

# 臺灣二〇〇八年國際科學展覽會

科 別：微生物學

作品名稱：廢紙漿發酵產氫之探究

得獎獎項：佳作

學校 / 作者：國立臺中第一高級中學  
國立臺中第一高級中學

林哲群  
謝秉儒

# 目錄

作者簡介	p. 2~3
壹、摘要。	p.4
貳、前言。	p.5~8
參、實驗器材與藥品。	p.9
肆、研究過程與方法。	p.10~18
伍、研究結果與討論。	p.19~28
陸、結論與應用。	p.29
柒、未來展望與研究。	p.30~31
捌、參考文獻。	p.32

## 作者介紹



我叫林哲群，目前就讀台中一中。

從小熱愛運動，不論是籃球、網球、桌球或是跑步都得心應手。從小跟著父母玩遍台灣，北到基隆南至墾丁；長大出國旅遊，足跡遍佈亞洲、歐洲，還自己去美國太空總署(NASA)逛了半個月。平常時，寫寫書法調劑身心，以舒緩沉重的課業壓力。

藉由這次科展，設計一套簡易的廢紙漿產氫系統，以因應目前能源不足和廢物利用的問題，對美麗的地球盡一小小的力量。

## 作者介紹



我是謝秉儒，目前就讀於台中一中，利用日常排定專題的時間研究微生物學，在研究本次實驗中，學到很多實驗都是基於其他人的辛苦研究，而且我們的實驗都是自己想出，由此我可以體會站在科學界尖端科技的辛苦，藉由動腦思考，如何讓自己理論更加完備，也讓我的邏輯思考更加純熟。

會選定這個主題是希望盡自己的一份心力減少化石燃料的使用，為地球的環境盡一份心力。



## 壹、摘要

氫氣在燃燒後只會產生水而不產生溫室氣體之二氧化碳，可謂一種潔淨能源。生質能源是屬於碳中性(Carbon neutral)型之利用方式，因此本研究著眼於如何建構一個操作簡便的共代謝系統，將生質料源從微生物之發酵反應中釋放氫氣出來。

實驗的主要方法是利用好氧性的 *Bacillus thermoamylovorans* 與厭氧性的 *Clostridium butyricum* 共培養分解廢紙漿以生產氫氣。廢紙漿是混合的基質，內富含纖維素、並含一些油墨及少許雜質。利用 *Bacillus thermoamylovorans* 是好氧菌，同時也能將廢紙漿中的纖維素轉換成還原醣的特性，將原本有氧的環境轉換成絕對厭氧的環境，並將廢紙漿中的纖維素轉化成 *Clostridium butyricum* 可以利用的還原醣。如此一來，原本不利於 *Clostridium butyricum* 生長的環境，卻能透過簡單的共培養方式創造出有利於 *Clostridium butyricum* 生長的環境並產生氫氣。除此之外，我們也對不同碳源、不同的植菌量、不同的氧氣量，比較其產氫能力差異，發現增加氧氣量可以提升最後的產氫量大約 2.7 倍。

## Abstract

Our major goal is to develop a cost-effective biohydrogen production system by the co-culturing of *Bacillus thermoamylovorans* and *Clostridium butyricum*. The aerobic *Bacillus thermoamylovorans* will consume oxygen and converse waste paper pulp into reductant-sugar and the anaerobic *Clostridium butyricum* will generate hydrogen after oxygen is consumed. With the increase of aeration, the aerobic *Bacillus thermoamylovorans* grows appropriately leading to more biohydrogen production. However, in enhanced aeration condition, the *Bacillus thermoamylovorans* will consume sugars that can offer for the *Clostridium butyricum*. So we can conclude that the control of oxygen is the key point for the system to operate.

## 貳、前言

### 一、 實驗動機：

因應目前世界能源越來越少，生質能源變成一個顯而易見而且勢在必行的趨勢，在閱讀科學人、國家地理雜誌時，得知目前美國以玉米生產酒精不僅造成食物價格節節攀升，更在生產的過程中投入大量的石化燃料，整體經濟效益並不高；而目前量產的生質酒精，只用一株玉米極少的部份，剩下的纖維素完完全全浪費掉了，於是我們就想有沒有方法可以利用剩下的纖維素，將一株玉米的利用價值提升到最高。又鑑於現今全球暖化日益嚴重，其中二氧化碳的排放量對全球暖化有關鍵性的影響，所以當務之急是減少二氧化碳的排放量。但是，燃燒酒精依然會排放二氧化碳，而氫氣燃燒只會產生水不產生二氧化碳，因此引發我們進一步想了解為生物產生氫氣的機制及原理，並試圖利用建構機制已產生廉價的生質氫能。

目前，大部份 *Clostridium* 屬產氫菌，都是絕對厭氧，要使這株菌發揮產氫的能力前提勢必要提供絕對厭氧的環境，然而以傳統物理方法除去氧氣成本過高，需要投入大量能源且不合經濟價值。從中興大學生命科學系黃介辰教授實驗室所發表之文獻中了解並得知 *Bacillus thermoamylovorans*，*Clostridium butyricum* 本來就是存在啤酒廠廢酵母液中，*Bacillus thermoamylovorans* 扮演的角色是除去氧氣並且分解纖維素成還原醣，因此我們就思考如何將 *Bacillus thermoamylovorans*，*Clostridium butyricum* 在耗能最少的條件下以共培養的方式產氫。我們選用，*Bacillus thermoamylovorans*，*Clostridium butyricum*，不僅可以兼顧到產氫量，也可顧及分解能力；同時也避免繁複的實驗步驟，更不需利用到基因轉植的技術。

雖然 *Bacillus thermoamylovorans* 分解纖維素會消耗部分能量，但是只用 *Clostridium butyricum*，缺乏分解酵素，是完完全全不可能產氫，但是假設我們自行配置「複雜」的基質，不僅沒有意義，更會浪費資源，廢物利用就成了我們思考的問題。能源就是要便宜才有價值，生質能源要比石油便宜勢必要使用便宜的碳源，目前纖維素一直缺乏有效轉化成能源的利用，一株植物只用一小部份是很浪費的，因此我們選用廢紙漿來作為碳源，選用廢紙漿有許多好處：

- 1.由於目前紙漿在造紙的成本依然沒辦法比全新原木紙漿價格低很多，造成再生紙並不常在我們日常生活中使用，而且在經過多次造紙之後，纖維會逐縮短，造成紙張強度下降，因此以紙漿產氫也是一個方法來利用這些資源。
- 2.可接續於造漿場以降低營運成本，提高原木料利用效率。
- 3.廢紙漿之組成大部份是纖維素，而且紙漿成份穩定，不會如能源植物一般因採收的時間不同而產生不一致的可利用成份。
- 4.免除前處理之作業程序。

## 二、實驗目的：

將 *Bacillus thermoamylovorans* 及 *Clostridium butyricum* 之共培養系統的產氫效率提升到最佳條件。此外，深入了解影響產氫量的因素，以求最佳產氫條件。

## 三、菌株介紹：

### 1. *Bacillus thermoamylovorans*

此菌株是從廢酵母粉批次醱酵培養瓶取出菌液，經熱處理後塗布在PYG agar plate上，再經過一週以上的培養，然後從中挑取單一菌落進行純化培養所得到的菌株。此菌株的菌落較大，外觀呈透明黏稠狀，經16s rDNA核苷酸序列的定序分析之後，發現與 *Bacillus thermoamylovorans*有98%的相似性。枯草桿菌屬 (*Bacillus* spp.) 的細菌為好氧或兼性厭氧、能產生內孢子、革蘭氏陽性或不定 (variable) 桿菌。*Bacillus thermoamylovorans*是屬於chemoorganotrophs，大多為具有多種受質分解能力的腐生性 (saprophytes) 可行嚴格的呼吸代謝、發酵代謝或是可並行呼吸代謝及發酵代謝，以利用不同的受質，但大部分*Bacillus*屬菌種行呼吸代謝時，最終的電子接受者為氧分子，因此受培養基中氧氣量影響極大。此菌株可能是產氫系統中協助分解基質以及提供厭氧環境的貢獻者。

### 2. *Clostridium butyricum*

*Clostridium butyricum* 是典型的絕對厭氧菌。普遍存在於土壤、地下水道、廢棄物、人類和反芻動物的腸道中。其生長的溫度約為 25°C~65°C，而最適合溫度為 37°C。最適合生長的 pH 值為 6.5~7.0。若環境不適合生長時，*Clostridium butyricum* 會形成內孢子進入休眠狀態。此菌株 M1 是從以糖蜜廢水作為培養基質的連續式醱酵槽取出的菌液，不經熱處理即塗布在加有 0.25% 苯乙醇(phenylethyl alcohol)的 PYG 培養基中以幫助篩選屬於革蘭氏陽性菌的 *Clostridium* 屬的細菌，再經過一週以上的培養，然後從中挑取單一菌落進行純化培養所得到的一株菌。抽取此菌株的染色體 DNA 並用引子對 16sF/16sR 進行 PCR 和所得 DNA 片段的定序分析，確定最為相似的為 *C. butyricum*，以引子對 E1f/L1r 進行 PCR 偵測時，可夾出 714 bp 的產氫酶基因片段，進行核苷酸序列分析後發現竟同樣與 *C. thermocellum* hydrogenase-1 基因有 45% 的相似度。若將這段核苷酸序列和上述以引子對 E1f/E1r 從 Z2 菌株得到的核苷酸序列以電腦程式 DNAMAN Version 4.11 進行比對發現二者之間，除了相當於引子 E1r 結合的部位有 5 個鹼基不同之外，其餘序列完全一致。

#### 四、*Clostridium butyricum* 厭氧產氫代謝途徑：

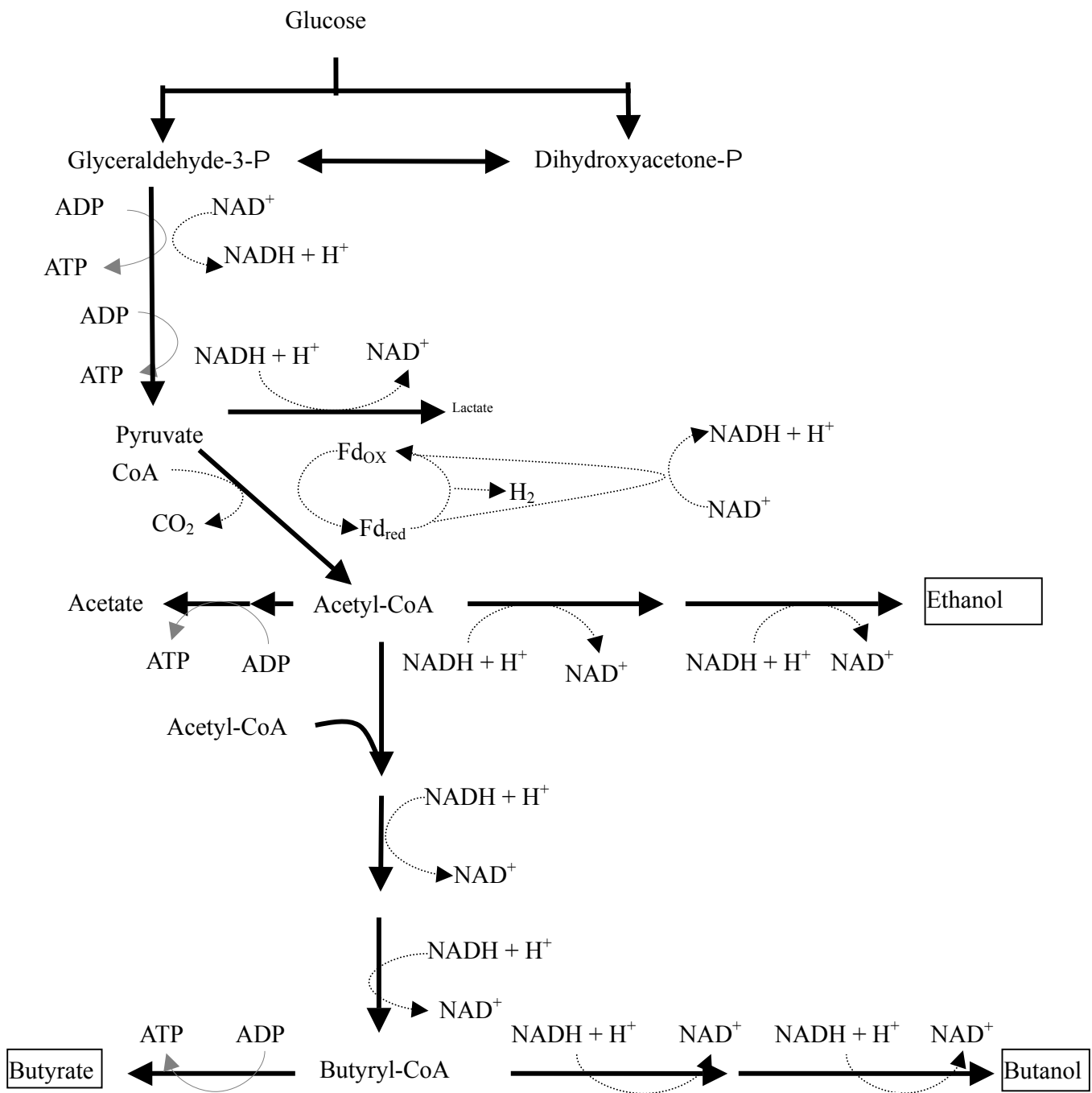
##### (一)醣類代謝途徑：

葡萄糖(glucose)首先經由 Glycolysis pathway 變成丙酮酸(pyruvate)，此過程中會生成 2 個 NADH，這 2 個 NADH 會在氫酶(hydrogenase)及鐵氧化還原蛋白(ferredoxin)的作用下轉回 NAD<sup>+</sup> 並釋放出氫氣，而丙酮酸則會繼續被催化生成 acetyl-CoA。若 acetyl-CoA 走向生成乙酸的途徑，就不會再消耗掉任何的 NADH，便可以繼續產生氫氣，所以產生乙酸是 *Clostridium* 屬細菌最佳的產氫途徑(圖一)。(Zhu and Yang, 2004)

##### (二)氫酶(Hydrogenase)：【Fe-Fe】hydrogenase

*Clostridium butyricum* 中大部分的氫酶為【Fe-Fe】hydrogenase。氫酶廣泛存在於原核微生物和一些簡單的真核生物中，它是催化分子氫的形成或氧化 ( $H_2 \rightleftharpoons 2H^+ + 2e^-$ ) 的酵素(Boichenko and Hoffmann, 1994)。許多微生物能夠利用 H<sub>2</sub> 作為能源，為細胞的代謝提供還原力，另一方面，當細胞代謝過程產生過剩的還原力時，常會通過形成分子氫釋放過剩的還原力以維持細胞代謝平衡。文獻中指出【Fe-Fe】hydrogenase 對氧氣非常敏感 (Chen and Mortenson, 1974)，並針對氧化態以及一氧化碳抑制態的活化區，利用紅外線光譜分析 (Infrared spectroscopy) 法，配合溫度的改變以及以光刺激打斷其中一氧化碳鍵結的方式來進行分子結構的解析，發現氫酶的活性會因活化區的水分子被一氧化碳置換而受到抑制，但在光照下又可恢復活性 (Chen *et al.*, 2002；Lemon and Peters, 1999)。





圖一

## 參、實驗器材與藥品

### 一、儀器與器材：

1. GC 氣相層析儀(Shimadzu GC-8A)
2. 無菌操作台
3. 離心機
4. 電子天平秤
5. 分光光度計
6. micropipette
7. pipetteaid
8. 密閉試管(PYG Tube)
9. 光學顯微鏡
10. 滅菌釜
11. 烘箱
12. 血清瓶

### 二、藥品：

1. Peptone
2. Tryptone
3. Yeast extract
4.  $K_2HPO_4$
5.  $MgSO_4 \cdot 7(H_2O)$
6.  $CaCl_2$
7.  $KH_2PO_4$
8.  $NaHCO_3$
9.  $NaCl$
10.  $FeSO_4 \cdot 7(H_2O)$
11. Cysteine - HCl
12. Glutathione

### 三、碳源：

1. 廢紙漿(永豐餘公司提供)
2. Glucose
3. 不可溶性纖維素 (Cellulose, microgranular)
4. 可溶性纖維素 (Carboxymethylcellulose sodium salt)

## 肆、研究過程與方法

### 一、基本 medium PYG 的配置：

#### (一) 每一公升所添加的基質：

Peptone	5	g
Tryptone	5	g
Yeast extract	10	g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2.04	g
MgSO <sub>4</sub> · 7 (H <sub>2</sub> O)	0.0192	g
CaCl <sub>2</sub>	0.008	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.04	g
NaHCO <sub>3</sub>	0.4	g
NaCl <sub>2</sub>	0.08	g
FeSO <sub>4</sub> · 7(H <sub>2</sub> O)	1.1	mg
Glucose	10	g
Cysteine - HCl	0.5	g
Glutathione ( 液體用 )	0.25	g

#### (二)濃縮液表(表一)：爲了方便實驗的進行，所以將常用的基質配成濃縮液。

	濃度(g/mL)	使用量 (mL /每升)	濃度(g/mL)	使用量 ( $\mu$ l/10 mL)	滅菌及厭氧處理方式
MgSO <sub>4</sub> store	1.92/100	1	0.0192/10	100	溼熱滅菌
CaCl <sub>2</sub> store	0.8/100	1	0.008/10	100	溼熱滅菌
NaCl store	8/100	1	0.08/10	100	溼熱滅菌
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 、 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 、 NaHCO <sub>3</sub> store	1/1000 、 1/1000 、 1/100	40	0.04/10 、 0.04/10 、 0.4/10	100	溼熱滅菌
FeSO <sub>4</sub> · 7(H <sub>2</sub> O) store	0.0022/10	5	0.0022/10	50	過濾滅菌後厭氧法
Glucose store	1/3	30	1/3	300	過濾滅菌後厭氧法
Cysteine- HCl store	0.5/10	10	0.5/10	100	過濾滅菌後厭氧法
Glutathione store	0.25/10	10	0.25/10	100	過濾滅菌後厭氧法

※備註：

- 1.若金屬離子和含有碳酸根或磷酸根的鹽類混合在一起時，濃縮液會造成沈澱。所以應分開滅菌處理；滅菌後，分別以針筒抽打氮氣，以除去針筒內之空氣，再以針筒取適量的濃縮液至滅菌後的 Broth 中。
2. Cysteine-HCl store 應於 36 小時內配置及使用，放置太久會產生沈澱。
- 3.葡萄糖溶液無法溼熱滅菌，因葡萄糖溶液在高溫之後會產生焦糖，會對某些細菌造成毒害。
- 4.過濾滅菌後厭氧法：
  - (1)先將厭氧試管充過 5 分鐘氮氣，接著旋緊蓋頭裝配好，溼熱滅菌 20 分鐘。
  - (2)在無菌操作台中以針筒接著過濾接頭來過濾溶液至厭氧試管中。
  - (3)以過濾接頭接著針頭接上氮氣管，插入滅菌處理過的溶液玻璃管作為入氣通道。
  - (4)再用一過濾接頭接著針頭，直接插入溶液玻璃管作為出氣孔，利用氮氣充氣 20 min，交換內部空氣出來使內部成無氧狀態。

(三)有氧 PY 配置過程：300mL

- 1.先將液態培養液血清瓶裝入少許的 DI water。
- 2.加入 Peptone 1.50g；Tryptone 1.50g；Yeast extract 3.00g。
- 3.加入濃縮液：
  - MgSO<sub>4</sub> store 300 μl
  - NaCl store 300 μl
  - CaCl<sub>2</sub> store 300 μl
  - K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、NaHCO<sub>3</sub> store 12mL
- 4.加入厭氧指示劑：300 μl(濃度：1mg/1 mL)
- 5.加 DI water 至 300 mL。
- 6.充分混合(用磁石攪拌)，分裝至 PYG Tube。
- 7.將廢紙漿加入 PYG Tube。
- 8.高壓滅菌。
- 9.每一 PYG Tube 植入 FeSO<sub>4</sub> · 7(H<sub>2</sub>O) store 50 μl(50 μl/10 mL)。(過濾滅菌)



圖二：有氧 PY



圖三：分裝後的有氧 PY。

(四)無氧 PY 的配置：300mL

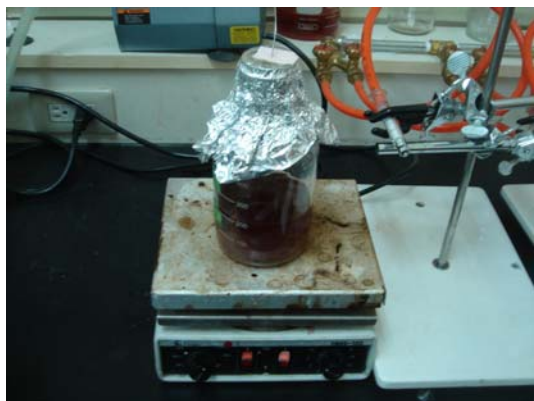
- 1.液態培養液血清瓶加入 Peptone 1.50g；Tryptone 1.50g；Yeast extract 3.00g
- 2.加入濃縮液：  
MgSO<sub>4</sub> store 300 μl  
NaCl store 300 μl  
CaCl<sub>2</sub> store 300 μl  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、NaHCO<sub>3</sub> store 12 mL
- 3.加入厭氧指示劑：300 μl(濃度：1mg/1 mL)
- 4.將 DI water 取 300 mL 放置於水壺中，加熱至沸騰，持續 10 分鐘。(因考慮水煮沸後會蒸散少許的水，所以應取稍稍大於 300mL 的 DI water)。
- 5.10 分鐘沸騰後，將沸水加入液態培養液血清瓶中，降溫至 60 ~ 70°C 並用磁石均勻攪拌。(圖四)
- 6.液態培養液血清瓶，用 parafilm(或用一般膠帶)黏上瓶口以充氣針插入，進行充氮氣 30 分鐘。(圖五、圖六)
- 7.將空的 PYG tube 加入碳源，並充氮氣 15 分鐘。(圖七)
- 8.使用安全吸球、福魯吸管，分裝液態培養液到已充氮空 tube 中，每支 9.5mL，並進行充氮 10 分鐘。(重覆步驟 6、7、8)。
- 9.多充一管空管，因植入 FeSO<sub>4</sub> · 7(H<sub>2</sub>O)時，需用過濾滅菌後厭氧法。
- 10.高壓滅菌。



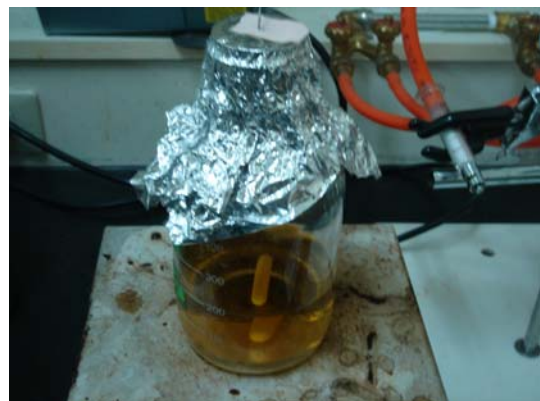
圖四：煮水。



圖五：將沸水加入血清瓶。



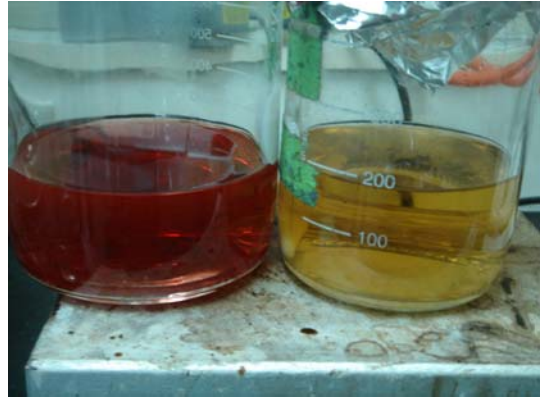
圖六：開始充氮氣。



圖七：充氮氣 30 分鐘後。



圖八：PYG tube 充氮氣 15 分鐘。



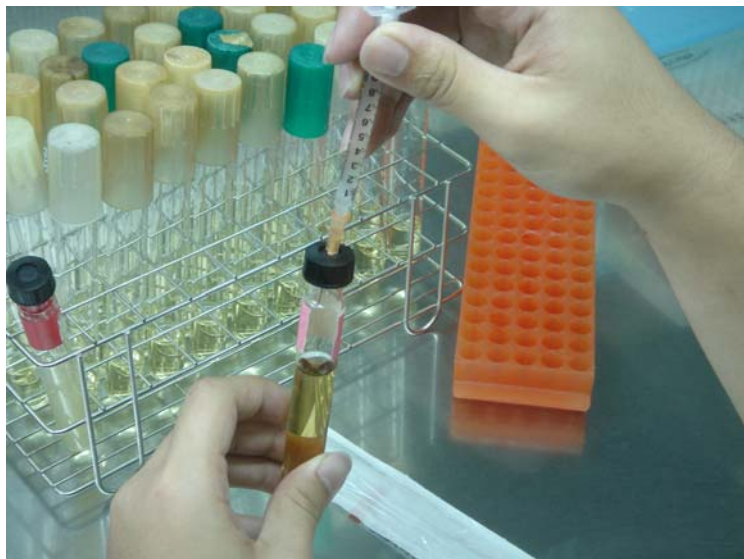
圖九：右圖---無氧 PY  
左圖---有氧 PY

## 二、基本生長

(一)目的：初步了解 *Bacillus thermoamylovorans* 與 *Clostridium butyricum* 共培養產氫的現象、所需花的時間和共培養情形。

(二)實驗過程：

1. 配置 3 支 PY，每支 PY 10.0mL；並加入廢紙漿 0.1g。
2. 高壓滅菌 20 分鐘。
3. 每管植入  $\text{FeSO}_4 \cdot 7(\text{H}_2\text{O})$   $50 \mu\text{l}$  ( $50 \mu\text{l}/10 \text{ mL}$ )。(過濾滅菌)
4. 置於室溫下冷卻後植入 *Bacillus thermoamylovorans*  $200 \mu\text{l}$ 。
5. 靜置培養 4 天。
6. 觀察 PY 顏色、混濁度和紙漿變化情形。
7. 植入 *Clostridium butyricum*  $200 \mu\text{l}$ 。
8. 靜置兩天。
9. 觀察 PY 顏色、混濁度和紙漿變化情形。
10. 測產氫濃度。



圖十：植菌過程



### 三、紙漿量對產氫量的影響

(一)目的：探討不同重量的紙漿對 *Bacillus thermoamylovorans* 與 *Clostridium butyricum* 共培養系統的產氫量差異，並探討其產率的差別。

(二)實驗步驟：

- 1.配置有氧 PY 5mL 12 管，兩管為一組，每一組分別加入不同重量紙漿(如下表)。
- 2.高溫滅菌。
- 3.每管植入  $\text{FeSO}_4 \cdot 7(\text{H}_2\text{O})$  25  $\mu\text{l}$ 。(過濾滅菌)
- 4.植入 *Bacillus thermoamylovorans* 200  $\mu\text{l}$ 。
- 5.靜置 2 天。
- 6.植入 *Clostridium butyricum* 200  $\mu\text{l}$ 。
- 7.靜置 2 天。
- 8.測產氫量。

(三)實驗組：

紙漿 編號	0.05g	0.10g	0.25g	0.50g	0.75g	1.00g
	①②	③④	⑤⑥	⑦⑧	⑨⑩	⑪⑫

#### 四、各種碳源的比較

(一)目的：分析那一種碳源最有利於產氫，並與紙漿的產氫量比較。

(二)碳源：紙漿、不可溶性纖維素( Cellulose, microgranular )、可溶性纖維素( Carboxymethylcellulose sodium salt )、葡萄糖 ( Glucose )

(三)實驗步驟：

- 1.配置有氧 PY 5mL 8 管，分別加入不同碳源皆為(0.1g)，每種兩管。
- 2.高溫滅菌。
- 3.每管植入  $\text{FeSO}_4 \cdot 7(\text{H}_2\text{O})$  25  $\mu\text{l}$ 。(過濾滅菌)
- 4.植入 *Bacillus thermoamylovorans* 200  $\mu\text{l}$ 。
- 5.靜置 2 天。
- 6.植入 *Clostridium butyricum* 200  $\mu\text{l}$ 。
- 7.靜置 2 天。
- 8.測產氫量。

(四)實驗組：

編 號 \ 碳 源	紙漿 0.1g	纖維素 0.1g	不可溶纖維素 0.1g	葡萄糖 0.1g
	①②	③④	⑤⑥	⑦⑧

## 五、植菌量對產氫量的影響

(一)目的：探討植入 *Bacillus thermoamylovorans* 與 *Clostridium butyricum* 的量對產氫量是否有差異。

(二)假設：理論上細菌不論植菌量的多寡，最後菌生長完全後菌量應相差不大，對產氫量應沒有直接的影響。

(三)實驗步驟：

- 1.配置 PY 5mL，10 管。
- 2.每管分別加入 0.1g 廢紙漿。
- 3.高壓滅菌。
- 4.每管植入  $\text{FeSO}_4 \cdot 7(\text{H}_2\text{O})$  25  $\mu\text{l}$ 。(過濾滅菌)
- 5.植入 *Bacillus thermoamylovorans* (各管植菌量如下表)。
- 6.靜置 2 天。
- 7.植入 *Clostridium butyricum*。
- 8.靜置 2 天。
- 9.測產氫量。

(四)實驗組：

植菌量 編號	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	<i>Clostridium butyricum</i>
①	200 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$
②	200 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$
③	200 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$
④	200 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
⑤	200 $\mu\text{l}$	400 $\mu\text{l}$
⑥	20 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
⑦	50 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
⑧	100 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
⑨	200 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$
⑩	400 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l}$

## 六、氧氣量對 *Bacillus thermoamylovorans* 與 *Clostridium butyricum* 共培養產氫之影響

(一)目的：*Bacillus thermoamylovorans* 為好氧菌，氧氣對它生長有決定性的影響，因此藉由提昇此系統之氧氣量，期望可獲得更高的產氫量。

(二)實驗步驟：

- 1.配置 PY 5 mL，9 管。
- 2.每管分別加入廢紙漿 0.1g。
- 3.高壓滅菌。
- 4.每管植入  $\text{FeSO}_4 \cdot 7(\text{H}_2\text{O})$  25  $\mu\text{l}$ 。(過濾滅菌)
- 5.植入 *Bacillus thermoamylovorans* 200  $\mu\text{l}$ 。
- 6.分別不同時間打開 PY tube 10 分鐘 (如下表)。
- 7.開管完後，靜置 2 天，直到 PY 由桃紅變淡黃色。
- 8.植入 *Clostridium butyricum* 200  $\mu\text{l}$ 。
- 9.靜置 2 天。
- 10.測產氫量。

※註：1.開管使厭氧指示劑由淡黃色轉變成桃紅色。(由無氧轉為含氧)

2.鋁箔：完成步驟 2 後，用鋁箔代替蓋子，使 *Bacillus thermoamylovorans* 生長於氧氣流通的環境下一天。隔天，蓋上蓋子再培養 *Bacillus thermoamylovorans* 一天，使系統成無氧環境。待厭氧指示劑轉成淡黃色後植入 *Clostridium butyricum*。

(三)實驗組：室溫培養

	開管一次	開管二次	鋁箔
50 $\mu\text{l}$	①②③	④⑤⑥	⑦⑧⑨

## 七、*Bacillus thermoamylovorans* 生長曲線

(一)目的：透過 *Bacillus thermoamylovorans* 生長曲線及厭氧指示劑變色時間，了解 *Bacillus thermoamylovorans* 的消長和達絕對厭氧所需時間。

(二)實驗方法：測 OD 值。

(三)實驗步驟：

- 1.配置有氧 PY 5mL。
- 2.加入 0.25g 廢紙漿。
- 3.高壓滅菌。
- 4.每管植入 *Bacillus thermoamylovorans* 200  $\mu$ l。
- 5.依下表時間點分別取液面上、中間菌液、底層菌液和混合菌液 400  $\mu$ l。(無菌操作台中進行，盡量不要搖晃試管)
- 6.低速離心 250 rpm，2 分鐘(去除雜質)。
- 7.以 1000  $\mu$ l DDH<sub>2</sub>O 作為標準值(0.000)。
- 8.100  $\mu$ l 菌液與 900  $\mu$ l DDH<sub>2</sub>O，充份混合。
- 9.測 OD<sub>600</sub> 值。(OD<sub>600</sub> 值誤差較大，需測數次後取平均值)

(四)實驗組：

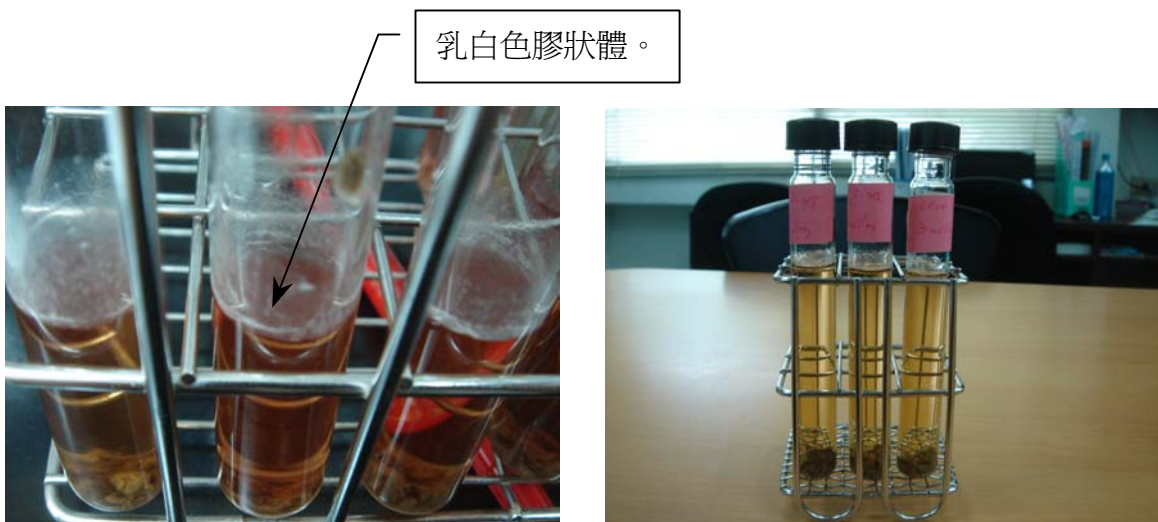
時間 \ 菌源	液面上(編號)	中間菌液(編號)	底層菌液(編號)	混合菌液(編號)
0 小時	①②③	①②③	①②③	①②③
4 小時	④⑤⑥	④⑤⑥	④⑤⑥	④⑤⑥
8 小時	⑦⑧⑨	⑦⑧⑨	⑦⑧⑨	⑦⑧⑨
12 小時	⑩⑪⑫	⑩⑪⑫	⑩⑪⑫	⑩⑪⑫
16 小時	⑬⑭⑮	⑬⑭⑮	⑬⑭⑮	⑬⑭⑮
20 小時	⑯⑰⑱	⑯⑰⑱	⑯⑰⑱	⑯⑰⑱
24 小時	⑲⑳㉑	⑲⑳㉑	⑲⑳㉑	⑲⑳㉑
28 小時	㉒㉓㉔	㉒㉓㉔	㉒㉓㉔	㉒㉓㉔

## 伍、研究結果與討論

### 一、基本生長

培養 *Bacillus thermoamylovorans* 四天後，PY 呈淡黃色(厭氧狀態)並發現 PY 上漂浮少許乳白色膠狀物，推測 *Bacillus thermoamylovorans* 在氧氣減少的不利環境之下聚集而形成。植入 *Clostridium butyricum* 2 天後，溶液混濁，而在未植入 *Clostridium butyricum* 之前除液面上浮著一層乳白色膠狀物外，下層沒有混濁的情形，但植入 *Clostridium butyricum* 之後，白色膠狀體逐漸減少，最後完全消失。

實驗證實廢紙漿確實可以被 *Bacillus thermoamylovorans* 分解成還原糖並為 *Clostridium butyricum* 利用產生氫氣。植入 *Bacillus thermoamylovorans* 之後應不需等到4天，因為參考文獻 (Y. Combet-Blanc, 1995, *Bacillus thermoamylovorans* sp. nov., a Moderately Thermophilic and Amylolytic Bacterium) 指出 *Bacillus thermoamylovorans* 生長完全只需一天，經過24小時顏色由桃紅色轉為淡黃色且溶液澄清(實驗七、*Bacillus thermoamylovorans* 生長曲線可以證實是正確的)。PY 的量太多，導致試管內含氧量不足，較不利於 *Bacillus* 的生長，所以將 PY 調整為 5mL。



圖十一、圖十二：植入 *Bacillus thermoamylovorans* 之後，菌液由桃紅變成淡黃，且有乳白色生物膜浮在液面上。



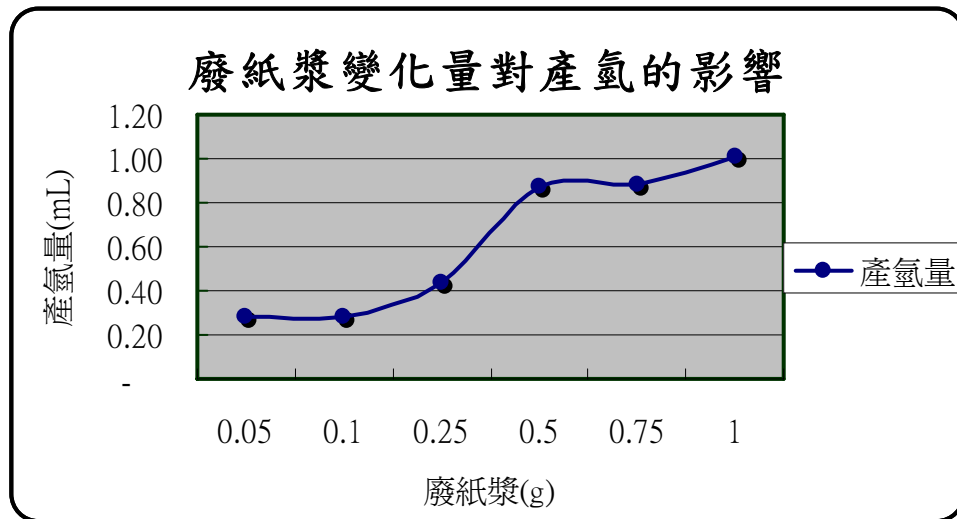
## 二、紙漿量對產氫量之影響

### (一)實驗結果：

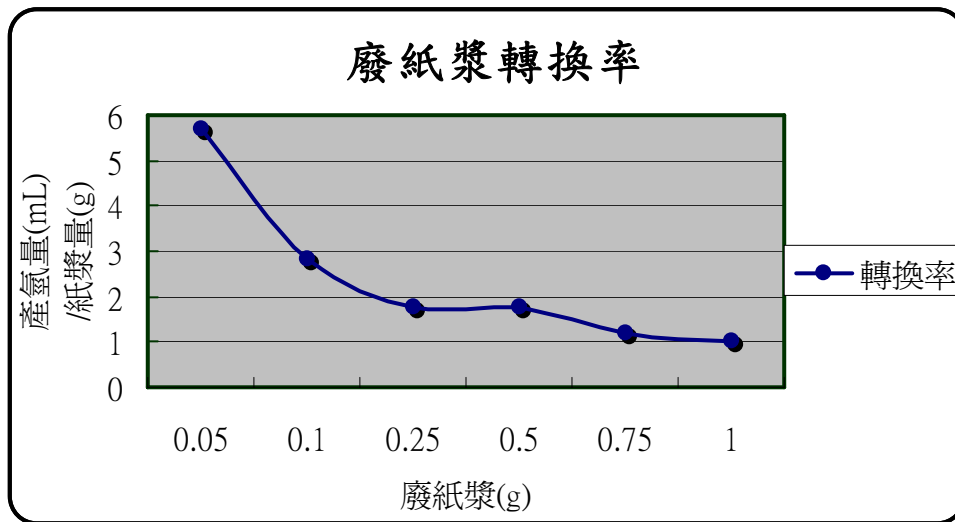
隨著廢紙漿量的增加，最終的產氫量也升高。廢紙漿量增加到 0.5 克以上時，由於只加入 5 mL 的 PY，所以並不能充分、均勻的被 *Bacillus thermoamylovorans* 所分解，導致產氫量沒有明顯的增加。由下圖，5 mL PY 中，廢紙漿量以 0.5 克的經濟價值最高。

### (二)實驗數據：

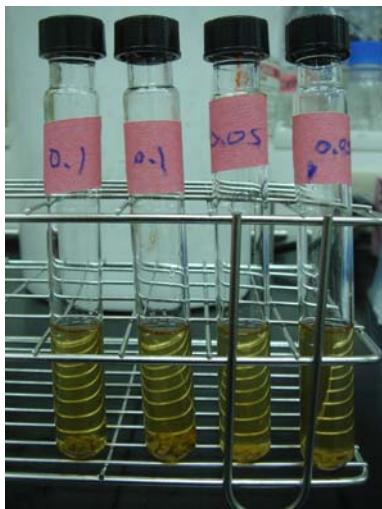
紙 漿	產 氫	產氫濃度(%)	總氣體量(mL)	產氫量(mL)	平均產氫量(mL)
0.05g		2.5%	11mL	0.27	0.29
		2.7%	11mL	0.30	
0.10g		3.0%	11mL	0.33	0.28
		2.2%	11mL	0.24	
0.25g		4.0%	11mL	0.44	0.43
		數據不正常	數據不正常	數據不正常	
0.50g		7.2%	11mL	0.80	0.87
		8.7%	11mL	0.90	
0.75g		8.1%	11mL	0.89	0.88
		8.0%	11mL	0.88	
1.00g		8.3%	11mL	0.93	1.02
		10.1%	11mL	1.11	



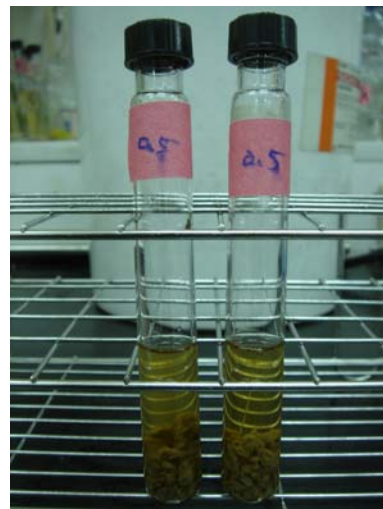
圖十三：廢紙漿變化量的影響。



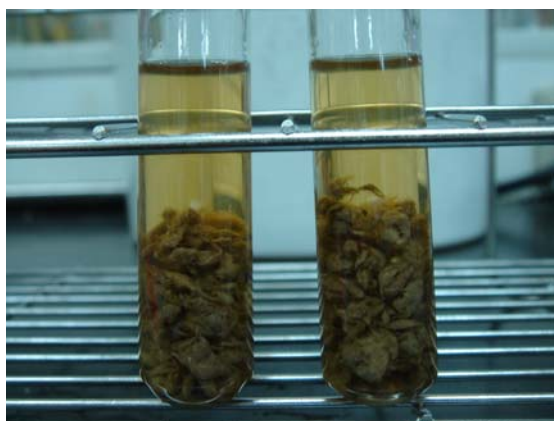
圖十四：廢紙漿轉換率。



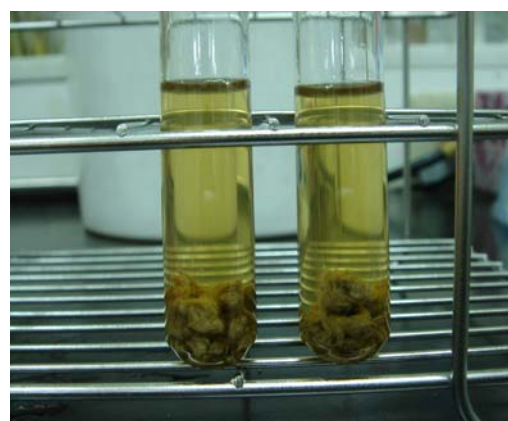
圖十五：PY 加入 0.05、0.1g 廢紙漿。



圖十六：PY 加入 0.5g 紙漿。



圖十七：PY 加入 0.75g 紙漿。



圖十八：PY 加入 0.25g 紙漿。

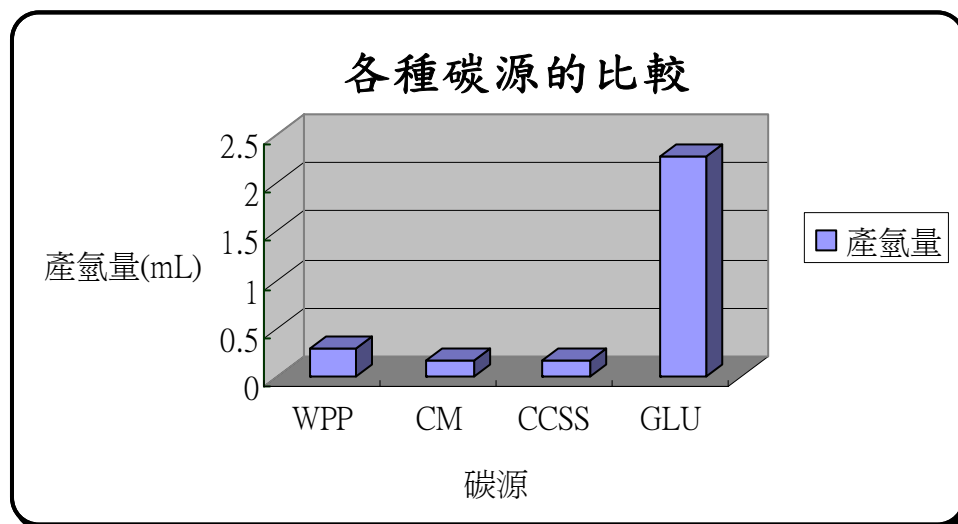
### 三、各種碳源的比較

#### (一)實驗結果

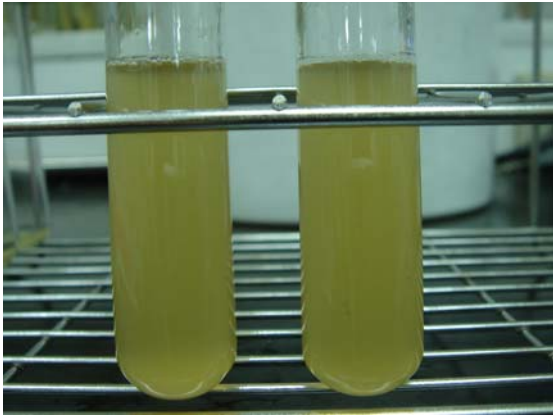
以葡萄糖為碳源，所產生的氫氣量最多，廢紙漿次之，纖維素和不可溶纖維素最少。由此可知，基質越單純（如：纖維素），共培養的效率會因兩株菌產生競爭而下降；相對的，複雜的基質(如：廢紙漿)，在共培養時可利用的碳源較多元，較不會因兩株菌的碳源相同而產生競爭，導致產氫量減少。

#### (二)實驗數據：(表八)

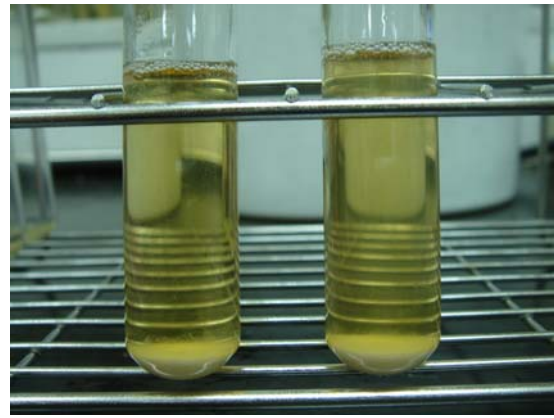
碳源 產氫	編號	產氫濃度(%)	產氫量(mL)	平均產氫量 (mL)	產氫(mL)/碳 源(g)
紙漿(WPP) 0.1g	1	3.0%	0.27	0.29	2.85
	2	2.2%	0.30		
纖維素(CM) 0.1g	3	1.2%	0.13	0.17	1.65
	4	1.8%	0.20		
不可溶纖維 素(CCSS) 0.1g	5	1.3%	0.14	0.18	1.77
	6	1.9%	0.21		
葡萄糖(GLU) 0.1g	7	20.9%	2.31	2.29	45.85
	8	20.7%	2.28		



圖十九：各種碳源的比較。



圖二十：葡萄糖為碳源



圖二一：不可溶纖維為碳源

#### 四、植菌量對產氫量的影響

##### (一)實驗結果：

*Bacillus thermoamylovorans* 量的多寡並不影響最終產氫量，而影響產氫量的最大因素為 *Clostridium butyricum*，並隨著菌量增加而上升。

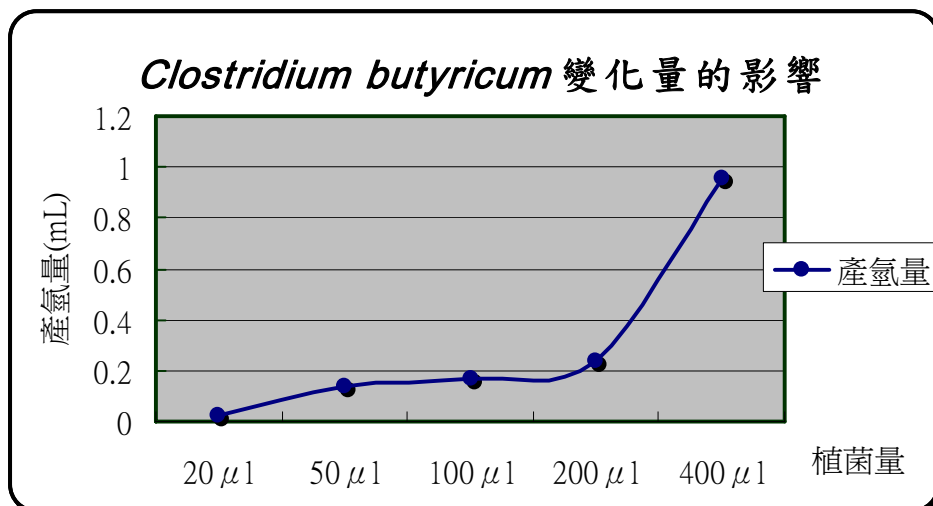
理論上，定量的 *Bacillus thermoamylovorans* 所能分解纖維素並轉換為還原糖的量為定量，而植入越多的 *Clostridium butyricum* 其產氫量也越多，由此可知厭氧後 PY 中的還原糖為過量。根據實驗二(紙漿量對產氫量之影響)，不同紙漿量會造不同的產氫量，推論廢紙漿中含有其他重要的生長因子影響最後的產氫量。

*Clostridium butyricum* 量的改變會影響最後產氫量與最初的假設不合，推論 *Clostridium butyricum* 產氫應在生長期，過了生長期產氫就會停止。

##### (二)實驗數據與圖表：

1 *Bacillus thermoamylovorans* 200  $\mu$ l

Clostridium	20 $\mu$ l	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l	200 $\mu$ l	400 $\mu$ l
產氫					
產氫濃度%	0.2%	1.3%	1.5%	2.2%	5.4%
產氫量 mL	0.02	0.14	0.17	0.24	0.96

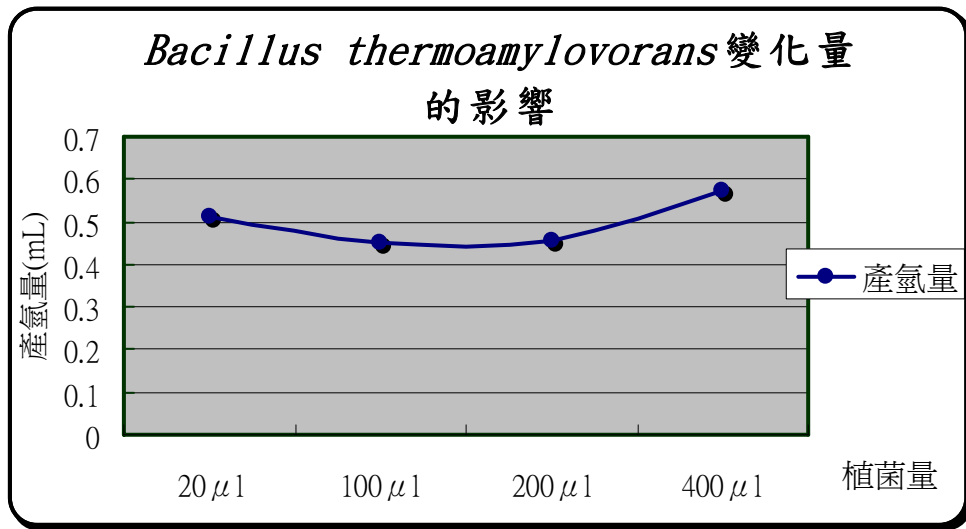


圖二十二： *Clostridium butyricum* 變化量的影響。

2 *Clostridium butyricum* 200  $\mu$ l

Bacillus	20 $\mu$ l	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l	200 $\mu$ l	400 $\mu$ l
產氫					
產氫濃度(%)	4.7%	0.2%	4.1%	4.1%	5.2%
產氫量(mL)	0.5	0.0	0.5	0.5	0.6

註：50 $\mu$ l 實驗誤差，忽略不計。



圖二十三：*Clostridium butyricum* 變化量的影響。

## 五、氧氣量對 *Bacillus thermoamylovorans* 與 *Clostridium butyricum* 共培養產氫的影響

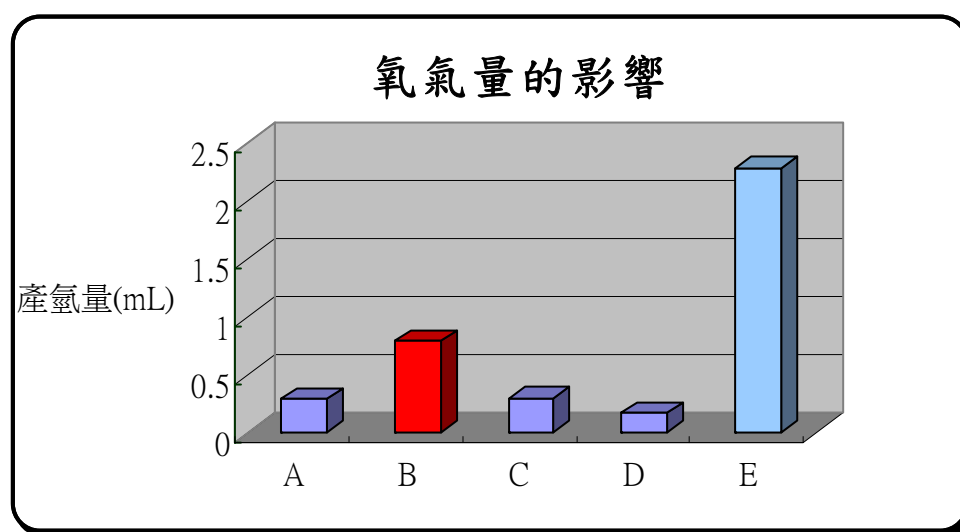
### (一)實驗結果：

提供適量的氧氣有利於 *Bacillus thermoamylovorans* 的生長，可以轉換更多的纖維素成 *Clostridium butyricum* 可利用的還原醣，而最終的氫氣產量大約是原來的 2.7 倍。根據 C、D，提供過量的氧氣會導致 *Bacillus thermoamylovorans* 生長太過旺盛，反而消耗本身所分解的還原醣，與 *Clostridium butyricum* 產生競爭，使最終的產氫量下降。所以，*Bacillus thermoamylovorans* 的生長必須取的一個平衡點，使其分解出的最大量的還原醣且消耗最少的還原醣。

未來進行大量連續產氫氣時，氧氣量是控制 *Bacillus thermoamylovorans* 生長情形的重要因素；也就是決定何時產氫、產氫量的多寡。

### (二)實驗數據與圖表：

	對照組 (不開管)	開管一次	開管二次	鋁箔	對照組(葡萄糖，不開管)
氫氣量 (mL)	0.3	0.7	0.3	0.17	2.29



圖二十四：不同氧氣量對產氫量的影響。

註： A---對照組。5 mL PY，加入 0.1 克廢紙漿。不開管蓋。

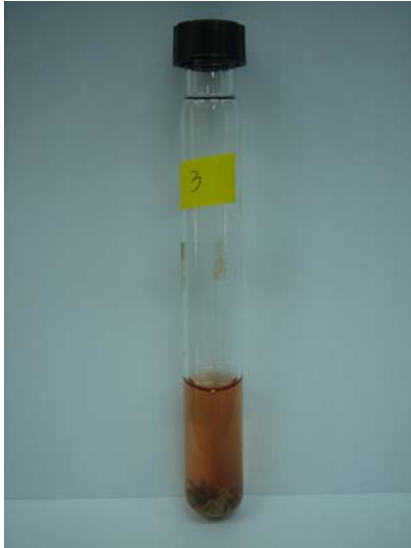
B---5 mL PY，加入 0.1 克廢紙漿。植入 *Bacillus thermoamylovorans* 後 24 小時開管一次。

C---5 mL PY，加入 0.1 克廢紙漿。植入 *Bacillus thermoamylovorans* 後 24 小時開管一次，再隔 24 小時後再開管一次。共開蓋兩次。

D---5 mL PY，加入 0.1 克廢紙漿。用鋁箔紙蓋住蓋口，使空氣流通，培養 *Bacillus thermoamylovorans* 24 小時後，再蓋上蓋子培養一天使其成無氧環境。

E---5 mL PY，加入 0.1 克葡萄糖。不開蓋。





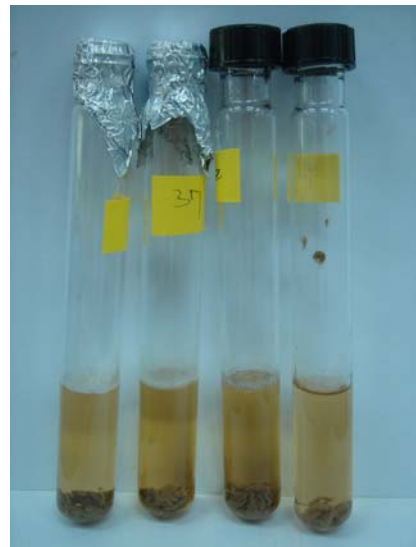
圖二五：開管後的培養基。



圖二六：以鋁箔封口的培養基。



圖二七：無氧狀態的培養基。



圖二八：培養過後表面生成薄膜。



圖二九：薄膜細部特寫。

左：以鋁箔封口。

右：開管一次。

## 六、*Bacillus thermoamylovorans* 生長曲線

### (一)實驗結果：

植入 *Bacillus thermoamylovorans* 前 8 小時，總菌量並無太大的變化。8 到 12 小時其總菌量明顯下降，應是 PY 中的廢紙漿無法及時分解導致無法提供 *Bacillus thermoamylovorans* 適當的碳源。植入後 12~16 小時紙漿被充足分解，導致 *Bacillus thermoamylovorans* 快速生長，而快速生長的同時氧氣也快速消耗而形成無氧的環境。也抑制了 *Bacillus thermoamylovorans* 的生長，使其菌量快速下降。隨著氧氣量的減少，最後形成無氧環境，但 *Bacillus thermoamylovorans* 為好氧菌，不利於生長在厭氧的環境中，導致 *Bacillus thermoamylovorans* 菌量下降並在液面形成乳白色的生物膜靠近空氣以克服不利的環境。

### (二)實驗數據：

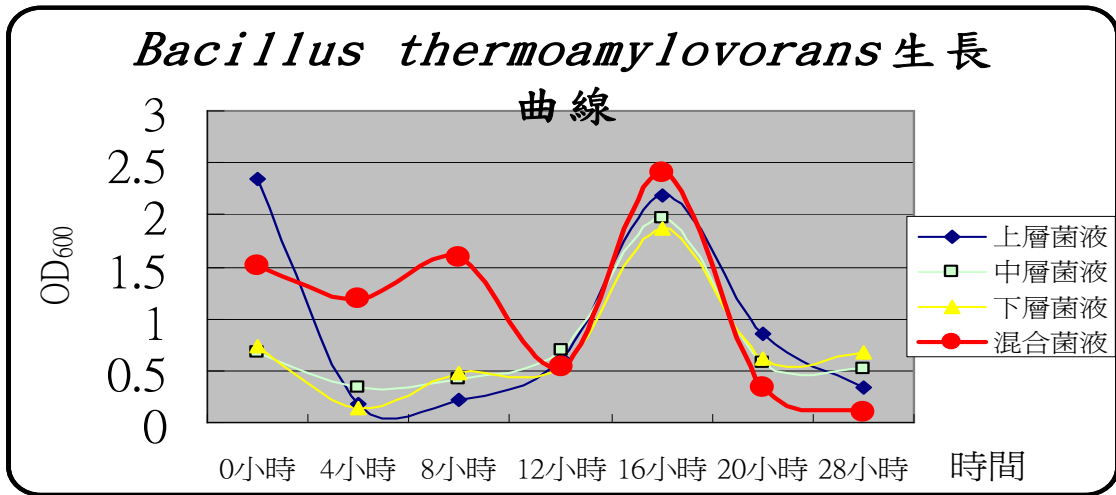
中層菌液	sample 1	sample 2	sample 3	平均
0 小時	0.78	0.56	0.68	0.7
4 小時	0.32	0.24	0.44	0.3
8 小時	0.4	0.48	0.4	0.4
12 小時	0.49	1.48	0.14	0.7
16 小時	1.94	1.94	2.02	2.0
20 小時	0.74	0.38	0.62	0.6
28 小時	1.0	0.5	0.04	0.5

上層菌液	sample 1	sample 2	sample 3	平均
0 小時	0.24	0.2	6.6	2.3
4 小時	0.3	0.08	0.14	0.2
8 小時	0.04	0.3	0.3	0.2
12 小時	0.9	0.74	0.18	0.6
16 小時	2.02	2.4	2.16	2.2
20 小時	1.18	0.52	0.84	0.8
28 小時	0.08	0.84	0.12	0.3

底層菌液	sample 1	sample 2	sample 3	平均
0 小時	1.34		0.84	1.0
4 小時	0	0.12	0.32	0.1
8 小時	0.58	0.36	0.48	0.5
12 小時	1.24	0.08	0.3	0.5
16 小時	2.04	1.84	1.72	1.9
20 小時	1.2	0.26	0.4	0.6
28 小時	1.00	1.04		1.0

混合菌液	sample 1	sample 2	sample 3	平均
0 小時	3.18	0.68	0.66	1.5
4 小時	0.99	1.25	1.36	1.2
8 小時	1.74	1.58	1.44	1.6
12 小時	0.9	0.04	0.66	0.5
16 小時	2.78	2.53	1.92	2.4
20 小時	0.06	0.38	0.38	0.3
28 小時	0.32			0.3

註：以上數據為 OD<sub>600</sub> 值



圖三十：*Bacillus thermoamylovorans* 生長曲線。



圖三一：0 小時。



圖三十二：12 小時。



圖三三：20 小時。

## 陸、結論與應用

*Bacillus thermoamylovorans* 與 *Clostridium butyricum* 共培養產氫系統可以有效率的分解廢紙漿並轉換成氫氣。*Bacillus thermoamylovorans* 主要扮演的角色是分解廢紙漿中的纖維素並轉化成還原醣，且耗掉氧氣形成無氧的系統；*Clostridium butyricum* 則利用 *Bacillus thermoamylovorans* 所分解的還原醣當作碳源，產生氫氣。

兩株菌以互利共生的方式共存，缺一不可。

以下是上述實驗所得到的結論，以利於運用在未來大規模產氫：

- (1)加入的廢紙漿愈多，產氫量也越多，但單位質量廢紙漿的產氫率明顯降低。
- (2)主要影響產氫的是 *Clostridium butyricum*，植菌量越多產氫量越多；而 *Bacillus thermoamylovorans* 扮演的是分解廢紙漿的角色，且隨著厭氧程度的提高，生菌量明顯下降。
- (3)若以 glucose 為碳源，於相同條件下產氫量大約是廢紙漿的 10 倍，但提高 *Bacillus thermoamylovorans* 生長所需的氧氣量(紙漿量不變)其總產氫量明顯提高大約 2.7 倍。藉由氧氣量的增加，可以大幅增加紙漿之利用率。
- (4)整套系統關鍵點就是氧氣量的控制。藉由控制氧氣量，也就是控制廢紙漿的糖化程度，對最終的產氫量有決定性的影響。

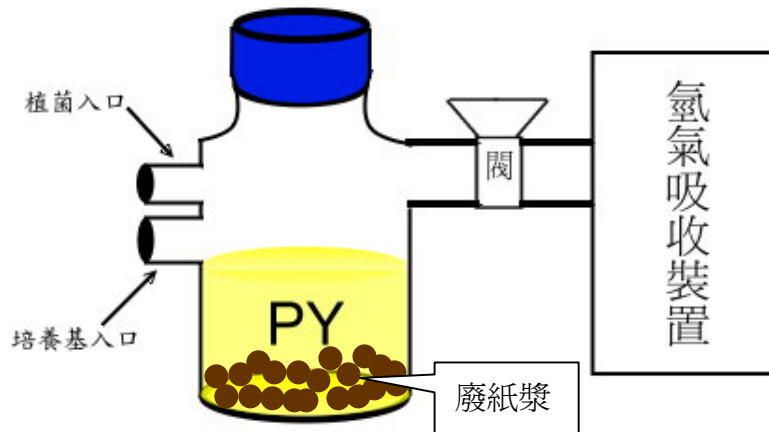
雖然說 *Bacillus thermoamylovorans* 的功用是分解廢紙漿中的纖維素並轉化成還原醣，但若 *Bacillus thermoamylovorans* 生長地太旺盛，會消耗本身所分解多餘的還原醣，和 *Clostridium butyricum* 產生競爭。所以，提供適量的氧氣量可以促進 *Bacillus thermoamylovorans* 分解廢紙漿，但若提供過量的氧氣或使其生長時間過長，對最後的產氫量有負面的影響。*Bacillus thermoamylovorans* 的生長必須取得一個平衡點，使其充分分解廢紙漿和消耗氧氣，且消耗最少的還原醣。

*Bacillus thermoamylovorans* 與 *Clostridium butyricum* 共培養產氫系統最終的目的是應用於商業生產。商業生產需要大量且連續的產氫，而本研究著重的是單批次的定性分析，比較不同條件對產氫的影響。若要大規模續性產氫，勢必會面臨一些技術上的問題(見 柒、未來展望與研究)，而且面對不同的需求，產氫模式也不盡相同，這是我們必須更深入思考的。

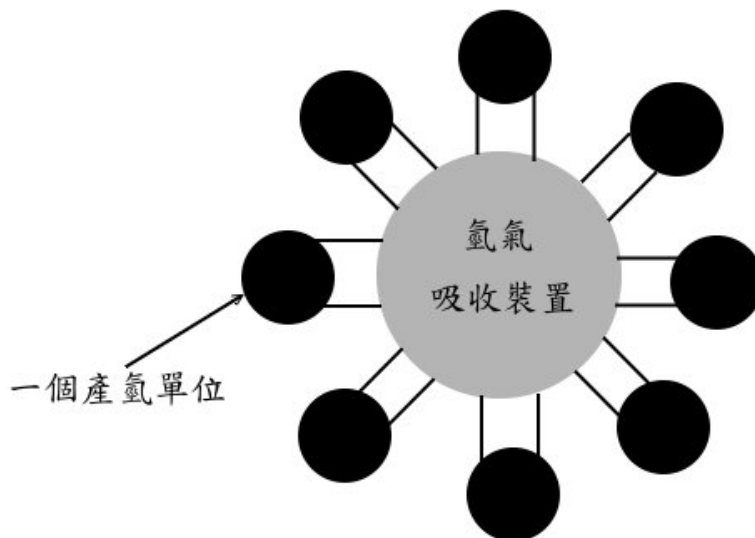
## 柒、未來展望與研究

### 一、大規模連續產氫系統之設計：

- 1.雖然可以簡單的用一個大發酵槽大量產氫，但如果需要連續產氫就有技術上的問題需要克服。所以我們想出的一套系統：將多個小發酵槽並聯成一個系統，控制氧氣量與植菌時間，利用個別的時間差不同來產生氫氣。



圖三三：單位發酵產氫槽。



圖二四：並聯發酵產氫系統(俯視圖)。

### 2.流程：

- (1)從培養基入口加入 PY 及廢紙漿。
- (2)從植菌入口植入 *Bacillus thermoamylovorans*，並轉鬆瓶蓋使空氣流通(增加氧氣量)。培養 1 至 2 天。
- (3)轉緊瓶蓋，使 *Bacillus thermoamylovorans* 消耗氧氣，提供無氧環境。
- (4)植入 *Clostridium butyricum*，培養 1 至 2 天。
- (5)打開閥門使產生的氣體流至氫氣吸收裝置。

### 3.需克服的問題：

- (1)實驗中所使用的廢紙漿、菌量、培養基量都是小量的。若等比例放大，是否會得到等比例放大的產氫量？

- (2)若靜置培養，廢紙漿是否能充分利用？或者須適當的攪拌或轉動？
- (3)氧氣量如何定量控制？
- (4)產生的氫氣混合於空氣中，氫氣如何純化？
- (5)整個系統是否需要滅菌？如何滅菌？

二、

*Bacillus thermoamylovorans* 與 *Clostridium butyricum* 共培養產氫系統分解的是廢紙漿中的纖維素，未來希望能運用在其他以纖維素為主成分的廢棄物中。例如：產酒精剩下的玉米渣、玉米桿、枯枝落葉、牧草……。

三、

若用其他有相同特性的 *Bacillus* 屬、*Clostridium* 屬，是否有更好的效果，期待未來進一步探討。

四、

本研究著重於產氫現象，及兩隻菌的巨觀交互作用。期望未來可以朝向更微觀的現象去研究，徹底了解 *Bacillus thermoamylovorans* 與 *Clostridium butyricum* 共培養產氫系統。



## 捌、參考文獻

1. Y. Combet-Blanc, 1995, *Bacillus thermoamylovorans* sp. nov., a Moderately Thermophilic and Amyolytic Bacterium
2. Y. Combet-Blanc, 1999, Effect of Organic Complex Compounds on *Bacillus thermoamylovorans* Growth and Glucose Fermentation
3. Y. Combet-Blanc, 1995, Effect of pH on *Bacillus thermoamylovorans* Growth and Glucose Fermentation
4. 許淳鈞，2001，利用混合特定菌種生產氫氣之研究。
5. 徐志華，2005，以螢光原位雜交技術偵測厭氧醱酵系統中產氫微生物產氫活性。

## 評語

研究內容有應用性，研究過程也很有系統，且有初步結果。可惜研究結果仍尚屬初期，宜再加深探討內容。