

超音波參數對微生物產氫效應之研究

Study of Ultrasonic Parameter on Effect of Dark Fermentation

夏紹毅¹、王金雄²、裴玉玲³

摘要

人類長久以來依賴石化燃料（煤、石油及天然氣）作為能源的來源，傳統燃料如石油、煤、天然氣及核能因為屬於無法再生之能源，且石化燃料被採用的速度太快，因此將逐漸被可再生能源及生質能所取代。另一方面使用燃料的時候會排放二氧化碳造成溫室效應，且由於石化能源日漸枯竭，尋找替代能源已是刻不容緩。在全球目前所積極開發的替代能源中，氫氣能源最被重視，也被認為是未來能源之主流。氫氣是潔淨能源，而以生物法產氫更符合永續環保的概念，是一深具潛力的新能源技術，生物產氫方法中之暗醱酵生物產氫具有廢棄物資源化、速率快的特色，最具商業化的潛能。本實驗藉由暗醱酵生物產氫與超音波結合的方法來探討超音波的頻率及照射時間來觀察超音波對暗醱酵產氫的影響，研究過程中將結合田口法來規劃實驗次數，找出對實驗的影響因素以達到最佳化時的條件，進而達到理想的品質。實驗結果顯示在不同的條件下經由適當的選取超音波參數可以得到最佳的產氫結果。

關鍵字：微生物產氫、超音波效應、暗醱酵生物

Abstract

Fossil fuels (coal, oil and gas) have been regarding as the sources of energy for a long time. They are not renewable energy, and used excessively. Therefore, some renewable energy is being substituted for it. In this case, because the hydrogen is the pure energy and only generates the byproduct of the water that is harmless to the environment, it is hence can be considered to be the mainstream of the future energy. Using biological method, for example, dark fermentation is one of the ways to produce hydrogen. Due to the more efficiency of production, commercial potential, and resource of waste, the dark fermentation will be known as one of better hydrogen-producing. The purpose of this study is to investigate the effect of ultrasound acting on dark fermentation to produce hydrogen. In this research, the experiment of the ultrasonic will change its working frequency and the irradiation time to observe the influence of the hydrogen-producing. The results can be found that the hydrogen production volume will be higher as the application of the ultrasound. It is obvious that the microbial product hydrogen is benefited by the working frequency of the ultrasound.

¹高苑科技大學機械與自動化系副教授

²永達技術學院生物技術系副教授

³永達技術學院精密機械與製造技術研究所研究生

Keywords: effect of ultrasound, hydrogen-producing bacteria, dark fermentation

一、前言

氫氣，由於具有潔淨無污染、永續供應及高熱能值(每單位重量產生支熱能值為34300kcal/kg，約為甲烷的2.5倍、汽油的3倍)等三項特質，故今年來氫氣能源已受到國際上學術及業界矚目。氫氣除了可直接燃燒得到大量能源外更可應用於燃料電池上之用電，從一般生活中筆記型電腦或行動電話等，甚至可擴大規模用來發電。而傳統的熱化學及電化學產氫方法，在穩定性、安全性及量產之可能性都有其考量，且以生物法產氫則成為一項及自然又有發展潛力的產氫方式，以環境生物技術，利用厭氧微生物(主要是芽孢桿菌)對廢水處理之同時將其中隻有機質轉為可利用之氫氣，一方面可解決環境污染之問題，另一更可開發出可用的再生能源，成為一種具有經濟競爭力的產氫方式，並期望以實場廢水之有機物作為菌體基質，除可以處理費水中有機物更可產生乾淨的氫氣能源[1]。

至於國際的現況呢？在2009年1月成立的國際新能源組織，旨在全球範圍推動大規模、可持續性地使用可再生能源，目前已有130多個國家簽署加入這一組織。可再生能源的發展將是21世紀的朝陽產業，其重要性不僅在於可創造就業，還可確保整個地球的健康和未來的繁榮與安全。美國政府和國會經過慎重考慮，決定以及宣佈在6月29日加入國際新能源組織，美國政府致力於支援清潔能源技術和低碳經濟發展以應對全球氣候變化[2,3]。而為因應氫能時代的來臨，需要生產價格便宜、產量大的氫氣，生物暗醱酵產氫可以是很好的選擇。因此本研究即以暗醱酵為產氫方法，開發適合的培養基組成，並在生物反應器中搭配超音波機械效應進行暗醱酵產氫，實驗過程中將利用田口方法來探討產氫過程中各項參數彼此之間的關係，希望能找到最佳的產氫條件及更深一層瞭解超音波對微生物的影響為本研究之目標。

有關超音波的使用情形如2005年劉學者使用低頻超音波聲學技術，評估木材受生物劣化而損壞之程度，並且應用超音波技術發展木構件受生物劣化時，殘留強度之預測模式。結果顯示木材在低頻超音波檢測方法，較可避免音波訊號之干擾發生，以40~1000kHz範圍之內沒有顯著之差異[4]。

2009年張學者建立實驗組分別為超音波的共振頻率與非共振頻率且在不同強度照射下，與無超音波照射的控制組坐一比較，以觀察兩者間的差異性，來探討超音波照射聲場對釀酒酵母細胞於生命週期所造成的生物效應。實驗結果顯示超音波頻率越高之照射聲場，對細胞生長的時間會造成抑制效果，由實驗中亦發現有超音波照射時對細胞生長率不會造成影響[5]。

至於國內相關研究則有2002年宗學者利用廢水污泥進行產氫，並開發固定化細胞系統以利於產氫污泥之程序化，另一方面又利用不同材料與產氫方式進行固定化細胞，藉由重複批次找出最適當的固定化細胞產氫方法[6]。

2002年陳及賴學者使用醱類來培養厭氧菌種由廢水污泥透過CSTR的方法來培養兩槽(反應體積為4升)以產生氫氣，另外又利用田口法以批次試驗探討營養源對厭氧生物產氫之影響[7、8]。

2006年王學者使用混合菌種結合原態澱粉和澱粉水解當做碳源來設計暗醱酵產氫系統，結果發現澱粉水解液產氫的速率比原態澱粉產氫的速率快；因此，水解澱粉酵素

的開發是以水解澱粉進行生物產氫成本的關鍵[9]。

二、基本理論

(1) 田口方法原理及種類

傳統的產品品質只是為了符合客戶的要求，並不強調品質的目標值及差異之間的關係，如果應用田口方法則可以克服品質變異發生並找出解決方法，若不能符合客戶的要求可能會造成有形或無形的損失[10]。

田口方法是利用統計技術及工程概念對問題的看法進行分析，而不是以統計人員的看法來進行實驗。現在，「田口方法」能針對企業在產品設計與生產條件所影響到產品的品質，並協助企業找到最佳設計及條件。田口方法將品質特性值分為三種類型：望小特性、望目特性及望大特性，本研究使用望大特性來做實驗規劃，以找出對實驗影響的因素及最佳參數組合。

本研究將使用田口方式來規劃實驗次數，並找出對實驗的影響因素達到最佳化時的條件，並判斷及淘汰一些干擾因素以讓本實驗縮小控制範圍進而達到理想的品質。本實驗採用四個控制因子及三水準為主軸，所以適當的直交表是 $L_9(3^4)$ ，透過 $L_9(3^4)$ 的直交表可規範本研究中實驗次數及實驗條件。

(2) 超音波系統

日常生活中，我們常聽到「音波」這個名詞，但是對它卻不甚瞭解，其實任何振動的物體都是一種聲音的來源，也可能藉由不同的形式被呈現出來。簡單的說「音波」就是一個彈性媒介中的機械振動，一般我們可聽見的音波振動頻率大約是每秒 20Hz~18kHz 的振動頻率稱為次音波，如果音波的振動頻率高於 20kHz，即稱為「超音波」。

超音波在氣體內傳播時，雖然容易產生衰減，然在液體或固體內時，則其傳播效果甚佳，在固體內傳播時，除了縱波之外，還有橫波及表面波存在。超音波的振盪位移雖小，但具有音壓高及功率密度強的特性，功率密度表示微波在單位面積上的輻射功率。超音波感測器利用發射之超音波，可再接收自被測定物上反射之反射波及透射波。

超音波可增加細胞膜的通透性（通透性代表水通過物質的能力，通透性愈好，則水越容易通過；如果通透性較不好，水不易通過），經由實驗發現，連續、脈衝式的超音波，會使組織改變內外的滲透壓（滲透是指物質經過選擇性膜時，有部分能通過，部分則無法通過），導致細胞刺激性的改變，提升代謝及反應的過程，會使體內 pH 值發生變化，就是運用這個效果。

超音波可提升組織的再生力和周圍神經的功效，對周圍神經的傳導速率會有明顯的影響，改變主要原因是源於超音波的透熱效果所致。如果用高強度的超音波，會產生一個傳導區，這也證實了神經組織對超音波功效的敏感性。

(3) 生物產氫系統

一般來說，氫氣生產的方法主要可分為三種，為熱化學法、電化學法及生物法。前面兩者上有許多缺點，如需耗費大量的能源、穩定性欠佳等問題，而生物法產氫乃藉由微生物(如厭養菌、光和菌等)之生物降解與生物轉換作用，將環境中之有機廢棄物轉化為能源。只用厭氧微生物在不需光源之情況下可將有機物質分解產生氫氣，並容易與廢水處理序合併操作，使得在處理環境污染之同時，也能生產具有經濟價值之氫氣能源，

可謂一舉兩得。

因此本研究即以暗醱酵為產氫方法，開發適合的培養基組成，並在生物反應器中搭配超音波機械效應進行暗醱酵產氫，實驗過程中將利用田口方法來探討產氫過程中各項參數彼此之間的關係，希望能找到最佳的產氫條件及更深一層瞭解超音波對微生物的影響為本研究之目標。

三、實驗方法及步驟

(1) 實驗方法

本研究將使用田口法來規劃實驗次數，找出對實驗的影響因素達到最佳化時的條件，並判斷及淘汰一些干擾因素以讓本實驗縮小控制範圍，進而達到理想的品質。本研究將嘗試以超音波所產生之機械效應，配合生物產氫技術來達到最佳化效應，產氫方式將選擇使用暗醱酵來處理，原因是暗醱酵方式有許多優異之處，為其它菌種所不能比擬的。

(2) 實驗步驟

a. 規劃實驗的直交表

實驗採用四個控制因子及三水準為主軸，所以適合的直交表是 $L_9(3^4)$ ，透過 $L_9(3^4)$ 的直交表可規範本研究中實驗次數及實驗條件如表 1 所示。

表 1：實驗規劃表

參數 實驗次數	A	B	C	D
1	1	15/30	0.5MHz	10g/l
2	1	15/15	1MHz	20g/l
3	1	全打	5MHz	30g/l
4	2	15/30	1MHz	30g/l
5	2	15/15	5MHz	20g/l
6	2	全打	0.5MHz	10g/l
7	3	15/30	5MHz	20g/l
8	3	15/15	0.5MHz	30g/l
9	3	全打	1MHz	10g/l

b. 實驗架構

實驗所需要的營養源及菌種處理完後以適當的比例放入反應槽，恆溫水槽裡灌滿水，水的溫度由控溫機來空溫保持水溫在 $33^{\circ}\text{C}\sim 40^{\circ}\text{C}$ ；反應槽裡面已放入攪拌石，將蓋子鎖緊以構成密閉空間，接著將整個反應槽放入恆溫水槽，下面佈置攪拌器來帶動攪拌石以維持反應器裡面均勻的狀態。超音波探頭則從發射器連到反應器的蓋子並插入反應器的液體內，反應器的另外兩孔用途在取樣及傳送氣體到流量機。超音波發射器另連接到示波器，引導訊號顯示在示波器的螢幕上，示波器又同時被連接至電腦以存取實驗圖檔。

c. 菌種和營養源

實驗所使用的菌種來自臺灣中部一都市廢水處理場終沉池的廢水，這些廢水裡含有混和菌種而其中主要的種類是芽孢桿菌。處理菌種有很多方法，用高溫來處理菌種是其

中一種，也是實驗所選擇的方法來處理菌液。高溫處理的方法如下：把菌液放入玻璃燒杯用蓋子放上面以免空氣中的雜菌掉入菌液，接著加熱板把燒杯加熱到沸騰，中間用鐵網隔離燒杯和加熱板以避免玻璃燒杯破壞，菌液沸騰之後把燒杯放一旁給予冷卻。處理菌液的主要目的是滅死一些雜菌，避免雜菌在反應的過程會產生雜氣。

營養源的主要成分有食用樹薯澱粉當作碳源、磷酸氫銨為氮源、磷酸氫二鈉為緩衝酸性變化的緩衝鹽及一些微量元素，詳細的配方如表 2 說明。把適當的碳源、氮源、緩衝鹽及微量元素放入鍋子裡再加上 1 公升 RO 水攪拌均勻分散在水中，然後加熱到沸騰，加熱的過程中需要攪拌均勻避免沉澱的現象而造成營養源的濃度不均勻。

緩衝鹽的功用在於穩定系統的 pH 值，在暗醱酵產氫的代謝過程中伴隨著揮發酸和醇類的產生，使得系統 pH 值會造成明顯的降低，進而改變產氫代謝路徑甚至醱酵產氫受到抑制停止產氫。最常被使用的緩衝鹽以磷酸氫銨及磷酸氫二鈉(NH₄H₂PO₄ 和 Na₂HPO)為主要成份，可以提高產氫量和降低氣體成分之 CO₂/H₂ 的比值，如下列公式可顯示 CO₂/H₂ 的比例：

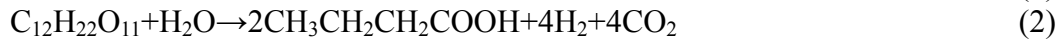


表2：醱酵的營養源配方成分

成分	濃度mg/l
澱粉	10g/l-20g/l-30g/l
NH ₄ H ₂ PO ₄	4500
Na ₂ HPO ₄	11867
K ₂ HPO ₄	125
MgCl ₂ · 6H ₂ O	100
MnSO ₄ · 6H ₂ O	15
FeSO ₄ · 7H ₂ O	25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	5
CoCl ₂ · 5H ₂ O	0.125

d. 醱酵產氫模擬

Gompertz 方程式(3)被用以模擬氫氣產生的狀況，氫氣隨時間生成的趨勢以 Gompertz 方程式的變化式來模擬，動力學參數(Hmax, Rmax 和 λ) 以 Sigma Plot 10.0 軟體的非線性回歸功能來建立：

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

其中：

H=所產生的氫氣的累積量(ml)

t=醱酵時間(h)

Hmax=最大產氫量潛能(ml)

Rmax=最大產氫速率(ml/h)

λ=遲滯時間(h)

四、實驗結果

(1) 針對產氫效率來分析實驗的結果

若針對實驗效率來分析結果，可得到結果如表 3 來說明。從表 3 的實驗結果來看，得到最好的效率是第 4 組，實驗條件分別為超音波強度 2、照射 15 分鐘/停 30 分鐘、超音波探頭 1MHz 及澱粉濃度是 30g/l。若針對平均值來分析可得到結果如表 4 及圖 1 所示。

表 3：探討產氫效率的結果

實驗重複 實驗組	重複 1	重複 2	重複 3	平均值	S/N 比	誤差
1	21.57	20.38	14.87	18.94	25.55	3.57
2	27.54	23.88	16.56	22.66	27.11	5.59
3	22.12	26.44	20.49	23.02	27.24	3.07
4	28.48	30.18	22.68	27.11	28.66	3.93
5	21.12	24.6	19.75	21.82	26.78	2.50
6	24.96	33.34	21.98	26.76	28.55	5.89
7	14.52	31.25	17.58	21.12	26.49	8.91
8	28.55	29.08	22.42	26.68	28.52	3.70
9	24.77	17.37	18.56	20.23	26.12	3.97

表 4：不同水準下產氫效率的實驗平均值

效率的平均值	超音波的強度	超音波的頻率	照射時間	澱粉的濃度
水準 1	21.54	22.39	24.13	20.33
水準 2	25.23	23.72	23.33	23.51
水準 3	22.68	23.34	21.99	25.6
影響力	3.69	1.33	2.14	5.27

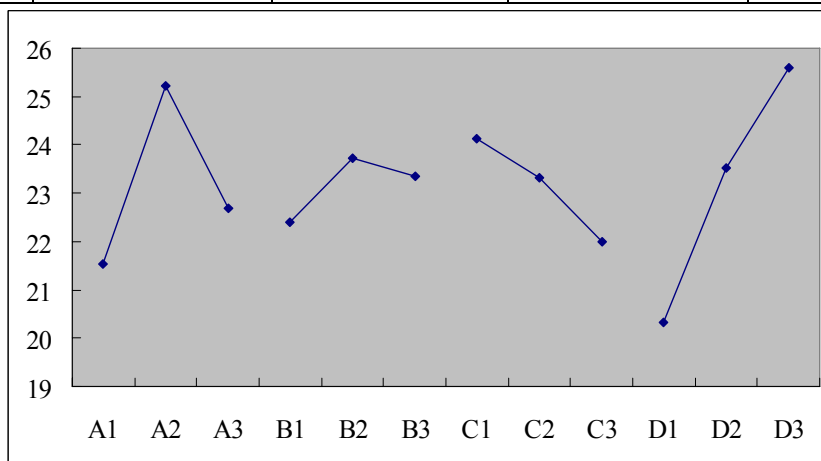


圖 1：針對產氫效率的實驗平均值

從表 4 及圖 1 可以到最好的條件組為：超音波強度 2、照射 15 分鐘/停 30 分鐘、超音波探頭 1MHz 及澱粉濃度是 30g/l。若以 S/N 比來分析可得到如表 5 及圖 2 所示，其中最好的實驗條件組分別為：超音波強度 2、照射 15 分鐘/停 30 分鐘、超音波探頭 1MHz 及澱粉濃度是 30g/l。

表 5：不同水準下產氫效率的 S/N 比

效率的 S/N 比	超音波的強度	超音波的頻率	照射時間	澱粉的濃度
水準 1	26.63	26.9	27.54	26.15
水準 2	27.99	27.47	27.3	27.38
水準 3	27.04	27.3	26.84	28.14
影響力	1.36	0.57	0.7	1.99
排名	2	4	3	1

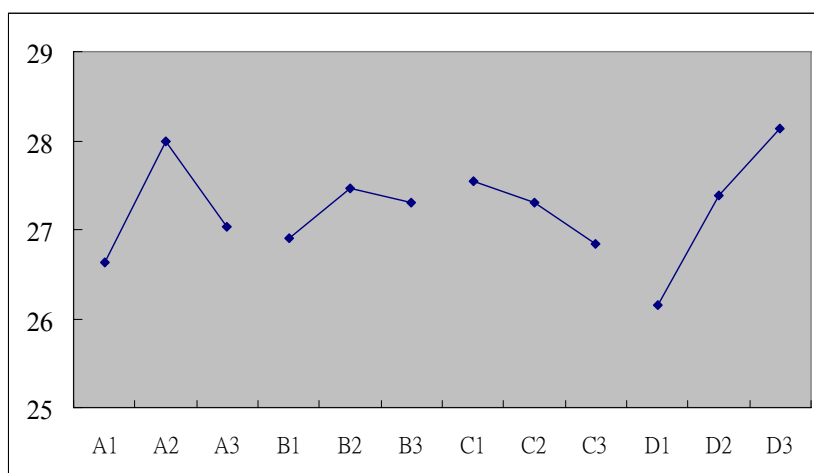


圖 2：針對產氫效率的實驗 S/N 比顯示反應圖

(2) 針對產氫速率來分析實驗的結果

若針對速率來分析結果，可得到結果如表 6 所示；從表 6 的實驗結果來看，可以得到最好的組別是第 8 組，實驗條件為超音波強度 3、照射 15 分鐘/停 30 分鐘、超音波探頭 1MHz 及澱粉濃度是 30g/l。若針對平均值來分析可得到結果如表 7 及圖 3 所示，其中最好的實驗組為：超音波強度 2、超音波探頭 1MHz、照射時間是全照及澱粉濃度是 30g/l。若以 S/N 比來分析可表示如表 8 及圖 4 所示。

表 6：探討產氫速率的結果

實驗重複 實驗組	重複 1	重複 2	重複 3	平均值	S/N 比	標準偏差 值
1	118.93	70.91	66.36	85.40	38.63	29.13
2	147.42	140.49	106.51	131.47	42.38	21.89
3	115.27	193.02	186.01	164.77	44.34	43.01
4	119.35	150.43	156.77	142.18	43.06	20.03
5	185.28	70.63	125.11	127.01	42.08	57.35
6	164.75	151.07	133.04	149.62	43.50	15.90
7	86.55	215.69	87.27	129.84	42.27	74.35
8	198.66	212.31	245.67	218.88	46.80	24.18
9	79.31	67.13	52.24	66.23	36.42	13.56

表 7：不同水準下產氫速率的實驗平均值

速率的平均值	超音波的強度	超音波的頻率	照射時間	澱粉的濃度
水準 1	127.21	119.14	151.3	92.88
水準 2	139.6	159.12	136.98	136.98
水準 3	138.32	126.87	175.28	175.28
影響力	12.39	39.98	38.3	82.4

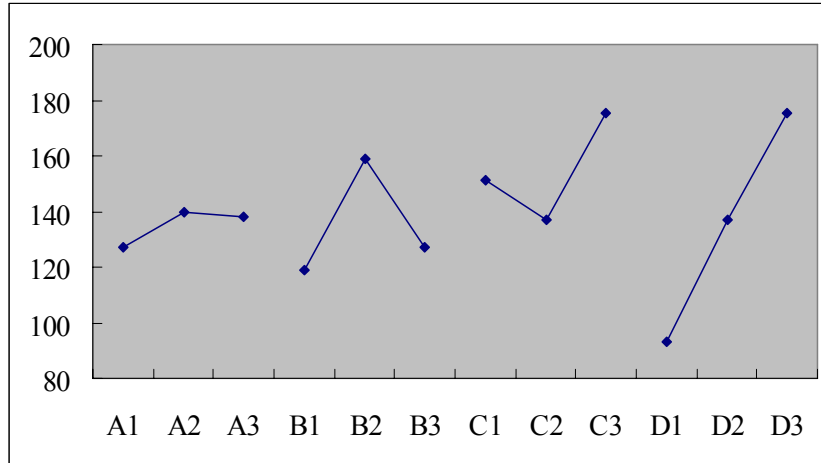


圖3：針對產氫速率之實驗平均值

從表 8 及圖 4 的實驗結果來看，可以得到第 3 組最好的實驗條件為超音波強度強度 2、超音波探頭 1MHz、照射時間是照 15 分鐘停 30 分鐘及澱粉濃度為 30g/l。

表 8：不同水準下產氫速率的 S/N 比

速率的 S/N 比	超音波的強度	超音波的頻率	照射時間	澱粉的濃度
水準 1	41.78	41.32	42.98	39.04
水準 2	42.88	43.75	40.62	42.72
水準 3	41.83	41.42	42.9	44.73
影響力	1.1	2.43	2.36	5.69
排名	4	2	3	1

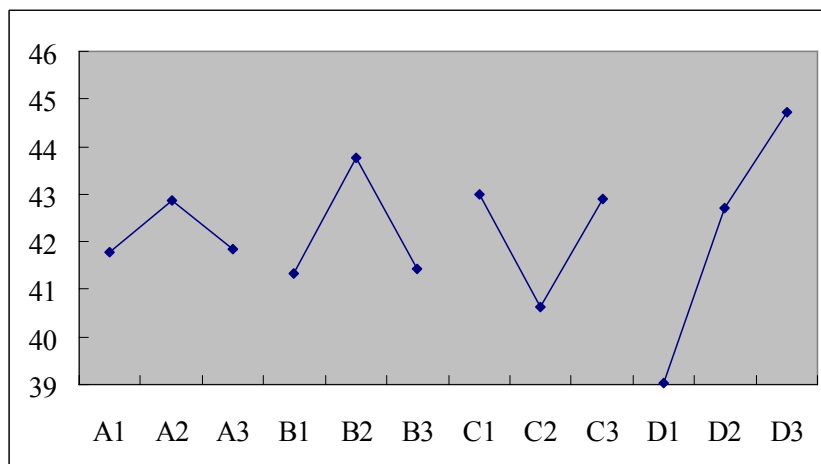


圖 4：針對產氫速率的實驗 S/N 比顯示反應圖

五、結論

如果針對實驗產氫效率來探討，可以得到三種組合條件分別為：田口法組、平均組及 S/N 比組，分別得到做好的結果如下：

- a. 田口法組：超音波強度 2、照射 15 分鐘/停 30 分鐘、超音波探頭 1MHz 及澱粉濃度是 30g/l。
- b. 平均值組：超音波強度 2、照射 15 分鐘/停 30 分鐘、超音波探頭 1MHz 及澱粉濃度是 30g/l。
- c. S/N 比組：超音波強度 2、照射 15 分鐘/停 30 分鐘、超音波探頭 1MHz 及澱粉濃度是 30g/l。

如果針對實驗產氫速率來探討，可得到三種組合條件分別為：田口法組、平均組及 S/N 比組，分別得到做好的結果如下：

- a. 田口法組：超音波強度 3、照射 15 分鐘/停 30 分鐘、超音波探頭 1MHz 及澱粉濃度是 30g/l。
- b. 平均值組：超音波強度 2、超音波探頭 1MHz、照射時間是全照及澱粉濃度是 30g/l。
- c. S/N 比組：超音波強度強度 2、超音波探頭 1MHz、照射時間是照 15 分鐘停 30 分鐘及澱粉濃度為 30g/l。

六、參考文獻

1. 宗逸詩「以固定化細胞進行連續產氫醱酵之研究」國立成功大學化學工程學系(所)，行政院國家科學委員會補助-大專學生參與專題研究計畫研究成果報告，2003。
2. <http://www.libertytimes.com.tw/2007/new/dec/20/today-int7.htm>
3. <http://n.yam.com/cna/china/200906/20090601779979.html>
4. 劉錦坤，超音波檢測技術應用於木構件劣化之評估，碩士論文，國立屏東科技大學，台灣，2005。
5. 張永承，超音波於聲場照射下對酵母菌之生物效應，碩士論文，國立中山大學機械與電工程學系，台灣，2009。
6. 林祺能，固定化細胞產氫，碩士論文，逢甲大學-化學工程學系，台灣，2002。
7. 賴奇厚，營養鹽對厭氧產氫之影響，博士論文，逢甲大學-土木及水利工程研究所，台灣2002。
8. 李輝煌「田口方法品質設計的原理與實務」國立成功大學工程科學 -2000年，高立圖書股份有限公司，台北。
9. 王金雄「以厭氧污泥進行生質產氫醱酵的策略」逢甲大學-化學工程學系，博士論文，2006。
10. 黃再得「銑削模具鋼之刀具磨耗及表面粗糙度預測模式之探討」碩士論文，民國92年1月10日。