

## 以紅藻龍鬚菜(*Gracilaria*)為甲烷氣來源之評估研究

### Evaluation of biomethanation from red algae (*Gracilaria*) bioconversion

黃啓裕

東海大學環境科學與工程學系 助理教授  
cyhuang@thu.edu.tw

王曉怡

東海大學環境科學與工程學系 碩士研究生  
G942721@thu.edu.tw

邱銘峻

東海大學環境科學與工程學系 大學專題生  
S932759@thu.edu.tw

#### 摘要

現行人類所使用的石化燃料會對於空氣、水和土壤造成污染，這些負面的影響加速新式乾淨能源技術的開發，由生物質轉化來之生質能即為其中一種再生能源。龍鬚菜(*Gracilaria*)為國內九孔養殖業之餌料，年產量高達3萬噸，若經適當養殖增加產量，將可讓我國從周圍海域取得大量生質材料生產自主生質能源，同時達到CO<sub>2</sub>減量及生質能源產出雙重效益。本研究從台中高美溼地底泥馴養出一批混合菌，可在厭氧環境下分解龍鬚菜並產生甲烷。以4g/L之龍鬚菜和無添加氯化鈉之情況下擁有最佳甲烷產量，甲烷濃度高達1164.93mmole，產率為425.16mmole CH<sub>4</sub>/g algae/L，如能善加利用，將可成爲未來生質能源發展之方向。

關鍵字: 生質能、生物製沼、巨藻、龍鬚菜

Keywords: biomass energy, biomethanation, macroalgae, *Gracilaria*

## 一、簡介

人類長久以來依賴石化燃料作為能源的來源，科技的進步為人類帶來便利之產品，但相對於石化燃料之需求也日與劇增。燃燒石化燃料時同時會釋放許多溫室氣體，當人類過度使用石化燃料，能源枯竭之問題對人類生活帶來相對之衝擊，且嚴重破壞自然環境，造成無法彌補之傷害。在過去的半個世紀，這些環境問題日益嚴重，尤其是因二氧化碳排放所造成之暖化現象，使得全球的氣候出現異常情況，造成近年來各國天災不斷。因此如何解決全球暖化的問題已成各國刻不容緩的議題。(7)

在此能源價格高漲且能源需求大增的時代，預期全球能源需求將持續成長，各國之能源政策開始極力尋找可取代石化燃料之替代能源。目前在永續經營的概念下，生質能已漸成為當前最重要之再生能源。生質能是指含有機物的生物質，經直接或間接轉換成能源使用。目前世界各國的研究均集中在轉化陸生植物之纖維素生成可醱酵糖再經醱酵成為乙醇之液態燃料為主(6)。陸生植物目前為生產生質能源的主要材料，水中能源作物藻類，如巨藻、褐藻、綠藻、紅藻、微藻與馬尾藻等，生產燃料油的前景也非常廣闊。目前，人們主要將海藻作為食品，佔海藻用途的百分之八十以上；約百分之十的海藻被做成膠質產品。2003 年全球海藻之產量約為 800 萬噸，年產值為 60 億美金；其中百分之九十的產量分布於日本、大陸、韓國與菲律賓等亞洲地區(5)。海藻細胞均具有葉綠素 a，行光合作用生長，為水環境中主要之生產者，如以海藻為生質能源之醱酵原料，不僅其生長過程中可將空氣中之  $\text{CO}_2$  固定轉化為生物質，還可獲得如酒精或甲烷等之生質燃料，可同時達到  $\text{CO}_2$  減量及生質能源產出雙重功能。

台灣位於太平洋西岸，是一個四面環海、天然資源貧乏的國家，加上可耕地有限，如以海藻為多醣材料來源生產生質能，不僅供應豐富，而且生產成本極為低廉。海藻於厭氧環境下，初期由能降解藻體的菌種分解海藻，將藻體中聚合醣類分解成較簡單的醣，之後由水解和醱酵菌將醣

代謝成羧酸和醇，此時乙酸生成菌便將醇和酸轉變成醋酸、氫和二氧化碳，之後甲烷菌便利用以上所代謝之物質生成甲烷(圖 1)。

龍鬚菜(*Gracilaria*)屬於紅藻中的一種，主要分布於本省中南部沿岸，是九孔養殖之主要飼料。龍鬚菜的植物體一般形狀呈圓柱狀，叉狀或側面分生。龍鬚菜和其他天然紅藻類，由於野生供應不足，所以漁民便利用人工繁殖法來生產，提供加工業及食品業的市場需求。龍鬚菜中多醣類主要的化學組成為洋菜，而洋菜主要成分為聚半乳糖(*polygalactan*)，而聚半乳糖是由約70%的洋菜糖(*agarose*)及30%的洋菜硫酸糖(*agaropectin*)組合而成。其中洋菜糖(*agarose*)為其主要的凝結成分，其組成為一連串重複的1,4鍵結的3,6-脫水左旋半乳糖(4-O-linked 3,6-anhydro- $\beta$ -L-galactopyranose)與1,3鍵結的右旋半乳糖(3-O-linked  $\alpha$ -D-galactopyranose)。

本研究擬利用海水中的微生物，以龍鬚菜作為基質，在厭氧環境中分解，並進行酒精及甲烷的檢測。經由還原醣和蛋白質濃度的分析，評估由龍鬚菜水解獲得之可醱酵糖原料轉化為乙醇或甲烷等生質能之可行性。

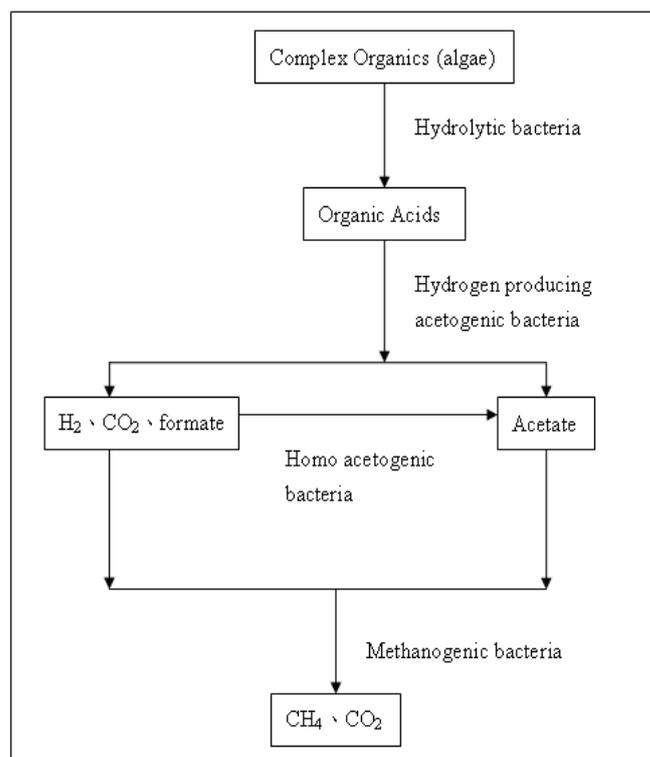


圖 1:有機物厭氧環境下分解生成甲烷過程(10)

## 二、材料與方法

### 2.1 藻類與混合菌種來源

龍鬚菜採自中部某九孔養殖場。以 65°C 烘乾後以剪刀剪成碎片以利添加。本研究使用之混合菌種來自台中高美濕地之底泥，採樣時以中空塑膠管垂直插入底泥，拔出塑膠管後將管內底泥推出，取表土層約 10 公分之黑色底泥作為菌種來源。在實驗室厭氧條件中，以龍鬚菜作為唯一碳源，添加 5g 之底泥樣本，培養在 35°C 下，馴養出厭氧龍鬚菜分解菌群。後續培養方式是使用 140ml 厭氧瓶，加入 100ml 的厭氧培養基和 10ml 的菌液。

### 2.2 厭氧培養基成分及培養方式

厭氧培養基以Hungate氏方法在厭氧操作下進行配製並於分裝後以滅菌釜進行滅菌程序(12)。厭氧培養基之成分如下(/L): 龍鬚菜, 1g (carbon source)、Trace element solution, 10.0 ml、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.40 g、Resazurin, 0.0005 g、CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.05 g、MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.10 g、(NH<sub>4</sub>)Cl, 1.00 g、L-Cysteine, 0.50 g、NaHCO<sub>3</sub>, 3.90 g、Na<sub>2</sub>S · 9H<sub>2</sub>O, 0.25 g、Peptone, 1.0 g/L、NaCl, 2.0g/L。Trace element solution 成分為每公升去離子水中含有conc. HCl, 1.0mL、NiCl<sub>2</sub>, 0.05 g、EDTA, 0.50 g、H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.05 g、FeCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 2.00 g、CuCl<sub>2</sub>, 0.03 g、ZnCl<sub>2</sub>, 0.05 g、(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0.05 g、MnCl<sub>2</sub>, 0.05 g、CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.05 g、AlCl<sub>3</sub>, 0.05 g、Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0.10g。龍鬚菜基質採分開滅菌方式不加入液態培養基中一起滅菌，避免海藻因熱分解。當液態培養基和基質滅好菌後，將其置入厭氧操作台(Anaerobic glove box)內，把龍鬚菜放入液態培養基後以n-butyl rubber封口。除非文章另提，菌液均在黑暗之35°C恆溫箱中培養。培養過程中定期分析瓶頂空間之甲烷濃度。

### 2.3 影響海藻轉化甲烷生成速率因子

高美溼地位於河川與海洋交界處，屬於低鹽濃度之環境，因此在找尋最佳生長條件時優先考

慮NaCl濃度，分別以0、1、2、3、3.5、4、5及6%NaCl探討鹽濃度對微生物生長及產甲烷速率之影響。在生長輔因子(Growth factor)對生長影響探討，則以1g/L yeast extract、1g/L peptone、1g/L yeast extract+1g/L peptone及兩者都不添加之培養方式探討之。

確定龍鬚菜可被轉化為甲烷後，不同濃度之龍鬚菜(0、0.5、1、2、3、4及5g/L)分別加入培養基中以探討不同基質濃度對微生物生長及甲烷生成速率之影響。

### 2.4 分析方法

#### 2.4.1 微生物生長測定

目前常用來量測菌株生長的方式有很多種，包括利用顯微鏡直接計數菌量的血球計數法、量秤菌體乾重的秤重法、測量菌株蛋白質的間接方法及測量菌液濁度的方式。本研究使用之碳源雖為固體物質(海藻)，但在培養過程中海藻碎片經略微靜置後會沉澱至管底，再取樣時並不會取到海藻碎屑，故選用分光光度計(SPECTRONIC 20D+ Thermo Scientific, USA)測量菌液濁度以決定菌群之生長。本研究以波長600 nm監測培養菌液之吸光度。

#### 2.4.2 還原糖測定

因海藻體主要成份為多糖類，經微生物酵素水解後產生可醱酵糖，可經測定還原糖濃度來代表海藻轉化酒精或甲烷之潛能。還原糖濃度測定參照Miller式方法(13)。其反應原理為含有醛基(CHO)的還原糖類(如葡萄糖)具有還原力，能將黃色之3,5-二硝基-水楊酸(3,5-dinitrosalicylic acid)還原成紅棕色之3-氨基-5-硝基-水楊酸(3-amino-5-nitrosalicylic acid)。海藻水解所產生的半乳糖含有醛基，故含有還原力，可與3,5-二硝基-水楊酸產生還原反應，產生之顏色變化可利用分光光度計在波長540nm下偵測。檢量線以半乳糖為標準品製備。

### 2.4.3 總糖分析

培養液中總糖濃度是參照Dubois式等以酚-硫酸試劑測定(11)。先將1mL培養液樣本取出以13000 rpm離心10分鐘去除固體，取上澄液適當稀釋，取1 mL樣品或稀釋液置於試管中，加入0.5 mL 5%酚及2.5 mL 96%濃硫酸，以1 mL蒸餾水加入0.5 mL 5%酚及2.5 mL濃硫酸為空白校正。待反應冷卻，以分光光度計波長488 nm偵測其吸光值。以葡萄糖為標準品製作的檢量線。

### 2.4.4 甲烷濃度

瓶頂空間中之甲烷濃度以 GC-FID 量測，使用 DB-WAX 毛細管柱(30m×0.319mm×0.5 μm)，以高純度氫氣為載流氣體，oven temperature 設為 40°C，injector temperature 為 200°C，detector temperature 為 250°C。利用氣密式注射針取 0.2mL 的瓶頂氣體 (headspace gas)，注入氣相層析儀，將測得的甲烷積分面積以 Sowers 式之公式計算 (14)。

## 三、結果與討論

### 3.1 龍鬚菜分解甲烷生成菌群增富(Enrichment)

本批次實驗是以高美底泥中之混菌作為植種，將底泥中可分解龍鬚菜生成甲烷之菌群作一增富，並探討混菌所產的甲烷量以及降解海藻之情況，以此判斷是否有其利用價值。以龍鬚菜1g/L作為基質與液態培養基一起進行滅菌，控制溫度在35±1°C，添加1g/L peptone，檢測甲烷量、總醣和還原糖。經過7天之培養後，肉眼可清楚發現加入之龍鬚菜固體均被消化完全，瓶頂空間中累積甲烷莫耳數可達到881.4mmoles(圖2a)，培養液中總糖濃度較未植菌空白組低(圖2b)，顯示龍鬚菜降解後釋出之糖類可被微生物所吸收利用。還原糖濃度呈現先上升後下降之趨勢(圖2c)，推測應為龍鬚菜降解過程中，初期產生較多大分子醣類，隨著時間增加，大分子醣類續被水解產生許多小分子、具還原端之醣類，此些小分子醣類易被微生物所吸收利用，因此還原糖濃度呈現一先上升後下降之趨勢。因此確定降解龍鬚菜產生甲烷之菌群由底泥中增富成功。

### 3.2 NaCl濃度控制

本批次實驗是以高美底泥中之混菌作為測試，控制鹽的濃度找出最佳生長條件。以龍鬚菜1g/L作為基質與液態培養基分開進行滅菌，控制溫度在35±1°C，添加1g/L peptone，NaCl則分別以0%、1%、2%、3%、3.5%、4%、5%、6%八種濃度進行調整，並檢測甲烷濃度、微生物生長(OD<sub>600</sub>)、還原醣、海藻剩餘乾重。結果顯示在0%的鹽濃度時，混合菌群有最高甲烷生成量(580mmole)(圖3a)。在微生物生長方面，在0%的鹽濃度下能在不到一天的情況下快速生長，上升的速度較其他鹽濃度來的快而且相當明顯(圖3b)。還原醣濃度在第一天可達最大值，表示混菌能降解由多醣結構之組成的海藻促使菌液中還原醣濃度因而升高，爾後由一連串之生物程序產生甲烷，還原醣即快速下降，能利用其醣類生長之菌種因可用的醣消耗，影響到它的生長代謝，使得降解海藻菌種所分解之還原醣得以累積，之後醣又被利用，週而復始就如同自然界中掠食者與被掠食者之個體數目類似(圖3c)。海藻降解速率在0%與1%的鹽濃度時相當接近大約都在0.11g/L/day(圖4)。甲烷生成速率於0%和3.5%時出現雙峰，可能於混菌中擁有嗜鹽與耐鹽之甲烷菌，在這兩種嚴濃度的情形下擁有最是生長條件。甲烷生產速率於0%鹽濃度時高達82mmole/day(圖5)。結果就是以0%的鹽濃度添加量擁有較大甲烷產率以此作為高美底泥混菌的最佳生長鹽濃度。

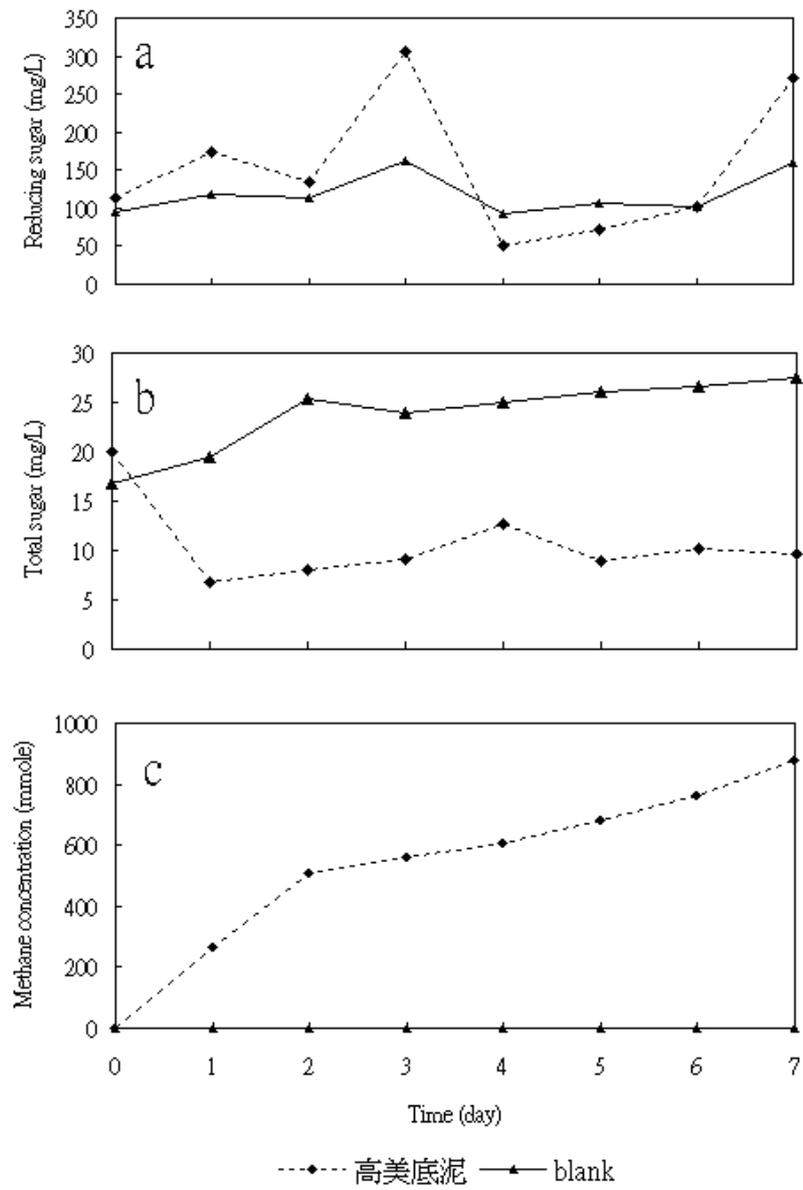


圖2:混合菌群分解龍鬚菜轉化生成甲烷過程中甲烷(a)、總糖(b)及還原糖變化(c)。

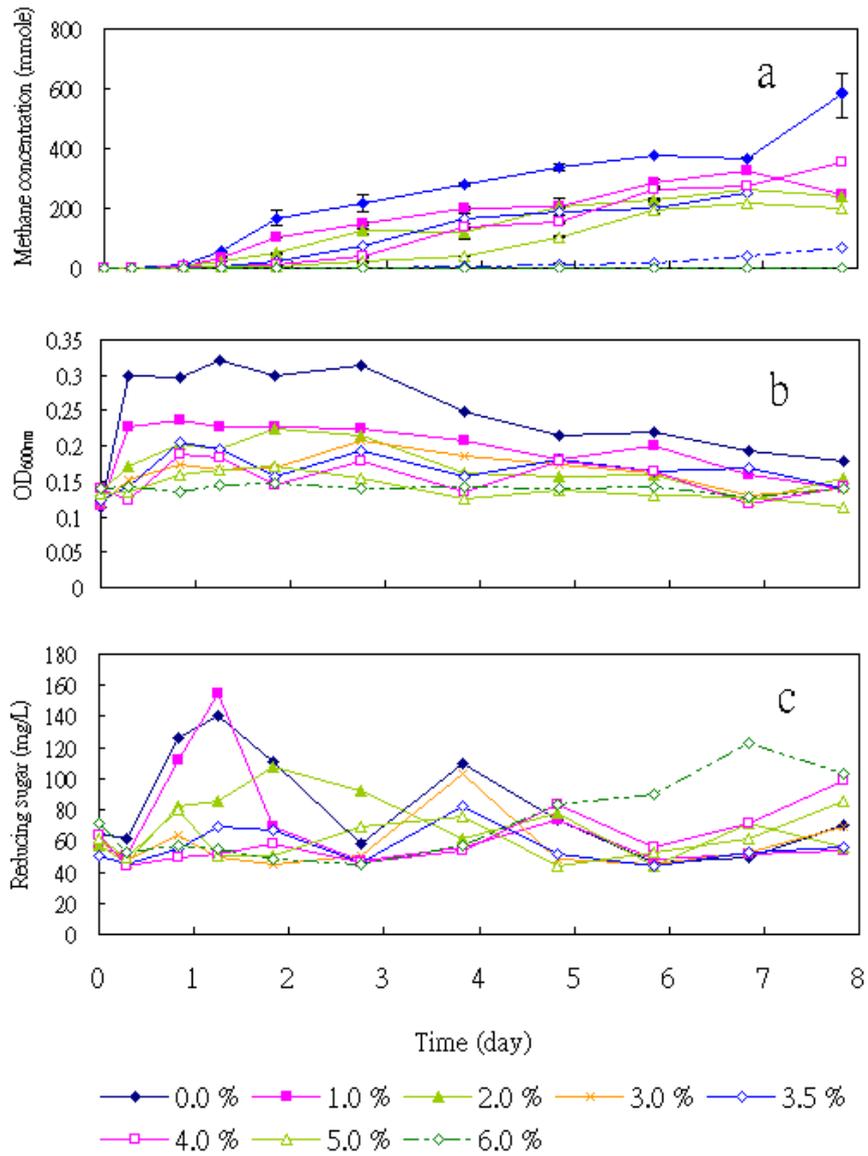


圖 3: 混合菌群在不同鹽濃度下分解龍鬚菜轉化生成甲烷過程中甲烷(a)、微生物生長(b)及還原糖變化(c)。

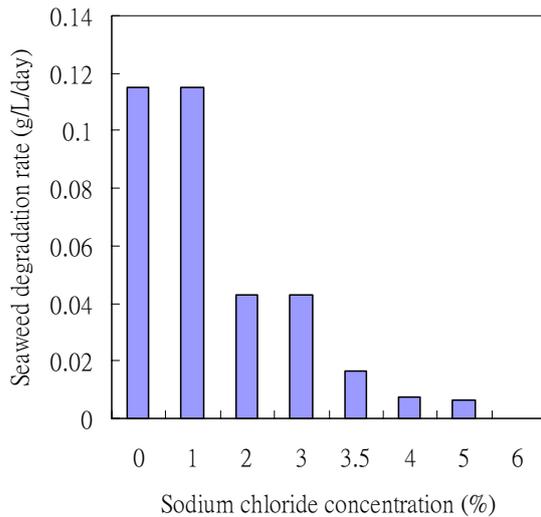


圖 4: 混合菌群在不同 NaCl 濃度下之海藻降解速率

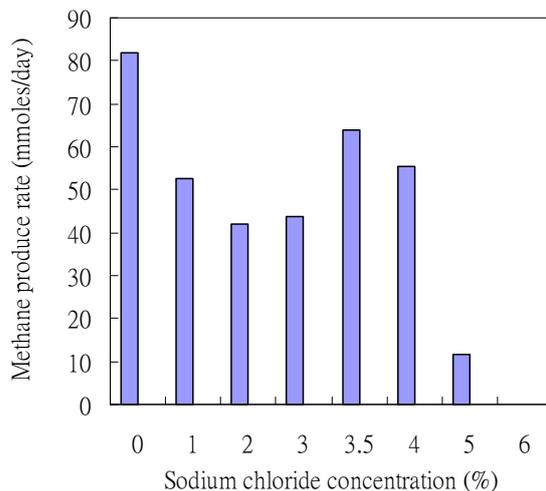


圖 5: 混合菌群在不同 NaCl 濃度下之甲烷生成速率

### 3.3 輔因子控制

本批次實驗是以高美底泥中之混菌作為測試，控制輔因子的添加來找出最佳甲烷產生濃度。以龍鬚菜1g/L作為基質與液態培養基一起進行滅菌，控制溫度在 $35\pm 1^\circ\text{C}$ ，並將輔因子分成四種控制: 1g/L peptone、1g/L yeast extract、1g/L peptone和1g/L yeast extract、都不添加。進行甲烷和還原醣檢測。結果在同時添加1g/L的peptone和yeast extract擁有最佳的甲烷產生量。當二種輔因子都不添加的情況下，混菌仍能生長並產生甲烷，但產生的量遠不及擁有添加輔因子的菌群

(圖6a)。當添加peptone或yeast extract時，還原糖於1天後便達到最大值，而兩者都不加的情況下需要2天的時間才能至最大值(圖6b)。

### 3.4 基質濃度

本批次實驗是以高美底泥中之混菌作為測試，控制基質的濃度找出最佳生長條件。以龍鬚菜 0、0.5、1、2、3、4、5g/L 作為基質與液態培養基分開進行滅菌，控制溫度在  $35\pm 1^\circ\text{C}$  以前批次最佳甲烷產量之條件添加 1g/L peptone 和 yeast extract 與 0%的鹽濃度，並檢測甲烷濃度、微生物生長( $\text{OD}_{600}$ )、還原醣、海藻剩餘乾重。實驗結果由數據得知在第六天後 4g/L 的基質可產生 1164.93mmole 的甲烷(圖 7a)，微生物生長在一天內便可爬升到最大值，之後便開始下降於 24 小時後漸漸趨於平緩(圖 7b)。還原糖則是龍鬚菜於降解後初期產生較多大分子醣類，隨著時間增加，大分子醣類續被水解產生許多小分子、具還原端之醣類，此些小分子醣類易被微生物所吸收利用，因此還原糖濃度呈現一先上升後下降之趨勢(圖 7c)。海藻降解速率可高達  $0.69 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ (圖 8)。雖然在基質濃度 5g/L 的情況下甲烷濃度能在最出即可快速爬升，但到第六天後便開始下降，而基質濃度 4g/L 可能第六天後還持續上升，如以甲烷生成速率來看，當基質濃度於 4g/L 和 5g/L 時，差異並不是非常明顯(圖 9)。如以海藻降解速率來看，基質濃度於 4g/L 之降解速率比其他基質濃度還要來的快。

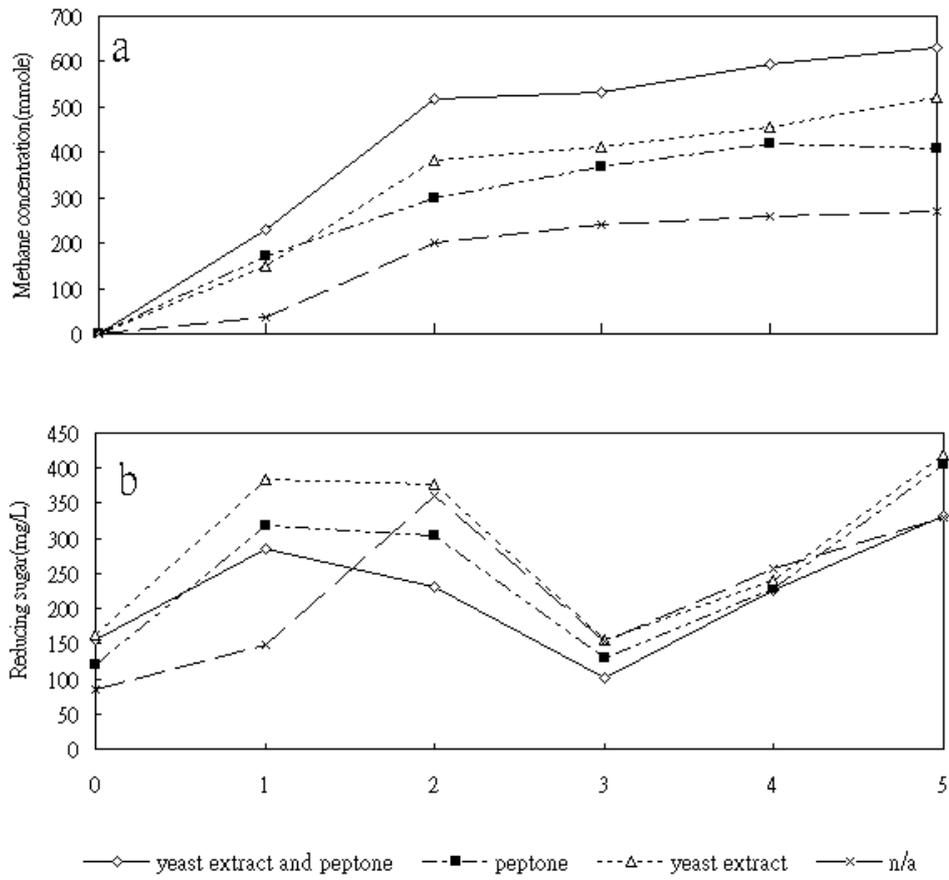


圖 6: 輔因子對混合菌群分解龍鬚菜轉化生成甲烷過程中甲烷(a)及還原糖濃度(b)變化。

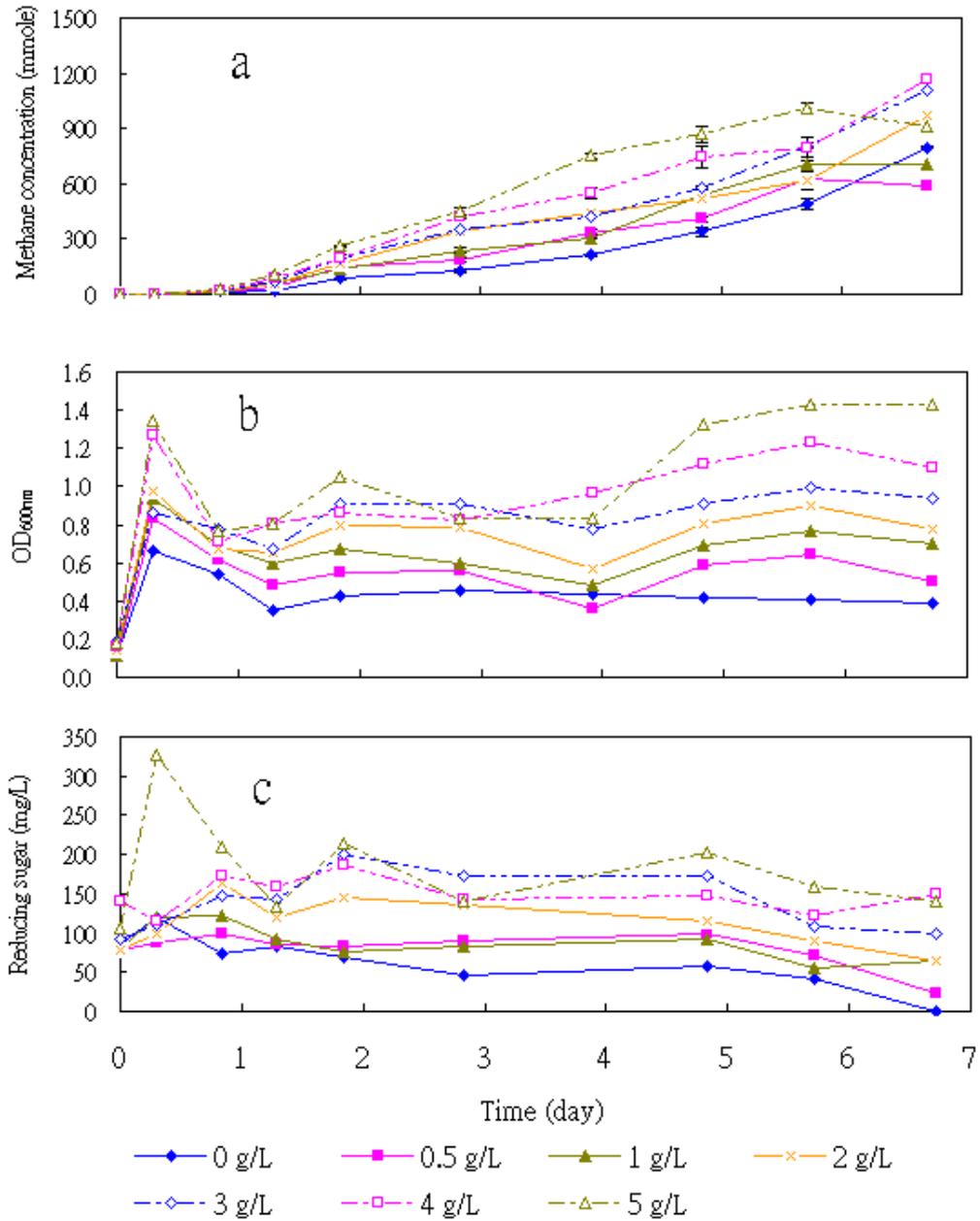


圖 7: 混合菌群在不同基質濃度下分解龍鬚茶轉化生成甲烷過程中甲烷(a)、微生物生長(b)及還原糖變化(c)。

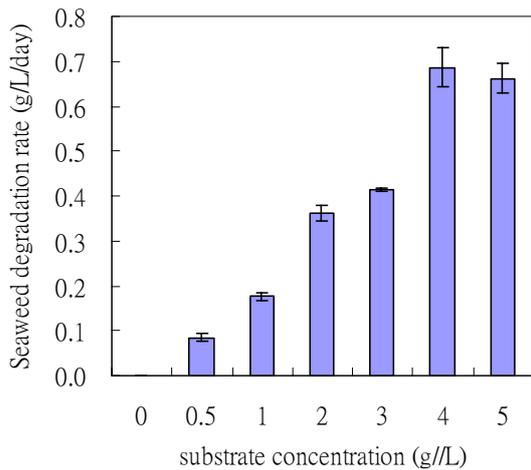


圖 8: 混合菌群在不同基質濃度下之海藻降解速率。

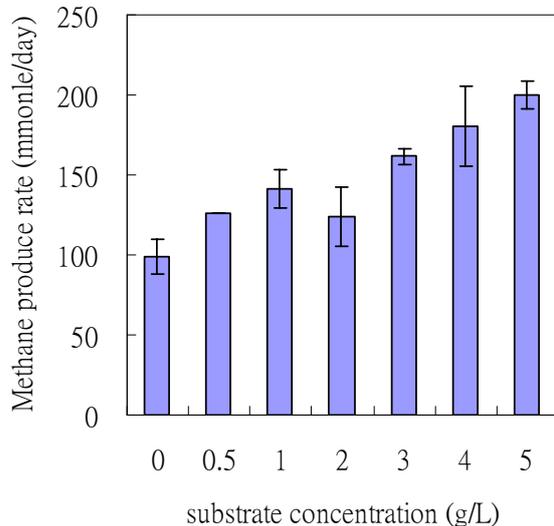


圖 9: 混合菌群在不同基質濃度下甲烷生成速率。

#### 四、結論

本研究是從台中高美濕地中所採集之厭氧混菌，經過批次培養並找出產甲烷的最佳條件。本實驗所採集之高美底泥位於河川出海口，由批次實驗中得知在不添加氯化鈉的情況下可得最佳甲烷和生長量，但在添加氯化鈉後仍能生長，所以其採集之混菌樣本即有可能是有耐鹽菌與嗜鹽菌群。在輔因子方面，如果只添加 yeast extract 或 peptone 之下，在添加 yeast extract 能有

比較高的甲烷產率，而在兩者都添加的情況下，似乎具有加乘的效果。基質濃度對於甲烷產率也具有相當之影響力。經由以上實驗數據之分析可能產率為 425.16mmole CH<sub>4</sub>/dry algae g/L。故由本實驗得知，底泥菌種在厭氧條件下具有分解龍鬚菜產甲烷氣體之能力，能作為未來生質能源的方向。

#### 參考文獻

- 1.工業技術研究院  
2005 生物能源技術應用研究計畫，九十三年度執行報告，經濟部能源局
- 2.王創正  
2006 廢棄有機污泥以連續批次厭氧消化產氫及甲烷研究。長榮大學職業安全與衛生學系碩士論文
- 3.台灣核研所  
2005 Energy Research Center of the Netherlands.
- 4.行政院  
2002 再生能源發展條例草案
- 5.陳俊延、林俊雄、林慧如、劉沅松、楊景雍、張嘉修  
2007 以批次反應器探討 *Flammeovirga yaeyamensis* 對洋菜膠降解效能的影響，中華民國環境工程學會2007廢水處理技術研討會，高雄大學
- 6.紹信  
1997 厭氧處理研發新方向—產氫技術，1997年廢水處理技術研討會
- 7.黃啓裕  
2008 纖維素產氫技術再生質能源之發展，農業生技產業季刊，第十三期，pp54~60
- 8.鄭幸雄、陳錫添、林秋裕、曾怡禎、李季眉、林信一、林明瑞、劉文佐  
2001 台灣生物產氫研究現況及未來發展，國科會生物產氫研究成果發表會，成功大學，pp.1-1~1-9
- 9.Alberto Vergara-Fernández,, Gisela Vargas, Nelson Alarco'n, Antonio Velasco

2007 Evaluation of marine algae as a source of biogas in a two-stage anaerobic reactor system. *Biomass and bioenergy*

10. Bradford, M. M.

1976 A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 98(1), pp289-297.

11. Dubois, M. K., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith F.

1956 Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), pp350-356.

12. Hungate, R. E.

1969 A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In *Methods in Microbiology*, vol. 3B, pp.117. Edited by J. R. Norris and D. W. Ribbons. New York.

13. Miller, G. L.

1959 Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31, pp.426-428

14. Sowers, K. R.

1995 Techniques for monitoring methanogen cell growth , In: *Archaea :A laboratory manual* , editor: K. R. Sowers and H. J. Schreier, CSHL press , New York, USA

# Evaluation of biomethanation from red algae (*Gracilaria*) bioconversion

Chi-Yu Huang

Assistant professor, Department of Environmental Science and Engineering, Tunghai University  
cyhuang@thu.edu.tw

Siao-Yi Wang

Master student, Department of Environmental Science and Engineering, Tunghai University  
g942721@thu.edu.tw

Ming-Jiun Chiou

Undergraduate student, Department of Environmental Science and Engineering, Tunghai University  
S932759@thu.edu.tw

## Abstract

The utilization of fossil fuel has been generating environmental pollution of air, water and soil for decades. These negative effects have increased interest in the development of new technologies to obtain clean and renewable energy. Biomass energy obtained through conversion of biomass is one of the renewable energy sources and has gained great interest worldwide in recent years. The red algae *Gracilaria* harvesting three million tons each year is the main fodder for *Holiotis* cultivation in Taiwan. If after appropriate farming to increase production, *Gracilaria* can be a great deal of self-production resource of biomass energy from neighboring ocean around Taiwan, while achieving CO<sub>2</sub> reduction. The technical feasibility of *Gracilaria* utilization as a source of renewable biomass energy was studied in this study. The anaerobic digestion of *Gracilaria* was evaluated in a batch culture whose inoculum came from the estuarine sediment in Goumei wetland. The results showed that the solid red algae could be completely digested and converted to methane by the acclimated mixed microbial culture. The maximum methane production rate (425.16mmole CH<sub>4</sub>/g algae/L), with the highest methane amount of 1163.93mmole was observed with 4 g/L of substrate concentration and in the absence of NaCl. In conclusion red algae *Gracilaria* has the potential for producing methane gas in the anaerobic digestion system.

Keywords: biomass energy, biomethanation, macroalgae, *Gracilaria*