

東海大學環境科學與工程研究所

碩士論文

厭氧生物降解龍鬚菜產甲烷程序最佳化之探討

Optimization of methane production from anaerobic
biodegradation of *Gracilaria*

指導老師：黃啟裕 博士

研究生：王曉怡

中華民國 九十七年七月

符號表

符號	英文說明	中文說明	單位
μ	Specific growth rate	比生長速率	day^{-1}
μ_{\max}	Maximum specific growth rate	最大比生長速率	day^{-1}
S	Substrate concentration	基質濃度	g/L
K_S	Half-saturation constant	半飽合速率常數	g/L

摘要

本研究係以中台灣高美濕地之沉積底泥中，培養出降解海藻產甲烷之中溫厭氧混合菌群。此厭氧菌群以龍鬚菜之海藻多糖為主要碳源，以批次方式培養在不同溫度、鹽度、pH值、生長輔因子(yeast extract, peptone)、碳源、不同海藻多醣來源之條件下生長。根據結果顯示此厭氧生物降解海藻產甲烷之最佳溫度、鹽度與pH值分別為 35°C、0 % 與pH 7.1，而最佳碳源(龍鬚菜)添加濃度為 4 g/L；此外生長輔因子(yeast extract, peptone)皆有促進之結果，而以yeast extract有較佳的刺激生長作用；再由最佳條件下進行不同藻類之降解產甲烷研究，此厭氧菌群無法顯著地將馬尾藻之藻體降解，但可利用其溶出之海藻多醣，而龍鬚菜則可被降解至破碎薄片狀；以最適反應條件培養時，有最高之海藻降解速率為 $0.84 \pm 0.08 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ ，且可生成最高 $1431.20 \pm 99.65 \text{ mmole}$ 之甲烷生成，其甲烷生成速率為 $210.02 \pm 24.15 \text{ mmole} \cdot \text{day}^{-1}$ ，反應液之主要中間產物為醋酸，最高可生成 $29.96 \pm 1.04 \text{ mmole}$ 醋酸，產率為 $16.11 \pm 0.14 \text{ mmole} \cdot \text{g seaweed}^{-1}$ 。

關鍵字：生質能、龍鬚菜、海藻、甲烷

Abstract

Mesophilic anaerobic biodegradation of seaweed by mixed microorganisms from Kaomei wetland sediment at Central Taiwan was investigated in this study. *Gracilaria* was used as the sole carbon source for methane production by the mixed culture. Batches of the mixed culture were grown at different conditions such as different temperatures, sodium chlorides, pH's, growth factors, carbon sources and various sources of algal polysaccharides from seaweed to determine the optimal conditions for methane production from seaweed bioconversion. The optimal temperature, sodium chloride concentration and pH value for bioconversion of seaweed to methane was 35°C, 0 % and pH 7.1, respectively. The optimal substrate concentration for methane production was 4 g/L of *Gracilaria*. Both growth factors yeast extract and peptone could stimulate bacterial growth with yeast extract giving the better effect. *Sargassum* could not be degraded by the mixed culture at the optimal conditions,. The highest seaweed degradation rate, methane yield and methane production rate by the mixed culture were $0.84 \pm 0.08 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$, $1431.20 \pm 99.65 \text{ mmole}$ and $210.02 \pm 24.15 \text{ mmole} \cdot \text{day}^{-1}$ respectively. Acetic was found to be the major product in the liquid phase during *Gracilaria* biodegradation. The highest acetate yield is $16.11 \pm 0.14 \text{ mmole} \cdot \text{g seaweed}^{-1}$.

Keywords: biomass energy, *Gracilaria*, seaweed, methane

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 再生能源.....	4
2.1.1 能源現況.....	4
2.1.2 生質能(Biomass energy).....	5
2.1.3 生質能與碳循環.....	6
2.1.4 生質能源產生方式.....	6
2.2 海藻(Seaweed).....	7
2.2.1 海藻之利用.....	9
2.2.2 臺灣海藻資源.....	10
2.2.3 海藻組成.....	12
2.3 海藻多醣來源.....	14
2.3.1 紅藻(Rhodophyceae).....	14
2.3.2 綠藻(Chlorophyceae).....	15
2.3.3 褐藻(Phaeophyceae).....	16
2.4 海藻多醣結構.....	17

2.4.1	洋菜(Agar)	17
2.4.2	褐藻膠(Alginate)	19
2.4.3	鹿角菜膠(Carrageenan)	21
2.5	分解海藻多醣之agarase	23
2.5.1	來源	23
2.5.2	分類與分解方式	23
2.6	海藻厭氧生物轉化(Anaerobic bioconversion of seaweed)	25
2.7	生物甲烷(Biogas)燃料與應用	28
2.8	厭氧醱酵化學	30
2.9	厭氧生物處理之影響因子	30
2.9.1	溫度	31
2.9.2	pH值	32
2.9.3	鹽度	32
2.9.3	輔因子	32
2.9.4	碳源種類	33
第三章	實驗材料與方法	34
3.1	實驗流程設計	34
3.2	菌種來源採樣	34
3.3	菌種培養	38

3.3.1	Hungate 除氧系統.....	38
3.3.2	厭氧操作台.....	40
3.3.3	厭氧培養基.....	40
3.3.4	菌群培養.....	42
3.4	分析方法與儀器.....	42
3.4.1	菌群生長分析.....	43
3.4.2	甲烷生成量分析.....	43
3.4.3	海藻重量分析.....	45
3.4.4	總糖分析.....	45
3.4.5	還原糖分析.....	46
3.4.6	液相成分分析.....	47
3.4.7	產氣量分析.....	47
3.5	甲烷生成反應最適化探討.....	48
3.5.1	生長溫度.....	48
3.5.2	生長鹽濃度.....	49
3.5.3	生長pH值.....	49
3.5.4	生長輔因子.....	50
3.5.5	不同海藻濃度.....	51
3.5.6	不同藻類利用.....	51

第四章	實驗結果與討論	52
4.1	龍鬚菜降解混合菌群增富(Enrichment).....	52
4.1.1	海藻降解測試.....	53
4.1.2	甲烷生成測試.....	56
4.2	龍鬚菜降解甲烷化最適條件探討	59
4.2.1	溫度.....	60
4.2.2	鹽濃度.....	69
4.2.3	pH值	77
4.2.4	生長輔因子添加(Growth factor)	85
4.3	藻類濃度對甲烷生成之影響探討	93
4.4	不同藻類之利用探討	101
4.5	最適降解龍鬚菜甲烷化條件下之液相產物探討	108
第五章	結論與建議	114
5.1	結論.....	114
5.2	建議.....	116
第六章	參考文獻	117
附錄	125	

表目錄

Table 2.1	Industrial application of various algae.....	11
Table 2.2	Approximate chemical composition of seaweeds.....	13
Table 2.3	List of agarase-producing microorganisms and their biochemical properties of agarases	24
Table 2.4	The oligosaccharides derived from various substrates by the degradation of microbial agarases.....	26
Table 2.5	Reaction and standard changes in free energies for methanogenesis	29
Table 4.1	Methane yield rate with different sources of microorganism	113

圖目錄

Figure 2.1	Main conversion options for biomass to secondary energy carriers.....	8
Figure 2.2	Structural unit of agar.....	18
Figure 2.3	Structural unit of alginate.....	20
Figure 2.4	Structural unit of carrageenan.....	22
Figure 2.5	Production of methane from biodegradation of complex organic(algae) under anaerobic condition.....	27
Figure 3.1	Flow chart of the experimental design in this study.....	35
Figure 3.2	Aerial photopictures of Kaomei wetland area at Taichung county.....	36
Figure 3.3	Photopicture of Kaomei wetland sampling site at Taichung county.....	37
Figure 3.4	Configuration of Hungate gas station.....	39
Figure 4.1	Degradation of seaweed by enriched anaerobic mixed bacterial culture after 8 days.....	52
Figure 4.2	Biodegradation of seaweed <i>Gracilaria</i> in medium by anaerobic mixed microorganisms.....	54
Figure 4.3	Dry weight lose of seaweed during anaerobic biodegradation of <i>Gracilaria</i>	55
Figure 4.4	Gas Chromatogram of standard methane gas and headspace gas of cultural vessel from biodegradation of <i>Gracilaria</i> by mixed culture.....	57

Figure 4.5	Methane production from fermentation of seaweed <i>Gracilaria</i>	58
Figure 4.6	<i>Gracilaria</i> biodegradation and its degradation rate by the mix culture at different temperatures	65
Figure 4.7	Growth and Specific growth rate of the mix cultures at different temperatures	66
Figure 4.8	Methane production, methane production rate and methane transform yield from <i>Gracilaria</i> -degradation by mix cultures at different temperatures.....	67
Figure 4.9	Total sugar production and reducing sugar production from biodegradation of <i>Gracilaria</i> by mix cultures at different temperatures	68
Figure 4.10	<i>Gracilaria</i> degradation and seaweed degradation rate of mix culture with different sodium chloride concentration	74
Figure 4.11	Growth and specific growth rate of mix cultures with different sodium chloride concentration	75
Figure 4.12	Methane production, methane produce rate and methane transform yield from <i>Gracilaria</i> by mix cultures with different sodium chloride concentration	76
Figure 4.13	pH changes at initial stage and end of cultivation of mixed culture with different initial pH's	81
Figure 4.14	<i>Gracilaria</i> degradation and seaweed degradation rate of mix culture at different pH values	82

Figure 4.15 Growth and specific growth rate of mix culture at different pH values.....	83
Figure 4.16 Methane production, methane production rate and methane transform yield from <i>Gracilaria</i> by mix culture at different pH values.....	84
Figure 4.17 <i>Gracilaria</i> degradation by the mix cultures with or without addition of growth factors.....	89
Figure 4.18 Growth of the mix culture with or without addition of growth factor.....	90
Figure 4.19 Methane production, methane production rate and methane transform yield from <i>Gracilaria</i> by the mix culture with or without addition of growth factor.....	91
Figure 4.20 Total sugar production from <i>Gracilaria</i> by the mix culture with or without addition of growth factor.....	92
Figure 4.21 <i>Gracilaria</i> degradation by the mix culture with different concentrations of seaweed.....	96
Figure 4.22 Microbial growth of the mixed culture with different seaweed concentrations.....	97
Figure 4.23 Methane production, methane production rate and methane transform yield from <i>Gracilaria</i> by the mixed culture at different concentrations of seaweed.....	98
Figure 4.24 Reciprocal relationship of seaweed concentration and specific growth rate.....	100

Figure 4.25 Biodegradation of different seaweed by the mixed culture	104
Figure 4.26 Microbial growth of the mixed culture with different seaweed	105
Figure 4.27 Methane production and methane production rate from seaweed by the mix culture at different seaweed.....	106
Figure 4.28 Production of reducing sugar from biodegradation of different seaweeds by the mixed culture.....	107
Figure 4.29 Liquid Chromatograph of VFA standard and aqueous products from <i>Gracilaria</i> biodegradation by the mixed culture at 96 hrs.....	110
Figure 4.30 Biodegradation of seaweed, methane production and production of acetate from anaerobic biodegradation of <i>Gracilaria</i> by the mixed culture.....	111

第一章 前言

1.1 研究動機

長久以來科技的進步，為人類帶來許多便利的產品，但同時對石化燃料(fossil fuel)的需求也與日劇增。石化燃料為一無法再生之能源，且燃燒石化燃料所產生的溫室氣體、懸浮微粒、硫氧化物和氮氧化物等都會對地球環境造成影響；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。為解決能源日漸吃緊之問題，各國近年來極力開發替代能源，而台灣屬島國型國家，土地面積不大，缺乏大量自然資源，大部分能源需依靠國外進口，更需對再生能源之利用加以開發，如太陽能、光電能、水力、風力、地熱能、生質能及廢棄物能源(王氏，2005)。

在各種再生能源中生質能源(biomass energy)佔有一重要的角色。由於生質能源可由生質植物轉化而得，不僅可取代目前所使用之石化燃料，而且養植生質作物時可將空氣中的二氧化碳固定，進而達到控制溫室氣體CO₂的目的，因此許多先進國家均致力於生質能源之開發與利用，如歐盟計劃於2010年時，生質能源將佔所使用能源的10% (Commission of the European Communities,

1997)。目前各國於生質能源研究中所使用之原料來源包含有廢棄物，如廚餘、陸生植物，如玉米及水生植物，如藻類。以台灣為例，由於台灣是一四面環海，擁有相當豐富海洋資源的海島型國家，且台灣在養殖漁業上藻類養殖的發展亦有顯著的成果，養殖面積達 253 公頃，而且行政院農業委員會於 2006 年宣佈將以海藻為海洋生質能源的主要研究對象並將其列為重要且優先執行項目之一，預訂研發「海藻轉化」、「海藻培植」及「海藻農場」等多項關鍵技術(行政院國家科學委員會，2006)。

現今再生能源的製造有消化、醱酵及萃取等方式(Faaij, 2006)，然而利用厭氧醱酵法除了可以獲得目標的生質能源外還有其他有用的醱酵產物，如醋酸等。且處理後之放流液也可作為良好的土壤改良劑，並可利用現有之基本設施進行，不需額外設計複雜的設備(Ferchichi *et al.*, 2005)。

厭氧醱酵過程中產生的替代能源包含甲烷，而且甲烷是整個礦化作用的最終產物(Henze *et al.*, 1997; Brock *et al.*, 1994)，使厭氧醱酵反應進行至甲烷可避免排放水中有機物含量過高而造成對生態環境的汙染或後續處理的壓力。

1.2 研究目的

本研究以蘊含大量生物之台中縣高美溼地底泥做為海藻降解菌群來源，以臺灣人工養殖藻類中技術最為純熟，且可做為九孔人工養殖飼餌，因此在養殖九孔時會一同養殖之龍鬚菜為轉化甲烷之生質作物，但龍鬚菜之生產量高於九孔可食用的量，雖然龍鬚菜可用於萃取商業上常用之洋菜及鹿角菜膠，但仍無法將人工所養殖出之所有龍鬚菜皆消耗完畢，因此選用來源無虞且不與人類爭食之紅藻類龍鬚菜作為初步試驗之基質，培養建立出能降解海藻並產生甲烷之穩定菌群，同時探討此穩定菌群降解海藻最佳條件，如溫度、酸鹼度及輔因子和基質濃度以提高菌群降解海藻轉化為甲烷之速率與了解此穩定菌群對不同藻類如褐藻類馬尾藻之利用情形。

第二章 文獻回顧

2.1 再生能源

2.1.1 能源現況

人類長久以來依賴的石油其實有兩個很大的問題，第一是它在燃燒的時候會散發溫室氣體，第二是它的蘊藏量有限(Horn, 2000)。雖然生質能的經濟效益與石化能源不能相比，但卻可以減少對於環境的衝擊。而且於 1970 年代中東戰爭時期，石油輸出國家組織(OPEC)宣佈收回原油標價權後，將價格由原本每桶 2.41 美元的價格提高到每桶 10.651 美元，許多工業國家開始出現景氣衰退的現象。1978 年底，全世界第二大原油輸出國家伊朗發生政局變化，使得原油產量由每天 500 萬桶驟降到 100 萬桶以下，加上 1980 年的兩伊戰爭，使原油市場供需發生變化，油價由每桶 13 美元上漲至 34 美元，使西方國家發生景氣衰退之現象(盧氏，2003)。直至今日，隨著原油蘊藏量逐漸減少，2008 年 6 月初原油價格已達到每桶 126 美元價格。

在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會持續成長，各國之能源政策開始極力尋求可替代石化燃料之

替代能源，如水力、風力、太陽能、熱能、潮汐及生質能。長久以來我國偏重於經濟發展，忽視了環境保護，環境的破壞隨著經濟的成長也有了相當的程度。且台灣缺乏自然資源，98%使用能源依賴國外進口，能源問題對國際孤立的台灣更為重要，一旦能源輸入受阻，國家將陷入危機，因此能源研究與開發以減輕對外能源之仰賴極為重要(徐，2007)。

2.1.2 生質能(Biomass energy)

自 1973 年的石油危機，人們開始對替代能源產生興趣，其中包含地熱、水力潮汐、太陽能、風力、生質能等(Tsai *et al.*, 2004)。目前再生能源主要以生質能為主，許多已開發國家及開發中國家已可利用生質能產生電能，其僅產生極微量溫室氣體甚至不排放溫室氣體。生質能是指含有大量有機物的生物質(Biomass)，能夠直接或間接轉換成能源使用，目前主要是以廢棄物及生質作物經由處理後獲得能源，其中生質作物包含玉米、海藻、一般性事業廢棄物、污泥、廢輪胎、有機廢液、農業廢棄物等以碳氫化合物為主之物質。

2.1.3 生質能與碳循環

生質能是利用生質物(biomass)為原料產製的能源。光合性生物吸收大氣中的二氧化碳，以陽光為能量來源進行而行光合作用而成長並把碳固定下來，而生質物又經過轉換而成為生質能，燃燒後又變回二氧化碳釋放回大氣中，形成了一個碳的循環，也因此被視為一種再生能源，而此種能源所產生的二氧化碳可視為零。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CO₂固定轉化為生質物，還可獲得如酒精或甲烷等之生質燃料，可同時達到CO₂減量及生質能源產出雙重功能(Horn, 2000)。

2.1.4 生質能源產生方式

利用廢棄物及生質作物轉換成生質能源之架構圖如 Figure 2-1 所示，最後可獲得熱能、電能及燃料，而產生之燃料包括生質酒精、生質柴油、甲烷或氫氣等。由圖可知，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。其技術分別如下：

- (1)直接燃燒技術：將生物質直接燃燒以轉換成熱能或電力。
- (2)物理轉化技術：將生物質經過破碎、分選、乾燥、混合劑添加及成型等過程，將廢棄物製成易於搬運及存放之固體燃料，作為鍋爐的燃料。
- (3)熱轉換技術：將生物質利用汽化或裂解(液化)等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。
- (4)化學/生物轉換技術：將生物質經由醱酵、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)。生物轉換方面主要是將生物質經水解菌作用分解成醣類後，由醱酵菌進行醱酵，可獲得乙醇及羧酸物質，其後可利用乙酸生成菌將酸轉變成醋酸、氫和二氧化碳，此時可獲得氫氣，最後甲烷菌將醋酸等剩餘之代謝物質經厭氧呼吸作用，以獲得甲烷。

2.2 海藻(Seaweed)

海藻和地衣、苔蘚一樣是生態系統中重要的生產者(Jensen, 1993)。不同藻類之間，其型態、大小、色彩變化多端，無奇不有。有的是數個細胞聚成粘合群體，或形成絲狀、管狀、網狀、膜狀、囊

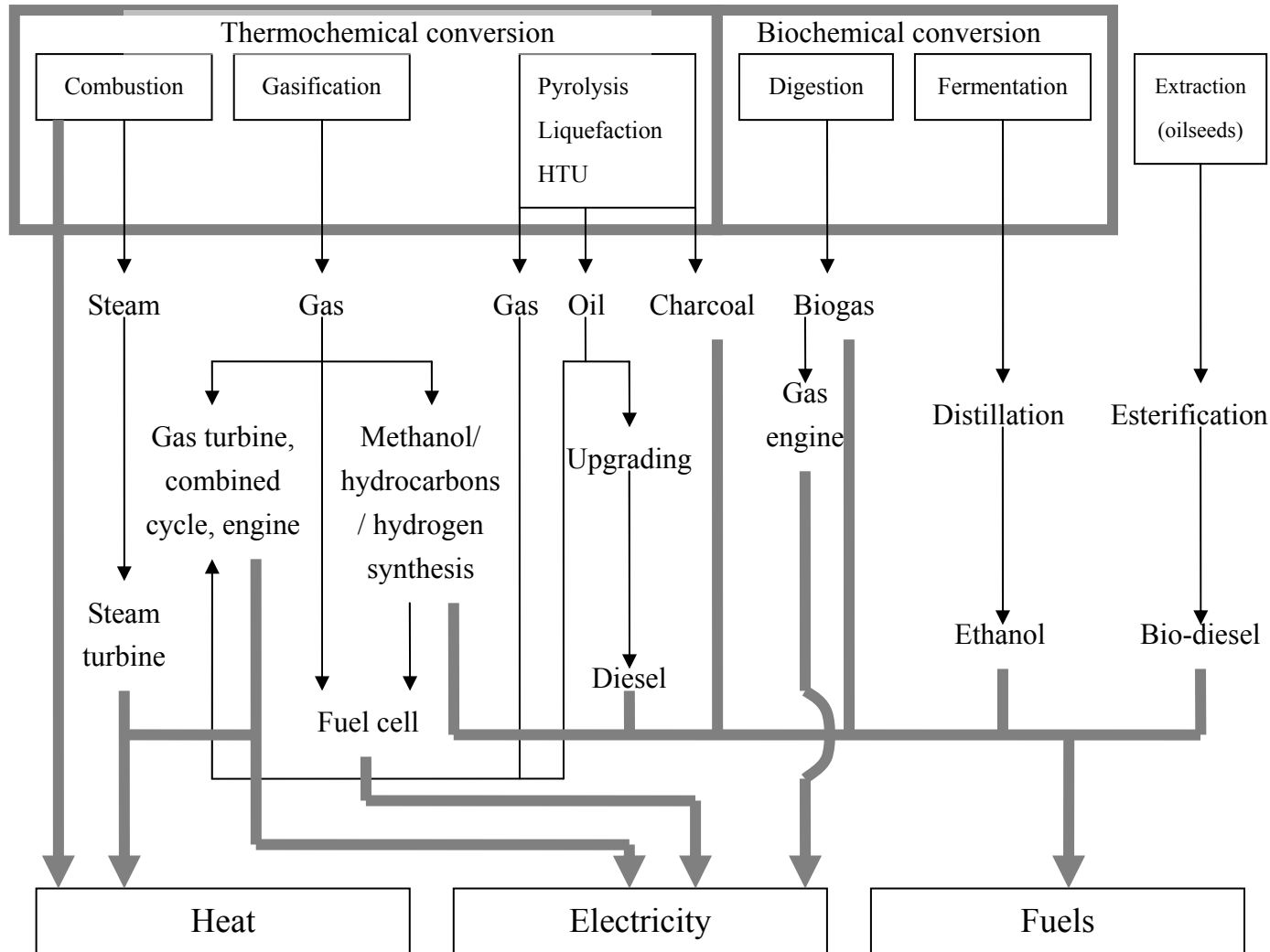


Figure 2.1 Main conversion options for biomass to secondary energy carriers. Some categories represent a wide range of technological concepts as capacity ranges at which they are deployed. (Faaij, 2006)

狀，有的較為精緻、複雜，如馬尾藻具有類似的根、莖、葉之構造，還有氣囊之分化，以協助藻體在水深數公尺下能向上直立生長，以接受較多陽光。不管形態如何變化，這些藻類的內部大多由形態相仿的細胞所構成，只具簡單之分工能力，而無真正的根、莖、葉。

藻類的分類，主要根據其所含色素種類、儲藏物質、細胞壁成分、鞭毛數目、鞭毛位置、細胞構造、藻體生長型式、分枝型式、固著器、孢子囊種類、果胞枝和囊果等特徵而來 (Horn, 2000; 臺灣海藻資訊網)。

2.2.1 海藻之利用

佔地球百分之七十的海洋中，海藻是製造氧氣與食物的重要基礎生產者，海藻除了可以淨化水質，並作為海洋生物棲息、產卵、覓食的地方，還可作為平衡營養的健康食品、飼料或飼料添加物、肥料，由海藻做成之堆肥，因不含雜草種子及病蟲害源，不但可避免雜草及蟲害的發生，其所含的大量有機質，還可提高土壤的保水力及改善土壤結構，部份具石灰質之海藻，如石枝藻更能用來製造泥灰土或改變土壤的酸鹼值及利用從海藻提煉的各種藻膠應用於食品加工、造紙、化妝品及基礎研究用之培養基等工業用途，海藻的用途如 Table 2.2 所示。甚至可利用大型海

藻來生產碳氫化合物（如甲烷），成為人類另一項可資開發的新能源(Schink, 1997; Bhatia, 1990; 臺灣海藻資訊網)。

2.2.2 臺灣海藻資源

臺灣位居於地球上生物歧異度最為豐富之地區－熱帶西太平洋區(Tropical Western Pacific Area)，而臺灣本身也具有多樣的海洋環境，沿著海岸，可以發現有許多的地形景觀，加上氣候、洋流等作用，提供海洋生物不同性質的生育地，每一個地區海藻的形態、數量及組成亦不同。自 1866 年開始臺灣地區的海藻研究至今，目前已知的海藻有綠藻 17 科 36 屬 112 種，褐藻有 90 科 25 屬 85 種，紅藻有 38 科 114 屬 262 種。臺灣的海藻呈現相當高的生物多樣性，兼具溫帶型及熱帶型種類，而每一種藻類有其特定的生長地帶，隨著光質之變化，藻類的分佈易受影響，此現象在海邊的垂直分佈上最為明顯。以臺灣地區來說，飛沫帶可以耐受長時間乾旱及炎熱的紫菜、柔弱捲枝藻為主，潮間帶上部多為石髮等綠藻類，中部以團扇藻等褐藻為主，潮間帶下部及低潮線附近以龍鬚菜等紅藻較為常見，而低潮線附近有浪之地區常見之藻類包括馬尾藻、石化菜等藻類。且臺灣養殖漁業常會與藻類一同養殖，以做為如九孔等生物之飼料。自 1961 年起，臺

Table 2.1 Industrial application of various algae

藻膠種類	原藻	用途
褐藻膠 (Alginate)	巨藻屬(Crocysis) 海帶屬(Laminaria) 馬尾藻屬(Sargassum) 囊葉藻屬 (Asoophyllum)	食品工業(冰淇淋、奶品、果汁、果醬、沙拉醬、食品罐頭之穩定劑)、 化妝品工業(乳液、牙膏、肥皂、洗髮精)、醫藥工業(藥丸打粒、膏 基、手術用縫線、敷料、假牙模型、止血劑、消化道造影劑添加、 體內重金屬吸收抑制劑等)、紡織品(彎曲形成或硬挺)、人造纖維原 料、污水淨化劑、硬水軟化劑、化學成分之分離劑、鹼類之精製、 油漆及塑膠工業之乳化劑、結合劑、安定劑、潤滑劑及填充劑等
洋菜 (Agar)	石花菜屬(Gelidium) 翼枝菜屬 (Pterocladia) 龍鬚菜屬(Gracilaria)	微生物培養基、食品工業(果凍、果醬、澱粉代用品、食品罐頭之穩 定劑、凝膠劑)、紡織工業、造紙、釀酒之澄清劑、超微切片輔助劑、 分析研究(電泳)、醫藥(胃腸不適、膠囊製作等)
鹿角菜 (Carrageenan)	角叉藻屬(Chondrus) 杉藻屬(Gigartina) 麒麟菜屬(Eucheuma) 沙菜屬(Hypnea)	食品工業(果凍、果醬、沙拉醬、食品罐頭之穩定劑、凝膠劑)、化妝 品、醫藥工業(藥丸打粒、膏基、膠囊、胃腸不適等)、油漆等
帚叉藻聚醣 (Furcellaran)	帚叉藻屬(Furcellaria)	製酪業
布糊(Funoran)	海蘿屬(Gloeopeltis)	造紙業、紡織工業
紫菜聚醣 (Porphyran)	紫菜屬(Porphyra)	粘劑

(臺灣海藻資訊網)

灣開始人工培養海藻，根據 2006 年漁業年報的統計資料，歷年來臺灣海藻養殖種類，皆以紅藻類門的龍鬚菜(*Gracilaria*)為最大宗，主要集中於宜蘭縣頭城鎮、礁溪鄉、雲林縣麥寮鄉、口湖鄉、台南縣台南市、七股鄉以及屏東縣林園鄉等 7 個地區，養殖面積可達 253 公頃 (Ajisaka, 1993; 台灣海藻資訊網)。年產量在五萬公噸以上(行政院農業委員會漁業署漁業資訊網)。

2.2.3 海藻組成

海藻類的化學組成如 Table 2.2 所示。海藻常見的特色即是含有大量的水分及礦物質。海藻中以氯化鈉與氯化鉀為其主要蘊含的礦物質。不論是何種海藻其蛋白質與脂質含量均很低，這兩種物質對藻類而言不同於人類或動物一般為必需物質。除了綠藻，大部分的海藻以柔韌的膠體構造(gel-forming)和黏性的聚合物(viscous polymers)代替陸生植物常見的纖維素(cellulose)和木質素(lignin)等堅固纖維結構；如紅藻是以洋菜、岩藻糖(fucose-containing polysaccharide)、硫酸脂半乳糖(sulphated galactans)聚合物、樹膠質(xylans)和其他聚合物所組成，因此大部分的海藻類纖維素和木質素的含量皆較陸生植物低，而以藻膠物為其主要組成物質，存在海藻細胞壁中(Estevez *et al.*, 2008)。海

Table 2.2 Approximate chemical composition of seaweeds.

Component	Brown	Red	Green
Water ^a	75-90%	70-80%	70-85%
Minerals ^b	30-50%	25-35%	10-25%
Carbohydrates	30-50% ^c	30-60% ^d	25-50% ^e
Protein	7-15%	7-15%	10-15%
Lipids	2-5%	1-5%	1-5%
Cellulose	2-10%	2-10%	20-40%

^a: of fresh weight; ^b: of dry weight; ^c: Mainly alginate and fucose-containing polysaccharides; ^d: Sulphated polygalactans and xylans; ^e: Cellulose and starch are the main components.

(Jensen, 1993)

藻的碳水化合物是一項非常特殊的有機物，人類或非反芻動物的消化系統無法消化這些物質(Jensen, 1993)。

2.3 海藻多醣來源

海藻根據藻類所含的儲存性及細胞壁多醣可分為三個綱：綠藻(Chlorophyceae)、褐藻(Phaeophyceae)與紅藻(Rhodophyceae)，其中褐藻和紅藻為重要多醣類之來源並具商業價值(Jiménez-Escring and Sánchez-Muniz, 2000)。目前重要的海藻產品有自紅藻中萃取出洋菜(agar)與鹿角菜膠(carrageenan)及由褐藻(algins)中可萃取之海藻多醣為褐藻膠(Cardoso et al., 2007; Renn, 1997)。

2.3.1 紅藻(Rhodophyceae)

龍鬚菜(*Gracilaria*)屬於紅藻的一種，在臺灣主要分布於中南部沿岸(Singh, 1992)。龍鬚菜的植物體一般形狀呈圓柱狀、叉狀或側面分身。龍鬚菜及其他天然紅藻類，由於野生原料供應不足，遂有漁民利用鹹水溝渠兩岸從事龍鬚菜的人工養殖生產，供應加工業及食品業的市場需求。近年來由於九孔養殖業興起，草食性的九孔需要一種產量充足而供應穩定的餌藻，以為成長所

需，而龍鬚菜的養殖恰好提供這項需求的不虞匱乏，於是此兩種養殖事業，近幾年來已漸漸建立起非常密切的供需關係(吳與周，1991)。龍鬚菜全醣量及蛋白質量分別高達 70.3%及 11.7%(Ito and Hori, 1989)，脂質在龍鬚菜中含量很低(Khotimchenko and Levchenko, 1997)，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(agarpectin)組合而成(馬，2003)，龍鬚菜經過 β -agarase 水解可得如 galactose、neoagarobiose、neoagarotetraose 及 neoagrohexasose 等寡糖類(袁，2001)。

2.3.2 綠藻(Chlorophyceae)

綠藻所含的黏異質多醣體(mucilaginous polysaccharides)，以澎湖產的寬礁膜(*Monostroma lactissimum*)最多，有 27.3%的多醣體(藻體含 15.9%水分)。海菜學名為 *Monostroma nitidum*，亦稱礁膜屬於綠藻，為單層細胞所構成之薄膜狀綠色海藻，主要生長在澎湖及臺灣北部沿岸岩礁地區(陳等，1989)。海藻之黏質物(mucilage)中的單醣組成主要含有木糖(xylose)、半乳糖(galactose)、半乳糖醛酸(galacturonic acid)及鼠李糖(rhamnose)，

與鈣離子螯合形成之鈣藻膠(calcium spirulan)經體外實驗證實為組織型血栓溶解因子(tissue plasminogen activator, TPA)之誘導物質(彭, 2005), 而多醣部分屬於硫酸根多醣類(sulphated polysaccharudes)(Maeshige, 1962)。

2.3.3 褐藻(Phaeophyceae)

褐藻所含的褐藻酸(Alginic acid)以屏東南灣產的馬尾藻(*Sargassum dupliatum*)最多含有 21%，沿海各地所產的馬尾藻皆有 20% 的多醣體含量，馬尾藻不但藻源豐富，並且膠含量並不低(袁, 2001)。褐藻膠是目前應用於工業上最為廣泛的一種海藻膠質，不論是用於製作果醬、沙拉醬等食品工業、洗髮精、乳液等化妝品工業及做為手術用縫線、藥丸打粒等醫藥工業上，更可做為人造纖維之原料、污水淨化劑、硬水軟化劑及油漆與塑膠工業之乳化技、結合劑、安定劑、潤滑劑和填充劑等(台灣海藻資訊網)大量運用與各種工業製程。

2.4 海藻多醣結構

由各種藻類所獲得的海藻多醣結構均相近，通常是以兩種或多種形式的雙醣分子以重覆的的單元相互鍵結(Usov, 1992)。

2.4.1 洋菜(Agar)

洋菜(agar)之結構可以分為兩部份，中性洋菜(agarose)亦稱為洋菜凝膠及酸性洋菜(agarpectin)。中性洋菜是洋菜中最具有形膠能力的成分，它的基礎結構(Figure 2.2)由 β -D-galactose 以 1 \rightarrow 4 鍵結方式與 3, 6-anhydro- α -L-galactose 結合而成的雙醣單元(agarobiose)構成而未帶有任何的硫酸基(Araki and Arai, 1954; 馬, 2003)；酸性洋菜是 sulphated galactans 的混和物，會帶有 glucuronic acid 或 pyruvic acid 等結構，結構會因來源不同而有各種變化。但在部分紅藻中會有某些 α -L-galactose-6-sulfate 單元(porphyrin 的型式)取代 3,6-anhydro- α -L-galactose，而 *O*-methyl 及 sulfate groups 等取代基通常在 β -D-galactose 上的 C-6 的位置(Usov, 1992)。

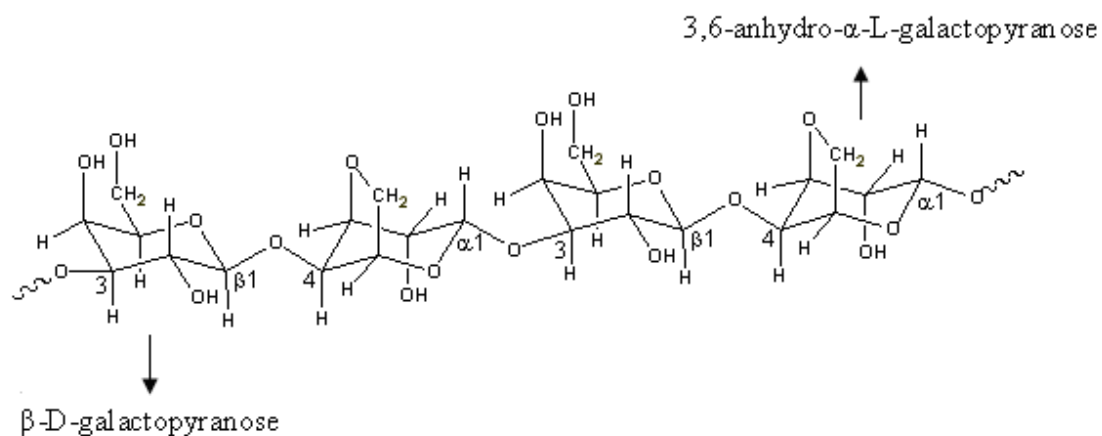


Figure 2.2 Structural unit of agar. Agar consists of a mixture of agarose and agaropectin. Agarose is a linear polymer, based on the $-(1\rightarrow3)\text{-}\beta\text{-D-galactopyranose-(1}\rightarrow4)\text{-3,6-anhydro-}\alpha\text{-L-galactopyranose}$ unit; the major differences of agar from carrageenans being the presence of L-3,6-anhydro- α -galactopyranose rather than D-3,6-anhydro- α -galactopyranose units and the lack of sulfate groups.

2.4.2 褐藻膠(Alginate)

褐藻膠 (alginate) 是由 α -L-guluronic acid (G) 和 β -D-mannuronic acid (M) 兩種次單元(Figure 2.3)構成 GG、MM 與 MG 等三種不同的單元以嚴謹交替呈直鏈方式鍵結而成之聚合物，不同的來源及不同種類間的褐藻膠之 M/G 比例會有所不同 (Draget *et al.*, 1997)。 α -L-guluronic acid (G)和 β -D-mannuronic acid 雖然互為異構物且僅在 C5 處不同，但卻造成它們擁有不同的結構。褐藻膠易與二價金屬離結合形成膠體化，尤其是鈣離子會與之形成 calcium alginate，此化合物容易與磷酸(phosphate)、檸檬酸(Citrate)、鎂離子(Mg⁺⁺)或鈉離子(Na⁺)等螯合形成不穩定之化合物，其鈉鹽和鉀鹽物質之水溶性強，而鈣鹽則不溶於水，吸收大量的水形成乳化狀態的膠體，黏稠度大增。

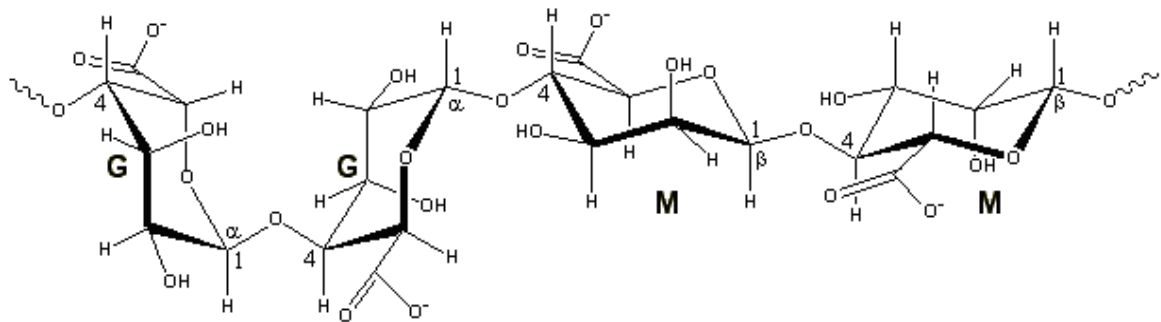


Figure 2.3 Structural unit of alginate. Alginates are linear unbranched polymers containing β -1 \rightarrow 4-linked D-mannuronic acid (**M**) and α -1 \rightarrow 4-linked L-guluronic acid (**G**) residues.

2.4.3 鹿角菜膠(Carrageenan)

鹿角菜膠(carrageenans)是由多種結構不同的聚合物所組成的複雜混合物。這些聚合物包括 kappa(κ)、lambda(λ)、mu(μ)、iota(ι)與 nu(ν)等五種二糖單元(Figure 2.4)。鹿角菜膠是由 α -D-galactose 以 1→4 鍵結方式與 3,6-anhydro- β -D-galactose 結合而成的單元為中樞，並帶有各種不同比例的硫酸酯(ester sulfate)(Cardoso *et al.*, 2007; Usov, 1992; Velde, 2008)。其中 κ -carrageenan 之基本結構單元在 galactose 的 C-4 帶有 sulfate 及約有 25% 的 ester sulfate； λ -carrageenan 之結構在 α -D-galactose 的 C-2 及 β -D-galactose 的 C-2 與 C-6 帶有 sulfate，並帶有約 35% 的 ester sulfate； μ -carrageenan 之結構在 α -D-galactose 的 C-4 及 β -D-galactose 的 C-6 帶有 sulfate； ι -carrageenan 的結構在 galactose 的 C-4 及 3,6-anhydro- β -D-galactose 的 C-2 帶有 sulfate； ν -carrageenan 之結構在 α -D-galactose 的 C-4 及 β -D-galactose 的 C-2 與 C-6 帶有 sulfate。鹿角菜膠的多醣通常帶有的硫酸脂(sulfate)通常比洋菜多醣的硫酸脂含量多，硫酸脂與 3,6-anhydro- β -D-galactose 及 pyruvate 同樣具有影響藻膠成膠性之功能(袁，2001)。

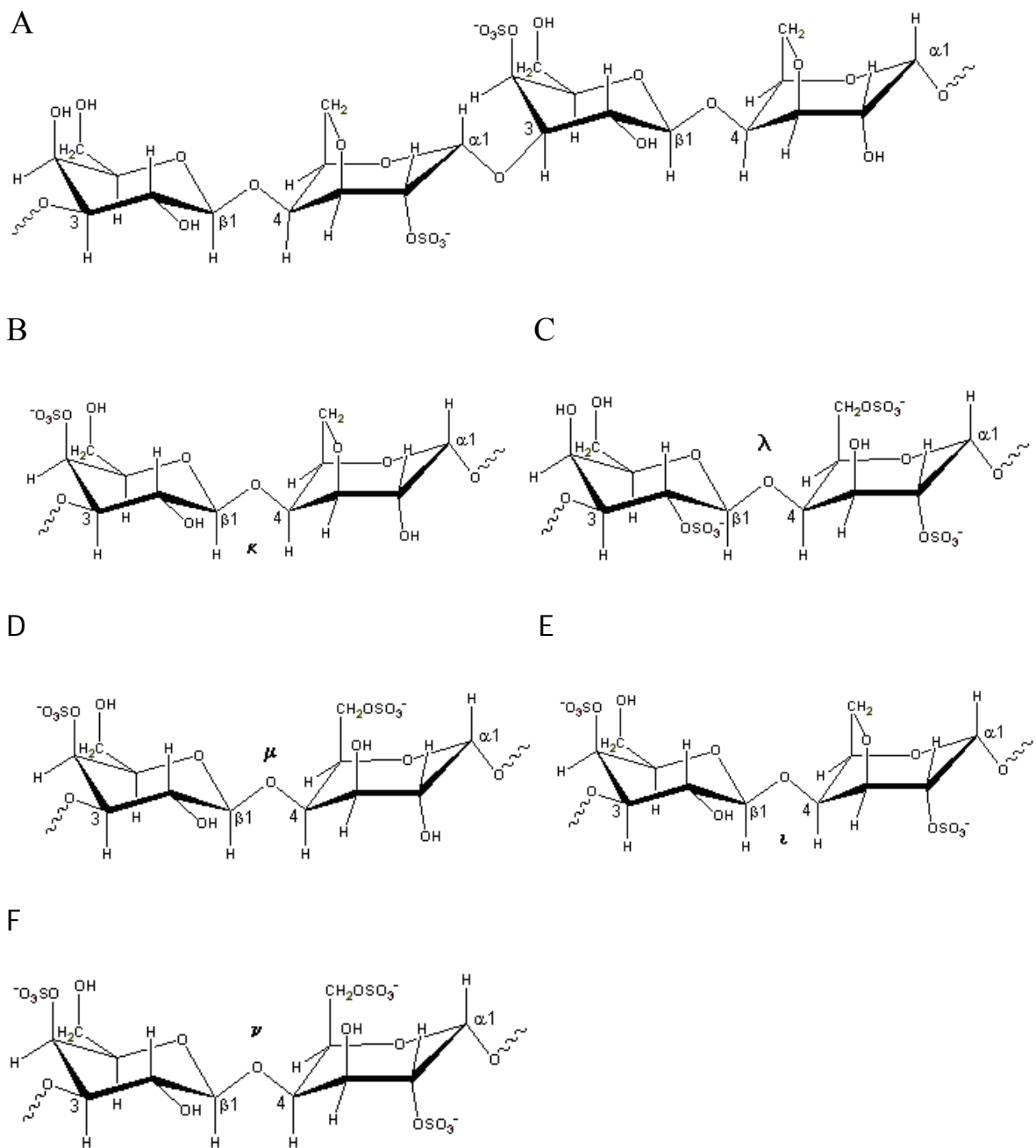


Figure 2.4 Structural unit of carrageenan consisting of alternating 3-linked-β-D-galactopyranose and 4-linked-α-D-galactopyranose units(A), κ-carrageenan(B), λ-carrageenan(C), μ-carrageenan(D), ι-carrageenan(D) and ν-carrageenan(F). Carrageenans are linear polymers of about 25,000 galactose derivatives with regular but imprecise structures, dependent on the source and extraction conditions.

2.5 分解海藻多醣之 agarase

2.5.1 來源

目前已知有許多菌株可以藉著分泌洋菜酶酵素(agarase)將海藻多醣分解，並利用海藻多醣作為碳源(Vera *et al.*, 1998)。這些菌株大部分分離自沿岸海水及河口環境，但也有許多分離自陸上之淡水、廢水及土壤。目前已發表文獻之 agarase 的整理如 Table 2.3(袁，2001)。

2.5.2 分類與分解方式

海藻多醣萃取物經洋菜酶 (agarases)降解為簡單醣類如單醣類與雙醣類等產物。Agarase 依其水解產物可分為兩類，分別是 α -agarase 和 β -agarase，可將洋菜分解成小分子的醣類， α -agarase 針對 D-galactose 與 L-3, 6-anhydro-galactose 之間的 α -1, 3-linkages 作用，分解後可得 oligosaccharides； β -agarase 是針對 D-galactose 與 L -3, 6-anhydro-galactose 之間的 β -1, 4-linkages 進行反應，分解後可得 neoagarobiose oligosaccharides(李，2005)。在 agar 固態培養皿上可觀察到具 agarase 的細菌水解洋菜的情況分為:造成洋菜廣泛液化現象和菌落周圍形成透明環，造成洋菜

Table 2.3 List of agarase-producing microorganisms and their biochemical properties of agarases

Enzyme	Bacteria	Source	Opt. pH	Opt. temp. (°C)	Reference	
agarase	<i>Arthribacter</i> sp. S-22	algae	5.0-6.0	50-60	Osumi <i>et al.</i> , 1997	
	<i>Cytophaga duffluens</i>	algae	7.2	28	Nikolaeva <i>et al.</i> , 1999	
	<i>Pseudomonas</i> sp. PT-5	algae	6.5	30	Yamaura <i>et al.</i> , 1991	
	<i>Pseudomonas vesicularis</i> MA103	marine environments	6.0-6.2	26	Liang, 1999	
	<i>Vibrio harvryi</i> FLB-17	marine environments	6.0	40	Fukasawa and Kobayashi, 1987	
	<i>Vibrio</i> sp. PO-303	marine environments	6.0-8.5	38-55	Araki <i>et al.</i> , 1998	
α -agarase	<i>Alteromonas agarlyticus</i> (GJ1B)	marine environments	7.2	45	Potin <i>et al.</i> , 1993	
α -NAOS hydrolase*	<i>Vibrio</i> sp. strain JT 0107	algae	7.7	30	Sugano <i>et al.</i> , 1994	
β -agarase	<i>Alteromonas</i> sp. E-1	soil	7.5	40	Kirimura <i>et al.</i> , 1999	
	<i>Alteromonas</i> sp. strain C-1	marine environments	6.5	--	Leon <i>et al.</i> , 1992	
	<i>Bacillus cereus</i> ASK202	marine environments	7.0	40	Kim <i>et al.</i> , 1999	
	<i>Cytophaga flevensis</i>	fishwater lakes	6.3	35	van der Meulen and Harder, 1975	
	<i>Cytophaga</i> NCMB 1327	marine environments	7.2	--	Duckworth and Turvey, 1969	
	<i>Pseudoalteromonas antarctica</i>	marine environments	7.0	30	Vera <i>et al.</i> , 1998	
	<i>Pseudomonas atlantica</i>	marine environments	7.0	40	Morrice <i>et al.</i> , 1983	
	<i>Pseudomonas kyoensis</i>	algae	5.0	40	Araki and Arai, 1954	
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Wastewater laboratories	6.7	38-43	Malmqvist, 1978	
	<i>Pseudomonas</i> sp. W7	marine environments	7.8	--	Ha <i>et al.</i> , 1997	
	<i>Vibrio agarliquefaciens</i>	algae	--	40	Ishimatsu, 1953	
	<i>Vibrio</i> sp. AP-2	marine environments	5.5-7.0	45	Aoki <i>et al.</i> , 1990	
	<i>Vibrio</i> sp. strain JT-0107	algae	8.0	30	Sugano <i>et al.</i> , 1994	
	β -neoagarotetraose hydrolase	<i>Pseudomonas atlantica</i>	marine environments	8.0	--	Groleau and Yaphe, 1977
	neoagarobiase	<i>Cytophaga flevensis</i>	fishwater lakes	6.7	25	van der Meulen and Harder, 1976
neoagarobiose hydrolase	<i>Pseudomonas atlantica</i>	marine environments	8.0	--	Day and Yaphe, 1975	
neoagarotetraose	<i>Cytophaga flevensis</i>	fishwater lakes	7.0	25	van der Meulen and Harder, 1976	

*: α -NAOS hydrolase is the α -neoagarooligosaccharide hydrolase.

(袁, 2001)

培養基凹陷兩類。洋菜在 80°C 以上水中溶解後，溫度降至 45°C 以下，將藉氫鍵形成緊密雙螺旋結構之膠體，除少數菌種外，大多數細菌均無法將其水解。細菌分解洋菜分成破壞其雙螺旋結構、破壞 α 鍵結構和破壞 β 鍵結。微生物被洋菜誘導產生的 agarase，將洋菜水解所得之產物整理如 Table 2.4 所示(袁, 2001)。

2.6 海藻厭氧生物轉化(Anaerobic bioconversion of seaweed)

要將生質物直接以燃燒方式獲得能源前需先經乾燥，但由於海藻含有大量的水分，因此要將海藻乾燥需要耗費大量的能源，然而用於可直接利用生物轉化的方式來分解藻體，可節省能源的消耗。海藻這類含水量高的有機物在有氧氣的環境下利用生物降解有機物僅能轉換為二氧化碳及水，但在厭氧環境下進行生物降解除除了二氧化碳外還能產生甲烷氣體(Henze *et al.*, 1997)。早在 70 年代中期到 80 年代末就有研究利用巨藻類產生能源(Chynoweth *et al.*, 1987; Ghosh *et al.*, 1981)。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(Figure 2.5)，甲烷菌可

Table 2.4 The oligosaccharides derived from various substrates by the degradation of microbial agarases.

Bacterium	Enzyme	Substances	Products	Reference
<i>Arthrobacter</i> sp. S-22	agarase	neoagarotetraose	neoagarobiose	Osumi <i>et al.</i> , 1997
<i>Alteromonas agarlyticus</i> (GJ1B)	α -agarase	agarooligosaccharides	agarotetraose or agarotriose	Potin <i>et al.</i> , 1993
<i>Alteromonas</i> sp. E-1	β -agarase	agarose and neoagarooligosaccharides	neoagarobiose	Kirimura <i>et al.</i> , 1999
<i>Bacillus cereus</i> ASK202	β -agarase	agarose	neoagarohexaose, neoagarotetraose and neoagarobiose	Kim <i>et al.</i> , 1999
<i>Cytophaga flevensis</i>	β -agarase	agarose	neoagarotetraose and neoagarobiose	van der Meulen and Harder, 1975
	neoagarobiase	neoagarotetraose	neoagarobiose	van der Meulen and Harder, 1976
	neoagarotetraose	neoagarobiase	D-galactose and 3,6-anhydro-L-galactose	van der Meulen and Harder, 1976
<i>Pseudoalteromonas Antarctica</i> stain N-1	β -agarase	agar	neoagarohexaose and agarotetraose	Vera <i>et al.</i> , 1998
<i>Pseudomonas atlantica</i>	neoagarobiose hydrolase	neoagarobiase	D-galactose and 3,6-anhydro-L-galactose	Day and Yaphe, 1975
	β -neoagarotetraose hydrolase	neoagarotetraose, neoagarohexaose and neoagarooctaose	neoagarobiose	Groleau and Yaphe, 1977
	β -agarase I	neoagarohexaose	neoagarotetraose and neoagarobiose	Morrice <i>et al.</i> , 1983
	β -agarase II	neoagarotetraose and neoagarohexaose	neoagarobiose	
<i>Pseudomonas elongate</i>	agarase	agarose	neoagarotetraose and neoagarobiose	Marta <i>et al.</i> , 1975
<i>Pseudomonas</i> sp.	β -agarase I	neoagarooctaose	neoagarotetraose	Malmqvist, 1978
	β -agarase Ib	neoagarotetraose	neoagarobiose	
<i>Vibrio</i> sp. AP-2	β -agarase	neoagarooligosaccharides and neoagarotetraose	neoagarobiose	Aoki <i>et al.</i> , 1990a
	β -agarase-a	neoagarooligosaccharides	neoagarotetraose	Aoki <i>et al.</i> , 1990c
	β -agarase-b β -agarase-c		neoagarobiose neoagarotetraose	
<i>Vibrio</i> sp. pO-303	agarase-a	agarose	neoagarohexaose and neoagarotetraose	Araki <i>et al.</i> , 1998
	agarase-b		neoagarotetraose and neoagarobiose	
	agarase-c		neoagarooctaose and neoagarodecaose	
<i>Vibrio</i> sp. strain JT 0107	β -agarase	agarose	neoagarotetraose and neoagarobiose	Sugano <i>et al.</i> , 1993
	α -NAOS hydrolase*	agarooligosaccharides	agaropetaose, agarotriose, agarobiose and D-galactose	Sugano <i>et al.</i> , 1994

*: α -NAOS hydrolase is the α -neoagarooligosaccharide hydrolase.

(袁, 2001)

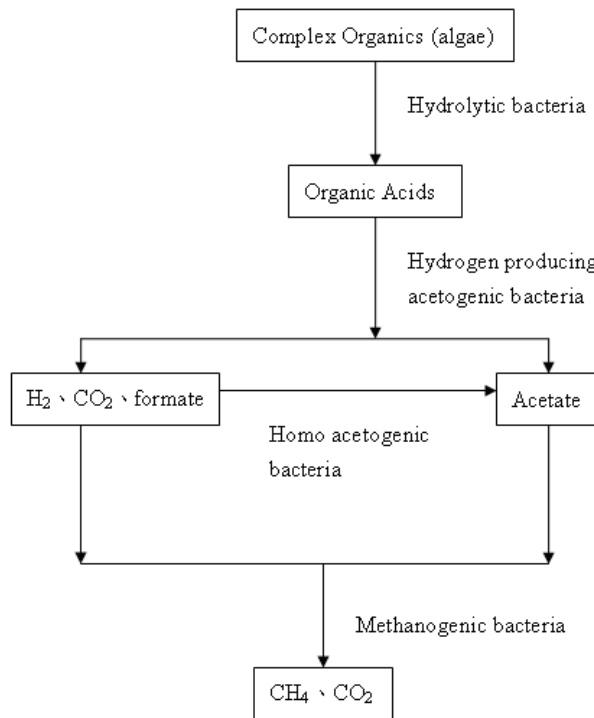


Figure 2.5 Production of methane from biodegradation of complex organic(algae) under anaerobic condition. (Vergara-Fernández *et al.*, 2007)

利用之化合物及轉換方程式如Table 2.5。

2.7 生物甲烷(Biogas)燃料與應用

生物甲烷又可稱為沼氣，具可燃性，逸散於空氣中則易燃。目前生物甲烷大都來自於厭氧轉化有機物及都市廢棄物，以獲得再生能源(Yang *et al.*, 2004; Leschine, 1995)。甲烷生成是有機物質被降解的最終階段，表示厭氧微生物反應完全才可進行至最終步驟。一般甲烷化通常發生於反芻動物的消化系統、淡水或海水之底泥、沼澤、濕地及稻田等自然環境與掩埋場、堆肥場及消化槽等人為環境(Ma *et al.*, 2006; Jiahg *et al.*, 2005; Shlimon *et al.*, 2004; Lia *et al.*, 2002; Joulian *et al.*, 2000; VaĀradyovaĀ *et al.*, 2000; 賴，2006; 黃，2006; 陳，2006; 林，2004)常會有沼氣產生，但卻未有完善的收集設備。若可以將甲烷氣體回收作為燃料使用，可以節省沼氣及臭味處理的管理經費，營造乾淨的綠色環境，並有效減少溫室氣體效應氣體中，甲烷及二氧化碳的排放量，因此回收的沼氣可用於替代燃料、發電等，是一種能夠符合環境再生之綠色能源(Murphy and McCarthy, 2005 ; 張，2000)。

Table 2.5 Reaction and standard changes in free energies for methanogenesis

Reaction	ΔG^0 (KJ/mol CH ₄)
4 CO + 2H ₂ O → CH ₄ + 3CO ₂	-211
4 H ₂ + CO ₂ → CH ₄ + 2H ₂ O	-135.6
4 Formate → CH ₄ + 3CO ₂ + 2H ₂ O	-130.1
2 Ethanol + CO ₂ → CH ₄ + 2 Acetate	-116.3
Methanol + H ₂ → CH ₄ + H ₂ O	-112.5
4 Methanol → 3CH ₄ + CO ₂ + 2H ₂ O	-104.9
4 Methylamine + 2H ₂ O → 3CH ₄ + CO ₂ + 4NH ⁴⁺	-75.0
Trimethylamine + 6H ₂ O → 9CH ₄ + 3CO ₂ + 4NH ⁴⁺	-74.3
2 Dimethylsulfide + 2H ₂ O → 3CH ₄ + CO ₂ + H ₂ S	-73.8
2 Dimethylamine + 2H ₂ O → 3CH ₄ + CO ₂ + 2NH ⁴⁺	-73.2
4 2-Propanol + CO ₂ → + 4 Acetone + 2H ₂ O	-36.5
Acetate → CH ₄ + CO ₂	-31.0

(陳，2006)

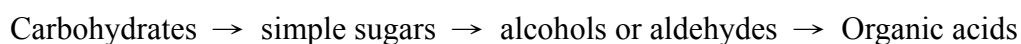
2.8 厭氧醱酵化學

厭氧醱酵化學主要可分為下列兩種：

I. 一般厭氧作用方程式



II. 碳氫化合物之分解



大部分有機酸生成菌為土壤微生物，亦為兼氣厭氧菌、異營性甲烷生成菌利用酸生成菌所產生的有機酸為基質，生成甲烷及二氧化碳。甲烷生成菌比酸生成菌生長慢，其生長 pH 值範圍為 6.7~7.4。

在厭氧醱酵過程中，產生氫氣大多會被甲烷菌、醋酸菌或硫酸還原菌消耗轉換成甲烷，在一般的甲烷系統中並無法監測到大量的氫氣釋出，但當系統不穩定或甲烷化受到抑制時，則可監測到氫氣生成 (王，2006)。

2.9 厭氧生物處理之影響因子

微生物生長除了適當的養分外，還需提供適合為生物生長的環境因子，在不同之環境下，細菌的分解海藻並產甲烷的能力亦會因環境條

件不同而改變。環境因子包含許多種類，其中有溫度、鹽度、pH值、輔助因子等，以下就幾種影響因素整理說明。

2.9.1 溫度

生物隨著本身的蛋白質特性不同而生長溫度不同，因此呈現多樣性，培養溫度會影響微生物本身的蛋白質活性，通常溫度每上升 10°C，酵素之催化反應速率可增加一倍(徐，2007)。但不當的溫度會造成其蛋白質性質改變而失去原有的功能及活性，導致新陳代謝速度降低。且培養溫度會影響為生物對基質的利用性與速率，過高的溫度會使微生物體內酵素和蛋白質的嚴重變性，而導致菌體快速死亡；過低的溫度則會降低酵素活性，並使微生物體內之水份凍結，使得吸收養分與排除體內代謝產物的反應無法進行。微生物可依其最適生長溫度(optimal temperature)範圍區分為嗜冷菌(Psychrophiles, <20 °C)、中溫菌(Mesophiles, 20-45 °C)及嗜熱菌(Thermophiles, >45 °C)(Haki and Rakshit, 2003; Itoh, 2003; Niehaus *et al.*, 1999; Lim, 1998)。

2.9.3 鹽度

鹽類物質會改變菌群生長環境中之滲透壓，進而影響微生物之活性，滲透壓過高或過低導致細胞膨壓無法與之抵抗時，細胞將會有萎縮或脹大之現象，影響細胞正常之生長與活性，甚至可使菌體死亡。此外，目前已知產 agarase 的菌株多為海洋性細菌，因此有學者認為添加適量的 NaCl 可以增加 agarase 的活性(Ha *et al.*, 1997; Morrice *et al.*, 1983)，進而促進菌株對海藻之分解。

2.9.2 pH 值

菌群生長環境之酸鹼度會對酵素之活性造成影響進而影響或限制其生長速率，菌體所分泌之酵素於一定 pH 值範圍下會表現出最大活性，過酸或過鹼皆容易對微生物生長產生抑制，因此依照菌體最適 pH 值範圍可分類為酸性菌(Acidophiles, pH 1-5.5)、中性菌(Neutrophiles, pH 5.5-8)以及鹼性菌(Alkalophiles, pH 8.5-11.5) (Mosuer *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2004; Lim, 1998)。

2.9.3 輔因子

以酵母菌萃取物(yeast extract)與水解蛋白質(peptone)為輔助

因子，是許多種微生物生長所需之輔助物質，可以提供菌群碳源以外之營養來源，如其中的 amino acids 可作為微生物生長所需但有無法自體生成之來源，輔助微生物生長。yeast extract 係由 amino acids, peptides, vitamins, 包括 pyruvic 及 glyceric acid 等有機酸所構成，提供脂溶性、水溶性物質；peptone 則是含有複雜的胺基酸成分。yeast extract 與 peptone 可以被微生物利用，進而形成細胞生長之營養因子，因此，適當的添加可促進細胞生長，促進菌群對基質之利用率與產物之生成率(Arasaratnam *et al.*, 1996)。

2.9.4 碳源種類

由前人的研究發現，微生物所產生的 agarase 是需要被誘導的，而且 agarase 對誘導物具有專一性，不同的誘導物會促使菌株產生不同的 agarase (Vera *et al.*, 1998; Sugano *et al.*, 1993)。因此本研究以主要組成單元皆為半乳糖而以不同結構所形成之藻膠如褐藻膠、洋菜與鹿角菜膠為主要探討轉化甲烷之碳源。褐藻膠來源選用以臺灣沿海地區皆有豐富蘊藏量的馬尾藻，洋菜與鹿角菜膠則選用臺灣目前具有高人工養殖能力且為養殖漁業的大量附加產物的龍鬚菜，進行藻類轉化甲烷之探討。

第三章 實驗材料與方法

3.1 實驗流程設計

本研究利用高美濕地底泥中，經由增富(enrichment)方式培養出具有降解海藻並產生甲烷氣體之厭氧穩定菌群，並進一步探討混合菌群最適生長條件包括溫度、pH、鹽濃度、輔因子(co-factor)添加及甲烷生成潛能之研究，最後利用分子生物技術探討研究菌群親緣關係。本研究之實驗流程圖如 Figure 3.1 所示。

3.2 菌種來源採樣

本研究所使用之混合微生物樣本來自台中縣高美濕地出海口 (Figure 3.2 與 Figure 3.3)之底泥微生物。高美溼地位於大甲溪及清水大排的出海口，面積大約為 300 多公頃。由於大肚溪承受了清水地區的家庭有機污水，其中的有機物質提供了低棲生物營養的來源，而高美濕地中包含了草澤、沙地、碎石、泥灘...等多樣的棲息環境，所以在不是非常廣大的環境中孕育了種類繁多、數量可觀的底棲生物。因此選定了高美濕地中的草澤地為高美底泥的採樣點，採樣處有許多腐

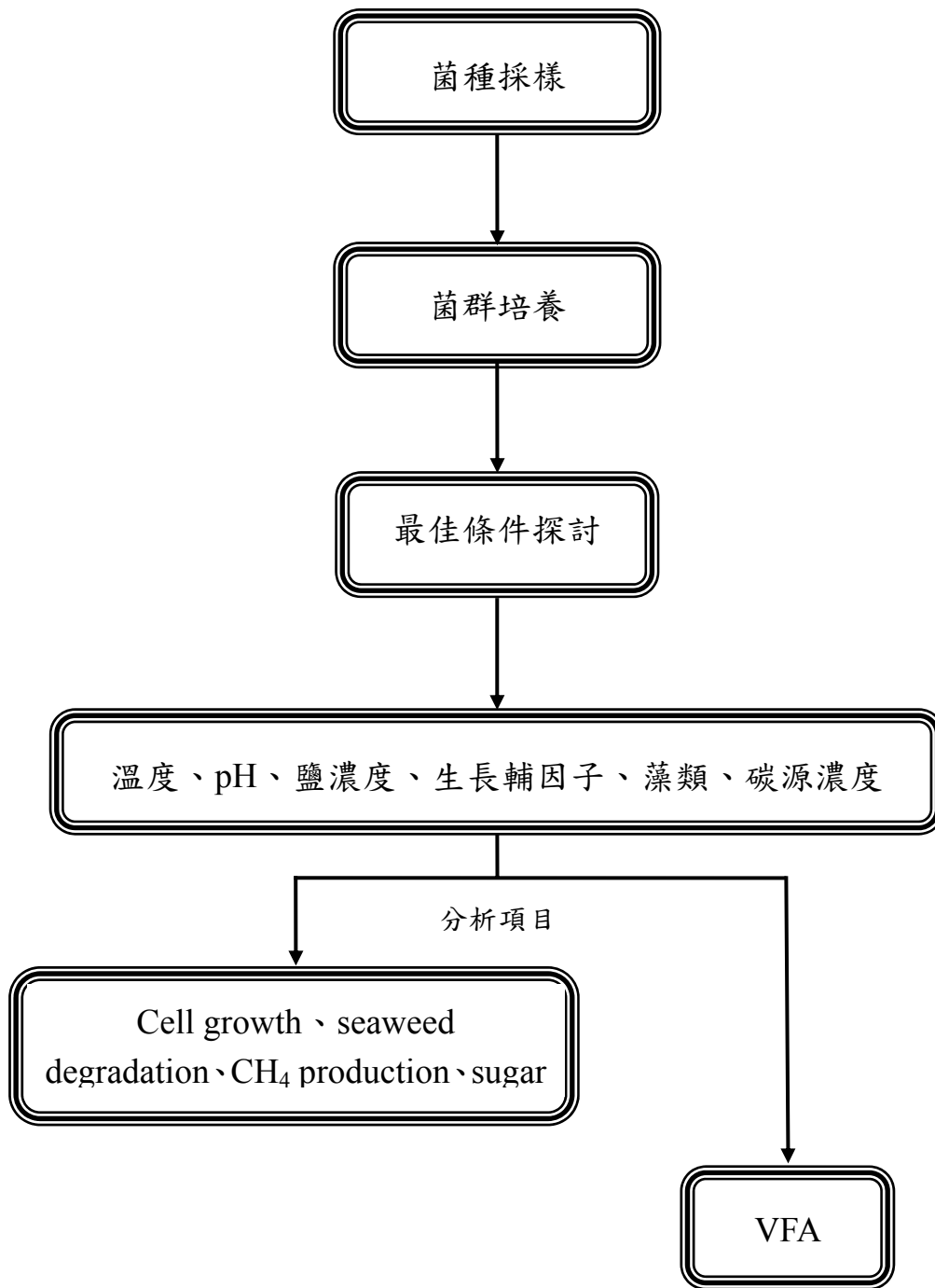


Figure 3.1 Flow chart of the experiment in this study.



Figure 3.2 Aerial photopictures of Kaomei wetland area at Taichung county



Figure 3.3 Photopicture of Kaomei wetland sampling site at Taichung county

爛的水草，有機物非常的豐富，判斷有非常多樣的菌種。於 2007 年 7 月退潮期間在採樣處，使用直徑 2.5 吋之採樣管柱挖取包含地表水至地面下 30 公分左右處的底泥，鹽度為 0 mg/L，水溫為 24°C，隨後立即以事先經紫外光照射殺菌之塑膠膜封住開口，攜回實驗室後以經紫外光照射殺菌之 1000 ml PE 採樣瓶將樣品混合後，轉種(inoculation)至添加 0.4 % 氯化鈉之厭氧培養基內，以龍鬚菜(*Gracilaria*)做為基質置於 37 °C 恆溫培養相中進行增富培養(enrichment)。

3.3 菌種培養

3.3.1 Hungate 除氧系統

本研究中厭氧菌群培養方法參考Hungate (Hungate, 1969)的方式來進行培養。此方法利用Hungate gas station(Figure 3.4)，以加熱包加熱填充銅絲之玻璃管柱，利用在高溫(250-270 °C)下氧氣會快速與銅絲結合，形成氧化銅(CuO)，去除氣體鋼瓶中之氧氣，達到無氧狀態。每次操作加氣站前，需先以 250 °C 的高溫下通入氫氣，用以還原氧化銅，使玻璃管中的銅絲持續保有與氧結合的能

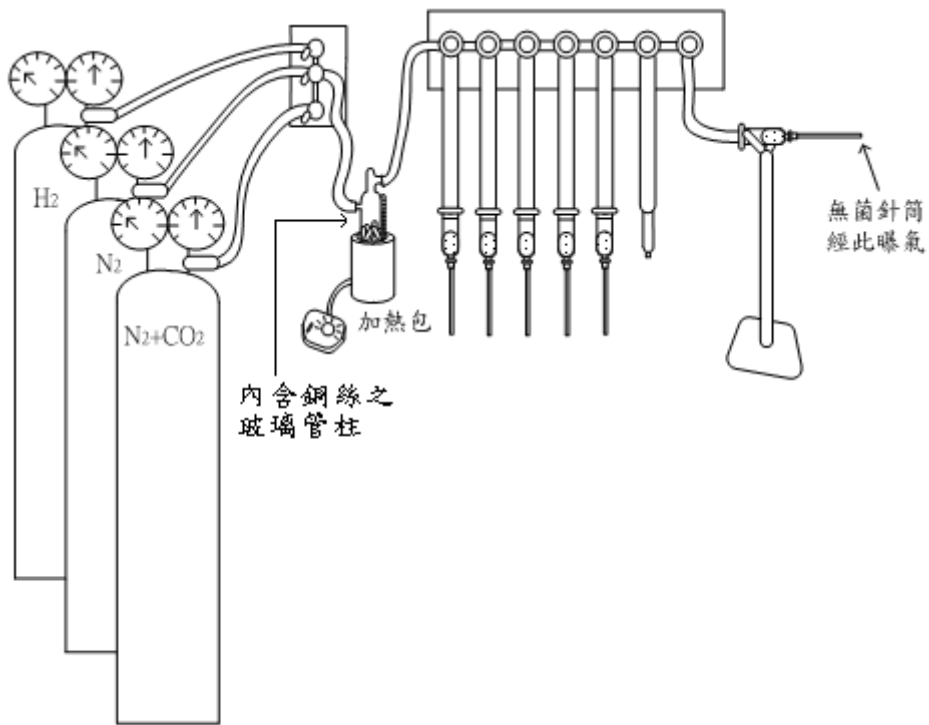


Figure 3.4 Configuration of Hungate gas station.

力，銅絲還原後再將所需氣體(如氫氣或混合氣)通入加氣站中，此時氣體內所含的氧即可與銅絲反應，達到無氧之氣體。

3.3.2 厭氧操作台

本研究中使用的厭氧菌群培養方式除使用上述的除氧系統外，還使用厭氧操作台(Anaerobic chamber, COY Laboratory Products Inc., Michigan, USA)進行菌群轉殖及培養基分裝等作業。操作箱維持在氫氣、二氧化碳及氮氣之混合氣體($H_2/CO_2/N_2 : 5/30/65$)之環境下，所有欲置入操作箱之物質均以 70 %酒精滅菌後，經換氣裝置後即可放入操作台內，操作台內放置有兩台含鉑片之催化裝置，可將不慎進入操作台內之氧氣與混合氣中之氫氣作用形成水，以確保操作台為無氧狀態。

3.3.3 厭氧培養基

本研究所使用的厭氧培養基(anaerobic medium, Huang *et al.*, 1998)均在厭氧操作程序下進行配製，培養基成分包含(L^{-1})：
 K_2HPO_4 ，0.40 g； $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ，0.05 g； $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ，0.10 g； $(NH_4)Cl$ ，1.00 g；Trace element solution，1.00 ml；Resazurin，0.0005

g ; L-Cysteine , 0.50 g ; NaHCO₃ , 3.80 g ; Na₂S · 9H₂O , 0.25 g 。

其中Trace element solution成分如下(L⁻¹) : concentrated HCl , 1.00 ml ; NiCl₂ , 0.05 g ; H₃BO₃ , 0.05 g ; FeCl₂ · 4H₂O , 2.00 g ; CuCl₂ , 0.03 g ; ZnCl₂ , 0.05 g ; Na₂MoO₄ · 2H₂O , 0.05 g ; MnCl₂ , 0.05 g ; CoCl₂ · 6H₂O , 0.05 g ; AlCl₃ , 0.05 g ; Na₂SeO₃ · 5H₂O , 0.10 g 。

本研究所使用的培養基配製操作步驟如下：先於圓底燒瓶中置入 3D水及 2~3 粒沸石，並於燒瓶壁上作一水位記號，加入上述除L-Cysteine、NaHCO₃、Vitamin solution和Na₂S · 9H₂O外之各培養基成分後，至少再加入 100ml 的 3D水，加熱使溶液沸騰蒸發至先前作記號的水面位置即可熄火，這期間持續以氮氣置換瓶頂空間之氣體。之後待溶液降至 60 °C左右依序加入L-Cysteine和NaHCO₃混合均勻後改以CO₂/N₂(20% : 80%)之混合氣體置換瓶頂空間之氣體直到培養基降至室溫，即可以n-butyl橡膠塞將瓶口封住並以白鐵絲綁緊密封，旋即以高溫高壓滅菌釜(121 °C、1.1 Kg/cm²，滅菌 15 分鐘)進行滅菌，即完成培養基之準備。碳源部分則先秤取所需的海藻重量置入Huangate tube或厭氧血清瓶中，同樣使用CO₂/N₂(20% : 80%)之混合氣體置換瓶頂空間之氣體，再以n-butyl橡膠塞與中空螺旋蓋或中空鋁蓋密封，維持厭氧狀態，以高溫高壓滅菌釜(121 °C、1.1 Kg/cm²，滅菌 15 分鐘)進行滅菌，即

完成碳源的前置準備。由於藻類若浸泡於液體中經高溫高壓滅菌會有水解的現象，因此本研究滅菌時藻類是以乾燥未浸泡於液體中之方式進行乾式滅菌，因此藻體並不會有水解之現象產生。

3.3.4 菌群培養

將事先配置好的厭氧培養基和裝有碳源的Huangate tube置入厭氧操作台中，於厭氧操作台中將裝有培養基之圓底燒瓶與碳源之Huangate tube打開，先於medium中加入 Na_2S 、peptone，使其最終濃度分別為 0.25 g/L、0.4 g/L，殖入 10 %的菌液混合均勻後，將medium分裝至裝有碳源之Huangate tube，再使用經滅菌的n-butyl 橡膠塞與中空螺旋蓋密封，最後將其置入 37 °C培養箱中進行培養。

3.4 分析方法與儀器

本研究於每一監測點，取出一培養管進行氣相甲烷量的分析後，拆管取 4ml 菌液進行菌群生長分析，剩餘之培養液用以分析海藻剩餘量、糖類，獲得最適培養條件後再進行 VFA 及產氣量分析。

3.4.1 菌群生長分析

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等多種方式。本研究所使用之碳源雖為固體物質(海藻)，但整個培養過程中海藻碎片經略微靜置後會沉澱至管底，在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。

3.4.2 甲烷生成量分析

本研究甲烷產量分析參考Sowers and Schreier所描述的方式進行量測。甲烷以氣相層析儀(Gas Chromatography, GC; GC-14B, SHIMADZU, Japan)，使用型號為DB-WAX(30 m×0.319 mm×0.5 μm)毛細管柱，以高純度氦氣作為載流氣體，分析條件為Injector temperature 200 °C、detector temperature 250 °C、column temperature 40 °C，使用火焰離子偵測儀(flame ionization detector, FID)偵測甲烷量。製備甲烷檢量線時，取 100 μl配製好的不同甲烷濃度(10, 20,

40 μM) 注入氣相層析儀中，檢測所配置的濃度範圍是否具有線性，若高濃度部分曲線變平，則需調降偵測器的靈敏度，使檢量曲線具有線性。使用氣體注射針重複三次注入 100 μl 高純度甲烷氣體(99.99%)標準品可獲得其甲烷積分面積(peak area)。先利用理想氣體公式計算甲烷莫耳數：甲烷莫耳數(moles of CH_4)=[壓力(atm) \times 注入標準品體積(100 μl)] \div [0.082 \times 溫度(K)]。利用理想氣體公式所求得的甲烷莫耳數求校正因子，校正因子(Calibration factor, CF)=[moles of CH_4 \div 注入標準品體積(100 μl)] \div 標準品 peak area。接下來即可進行樣品的分析，使用裝有氣密閥的氣體注射針抽取 100 μl 的瓶頂氣體(headspace gas)，將樣品注入氣相層析儀，最後利用分析所得的積分面積以下列式子計算即可得總甲烷莫耳數，甲烷莫耳數(moles of CH_4 , 100 μl)=peak area of sample \times CF。瓶頂空間之總甲烷莫耳數(moles of CH_4 , total)=[瓶頂空間體積(liters) \div 注射體積(100 μl)] \times moles of CH_4 , 100 μl 。

而菌群利用藻類轉化為甲烷轉化率之計算先以理想氣體公式換算所生成之甲烷濃度於培養溫度時之甲烷體積，再以 3-1 式將所得之甲烷體積與實驗所得之海藻降解量進行計算，即可得甲烷轉換率。

$$\text{Methane transform rate} = \frac{\text{Accumulated methane volume}}{\text{Seaweed consumption}} \quad (3-1 \text{ 式})$$

(Sowers and Schreier, 1995)

3.4.3 海藻重量分析

培養基中海藻剩餘量分析利用測量剩餘海藻乾種方式，將取出分析菌群生長後剩餘之培養液參考環檢所公告之水中總溶解固體及懸浮固體檢測方法-103°C~105°C乾燥(NIEA W210.57A)中之懸浮固體檢測方法，將海藻以 105 °C烘乾並秤重後之 1.2 μm孔徑濾紙過濾，再將含有海藻之濾紙以 105 °C重複烘 1 小時、冷卻、秤重步驟直到恆重為止或前後兩次之重量差需在 50 mg範圍內或小於前重之 4%，再將所得之重量與過濾前之濾紙重相減即可得海藻剩餘量。

3.4.4 總糖分析

本研究以酚-硫酸法(Phenol-sulfuric Acid) Dubois *et al.*, 1956) 測定樣本中總糖濃度。先將樣品取出以 13000 rpm 離心 10 分鐘去除懸浮固體及細胞，取上澄液適當稀釋，取 1 mL 樣品或稀釋液置於試管中，分別加入 0.5 mL 5 %酚及 2.5 mL 濃硫酸(98%)，而以 1

mL 蒸餾水取代樣品或稀釋液為空白校正，待反應冷卻，以分光光度計波長 488 nm 偵測其吸光值，將吸光值帶入以葡萄糖為標準品製作的檢量線求其含糖量。

3.4.5 還原糖分析

還原糖濃度測定主要參考吳氏修正之DNS法(吳氏，2006)，使用Dinitrosalicylic acid (DNS, 3, 5-二硝基水楊酸)試劑，此修正法移除原Miller氏所發表之方法中之酚及Sodium sulfite (Miller, 1959)。此方法為利用含有醛基 (CHO) 的糖類具有還原力，能將 3, 5-二硝基水楊酸還原成 3-氨基-5-硝基水楊酸。DNS法主要就是利用DNS試劑中的 3, 5-二硝基水楊酸與還原糖之間地呈色反應，作為判斷還原糖多寡的標準。DNS試劑成分如下 (100 mL^{-1})：3, 5-Dinitrosalicylic acid，1.0 g；K-Na-tartrate- $4\text{H}_2\text{O}$ (酒石酸鉀鈉)，30 g；NaOH，1.6 g。配置DNS試劑時先將NaOH、酒石酸鉀鈉溶解於水中，再秤取 3, 5- Dinitrosalicylic acid使其溶解於水中後以蒸餾水定量至 100 mL，使用前保存於 4°C 。

先取 0.5 mL 經離心的澄清消化液於試管中，加入 0.5 mL DNS試劑後，置於沸水中反應(隔水加熱法)10 分鐘後，迅速置於冷水中冷卻，以中止反應，使用分光光度計 (spectrophotometer;

SHIMADZU, UVmini-1240)以 540 nm 波長測定反應液吸收值，再與標準曲線轉換得相當的還原糖量。由於本研究所使用之基質為藻類，而藻類所含有的藻膠物質如洋菜及鹿角菜膠主要組成單元為半乳糖，因此選用半乳糖作為還原糖之標準品。

3.4.6 液相成分分析

本研究除利用上述方法分析液相中總糖和還原糖含量外，亦利用液相層析儀 (Liquid Chromatography; CTO-10A, SHIMADZU, Japan)連接型號為ICSep ICE-COREGEL 87H3 (300 mm×7.8 mm)的管柱控制於 35 °C，流洗液為 0.008 N H₂SO₄，流速為 0.6 mL/min，使用折射率偵測器(Refractive Index Detector; RID-10A, SHIMADZU, Japan)進行分析定性及定量糖類與揮發性有機酸。

3.4.7 產氣量分析

本研究於產氣量分析部份是於每一分析點將累積氣體導出至 PV 針筒中並計量總產氣量，將氣體導出使壓力平衡至 1 大氣壓(1 atm)後所量測到之甲烷莫耳數利用理想氣體公式可求得甲烷氣體之體積。

3.5 甲烷生成反應最適化探討

針對菌群降解海藻並產生甲烷的最適條件進行探討。程序最適條件探討包括溫度、鹽濃度、pH值、輔助因子、基質濃度、不同基質等測試，定時檢測其OD_{600 nm}、累積的甲烷生成量、海藻剩餘量、總糖或還原糖。每一培養條件為一組，每一組至少為 12 管，每管培養體積均為 10 mL，並進行二重複。各批次實驗皆以菌液再培養至海藻開始明顯降解，約培養兩天作為植種來源以進行下列各試驗。

3.5.1 生長溫度

對於微生物的生長，溫度是一重要的影響因子，當培養於適當的溫度條件下菌株的生長量及甲烷的生成量會有正向的結果。雖然海洋混合層之水溫範圍於 23-28°C 之間，且採樣時之現場溫度為 24°C，但於冬季且退潮時，採樣地點受空氣溫度影響可能實際溫度會較採樣時之溫度低，因此為了解本研究微生物族群是否具有耐受低溫之菌群，以便了解後續欲分析樣品於分析前保存溫度是否需調整以及確認培養於低溫時，菌群是否仍保有降解海藻並產生甲烷之能力。因此本實驗對於菌群生長溫度條件的檢測範圍

為 4、25- 55 °C 之間，以 5 °C 為一間隔，分別培養一組未植種空白及兩組植種之實驗組。

3.5.2 生長鹽濃度

大部分的微生物在生長時並不需要有鹽度，但部分微生物對鹽度有較高的需求，尤其是生長在海邊或鹽山等特殊環境下的微生物對鹽度的需求更是不同於一般的微生物，而本研究所使用的混合菌群來源為淡水及海水交界的濕地地區之底泥，雖本研究於採樣當時所做之鹽度分析為 0 %，但採樣當時為退潮時期，故為了解鹽度對於本研究所使用的菌群是否為影響因子，因此設計此一鹽度實驗。本實驗對於菌群生長鹽度測試濃度為 0、0.5、1、2、3、4 和 5 %，分別培養一組未植種空白及兩組植種之實驗組。

3.5.3 生長 pH 值

酸鹼度會影響菌群生長速率甚至會抑制生長，因為 pH 值過高或過低的環境下，會影響酵素系統，降低微生物生長的活性，而大部分的細菌為嗜中性(Neutrophiles)，且經分析後可知培養之混合菌群中含有甲烷生成菌群，大多數的甲烷生成菌在中性環境下有

較佳的生長速率。故為測試此培養菌群適合之pH範圍，利用調整培養基中原本即有添加的 NaHCO_3 的量來改變起始pH值，本研究以 NaHCO_3 進行調整起始之pH值，但由於培養瓶之瓶頂氣體中含有 CO_2 ，液相中之 HCO_3^- 與氣相中 CO_2 形成碳酸緩衝系統，因此使用 NaHCO_3 除可調整起始之pH值，還可形成緩衝系統以維持培養過程中之pH值。每一測試pH值分別培養一組未植種空白及兩組植種之實驗組。

3.5.4 生長輔因子

酵母菌萃取物 (yeast extract) 與水解蛋白質 (peptone) 是廣為所知的生長輔助因子提供者，可提供菌群營養來源，增進微生物的生長，但不同菌群適用的輔助因子亦不同。為測試較適合本培養菌群之輔助因子，因此分別以無添加 yeast extract 及 peptone、有添加 yeast extract 但無添加 peptone、無添加 yeast extract 但有添加 peptone 與有添加 yeast extract 及 peptone，四種組合進行探討，而 yeast extract 與 peptone 添加量均為 1 g/L。分別培養一組未植種空白及兩組植種之實驗組。

3.5.5 不同海藻濃度

為測試菌群降解海藻之耐受濃度，因此本實驗將菌群分別植入含有 0、0.5、1、2、3、4 和 5 g/L 的不同海藻濃度的培養基中，分別培養一組未植種空白及兩組植種之實驗組。

3.5.6 不同藻類利用

一般藻類可分為綠藻、褐藻及紅藻三大類，又以褐藻和紅藻的成分組成較為相似，以藻膠(algin)為主。雖藻膠組成分子不同，但均不含木質素並僅含微量(2-10%)纖維素，褐藻與紅藻的藻膠物質分別主要為褐藻膠與洋菜和鹿角菜膠，而此三種藻膠物質主要的組成單糖類皆為半乳糖，因此本試驗為進一步了解培養菌群對不同藻類的利用情形，故分別使用濃度為 4 g/L 的龍鬚菜與馬尾藻作為培養碳源，進行本試驗以測試本培養菌群是否會降解不同組成分子之藻膠並產生甲烷。

第四章 實驗結果與討論

4.1 龍鬚菜降解混合菌群增富(Enrichment)

本研究採用台中縣高美溼地底泥菌群作為海藻分解生菌群來源。將底泥培養再以龍鬚菜作為碳源的厭氧培養基內置於 37°C 下增富培養混合菌群。增富培養過程中，培養基內之龍鬚菜於 8 天內被菌群分解至中空片狀小段狀，而未植菌的培養瓶中之龍鬚菜之外觀仍維持完整(Figure 4.1)，因此確定此混合菌群中含有海藻糖分解酶產生菌才可將龍鬚菜分解。

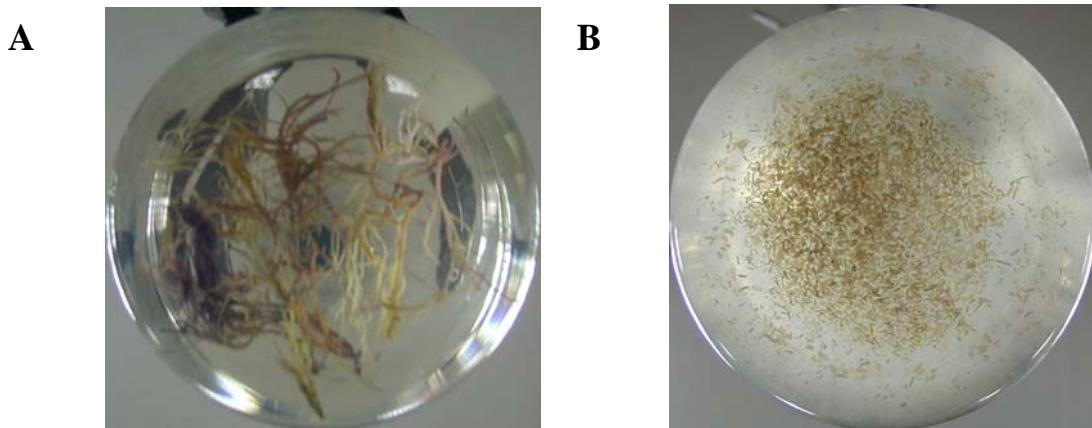


Figure 4.1 Degradation of seaweed by enriched anaerobic mixed bacterial culture after 8 days. 1 g/L *Gracilaria* fragments was used as sole carbon source in medium. The culture was incubated at 37°C. (A) Uninoculated culture (B) Inoculated culture.

4.1.1 海藻降解測試

為進一步了解此研究菌群降解海藻之能力，因此以添加 0.2% 氯化鈉與 peptone 0.04 g /L 於 pH 為 7.2 之 medium 培養此研究菌群，利用龍鬚菜為培養的碳源，於溫度 37°C 下培養，進行觀察及海藻降解測試。於培養期間，定期以拆瓶方式分析剩餘海藻之乾重。

Figure 4.2 為 9 天實驗過程中培養基中經烘乾之龍鬚菜，可以明顯觀察到有植入研究菌群之培養基中其龍鬚菜隨時間之變化過程，龍鬚菜由原本完整實心的絲狀逐漸變成中空絲狀，經過濾烘乾會平貼於濾紙上，培養至末期龍鬚菜最後形成由薄片所圍成之中空小段，經過濾烘乾同樣會平貼於濾紙上。而無植菌之培養基中之龍鬚菜仍維持原有之形狀。由剩餘海藻重量分析(Figure 4.3)可知，植入研究菌群的培養基中的龍鬚菜經培養一天後含量有明顯的減少情形，培養 2 天內龍鬚菜被快速降解，降解量約為 50%，降解速率為 $0.23 \text{ g } Gracilaria \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ ，其後龍鬚菜仍被緩慢降解，培養至第 12 天龍鬚菜總降解量為 80%。故由此降解測試可知，本研究所選擇之研究菌群具有分解龍鬚菜作為碳源之能力。

Blank (Uninoculated culture)



Experimental (inoculated culture)

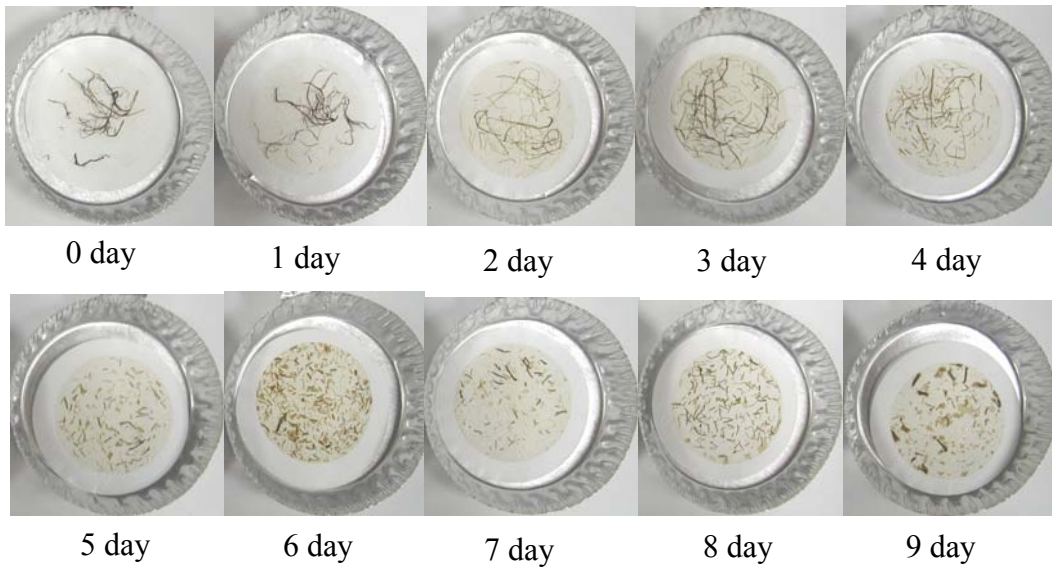


Figure 4.2 Biodegradation of seaweed *Gracilaria* in medium by anaerobic mixed microorganisms. 1 g/L of *Gracilaria* were used as sole carbon source and remaining seaweed in medium was filtered and dried at 105°C till constant weight. Upper part of this figure showed the non-degraded seaweed in the uninoculated culture while lower part showed degraded seaweed in the inoculated culture after 9 days.

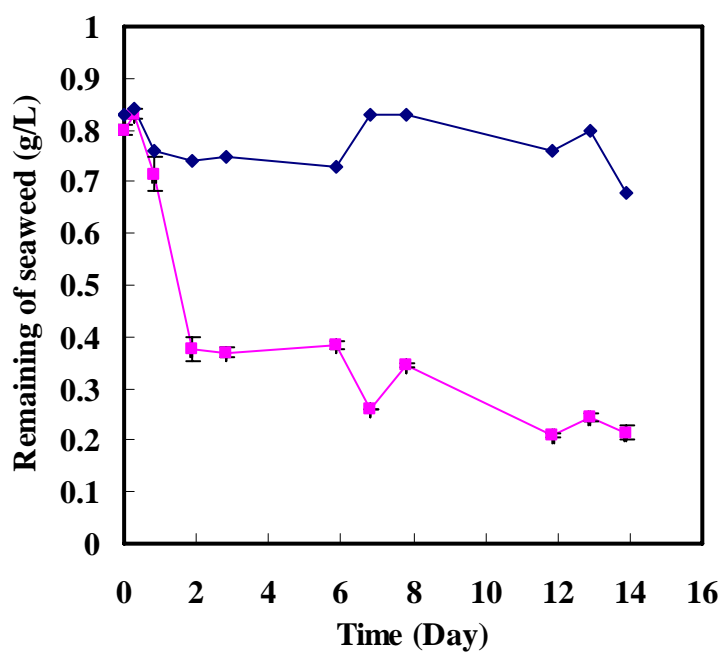


Figure 4.3 Dry weight lose of seaweed (in 1 g/L) during anaerobic biodegradation of *Gracilaria*. Symbols: ■, inoculated culture; ◆, uninoculated blank. The pH value of medium is 7.2, sodium chloride is 0.2% and incubated at 37°C. (n=2)

4.1.2 甲烷生成測試

厭氧醱酵有機物最終礦化產物為甲烷及二氧化碳(Henze *et al.*, 1997)，其中的甲烷可作為燃料來源，且由生物厭氧產生的生物氣體(Biogas)成分也較天然氣單純，對於後續的使用更為方便及有利(Schink, 1997; Bhatia, 1990)。Figure 4.4 A 為利用 GC-FID 分析甲烷標準品之圖譜，其滯留時間為 1.00 min；分析經培養之研究菌群降解龍鬚菜之氣相中亦有一產物，其滯留時間與甲烷標準品之圖譜相符(Figure 4.4 B)，故可發現本研究菌群可降解龍鬚菜並產生甲烷，因此利用氣相層析儀偵測研究菌群之甲烷產物。

為了解本研究菌群生成甲烷之能力，以添加 0.2%氯化鈉與 peptone 0.04 g /L於pH為 7.2 之medium培養此研究菌群，利用龍鬚菜為海藻基質培養的碳源，於溫度 37°C下培養，於培養期間，以GC-FID進行氣相產物之分析。Figure 4.5 顯示出未植種之空白組(blank)在培養前後皆無甲烷生成，培養基中龍鬚菜之結構與含量亦無變化；而有植種之實驗組(inoculated culture)依據培養時間增加，甲烷有累積生成之現象(Figure 4.5)，培養至第 16 天總生成 1217.58±9.67 mmole CH₄，甲烷總累積產量為 30.95±0.49 L，綜合龍鬚菜降解之初步資料，本研究菌群降解龍鬚菜轉化為甲烷之轉化率為 50.15±0.03 L CH₄/g seaweed。由此可以知在由高美溼

地底泥中馴化出之海藻降解混合菌群中含有甲烷生成菌，因此在龍鬚菜降解過程中含有甲烷氣體生成，是故本研究以不同的生長條件下，除探討海藻降解及生長情形之外，並進行甲烷產量分析。

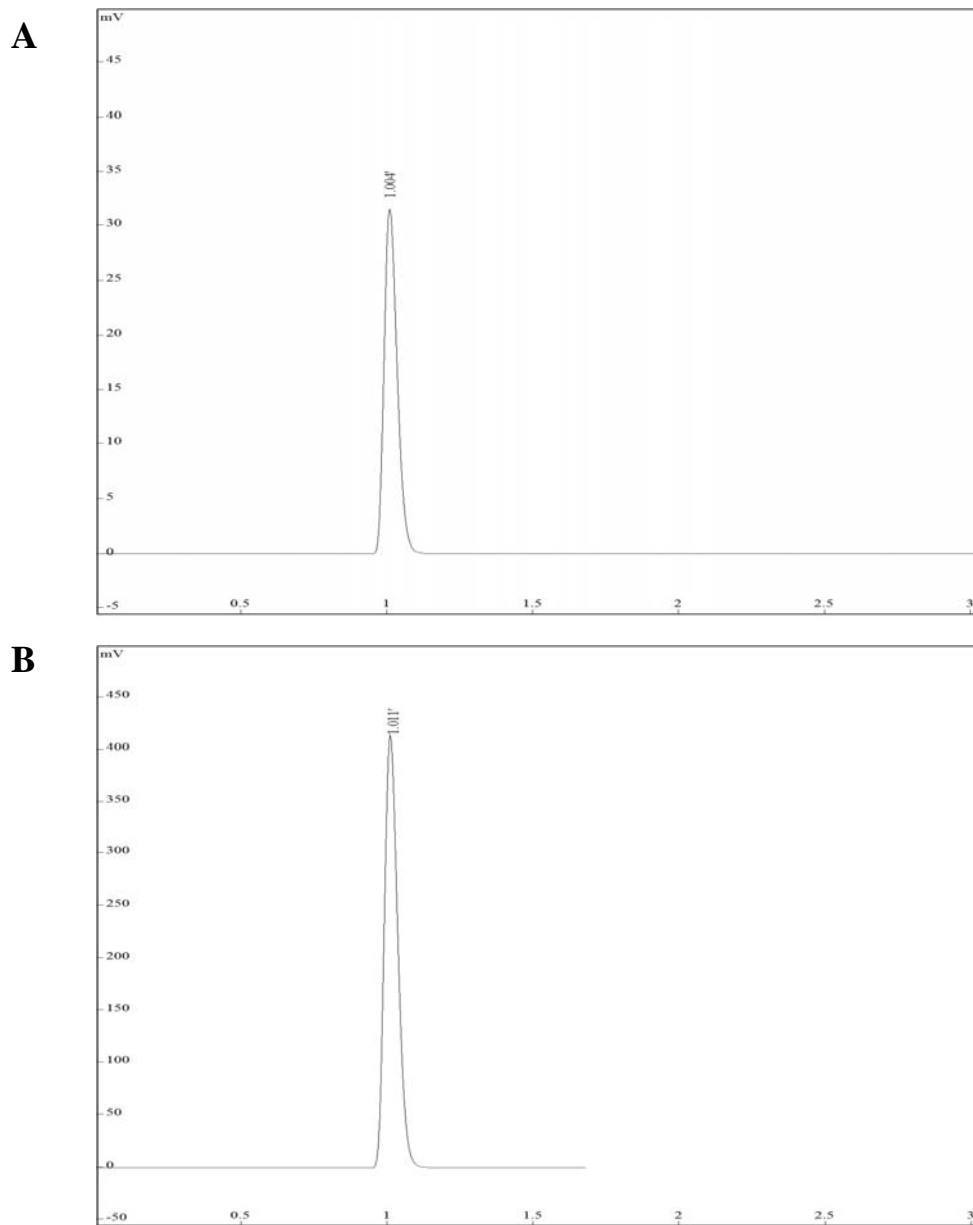


Figure 4.4 Gas Chromatograph of methane standard gas (A) and headspace gas of *Gracilaria* degradation mixed culture (B). Injection volume of sample was 100 μ l.

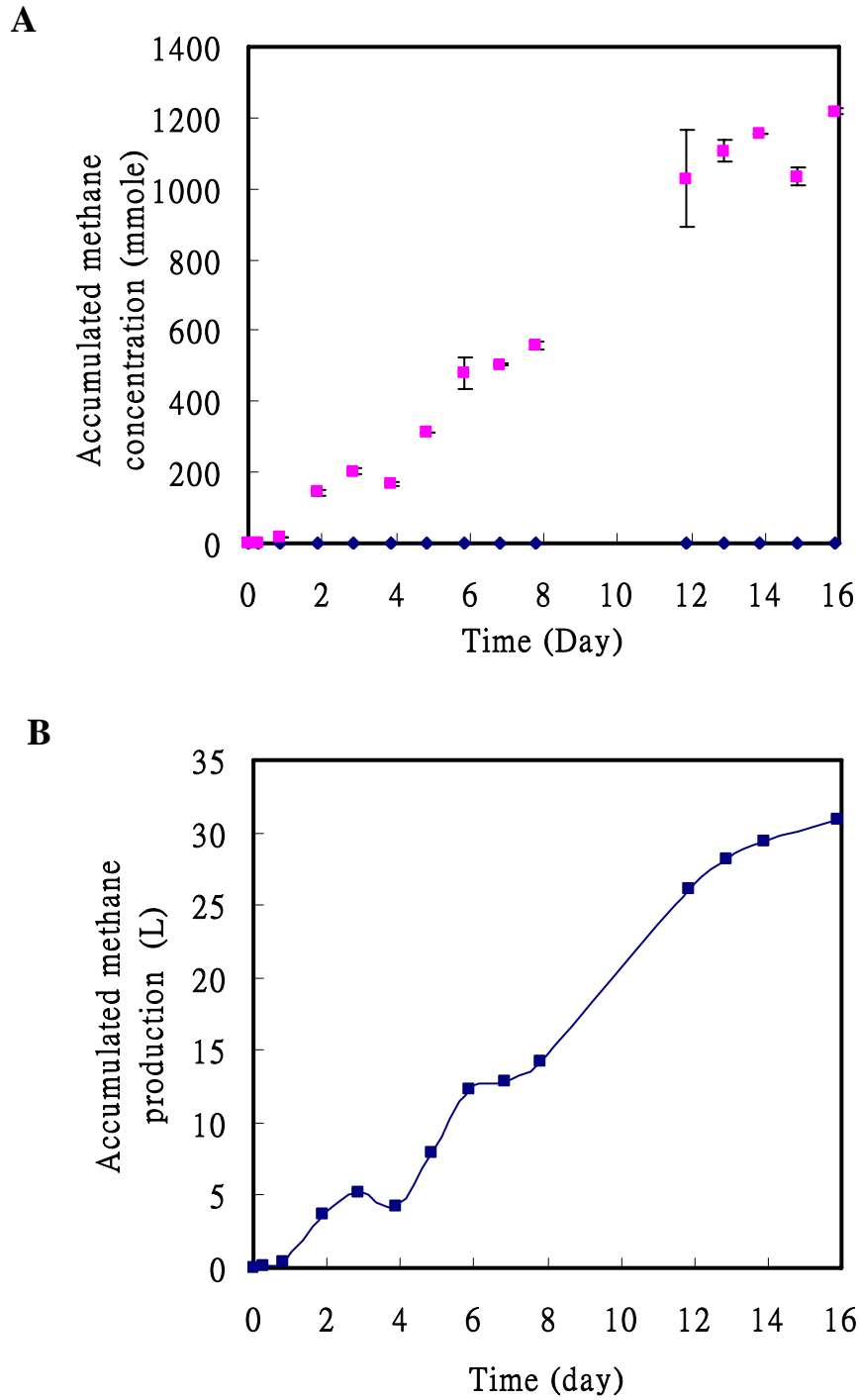


Figure 4.5 Methane production from fermentation of seaweed *Gracilaria*. (A) Accumulated methane concentration, (B) accumulated volume of methane produced in cultural headspace. Symbols: ■, inoculated culture; ◆, uninoculated blank. The pH value of medium is 7.2, sodium chloride is 0.2% and incubated at 37°C. (n=2)

4.2 龍鬚菜降解甲烷化最適條件探討

探討混合菌群最佳生長條件，探討的因子包含溫度、鹽濃度、pH 值與輔因子添加等因素，以混合菌群之海藻降解與甲烷產率進行探討不同培養條件下，對於海藻降解與甲烷生成的影響。

利用微生物之比生長速率作為分解龍鬚菜最佳反應條件之依據之一。微生物之生長速率與微生物總數之總比值稱為比生長率，即單位微生物量之生長速率。取對數生長期(Log Phase)之吸光值，依照 4-1 式換算(徐及李，1995)，求取各不同生長條件下之比生長速率，最後將換算所得數據作圖以求得最佳生長條件。

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \rightarrow \frac{dX}{X} = \mu dt$$

$$\text{積分} \rightarrow \int_{X_0}^X \frac{dX}{X} = \mu \int_0^t dt$$

$$\ln X - \ln X_0 = \mu t$$

$$\ln X = \mu t + \ln X_0 \quad (4-1)$$

μ : specific growth rate

t : incubation time

X and X_0 : represent cell concentrations at time t and t_0

將 log phase 之吸光值取自然對數與時間(t)做圖，取點間趨勢線，所得之方程式斜率即為比生長速率(μ)。

4.2.1 溫度

培養的溫度會影響菌群生長並間接影響副產物或最終產物的生成量，而微生物的酵素活性會隨生長溫度上升而增加，直到一最高溫度而後快速下降。因此首先以不同溫度進行培養探討最佳培養溫度，以獲得菌群生長與代謝速度最佳狀況的環境下再進行其他因子的探討。故本實驗以 1 g/L 的龍鬚菜作為碳源，以添加氯化鈉與 peptone，最終濃度分別為 0.2% 與 0.04 g/L 之培養基 (pH 7.2) 進行培養。每一培養溫度為一組，每一組至少為 12 管，每管培養體積均為 10 ml，並進行二重複，在 4、25、30、35、40、45、50、55°C 的溫度下培養 7 天，測試不同培養溫度對菌群生長、海藻降解與甲烷生成之影響。

在龍鬚菜降解部分以過濾烘乾的方式測定培養基中剩餘之龍鬚菜量 (Figure 4.6 A)。培養至第 7 天時，未植種的空白組內之龍鬚菜形狀完整，而在植種之實驗組中，發現以 4°C 培養時，龍鬚菜並沒有明顯被降解的情形，培養至第 7 天仍有 0.90 ± 0.03 g/L 之龍鬚菜，龍鬚菜於培養基中仍保有完整之形狀。在 25°C 培養時，有 2 天的遲滯期，培養至第 7 天時，龍鬚菜剩餘量為 0.56 ± 0.03 g/L，龍鬚菜外觀形態於第 3 天開始出現不完整，至第 7 天呈現破碎之薄片狀。而在 30°C、35°C、40°C、45°C、50°C 與 55°C 培養時，則

無遲滯期，以 30°C 與 35°C 培養第 3 天開始龍鬚菜有被菌群降解破碎之情形發生，直至第 6 天時，龍鬚菜僅剩 0.32 ± 0.03 g/L。而以 40°C 與 45°C 培養時，直到培養 5 天時龍鬚菜才有觀察到略為被降解產生破碎之情況。另 50°C 與 55°C 培養時，雖龍鬚菜含量有下降之趨勢，但就以龍鬚菜外觀之觀察並無明顯被菌群降解的情形，培養至第 7 天龍鬚菜之外觀與未植種之外觀並無顯著差異。不同溫度下海藻降解之速率有明顯的差異(Figure 4.6 B)。培養於 30 與 35°C 時，有最佳的海藻降解速率，分別為 0.14 ± 0.01 與 0.13 ± 0.01 g *Gracilaria* · L⁻¹ · day⁻¹。

菌群生長情形以 OD_{600nm} 表示(Figure 4.7 A)，在 30°C 與 35°C 培養時，有較高的生長量，所造成的 OD_{600nm} 分別有 0.408 ± 0.019 與 0.407 ± 0.012 ，而培養於 4°C、20°C 與 55°C 有最低的生長量，OD_{600nm} 分別為 0.293 ± 0.007 、 0.320 ± 0.009 與 0.303 ± 0.010 。除 4°C 的培養有略為遲滯期外，其他培養溫度下，均無遲滯現象。除在 25°C 與 40°C 下，培養至第 2 天時達最大生長菌量，而 4、30、35、45、50 與 55°C 下，均需培養至第 3 天時可達最大生長菌量。取菌群對數生長期(log growth phase)之 OD₆₀₀ 計算比生長速率可得 Figure 4.7 B，由比生長速率可知，在 35°C 的培養溫度下有最高的比生長速率 0.46 ± 0.11 day⁻¹，其次為培養於 25、30 與 40°C 時，最低比生長速

率為 $0.19 \pm 0.01 \text{ day}^{-1}$ ，而培養於 4、45、50 與 55°C 時之比生長速率最低，最高僅 $0.11 \pm 0.03 \text{ day}^{-1}$ 。由上述可知，對此菌群在 35°C 時有最佳的生長速率。

由最終產物甲烷生成量進行產探討，如Figure 4.8 A所示，培養於 4、45、50 與 55°C 時，並無顯著的甲烷生成，分別為 13.51 ± 0.70 、 26.62 ± 0.17 、 7.07 ± 0.80 與 $3.36 \pm 0.03 \text{ mmols CH}_4$ ，而以 25、30、35 與 40°C 培養時，有較高之甲烷生成量，培養至第 7 天時，累積甲烷生成量分別為 404.87 ± 25.21 、 566.63 ± 6.19 、 694.76 ± 61.80 與 $792.96 \pm 26.41 \text{ mmols CH}_4$ 。由甲烷生成速率，如Figure 4.8 B所示，可知 $30\text{-}40^\circ\text{C}$ 的培養溫度有較高的甲烷生成速率，甲烷生成速率依序分別為 118.72 ± 0.08 、 133.78 ± 20.00 、 $114.56 \pm 0.15 \text{ mmols CH}_4 \cdot \text{day}^{-1}$ 。其次為培養於 25°C 下，甲烷生成速率有 $61.65 \pm 1.47 \text{ mmols CH}_4 \cdot \text{day}^{-1}$ 。而培養於 4、45、50 與 55°C 時之甲烷生成速率為較低，尤以 4、50 與 55°C 培養時之甲烷生成速率最低，均低於 $10 \text{ mmols CH}_4 \cdot \text{day}^{-1}$ 。由甲烷生成速率可知，此菌群在 $30\text{-}40^\circ\text{C}$ 的培養溫度下有最佳甲烷生成速率。而菌群利用龍鬚菜轉化為甲烷之能力，由Figure 4.8 B可發現，甲烷轉化率隨溫度增加而加快，但當培養溫度高於 45°C 時，菌群轉化甲烷的能力快速下降。在甲烷轉化率的部份為培養於 40°C 下之轉化率

$44.24 \pm 2.94 \text{ L CH}_4 \cdot \text{g seaweed}^{-1}$ 為最佳，此與甲烷生成速率的最佳溫度略有差異，因為培養至第 7 天時， 40°C 之培養甲烷生成濃度有異常之增加，是故導致在計算甲烷轉換率時造成此差異。而在甲烷最佳條件的選擇為避免因特殊因素所導致的異動，因此仍以甲烷生成速率為主要參考。

龍鬚菜經分解所產生的總糖部份(Figure 4.9 A)，培養在 4、25、30 與 35°C 時培養基中總糖濃度最低，不到 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。培養於 40°C 時，培養至第 2 天開始至第 7 天時，總糖濃度維持在 60-70 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 之間。而 $45\text{-}55^\circ\text{C}$ 的培養溫度下，培養基中的總糖濃度較高。而還原糖(Figure 4.9 B)濃度起始較高，但皆在培養 2 天內降至 50 mg/L 左右，整個反應至末期除培養於 45°C 時還原糖濃度有再升高之現象，其餘之培養皆無太明顯之增減發生。由醣類分析可知，雖然在 50°C 以上的培養溫度下，龍鬚菜降解情況不佳，甚至與無植種的空白組相似，由於龍鬚菜於培養基中其所含之糖類即會溶出於溶液中，而在高溫環境下可能會增加龍鬚菜溶出的糖量，而可利用分解龍鬚菜所產生之有機物之菌群在較高溫的環境下活性較差，無法有效快速利用溶出的醣類將之分解成小分子醣類，因此形成較高溫的培養溫度下之有較高的殘留總糖濃度，而於 45°C 之培養，混合菌群中轉換大分子醣類成小分子醣類之菌群活性較

50°C以上之培養略佳，仍能將溶出之大分子醣類轉換成小分子醣類，但可利用小分子醣類之菌群活性較差無法有效利用所產生的小分子醣類，因此隨培養時間增加累積的還原糖濃度亦增加。

綜合上述，培養於 30°C前不論是龍鬚菜降解速率、菌群生長速率或甲烷生成速率均有隨溫度上升而增加的情形。培養於 30 與 35°C時，可達最佳海藻降解速率，而菌群生長速率及甲烷生成速率均以 35°C時為最佳。但高於 35°C後，龍鬚菜降解速率明顯下降，說明此混合菌群中分解龍鬚菜之菌群並不適合生長於較高溫的環境下，同樣的甲烷生成速率亦有下降之情形，顯示此混合菌群中之甲烷生成菌群亦不適合生長在高溫的環境下。是故考量甲烷生成速率與海藻降解速率之因素，後續實驗選擇以兩者均有良好效能之溫度 35°C為最適溫度進行研究。

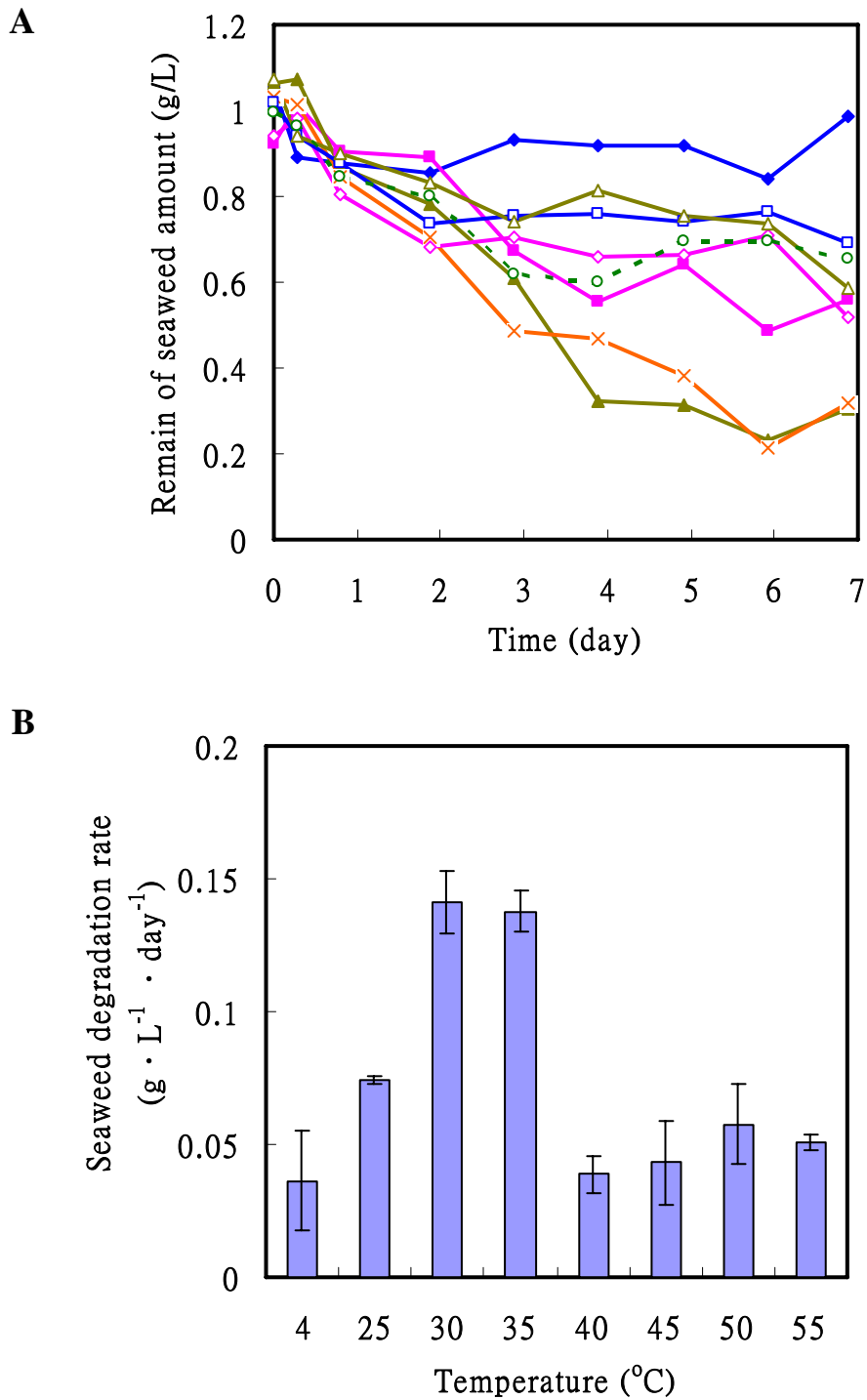


Figure 4.6 *Gracilaria* degradation (A) and gracilaria degradation rate (B) of mix cultures at different temperatures: 4 $^{\circ}\text{C}$ (\blacklozenge), 25 $^{\circ}\text{C}$ (\blacksquare), 30 $^{\circ}\text{C}$ (\blacktriangle), 35 $^{\circ}\text{C}$ (x), 40 $^{\circ}\text{C}$ (\diamond), 45 $^{\circ}\text{C}$ (\square), 50 $^{\circ}\text{C}$ (\triangle), 55 $^{\circ}\text{C}$ (\circ). Cultivation was conducted in 10 mL of liquid medium with 1 g/L of *Gracilaria*. The tests were run duplicate at each temperature.

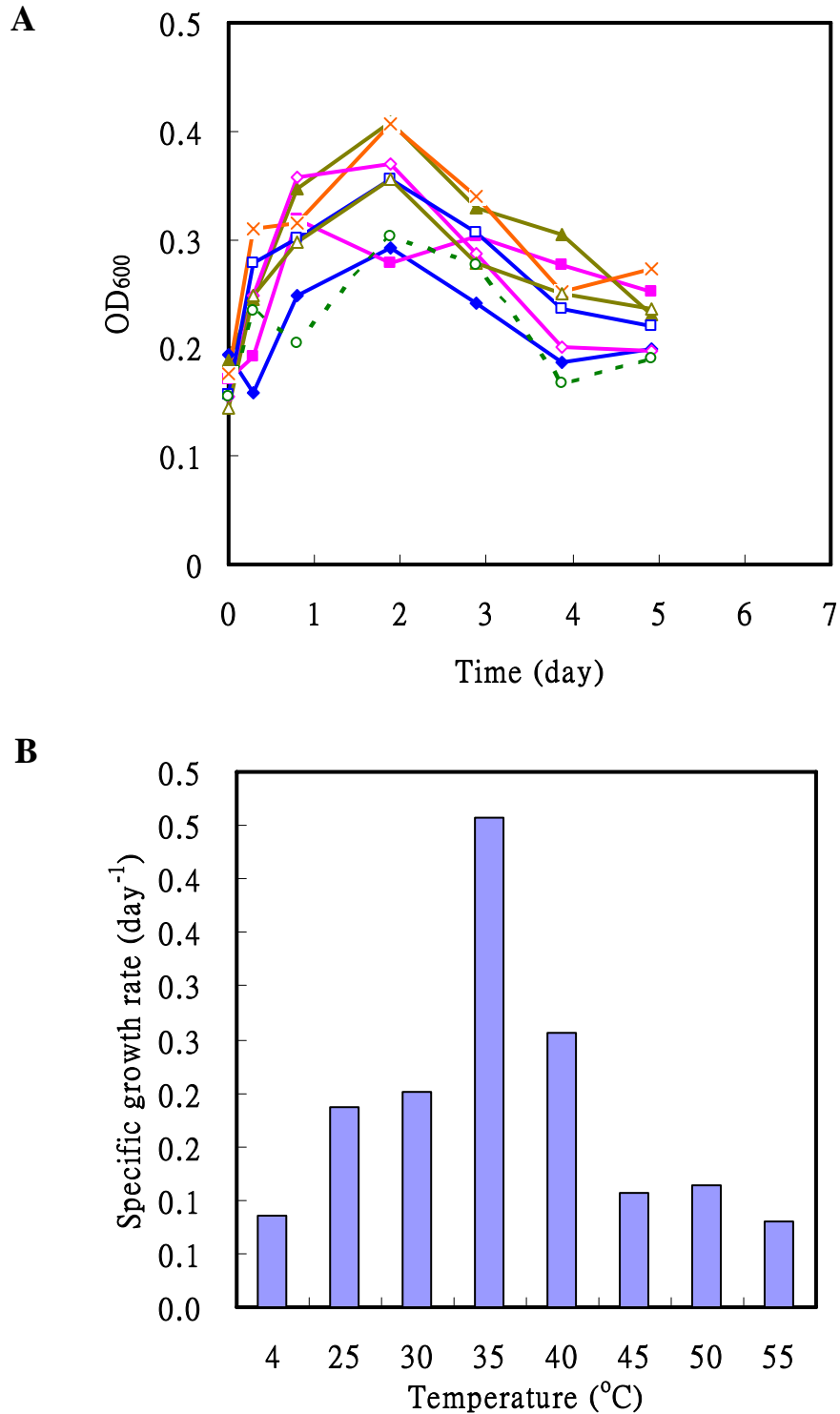


Figure 4.7 Growth (A) and Specific growth rate (B) of mix cultures at different temperatures: 4°C (◆), 25°C (■), 30°C (▲), 35°C (x), 40°C (◇), 45°C (□), 50°C (△), 55°C (○). Cultivation was conducted in 10 mL of liquid medium with 1 g/L of *Gracilaria*. The tests were run duplicate at each temperature.

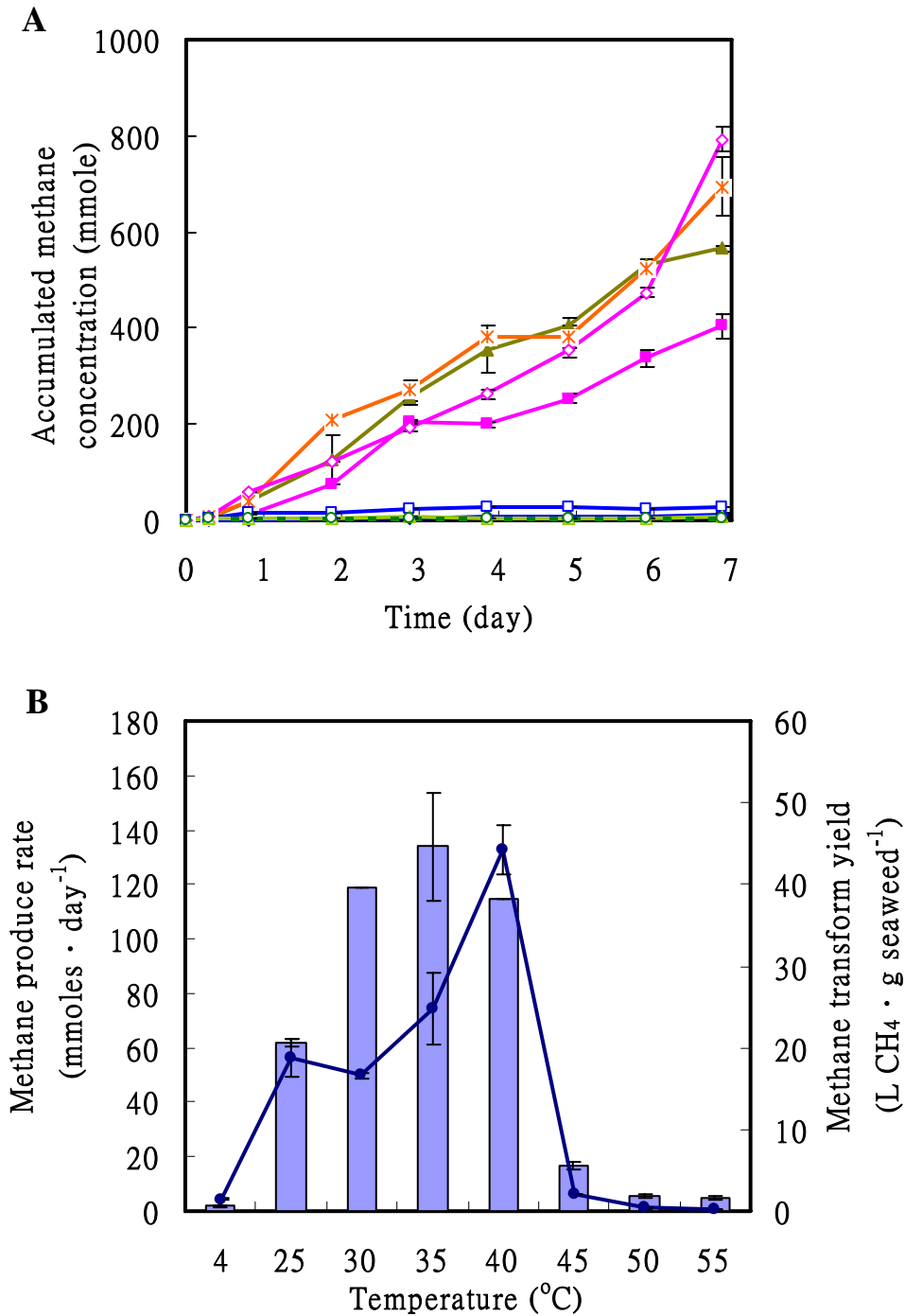


Figure 4.8 Methane production (A), methane produce rate (bar) and methane transform yield (broken-line)(B) from *Gracilaria*-degradation by mix cultures at different temperatures: 4°C (◆), 25°C (■), 30°C (▲), 35°C (x), 40°C (◇), 45°C (□), 50°C (△), 55°C (○). Cultivation was conducted in 10 mL of liquid medium with 1 g/L of *Gracilaria*. The tests were run duplicate at each temperature.

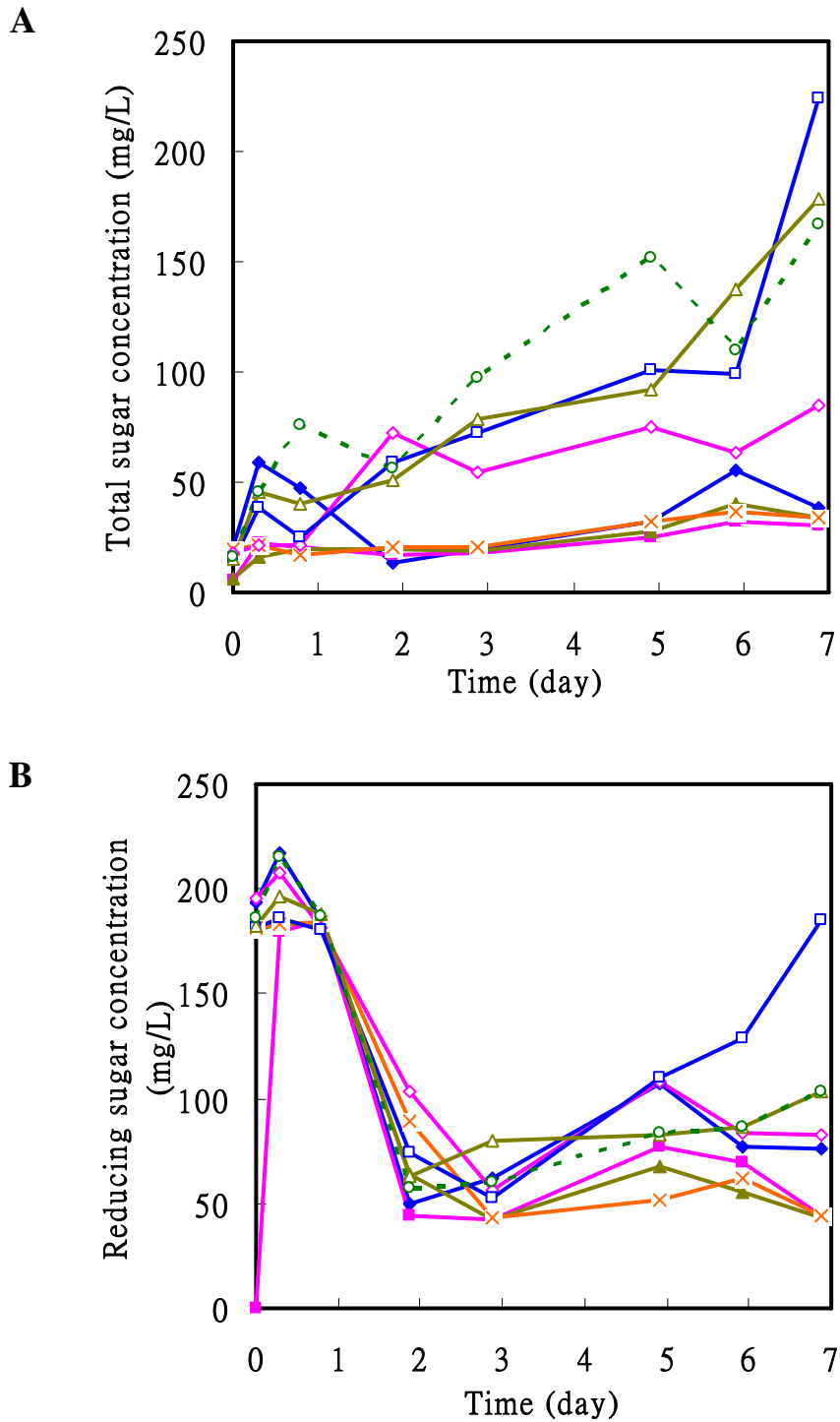


Figure 4.9 Total sugar production (A) and reducing sugar production (B) from biodegradation of *Gracilaria* by mix cultures at different temperatures: 4°C (◆), 25°C (■), 30°C (▲), 35°C (x), 40°C (◇), 45°C (□), 50°C (△), 55°C (○). Cultivation was conducted in 10 mL of liquid medium with 1 g/L of *Gracilaria*. The tests were run duplicate at each temperature.

4.2.2 鹽濃度

由於本研究菌群來源為河海交界的溼地，雖然其鹽濃度並不如海水之鹽濃度高(3.5%)，但仍有其一定之鹽濃度。而本研究樣品於採樣時所測得之鹽濃度趨近於 0 g/L，但因採樣當時為退潮時期，且又接近河口，故會受當時環境影響而造成採樣時之鹽濃度與漲潮時之鹽濃度之差異。為了解本研究之混合菌群之最佳生長鹽濃度及最大耐受鹽濃度，故設計此一試驗藉此了解其最佳之鹽濃度。故本實驗以 1 g/L 的龍鬚菜作為碳源，以添加 0.04 g/L peptone 之培養基(pH 7.2)培養於 35°C。每一培養條件為一組，每一組至少為 12 管，每管培養體積均為 10 ml，並進行二重複，分別於 0、1、2、3、3.5、4、5、6 % 的鹽濃度培養 7 天，龍鬚菜添加濃度為 1 g/L，測試不同培養鹽濃度對菌群生長、海藻降解與甲烷生成之影響。

在龍鬚菜降解部分以過濾烘乾的方式測定培養基中剩餘之龍鬚菜量(Figure 4.10 A)，培養至第 7 天時，未植種的空白組內之龍鬚菜形狀完整，而在植種之實驗組中，僅鹽濃度 0 與 1% 的培養下有龍鬚菜明顯大量的降解情形，培養基中龍鬚菜降解量約近 80%。培養於鹽濃度 0 與 1% 時，培養基中降解龍鬚菜之情形並無遲滯發生，且培養至第 2 天起即可觀察到龍鬚菜外觀型態有破碎之情形發生。培養第 7 天時培養基中剩餘龍鬚菜量分別為

0.22±0.02 與 0.31±0.02 g。而培養於 2-6%的鹽濃度下之龍鬚菜並無明顯的降解情形，龍鬚菜於培養基中仍保有完整之形狀，最大僅約 20%的龍鬚菜含量減少。取海藻降解速率，如Figure 4.10 B，可發現培養於 0 與 1%的鹽濃度下同樣有 0.11±0.01 g *Gracilaria* · L⁻¹ · day⁻¹的降解速率為最高。培養於 2 與 3%鹽濃度下之降解速率其次，均為 0.04±0.01 g *Gracilaria* · L⁻¹ · day⁻¹。培養於 3.5、4 與 5%鹽濃度時，海藻降解速率偏低，只有 0.01±0.01 g *Gracilaria* · L⁻¹ · day⁻¹。而培養於 6%鹽濃度時無海藻降解發生。

菌群生長情形(Figure 4.11 A)，可發現除培養於 6%鹽濃度時無菌群生長之情形，其餘不同鹽濃度下均有菌群生長之情形。於 0%鹽濃度培養 1 天時，有最高的生長量，所造成的OD_{600nm}為 0.300±0.002；而培養於 1%鹽濃度 1 天時菌群生長量為次之，OD_{600nm}有 0.226±0.002；培養於 2、3、3.5、4 與 5%鹽濃度 1 天時之 OD_{600nm} 分別為 0.203±0.006、0.173±0.006、0.204±0.004、0.188±0.003 與 0.160±0.012。除於 6%鹽濃度下無菌群生長外，其它培養鹽濃度下均無遲滯現象。且在 0 與 1%時，可於培養 1 天內達最大生長菌量，而 2、3、3.5 與 4 則需有 1 天的培養時間可達最大生長菌量。5%鹽濃度需較長的培養時間，約 2 天的培養時間，才可達最大生長菌量。計算比生長速率可的Figure 4.10 B，由比生

長速率可知，隨鹽濃度上升而菌群之生長速率下降。比生長速率最高為 0%培養鹽濃度時，次之為 1%，比生長速率為 $0.64\pm 0.03 \text{ day}^{-1}$ ，其後為 2%，比生長速率為 $0.38\pm 0.01 \text{ day}^{-1}$ 、3 - 5%，比生長速率為 $0.07\pm 0.01 - 0.05\pm 0.03 \text{ day}^{-1}$ ，6%則無菌群生長。

最終產物甲烷生成部分(Figure 4.12 A)，培養於 6%鹽濃度時，累積的甲烷生成量最低，培養至第 7 天僅 $1.02\pm 0.16 \text{ mmol CH}_4$ 生成。在 0%鹽濃度時甲烷生成遲滯期約 1 天內，甲烷生成並無遲滯且培養至第 6 天時累積甲烷生成量達 $367.48\pm 2.24 \text{ mmol CH}_4$ 。培養於 1、2 與 3 %時，甲烷生成遲滯期亦為 1 天內，培養至第 7 天時，累積的甲烷生成量分別為 324.79 ± 0.34 、 261.01 ± 6.97 與 $252.39\pm 9.19 \text{ mmol CH}_4$ 。3.5 與 4%的鹽濃度時，甲烷生成遲滯其略微延長至 2 天，但 3.5%鹽濃度的培養於第 7 天時其累積甲烷生成量($276.15\pm 21.16 \text{ mmol CH}_4$)並不低於鹽濃度 2%所累積的甲烷生成量，而以 4%鹽濃度進行培養之累積甲烷量($219.50\pm 22.92 \text{ mmol CH}_4$)略低。以 5%鹽濃度進行培養之混合菌群的甲烷生成遲滯期延長至 4 天，所累積之甲烷量為 $38.99\pm 11.13 \text{ mmol CH}_4$ 。計算所得之甲烷生成速率如Figure 4.12 B所示。由甲烷生成速率可知，於 0%鹽濃度的培養時，有最高的甲烷生成速率($88.81\pm 5.43 \text{ mmol CH}_4 \cdot \text{day}^{-1}$)。其次為培養於鹽濃度 3.5%時，其甲烷生成速

率為 $63.84 \pm 1.88 \text{ mmols CH}_4 \cdot \text{day}^{-1}$ 。培養於 1 與 4% 鹽濃度時有相近之甲烷生成速率，分別為 52.74 ± 0.17 與 $55.50 \pm 5.37 \text{ mmols CH}_4 \cdot \text{day}^{-1}$ 。培養於 2 與 3% 鹽濃度時之甲烷生成速率較低，不達 $45 \text{ mmols CH}_4 \cdot \text{day}^{-1}$ 。而有甲烷生成之鹽濃度中生成速率最低的培養為 5% 鹽濃度時之甲烷生成速率，僅 $11.78 \pm 6.81 \text{ mmols CH}_4 \cdot \text{day}^{-1}$ 。在甲烷轉化率部份(Figure 4.12 B)可知，3.5% 的鹽濃度下有最高的甲烷轉化率($92.99 \pm 11.64 \text{ L CH}_4 \cdot \text{g seaweed}^{-1}$)，而亦有良好之甲烷生成速率之 0% 鹽濃度培養時之甲烷轉化率僅只有 $16.07 \pm 0.04 \text{ L CH}_4 \cdot \text{g seaweed}^{-1}$ 。0% 鹽濃度添加之培養中所消耗的基質被利用作為菌群生長之能量源之部分較 3.5% 鹽濃度之培養高，因此導致 0% 鹽濃度之甲烷轉換率較 3.5% 鹽濃度低。

綜合上述分析，海藻降解部份，在低鹽濃度的培養下菌群能有效分解龍鬚菜，尤以 0% 鹽濃度時有最佳的龍鬚菜降解速率，當鹽濃度高於 1% 時，研究菌群即無法分解龍鬚菜。菌群的生長亦是隨著鹽濃度的上昇而下降，當鹽濃度高達於 6% 時，菌群生長即受到抑制。甲烷生成部分，可發現除 0% 鹽濃度時有較佳的甲烷生成速率及產量，在 3.5% 鹽濃度時亦有較其他鹽濃度時略佳的甲烷生成速率，由此可知，此混合菌群中可能有兩群對嗜鹽度不同之甲烷生成菌群，但嗜鹽度較低的甲烷生成菌群活性較嗜鹽度高的甲

烷生成菌群佳。由此可顯示，原生長於濕地地區之混合菌群對鹽濃度的耐受範圍極廣，最低可生長於無鹽濃度的環境中，最高可生長於高達 5% 的鹽濃度環境，較海水鹽濃度(3.5%)高出頗多。是故在最適鹽濃度的評估中，除考量海藻降解速率、菌群生長速率與甲烷生成速率等因素外，亦考量應用於實廠時應減少額外添加之物質此因素，因此選擇以鹽濃度為 0% 作為最適鹽濃度以進行後續研究。

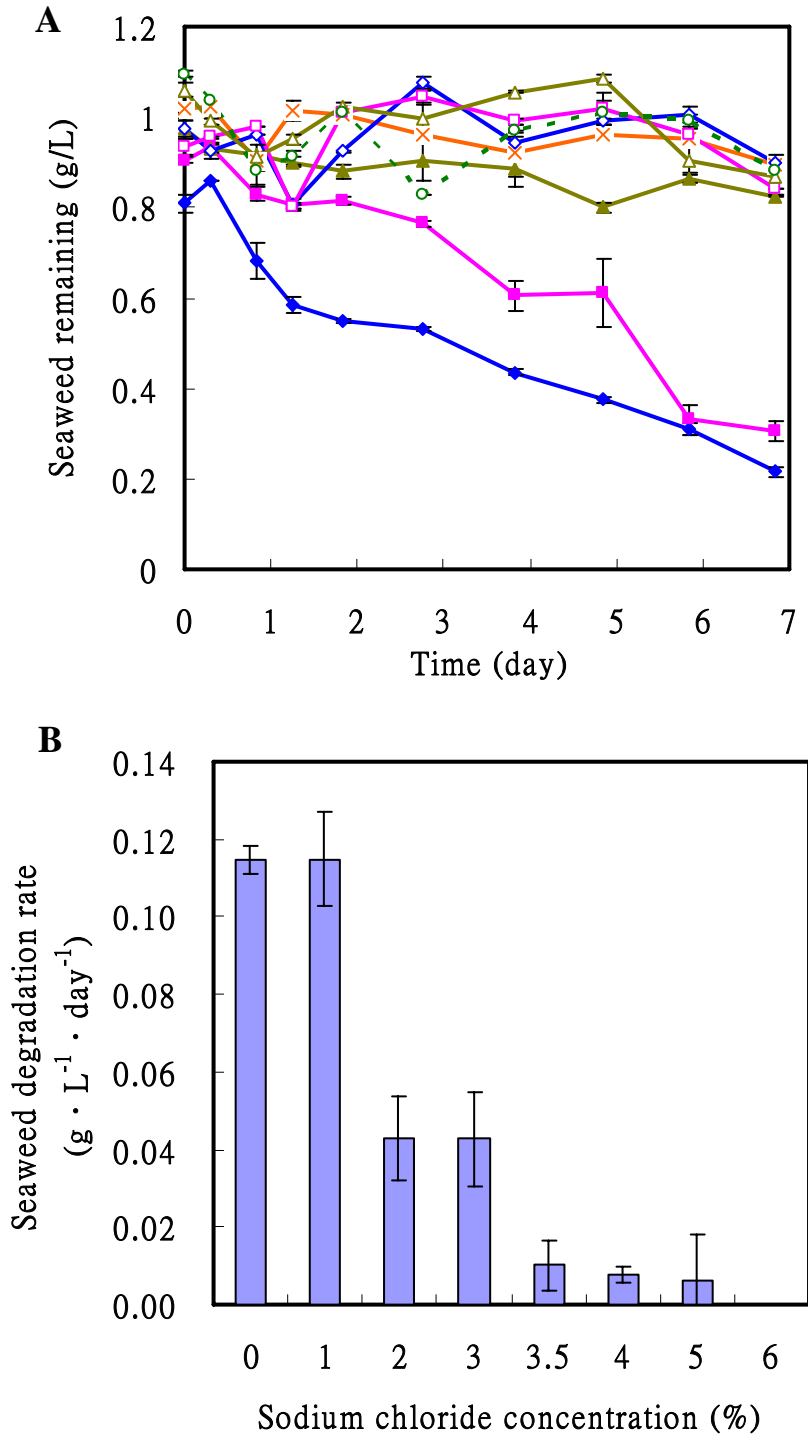


Figure 4.10 *Gracilaria* degradation (A) and seaweed degradation rate (B) of mix culture with different sodium chloride concentration: 0.0 % (◆), 1.0 % (■), 2.0 % (▲), 3.0 % (x), 3.5 % (◇), 4.0 % (□), 5.0 % (△), 6.0 % (○). Cultivation was conducted in 10 mL of liquid medium with 1 g/L of *Gracilaria* at 35°C. The tests were run duplicate at each sodium chloride concentration.

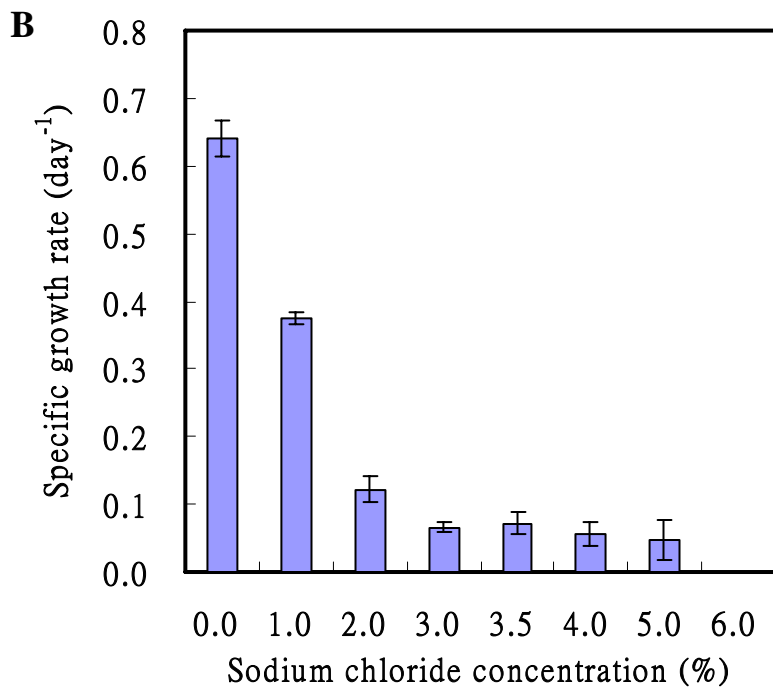
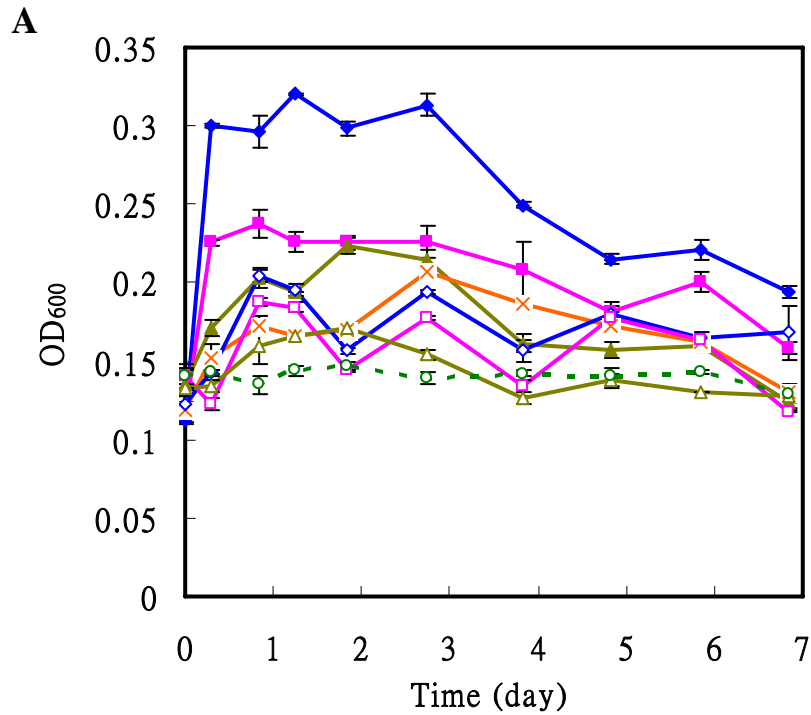


Figure 4.11 Growth (A) and specific growth rate (B) of mix cultures with different sodium chloride concentration: 0.0 % (◆), 1.0 % (■), 2.0 % (▲), 3.0 % (x), 3.5 % (◇), 4.0 % (□), 5.0 % (△), 6.0 % (○). Cultivation was conducted in 10 mL of liquid medium with 1 g/L of *Gracilaria* at 35°C. The tests were run duplicate at each sodium chloride concentration.

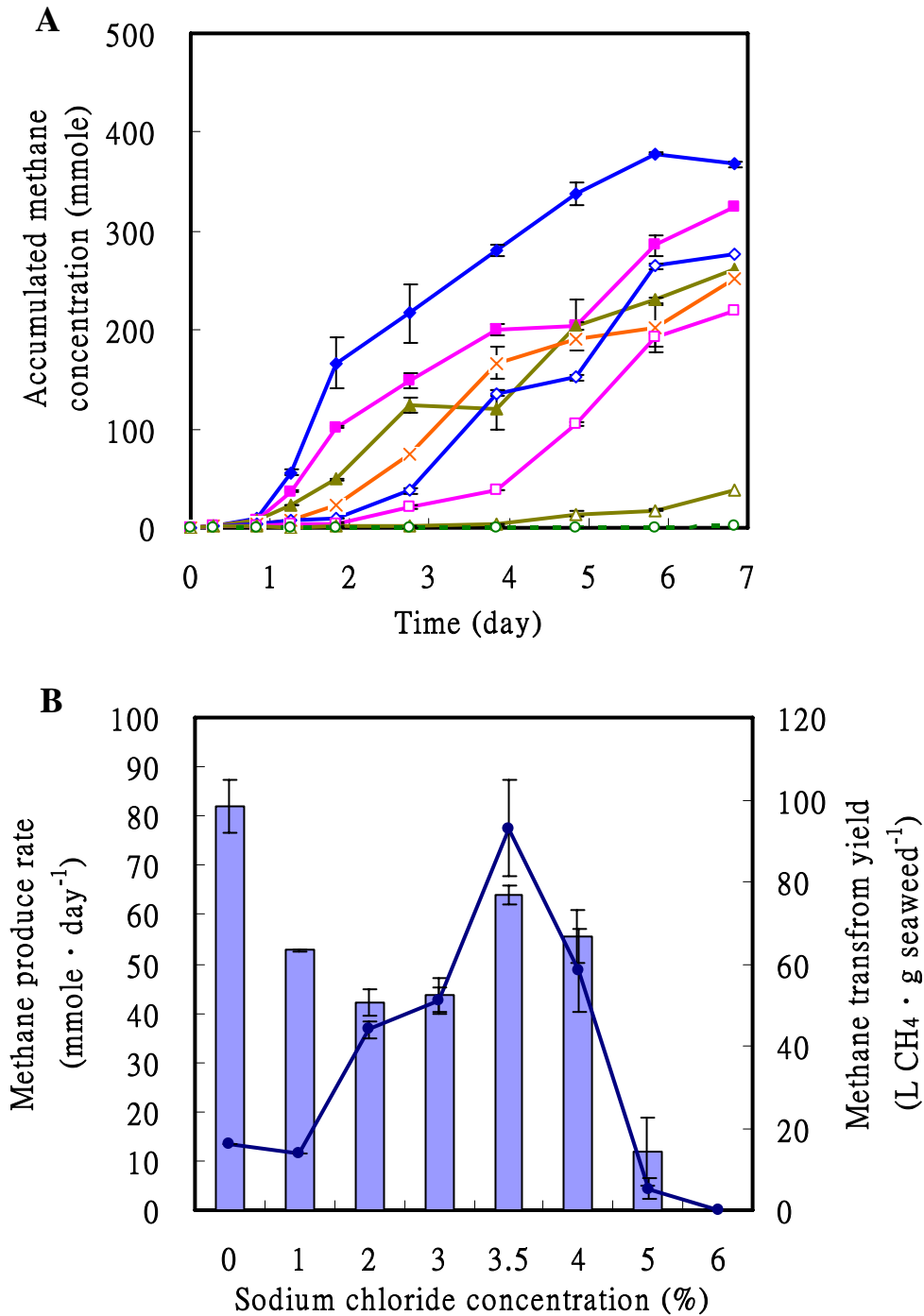


Figure 4.12 Methane production (A), methane produce rate (bar) and methane transform yield (broken-line)(B) from *Gracilaria* by mix cultures with different sodium chloride concentration: 0.0 % (◆), 1.0 % (■), 2.0 % (▲), 3.0 % (x), 3.5 % (◇), 4.0 % (□), 5.0 % (△), 6.0 % (○). Cultivation was conducted in 10 mL of liquid medium with 1 g/L of *Gracilaria* at 35°C. The tests were run duplicate at each sodium chloride concentration.

4.2.3 pH 值

酸鹼度會影響微生物的生長速率，培養的環境中之pH值過高或過低均會造成酵素系統失去活性並限制微生物之生長。微生物生長所適合之pH值隨不同型態之菌群而有所不同，大部分之菌群適合生長於中性的環境下，少數為嗜鹼性(Alkalophiles)或嗜酸性(Acididophiles)微生物。根據前人的研究，目前已知具分泌agarases的菌株生長pH值大多為中性，且本研究厭氧混合菌群中含有甲烷生成菌群，而甲烷生成菌群大部分屬中性菌，因此本試驗以中性pH值設計不同培養基起始之pH值，範圍為pH 6.4、6.7、7.1、7.4、7.9 與 8.3，龍鬚菜添加濃度為 1 g/L並以 0 %氯化鈉與 0.04 g/L peptone之添加於 35°C進行菌群最佳生長pH值之試驗。

培養前後之 pH 值如 Figure 4.13 所示可知，本試驗之 pH 值於培養前後並無太顯著之變化，表示本厭氧降解龍鬚菜之系統所產生之液相產物對系統之 pH 值並無明顯之影響。

本試驗之海藻降解結果如Figure 4.14 A所示，除起始pH 7.9 與 8.3 之培養於培養至第 7 天時仍無明顯之龍鬚菜之降解情形發生，龍鬚菜降解量僅為近 10%。起始pH值為 6.4、6.7、與 7.4 的培養在降解龍鬚菜時均無遲滯發生。起始pH值為 7.1 之培養於 1 天後，已降解近 60%之龍鬚菜。培養至第 5 天時，培養基中龍鬚菜剩餘

含量為 $0.27 \pm 0.00 \text{ g Gracilaria} \cdot \text{L}^{-1}$ ，達最大降解量，約降解 30% 龍鬚菜。培養起始 pH 6.7 時，培養一天後龍鬚菜降解量近 50%。培養 7 天時，總龍鬚菜剩餘量為 $0.28 \pm 0.01 \text{ g Gracilaria} \cdot \text{L}^{-1}$ 。起始 pH 6.4 與 7.5 之培養，培養 7 天後龍鬚菜剩餘量分別為 0.38 ± 0.01 與 $0.28 \pm 0.01 \text{ g Gracilaria} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由龍鬚菜降解速率(Figure 4.14 B) 可知，龍鬚菜降解速率隨 pH 值上升而增加，直到 pH 7.1 時達最佳的龍鬚菜降解速率($0.37 \pm 0.01 \text{ g Gracilaria} \cdot \text{L}^{-1}$)，隨後降解龍鬚菜之速率快速降低，顯示本研究菌群中之龍鬚菜降解菌群在高於 pH 7.9 後菌群之酵素活性受到抑制。

菌群生長結果如 Figure 4.15 A，除培養於 pH 8.3 之培養基中之菌群無明顯之生長，培養於 pH 6.4、6.7、7.1、7.4 與 7.9 之培養基中之菌群均於培養一天內達穩定期，以 pH 7.1 之培養有較高之菌群生長量， $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 達 0.260 ± 0.024 。培養於 pH 6.7 與 7.4 時之菌群生長量為次之， $\text{OD}_{600\text{nm}}$ 分別為 0.222 ± 0.009 與 0.231 ± 0.023 。由比生長速率可知(Figure 4.15 B)，本研究菌群隨 pH 值上升菌群生長速率亦隨之增加，於 pH 7.1 之培養時達最大比生長速率($0.52 \pm 0.02 \text{ day}^{-1}$)。而當 pH 值高達 8.3 時，本研究菌群之比生長速率快速下降，僅餘 $0.04 \pm 0.02 \text{ day}^{-1}$ 。由此可知，當 pH 高達 8.3 時，pH 即開始對本研究菌群之生長產生抑制。

本研究菌群中之甲烷生成菌群培養於pH 6.4、6.7、7.1 與 7.4 下培養 6 天時，有較佳的甲烷生成量(Figure 4.16 A)，分別為 381.48 ± 20.51 、 324.84 ± 22.61 、 348.97 ± 19.18 與 386.29 ± 15.73 mmoles CH_4 。培養至第 6 天時於pH 7.9 環境下之甲烷生成量(190.68 ± 7.02 mmoles CH_4)為培養於上述pH值環境時之近一半生成量。而培養於pH 8.3 之環境下之幾近無甲烷之生成，培養至第 7 天僅只有 1.73 ± 0.12 mmoles之甲烷生成。由甲烷生成速率(Figure 4.16 B)可知，本研究菌群於pH 6.4、6.7、7.4 與 7.95 之培養下有相近之甲烷生成速率，分別為 70.27 ± 2.39 、 63.18 ± 8.79 、 73.47 ± 6.66 與 52.99 ± 0.90 mmoles $\text{CH}_4 \cdot \text{day}^{-1}$ 。pH 7.1 培養時甲烷生成速率(82.29 ± 7.03 mmoles $\text{CH}_4 \cdot \text{day}^{-1}$)較其他pH下之甲烷生成速率高。而培養於pH 8.3 時之甲烷生成速率為最低。可知對於本研究菌群中之甲烷生成菌群當培養之pH值達 8.3 時，對甲烷生成菌群生成甲烷之酵素活性產生抑制。而在不同pH值之培養下所得之最佳甲烷轉換率亦與甲烷生成速率有所差異，在pH 6.4、6.7、7.1、7.4 與 7.9 培養之甲烷轉換率並無太大差異，分別為 19.87 ± 1.74 、 14.52 ± 2.02 、 17.42 ± 4.04 、 15.36 ± 1.25 與 18.78 ± 1.26 L $\text{CH}_4 \cdot \text{g seaweed}^{-1}$ ，而在pH 8.3 之培養下甲烷轉換率僅有 0.27 ± 0.04 L $\text{CH}_4 \cdot \text{g seaweed}^{-1}$ 。

綜和本試驗之實驗結果，本試驗以培養基中碳酸氫鈉濃度作

為 pH 值之調控方式，可有效以同一緩衝溶液調整出不同 pH 值，且此緩衝溶液對菌群生長並無造成抑制之現象產生。而本研究所使用之混合菌群降解龍鬚菜所產生之酸性物質不會造成此緩衝溶液失效，緩衝溶液仍具有維持 pH 值之功能(Figure 4.13)。而本研究之混合菌群中之降解龍鬚菜之菌群最適生長 pH 值為 pH 7.1。而當 pH 值達 7.4 時即會對降解龍鬚菜之菌群產生抑制作用，造成其降解速率下降。當 pH 值達 7.9 時，龍鬚菜降解菌群活性完全受到抑制。甲烷生成菌群在 pH 7.1 時有最佳生成速率。pH 值達 7.4 時，甲烷生成菌活性開始受到負面之影響。而當 pH 值達 8.3 時，甲烷生成菌群之活性完全受到抑制。混合菌群生長最適 pH 值為 7.1。當培養基之 pH 值為 7.4 時菌群生長開始受到輕微抑制，直到 pH 8.3 時 pH 值所造成的負面影響達最明顯。故考量菌群生長速率、甲烷生成速率及龍鬚菜降解速率等因素，以 pH 7.1 為本研究混合菌群最適 pH 值，後續試驗培養基之 pH 值均控制在 pH 7.1 下進行探討。

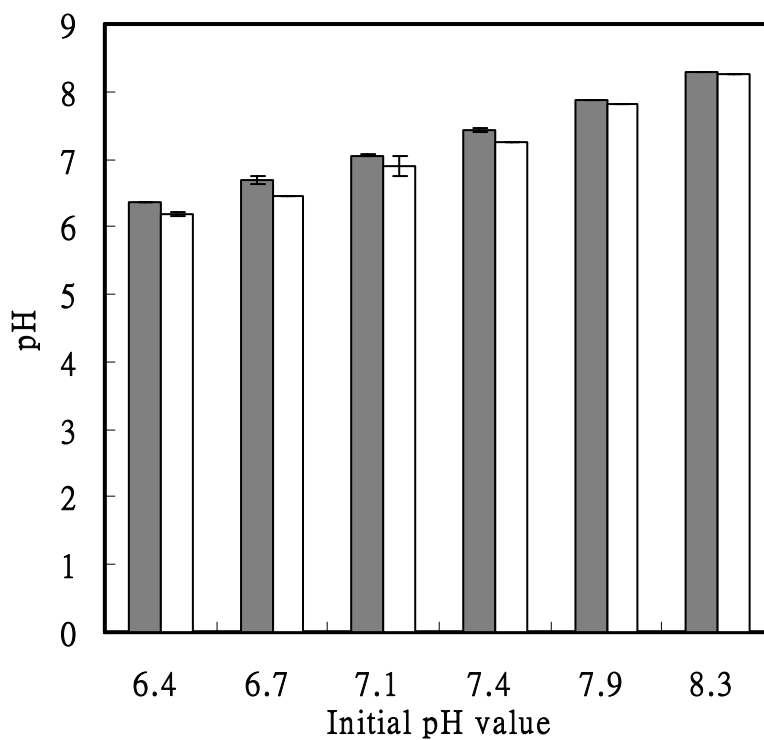


Figure 4.13 pH changes at initial stage and end of cultivation of mixed culture with different initial pH's. Black bar, initial pH; white bar, pH value after cultivation. Cultivation was conducted in 10 mL of liquid medium with 1 g/L of *Gracilaria* at 35°C. (n=2)

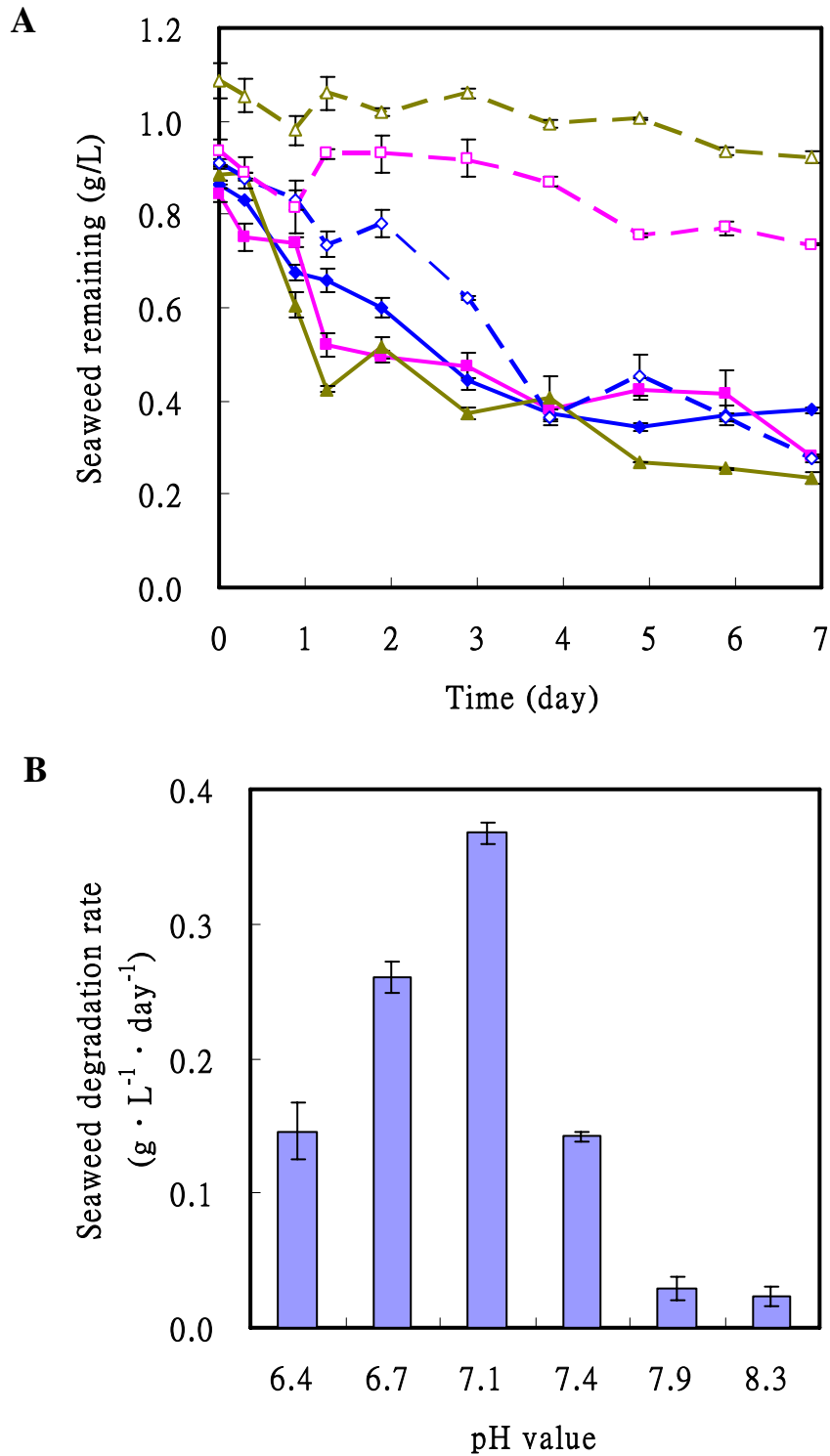


Figure 4.14 *Gracilaria* degradation (A) and seaweed degradation rate (B) of mix culture at different pH value: 6.4 (◆), 6.7 (■), 7.1 (▲), 7.4 (◇), 7.9 (□), 8.3 (△). Cultivation was conducted in 10 mL of liquid medium with 1 g/L of *Gracilaria* at 35°C. The tests were run duplicate at each pH value.

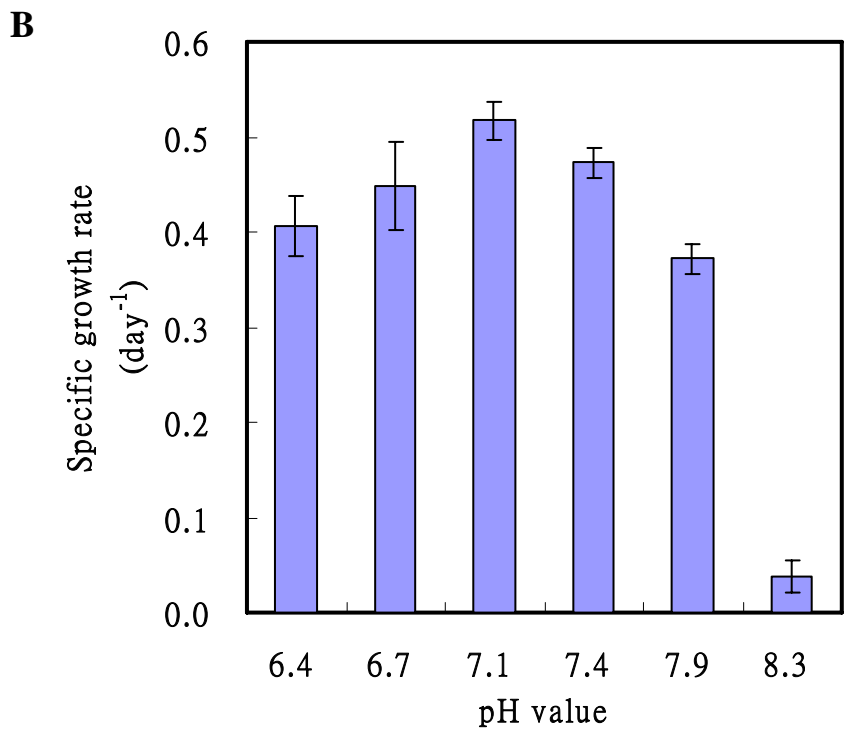
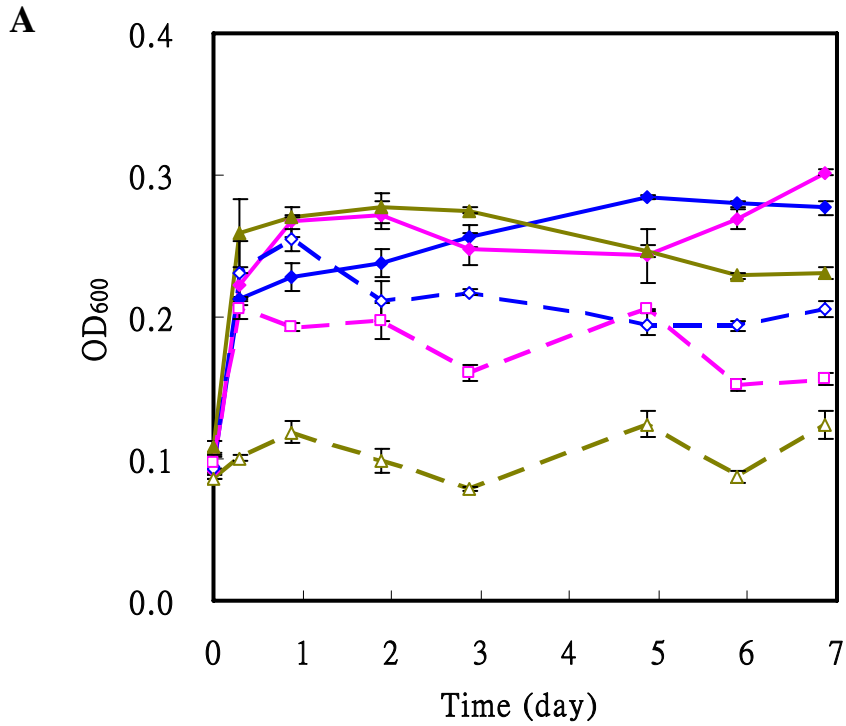


Figure 4.15 Growth (A) and specific growth rate (B) of the mix culture at different pH values: 6.4 (◆), 6.7 (■), 7.1 (▲), 7.4 (◇), 7.9 (□), 8.3 (△). Cultivation was conducted in 10 mL of liquid medium with 1 g/L of *Gracilaria* at 35°C. The tests were run duplicate at each pH value.

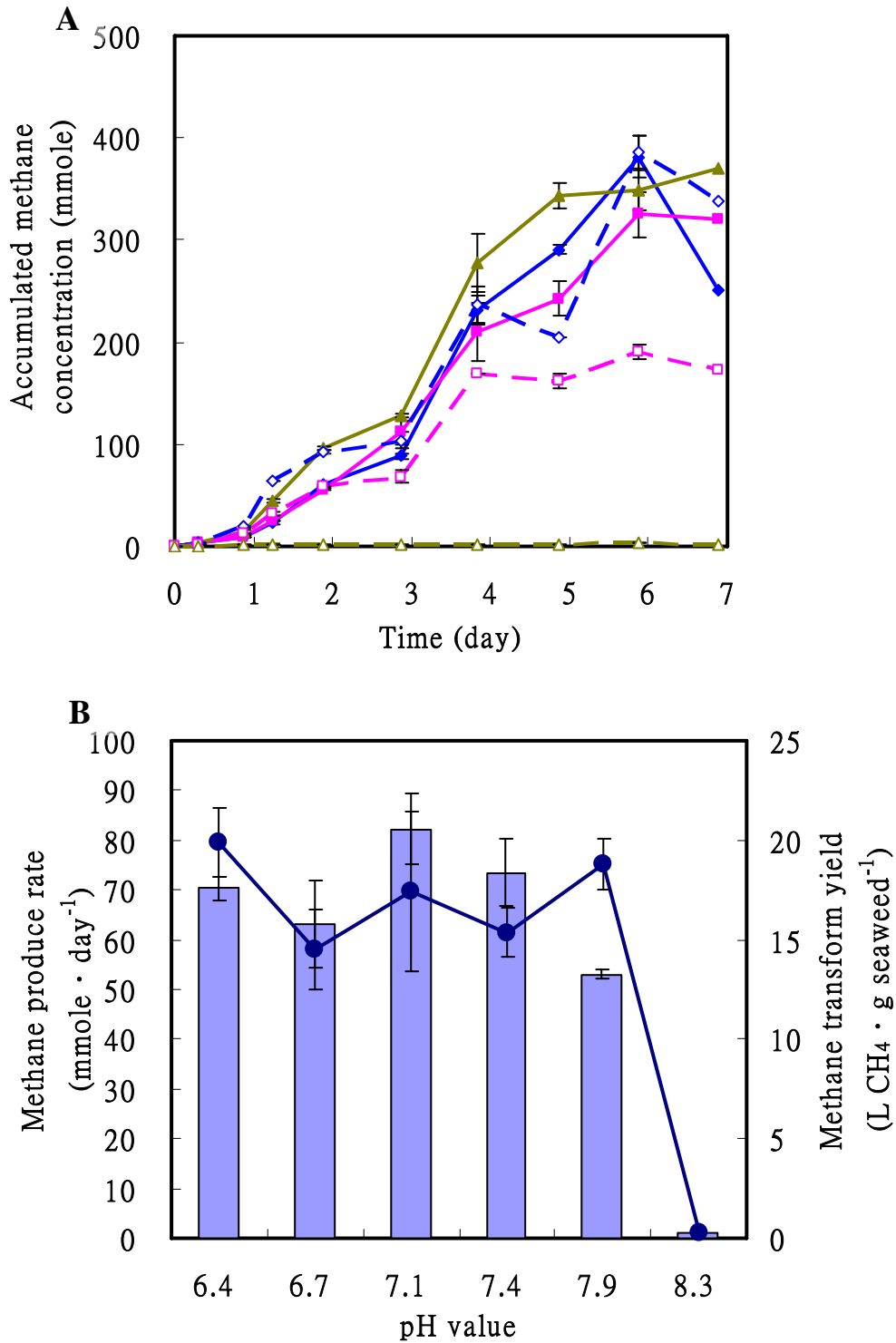


Figure 4.16 Methane production(A), methane produce rate (bar) and methane transform yield (broken-line)(B) from *Gracilaria* by mix culture at different pH value: 6.4 (◆), 6.7 (■), 7.1 (▲), 7.4 (◇), 7.9 (□), 8.3 (△). Cultivation was conducted in 10 mL of liquid medium with 1 g/L of *Gracilaria* at 35°C. The tests were run duplicate at each pH value.

4.2.4 生長輔因子添加(Growth factor)

輔因子為可提供微生物生長時所需之物質，其成份大致含有胺基酸(amino acid)、胜肽(peptides)、維他命(vitamins)等物質，當中又以維他命B群化合物可提供微生物生長所需之營養(Vasanthi et al., 1996)，有效促進微生物生長，故一般微生物培養大都添加 yeast extract和peptone作為輔因子來源，但並非所有微生物生長時皆須添加。以yeast extract和peptone成分而言，除上述成分外，尚有許多成分目前無法明確了解，但卻是微生物生長時重要的輔因子，為了解yeast extract和peptone對本研究菌群之影響，故本實驗以無添加輔因子、分別添加 1 g/L之單一輔因子與兩種輔因子各添加 1 g/L等 4 種不同培養進行探討，由前述實驗所得之較佳培養條件，無添加氯化鈉、pH值為 7.1 之培養基，以 1 g/L之龍鬚菜作為碳源，培養於 35°C進行試驗。

本試驗之龍鬚菜降解結果如Figure 4.17 A所示。不論是否有添加輔因子或添加何種輔因子均對龍鬚菜之降解無影響，且均無遲滯發生，培養至第 7 天時，無添加輔因子剩餘龍鬚菜含量為 0.21 ± 0.00 g *Gracilaria* · L⁻¹，添加yeast extract作為輔因子之培養剩餘 0.21 ± 0.01 g *Gracilaria* · L⁻¹，添加peptone作為輔因子之培養剩餘 0.22 ± 0.01 g *Gracilaria* · L⁻¹，同時添加YE及peptone兩輔因子之培

養基中剩餘龍鬚菜含量為 $0.29 \pm 0.02 \text{ g Gracilaria} \cdot \text{L}^{-1}$ 。由計算所得之降解速率(Figure 4.17 B)可發現，以yeast extract或peptone作為輔因子對菌群分解龍鬚菜並無差異，降解速率均為 $0.14 \pm 0.01 \text{ g Gracilaria} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ ，且較無添加輔因子之培養的降解速率略慢($0.18 \pm 0.01 \text{ g Gracilaria} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$)，而同時添加兩兩輔因子之降解速率則與無添加的培養相近。

在有添加輔因子之三種培養之下，混合菌群生長趨勢相似(Figure 4.18 A)，均在培養7小時時達最大菌群生長量，隨後菌量快速減少，其後菌量維持一定量。有添加輔因子之培養中又以分別添加單一輔因子之兩培養之菌群生長量均相似(分別為 0.528 ± 0.012 與 $0.444 \pm 0.014 \text{ day}^{-1}$)，而同時添加兩種輔因子之菌量為添加任單一輔因子的2倍，以無添加輔因子之培養菌群生長量為最低。菌群生長速率(Figure 4.18 B)顯示，單一輔因子，yeast extract或peptone的培養對本研究菌群之生長速率有頗佳之正面之影響，但兩輔因子之間並無明顯之差異，比生長速率分別為 1.49 ± 0.07 與 $1.19 \pm 0.08 \text{ day}^{-1}$ 。若同時添加本試驗所使用之兩輔因子，對於本研究所使用之混合菌群之生長速率有加乘之效果(比生長速率為 $2.83 \pm 0.18 \text{ day}^{-1}$)。

在甲烷生成部分(Figure 4.19)，無添加輔因子與添加peptone之

培養所產生的甲烷量(Figure 4.19 A)為此試驗中較少，分別為 334.81 ± 15.50 與 366.23 ± 0.24 mmols CH_4 ，而添加 yeast extract (722.53 ± 12.49 mmols CH_4)和均添加(704.88 ± 23.84 mmols CH_4)的培養所同屬於產生的甲烷量較多的培養。甲烷生成速率如Figure 4.18 B所示，同樣的為無添加輔因子(55.67 ± 4.37 mmols $\cdot \text{day}^{-1}$)與添加peptone(59.02 ± 2.91 mmols $\cdot \text{day}^{-1}$)之培養的甲烷生成速率較低，而添加 yeast extract(120.04 ± 3.93 mmols $\cdot \text{day}^{-1}$)與均添加(141.45 ± 12.21 mmols $\cdot \text{day}^{-1}$)為甲烷生成速率較高之培養。在不同輔因子添加部份，甲烷轉換率與甲烷生成率之結果相符，在有添加 yeast extract的部份，不論是否有添加peptone其甲烷轉化速率相近，甲烷轉化速率分別為無添加peptone之培養 28.51 ± 0.99 L $\text{CH}_4 \cdot \text{g seaweed}^{-1}$ ，有添加peptone之培養 28.71 ± 1.94 L $\text{CH}_4 \cdot \text{g seaweed}^{-1}$ 。僅添加peptone之甲烷轉化速率為 14.34 ± 0.80 L $\text{CH}_4 \cdot \text{g seaweed}^{-1}$ ，無添加輔因子之培養(10.36 ± 0.96 L $\text{CH}_4 \cdot \text{g seaweed}^{-1}$)略高。

綜合上述結果與總糖分析結果(Figure 4.20)，可發現含有 yeast extract 的培養基初始的總糖濃度均較僅含有 peptone 的培養基高，因此以 yeast extract 作為輔因子添加可於培養一開始即提供較高的醣類以供混合菌群利用，但僅添加 yeast extract 或 peptone 之培養

所產生的菌群生長量並沒有顯著的差異，在龍鬚菜降解部分亦無差異，而甲烷生成部分則可明顯發現，添加 yeast extract 的培養確實有較高的甲烷生成量，由此可知，yeast extract 對本研究混合菌群中之甲烷生成菌群有正面的影響，但對龍鬚菜降解菌群則無明顯之影響。而同時添加 yeast extract 和 peptone 之培養與僅添加 yeast extract 或 peptone 之培養在菌群生長之分析，可發現同時添加兩因子之培養生成之菌量幾乎為兩單一因子培養所生成之菌量之總和，可知此兩輔子同時添加時並不會對菌群造成抑制，而是有加乘之作用。就甲烷生成部分 peptone 之影響較 yeast extract 低。兩輔因子添加之培養的降解龍鬚菜之速率亦較分別添加任一輔因子之培養略高，但並無如菌群生長量有達 2 倍的產量或產率。於甲烷生成部分亦與龍鬚菜降解相似，雖兩輔因子添加之培養較分別添加任一輔因子之培養略高，但所造成之加乘作用並不如菌群生長顯著。由龍鬚菜降解與甲烷生成部分可知，添加兩輔因子所增量之菌群並不是降解龍鬚菜或產生甲烷之主要菌群，而可能是其中具降解龍鬚菜或甲烷生成之非優勢菌群，因此對龍鬚菜之降解或甲烷生成並無顯著之協助。

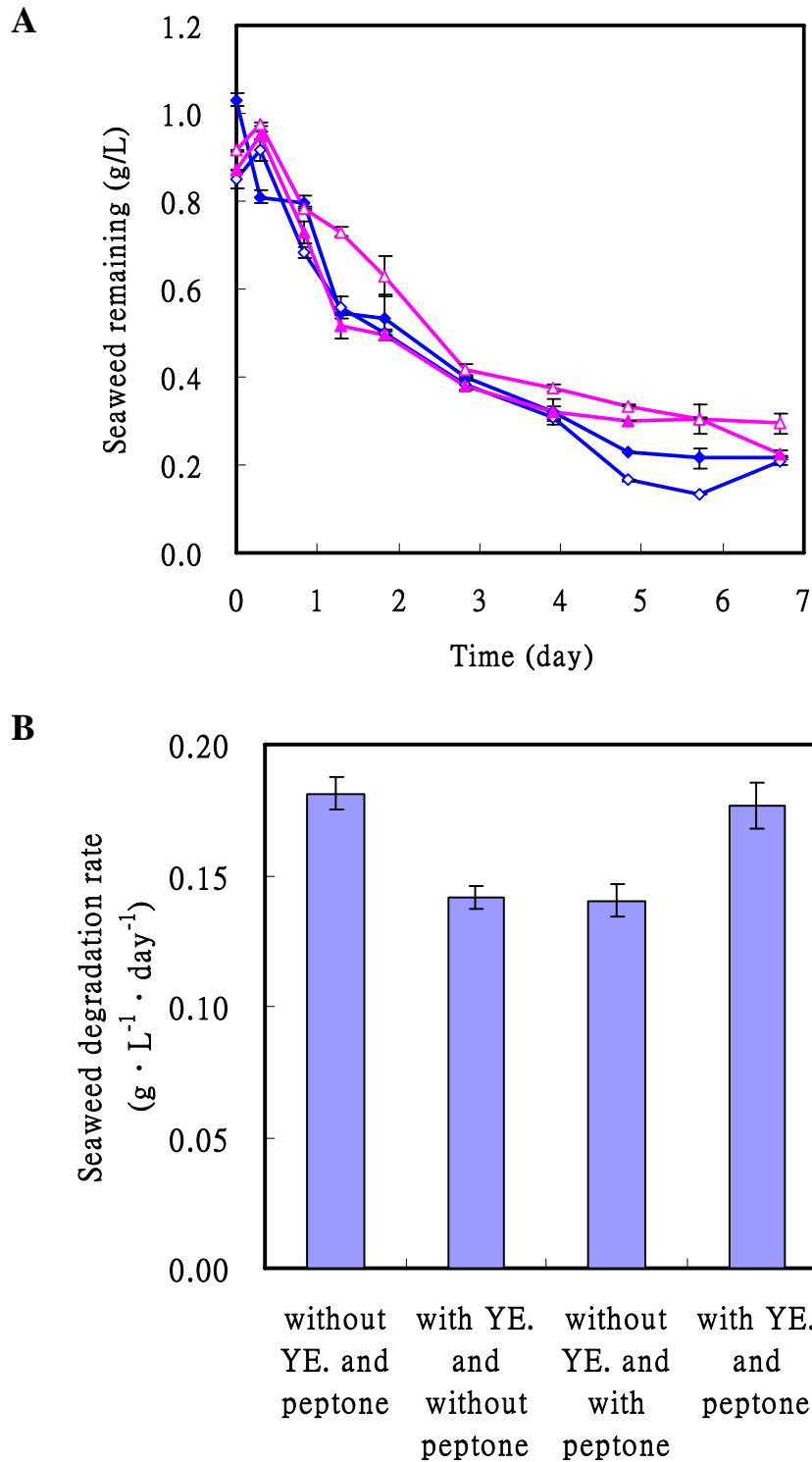


Figure 4.17 *Gracilaria* degradation of mix cultures with or without addition of growth factor: without yeast extract(Y.E.) and peptone (◆), with Y.E. and without peptone (◇), without Y.E. and with peptone (▲), with Y.E and peptone (△). Cultivation was conducted in 10 mL of liquid medium with 1 g/L of *Gracilaria* at 35°C. The tests were run duplicate at each growth factor.

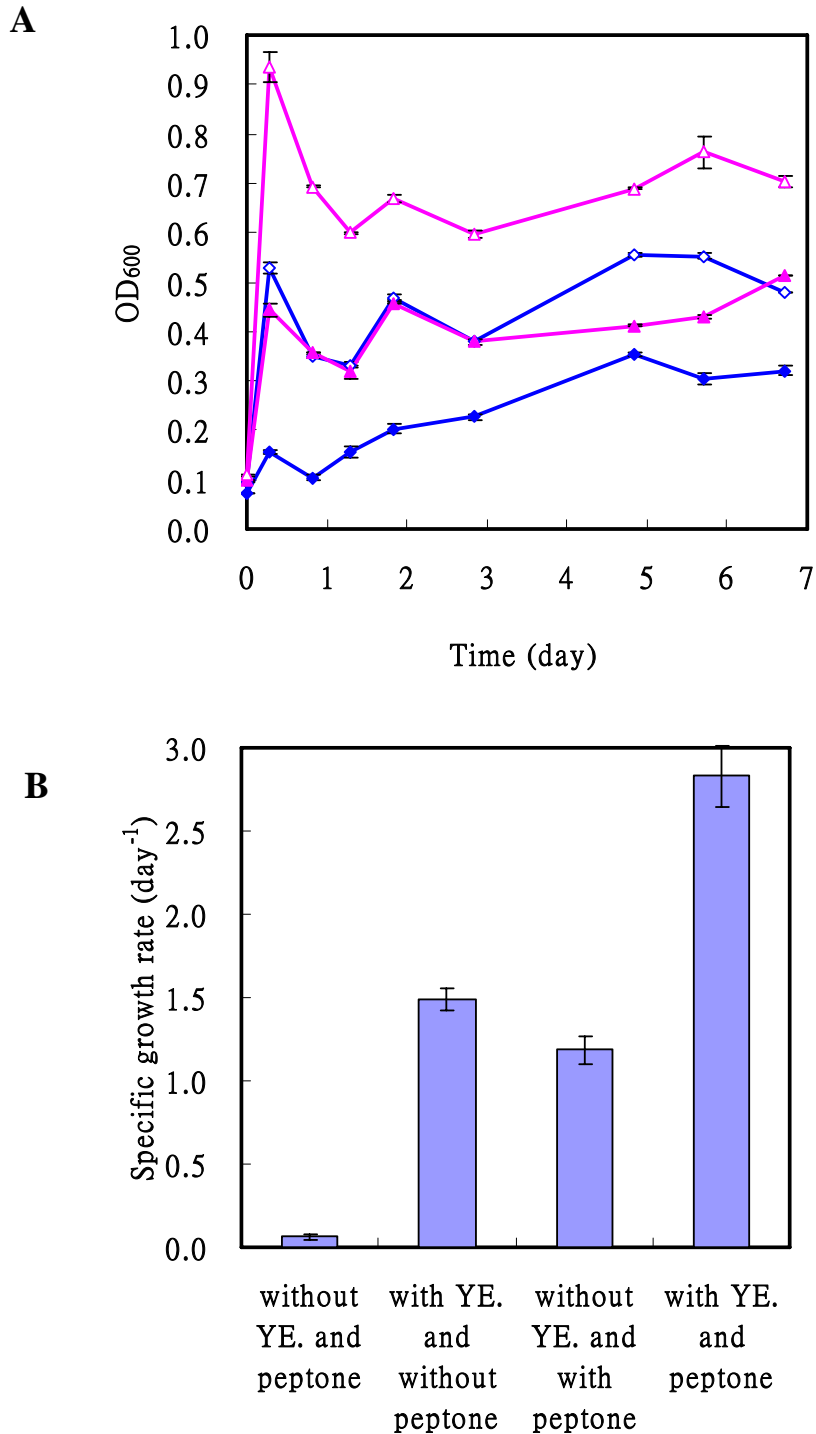


Figure 4.18 Growth of mix cultures with or without addition of growth factor: without yeast extract(Y.E.) and peptone (◆), with Y.E. and without peptone (◇), without Y.E. and with peptone (▲), with Y.E and peptone (△). Cultivation was conducted in 10 mL of liquid medium with 1 g/L of *Gracilaria* at 35°C. The tests were run duplicate at each growth factor.

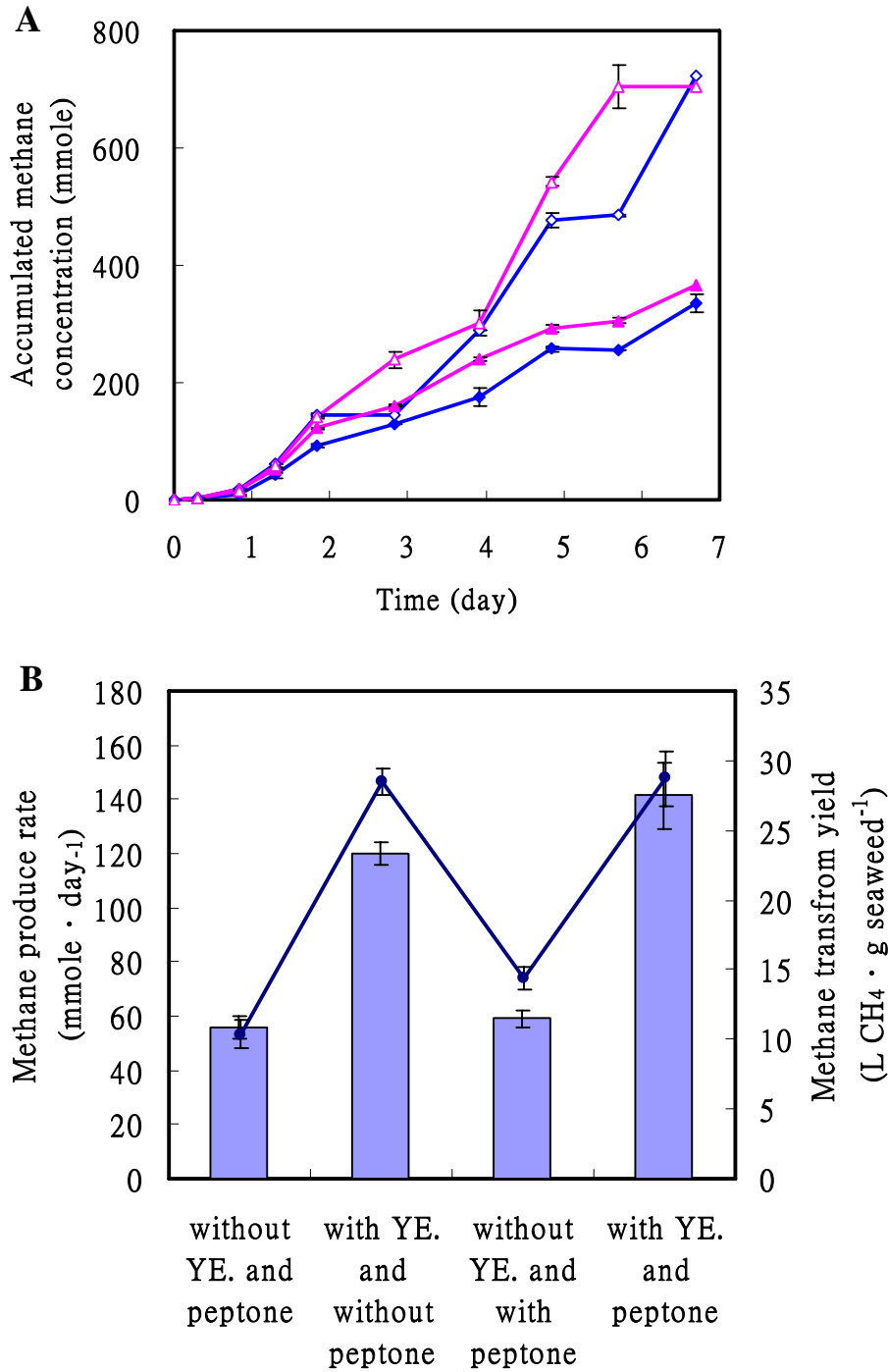


Figure 4.19 Methane production(A), methane produce rate (bar) and methane transform yield (broken-line)(B) from *Gracilaria* by mix culture with or without addition of growth factor: without yeast extract(Y.E.) and peptone (◆), with Y.E. and without peptone (◇), without Y.E. and with peptone (▲), with Y.E and peptone (△). Cultivation was conducted in 10 mL of liquid medium with 1 g/L of *Gracilaria* at 35°C. (n=2)

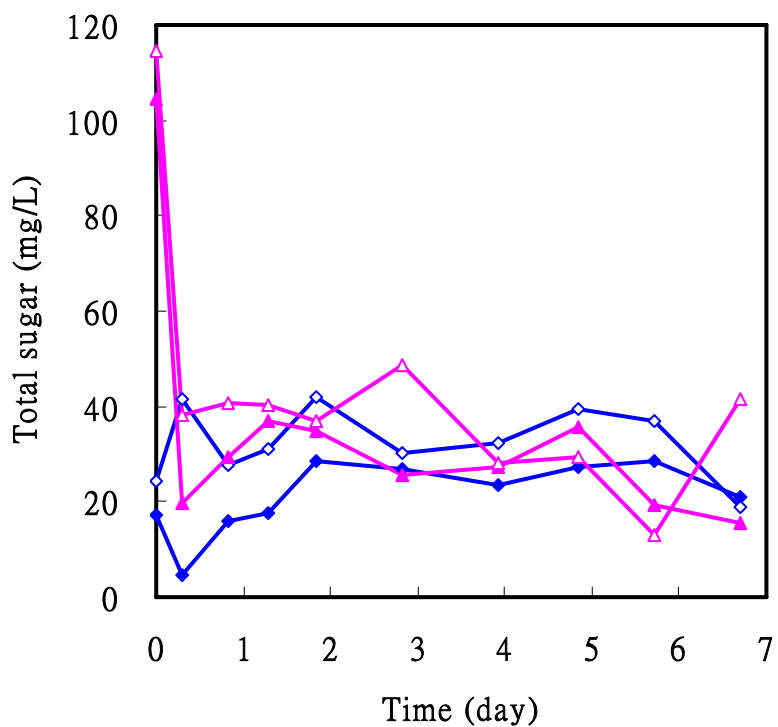


Figure 4.20 Total sugar production from *Gracilaria* by mix culture with or without addition of growth factor: without yeast extract(Y.E.) and peptone (◆), with Y.E. and without peptone (◇), without Y.E. and with peptone (▲), with Y.E and peptone (△). Cultivation was conducted in 10 mL of liquid medium with 1 g/L of *Gracilaria* at 35°C. The tests were run duplicate at each growth factor.

4.3 藻類濃度對甲烷生成之影響探討

碳源係為微生物生長主要之能量來源，適量的添加可增進微生物的生長，然而過高濃度的碳源，對於菌群的生長會造成抑制作用，生長速度會受影響而減緩。本研究針對此厭氧混合菌群，以 10 ml 的培養體積，添加不同濃度的龍鬚菜作為碳源進行培養，觀察龍鬚菜濃度對海藻降解菌群與甲烷生成菌群的影響，以尋求本菌群最佳甲烷生成之龍鬚菜添加量。本試驗由前述實驗所得之較佳培養條件，無添加氯化鈉、pH 值為 7.1 之培養基，分別添加 1 g/L 之 yeast extract 與 peptone，培養於 35°C 進行試驗。

添加 3、4 與 5 g/L 之龍鬚菜培養時，培養第 5 天時，海藻降解量達一定值，但分別仍有 0.81 ± 0.01 、 1.25 ± 0.05 與 1.67 ± 0.05 g/L 龍鬚菜未被降解，瓶中仍有龍鬚菜殘留；少量添加時，如 0.5、1 與 2 g/L 龍鬚菜培養時，分別只需 2 到 3 天的培養時間降解量即可達到定值 (Figure 4.21 A)，各濃度被降解的龍鬚菜量為 64-73%，由此可發現，本研究菌群對於龍鬚菜之組成中有 $31.06 \pm 3.17\%$ 是無法作為碳源分解並利用，以龍鬚菜降解速率而言，培養在 4 g/L 時，有最高的降解速率 0.69 ± 0.04 g *Gracilaria* · L⁻¹ · day⁻¹，如 Figure 4.21 B 所示，顯示適當的碳源濃度可刺激提高海藻降解速率，但當碳源濃度超過最適量時，海藻降解速率並不會持續提升。

在本試驗中，各種海藻濃度培養 1 天內，菌群生長皆可達最大量，添加 4 與 5 g/L 龍鬚菜之培養，經 7 個小時的培養，有最大菌量分別為 1.266 ± 0.051 與 1.346 ± 0.045 ，添加 0.5、1、2 與 3 g/L 的培養，經 7 個小時的培養，菌量分別可達 0.830 ± 0.008 、 0.935 ± 0.030 、 0.975 ± 0.010 與 0.863 ± 0.011 (Figure 4.22 A)。就生長速率而言，如 Figure 4.22 B 所示，在適當的碳源濃度下菌群生長速率隨碳源濃度增加而加快，然而本研究菌群於添加碳源濃度為 4 g/L 時之菌群生長速率 ($3.78 \pm 0.36 \text{ day}^{-1}$) 與 5 g/L 時之菌群生長速率 ($3.99 \pm 0.07 \text{ day}^{-1}$) 相近。

在不同碳源濃度的培養，皆有 1 天的遲滯期，隨後開始有顯著的甲烷生成 (Figure 4.23 A)。培養至第 6 天時，以 5 g/L 龍鬚菜之培養有最高之甲烷生成量 ($1006.56 \pm 29.70 \text{ mmol CH}_4$)，而以 0.5 g/L 龍鬚菜之培養所生成之甲烷量 ($126.23 \pm 0.06 \text{ mmol CH}_4$) 為最低。由甲烷生成速率 (Figure 4.23 B) 可發現，培養基中碳源的增加確實對甲烷生成速率有正向之幫助，以 0.5、1、2、3 與 4 g/L 龍鬚菜之培養，碳源濃度越高甲烷生成速率越快，甲烷生成速率分別為 126.23 ± 0.06 、 141.45 ± 12.21 、 124.20 ± 18.44 、 161.68 ± 4.97 與 $180.54 \pm 24.65 \text{ mmol CH}_4 \cdot \text{day}^{-1}$ 。添加 4 g/L 龍鬚菜之培養的甲烷生成速率較添加 0.5 g/L 龍鬚菜之培養的甲烷生成速率提升近 0.5 倍。而以 5 g/L 龍鬚菜培養之甲烷生成速率 ($200.04 \pm 8.44 \text{ mmol CH}_4 \cdot \text{day}^{-1}$) 則與添加 4 g/L 龍鬚菜培養

之甲烷生成速率相近。甲烷轉換率則以 0.5 g/L 龍鬚菜之培養為最佳，隨龍鬚菜含量愈多甲烷轉換率愈低。

由海藻降解、菌群生長及甲烷生成之結果可知，本研究菌群添加之基質量愈多龍鬚菜降解速率愈快，甲烷生成速率亦愈快但甲烷轉化率則反之，而菌群生長速率在 0.5-3 g/L 基質的添加時並無顯著差異，添加量達 4 g/L 時菌群生長速率才有明顯之增加，可知當添加基質量增加時，首先增加的菌群為海藻降解菌群，而非甲烷生成菌群，因此各基質濃度的甲烷累積濃度及生成速率差異並不大，是故導致甲烷轉換率隨基質濃度愈高而愈低。然而就龍鬚菜降解及甲烷生成速率對本研究菌群而言，添加 4 g/L 龍鬚菜作為碳源進行培養，不僅有較佳之龍鬚菜降解速率，菌群生長與甲烷生成亦是以 4 g/L 龍鬚菜之添加有較佳之成果，因此本研究以 4 g/L 之龍鬚菜添加作為後續研究之碳源添加量，除可促進海藻降解率之外，亦能維持一定之甲烷活性。

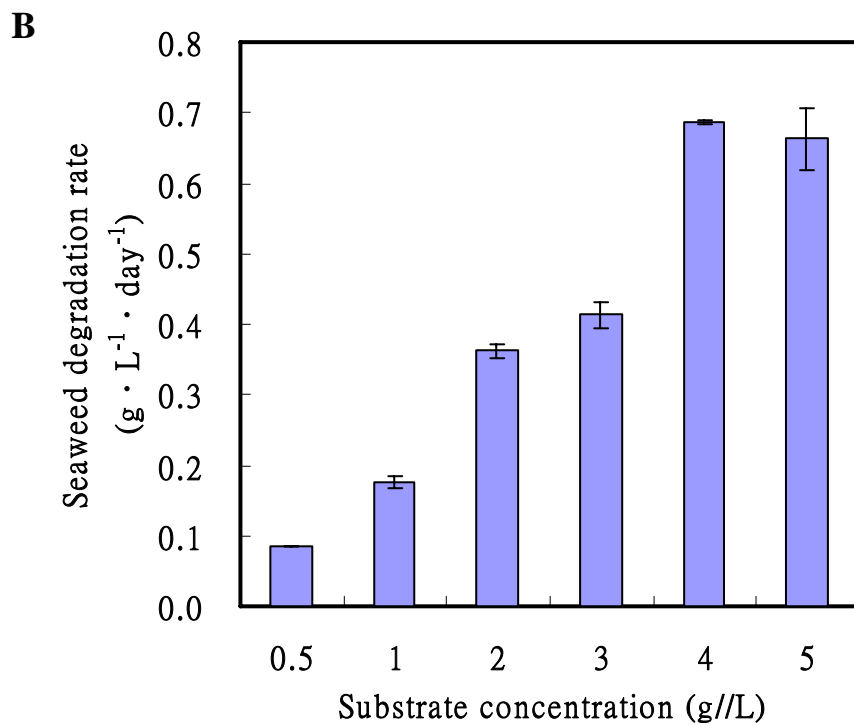
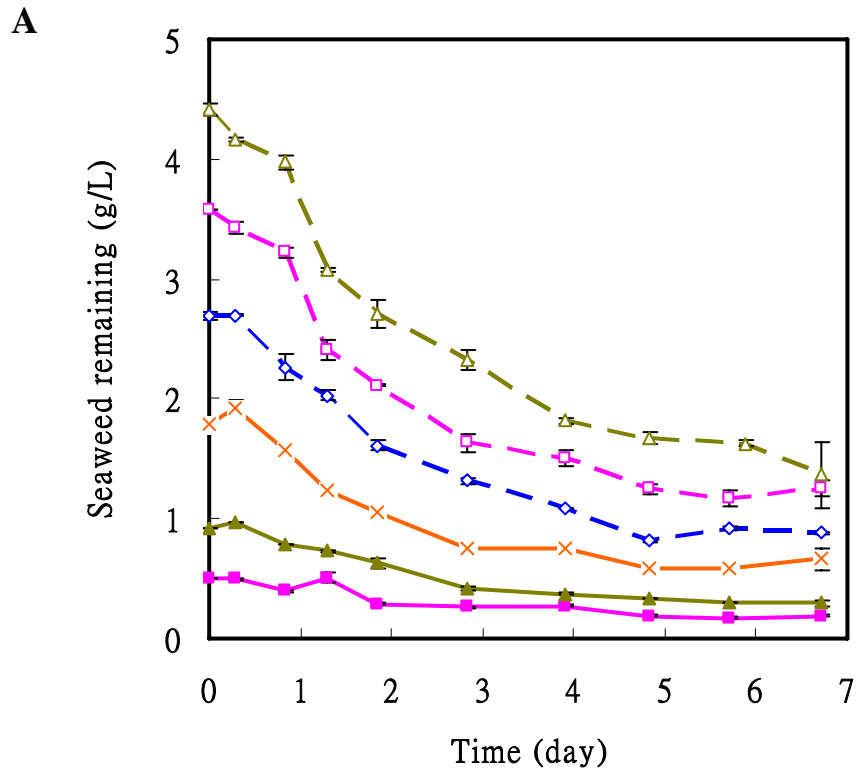


Figure 4.21 *Gracilaria* degradation of mix culture with different concentration of seaweed: at 0.5 g/L (■), at 1 g/L (▲), at 2 g/L (x), at 3 g/L (◇), at 4 g/L (□), at 5 g/L (△). Cultivation was conducted in 10 mL of liquid medium at 35°C. The tests were run duplicate at each concentration.

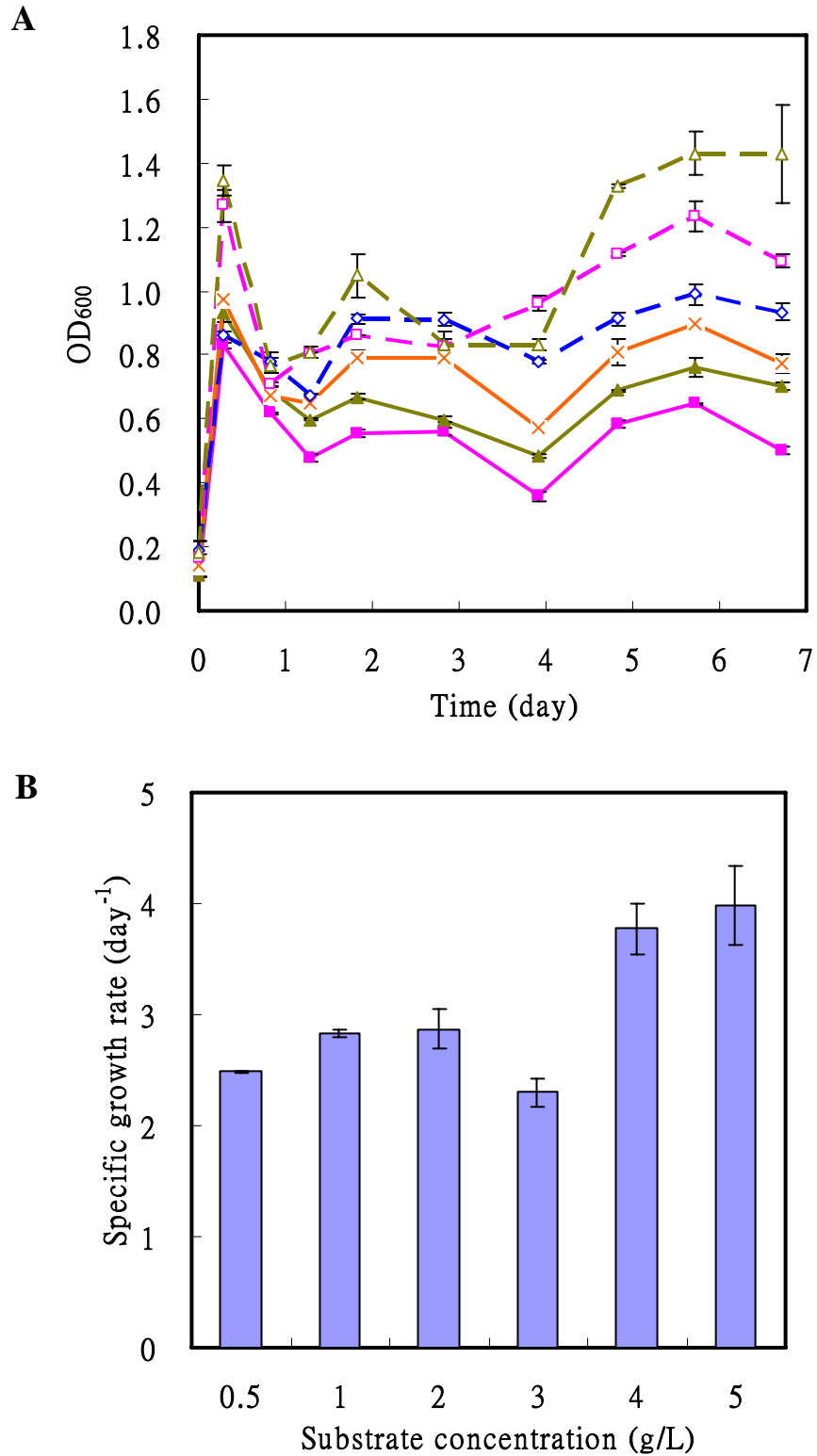


Figure 4.22 Microbial growth of mixed culture with different seaweed concentration: at 0.5 g/L (■), at 1 g/L (▲), at 2 g/L (x), at 3 g/L (◇), at 4 g/L (□), at 5 g/L (△). Cultivation was conducted in 10 mL of liquid medium at 35°C. The tests were run duplicate at each concentration.

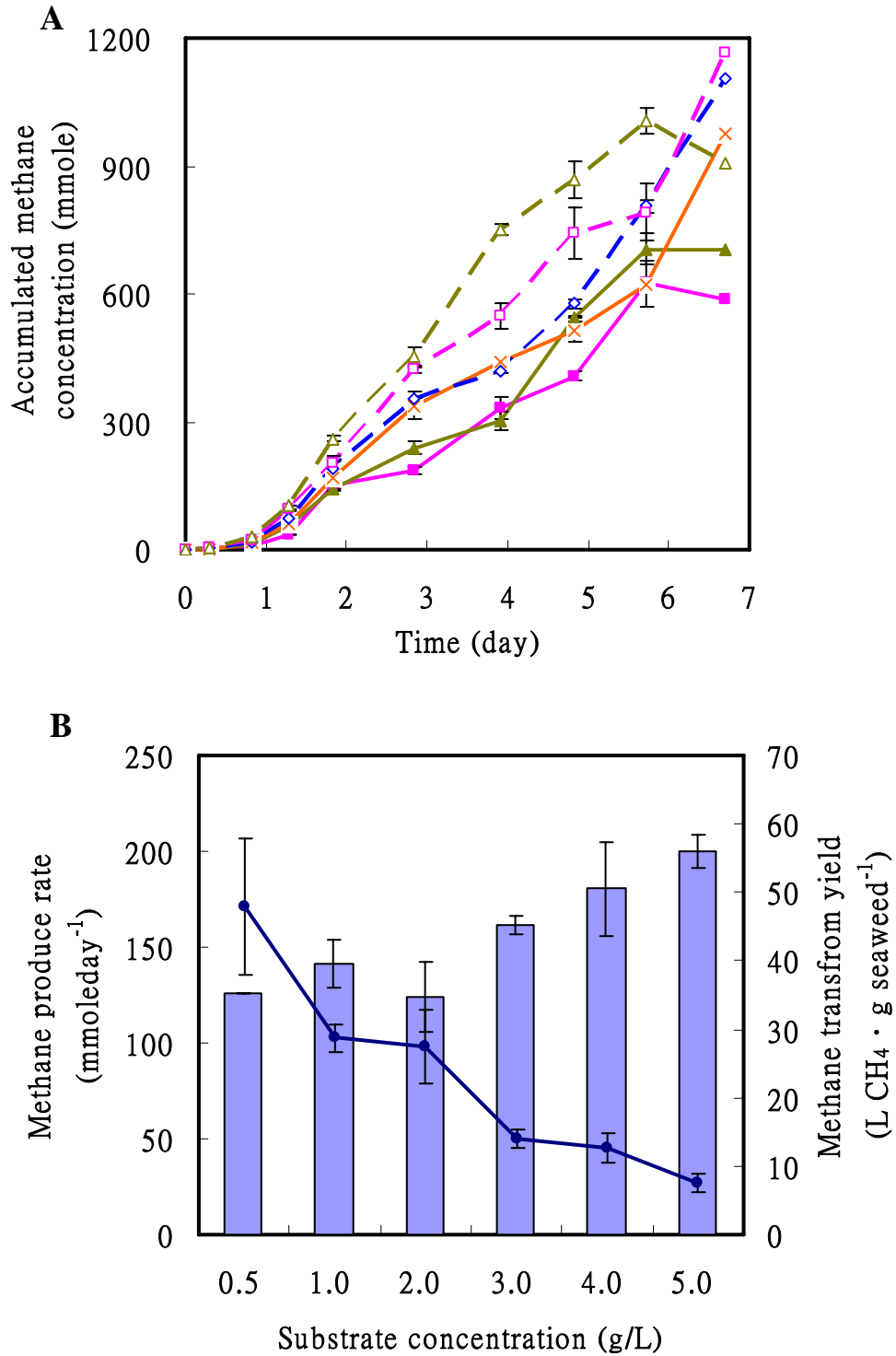


Figure 4.23 Methane production(A), methane produce rate (bar) and methane transform yield (broken-line)(B) from *Gracilaria* by mixed culture at different concentration of seaweed: at 0.5 g/L (■), at 1 g/L (▲), at 2 g/L (x), at 3 g/L (◇), at 4 g/L (□), at 5 g/L (△). Cultivation was conducted in 10 mL of liquid medium at 35°C. The tests were run duplicate at each concentration.

由於不同濃度之基質(如龍鬚菜)會影響微生物生長之代謝活性，可利用 Monod 模式探討基質濃度與微生物生長速率間之關係，因菌群在最適反應的環境下生長，代謝活性將會提高，故利用甲烷的產生速率最為量測微生物生長之間接方法。

其方程式如下：

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_S + S} \quad (4-1 \text{ 式})$$

S: 基質濃度, 單位 g/L

μ : 比生長速率, 單位 day⁻¹

μ_{\max} : 最大比生長速率, 單位 day⁻¹

K_S : 半飽和速率常數, 達到最大比生長速率一半時之基質濃度,
單位 g/L

將上述取倒數則可轉為: $\frac{1}{\mu} = \frac{K_S}{\mu_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{\max}}$ (4-2 式)

依 4-2 式，取基質濃度倒數(1/S)對比生長速率倒數(1/ μ)做圖，可得到一直線，由此線之斜率及Y軸截距可求得 μ_{\max} 及 K_S 值。可求得 Figure 4.24 之斜率與截距，所得 μ_{\max} 為 333.33 day⁻¹， K_S 為 3.37 g/L。由 K_S 可知本研究菌群在添加 3.37 g/L 龍鬚菜時可達最佳的比甲烷生成速率與實驗所得之 4 g/L 之龍鬚菜添加相近。

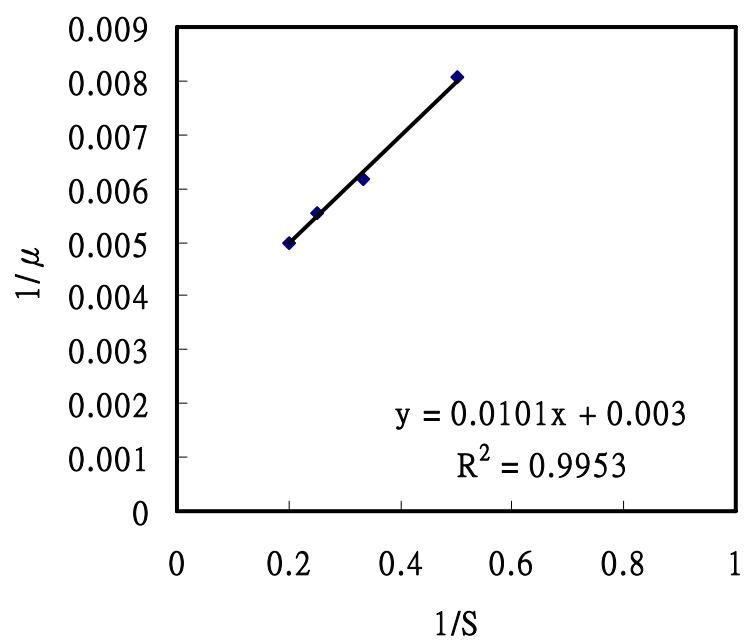


Figure 4.24 Reciprocal relationship of seaweed concentration and specific growth rate.

4.4 不同藻類之利用探討

不同藻類所含之藻膠組成單元有所不同，而微生物對於不同單元組成之藻膠之降解能力亦會有所不同，為了解本研究菌群對不同組成單元之藻膠利用之情形，除原本即做為基質來源屬於紅藻門之龍鬚菜，另選擇台灣海域蘊藏量豐富屬於褐藻門之馬尾藻(Sargassum)作為不同組成單元之藻膠來源，以進行試驗檢測本研究菌群對於不同藻膠是否均有良好之降解並產生甲烷之能力。由前述實驗所得之較佳培養條件，無添加氯化鈉、pH值為 7.1 之培養基，分別添加 1 g/L之yeast extract與peptone，以 4 g/L之馬尾藻或龍鬚菜作為碳源，培養於 35°C 進行試驗。

Figure 4.25 A 所顯示的為反應期間龍鬚菜與馬尾藻於培養基中之剩餘含量之變化，可發現本研究菌群對於降解龍鬚菜並無遲滯現象，培養至第 4 天，培養基中之龍鬚菜含量僅剩餘 1.25 g/L，已降解完近 68%之龍鬚菜。而馬尾藻於培養基中之含量培養至第 7 天仍無被降解之情形。就外觀而言(資料無顯示)，龍鬚菜會被分解成破碎狀，如Figure 4.2 之形態，而馬尾藻卻仍維持堅硬完整之外觀形態。以龍鬚菜培養之海藻降解速率(Figure 4.25 B)可達 $0.84 \pm 0.08 \text{ g seaweed} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ 。

菌群生長(Figure 4.26 A)亦是以龍鬚菜培養有一較佳的結果， OD_{600nm} 最高可達 1.182 ± 0.007 。利用馬尾藻作為基質之培養菌量僅 0.935 ± 0.009 與無添加基質之培養所達之最大菌量(0.661 ± 0.002)之差異並不多。比生長速率(Figure 4.26 B)顯示以龍鬚菜培養之速率略高於以馬尾藻之培養，分別為 $3.06 \pm 0.02 \text{ day}^{-1}$ 和 $2.42 \pm 0.06 \text{ day}^{-1}$ 。

以龍鬚菜培養之甲烷生成量(Figure 4.27 A)培養第 7 天時可達 $1431.20 \pm 99.65 \text{ mmols CH}_4$ 為最高，其次為以馬尾藻所培養之反應，為 $975.58 \pm 3.37 \text{ mmols CH}_4$ ，但僅較無添加基質之培養($797.05 \pm 3.98 \text{ mmols CH}_4$)高出 $178.53 \pm 3.12 \text{ mmols CH}_4$ 。甲烷生成速率，如Figure 4.27 B所示，同樣是以龍鬚菜培養的為最高($210.02 \pm 24.15 \text{ mmols} \cdot \text{day}^{-1}$)，其次為以馬尾藻為基質之培養($143.71 \pm 0.54 \text{ mmols} \cdot \text{day}^{-1}$)，僅利用輔因子進行生長之培養亦有 $98.73 \pm 10.60 \text{ mmols} \cdot \text{day}^{-1}$ 之甲烷生成速率。甲烷轉化率為以馬尾藻作為基質之培養($123.20 \pm 0.52 \text{ L CH}_4 \cdot \text{g seaweed}^{-1}$)為最高，其因為以馬尾藻為基質之培養，菌群分解馬尾藻之量並不顯著，且菌群會利用輔因子生長及產生甲烷，因此以馬尾藻為基質之培養雖未有明顯之利用但仍有甲烷生成，是故以馬尾藻為基質之培養所得之甲烷轉換率會較龍鬚菜之培養($12.51 \pm 3.48 \text{ L CH}_4 \cdot \text{g seaweed}^{-1}$)高。

由還原糖之分析(Figure 4.28)，無添加海藻之培養整個培養過程

中，還原糖之含量最高僅 119.12 ± 7.58 mg/L，培養 1 天後維持於 50 mg/L。有添加海藻之培養，其還原糖含量皆較無添加之培養高，由此結果可知，本研究菌群對於具有類似的根、莖、葉構造及氣囊之分化且內部組織有表皮、皮層及髓部之分化的馬尾藻相較於僅由數個細胞形成之絲狀構造的龍鬚菜而言較難以分解。本研究菌群雖無法分解馬尾藻，但可分解馬尾藻釋出於溶液中之藻膠物質。因此本研究菌群雖可利用馬尾藻之藻膠物質但無法分解藻體。

本試驗之結果可知，龍鬚菜對本研究菌群為一容易分解利用之藻類，但馬尾藻因其結構所致對本研究菌群屬一不易分解之物質。但本研究菌群對龍鬚菜之組成-紅藻膠或馬尾藻之組成-褐藻膠均可利用並生成甲烷。

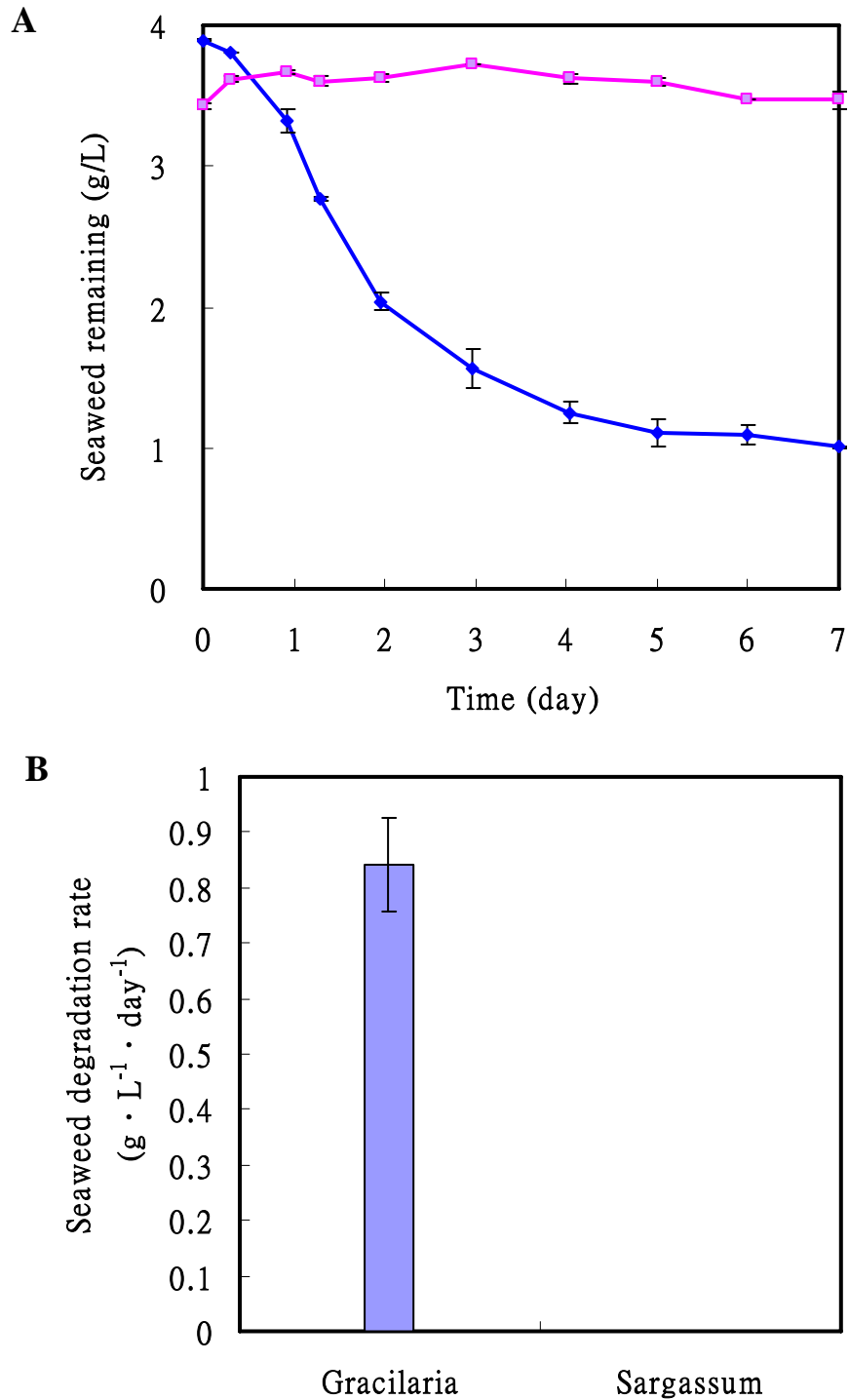


Figure 4.25 Biodegradation of different seaweed (*Gracilaria* and *Sargassum*) by mixed culture. Symbols: *Gracilaria* (◆) and *Sargassum* (□). Cultivation was conducted in 10 mL of liquid medium with 4 g/L of seaweed at 35°C. The tests were run duplicate at each seaweed.

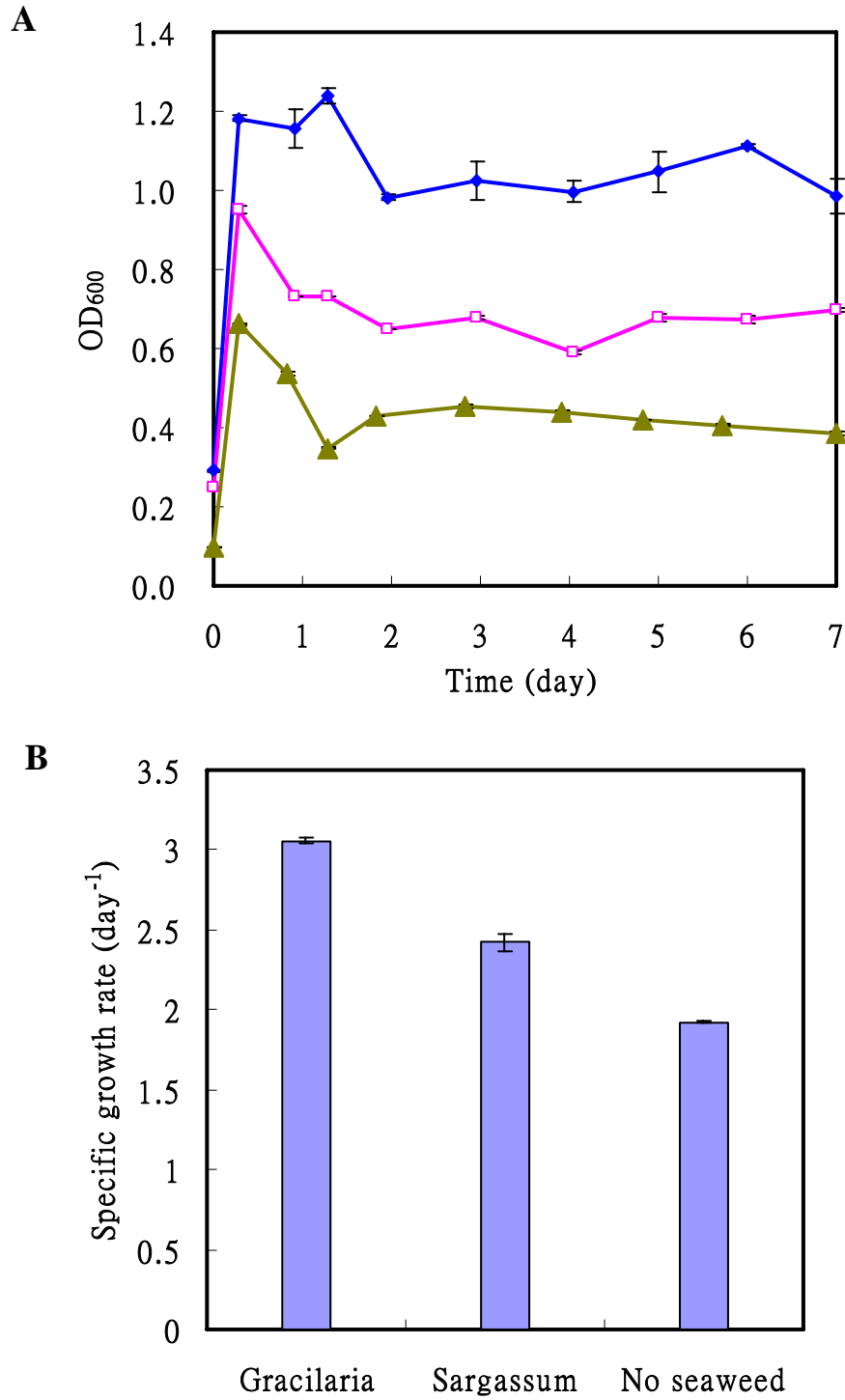


Figure 4.26 Microbial growth of mixed culture with different seaweed: *Gracilaria* (◆), *Sargassum* (□) and no seaweed (▲). Cultivation was conducted in 10 mL of liquid medium with 4 g/L of seaweed at 35°C. The tests were run duplicate at each seaweed.

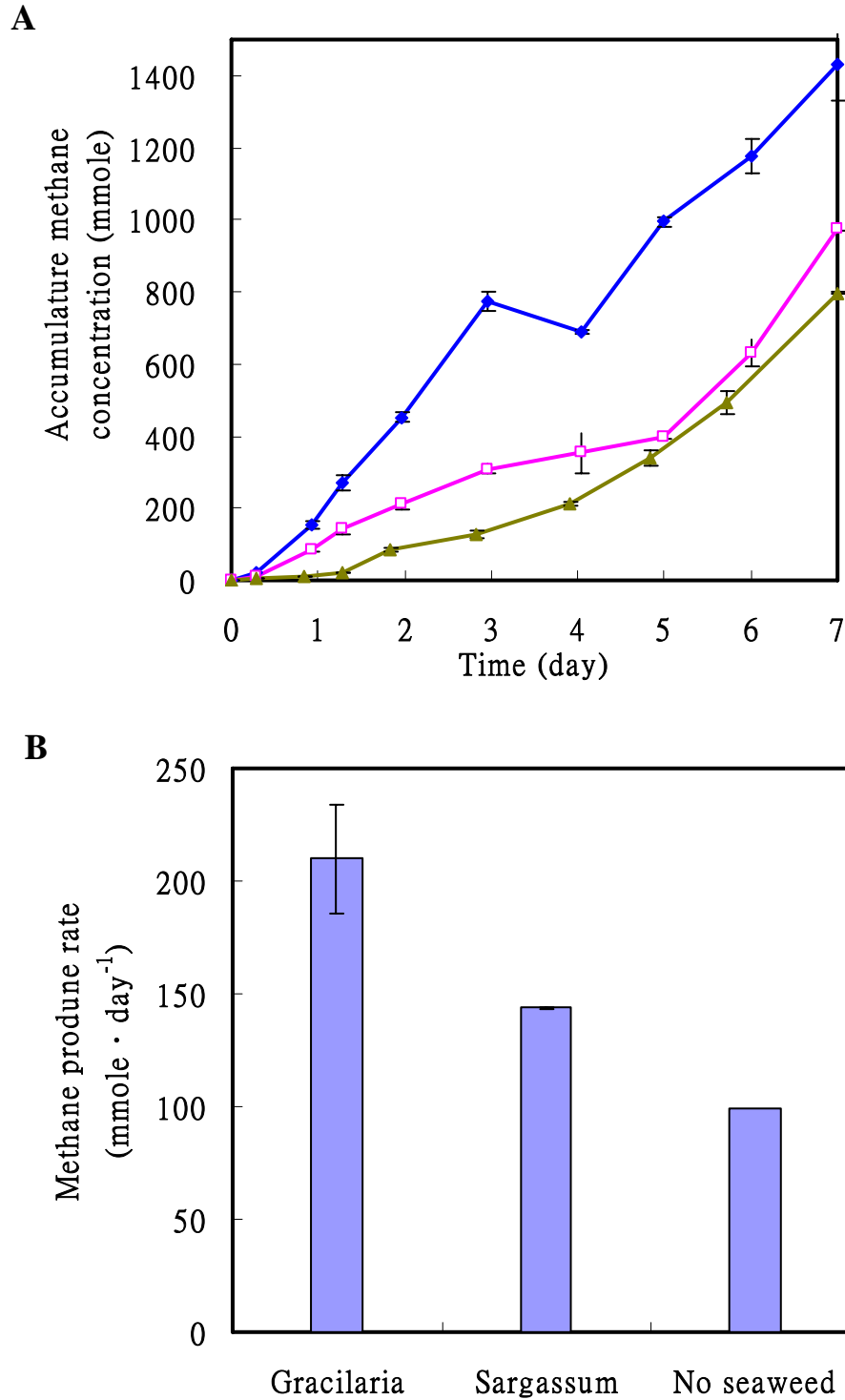


Figure 4.27 Methane production(A) and methane produce rate (B) from seaweed by mix culture at different seaweed: *Gracilaria* (◆) , *Sargassum* (□) and no seaweed (▲). Cultivation was conducted in 10 mL of liquid medium with 4 g/L of seaweed at 35°C. The tests were run duplicate at each seaweed.

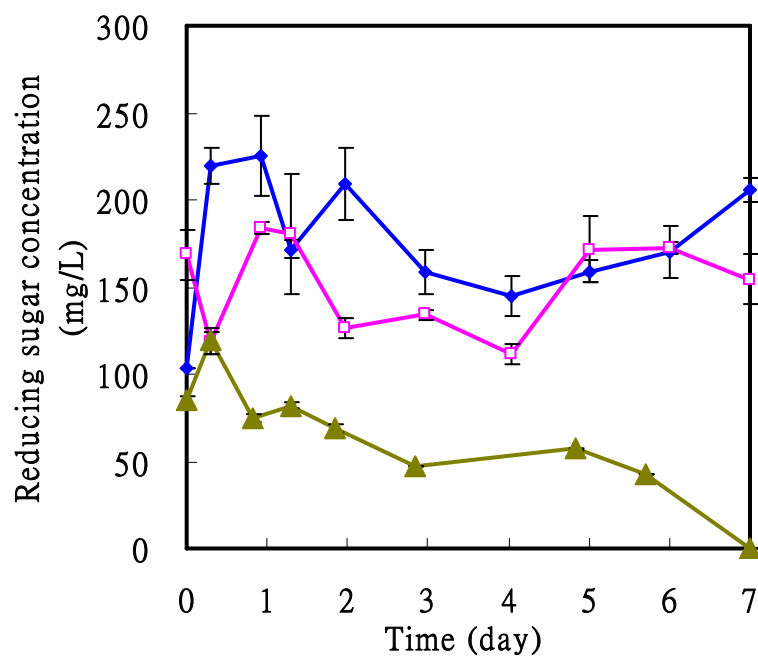


Figure 4.28 Production of reducing sugar from biodegradation of different seaweeds by mixed culture: *Gracilaria* (◆) , *Sargassum* (□) and no seaweed (▲). Cultivation was conducted in 10 mL of liquid medium with 4 g/L of seaweed at 35°C. The tests were run duplicate at each seaweed.

4.5 最適降解龍鬚菜甲烷化條件下之液相產物探討

由 4.2 節所得之最適培養條件，以 4g/L 龍鬚菜作為碳源，0% NaCl、pH 7.1 並添加 yeast extract 與 peptone 培養於 35°C，並利用液相層析儀進行培養液中液相產物之分析與探討，以了解本研究菌群分解龍鬚菜後會生成之液相產物，且於本試驗中實際量測氣體生成量及經壓力平衡後所生成之甲烷量。

經液相層析儀分析後發現，在最適反應條件下進行培養之培養液中主要之液相產物為醋酸，如 Figure 4.29 所示，且並無偵測到其他常見之有機物厭氧消化產物，如甲酸等。此外，本培養液除了揮發性有機酸外亦有不少三糖以上之大分子醣類存在於培養液中。進一步以 LC 分析量測液相中所生成之醋酸濃度後，如 Figure 4.30 B 所示，醋酸濃度隨時間增加而上升，直至培養第 2 天後，所生成之醋酸濃度達一穩定濃度，最大濃度為 29.96 ± 1.04 mmole，培養液中之醋酸濃度不超過 30 mmole，由 Figure 4.30 A 顯示，海藻降解亦是在培養 2 天內有快速降解情形，之後海藻仍有緩慢降解。是故，在培養 2 天內海藻被菌群迅速分解因此產生大量醋酸累積，2 天後由於菌群可分解之海藻量減少導致所生成之醋酸量亦降低，而可利用醋酸之菌群，如甲烷菌群仍持續利用醋酸，導致醋酸累積濃度維持一定並未持續增加。此混合菌群降解龍鬚菜生成醋酸的速率為 2.95 ± 0.06 mmole · day⁻¹，產率為

$16.11 \pm 0.14 \text{ mmole} \cdot \text{g seaweed}^{-1}$ 。且反應前後培養液之pH值並無顯著變化，前後pH值僅相差 0.05 不到(資料無顯示)，所生成之醋酸濃度相當于 $1,800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ，但用以調控pH用之 NaHCO_3 添加量約為 $2,260 \text{ mg CaCO}_3 \cdot \text{L}^{-1}$ 之鹼度，酸鹼中和程度相當，是故，此菌群降解龍鬚菜所生成之醋酸濃度對本研究所使用碳酸緩衝系統所造成之pH下降幅度並不大。由液相成份檢測可知，本研究菌群分解龍鬚菜後所生成之液相產物與厭氧醱酵有機物所生成之主要液相物質相似。

最適培養條件下，氣體生成如Figure 4.31 所示，培養 7 天總累積產氣量為 $0.57 \pm 0.07 \text{ L}$ ，累積甲烷產量為 $0.27 \pm 0.03 \text{ L}$ ，7 天的培養期間平均甲烷百分比為 $43.73 \pm 9.70 \%$ ，甲烷轉換量為 $0.09 \pm 0.01 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1}$ seaweed，理論上 1 g 乾重相當於 1g COD，而 1g COD可轉換為 0.35L CH_4 ，且根據前人的研究，降解海藻產甲烷之研究中培養 10-20 天最多生成 $0.3 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1}$ seaweed (Horn, 2000)，本試驗實際轉換甲烷量僅為理論值的 25.71%。本研究的甲烷轉換量與Vergara-Fernández之轉換量相當，均高於King所進行試驗之甲烷轉換量(Table 4.1)。

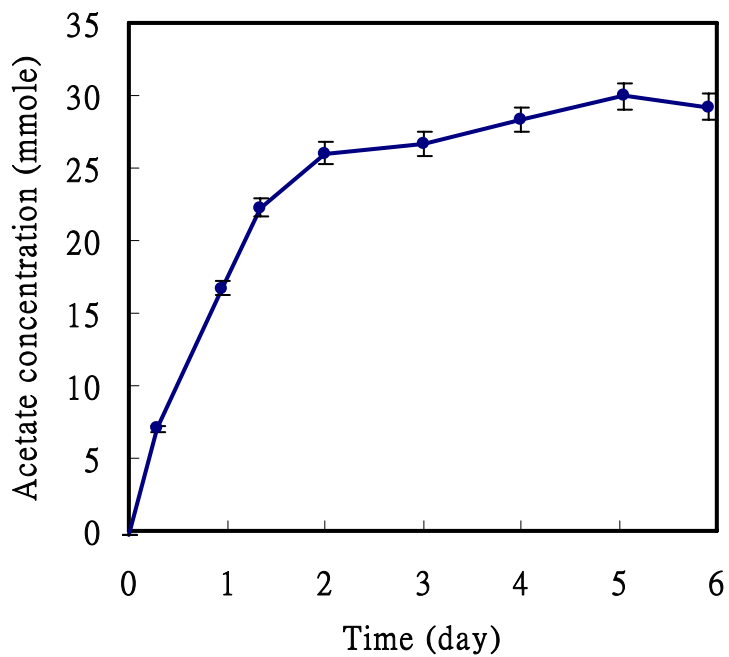
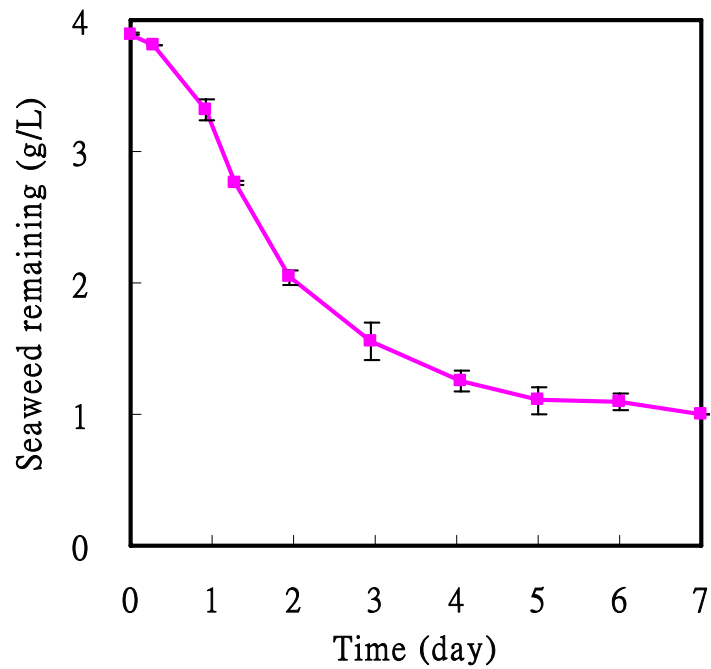


Figure 4.30 Biodegradation of seaweed (A) and production of acetate (B) from anaerobic biodegradation of *Gracilaria* by mixed culture. Cultivation was conducted in 10 mL of liquid medium with 4 g/L of seaweed at 35°C. (n=2)

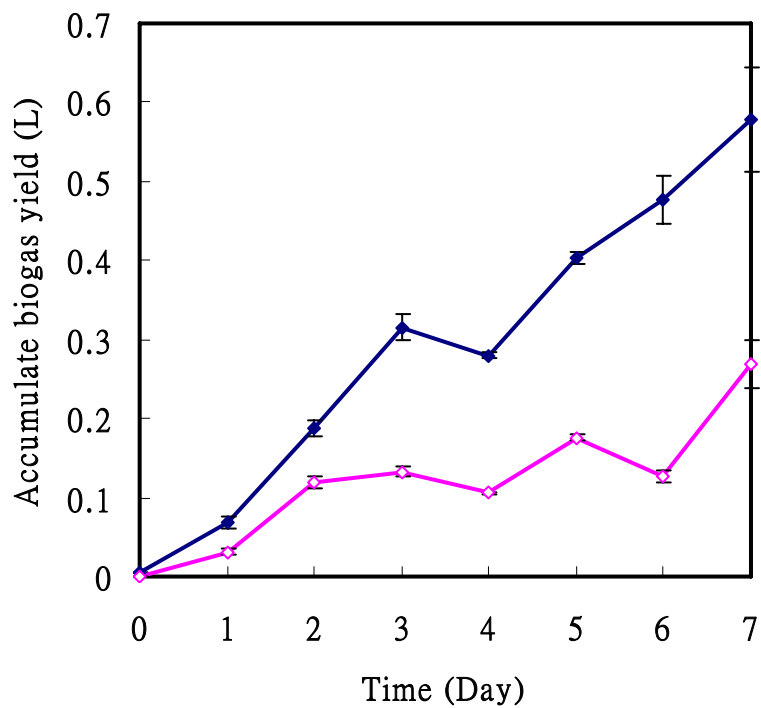


Figure 4.31 Biogas production yield(◆) and methane production yield(◇) from anaerobic biodegradation of *Gracilaria* by mixed culture. Cultivation was conducted in 10 mL of liquid medium with 4 g/L of seaweed at 35°C. (n=2)

Table 4.1 Methane yield rate with different sources of microorganism.

Inoculate	Temp. (°C)	pH	Methane yield rate (L CH₄ · g seaweed⁻¹ · day⁻¹)	Reference
cow manure	37	7.0	0.11±0.00	Vergara-Fernández. (2008)
anaerobic sewage sludge	20-25	6.5	0.01	King (1985)
wetland sediment	35	7.1	0.09±0.01	This study

第五章 結論與建議

5.1 結論

本研究以龍鬚菜為基質來源，由台中高美濕地之底泥進行厭氧培養並探討各種培養條件下，以批次實驗觀察其厭氧菌群分解海藻多醣與甲烷生成之最適培養條件，結果如下所示：

- 1、以 30°C 或 35°C 培養分別有較佳的海藻降解速率，但甲烷生成速率則以 35°C 培養時為最高，而 30°C 與 40°C 培養時之甲烷生成速率略低，因此，甲烷生成菌群最適生長範圍為 30-40°C。雖然海藻降解速率於 30°C 與 35°C 時相當，然而，最適甲烷生成速率在 35°C 培養時，因此，選擇以 35°C 為此厭氧菌群最適降解龍鬚菜並產生甲烷之溫度。
- 2、培養於 0 與 1% 鹽濃度時相較高鹽濃度添加之培養的海藻降解速率為最高，可知在有添加鹽濃度的環境下對本研究菌群之海藻多醣降解酵素並無助益。而以 0% 鹽濃度添加時有最高之甲烷生成速率，3.5% 鹽濃度添加之培養為次之，是故，甲烷生成菌群可分成不嗜鹽菌群和嗜鹽菌群，因此，鹽濃度添加以 0% 為最適。
- 3、無論是海藻降解速率或甲烷生成速率皆以在 pH 7.1 時之培養，有最佳之表現。因此，本混合厭氧菌群最適反應 pH 值為 7.1。

- 4、不同生長因子試驗部份，可知 yeast extract 或 peptone 對海藻降解均無影響，但皆可刺激菌群生長及甲烷生成，且均以 yeast extract 有較佳的表現。
- 5、添加 4 與 5 g/L 海藻培養時，有相近之海藻降解速率與甲烷生成速率，因此，此菌群在添加 4 g/L 之龍鬚菜時海藻降解速率及甲烷生成速率皆達一最大值，此外由 Monod 模式所求得之 K_s 可知本研究菌群在添加 3.37 g/L 龍鬚菜時可達最佳的比甲烷生成速率與實驗所得之 4 g/L 之龍鬚菜添加相近。
- 6、利用此混合菌群分解不同藻類之試驗顯示，龍鬚菜可容易被此混合菌群分解成小片段，但此混合菌群無法如同分解龍鬚菜一般，將馬尾藻之結構分解成小片段，而馬尾藻或龍鬚菜之海藻多醣皆可被此混合菌群利用於生長及產生甲烷。
- 7、經液相層析儀分析液相之醱酵產物可知，此混合菌群分解龍鬚菜時，液相產物主要以醋酸為主，與一般有機物厭氧醱酵之主要液相產物相同，最大產生之醋酸濃度為 29.96 ± 1.04 mmole，醋酸生成產率為 16.11 ± 0.14 mmole \cdot g seaweed⁻¹。
- 8、以濕地底泥作為植種並以龍鬚菜做為基質來源，於培養最適的條件下甲烷轉換量為 0.09 ± 0.01 L CH₄ \cdot g¹ seaweed⁻¹。

5.2 建議

本研究主要為培養建立出能降解海藻產生甲烷之厭氧菌群，並檢測此混合菌群最佳降解海藻及產生甲烷之反應條件。可嘗試由此穩定菌群中分離海藻降解與甲烷生成之純菌，進一步明確鑑別此類厭氧菌株中，海藻降解純菌與甲烷生成純菌等厭氧菌株之基本特性，或以海藻多醣分解酵素、甲烷菌產甲烷機制等方向探討。亦可再利用不同之藻類進行誘導測試本混合菌群可降解及產生甲烷之海藻種類。

第六章 參考文獻

- Ajisala, Tetsuro and Young-Meng Chiang. 1993. Recent status of *Gracilaria* cultivation in Taiwan. *Developments in Hydrobiology-Fourteenth International Seaweed Symposium. Hydrobiologia* **260/261**, 335-338.
- Araki, C. and K. Arai. 1954. Studies on agar-digesting bacteria. The isolation of agar-digesting bacteria and enzymatic activities. Memoirs. Faculty of Industrial Arts. Kyoto Technical University. *Sciences and Technology*, **3B**, 7-23.
- Arasaratnam, V., A. Senthnuran, and K. Balasubramaniam. 1996. Supplementation of whey with glucose and different nitrogen sources for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. *Enzyme and Microbial Technology*, **19**, 482-486.
- Arne Jensen. 1993. Present and future needs for algae and algal products. *Developments in Hydrobiology-Fourteenth International Seaweed Symposium. Hydrobiologia* **260/261**, 15-23.
- Bhatia R. 1990. Diffusion of renewable energy technologies in developing countries: a case study of biogas engines in India. *World Dev.*, **18**, 575-590
- Cardoso, Marco A., Miguel D. Nosedá, Mutue T. Fujii, Rosiane G. M. Zibetti and Maria E. R. Duarte. 2007. Sulfated xylomannans isolated from red seaweeds *Chondrophycus papillosus* and *C. flagelliferus* (Ceramiales) from Brazil. *Carbohydrate Research*, **342**, 2766-2775
- Chynoweth, D. P., K. F. Fannin and V. J. Srivastava. 1987. Biological gasification of marine algae. In: Bird, KT, Benson, PH (eds),

- Seaweed cultivation for renewable resources. *Elsevier*, Amsterdam, 285-295.
- Draget, K. I. and Skjåk-Bræk and Smidsrød. 1997. Alginate based new materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, **21**, 47-55.
- Dubois, M. K., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28(3)**, 350-356.
- Estevez, José M., Marina Ciancia and Alberto S. Cerezo. 2008. The system of sulfated galactans from the red seaweed *Gymnogongrus torulosus* (Phylloporaceae, Rhodophyta): Location and structural analysis. *Carbohydrate Polymers*, **73**, 594-605
- Faaij, A.P.C. 2006. Bio-energy in Europe:changing technology choices. *Energy Policy*, **34**, 322-342.
- Ghosh, S., D. L. Klass, D. P. Chynoweth. 1981. Biconversion of *Macrocystis pyrifera* to methane. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **31**, 791-807.
- Ha, J. C., G. T. Kim, T. K. Oh, J. H. Yu and I. S. Kong. 1997. β -Agarase from *Pseudomonas* sp. W7: Purification of the recombinant enzyme from *Escherichia coli* and the effects of salt on its activity. *Biotechnology of Applied Biochemistry*, **26**, 1-6.
- Haik, G. D. and S. K. Rekshik. 2003. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, **89**, 17-37.
- Henze, M., Harremoës P., Jansen J. C. and Arvin E. 1997. Wastewater treatment. Biological and chemical processes. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.

- Horn, Svein Jarle. 2000 Bioenergy from brown seaweeds. A PH. D. thesis, Norwegian University of Science and Technology, Norway.
- Hu, Z. H., G. Wang and H. Q. Yu. 2004. Anaerobic degradation of cellulose by rumen microorganisms at various pH values. *Biochemical Engineering Journal*, **21**, 59-62.
- Huang, C. Y., B. K. Patel, R. A. Mah and L. Baresi. 1998. *Caldicellulosiruptor owensensis* sp. Nov., an anaerobic, extremely thermophilic, xylanolytic bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **48**, 91-97.
- Hungate, R. E. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: J. R. Norris and D. W. Ribbons(ed.), *Methods in Microbiology*, vol.3b, Academic Press, Inc., New York. pp. 117-132.
- Ito, K. and K. Hori. 1989. Seaweed: Chemical composition and potential food uses. *Food Reviews International*, **5**, 101-104.
- Itoh, T. 2003. Taxonomy of nonmethanogenic hyperthermophilic and related thermophilic archaea. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **96**, 203-212
- Jiang, B., S.N. Parshina, W. vanDoedburg, B. P. Lomans and A. J. M. Stams. 2005. *Methanomethylovorans thermophila* sp. nov., a thermophilic, methylotrophic methanogen from an anaerobic reactor fed with methanol. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**, 465-2470.
- Joulian, C., B. K. C. Patel, B. Ollivier, Jean-Louis Garcia and P. A. Roger. 2000. *Methanobacterium oryzae* sp. nov., a novel methanogenic rod isolated from a Philippines ricefield. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**, 525-528.
- Khotimchenko, S. V. and E. V. Levchenko. 1997. Lipids of the red

- alga *Gracilaria verrucosa* (Huds.) Papenf. *Botanica Marina*, **40**, 541-545.
- Lai, M. C., S. C. Chen, C. M. Shu, M. S. Chiou, C. C. Wang, M. J. Chuang, T. Y. Hong, C. C. Liu, L. J. Lai and J. J. Hua. 2002. *Methanocalculus taiwanensis* sp. nov., isolated from an estuarine environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**, 1799-1806.
- Leschine, S. B. 1995. Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annual Review of Microbiology*, **49**, 399-426.
- Lim, Daniel. 1998. Microbiology, second edition. WCB/McGraw-Hill Companies, Inc. New York.
- Ma, Kai, Xiaoli Liu and Xiuzhu Dong. 2006. *Methanosaeta harundinacea* sp. nov., a novel acetate scavenging methanogen isolated from a UASB reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**, 127-131.
- Maeshige, S. 1962. Chemical studies on the green alga, *Monostroma nitidum wittrock*-I. Component sugars of the mucilage (part 1). *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **28**, 326-334.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, **31**, 426-428.
- Mosier, N., R. Hendrickson, N. Ho, M. Sedlak and M. R. Ladisch. 2005. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover. *Bioresource Technology*, **96**, 1986-1993.
- Murphy, J. D. and K. McCarthy. 2005. The optimal production from energy crops and wastws for use as a teansport fuel in Ireland. *Renewable Energy*, **30**, 2111-2127.

- Niehaus, F., C. Bertoldo, M. Kahler and G. Antranikina. 1999. Extremophiles as a source of novel enzymes for industrial application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **51**, 711-729.
- Renn, D. 1997. Biotechnology and the red seaweed polysaccharide industry: Status, needs and prospects. *Trends in Biotechnology*, **15(1)**, 9-14
- Schink B. 1997. Energetics of syntrophic cooperation in methanogenic degradation. *Microbiol. Molec. Biol. Reviews.*, **61**, 262-280.
- Shlimon, Adris Georgis, Michael W. Friedrich, Helge Niemann, Niels Birger Ramsing and Kai Finster. 2004. *Methanobacterium arhusense* sp. nov., a novel methanogen isolated from a marine sediment (Aarhus Bay, Denmark). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**, 759-763.
- Sowers, K. R. and H. J. Schreier (ed.). 1995. Archaea a laboratory manual: Methanogens. *Cold Spring Harbor Laboratory*, USA, pp. 93-94.
- Sugano, Y., I. Terada, M. Arita, M. Noma and T. Matsumoto. 1993. Purification and characterization of a new agarase from marine bacterium, *Vibrio* sp. strain JT0107. *Applied and Environmental Microbiology*, **59(5)**, 1549-1554.
- Tsai, W. T., Y. H. Chou and Y. M. Chang. 2004. Progress in energy utilization from agrowastes in Taiwan. *Renewable and Sustainable energy Reviews*, **8**, 461-481.
- Usov, A. I. 1992. Sulfated polysaccharides of the red seaweeds. *Food Hydrocolloids*, **6(1)**, 9-23.

- Vařadyova, Z., I. Zelenka and P. Siroka. 2000. In vitro study of the rumen and hindgut fermentation of fibrous materials (meadow hay, beech sawdust, wheat straw) in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, **83**, 127-138.
- Velde, Fred van de. 2008. Structure and function of hybrid carrageenans. *Food Hydrocolloids*, **22**, 727-734
- Vera, J., R. Alvarez, E. Murano, J. c. Slebe and O. Leon. 1998. Identification of a Marine Agarolytic *Pseudoalteromonas* Isolate and Characterization of Its Extracellular Agarase. *Applied and Environmental Microbiology*, **65(11)**, 43778-4383.
- Vergara-Fernández, Alberto, Gisela Vargas, Nelson Alarcón and Antonio Velasco. 2008. Evaluation of marine algae as a source of biogas in a two-stage anaerobic reactor system. *Biomass and bioenergy*, **32(4)**, 338-344.
- Yang, Y., K. Tsukahara, T. Yagishita and S. Sawayama. 2004. Performance of a fixed-bed reactor packed with carbon felt during anaerobic digestion of cellulose. *Bioresource Technology*, **94**, 197-201.
- 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，
- 行政院國家科學委員會。2006。2006年政府科技發展策略規劃報告。行政院農業委員會漁業署漁業資訊網
<http://www.fa.gov.tw/chn/index.php>
- 吳季芳。2006。以澱粉為碳源基質進行生物產氫。成功大學化學工程系碩士論文。
- 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。

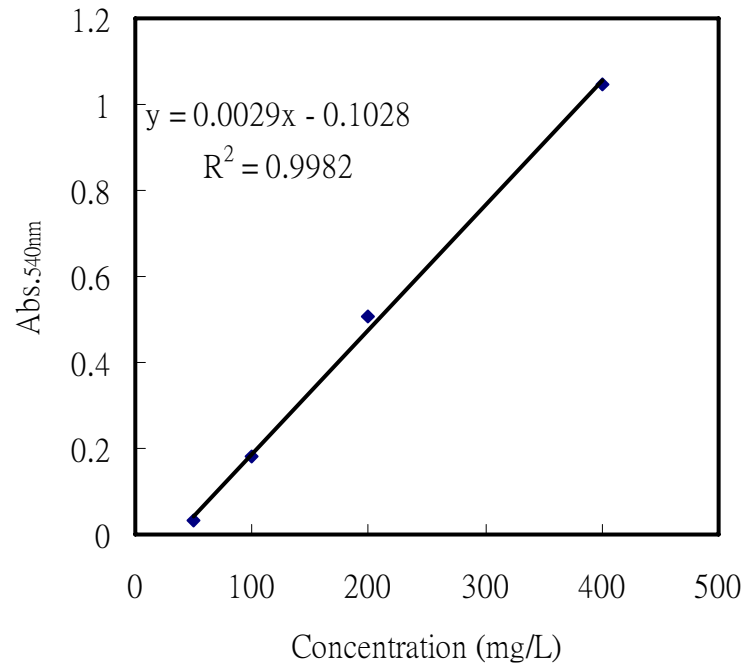
- 吳淑娟、周宏農。1991。龍鬚菜的市場情況分析。中國水產。460期，7-16。
- 李承芳。2005。*Alterococcus* 洋菜酶基因的選殖與分析。東吳大學微生物研究所碩士論文。
- 林柏丞。2004。滾管型複製的嗜鹽甲烷古生菌質體 pML 之 rep 基因及其表現蛋白質的分析。國立中興大學生命科學研究所碩士論文。
- 徐維廷。2007。纖維水解菌群中嗜熱產氫菌 *Clostridium* sp. C4 之分離及其產氫特性研究。東海大學環境科學與工程研究所碩士論文。
- 馬盈瑜。2003。龍鬚菜多醣及其水解產物生理活性之探討。國立屏東科技大學食品科學系博士學位論文。
- 袁景道。2001。海洋細菌 *Pseudomonas vesicularis* MA103 之 agarase 發酵槽生產條件探討以及海藻多醣與經酵素水解所得寡糖之應用。國立臺灣海洋大學食品科學研究所碩士論文。
- 張添晉。2000。沼氣控制與回收再利用技術，行政院環境保護署八十九年度委辦計畫，封閉垃圾場復育綠美化執行成效評估。
- 陳建翰。2006。造紙廢水中嗜熱厭氧纖維素降解菌群解構分析及嗜熱甲烷菌之分離與鑑定。東海大學環境科學與工程研究所碩士論文。
- 陳再發、紀美連、洗宜樂、薛月娥。1989。海藻化學組成、原料貯藏及加工之研究。臺水試澎所報彙集。8期。57-68。
- 臺灣海藻資訊網(Seaweed net of Taiwan)
<http://www.ntm.gov.tw/seaweeds/home.asp>
- 彭子倩。2005。光度、溫度及鹽度對於螺旋藻多醣體(膠質)之影響。國立台灣海洋大學水產養殖研究所碩士論文。
- 黃美燕。2006。嗜熱厭氧生物降解纖維素產甲烷程序最佳化探討。東海大學環境科學與工程研究所碩士論文。

賴美津。2006。厭氧環境的甲烷古菌。科學月刊，436 期，270-273。

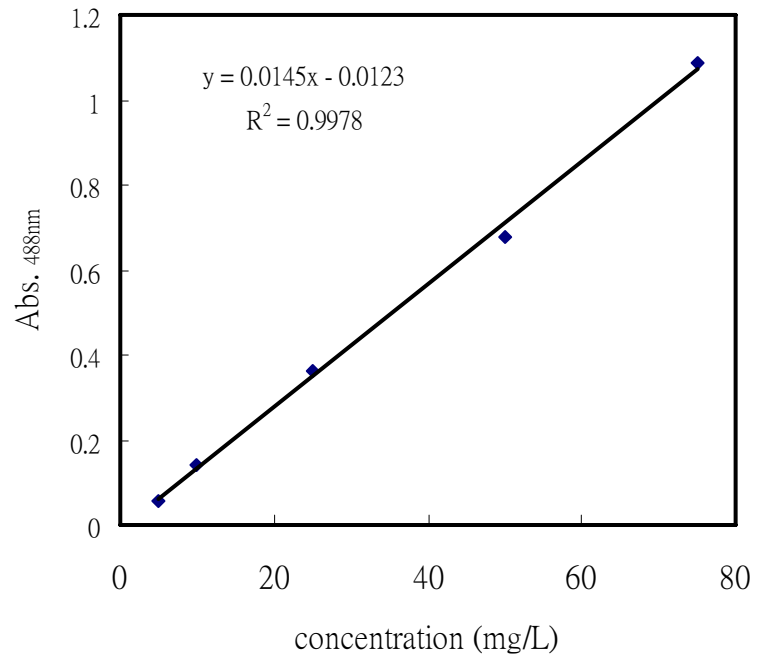
盧樂人。2003。能源使用、就業、經濟成長與景氣循環，中原大學國際貿易學系碩士論文。

附錄

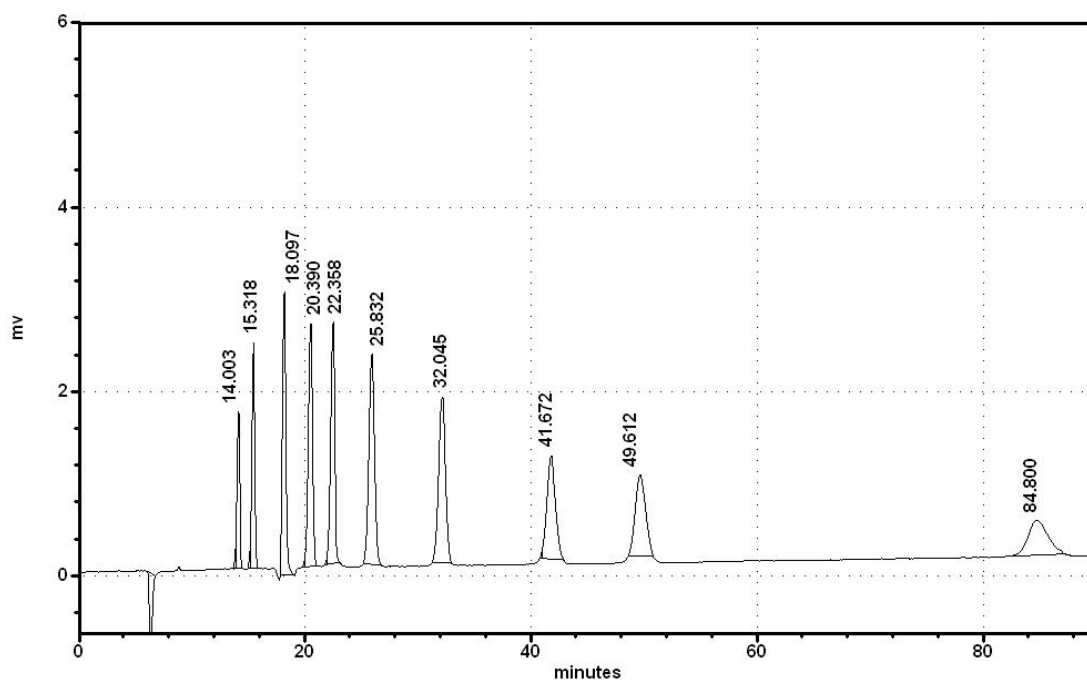
附錄一 還原糖檢量線



附錄二 總糖檢量線



附錄三 揮發性有機酸標準品 LC 停留時間



偵測端：shimadzu, RID-10A

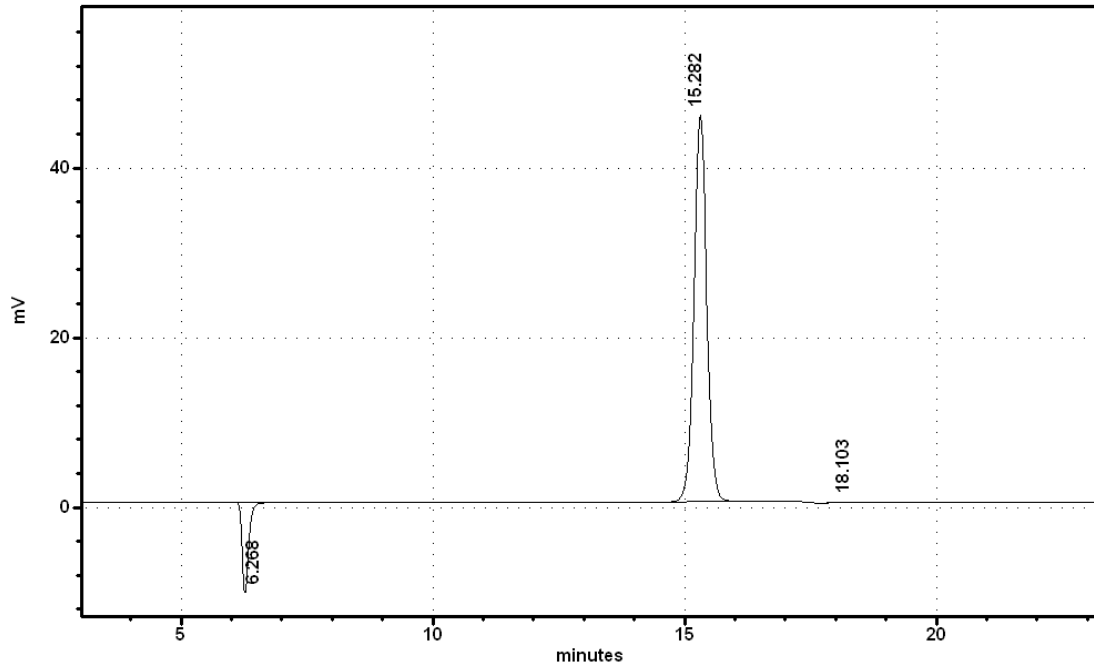
Column : *Transgenomic* ICsep ICE-COREGEL 87H3 column, Part NO:
ICE-99-9861, Serial NO: 06416923

流洗液: 0.008N H₂SO₄

分析條件: 0.6ml/min, column 35°C

附錄四 醋酸標準品 LC 停留時間及檢量線

A 醋酸標準品 LC 分析圖



Retention time = 15.300 ± 0.018 min

B 檢量線

