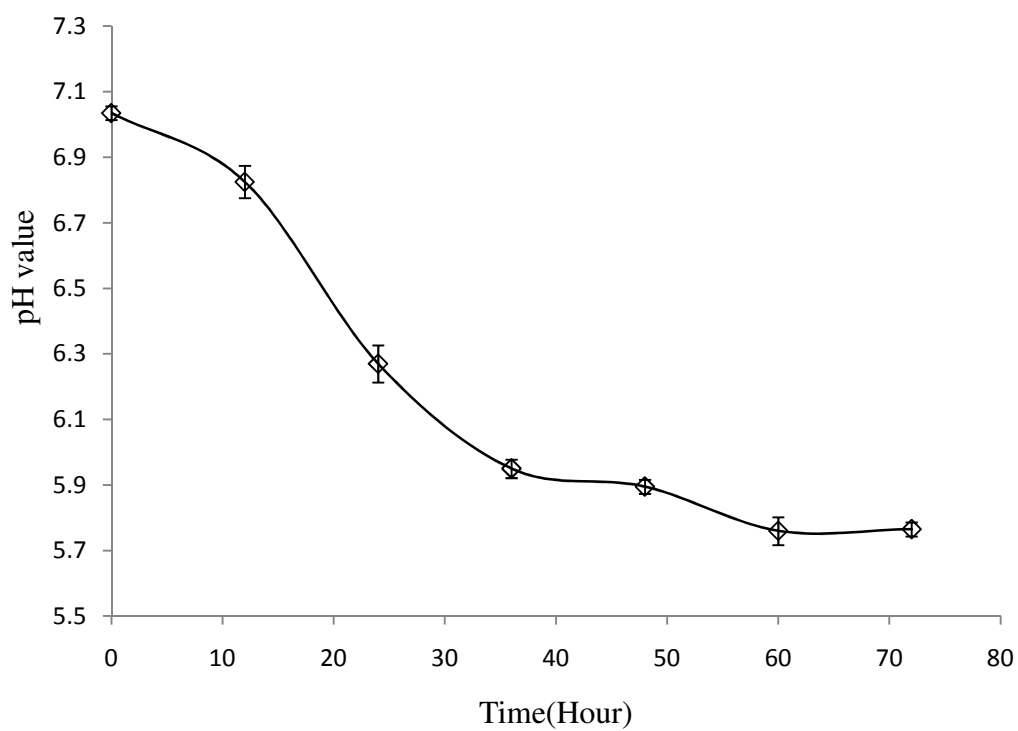


圖 4-21 Strain TCW1 以 5 g/L 之 α -cellulose、高溫 60°C，以 160 rpm 震盪的情況下進行醱酵培養時，其 pH 曲線表示圖。

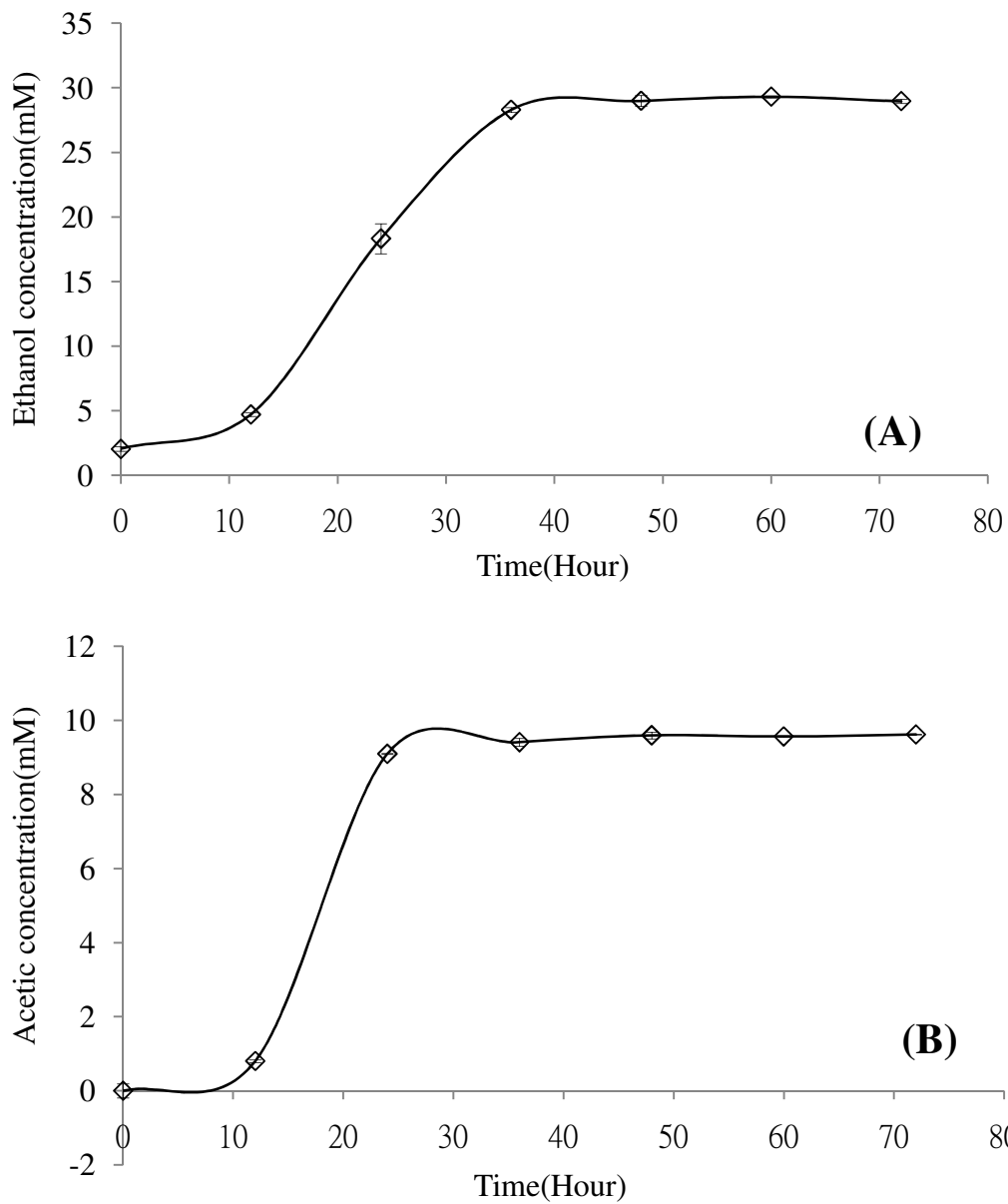


圖 4-22 Strain TCW1 以 α -cellulose 為碳源之乙醇及乙酸濃度比較。(A)乙醇濃度產生曲線；(B)乙酸濃度產生曲線。基質濃度為 5 g/L，培養溫度為 60°C，以 160 rpm 震盪進行批次培養。

4.6.2 震盪培養因子綜合討論

將上述之震盪培養實驗結果匯整為表 4-6，比較震盪與否對 strain TCW1 纖維水解產氫能力之影響，由此表可知 strain TCW1 在震盪培養時，其比生長速率會較無震盪培養的效果好上兩倍，最高可達 0.2315 day^{-1} ，而基質水解速率兩者則是有相近的效率，皆可達到 $2.5 \text{ g/L} \cdot \text{day}$ ，但在有震盪的情況下會稍微比無震盪的情形好一些，最佳水解速率可達 $2.93 \text{ g/L} \cdot \text{day}$ 。還原糖產率在此兩種情況下則會有明顯的差異，在震盪培養之情形下，其產率可達 $429.3 \text{ mg/L} \cdot \text{day}$ ，高出無震盪培養之兩倍以上。氣體累積產量及氫氣產率則都是有明顯的差異，震盪培養的氣體累積產量可達 $2680 \text{ mL/L} \cdot \text{liquid}$ ，幾乎是無震盪培養的 1.5 倍左右，而氫氣產率則是以震盪培養之 $106.7 \text{ mL/g} \cdot \text{cellulose}$ 明顯高於無震盪培養的 $66.55 \text{ mL/g} \cdot \text{cellulose}$ 。由上述可知，在震盪培養之情形下，不論是細胞生長、纖維水解、還原糖產率、氣體累積產量及氫氣產率皆明顯高於無振盪培養的情況，推測是震盪可使培養基中的基質均質化，使的菌體能夠與基質接觸的機會增加而使反應速率提升，且由於震盪能夠使培養液中的氫分壓減低，使培養液中抑制物質之壓力減小，讓細胞能夠持續產氫反應，以提高產氫量。

表 4-6 Strain TCW1 在震盪培養下之纖維水解產氫潛力比較表

	Specific growth rate (day ⁻¹)	Cellulose degradation rate (g/L · day)	Reducing sugar production rate(mg/L · day)	Total gas production (mL/L)	Hydrogen yield(mL/g · cellulose)
Non-shaking	0.1136	2.59	206.1	1690	66.55
Shaking	0.2315	2.93	429.3	2680	106.7

4.7 天然基質產氫測試

4.7.1 菌體生長分析

本實驗初期藉由純纖維基質 α -cellulose 的實驗，尋找較佳的纖維水解產氫環境，並以 4 種常見的天然纖維廢棄物(稻稈、狼尾草、橘子皮、蔬菜葉之粉末)作為碳源進行 strain TCW1 水解產氫測試，實驗培養條件為 60°C、起始 pH 6.99，基質濃度為 5 g/L，在 160 rpm 之震盪情況下進行醱酵培養，其結果如圖 4-21 所示。在此培養條件下，strain TCW1 確實能夠生長於此 4 種天然基質的培養下，細胞生長皆有明顯上升的趨勢，其中以稻稈培養的情況下為最佳(比生長速率可達 0.2496 day^{-1})，大約在第 36 小時會達到細胞生長的平穩期。由實驗結果可知 strain TCW1 確實皆能利用此 4 種天然基質，細胞的生長趨勢會與以稻稈及狼尾草為基質培養的趨勢較為相近，而以橘子皮或蔬菜葉的培養則生長情形較差，由此可確定 strain TCW1 的確有分解天然纖維基質的能力。

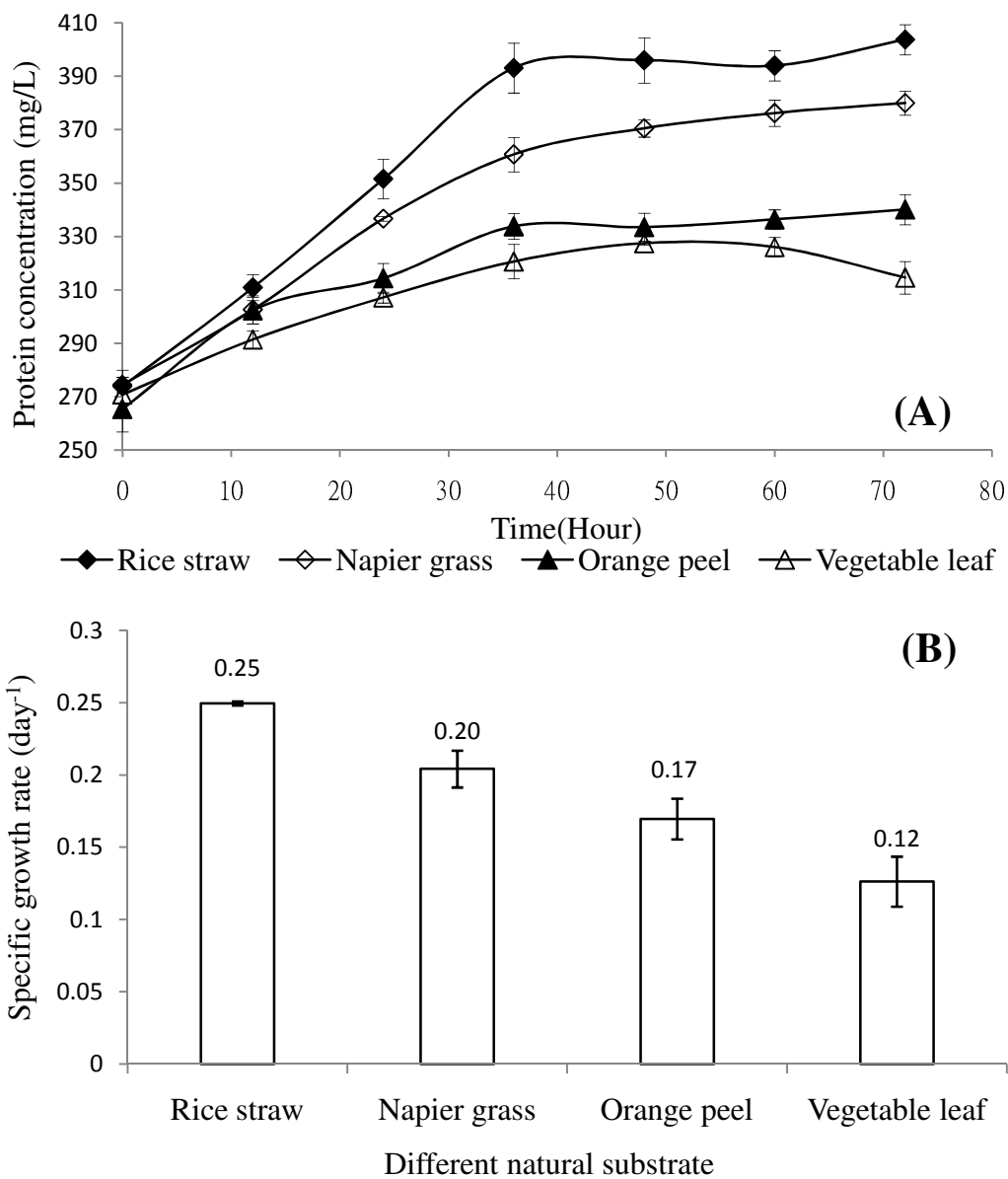


圖 4-23 Strain TCW1 以不同天然纖維基質為碳源之生長比較。(A)生長曲線，以總蛋白質量變化表示；(B)比生長速率。各種基質濃度均為 5 g/L，培養溫度為 60°C，以 160 rpm 震盪進行批次培養。

4.7.2 天然基質之液相產物分析

液相產物方面，實驗結果如圖 4-22 所示，可看出 strain TCW1 以稻稈為基質時能夠累積還原糖，在反應初期的前 36 小時內達到最高累積量 485 mg/L，而其他種類之天然基質除了蔬菜葉無還原糖的累積外，橘子皮及狼尾草在前 24 小時內也有少量之累積還原糖，而後其所產生之糖類馬上被細胞所利用而使趨勢又再度下降，推測可能為天然基質內的纖維素已被完全分解，僅存菌體無法利用的物質如木質素，在基質嚴重不足的情況下，細胞又回頭將先前所生產的糖類進行利用，而導致培養液中的糖類在 24 小時後逐漸降低。

以液相層析儀來分析其他種類之液相產物，結果如圖 4-23 所示，可看到以狼尾草所培養的乙醇濃度會有明顯增加的趨勢，最高可達 6.206 mM，而其他種類基質所培養的情況下卻幾乎沒有產醇之反應。以乙酸而言，其僅以稻稈及狼尾草為基質時有偵測到，其最高乙酸濃度累積分別可達 5.809 mM 及 9.243 mM。在橘子皮粉末及蔬菜葉粉末則完全沒有乙酸的累積，直到第 72 小時，以橘子皮粉末之培養基僅偵測到相當少量的乙酸，僅只有 0.6733 mM。

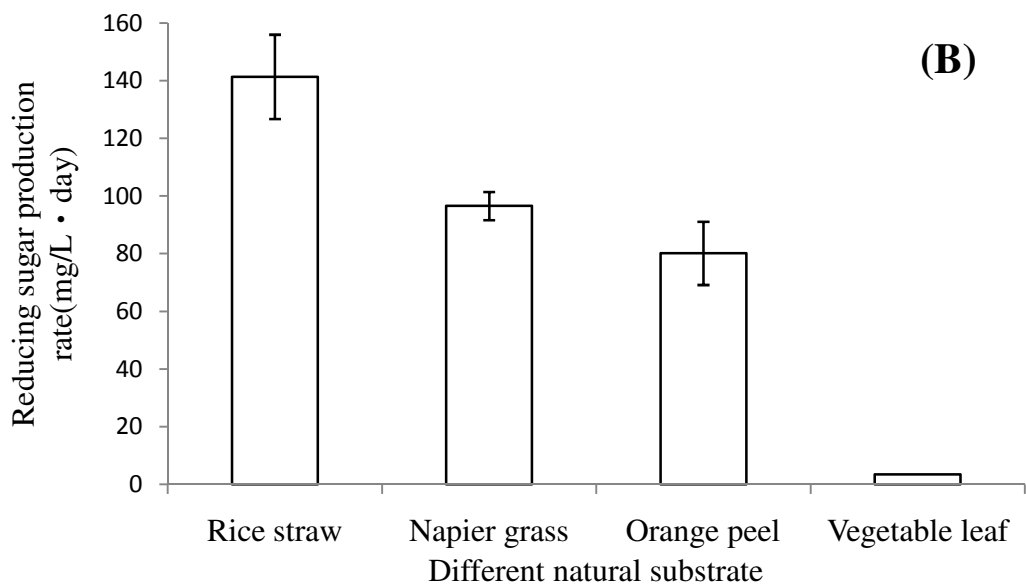
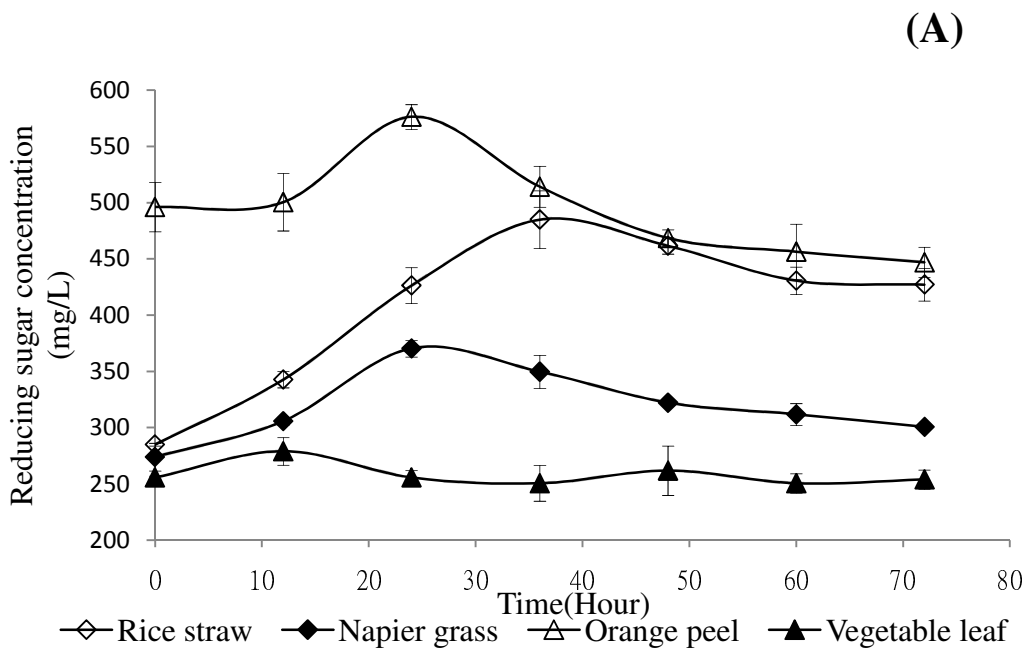


圖 4-24 Strain TCW1 以不同天然纖維基質為碳源之還原糖比較。(A)還原糖濃度產生曲線；(B)還原糖產生速率。各種基質濃度均為 5 g/L，培養溫度為 60°C，以 160 rpm 震盪進行批次培養。

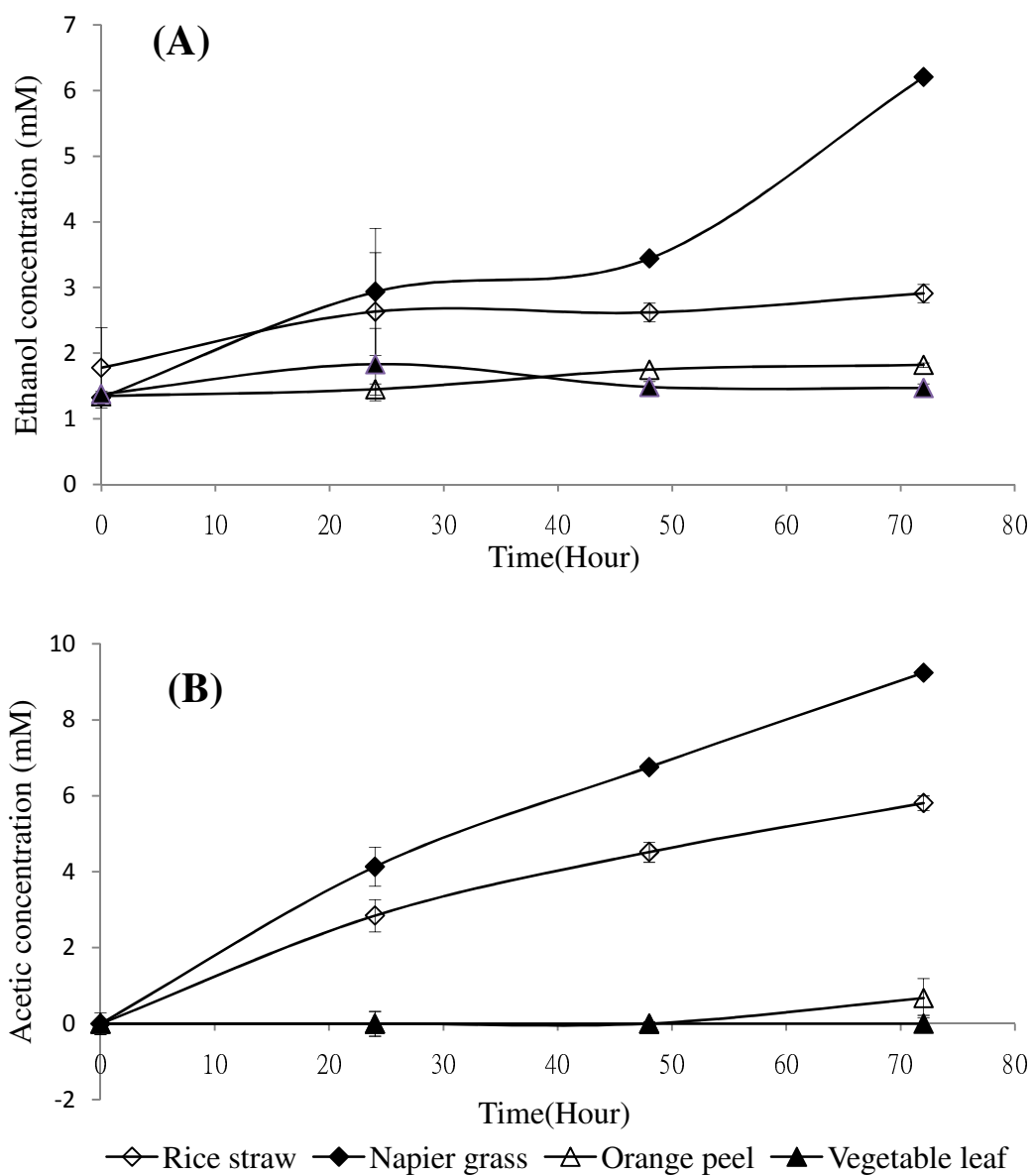


圖 4-25 Strain TCW1 以不同天然纖維基質為碳源之乙醇及乙酸濃度比較。(A)乙醇濃度產生曲線；(B)乙酸濃度產生曲線。各種基質濃度均為 5 g/L，培養溫度為 60°C，以 160 rpm 震盪進行批次培養。

4.7.3 天然基質之氣相產物分析

在氣相產物方面，其結果如圖 4-23 所示，可看出 strain TCW1 有直接利用纖維素產氫之能力，以狼尾草粉末為基質時能有最佳之效果，其能夠產生大量的生物氣體約 1475 mL/L·liquid，其中氫氣含量大約可達 274.4 mL/L·liquid，相較於先前以純纖維素為基質之產氫測試(圖 4-19)，純纖維素物質確實較容易被利用，但由於天然纖維基質中之成分較為複雜且較難以分解，因此其生物氣體及氫氣產量相對較少。以氫氣濃度而言，結果如圖 4-25 所示，由圖可知以稻稈及狼尾草為基質時，其氫氣含量會有較佳的表現，其濃度最高分別可達 27.73 % 及 23.88 %，產氫反應在培養 36 小時後逐漸趨於平緩，而以菜葉為基質所培養的情況下，產氫的情況相當地差，僅在前 12 小時有少量的氫氣產出。由此可見，雖然 strain TCW1 能夠利用天然纖維物質直接產生氫氣，但也不是所有的纖維廢棄物皆能有明顯的效果。

從結果來看，strain TCW1 針對這些具潛力的生質原料有著不同的水解產氫特性，雖然氫氣產率遠遠不及純纖維素，但至少可看到對於此 4 類天然基質都可進行水解並產生醣類及氫氣，顯示出 strain TCW1 能適應這些不同基質環境，因此在未來可具有相當廣泛的發展及利用性。

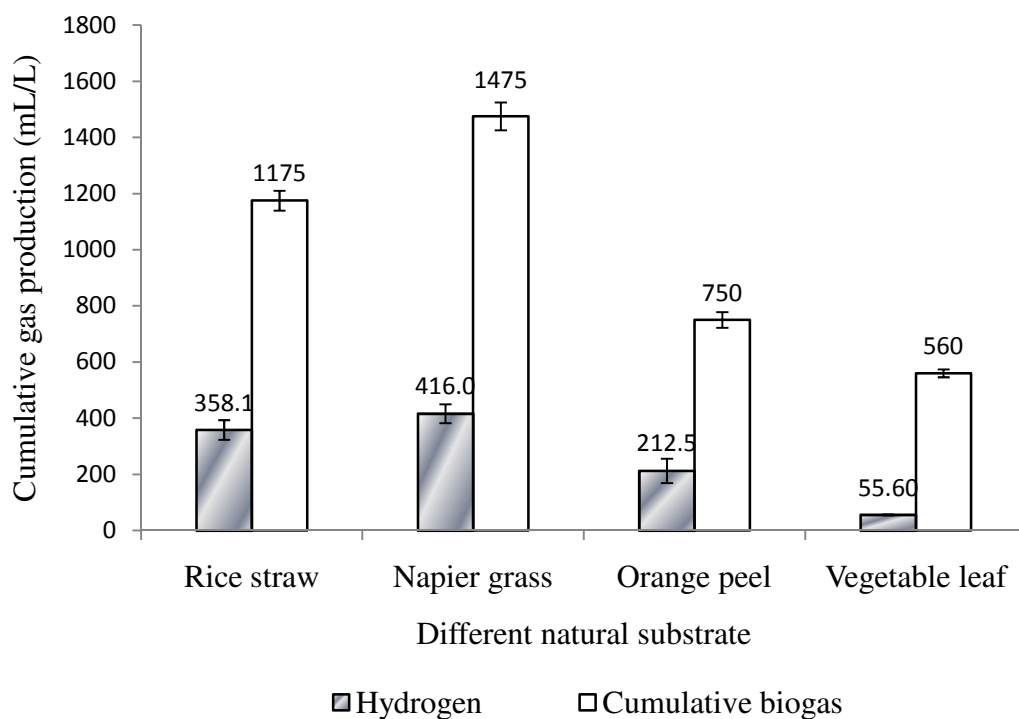


圖 4-26 Strain TCW1 以 4 種不同種類之天然纖維基質粉末(稻稈、狼尾草、橘子、蔬菜葉)，震盪培養於高溫 60°C、起始 pH 6.99 的情況下，其生物氣體及氫氣累積產量表示圖。

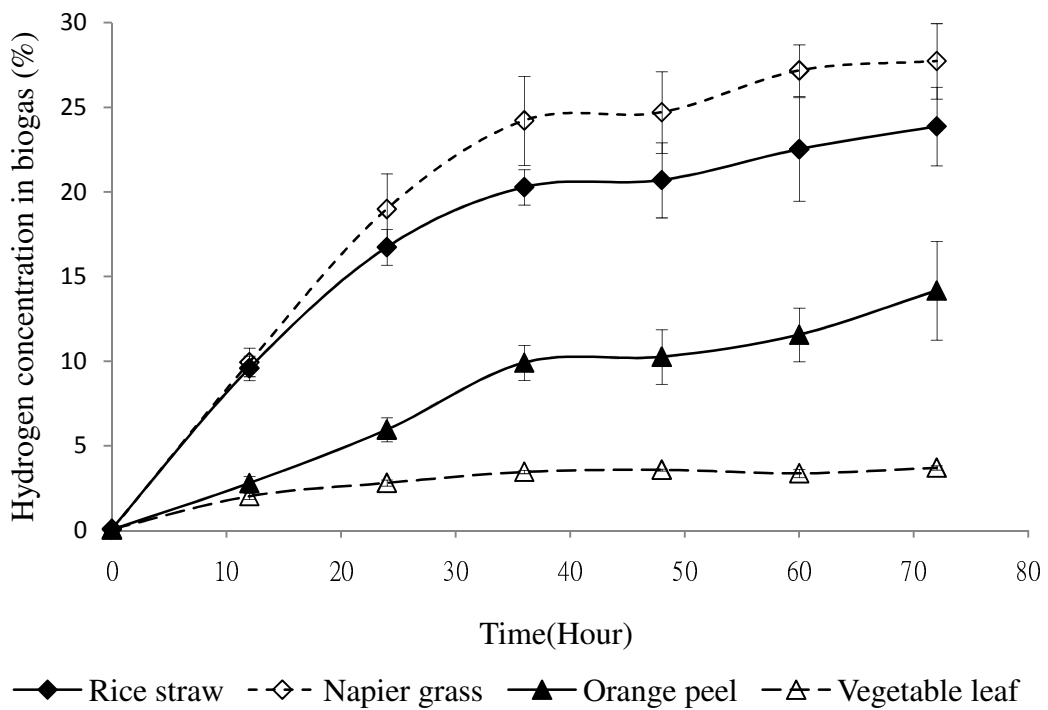


圖 4-27 Strain TCW1 以 4 種不同種類之天然纖維基質粉末(稻稈、狼尾草、橘子、蔬菜葉)，震盪培養於高溫 60°C、起始 pH 6.99 的情況下，其氣體產物中氫氣含量之時間變化曲線圖。

4.7.4 產氫能力分析

經由前述之試驗可發現在高溫 60°C 的震盪培養下，以不同種類之天然纖維性物質為基質，strain TCW1 確實皆能夠有產氫現象，並與先前之 α -cellulose 實驗產氫結果進行比較。以 Modified Gompertz equation 推估可得知最高產氫量(H_{max})及最大產氫速率分別列表如表 4-7 所示。

表 4-7 Strain TCW1 利用 Gompertz equation 推估之氫氣生產參數

Substrate	H_{max} (mL)	R_{max} (mL/h)
α -cellulose	114.5	1.91
Rice straw	85.36	1.40
Napier grass	99.63	1.66
Orange peel	41.04	0.75
Vegetable leaf	14.29	0.22

4.8 不同菌株水解纖維素產氫能力比較

將本研究之 strain TCW1 批次產氫結果與其他產氫文獻中之純菌相比較，選取同樣以批次實驗且基質為較複雜之澱粉或纖維素等純菌，比較相互之間的氫氣產量(表 4-7)。可發現嗜熱菌 *Clostridium thermocellum* strain TCW1 的產氫能力與其他產氫純菌差異不大，除了目前已知產氫能力最強的 *Clostridium butyricum* 之外，可知 *Clostridium thermocellum* strain TCW1 極具有生物產氫之潛能。

表 4-8 Strain TCW1 之氫氣產率能力與前人文獻比較

H ₂ producer	Culture type	Carbon source	H ₂ yield	Reference
<i>Clostridium pasteurianum</i>	Batch	Hydrolyzed carboxymethyl cellulose (10g/L)	1.09 mmol H ₂ /g • cellulose	Lo <i>et al.</i> (2008)
<i>Clostridium</i> sp.	Batch	Microcristalline cellulose (25 g/L)	2.18 mmol H ₂ /g • cellulose	Lay(2001)
<i>Clostridium</i> sp. strain No.2	Batch	Avicel hydrolysate ^a (3 g/L)	19.6mmol H ₂ /g • substrate	Taguchi <i>et al.</i> (1995)
<i>Thermoanaerobacterium</i>	Batch	Cellulose(5 g/L)	4.16 mmol H ₂ /g • cellulose	Liu, <i>et al.</i> (2003)
<i>Thermotoga neapolitana</i>	Batch	Cellulose(5 g/L)	1.07 mmol H ₂ /g • cellulose	Nguyen <i>et al.</i> (2008)
<i>Thermotoga maritima</i>	Batch	Cellulose(5 g/L)	0.96 mmol H ₂ /g • cellulose	Nguyen <i>et al.</i> (2008)
<i>Clostridium thermocellum</i> strain TCW1	Batch	Cellulose(5g/L)	4.35 mmol H ₂ /g • cellulose	This study

^a Obtained from enzymatic hydrolysis.

第五章 結論與建議

5.1 結論

在不同溫度的狀況下，利用 strain TCW1 以純纖維素為基質進行批次產氫試驗中，其在 60°C 能有最佳的比生長速率，可達約 0.2153 day⁻¹，而在纖維水解方面，自 50°C-65°C 幾乎能夠將 5 g/L 的基質完全降解，其最高水解速率為 2.437 g/L · day。以總產氣量而言，其生物氣體可產生 1075 mL/L · liquid，氫氣濃度最高可達約 19.5%，氫氣產率則可達 57.75 ml/g · cellulose。

初始 pH 為 6.99 時，strain TCW1 的比生長速率能有最佳的表現，最佳可達 0.1609 day⁻¹，相同情況下之纖維水解速率可達 2.167 g/L · day，以產氣量而言，其生物氣體最高可產生約 1190 mL/L · liquid，氫氣濃度最高可達約 18.9%，氫氣產率則可達 58.87 mL/g · cellulose。

在不同基質濃度的情況下，strain TCW1 的比生長速率會依基質濃度越高而有稍微增加的趨勢，自 5 g/L 的 0.0735 day⁻¹ 增加至 10 g/L 的 1.022 day⁻¹，但當基質濃度高於 20 g/L 時，其比生長速率便有下降的趨勢，約降至 0.0733 day⁻¹，與基質濃度為 5 g/L 時的比生長速率相似。纖維水解的情況則依基質濃度越高，其水解的量便越多，從 5 g/L

的 100% 完全水解，至 25 g/L 僅降解約 50%，但其還原糖產量能因基質濃度越高而累積量明顯變高，其最高濃度分別可達到(5 g) 0.91 g/L、(10 g) 2.17 g/L、(15 g) 3.58 g/L、(20 g) 3.77 g/L、(25 g) 4.68 g/L。在產氣方面，當纖維素濃度由 5 g/L 提高至 15 g/L 時，其生物氣體累積量會明顯從(5 g)1690 mL/L · liquid 增加至(10 g)2090 mL/L，當基質濃度增加超過 15g/L 後，產氣量便會逐漸開始下降，降至約(25 g)2000 mL/L · liquid，氫氣濃度則差異不大，大約介於 16.90% 至 18.04% 之間，氫氣產率則以 5 g/L 為最佳，可達 49.15 mL/g · cellulose。

以微量元素的實驗結果可知，當亞鐵(Fe^{2+})離子濃度為 40 mg/L 時，其有最佳的生物氣體累積量，可達 1365 mL/L · liquid，氫氣累積量則以亞鐵離子濃度為 5 mg/L 時最佳，可達 347.4 mL/L · liquid，氫氣濃度則差異不大，皆介於 16.05% 至 23.16% 之間。以鎳(Ni^{2+})離子濃度而言，當濃度為 0.01 mg/L 時，其生物氣體有最佳的累積量，可達 1510 mL/L · liquid，氫氣累積量最高可達 406.9 mL/L · liquid，氫氣濃度最高可達 26.32%。

在震盪培養試驗中，可知 strain TCW1 的比生長速率在有震盪(0.2315 day^{-1})的情況下會比無震盪(0.1136 day^{-1})培養的情況好上兩倍，纖維水解的情況則是差異不大，不論有無震盪皆可達到 2.5 g/L，day

以上。還原糖的產率在這兩種情形下就有明顯的差異，有震盪的情況下可達 429.3 mg/L · day，是無震盪培養 206.1 mg/L · day 的兩倍。在產氣方面，不論是生物氣體的累積或氫氣濃度皆為有震盪的情況較佳，最高分別可達到 2680 mL/L · liquid 及 34.12%。氫氣及二氧化碳的水溶性高，在有震盪的情況下，可將培養液中之水溶性氣體驅趕出來，減低抑制使其能夠持續進行產氫反應，提高產氫量及氫氣濃度。

5.2 建議

本研究針對 strain TCW1 的產氫特性進行探討，主要目的是在未來實際應用上提供依據，相對於許多產氫菌株，目前所發現之菌種大多皆需依賴前水解步驟，無法直接將纖維素轉換為氫氣，而此菌株最大的特點在於可同時完成纖維水解及產氫，因此在未來可考慮使用單相式批次反應槽來水解纖維素並同時生產氫氣，以減少反應槽體的設計及設置成本，同時也可直接處理纖維性廢棄物，轉換為可供利用的氫氣，以減緩廢棄物與日俱增及提供能源供應等問題。

實驗中未對天然纖維基質進行深入探討，然而從結果可看出相對於純纖維素基質，天然基質由於被其他結構性物質包覆而導致生長緩慢且產氫效率不佳，之後可針對基質的前處理做調整以增進直接利用纖維素產氫之效果，並探討 strain TCW1 產生並利用後所剩餘之還原

醱是否能夠提供給其他菌種做二次醱酵反應，以產生生質酒精或氫氣等生質燃料之可行性。

參考文獻

- Adams, M. W. W., Mortenson, L. E. and Chen, J. S.. (1980).
Hydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta.* 594: 105-176.
- Alshiyab, H., Kalil, M.S., Hamid, A.A. and Yusoff, W.M.W.. (2008).
Trace metal effect on hydrogen production using *C. acetobutylicum*.
Online J. Biol. Sci., 8(1):1-9.
- Balat, M.. (2008). Potential importance of hydrogen as a future solution
to environmental and transportation problems. *Int. J. Hydrogen
Energy.* 33:4013-4029.
- Beguin, P. and Aubert, J.. (1994). The biological degradation of cellulose,
FEMS Microbiol. Rev. 13, 25-58.
- Bjerre, A. B., Olesen, A. B., Fernqvist, T., Ploger, A., and Schmidt, A. S..
(1996) Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation
and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and
hemicelluloses. *Biotechnol. Bioeng.* 49, 568-577.
- Bradford, M.M.. (1976). A rapid and sensitive method for the
quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle
of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 98(1):289-297.
- Calvin, M., and Taylor, S.E.. (1989). Fuels from algae. In: Cresswell RC,
Rees TAV, Shah N, editors. *Algal and cyanobacterial biotechnology*.
London: Longman Scientific and Technical. p. 137-160.
- Canganella, F. and Weigel, J.. (1993). The potential of thermophilic
clostridia in biotechnology. In: *The Clostridia and Biotechnology*, D.
R. Woods, (eds), Butterworth-Heinemann.
- Cato, E. P., George, W. L. and Finegold, S. M.. (1986). The genus

- Clostridium*. In: H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (ed), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1141-1200.
- Chen, J. S., and Mortenson, L. E.. (1974). Purification and properties of hydrogenase from *Clostridium pasteurianum* W5. *Biochim. Biophys. Acta.* 371: 283-298.
- Dabrock, B., Bahl, H., and Gottschalk, G.. (1992). Parameters affecting solvent production by *Clostridium pasteurianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1233-1239.
- Das, D., and Veziroğlu, T.N..(2001). Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *Int. J. Hydrogen Energy.* 25, 13-28.
- Desvaux, M., Guedon, E., and Petitdemange, H.. (2000). Cellulose catabolism by *Clostridium cellulolyticum* growing in batch culture on defined medium, *Appl Environ. Microbiol.* 66, 2461–2470.
- Fabiano, B., and Perego, P.. (2002). Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by *Enterobacter aerogenes*. *Int. J. Hydrogen Energy.* 27, 149-156.
- Fang, H.P. and Liu, H.. (2002). Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture. *Bioresource Technol.* 82, 87-93.
- Ferchichi, M., Crabbe, E., Gil, G.H., Hintz, W., and Almadidy A..(2005). Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. *J. Biotechnol.* 120, 402-409.
- Ferchichi, M., Crabbe, E., Hintz, W., Gil, G.H., and Almadidy A..(2005). Influence of culture parameters on biological hydrogen production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC 27021. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 21, 855-862.

- Freier, D., Mothershed, C.P. and Wiegel, J.G.. (1988). Characterization of *Clostridium thermocellum* JW20, *Appl. Environ Microbiol.* 54, 204-211.
- George, H. A., Johnson, J. L., Moore, W. E. C., Holdeman, L. V. and Chen, J. S.. (1983). Acetone, isopropanol, and butanol production by *Clostridium beijerinckii* (syn. *Clostridium butylicum*) and *Clostridium aurantibutyricum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1160-1163.
- Girbal, L., Croux, C., Vasconcelos, I. and Soucaille, P.. (1995). Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *FEMS Microbiol. Rev.* 17, 287-297.
- Gottschalk, G.. (1985). Bacterial metabolism. 2nd ed, Springer-Verlag New York Inc.
- Hägström, L.. (1986). Kinetics of product formation in batch and continuous culture of *Clostridium barkeri*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 187-190.
- Holtzapfel, M. T., Jun, J., Ashok, G., Patibandla, S. L., and Dale, B. E.. (1991) The ammonia freeze explosion (AFEX) process A practical lignocellulose pretreatment, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 28(29), 59-74.
- Huang, C.Y., Patel, B.K., Mah, R.A. and Baresi, L.. (1998). *Caldicellulosiruptor owensensis* sp. Nov., an anaerobic, extremely thermophilic, xylanolytic bacterium. *Int. J. Syst Bacteriol.*, 48, 91-97.
- Hungate, R.R.. (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods Microbiol.* 3(B), 117-132.
- International Energy Agency. (2003). Renewables Information 2003, IEA, Paris.

- Junelles, A. M., Janati-Idrissi, R., Petitedemange, H., and Gay, R.. (1988). Iron effect on acetone butanol fermentation. *Curr. Microbiol.* 17, 299-303.
- Jungermann, K., Thauer, R. K., Leimenstoll, G. and Decker, K.. (1973). Function of reduced pyridine nucleotide-ferredoxin oxidoreductases in saccharolytic clostridia. *Biochim. Biophys. Acta.* 305, 268-280.
- Khanal, S.K., Chen, W.H., Li, L. and Sung, S.. (2004). Biological hydrogen production: effect of pH and intermediate products. *Int. J. Hydrogen Energ.* 29, 1123-1131.
- Kumar, D., and Kumar, H. D.. (1991). Effect of monochromatic lights on nitrogen fixation and hydrogen evolution in the isolated hetrocysts of *Anabaena* sp. strain CA. *Int. J. Hydrogen Energy.* 16, 397-401.
- Kutzenock, A. and Aschner, M.. (1952). Degenerative processes in a strain of *Clostridium butylicum*. *J. Bacteriol.* 64, 829-836.
- Lai, T. E., Nopharatana, A., Pullammanappallil, P. C., and Clarke, W. P.. (2001). Cellulolytic activity in leachate during leach-bed anaerobic digestion of municipal solid waste, *Bioresource Technol.* 80, 205–210.
- Lambert, G. R., and Smith, G.D..(1981). The hydrogen metabolism of cyanobacteria (blue-green algae). *Biol. Rev.* 56, 589-660.
- Lay, J.J..(2001). Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose. *Biotechnol. Bioeng.* 74(4), 280-287.
- Lejeune, R., Baron, G.V.. (1995). Effect of agitation on growth and enzyme production of *Trichoderma reesei* in batch fermentation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 249-258.

- Lin, C.Y., and Lay, C.H.. (2005). A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora. *Int. J. Hydrogen Energy*. 30, 285-292.
- Liu, G., and Shen, J..(2004). Effects of culture and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria. *J. Biosci. Bioeng.*98(4), 251-256.
- Liu, H., Zhang, T., and Fang, H.H.P..(2003). Thermophilic H₂ production from a cellulose-containing wastewater, *Biotechnol. Lett.* 25, 365-369.
- Lo, Y.C., Bai, M.D., Chen, W.M., and Chang, J.S..(2008). Cellulosic hydrogen production with a sequencing bacterial hydrolysis and dark fermentation strategy. *Bioresource Technol.* 99, 8299-8303.
- Lo, Y.C., Chen, W.M., Hung, C.H., Chen, S.D., and Chang, J.S.. (2008). Dark fermentation from sucrose and xylose using H₂-production indigenous bacteria: Feasibility and kinetic studies. *Water Res.* 42, 827-842.
- Macy, J.M., Snellen, J.E. and Hungate, R.E.. (1972).Use of syringe methods for anaerobiosis. *Amer. J. Clin. Nutr.* 25, 1318-1323.
- McCoy, E. and Fred, E.B.. (1941). The stability of a culture for industrial fermentation. *J. Bacteriol.* 41, 90-91.
- Michel-Savin, D., Marchal, R. and Vandecasteele, J. P.. (1990). Control of selectivity of butyric acid production and improvement of fermentation performance with *Clostridium tyrobutyricum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 387-392.
- Miller, G.L.. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* 31, 426-428.

- Mosier, N., Wyman, C., Dale, B., Elander, R., Lee, Y. Y., Holtzapfle, M., and Ladisch, M.. (2005). Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass, *Bioresource Technol.* 96, 673–686.
- Nguyen, T.A.D., Kima, J.P., Kim, M.S., Oh, Y.K., Sim, S.J.. (2008). Optimization of hydrogen production by *hyperthermophilic eubacteria, Thermotoga maritime* and *Thermotoga Neapolitana* in batch fermentation. *Int. J. Hydrogen Energy.* 33, 1483-1488.
- Noike, T., Endo, G., Chang, J., Yaguchi, J., and Matsumoto, J.. (1985). Characteristics of carbohydrate degradation and the rate-limiting step in anaerobic digestion, *Biotechnol. Bioeng.* 27, 1482–1489.
- Peguin, S. and Soucaille, P.. (1995). Modulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* by iron limitation and methyl viologen addition. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 403-405.
- Rani, D.S., Thirumale, S., and Nand, K..(2004). Production of cellulose by *Clostridium papyrosolvans* CFR-703. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20, 629-632.
- Rheinheimer, G.. (1992). The influence of environmental factors on the development of microorganisms. Rheinheimer G. eds., *Aquatic Microbiology* 4th ed., 111-147, Baffins Lane, England.
- Sarker, S., Pandey, K. D., and Kashyap, A. K..(1992). Hydrogen photoproduction by filamentous non-heterocystous cyanobacterium *Plectonema boryana* and simultaneous release of ammonia. *Int. J. Hydrogen Energy.* 17, 689-94.
- Schoenheit, P., Brandis, A., and Thauer, R. K.. (1979). Ferredoxin degradation in growing *Clostridium pasteurianum* during periods of

- iron deprivation. *Arch. Microbiol.* 120, 73-76.
- Sjolander, N. O. and McCoy, E.. (1973). Studies on anaerobic bacteria. A cultural study of some “butyric” anaerobic previously described in the literature. *Zentralbl. Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten, Hygiene, Abteilung 2.* 97, 314-324.
- Stewart, W. D. P..(1980). Some aspects of structure and function in N₂-fixing cyanobacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 34, 497-536.
- Taguchi, F., Mizukami, N., Yamada, K., Hasegawa, K., Saito, T.T.. (1995). Direct conversion of cellulosic materials to hydrogen by *Clostridium* sp. strain No. 2. *Enzyme Microbiol. Technol.* 17, 147-150.
- Updegraff, D. M.. (1969). Semimicro determination of cellulose in biological materials.” *Anal. Biochem.* 32, 420-424.
- Van Dyke, M.I., and McCarthy, A.J.. (2002). Molecular biological detection and characterization of *Clostridium* populations in municipal landfill sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(4), 2049-2053.
- Viles , F. J. Jr., and Silverman, L.. (1949). Determination of starch and cellulose with anthrone, *Anal. Chem.* 21, 950-953.
- Wachsman, J. T. and Barker, H. A.. (1955). The accumulation of formamide during the fermentation of histidine by *Clostridium tetanomorphum*. *J. Bacteriol.* 69, 83-88.
- Wang, C.H., Lin, P.J., Chang, J.S.. (2006). Fermentative conversion of sucrose and pineapple waste into hydrogen gas in phosphate-buffered culture seeded with municipal sewage sludge, *Process Biochem.* 41, 1353-1358.
- Wang, J.L. and Wan, W.. (2008). Effect of Fe²⁺ concentration on

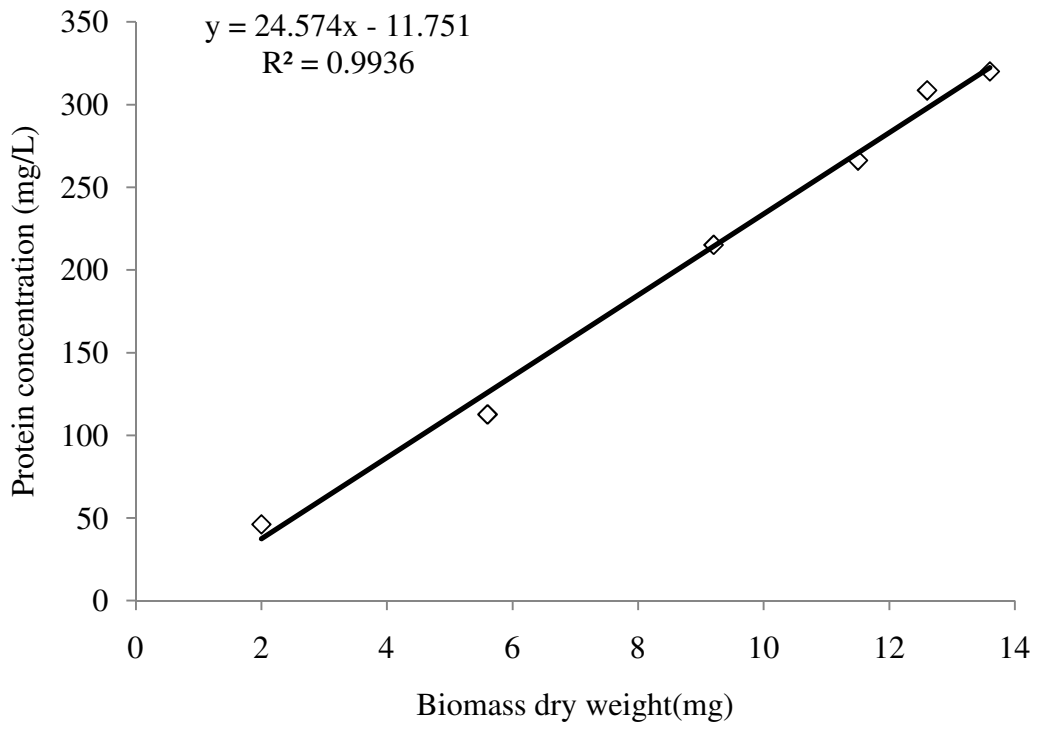
- fermentative hydrogen production by mixed cultures, *Int. J. Hydrogen Energy*. 33, 1215-1220.
- Wang, J.L. and Wan, W.. (2008). Influence of Ni²⁺ concentration on biohydrogen production. *Bioresource Tech.* 99, 8864-8868.
- Wiegel, J., Kuk, S. U., and Kohring, G. W.. (1989). *Clostridium thermobutyricum* sp. nov., a moderate thermophile isolated from a cellulolytic culture, that produces butyrate as the major product. *Int. J. Syst. Bacterial.* 39(2), 199-204.
- Wiegel, J..(1982). Ethanol from cellulose. *Cell. Mol. Life Sci.* 38, 151-155.
- Yokoi, H., Ohkawa, T., Hirose, J., Hayashi, S., and Takasaki, Y.. (1995). Characteristics of hydrogen production by aciduric, *Enterobacter aerogen* strain HO-39. *J. Ferment. Bioeng.* 50, 571-574.
- Zhang, T., Liu, H., Fang, H.H.P..(2003). Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic conditions. *J. Environ. Manag.* 69, 149-156.
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombout, F. M., and Van't, Riet K. (1990), Modeling of bacterial growth curve, *Appl. Environ. Microbial.* 56(6), 1875-1881.
- 王貴譽，張瑞烽。(1993)。微生物學第五版，第24-29頁。
- 王曉怡。(2008)。厭氧生物降解龍鬚菜產甲烷程序最佳化之探討，東海大學環境科學與工程研究所碩士論文。
- 王馨儀。(2005)。以牛糞中嗜熱厭氧菌群分解纖維素產乙醇之研究，東海大學環境科學與工程研究所碩士論文。

- 古森本。(2008)。生質能源作物之開發與潛力，農業生技產業季刊，13：46-53。
- 白明德。(1999)。厭氧生物產氫機制與程序操作策略之研究，成功大學環境工程研究所碩士論文。
- 曲新生，陳發林，呂錫民。(2007)。產氫與儲氫技術。第一版，五南圖書出版股份有限公司，台北市。
- 吳季芳。(2006)。以澱粉為碳源基質進行生物產氫。國立成功大學碩士論文。
- 吳耿東，李宏台。(2004)。生質能源化腐朽為能源。科學發展，383期，20-27。
- 徐維廷。(2007)。纖維水解菌群中嗜熱產氫菌*Clostridium* sp. C4之分離及其產氫特性研究，東海大學環境科學與工程研究所碩士論文。
- 張仕旻。(2001)。利用薄膜反應器於高溫厭氧產氫生物程序之研究，成功大學環境工程學系研究所碩士論文。
- 張嘉修、李國興、林屏杰、吳石乙、林秋裕。(2002)。以環境生物技術生產清潔能源—氫氣，化學工程，第49卷，第6期，第85-104頁。
- 郭博堯。(2003)。全球石油危機的油價衝擊，國家政策論壇季刊，夏季號。

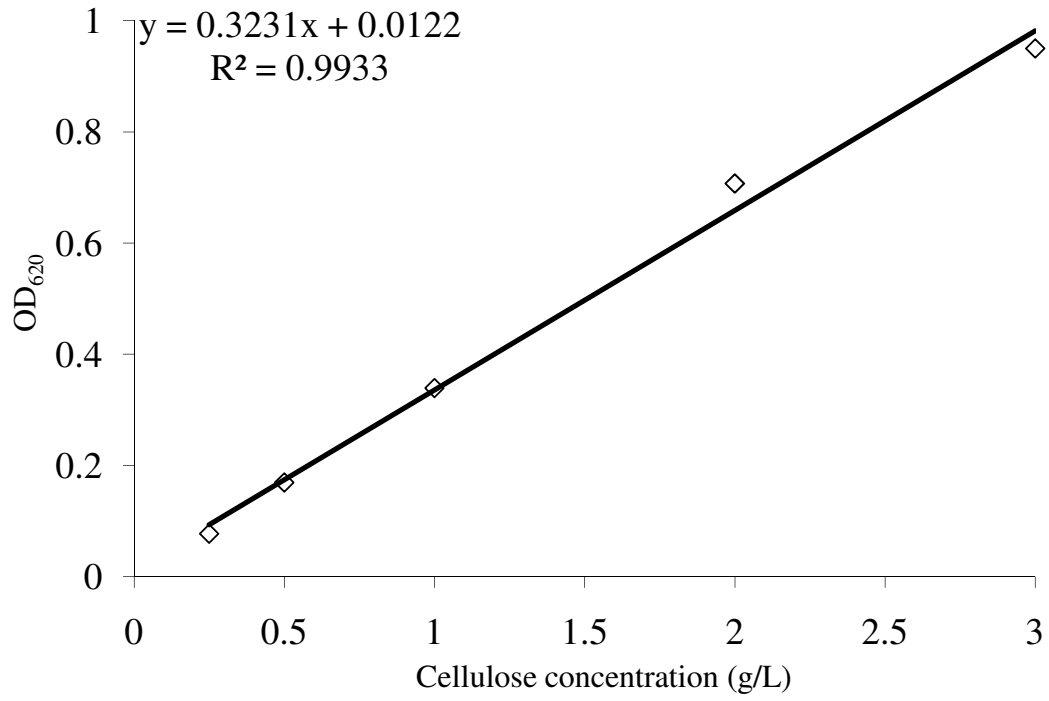
- 傅子寧。(2009)。牛糞肥中一株嗜熱厭氧纖維水解菌*Clostridium* sp. TCW1 之分離鑑定及纖維醱化特性研究，東海大學環境科學與工程研究所碩士論文。
- 楊忠龍。(2004)。*Clostridium thermocellum* & *Klebsiella pneumoniae* 分解纖維素產氫之特性分析，高雄第一科技大學環境與衛生安全工程系碩士論文。
- 韓長龍。(2003)。以動態植種方式促進高濃度固體之厭氧產氫，高雄第一科技大學環境與衛生安全工程研究所碩士論文。
- 羅泳勝。(2005)。以反應曲面實驗設計法探討本土厭氧產氫菌 *Clostridium butyricum* CGS2 之最佳醱酵產氫條件，國立成功大學化學工程學系碩士論文。

附錄

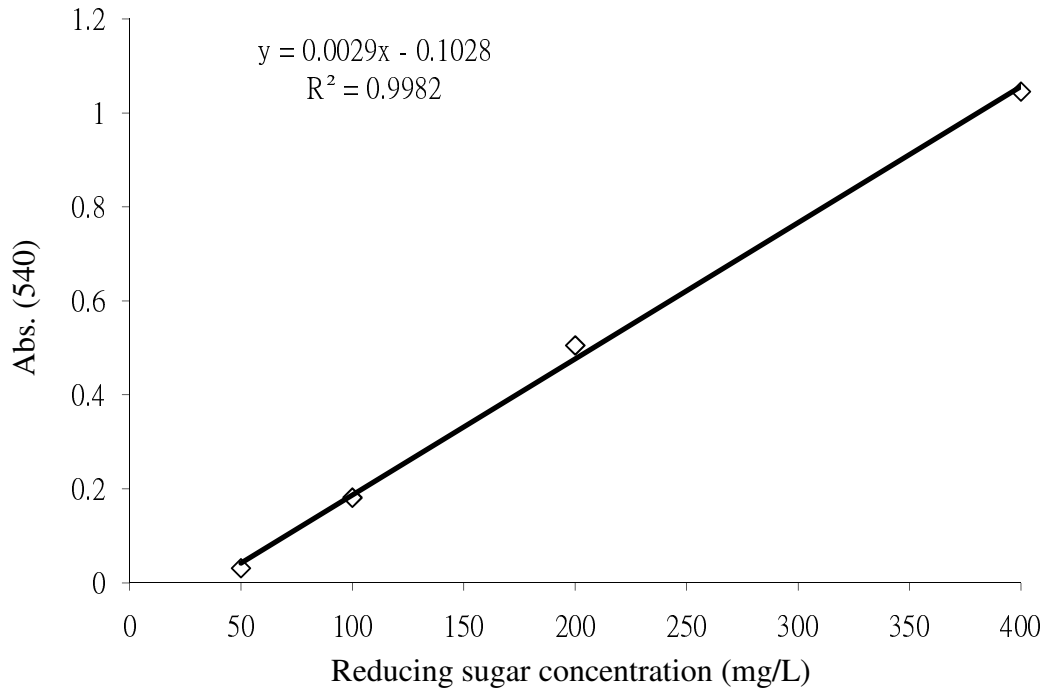
附錄一 蛋白質檢量線



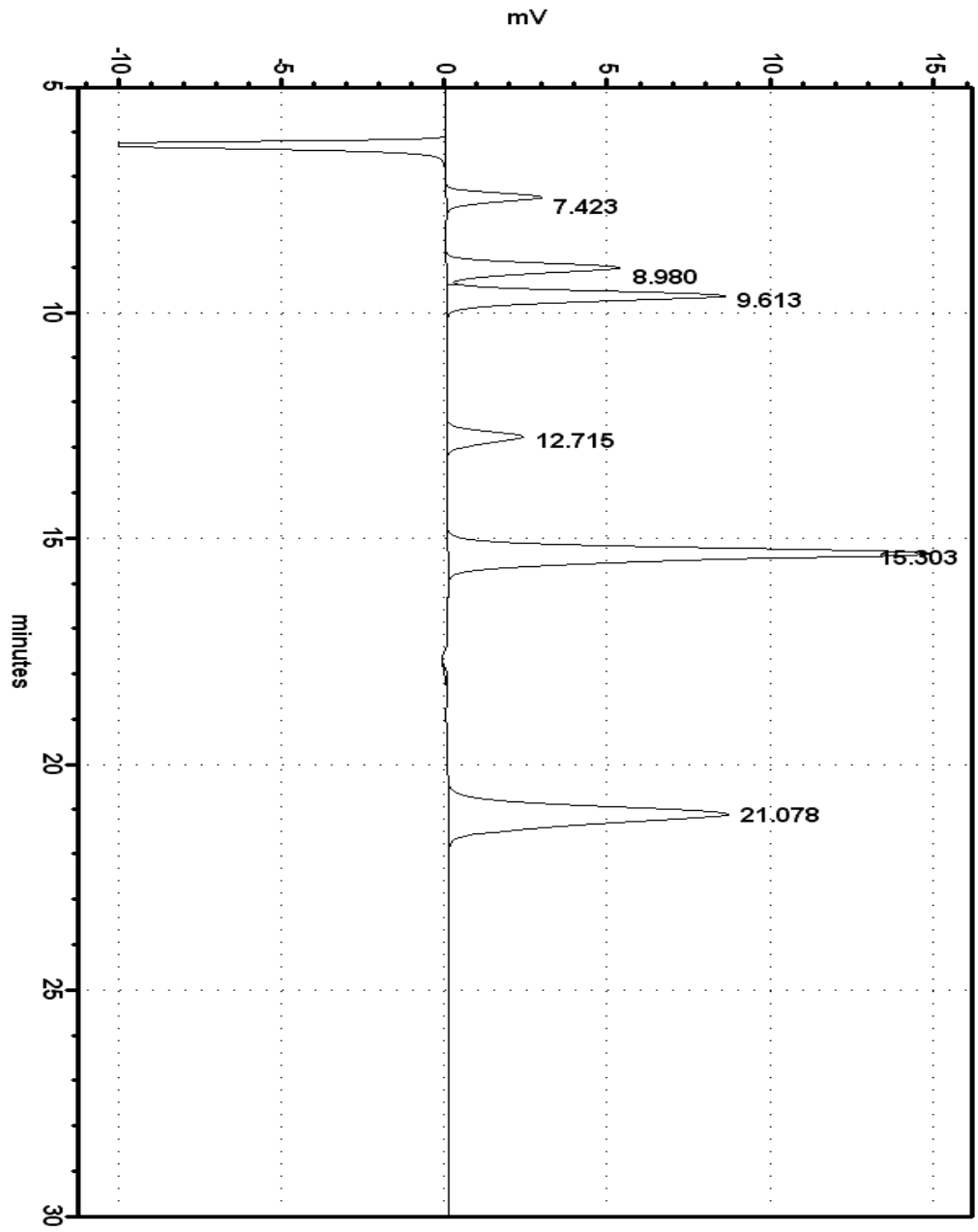
附錄二 纖維素檢量線



附錄三 還原糖檢量線

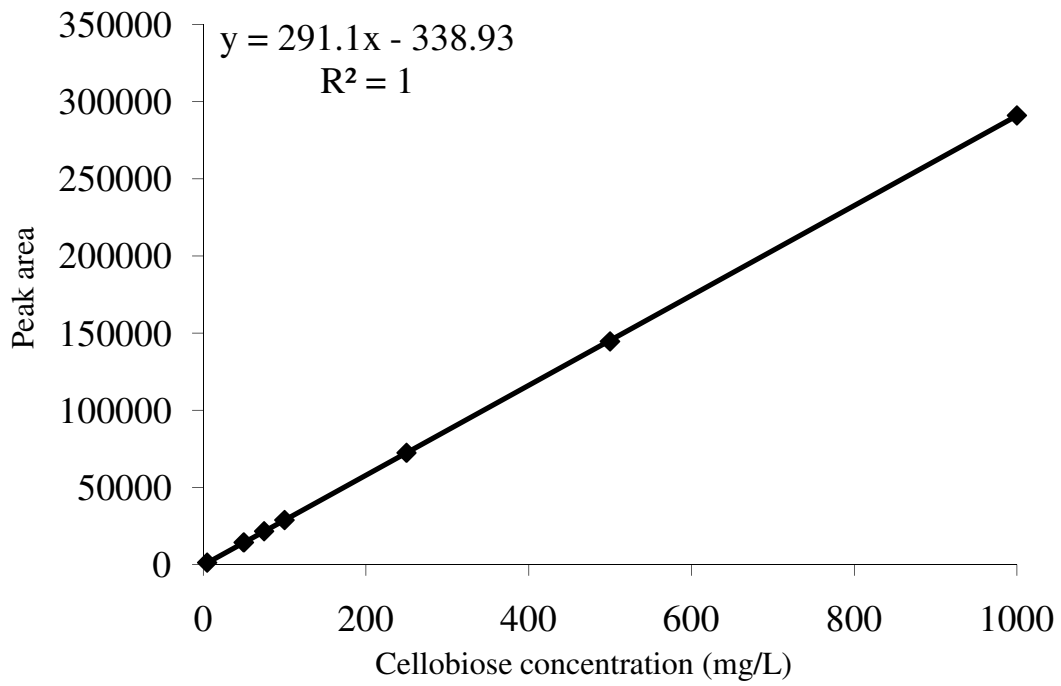


附錄四 液相代謝產物標準品 HPLC 停留時間及檢量線

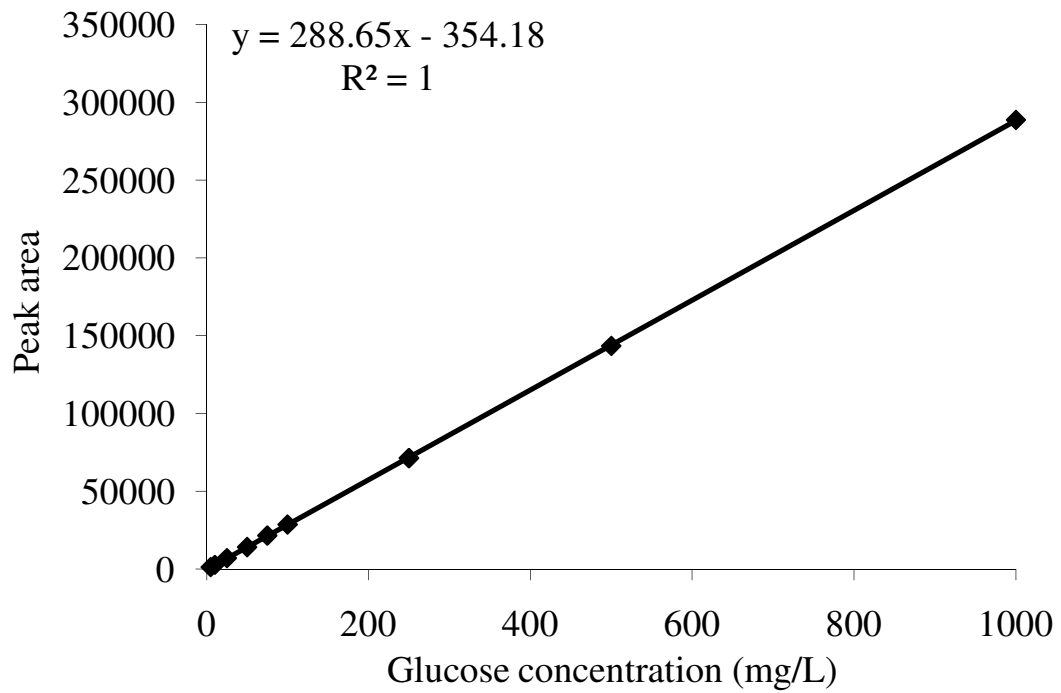


Retention time =	Cellobiose	7.423 min
	Glucose	8.980 min
	Xylose	9.613 min
	Lactate	12.715 min
	Acetate	15.303 min
	Ethanol	21.078 min

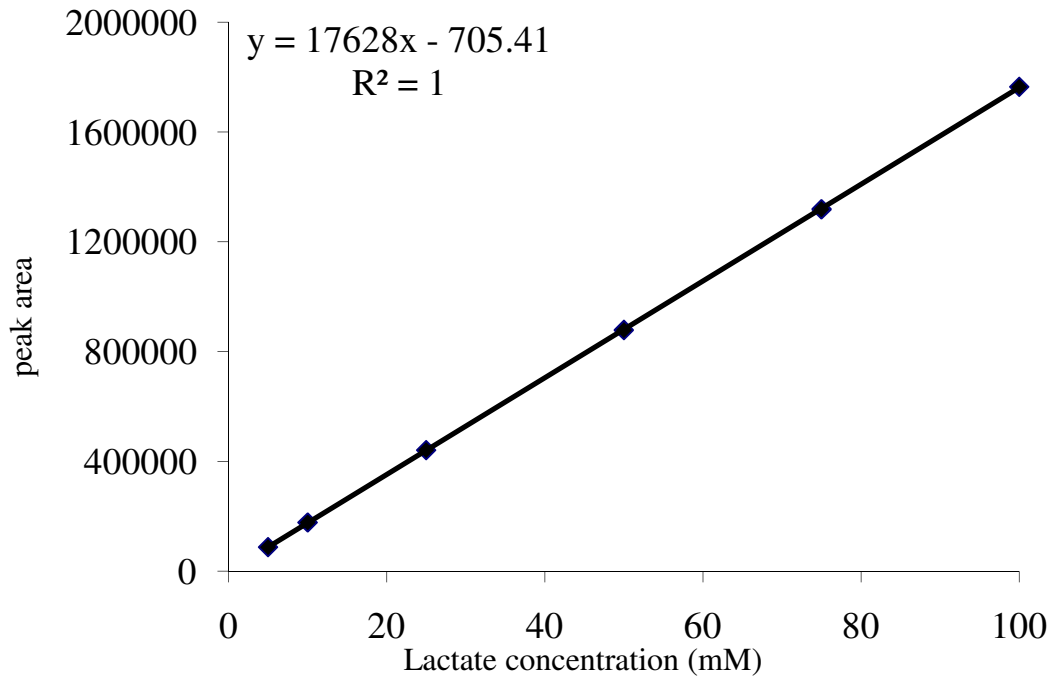
纖維二糖 HPLC-RID 檢量線



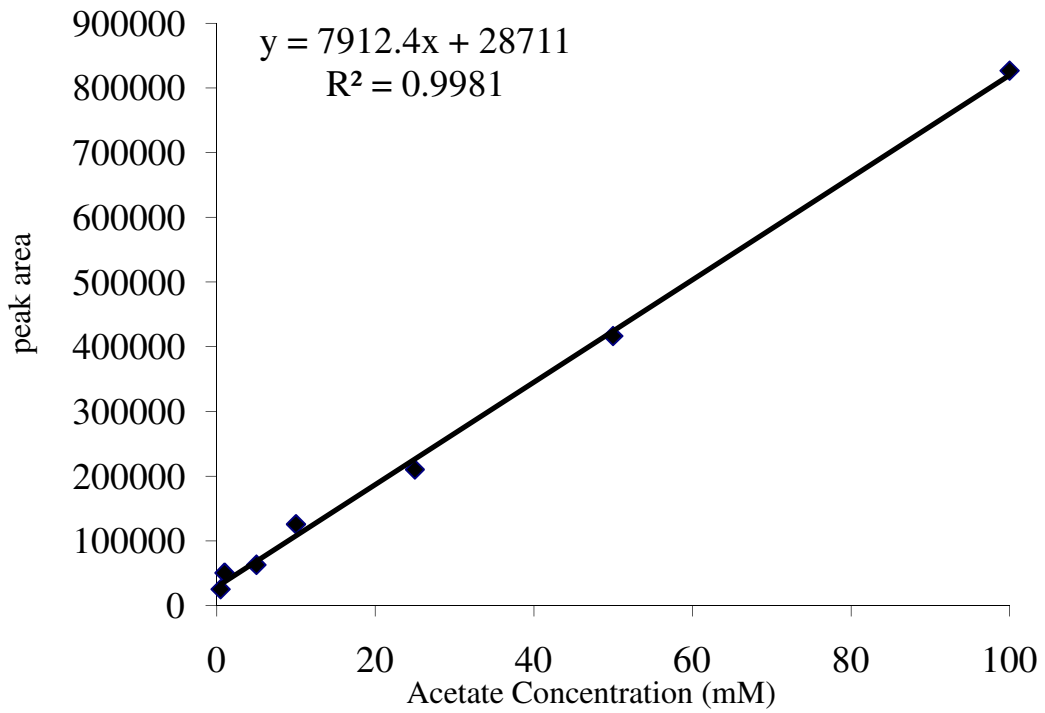
葡萄糖 HPLC-RID 檢量線



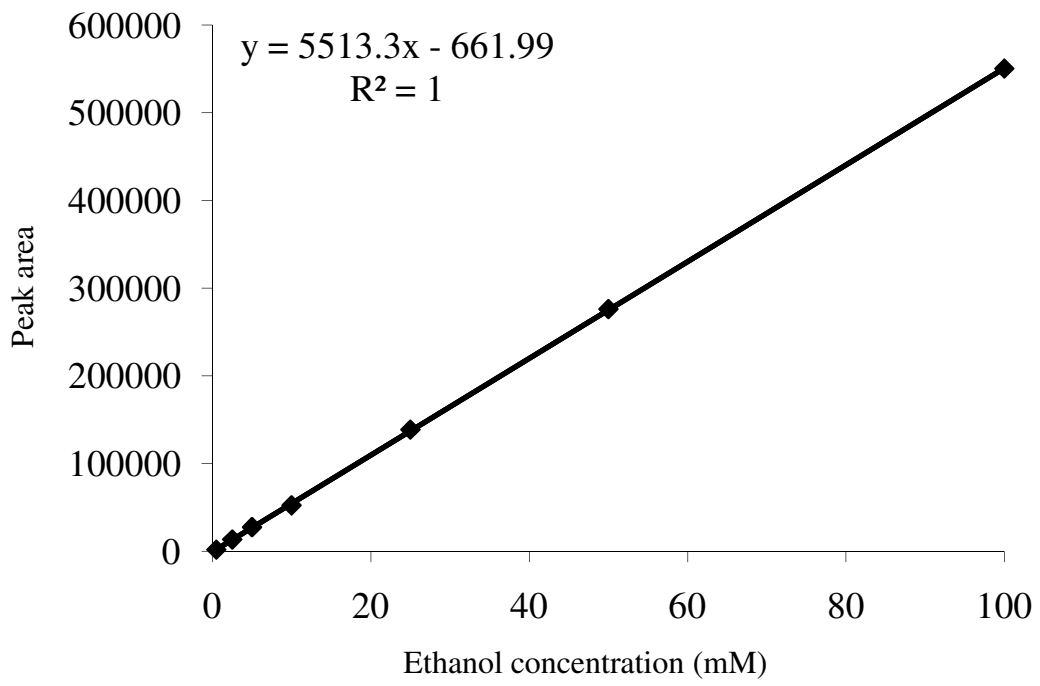
乳酸 HPLC-RID 檢量線



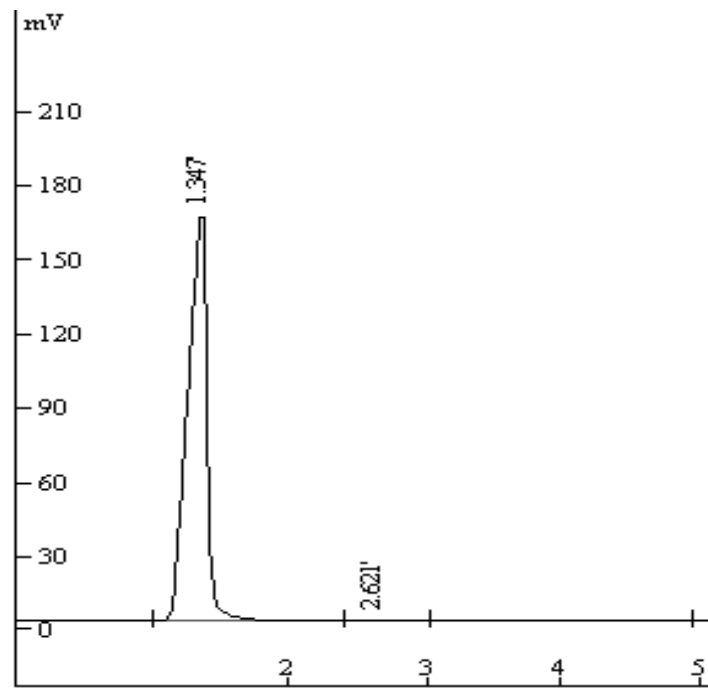
乙酸 HPLC-RID 檢量線



乙醇 HPLC-RID 檢量線



附錄五 氫氣標準品 GC-TCD 停留時間及檢量線



Retention time = Hydrogen 1.347 min

氫氣檢量線

