



木質纖維水解副產物對 ABE 發酵的影響

曾彥儒¹ 郭政昌¹ 陳文興^{2*}

1. 國立宜蘭大學環境工程學系（所）研究生
2. 國立宜蘭大學環境工程學系（所）副教授

摘要

木質纖維生物質需經水解轉變成單糖小分子後可作為丁醇發酵基質，但其水解過程釋出的副產物，有可能會影響後端的發酵反應。本研究探討木質纖維生物水解副產物 Furfural 與 Hydroxymethyl Furfural (HMF) 對 Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) 發酵的影響。本研究實驗條件為不加副產物、Furfural 與 HMF 的配對濃度為 0.1 與 0.3 g/L 以及 0.3 與 0.3 g/L。研究結果發現，0.1 與 0.3 g/L 配對濃度較空白之丁醇濃度提升 116%。另外，0.3 與 0.3 g/L 配對濃度則較空白之丁醇濃度增加 111%。同時，丁醇的生產速率，在 0.1 與 0.3 g/L 以及 0.3 與 0.3 g/L 配對濃度較空白分別提升 133% 與 301%。結果顯示在不同副產物濃度，都有助於丁醇的生成。就葡萄糖的利用而言，不加副產物、0.1 與 0.3 g/L 以及 0.3 與 0.3 g/L 配對濃度下的葡萄糖消耗率分別為 73%、81% 以及 85%。顯示在愈高濃度副產物反而有助於促進微生物對葡萄糖的利用。綜合而言，Furfural 與 HMF 的存在能促進 ABE 發酵。

關鍵詞： 丁醇、Furfural、HMF、木質纖維生物質、發酵

*通訊作者 E-mail : albert@niu.edu.tw



The Influence of the Byproducts in Lignocellulosic Biomass Hydrolysate on ABE Fermentation

Yan-Ru Zeng¹, Zheng-Chang Guo¹, Wen-Hsing Chen^{2*}

1. Graduate student, Department of Environmental Engineering, National Ilan University
2. Associate Professor, Department of Environmental Engineering, National Ilan University

Abstract

Monosaccharides hydrolyzed from lignocellulosic biomass are the substrates for butanol fermentation by solvent-producing clostridia. However, the release of the fermentable sugars during acid or base hydrolysis accompanies with the production of byproducts. These byproducts may affect the subsequent fermentation reaction. This study evaluated the influence of furfural and hydroxymethyl furfural (HMF), the byproducts of chemical hydrolysis, on acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation. A series of batch experiments were performed with different paired concentrations of furfural and HMF. Results indicate that butanol production for 0.1 g/L furfural and 0.3 g/L HMF increased 116% of that for 0 g/L furfural and 0 g/L HMF while the butanol production escalated 111% for 0.3 g/L furfural and 0.3 g/L HMF. Meanwhile, the butanol production rates for the paired concentrations of 0.1 g/L furfural and 0.3 g/L HMF, and 0.3 g/L furfural and 0.3 g/L HMF increased 133 and 301%, respectively. Furfural and HMF also accelerated the consumption of sugar during ABE fermentation. It was observed that the glucose consumptions for 0 g/L furfural and 0 g/L HMF, 0.1 g/L furfural and 0.3 g/L HMF, and 0.3 g/L furfural and 0.3 g/L HMF were 73, 81, and 85%, respectively. The existence of furfural and HMF in lignocellulosic biomass hydrolysate exhibited a synergistic effect on ABE fermentation.

Keywords: Butanol, Furfural, Hydroxymethyl furfural (HMF), Lignocellulosic biomass, Fermentation

* Corresponding author: albert@niu.edu.tw

一、前言

隨著人類社會文明快速發展，對於石化燃料的需求日趨增劇，使石油等不可再生能源逐漸短缺，而造成石化燃料的價格逐年攀升。近年世界各國開始發展其他可再生性能源，生質燃料，即是將生物質量轉化成生質乙醇、丁醇或柴油，成為新的能源發展研究之一。特別是丁醇，在工業上它不但是種優良的有機溶劑，可以作為重要化工原料和新型生質燃料。丁醇比乙醇具有許優良的特性，如較低的蒸氣壓、較低的生物毒性、高能量密度、含氧燃料可降低HC—和CO的排放、降低植物油的黏質性等(Manuela et al., 2011)。生質丁醇可藉由Acetone-Butanol-Ethanol (ABE)發酵獲得。ABE發酵，其發酵產物丙酮、丁醇與乙醇的比例在傳統上大多為3比6比1。ABE發酵過程主要分為兩個階段，第一階段為產酸階段、第二階段為產醇階段。產酸階段主要生產乙酸、丁酸，使pH值下降，細菌生長至對數生長期；至對數生長後期，累積足夠的有機酸，有機酸開始被利用轉成醇，進入產醇期，主要生產丙酮、丁醇、乙醇，發酵液pH開始回升，達穩定生長期(Gottschalk and Morris, 1981；Gottwald and Gottschalk, 1985)。

木質纖維素材料包括包括木材、草本植物、農業與林業廢棄物和城市固體廢棄物等，含有大量的聚合糖。其主要成分有纖維素、半纖維素與木質素三種成分，經由水解後轉變成簡單的單糖分子物質後作為發酵之基質。在木質纖維素的水解主要常用的有稀酸水解和酶水解，而在稀酸水解過程中所產生的單糖會進一步產生大量的副產物，如乙酸、呋喃衍生物(Furfural、HMF)和酚類化合物，如圖 1 所示，而這些副產物有可能會抑制發酵反應的厭氧微生物(Eva and Barbel, 2000；Zhang et al., 2012)。

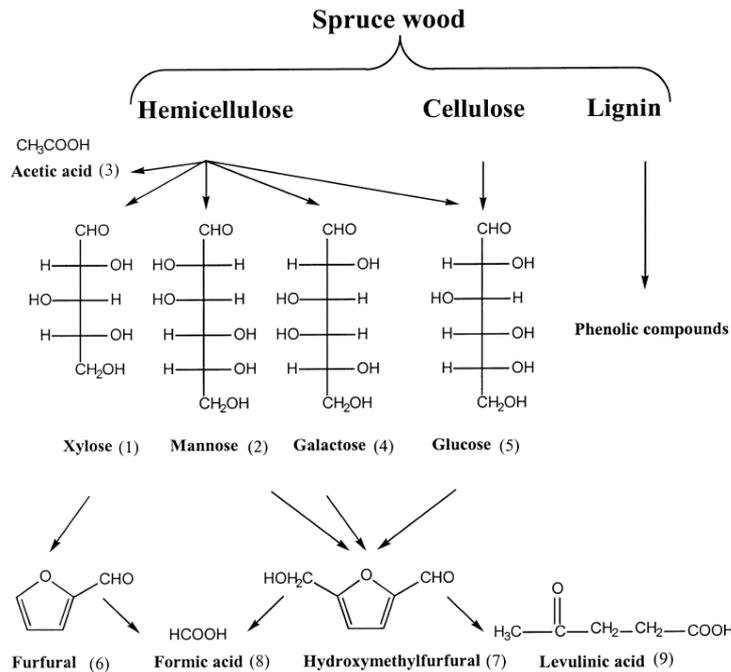


圖 1. 在酸性條件下木質纖維素水解過程所產生的一系列化合物之降解途徑(Eva and Barbel, 2000 ; Zhang et al., 2012)

Furfural和HMF對厭氧微生物之抑制作用主要是在於會對細胞壁和細胞膜造成傷害、降低糖酵解之酵素活性、ATP的生成、抑制細胞內的RNA合成以及影響細胞的生成(簡子策, 2011)。Furfural和HMF導致厭氧發酵微生物受到的抑制,使其反應速率降低,然而在不同種的厭氧微生物菌株,對發酵產物的產量上卻有增加或是減少的差異。部分*Clostridium*菌株在發酵過程中,會使Furfural和HMF成為電子接受者,將其還原成Furfural alcohol與2,5-bishydroxymethylfuran,因而降低Furfural和HMF對微生物的毒性。對於發酵的影響上,在總ABE速率有略微增加;添加Furfural和HMF後,丙酮的濃度皆有提升,而乙醇和丁醇則沒有顯著差異。在細胞濃度上,也有增加的情況(簡子策, 2011)。然而, Furfural和HMF對於ABE發酵的研究仍然有限,因此,本研究的目的是在於以不同的Furfural和HMF之配對濃度來對厭氧發酵中總ABE以及丁醇濃度生產之影響作為探討。

二、實驗方法

2-1-1 種源

本文所使用之菌種來源於American Type Culture Collection (ATCC 27021)購買*C. saccharoperbutylaceticum* N1-4(ATCC 27021)菌株。所有實驗使用的菌種為所購得乾凍管菌株之第三次的植種培養，並將培養之細菌分別取0.75 mL之菌液置入以裝有甘油之1.5 mL微量離心管，菌液與甘油的比例為3：1。分裝後之微量離心管置入於-80°C的超低溫冷凍櫃保存。

2-1-2 植種培養

本文使用Peptone-Yeast-Glucose (PYG)厭氧培養液作為*C. saccharoperbutylaceticum* N1-4(ATCC 27021)菌株之植種培養基，培養基的組成列於表2。菌株於厭氧條件下，轉速控制在100 rpm，溫度控制在35°C，恆溫震盪培養36小時。

2-2 批次發酵實驗

批次實驗於500 mL厭氧血清瓶內進行。添加葡萄糖25 g/L、500 mL乙酸緩衝溶液(0.1 M乙酸357 mL/0.1 M混合無水乙酸鈉643 mL)及3.33 mL營養鹽。營養鹽組成參考(陳怡君，2011)。最後依各批次加入不同配對濃度的Furfural與HMF進行實驗，其發酵條件如表3所示。移植上述之PYG培養液(500 mL)，加入批次培養液中，於厭氧狀態下保持35°C，靜止環境培養 8 天。所有實驗進行二重複，每次採樣須於無菌操作臺中採集樣品，每次採樣約10 mL，並至於螺蓋樣品瓶，加入三滴濃硫酸，作為酸化(pH<2)保存，並存放於4°C冰箱，以便後續的實驗分析。本實驗每條件為二重複實驗。

表 2. PYG培養液組成(Chen et al., 2006)

成份	濃度(g/L)	成份	濃度(g/L)
Peptone	5	NaHCO ₃	0.4
Trytone	5	NaCl	0.08
Yeast Extract	10	Glucose	10
CaCl ₂	0.008	Cysteine-HCl	0.5
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.0192	L-Glutathione	0.25
K ₂ HPO ₄	2.04	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.0011
KH ₂ PO ₄	0.04		

表 3. 批次發酵添加 Furfural 及 HMF 之濃度

實驗	Furfural(g/L)	HMF(g/L)
A	0.3	0.3
B	0.1	0.3
C(空白)	0	0

2-3. 實驗分析

將採樣後之菌液經6000 rpm離心20分鐘後，過濾上層溶液留下沉澱菌株，加入蒸餾水至等量體積，以震盪器均勻攪拌後，放入波長在600 nm之分光光度計下測量其吸光值(最後細胞濃度經過換算以乾重表示)。以氣相層析儀搭配火焰離子偵測器(GC-FID)以及來測

量ABE發酵產物。分析項目有：丙酮、乙醇、正丁醇、乙酸、丁酸，樣品做二重複分析。碳水化合物分析參照於(Chen et al., 2006)的研究，使用anthrone試劑法測量。

2-3-4. Gompertz Model動力分析

本文所用之Gompertz Model，為廣泛應用於統計各發酵中之累積產氫量、甲烷量等(陳怡君，2011)，本實驗將以此模型了解丁醇及其他產物的ABE生產狀況。

$$P(t) = P \cdot \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (1)$$

其中， $P(t)$ ：隨時間內所累積的丁醇或總ABE生產濃度； λ ：遲滯期； P ：丁醇或總ABE生產潛力； R ：丁醇或總ABE生產速率； $\exp(1)$ ：2.71828。

三、結果與討論

3-1 產物生成

圖2顯示不同副產物配對濃度下丙酮濃度變化的情形。圖2中，由實驗A、B與實驗C(空白)相比，可以明顯看出兩組實驗的丙酮濃度有明顯的增加，增加的濃度約在600~700 mg/L，顯示其不同副產物(Furfural與HMF)配比濃皆對丙酮有增加的效果。越高濃度的Furfural或是相對的總濃度較高的實驗A與實驗B相比下，丙酮濃度之間的變化則無明顯的差異。丙酮生產速率方面，實驗A、B、C分別為2631、1548、948 mg/L-day，也顯示在不同配比濃度下，對於丙酮而言也是有增加的效果。另外，在遲滯時間方面，實驗A、B、C分別為1.53、0.28、0.39天。在越高濃度的Furfural中(實驗A)，遲滯時間有明顯的增加，而在實驗B中卻會減少，顯示較低的Furfural濃度，對其丙酮生產的時間相對較快。

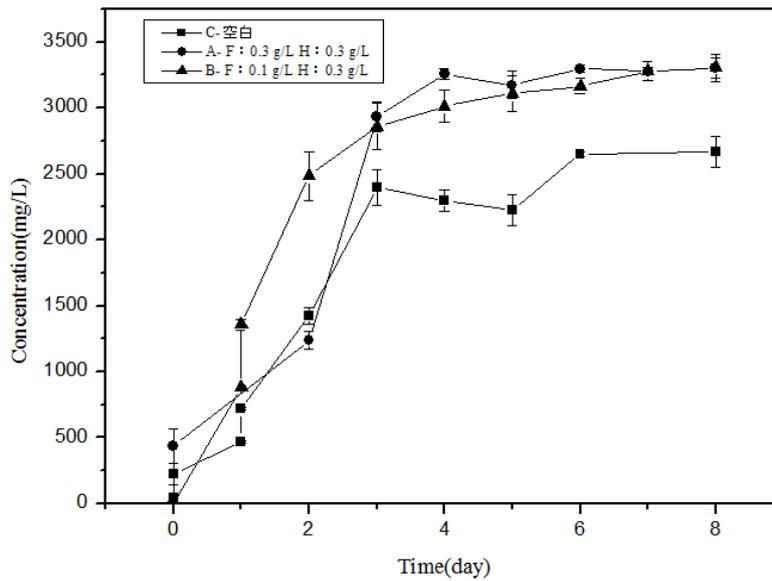


圖 2. 不同Furfural與HMF配對濃度之丙酮濃度隨時間變化的情形

丁醇為ABE發酵中的主要產物。圖3顯示不同副產物配對濃度下丁醇濃度變化的情形。圖3中，實驗A、B與C(空白)相比下之丁醇濃度皆有增加，但增加的濃度相對於丙酮所增加之濃度要略低，約為400~600 mg/L。在丁醇生產速率方面，實驗A、B、C分別為5090、2253、1686 mg/L-day。顯示不同Furfural與HMF配比濃度下，丁醇生產速率皆有增加的趨勢，尤其是在實驗A(F-0.3 g/L H-0.3 g/L)，有非常明顯的增加。相對於實驗B，實驗A中Furfural濃度較高，對於丁醇生產速率的促進比實驗B要來的好。遲滯時間方面，實驗A、B、C分別為1.82、0.47、0.93天，顯示較高濃度的副產物濃度，遲滯時間明顯增加，而較低的副產物濃度下之遲滯時間確有減少的情形。

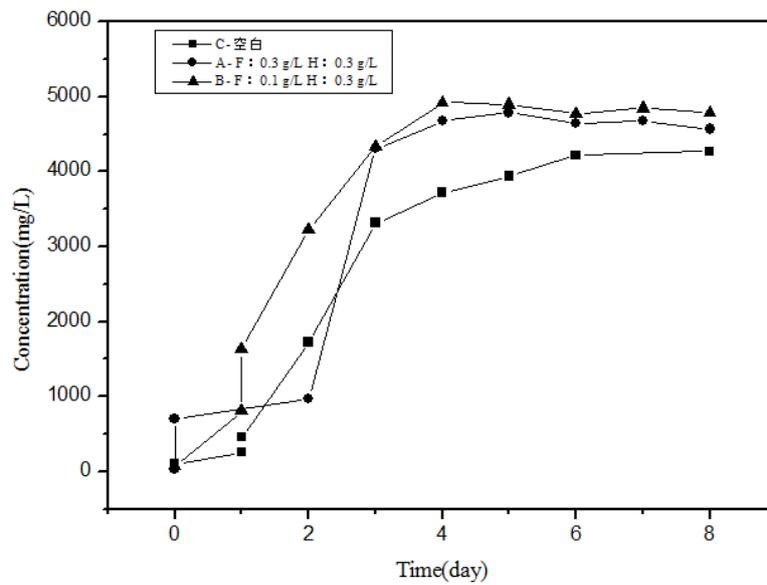


圖 3. 不同 Furfural 與 HMF 配對濃度之丁醇濃度隨時間變化的情形

圖 4 為不同 Furfural 與 HMF 濃度下之總 ABE 濃度隨時間變化的情形。在實驗 A、B 與實驗 C (空白) 皆有增加，增加濃度範圍在 500~1400 mg/L。由圖 5 可知，在實驗 A 與 C 中最終總 ABE 濃度增加不明顯，而在實驗 B 中卻有明顯增加，其可能的原因是在於實驗 A 的副產物配比濃度，Furfural 濃度相對較高，會使總 ABE 的濃度有所影響。在總 ABE 生產速率方面，實驗 A、B、C 分別為 7691、3772、2686 mg/L-day，顯示在不同副產物配比濃度，對於總 ABE 的生產速率有增加的趨勢，而在相對較高的副產物濃度而言，有更好的總 ABE 生產速率。另外，在遲滯時間方面，實驗 A、B、C 分別為 1.71、0.33、0.65 天，顯示較低濃度的副產物對於總 ABE 來說有減少的趨勢，而越高的副產物濃度有明顯的遲滯時間。

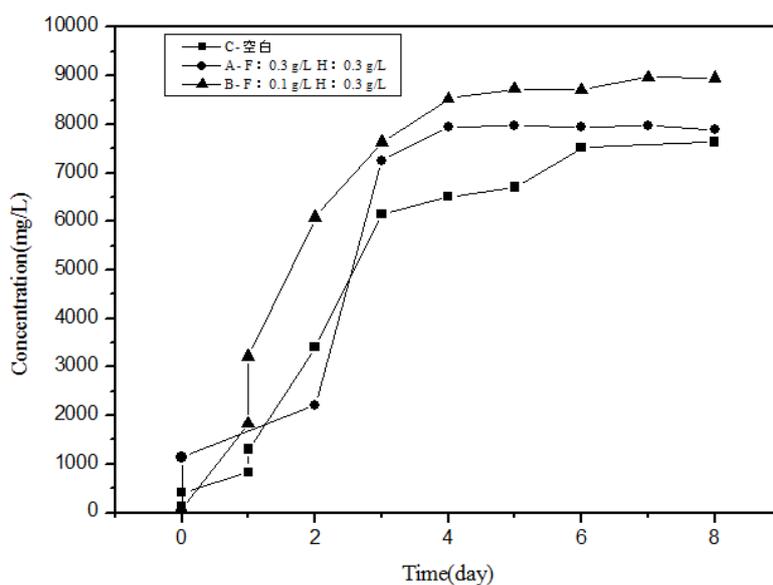


圖 4. 不同Furfural與HMF配對濃度之總ABE濃度隨時間變化的情形

3-2 Gompertz Model動力分析

將丙酮之生產潛力、生產速率作圖，如圖 5。由圖 5 可以知道，實驗A與B在丙酮生產潛力上與空白相比，分別增加128%和124%。對於丙酮而言，不同副產物配對濃度皆有利於丙酮生產。越高濃度的副產物(實驗A)相對比實驗B有更好的生產速率。與空白相比，分別增加270%和159%。

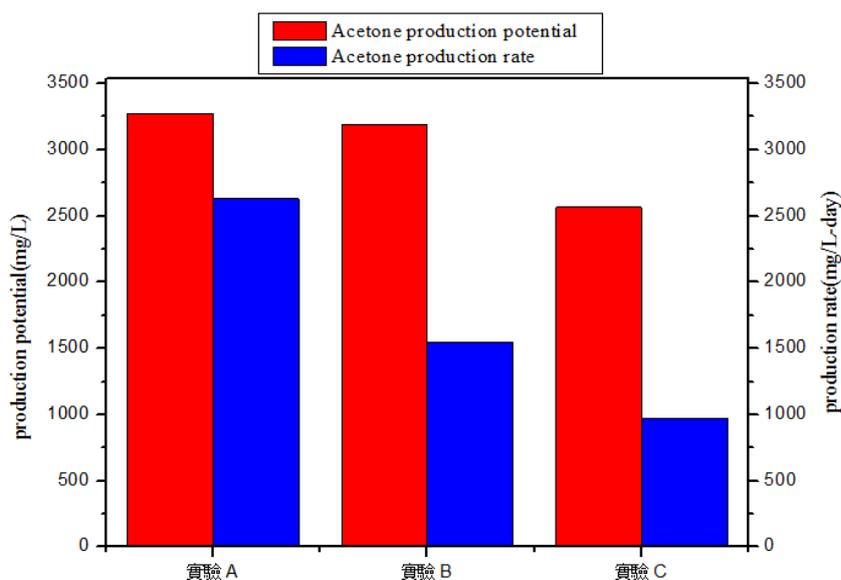


圖 5. 丙酮生產潛力與生產速率比較圖

圖 6 分別為各組之丁醇生產潛力與生產速率之比較。由圖 6 可知，對於丁醇生產潛力而言，實驗B有相對較高的丁醇生產潛力，與空白相比，實驗A、B分別增加111%和116%。對於越高的副產物濃度對於丁醇的生產潛力有抑制的現象產生，但是相對於空白的情況下都是促進生產的情況。對於丁醇生產速率，實驗A比B有更好的生產速率，而實驗A與B的生產速率與空白相比下，分別增加301%、133%。由此可知對於丁醇生產速率，較高副產物配對濃度，會幫助丁醇生產速率的增加。

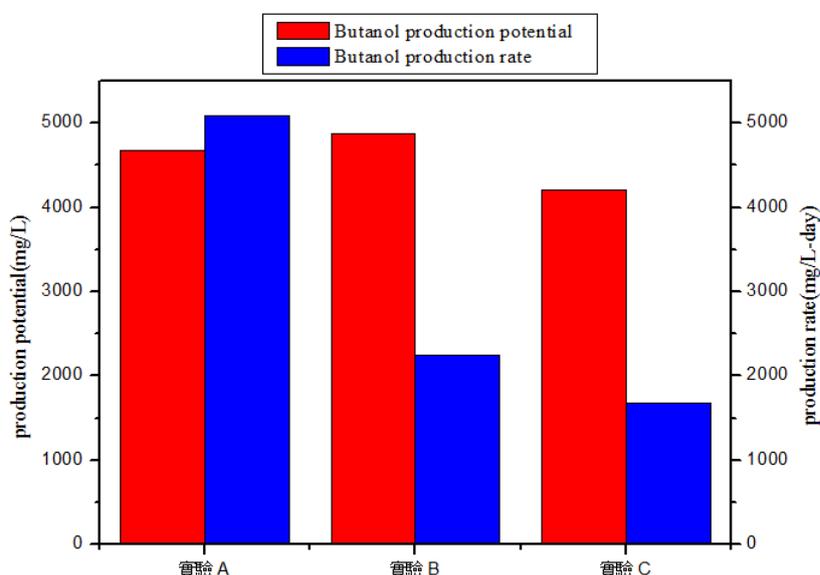


圖 6. 丁醇生產潛力與生產速率比較圖

圖 7 為各組之總ABE生產潛力與生產速率之比較。由圖7可知，對於總ABE生產潛力而言，實驗B有相對較高的總 ABE生產潛力，與空白相比，實驗A、B分別增加 107%和 119%。對於總ABE生產潛力而言，在相對較低的副產物濃度有較高ABE生產潛力，顯示越高濃度的副產物濃度對於總ABE生產潛力是會有抑制的情況，但與空白相比，不同副產物濃度對於總 ABE生產潛力的影響則皆有促進的效果。另外，對於總 ABE 生產速率，實驗 A、B與空白相比下，分別增加286%、140%。而相對較高副產物濃度的實驗

A則比實驗B有更高的總ABE生產速率，顯示在實驗A中，對於總ABE的生產速率上，有更好的促進效果。

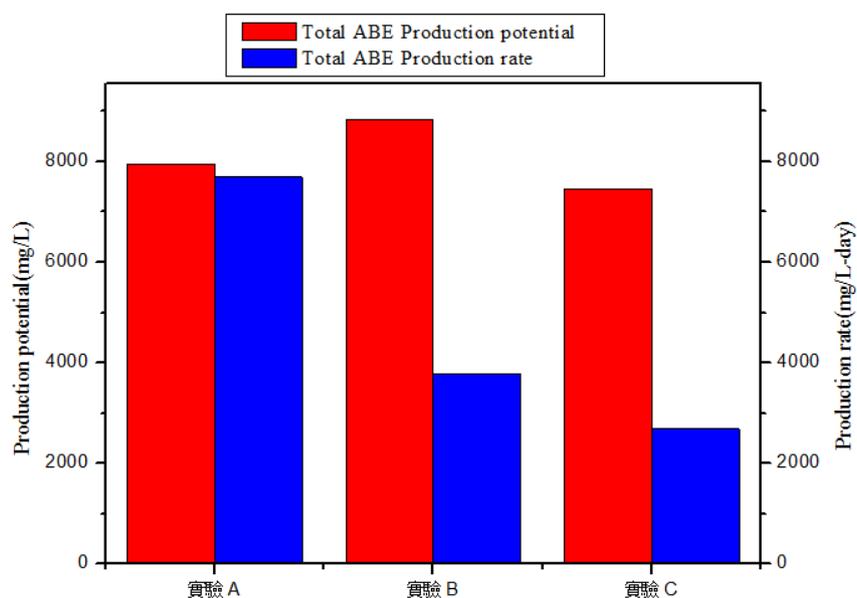


圖 7. 總ABE生產潛力與生產速率比較圖

表 4 列出 Gompertz Model 分析之結果，為丙酮、丁醇與總ABE之數據整理。由 Gompertz Model 分析之結果可以預測出丙酮、丁醇與總ABE的生產潛力、生產速率與遲滯時間。而在實驗A、B與空白組的預測結果相比之下，可以知道，不同配對濃度，皆促進丙酮、丁醇、ABE的生產，而在遲滯時間上，顯示，實驗B比實驗A有更短的遲滯，顯示較高配對濃度對於發酵遲滯有較大的影響。

表 4. Gompertz Model 數據整理

實驗	A	B	C
丙酮生產潛力(mg/L)	3271	3185	2565
丁醇生產潛力(mg/L)	4676	4880	4205
總ABE生產潛力(mg/L)	7951	8829	7445
丙酮之遲滯時間(day)	1.53	0.28	0.39
丁醇之遲滯時間(day)	1.82	0.47	0.93
總ABE之遲滯時間(day)	1.71	0.33	0.65
丙酮生產速率(mg/-day)	2630	1548	948
丁醇生產速率(mg/L-day)	5090	2253	1686
總ABE生產速率(mg/L-day)	7691	3772	2686
丙酮生產潛力與空白之百分比(%)	128	124	-
丁醇生產潛力與空白之百分比(%)	111	116	-
總ABE生產潛力與空白之百分比(%)	107	119	-
丙酮生產速率與空白之百分比(%)	270	159	-
丁醇生產速率與空白之百分比(%)	301	133	-
總ABE生產速率與空白之百分比(%)	286	140	-

3-3 基質消耗以及 Furfural 與 HMF 變化

本實驗主要以葡萄糖作為發酵時所需之碳源，以探討葡萄糖對於菌株之利用的情形。在圖 8 中顯示不同副產物配對濃度之葡萄糖消耗的變化情形。在所有實驗中，葡萄糖消耗的趨勢皆類似，在實驗A、B、C中其葡萄糖的消耗量分別為21493、19661、17767 mg，而葡萄糖利用率分別為85%、81%、73%。由圖 11 顯示在發酵第二天，實驗B有較

快速的葡萄糖消耗，而實驗A則較慢，顯示在越高濃度的Furfural中，對於發酵初期葡萄糖的利用有些微抑制的情形。

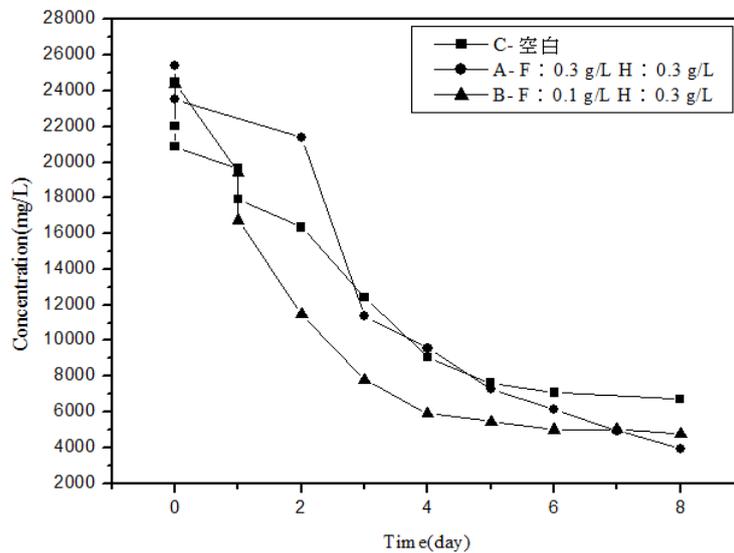


圖 8. 不同 Furfural 與 HMF 配對濃度之葡萄糖隨時間之消耗變化情形

圖 9 為實驗A、B中Furfural與HMF隨時間變化的情形。由圖12可以發現，Furfural比HMF更快的被消耗約在一天左右的時間，而越高濃度的Furfural，有較長的停留時間。而HMF約在2-4天左右才會被消耗完。

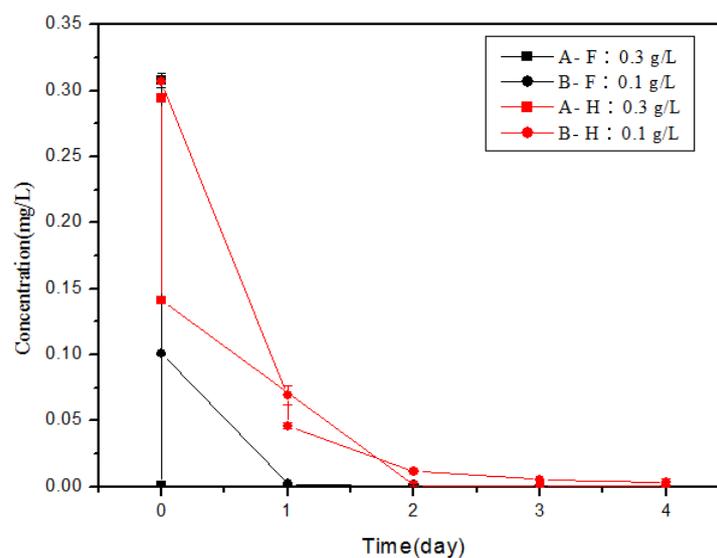


圖 9. 不同Furfural與HMF濃度隨時間的變化情形

表5為葡萄糖與丁醇、總ABE之數據分析。顯示，與空白組相比下，B組比A組有較好的丁醇以及總ABE產量，可以得知越高的副產物配對濃度，對厭氧微生物的丁醇、總ABE產量有抑制的影響。而在各組實驗中(實驗A、B、C)，相對越高的副產物配對濃度顯示，有越好的濃度比(丁醇/ABE)關係，其數值分別為0.588、0.553、0.535。

表 5. 葡萄糖、丁醇與總 ABE 之數據分析

實驗	A	B	C
葡萄糖消耗率(%)	85%	81%	73%
總 ABE 產量 (g ABE /g 葡萄糖)	0.370	0.449	0.442
丁醇產量 (g 丁醇/g 葡萄糖)	0.218	0.248	0.236
丁醇對 ABE 濃度比	0.588	0.553	0.535

四、結論

本研究實驗條件為不加副產物、Furfural與HMF的配對濃度為0.1 g/L、0.3 g/L以及0.3 g/L、0.3 g/L。研究結果發現，0.1與 0.3 g/L配對濃度較空白之丁醇生產潛力提升116%。另外，0.3與0.3 g/L配對濃度則較空白之丁醇生產潛力增加111%。同時，丁醇的生產速率，在0.1與0.3 g/L以及0.3與0.3 g/L配對濃度與空白相比，分別提升133%與301%。結果顯示在不同副產物濃度，都有助於丁醇的生成。就葡萄糖的利用而言，不加副產物、0.1與0.3 g/L以及0.3與0.3 g/L配對濃度下的葡萄糖消耗率分別為73%、81%以及85%。顯示在越高濃度副產物反而有助於促進微生物對葡萄糖的利用。整體而言，適當濃度Furfural與HMF能促進ABE發酵，而非抑制發酵反應。

參考文獻

- 陳怡君，2011，”利用農業廢棄物稻稈生產丁醇生質能源之研究”，碩士論文，國立交通大學環境工程所。
- 簡子策，2011，”生質丁醇生成之動力探討:基質濃度與丁酸濃度對丁醇發酵的影響”，碩士論文，國立宜蘭大學環境工程所。
- Chen, W.H., Chen, S.Y., Khanal, S.K., Sung, S., 2006, “Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation,” *International Journal of hydrogen Energy*, Vol. 31, pp. 2170-2178.
- Eva P., Barbel Hahn-H., 2000, “ Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition,” *Bioresource Technology*, Vol. 25, pp. 25-33.
- Gholizadeh L., 2009, “Enhanced Butanol Production by Free and Immobilized Clostridium sp. Cells Using Butyric Acid as Co-Substrate. Biotechnology (Bioprocess Engineering – Biofuels),” University College of Borås School of Engineering.
- Gottschalk, J.C., Morris, J.G., 1981, “The Induction of Acetone and Butanol Production in Cultures of Clostridium acetobutylicum by Elevated Concentrations of Acetate and Butyrate,” *FEMS Microbiol Letters*, Vol. 12, pp. 385-389
- Gottwald, M., Gottschalk, G., 1985, “The Internal pH of Clostridium acetobutylicum and its Effect on the Shift from Acid to Solvent Formation,” *Arch Microbiol*, Vol. 143, pp. 42-46.
- Manuela, S., Ralf, W., Martin, F., Winfried, R., 2011, “Biobutanol from food wastes – fermentative production, use as biofuel and the influence on the emissions,” *Procedia Food Science 1*, pp. 1867-1874.
- Zhang, Y., Han, B., Ezeji, T.C., 2012, “Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural (HMF) by Clostridium acetobutylicum ATCC 824 during butanol fermentation,” *New Biotechnology*, Vol. 29, pp. 345-351.