

第四章 結果與討論

4.1 菌種增富培養 (Enrichment culture)

本研究採用廢紙回收廠之初沉池水樣進行混合培養，使用 Whatman No.1 濾紙為基質進行高溫厭氧培養，探討高溫下纖維素之生物降解。將採集之樣品置於在 55、60、70°C 培養時，濾紙皆未被分解的情形，與最終產物甲烷生成，而在 70°C 培養時有較快的濾紙分解情形，增富時之培養體積為 200 ml，培養 8 天可完全將 8 g/L 濾紙完全分解 (Fig. 4.1)。因此，先將培養溫度設為 70°C，針對混合菌群對於降解纖維素、生物量及甲烷生成進行分析，探討混合菌群對於纖維素的降解與甲烷生成之最佳化條件。

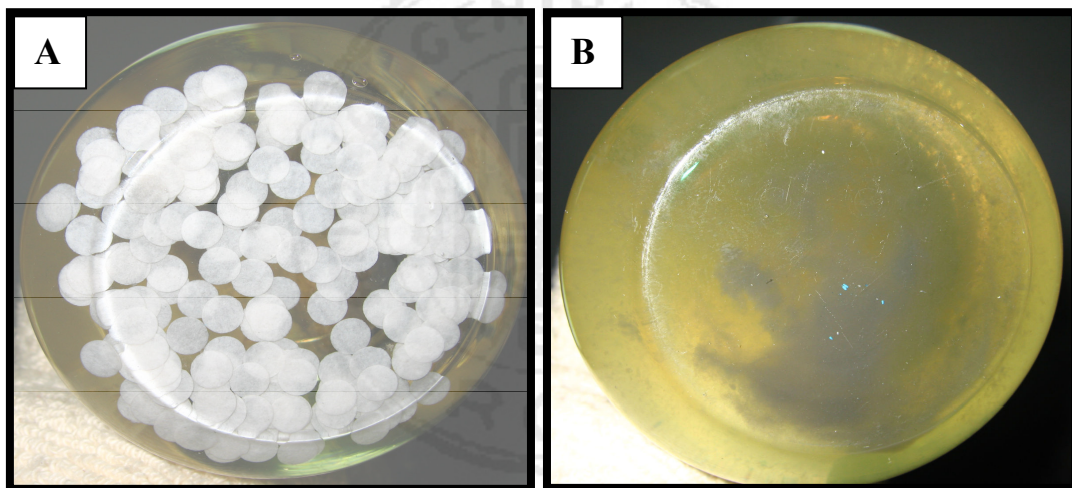


Fig. 4.1 Degradation of filter paper by the microbial community in the batch cultured. (A) Uninoculated culture, (B) Inoculated culture. All cultures were incubated at 70°C for 8 days.

4.2 甲烷分析

以濾紙為碳源並在70°C進行增富培養後，發現有氣體產生，取100 µl含10 µmole之甲烷氣體標準品 (Methane Standard, Supelco) 以GC-FID進行分析，並建立甲烷之偵測條件，再取100 µl之培養瓶中瓶頂空間的氣體，與甲烷標準品比對出現時間。

在retention time 0.717分鐘出現甲烷標準品之peak (Fig. 4.2 A)，與樣品進行比對後，發現本研究之實驗樣品分析後之peak retention time出現時間為0.717分鐘 (Fig. 4.2 B)，因此可以證明在由廢紙回收廠廢水中馴化出高溫降解纖維素之混合菌群中含有甲烷生成菌，因此在降解過程中含有甲烷氣體生成，因而本研究以不同的生長條件下，探討纖維及生長情形之外，並進行甲烷產量分析。

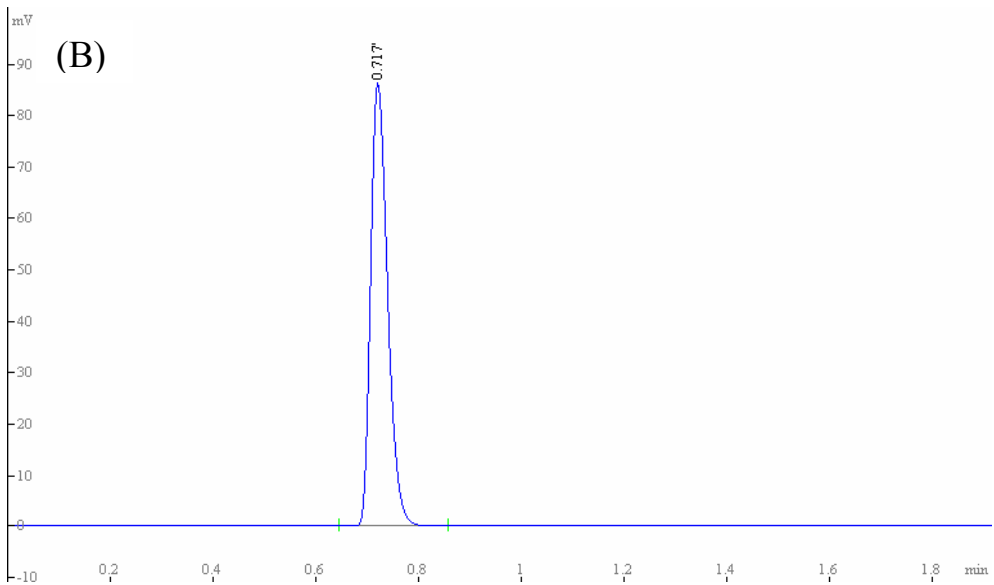
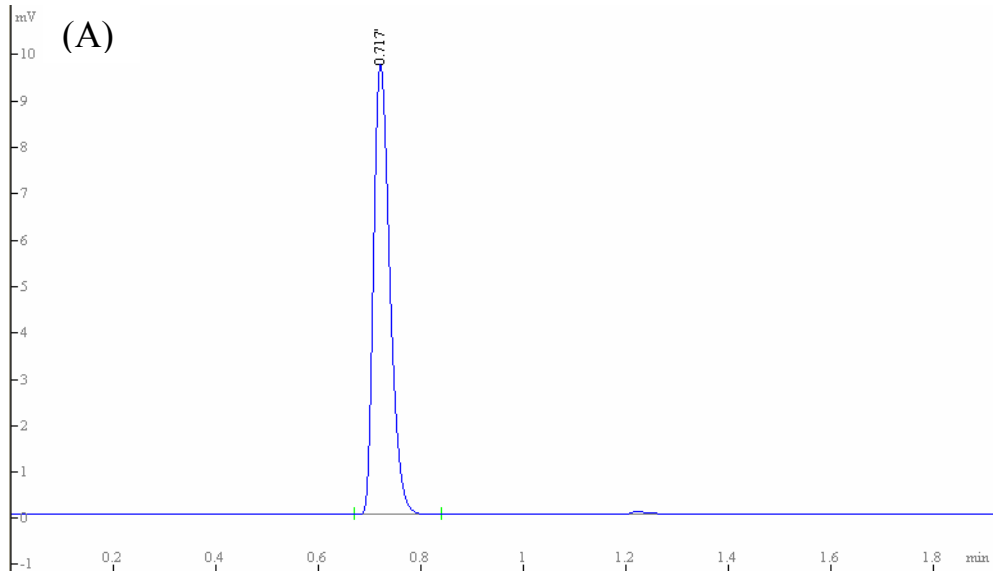


Fig. 4.2 Gas Chromatograph of methane standard gas (A) and headspace gas of filter paper degrading mixed culture (B). Injection volume of gas was 100 μ l.

4.3 最佳生長條件

利用不同的溫度、pH 值、基質添加濃度、yeast extract、peptone、不同來源之纖維素與不同濃度之 NaHCO_3 添加探討最佳生長條件，培養體積皆為 100 ml，以此混合菌群之纖維素降解與甲烷產率進行探討。在微生物生長情形以蛋白質濃度表示其生物量，計算其比生長速率，以不同條件下之比生長速率變化，探討不同培養條件下，對於纖維降解與甲烷生成菌的影響。

4.3.1 溫度

微生物培養溫度影響菌群生長，間接影響副產物或最終產物的生成，而微生物的酵素活性隨生長溫度上升而增高，直至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溫度，在維持菌群活性最高時，生長與代謝速度最佳狀況的環境下再進行其它實驗。故本實驗添加 2 g/L 的濾紙作為碳源，培養體積為 100 ml，在 45、50、55、60、65、70、75°C 的溫度下培養 9 天，測試不同培養溫度對菌群生長及濾紙分解之影響。

在濾紙降解的部份以 Anthrone reagent 測定培養基中因微生物分解濾紙而形成之纖維素殘渣 (Fig. 4.3)，培養至第 10 天時，未植種空白組內的濾紙片形狀完整，在植種之實驗組中，發現以 45°C 培養時，遲滯期約為 5 天，在第 6 天濾紙才有開始被瓦解的情形，

培養至第 10 天僅可測得最高為 0.39 ± 0.02 g/L 之纖維素粉末，觀察發現培養瓶中仍保留大部份完整的濾紙片，瓦解的濾紙少因而在培養基中可以測到的纖維素殘渣濃度很低。在 50°C 培養時，有 4 天的遲滯期，可測得最高濃度為 1.21 ± 0.02 g/L 的纖維素，僅有少量完整的紙片存在。而在 55°C 培養時，濾紙幾乎完全被分解成粉末狀，但仍有 2 天的遲滯期，在第 4 天可測得培養基中纖維素最高濃度為 1.39 ± 0.09 g/L，培養至第 10 天時仍有 0.60 ± 0.16 g/L 的纖維素未被降解。另外在 60°C 、 65°C 、 70°C 與 75°C 培養時，則無遲滯期，表示此混合菌群在高於 55°C 的環境下，有較高的纖維降解效率，但以 60°C 培養需 10 天可幾乎將纖維降解完，而 70°C 與 75°C 僅培養 3 天，即可將濾紙完全分解。

因受培養基中纖維素顆粒之干擾，菌群生長之生物量以蛋白質生成情形表示，如 Fig. 4.4 所示，在 60°C 、 65°C 與 70°C 培養時之蛋白質濃度最高分別為 56.30 ± 2.73 、 54.22 ± 1.42 與 47.06 ± 2.51 mg/L，而培養在 $45^{\circ}\text{C}\sim 55^{\circ}\text{C}$ 與 75°C 時，生成之蛋白質濃度較低，分別為 4.589 ± 0.92 、 13.64 ± 0.29 、 44.17 ± 2.71 與 21.34 ± 1.81 mg/L。

依上述所示，在高溫之下有較佳的纖維素降解與生物量生成，再以最終產物甲烷生成量進行探討，如 Fig. 4.5 所示，以 70°C 培養時有最高甲烷生成量 1252 ± 50 μmole 生成，在培養 65°C 與 60°C

時之甲烷生成量略低，分別為 1134 ± 56 與 1113 ± 57 μmole ，但培養在 45°C ~ 55°C 與 75°C 時，生成之甲烷生成量較低，分別為 192 ± 20 、 386 ± 8 、 750 ± 2 與 227 ± 20 μmole 。

取菌群對數生長期 (log growth phase) 之蛋白質與甲烷生成量變化值計算此生長速率及最大甲烷生成速率後可得 Fig. 4.6，發現均在 70°C 培養時之比生長率與最大甲烷生成率最高，分別為 0.80 ± 0.02 day^{-1} 與 0.92 ± 0.00 $\mu\text{mole day}^{-1}$ 。以 70°C 培養時有最高之生物量與甲烷生成，再利用測得之蛋白質濃度與甲烷生成量計算比甲烷生成率，如 Fig. 4.7 所示，在 70°C 培養時有最高比甲烷生成速率 1.17 ± 0.00 $\mu\text{mole CH}_4 \text{ day}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$ 。

培養在 $65\sim 70^{\circ}\text{C}$ 的溫度下，纖維降解效率、生物量之生成及甲烷生成量高，表示此混合菌群為厭氧嗜熱菌群，在高溫培養時活性高且代謝速度快，可能此厭氧嗜熱菌群具有耐熱酵素因而可在高溫下運作而不失活性，而低於 65°C 時，纖維素降解與甲烷生成量隨溫度遞減而降低，在 70°C 培養時之比生長率、最大甲烷生成率與比甲烷生成率皆有最高的速率，故以 70°C 培養為最佳培養溫度。

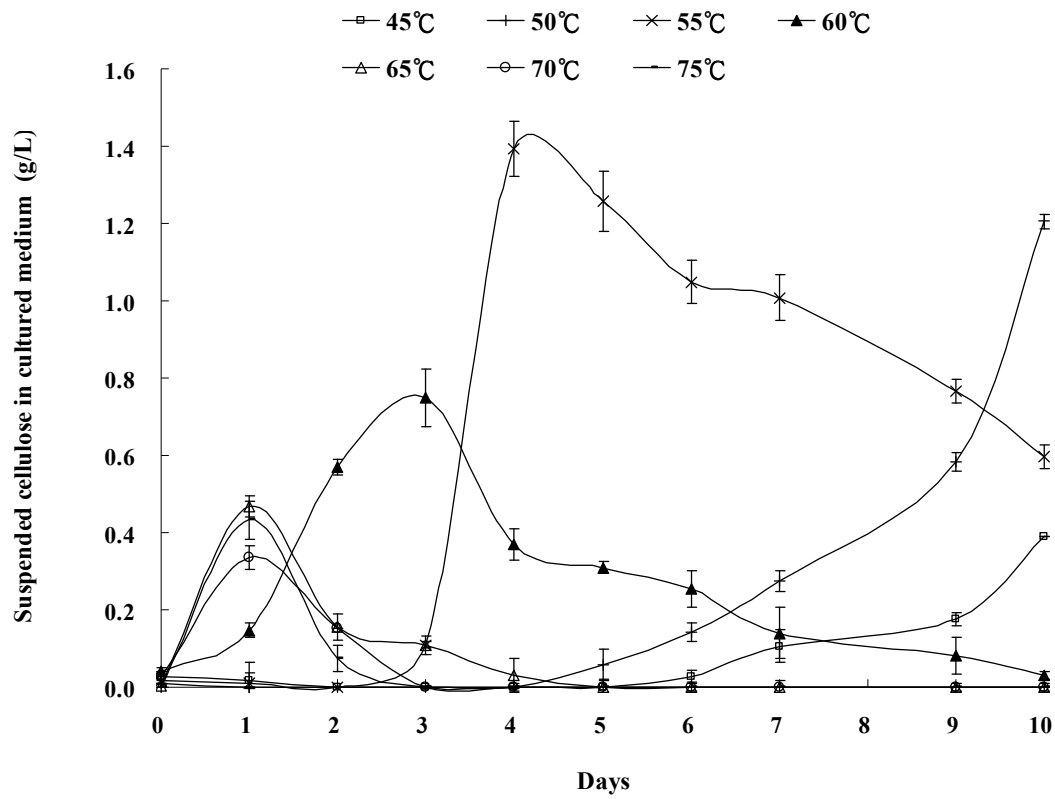


Fig. 4.3 Filter paper degradation of mix cultures with different temperatures. Cultures of mix thermophilic anaerobic were grown at different temperatures. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 2 g/L of filter paper.

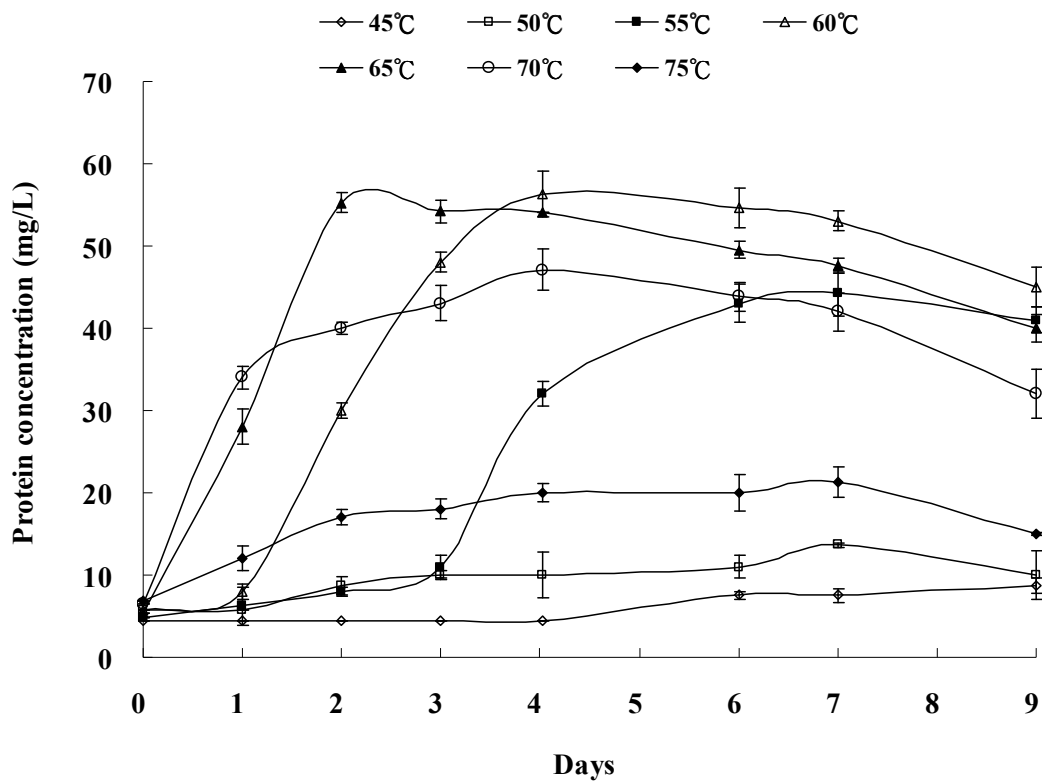


Fig. 4.4 Growth of biomass measured as total protein concentration with different temperatures. Cultures of mix thermophilic anaerobic were grown at different temperatures. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 2 g/L of filter paper.

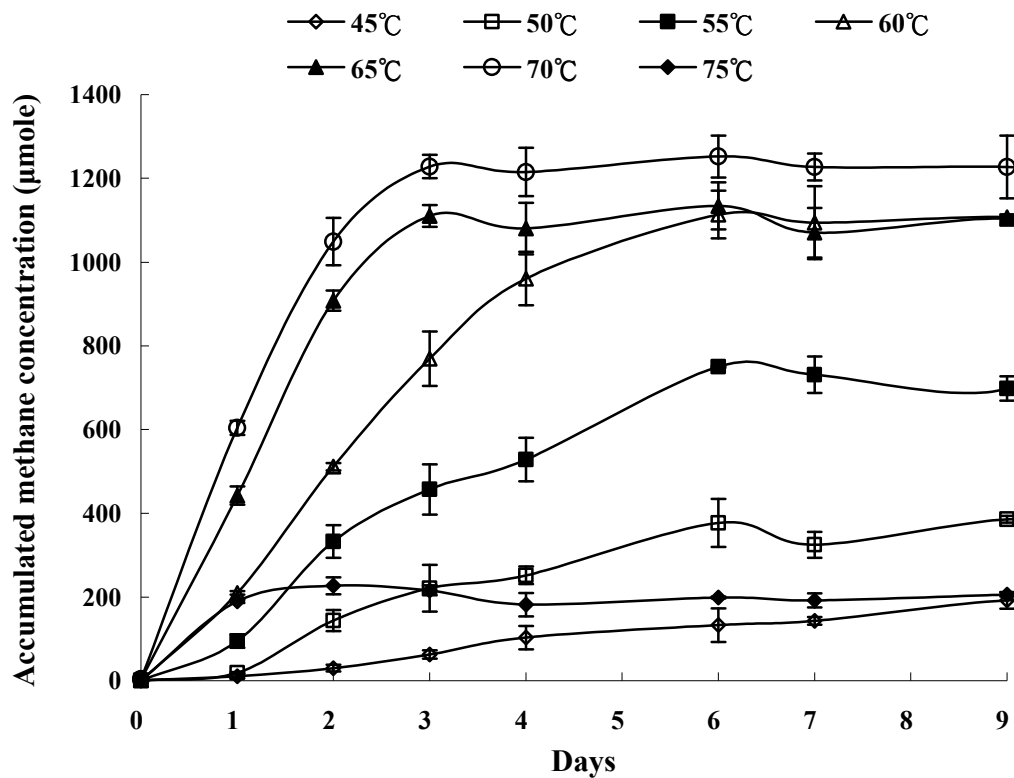


Fig. 4.5 Methane production from bioconversion of filter paper by mix thermophilic anaerobes under different temperatures. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 2 g/L of filter paper.

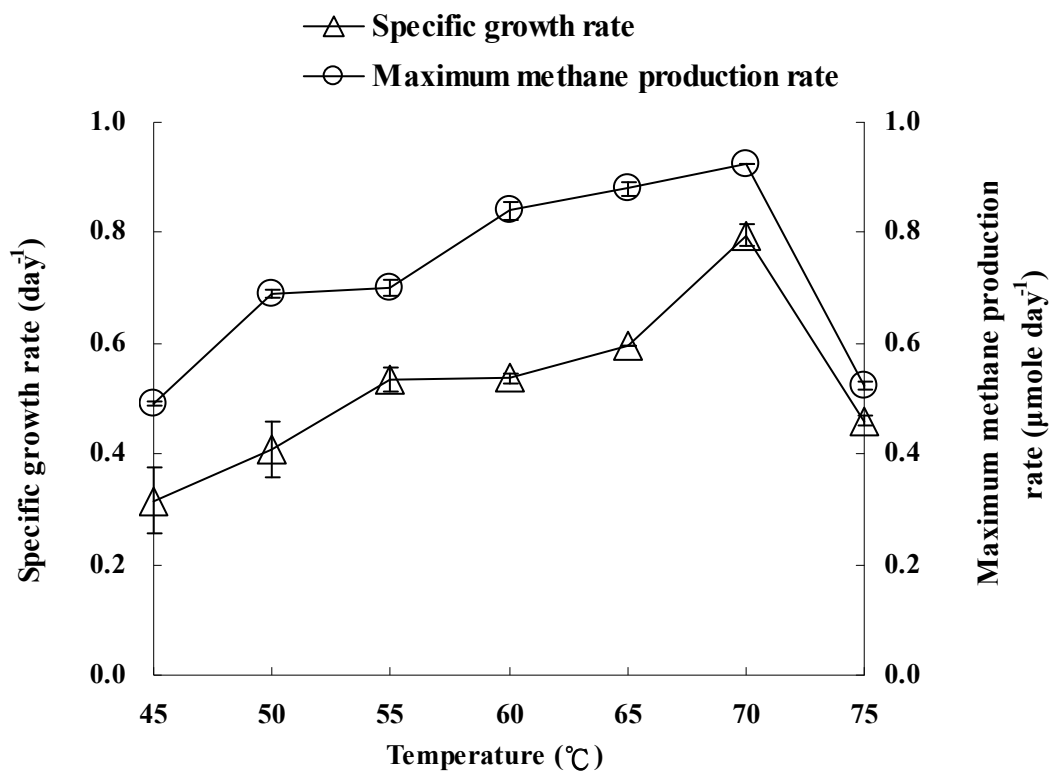


Fig. 4.6 Specific growth rate (day^{-1}) and maximum methane production rate ($\mu\text{mole day}^{-1}$) from cellulose bioconversion by thermophilic anaerobes at different temperatures. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 2 g/L of filter paper.

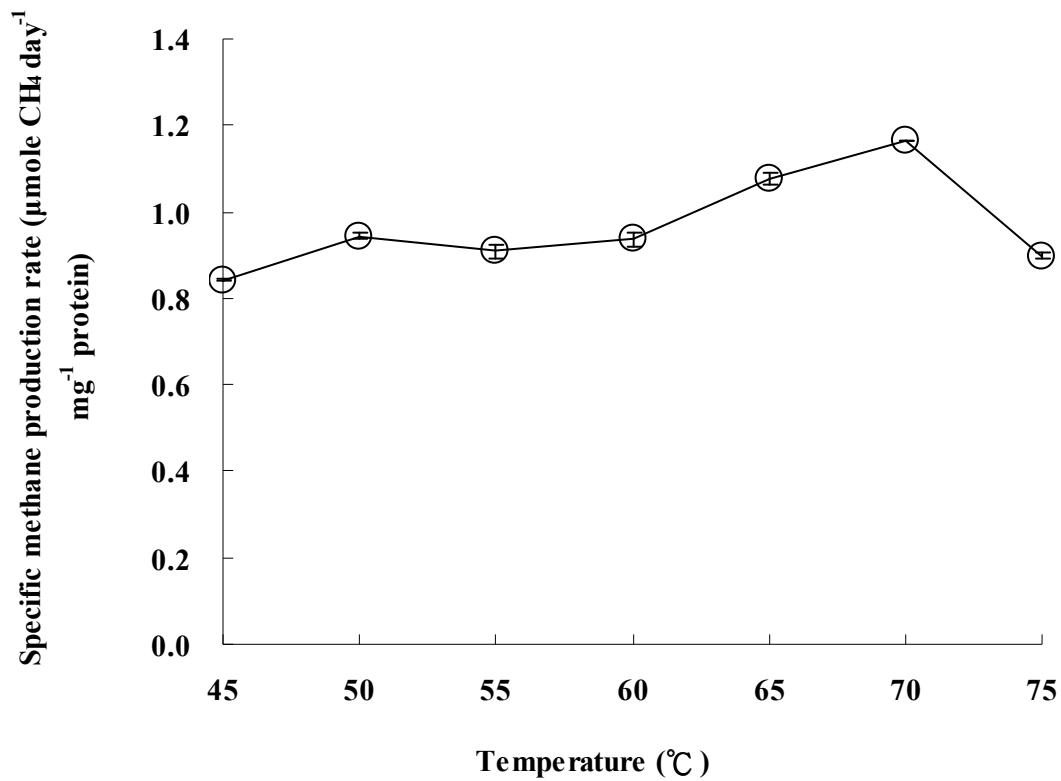


Fig. 4.7 Specific methane production rate ($\mu\text{mole CH}_4 \text{ day}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) from cellulose bioconversion by thermophilic anaerobes at different temperatures. Cultivation in 100 ml of liquid medium with 2 g/L of filter paper.

4.3.2 pH

酸鹼度會影響微生物之生長速率，pH 值過高或太低之下造成酵素系統失去活性並限制微生物生長。微生物之培養 pH 值隨不同型態菌群而有所不同，大部份的菌群適合在中性的環境下生長，少數為嗜酸 (Acidophiles)、嗜鹼性 (Alkalophiles) 微生物。因本研究中之厭氧嗜熱混合菌群中含有甲烷生成菌群，且甲烷生成菌群大部份為中性菌，因此以中性 pH 值設計不同之培養基起始 pH 值，範圍為 pH 6.1、6.2、6.4、6.6、6.8、7.2、7.7、7.8，濾紙添加濃度為 2g/L，測試菌群最佳生長之 pH 值。

結果如 Fig. 4.8，pH 值在 6.6 與 6.8 之培養情況下，在第 5 天就可將濾紙分解完，最終 pH 值分別為 6.0 ± 0.01 與 6.2 ± 0.08 (Fig. 4.9)，而其它 pH 值培養時大約需要 7 天，可將濾紙完全分解。其纖維降解速率如 Table 4.1 所示，培養在 pH 6.6 與 6.8 時，分別有最高 0.48 ± 0.00 與 $0.48 \pm 0.06 \text{ g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$ 。

以 pH 6.1~6.4 培養至第 8 天時，最終 pH 值分別為 4.5 ± 0.01 、 4.7 ± 0.13 與 4.8 ± 0.06 ，表示 pH 值的緩衝範圍不夠，導致 pH 值隨著纖維素被分解所造成的酸化影響而變酸，但是在 pH 7.7 與 7.8 培養之下，最終 pH 值分別為 6.9 ± 0.06 與 7.1 ± 0.04 ，pH 值過低或過高時，纖維降解速率降低，因此，不適當的 pH 值培養時容易對

纖維分解速度造成抑制。

蛋白質生成情形與纖維素降解效率一致，皆在 pH 6.6 與 6.8 培養時有最高值，在 pH 6.6 與 6.8 培養時，有最高蛋白質濃度，分別為 29.08 ± 0.78 與 27.20 ± 1.28 mg/L (Fig. 4.10)，而培養在 pH 7.2、7.7 與 7.8 時，生成之蛋白質濃度較低，分別為 22.33 ± 1.29 、 16.72 ± 0.39 與 17.67 ± 0.12 mg/L。

另外在甲烷生成情形，與蛋白質生成及纖維素降解效率有相同的趨勢，如 Fig. 4.11 所示，以 pH 6.6、6.8 與 7.2 培養時，有最高生成量為 1198 ± 61 、 1299 ± 51 與 1228 ± 73 μmole 產生，而在 pH 7.7 與 7.8 培養時略低，生成之甲烷生成量分別為 1040 ± 32 與 1172 ± 65 μmole ，最低之甲烷生成量是在 pH 6.1~6.4 培養時，分別為 707 ± 11 、 879 ± 45 與 973 ± 32 μmole 。

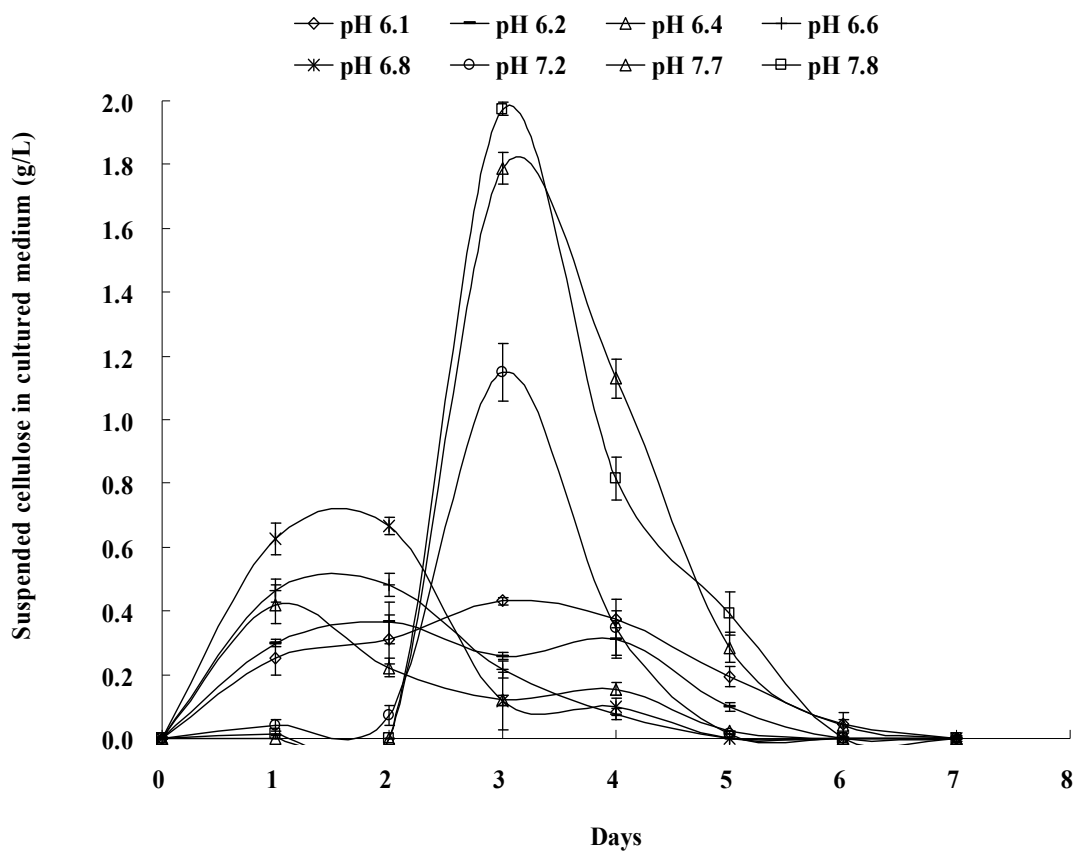


Fig. 4.8 Filter paper degradation of mix culture with different pH's. Cultures of mix thermophilic anaerobic were grown at different pH values. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 2 g/L of filter paper.

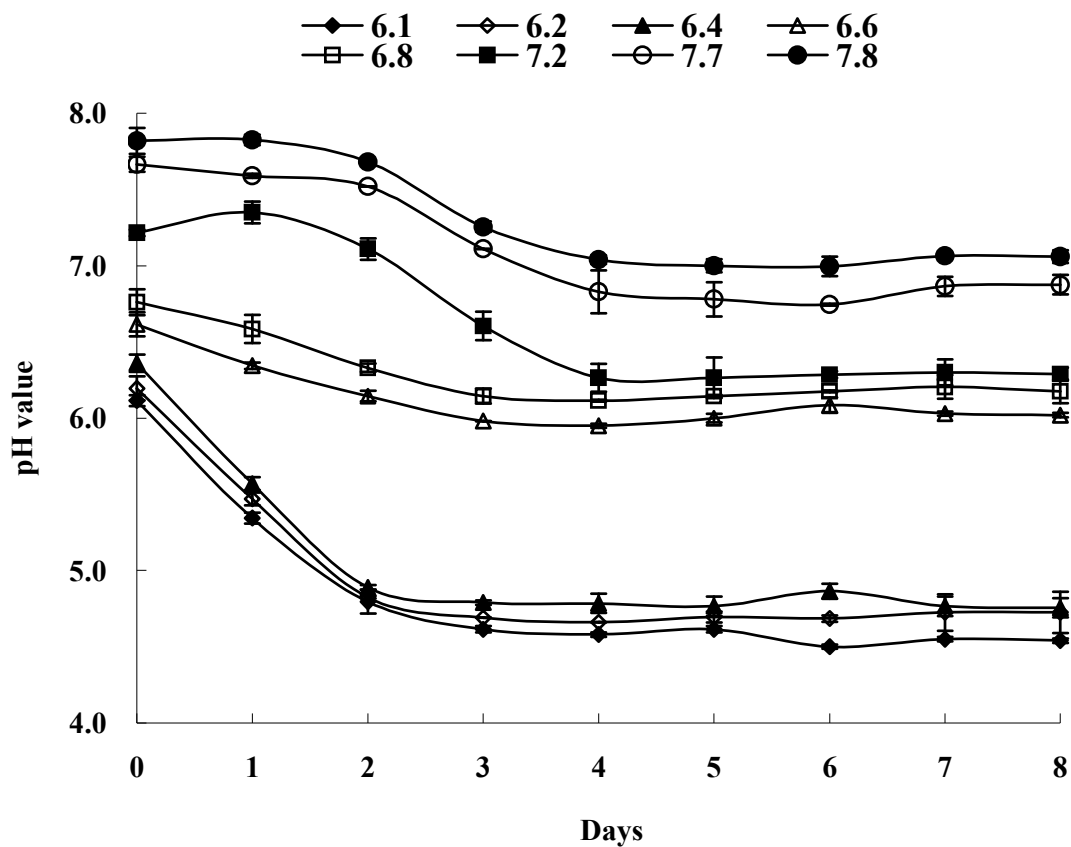


Fig. 4.9 Changes of pH of cultural medium during bioconversion of cellulose at different initial pH's. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 2 g/L of filter paper.

Table 4.1 Filter paper degradation rate of mixed culture at different pH's.
 The pH values shown in this table were initial pH value of medium before cell inoculation.

	Culture pH value							
	6.1	6.2	6.4	6.6	6.8	7.2	7.7	7.8
Filter paper degradation rate (g L ⁻¹ day ⁻¹)	0.33±0.00	0.33±0.03	0.40±0.05	0.48±0.00	0.48±0.06	0.40±0.00	0.33±0.03	0.32±0.01

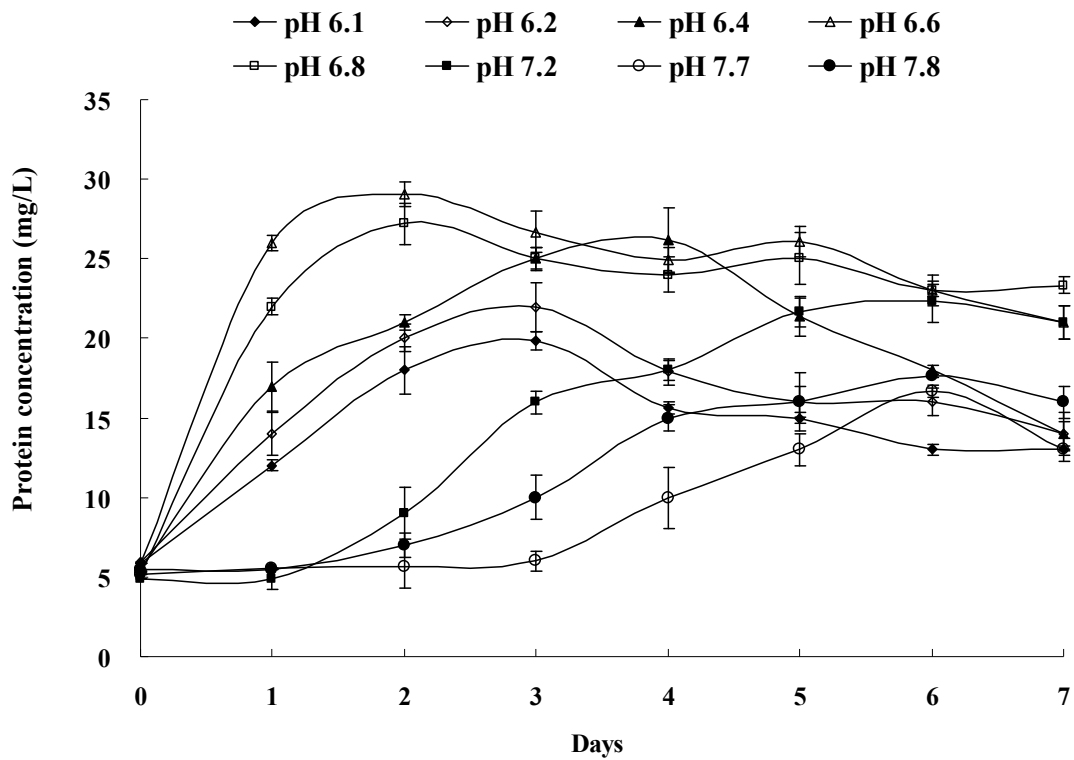


Fig. 4.10 Total protein concentration produced by the mix culture grown at different initial pH's. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 2 g/L of filter paper.

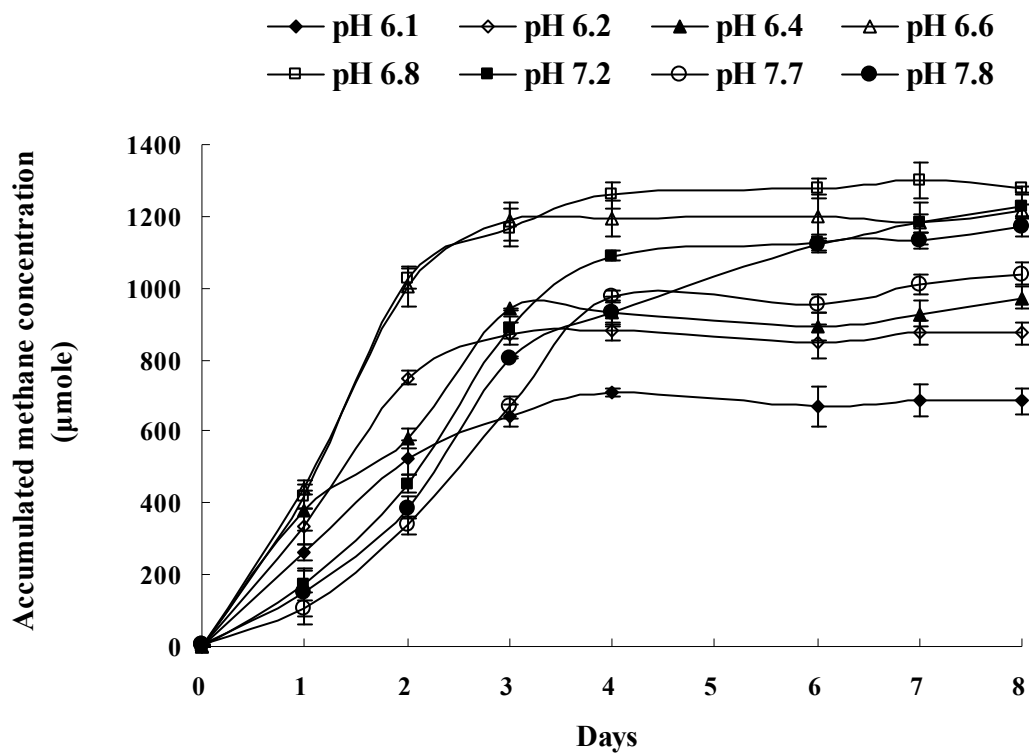


Fig. 4.11 Methane production from filter paper bioconversion by the mix culture grown at different initial pH's. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 2 g/L of filter paper.

比生長速率與最大甲烷產生速率如 Fig. 4.12 所示，發現培養在 pH 6.6 與 6.8 之比生長率與最大甲烷生成率較高，其中比生長率分別為 0.96 ± 0.02 與 $0.90 \pm 0.05 \text{ day}^{-1}$ ，而最大甲烷生成率分別為 0.82 ± 0.02 與 $0.82 \pm 0.04 \mu\text{mole day}^{-1}$ ，其中在 pH 6.8 培養時有最高比甲烷生成速率為 $0.91 \pm 0.05 \mu\text{mole CH}_4 \text{ day}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ 生成 (Fig. 4.13)。

在 pH 7.2~7.8 培養時其纖維素降解反應皆有 2 天的遲滯期，可能是菌群對於鹼度的耐受性低，所以細胞生長較緩慢，生長率低也使得分解纖維及最大甲烷生成率降低，而培養在 pH 6.1~6.4 時，起始 pH 值為菌群可接受範圍，無遲滯期，但緩衝範圍較低，因此纖維素被分解後，會產生揮發性脂肪酸而開始累積，培養至第 2 天時之 pH 值快速下降至 5.0 左右，而過酸的環境會抑制甲烷菌群的生長，使最大甲烷生成率低，但是在 pH 6.6 與 pH 6.8 培養時有最佳纖維素降解速率、生物量與甲烷生成，表示 pH 6.6 與 pH 6.8 緩衝能力足夠，即使在纖維素被降解後產生酸化累積，pH 值也不至於下降太多單位，其中以 pH 6.8 培養時有最高之比甲烷生成率，此厭氧嗜熱菌混合菌群最佳生長之 pH 值為 6.8。

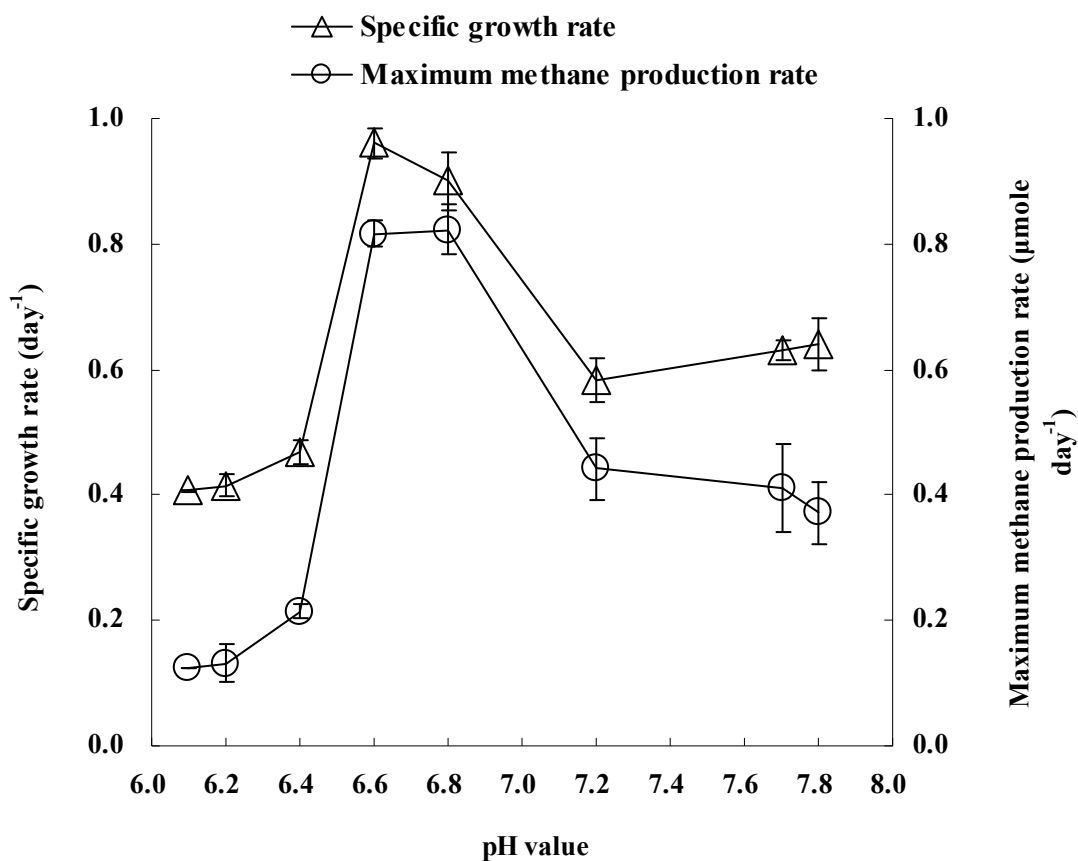


Fig. 4.12 Specific growth rate (day⁻¹) and maximum methane production rate (μmole day⁻¹) from cellulose bioconversion by thermophilic anaerobes with different pH values. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 2 g/L of filter paper.

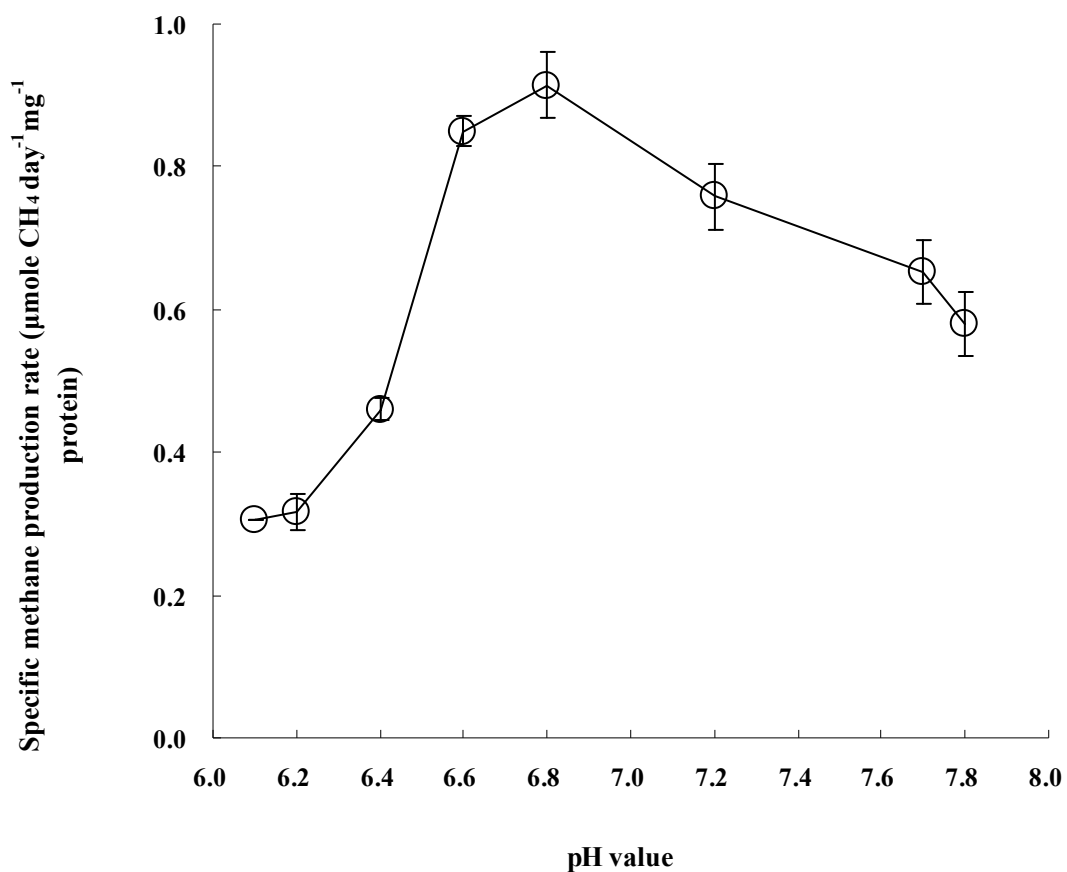


Fig. 4.13 Specific methane production rate ($\mu\text{mole CH}_4 \text{ day}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) from cellulose bioconversion by thermophilic anaerobes with different pH values. Cultivation in 100 ml of liquid medium with 2 g/L of filter paper.

4.3.3 纖維素濃度影響

碳源係為微生物生長主要能量來源，適量的添加可增進微生物生長。過高濃度的碳源，對於菌群生長會造成抑制作用，生長速度受影響而遲緩。本研究針對此厭氧嗜熱混合菌群，以 100 ml 的培養體積，添加不同濃度的 α -cellulose 作為唯一碳源進行培養，觀察纖維素濃度對纖維降解菌群與甲烷生成菌群的影響，以尋求本菌群最佳生長之纖維素添加量。

添加 12、15 與 20 g/L 之纖維素培養時，在第 12 天仍有 0.22 ± 0.10 、 1.77 ± 0.00 與 1.88 ± 0.29 g/L 纖維素未被降解，瓶中仍有纖維素殘渣殘留，少量添加時，如添加 1 g/L 之纖維素培養時，僅需 2 天的培養可將纖維素完全降解，在 2、5、8 與 10 g/L 培養時分別需要 3、5、9 與 12 天的培養時間可完全分解纖維素 (Fig. 4.14) 隨添加的纖維素濃度越高，則降解時間也隨之增加，但以比纖維素降解速率而言，培養在 8 g/L 時，有最高 0.60 ± 0.01 g L⁻¹ day⁻¹，如 Fig. 4.15 所示，顯示適當的碳源濃度可刺激提高纖維降解速率，過多的纖維素則使微生物對於纖維素降解速率降低，高碳源的環境下累積的副產物過高，會抑制菌群的生長，低碳源提供給的能量不足而容易有競爭作用，但以蛋白質生成情形如 Fig. 4.16，在 8 g/L 纖維素培養時之蛋白質濃度最高為 85.63 ± 1.90 mg/L，培養在 1 與 2 g/L 時，生成之蛋白質濃度最低，分別為 40.54 ± 3.67 與

50.11±2.60 mg/L。

生物量之生成與最大甲烷生成情形相似，如 Fig. 4.17 所示，以 8、10、12 與 15 g/L 培養時，有最高甲烷生成量，分別為 4123±68、4162±4、3992±77 與 4135±96 μmole 生成，培養在 1 與 2 g/L 時之甲烷生成量最低，分別為 925±98 與 1645±72 μmole ，其中 10 g/L 之纖維素所產生之甲烷最終濃度 (4162±4 μmole) 高於其它測試之纖維素添加量所生成之甲烷。

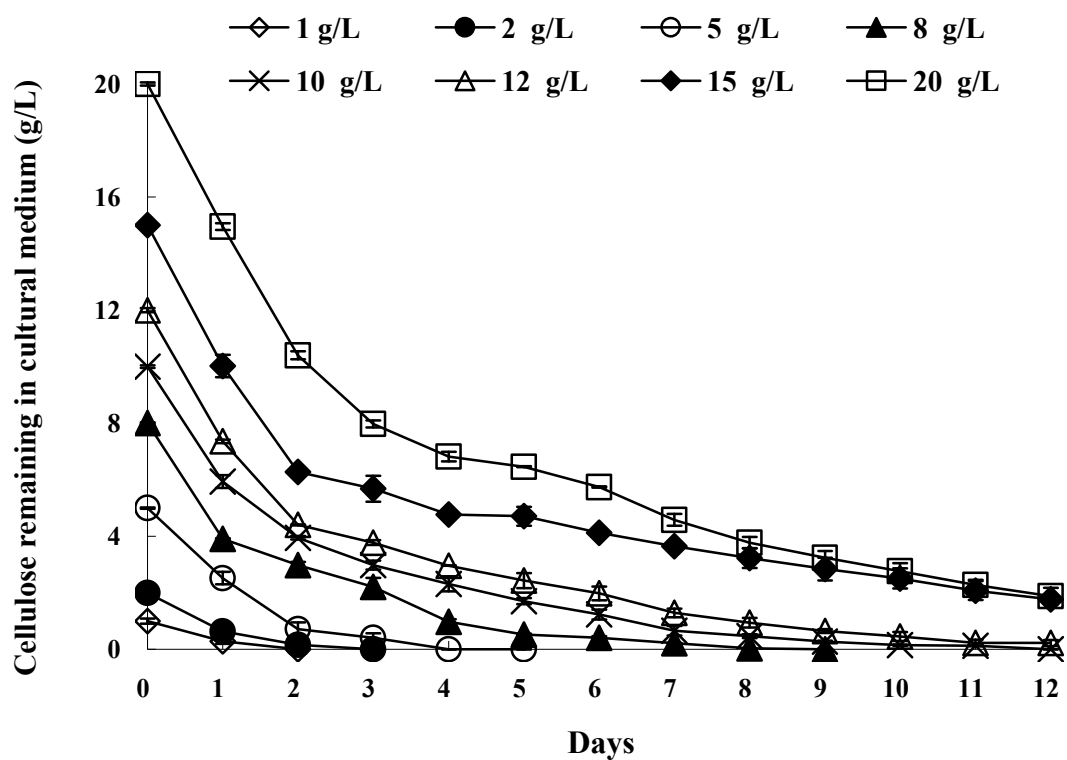


Fig. 4.14 Cellulose degradation of mix cultures with different concentration of α -cellulose under anaerobic condition. Cultivation was conducted in 100 ml of medium at 70°C with different concentrations of α -cellulose.

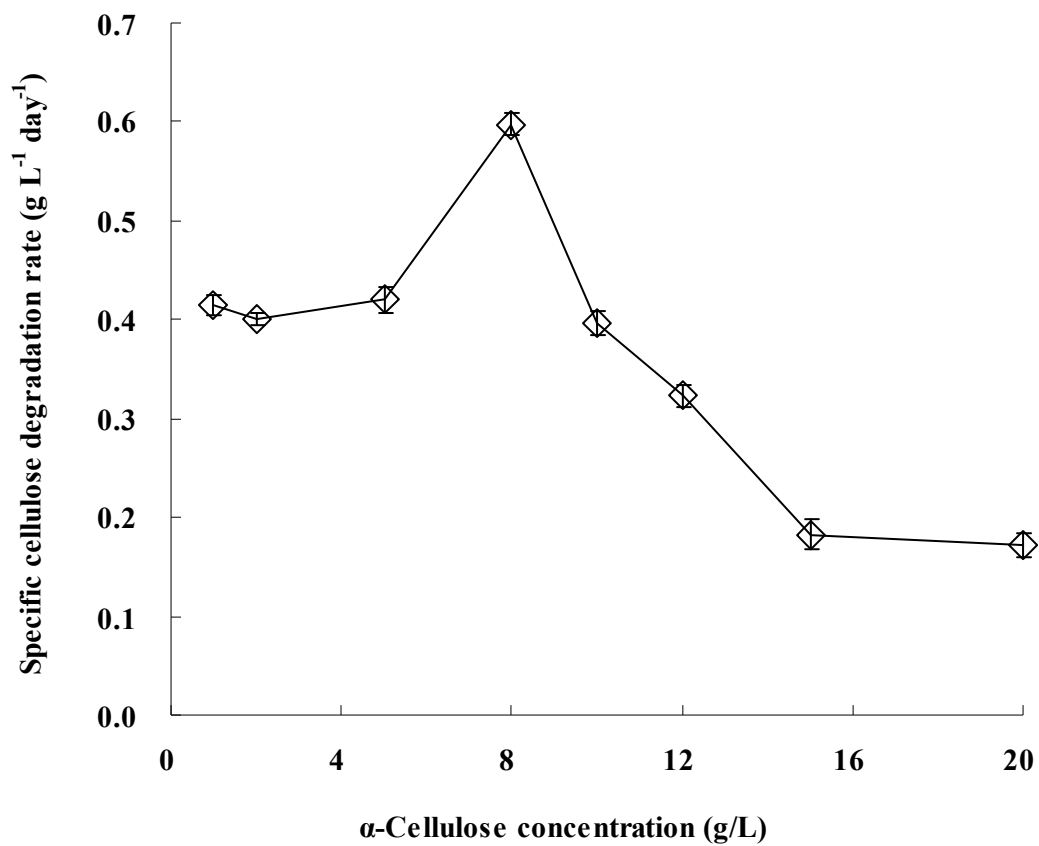


Fig. 4.15 Specific cellulose degradation rate ($\text{g L}^{-1} \text{ day}^{-1}$) with different concentration of α -cellulose under anaerobic condition.

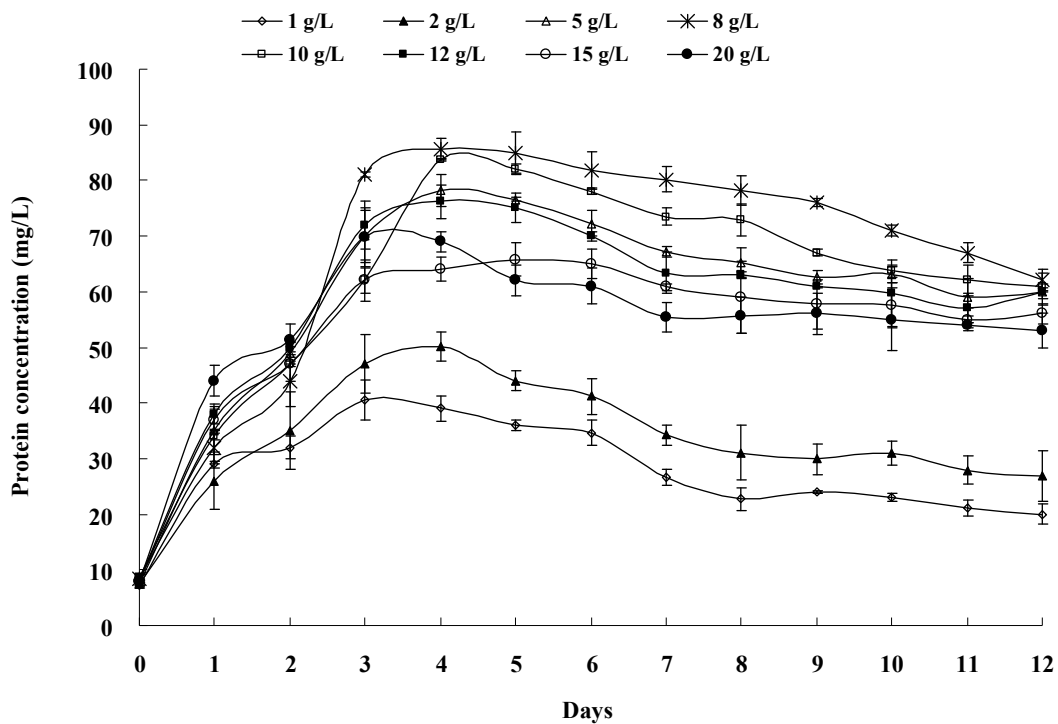


Fig. 4.16 Biomass growth measured as total protein concentration of the mix culture with different α -cellulose concentrations. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium at 70°C with different concentrations of α -cellulose.

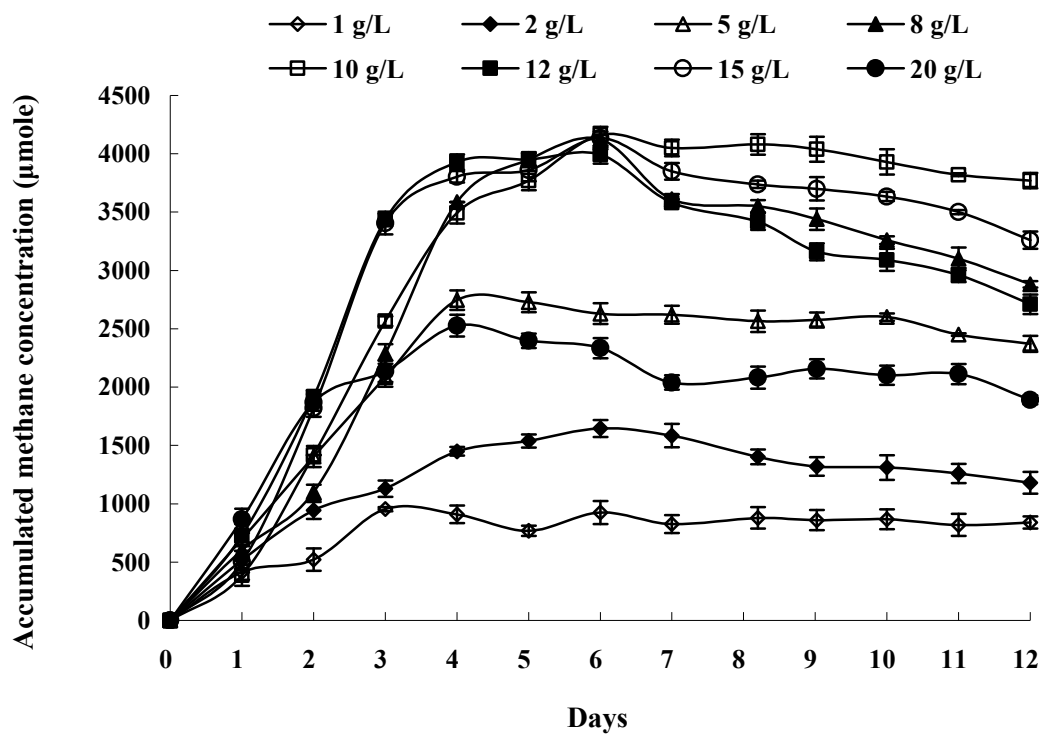


Fig. 4.17 Methane production by the mixed culture with different α -cellulose concentrations.

甲烷生產率如 Fig. 4.18，發現最高的甲烷生成速率則是在添加 8 與 10 g/L 纖維素濃度培養時，分別為 0.84 ± 0.01 與 $0.85 \pm 0.02 \mu\text{mole day}^{-1}$ ，並沒有很大的差異，因此在針對比甲烷生成率探討 (Fig. 4.19)，發現在 8、10、12 g/L 纖維素濃度培養所生成之比甲烷生成率相當，分別為 0.87 ± 0.01 、 0.89 ± 0.01 、 $0.86 \pm 0.02 \mu\text{mole CH}_4 \text{ day}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$ 生成，表示添加 8~12 g/L 纖維素濃度培養仍可保有一定的甲烷生成率。但其中以 8 g/L 纖維素濃度進行培養時，可達到最高的纖維素分解效率，因此本研究以 8 g/L 之纖維素為添加濃度進行後續實驗，除了可促進纖維素降解率之外，更能夠維持一定的甲烷活性。

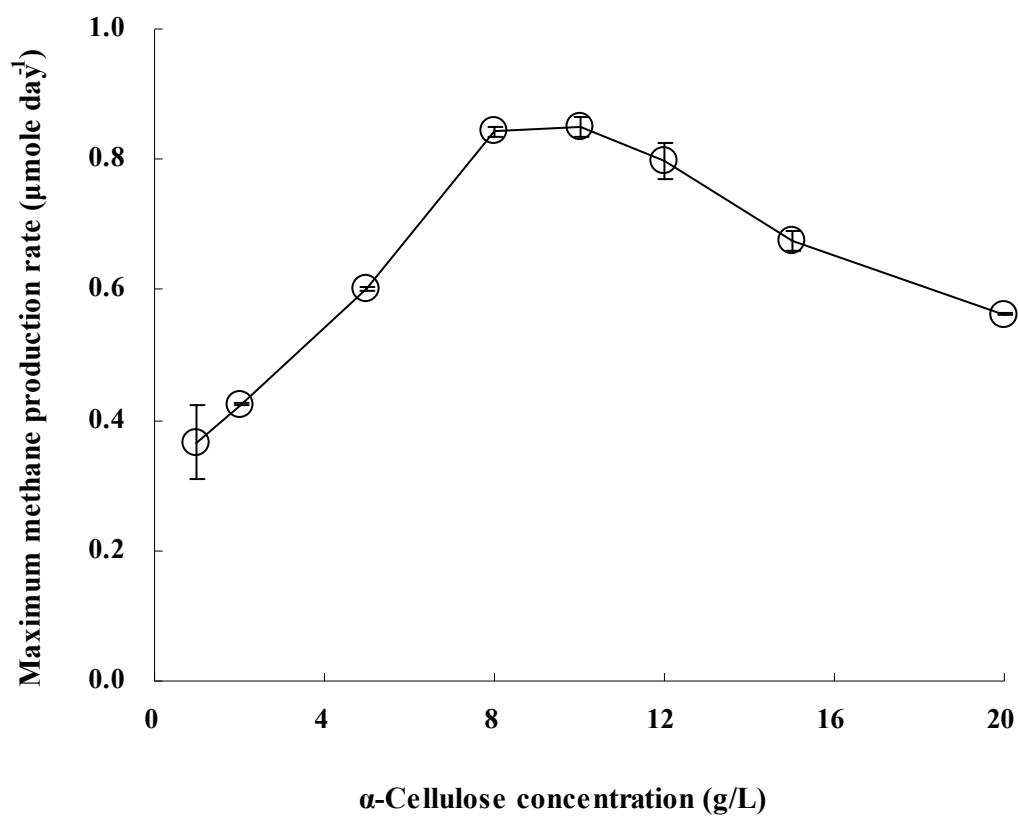


Fig. 4.18 Maximum methane production rate ($\mu\text{mole day}^{-1}$) from cellulose bioconversion by the mixed culture at 70°C with different α -cellulose concentrations.

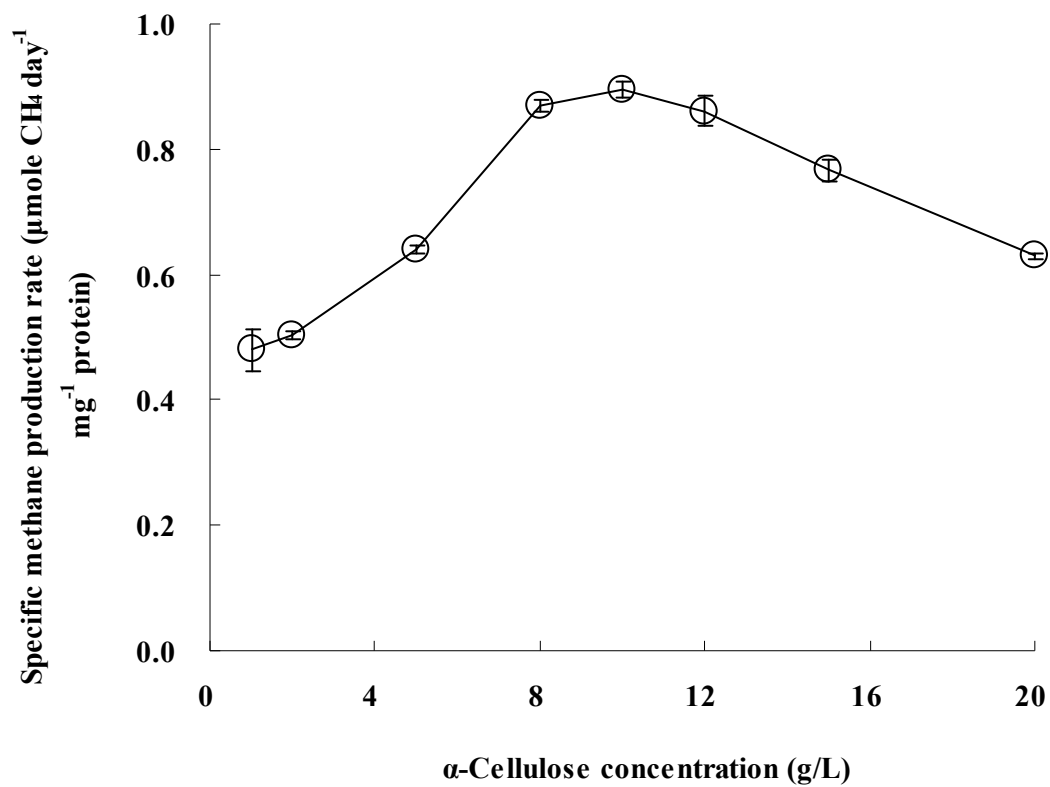


Fig. 4.19 Specific methane production rate ($\mu\text{mole CH}_4 \text{ day}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) from cellulose bioconversion by the mixed culture at 70°C with different α -cellulose concentrations.

利用蛋白質生成速率，以 Monod 模式 (4-1、4-2 式) 探討纖維素濃度與混合菌群生長速率關係。

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

S : Substrate concentration (g/L)

μ : Specific growth rate (day^{-1})

μ_{\max} : Maximum specific growth rate (day^{-1})

K_s : Half saturation constant, the substrate concentration that achieve half of the maximum specific growth rate (g/L)

將 4-1 式取倒數可得 4-2 式，以 $1/S$ 對 $1/\mu$ 作圖，可求得 μ_{\max} 為 0.60 day^{-1} ， K_s 為 3.78 g/L (Fig. 4.20)。

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{\max}} \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{\max}} \quad 4-2 \text{ 式}$$

將求得之 μ_{\max} (0.60 day^{-1}) 與 K_s (3.78 g/L) 帶入 4-1 式得 4-3 式，再以 1、2、5、8、10、12、15、20 g/L 之 α -纖維素作為 S 分別帶入求出模擬的 μ 值，以不同的 α -纖維素作為 x 軸，y 軸為求出之模擬 μ 值進行作圖，可得 Fig. 4.21，發現其半飽合常數與 Fig. 4.20 之 K_s 值相當，添加 12、15 或 20 g/L α -纖維素之 μ 值已趨於平穩，無明顯的上升，且模擬之 μ 值與實驗值之曲線趨勢相符合。

$$\mu = 0.6 \frac{S}{3.78 + S} \quad 4-3 \text{ 式}$$

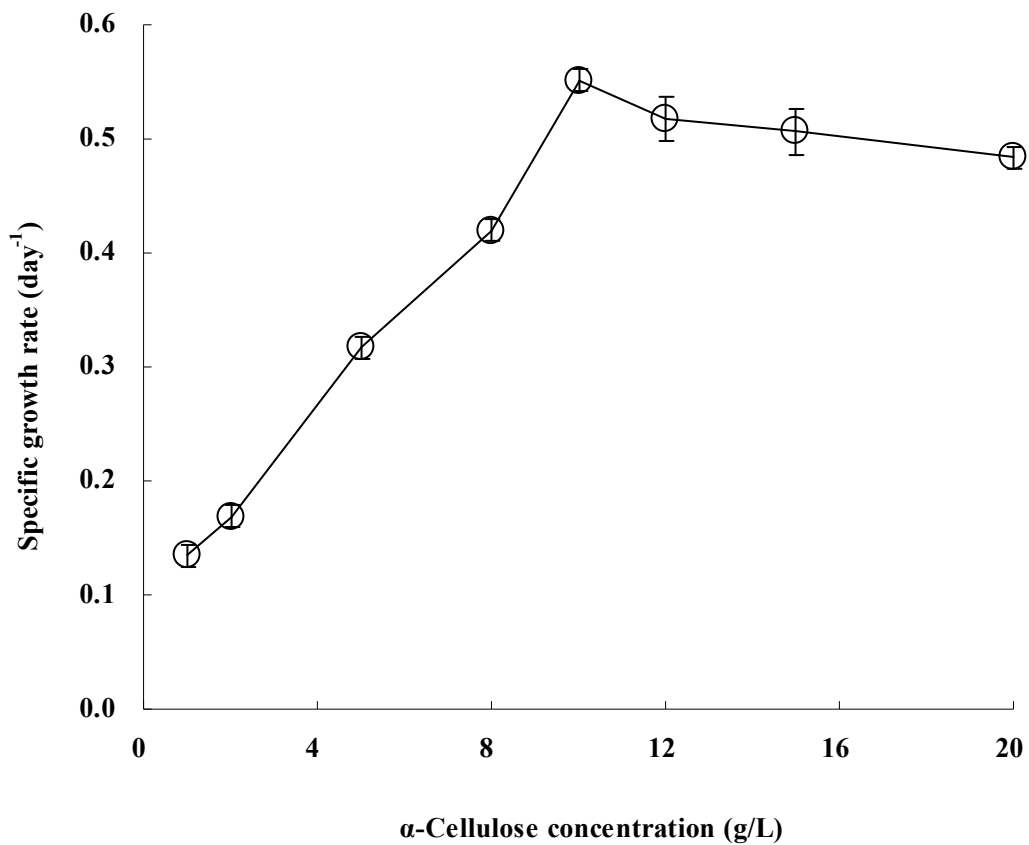


Fig. 4.20 Monod growth kinetics of the mix cultured with different cellulose concentration. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with different concentrations of α -cellulose.

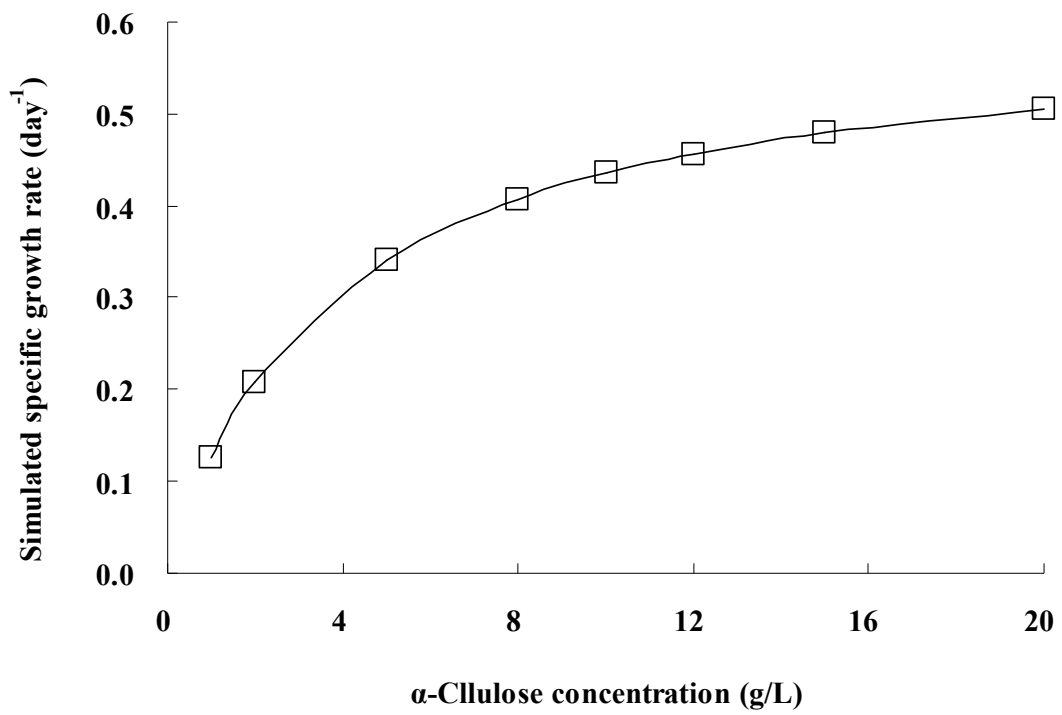


Fig. 4.21 Simulated specific growth rate of the mix cultured with different cellulose concentration from Monod growth kinetics.

4.3.4 不同濃度之 yeast extract 添加

yeast extract 可促進微生物之生長並輔助微生物進行代謝反應，藉此探討適量的 yeast extract 是否可以刺激纖維分解菌群之纖維素降解反應，而 vitamins 亦可促進甲烷生成菌群的生長，故而進行 yeast extract 添加量的測試，以 100 ml 的培養體積，添加不同濃度的 yeast extract 培養 9 天，探討此嗜熱混合菌群在不同濃度 yeast extract 培養下，對於纖維素的分解速度與甲烷生成效率的影響，討論 yeast extract 最佳添加量。

添加 1 g/L yeast extract 培養時，需要 8 天的培養時間可完全分解纖維，添加 0 與 2~10 g/L yeast extract 時，則需要 9 天可將纖維分解(Fig. 4.22)，其纖維素降解速度低於添加 1 g/L yeast extract 培養時。

而生物量之生成情況與纖維素降解速度相同，如 Fig. 4.23，培養第 1 天時，添加 1 g/L yeast extract 有最高濃度蛋白質為 77.42 ± 3.66 mg/L，其次為 2 與 4 g/L yeast extract 添加時，分別有 68.73 ± 1.36 、 73.14 ± 2.15 mg/L，而最低生物量為添加 0、6、8 與 10 g/L yeast extract 培養時，其生成之蛋白質濃度分別為 49.21 ± 2.33 、 45.70 ± 1.24 、 34.11 ± 3.20 與 29.14 ± 1.10 mg/L 培養至第 2 天時，添加 1 g/L yeast extract 之菌群，有最高 889 ± 58 μ mole 之甲烷生成量 (Fig.

4.24), 0 g/L yeast extract 添加培養至第 8 天時, 甲烷生成量可達到 $786 \pm 25 \mu\text{mole}$, 高於 2、4、6 g/L yeast extract 添加時所生成的最高甲烷生成量, 其分別為 697 ± 24 、 674 ± 46 、 $617 \pm 56 \mu\text{mole}$, 最低之甲烷生成量係為培養在 8 與 10 g/L yeast extract 時, 分別為 295 ± 27 與 $243 \pm 18 \mu\text{mole}$ 。

比生長速率與最大甲烷產生速率如 Fig. 4.25, 添加 1 g/L yeast extract 培養時, 皆有最高之比生長率與最大甲烷生成率, 分別為 $0.79 \pm 0.01 \text{ day}^{-1}$ 與 $0.96 \pm 0.06 \mu\text{mole day}^{-1}$ 。

比甲烷生成率如 Fig. 4.26, 在 1 g/L yeast extract 培養時有最高 $1.22 \pm 0.03 \mu\text{mole CH}_4 \text{ day}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$ 生成, 其次為 0 g/L yeast extract 培養時比甲烷生成率為 $0.98 \pm 0.08 \mu\text{mole CH}_4 \text{ day}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$ 生成, 比甲烷生成率略低於 1 g/L, 與前面的敘述有相同的結果, 添加 10 g/L yeast extract 培養時, 比甲烷生成率最低, 僅只為 $0.70 \pm 0.05 \mu\text{mole CH}_4 \text{ day}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$ 生成, 由此可知 yeast extract 無添加時與添加過量都會造成影響, 過多的氮源累積造成抑制, 使生物量與最大甲烷之生成速率降低, 而過少時則會限制生長, 本實驗以 1 g/L yeast extract 添加培養有最佳的纖維素降解速度、生長情形與甲烷生成率, 因此以為 1 g/L yeast extract 最佳生長時之添加量。

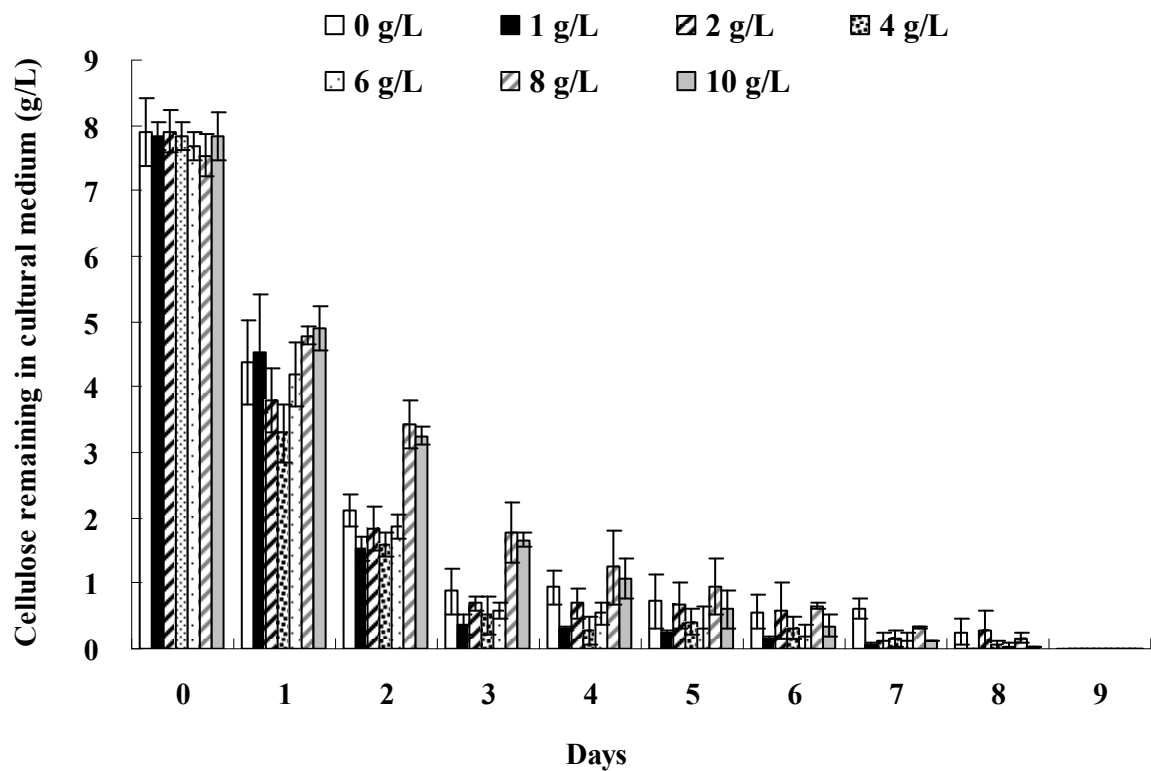


Fig. 4.22 Cellulose degradation by the mix culture grown with different concentrations of yeast extract. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 8 g/L α -cellulose at 70°C .

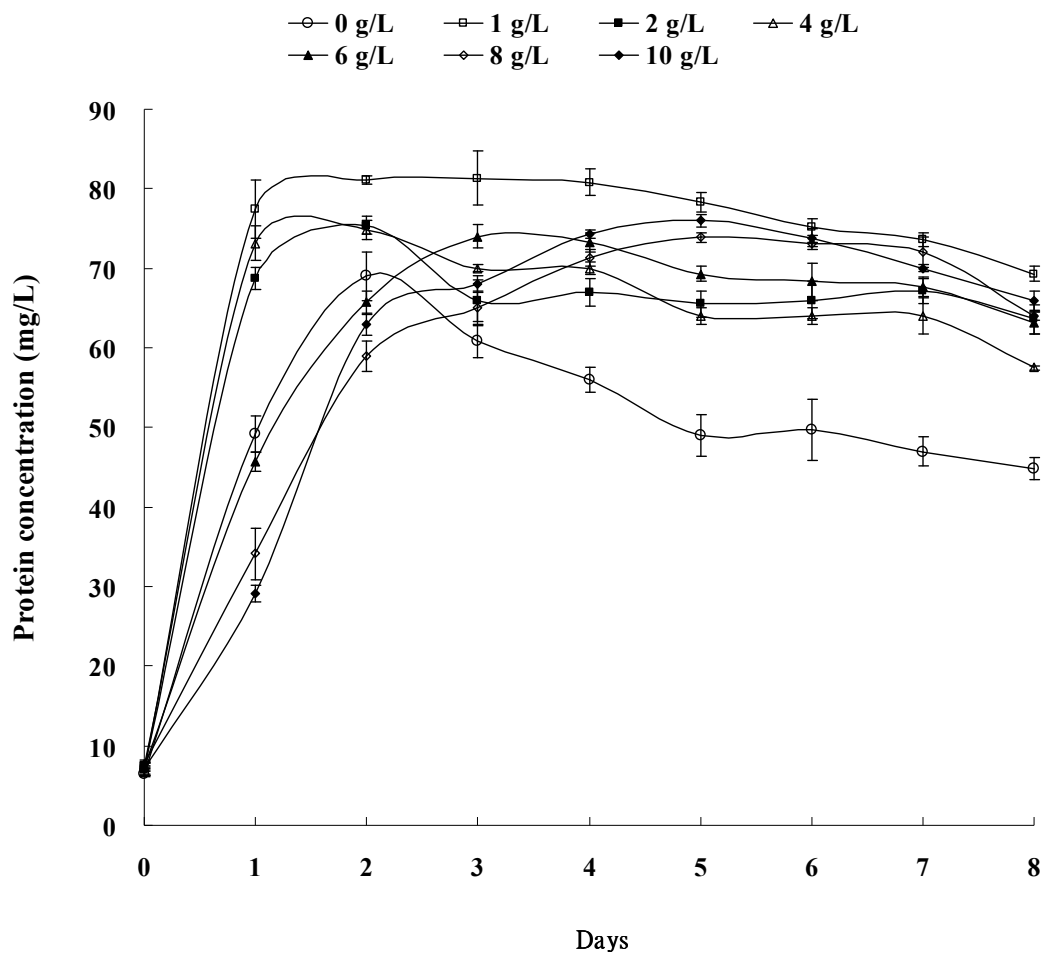


Fig. 4.23 Protein concentration of mix culture with different concentrations of yeast extract. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 8 g/L α -cellulose 70°C .

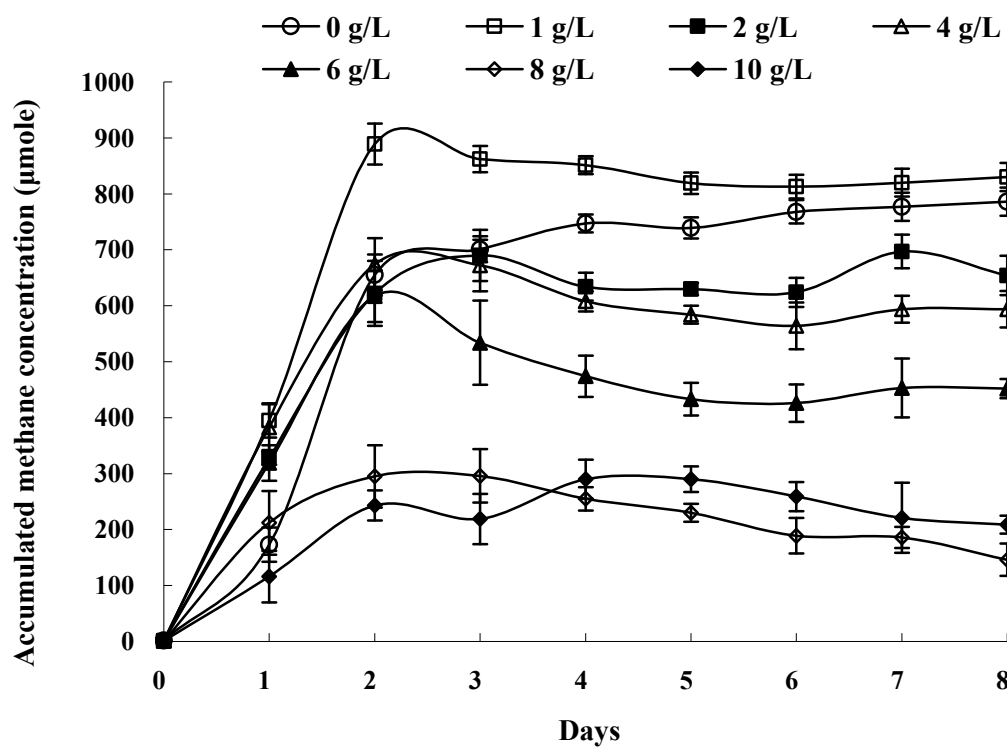


Fig. 4.24 Methane production from bioconversion of cellulose by mix thermophilic anaerobes. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 8 g/L α -cellulose.

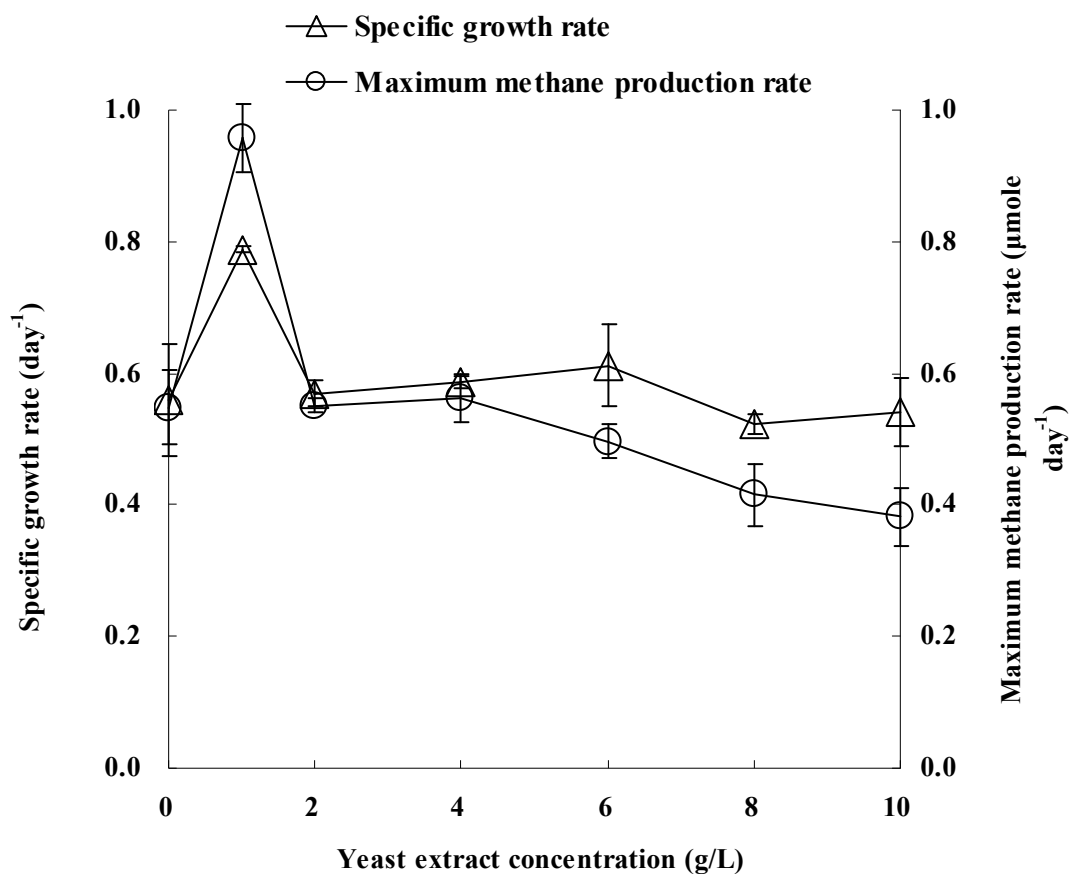


Fig. 4.25 Specific growth rate (day⁻¹) and methane production rate (μmole day⁻¹) from cellulose bioconversion with different concentrations of yeast extract. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 8 g/L α-cellulose.

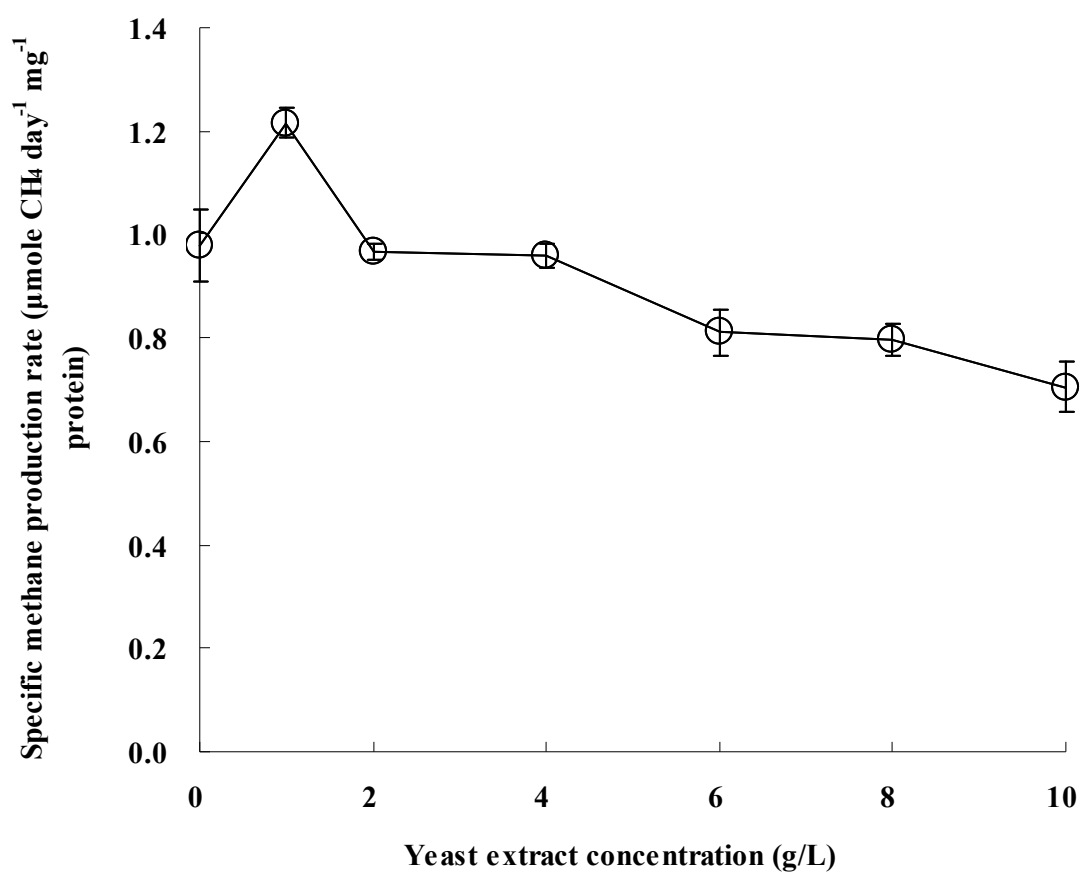


Fig. 4.26 Specific methane production rate ($\mu\text{mole CH}_4 \text{ day}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ protein) from cellulose bioconversion with different concentrations of yeast extract. Cultivation in 100 ml of liquid medium with 8 g/L α -cellulose.

4.3.5 不同濃度之 peptone 添加

Peptone 為水解蛋白質，又稱為蛋白朊，是一種容易利用的多樣性胺基酸，這胺基酸是微生物在代謝過程中，細胞內蛋白質生成的主要輔助物質，添加適量的 peptone 可加速細胞生長，增加微生物對基質的利用，故本實驗以 100 ml 的培養體積，測試不同濃度的 peptone 對於纖維降解菌群與甲烷生成之影響。

添加 1 g/L peptone 時，需要 7 天的培養時間可完全分解纖維，添加 0 與 2~8 g/L peptone 時，則需要 8 天可將纖維分解，降解速度明顯的降低 (Fig. 4.27)。與前一節 yeast extract 效果比較，在添加 yeast extract 最佳濃度 1 g/L 時 (Fig. 4.22)，需 9 天可將纖維素完全分解，表示添加 peptone 之後，可提高纖維素分解速率。

混合菌群生質量 (以蛋白質表示) 生成如 Fig. 4.28 所示，在培養第 1 天時，無 peptone 添加 (0 g/L peptone) 之培養有最高之蛋白質生成 (52.44 ± 1.30 mg/L)，培養至第 2 天時，無 peptone 培養之蛋白質量僅為 66.31 ± 0.92 mg/L，微生物生長而進入穩定狀態。但是以 1、2、4、6 或 8 g/L peptone 添加培養第 2 天時，蛋白質量分別有 63.72 ± 1.30 、 78.53 ± 1.40 、 77.90 ± 0.54 、 74.71 ± 1.50 與 69.64 ± 0.46 mg/L，有添加 peptone 時所測得之蛋白質濃度比無添加 peptone 培養時高。培養至第 4 天時，添加 4 g/L peptone 培養時有最高蛋白

質生成濃度 (85.03 ± 1.20 mg/L)，而 0 g/L peptone 培養時蛋白質生成最低，為 69.92 ± 1.40 mg/L，表示有添加 peptone 培養時可促進菌群生長。

但無添加 peptone 培養時之甲烷生成量最高，為 1179 ± 26 μ mole (Fig. 4.29)，表示添加 peptone 培養時，可促進纖維素分解菌群的生長，故生物量較高，而添加 1、2、4、6 與 8 g/L peptone 培養時，其最高甲烷生成量分別為 1033 ± 90 、 953 ± 72 、 809 ± 66 、 685 ± 30 與 16 ± 2 μ mole，表示添加 peptone 培養時，比較不利於甲烷菌生成甲烷，且會隨著 peptone 濃度的增加而減少甲烷生成量，因此，無添加 peptone 培養可生成最高的甲烷量。

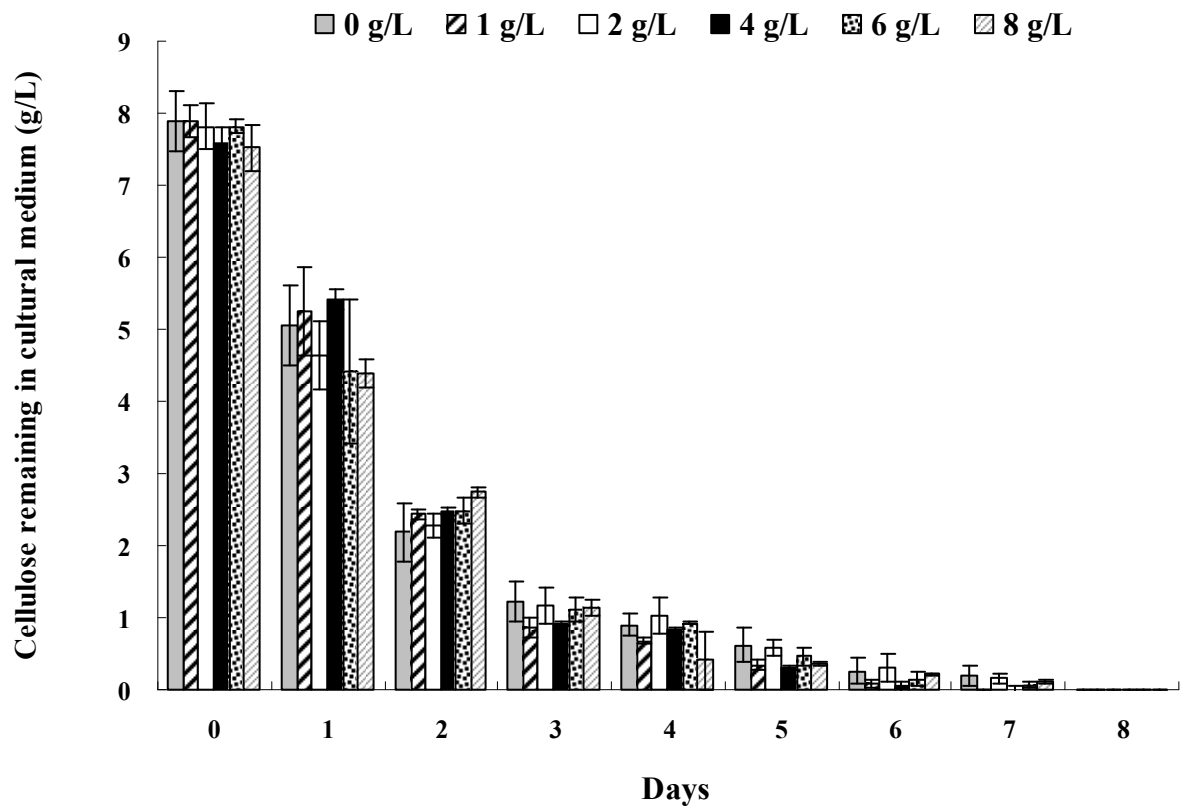


Fig. 4.27 Cellulose degradation of mix cultures with different concentrations of peptone. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 8 g/L α -cellulose.

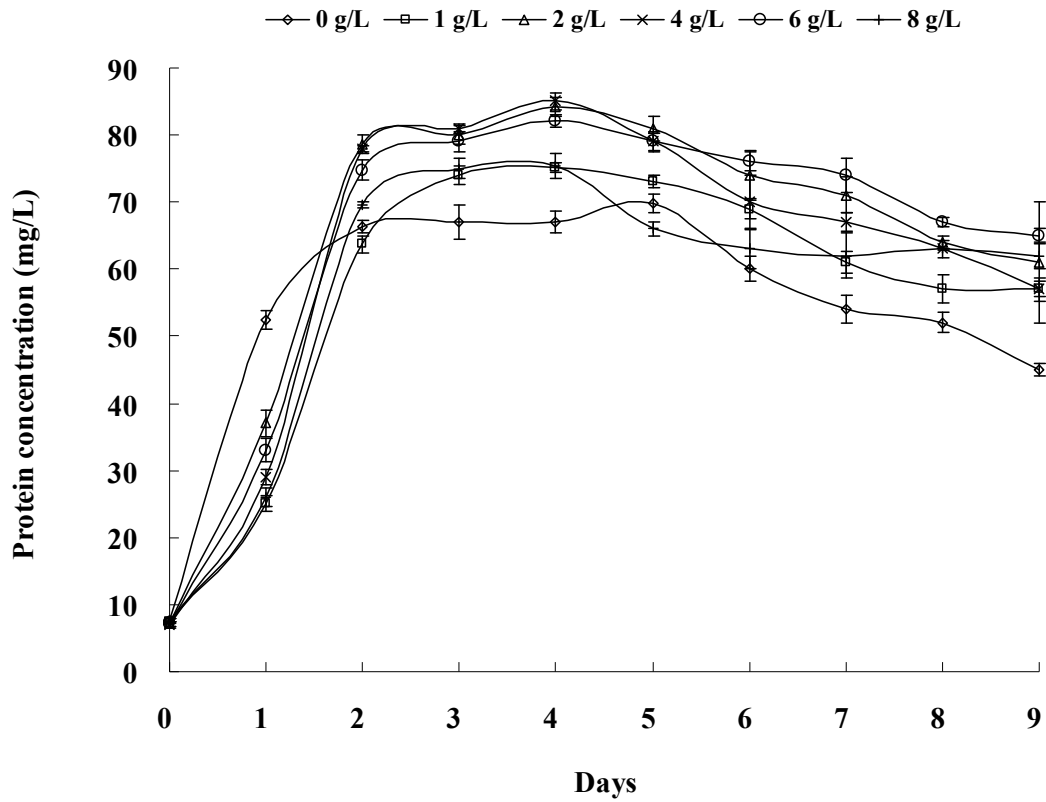


Fig. 4.28 Protein concentration of mix culture with different concentrations of peptone. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 8 g/L α -cellulose.

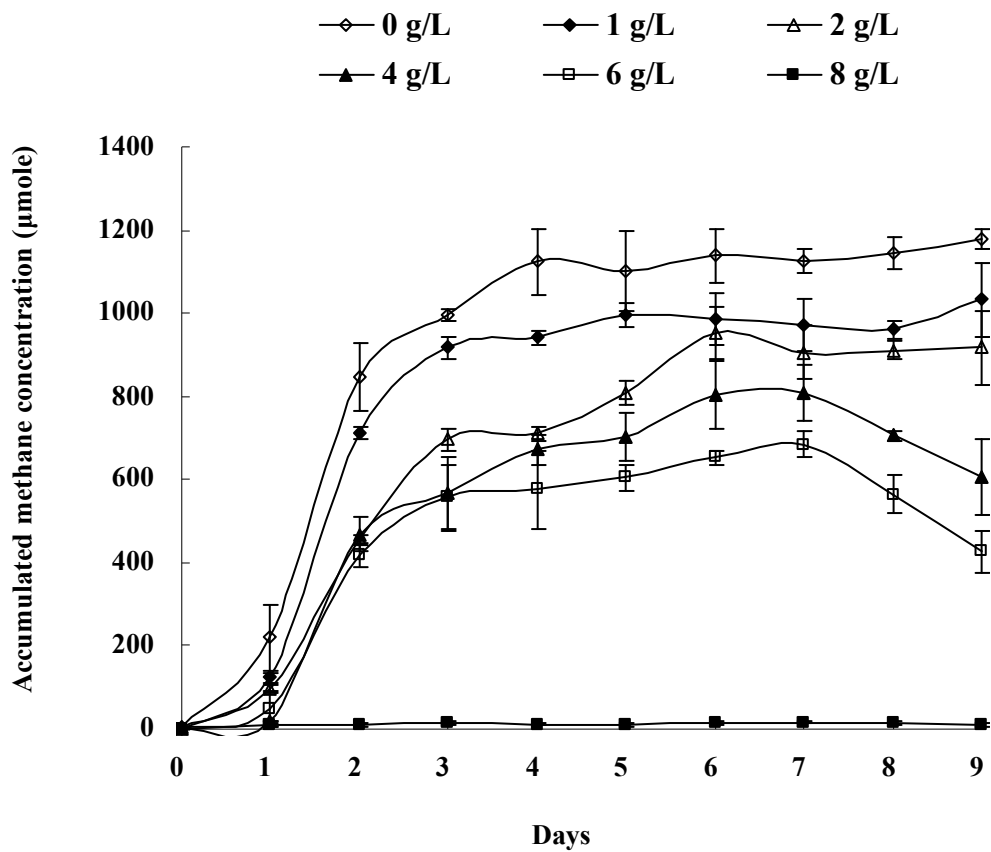


Fig. 4.29 Methane production from bioconversion of cellulose with different concentrations of peptone. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 8 g/L α -cellulose.

比生長速率與最大甲烷生成率如 Fig. 4.30，不添加 peptone 培養時之比生長速率最低，為 $0.85 \pm 0.06 \text{ day}^{-1}$ ，添加 1~8 g/L peptone 培養時之比生長率差別不大。但最大甲烷生成率在不添加 peptone 培養時最高，為 $0.71 \pm 0.04 \mu\text{mole day}^{-1}$ ，隨 peptone 添加越多而甲烷生成率越低。

比甲烷生成率如 Fig. 4.31，在 0 g/L peptone 培養時有最高 $0.83 \pm 0.05 \mu\text{mole CH}_4 \text{ day}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$ 生成，其次為 1 g/L peptone 培養時比甲烷生成率為 $0.67 \pm 0.01 \mu\text{mole CH}_4 \text{ day}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$ 生成，培養在 8 g/L peptone 時，比甲烷生成率最低，為 $0.281 \pm 0.01 \mu\text{mole CH}_4 \text{ day}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$ 。

因此，不添加 peptone 培養有最高的比甲烷生成率，但添加 peptone 培養可增進此嗜熱混合菌群生長，尤其在添加 1 g/L peptone 時有最高的纖維素降解速率，而本研究考量纖維素降解速率，故採用後續 1 g/L peptone 進行實驗培養。

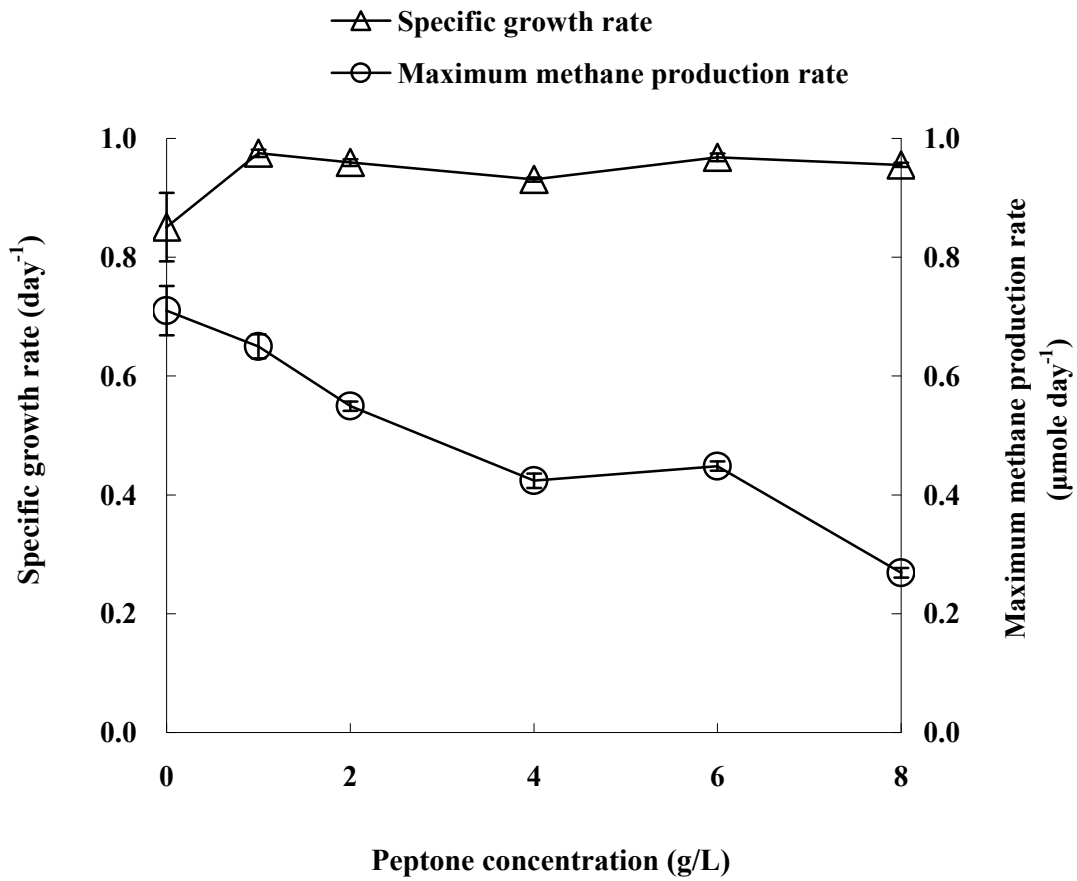


Fig. 4.30 Specific growth rate (day⁻¹) and maximum methane production rate (μmole day⁻¹) from cellulose bioconversion by thermophilic anaerobes growth with different concentrations of peptone. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 8 g/L α-cellulose at 70°C.

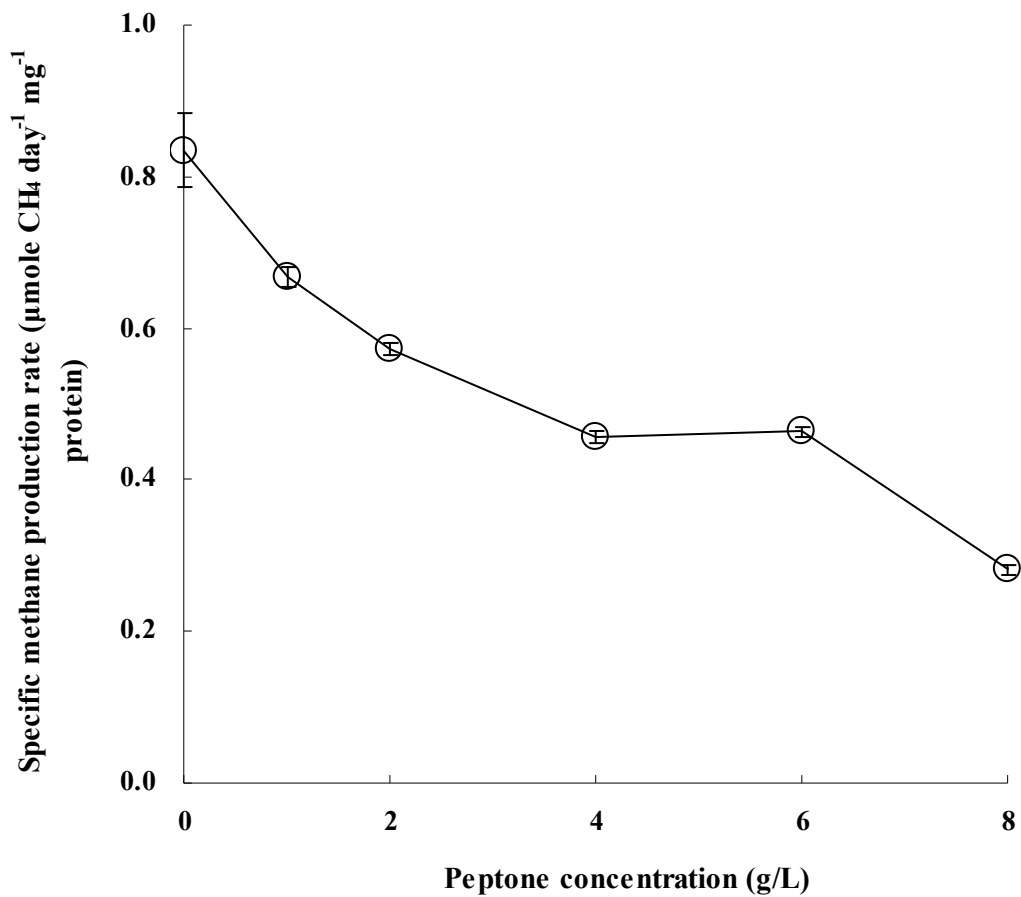


Fig. 4.31 Specific methane production rate ($\mu\text{mole CH}_4 \text{ day}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) from cellulose bioconversion by thermophilic anaerobes growth with different concentrations of peptone.

4.4 不同紙類之降解情形

在一般都市及農業廢棄物質中，各種紙類 (都市廢棄物)及稻稈 (農業廢棄物)均含有大量的纖維質，目前的處理方式包括焚燒、回收或生物處理，但焚燒處理會產生溫室氣體及嚴重空氣污染，對於環境相當不友善，而回收製成再生紙或是利用生物分解的方法都可以達到再生的效果，且利用生物分解這些纖維質除了可以減少這類廢棄固體物質外，可進一步轉化為民生或工業上之再生能源。以不同纖維素來源 (纖維素、濾紙、影印紙、瓦楞紙、報紙及稻稈)探討此厭氧嗜熱混合菌群對於不同來源的纖維降解性以及甲烷生成速率的影響，進一步評估此菌群在實場上處理廢棄物的運用性。

在 100 ml 的培養體積中，各別添加 0.8 g 不同纖維素來源在最佳條件下培養 14 天。結果如 Fig. 4.32 與 Fig. 4.33 所示，以 α -纖維素培養時，在第 8 天可將纖維素完全分解，以濾紙培養時需 12 天， α -纖維素與濾紙培養至第 14 天時液體呈現半透明混濁且無粉末狀之纖維素殘渣存在。而影印紙約有 $71 \pm 0.26\%$ 之纖維素含量，培養 5 天可完全分解影印紙，而無法分解的碳粉則沉積在瓶底。

瓦楞紙與報紙其纖維素含量分別為 $59.7\pm 0.1\%$ 與 $64\pm 0.93\%$ ，培養至第 14 天時在培養基中仍可測得殘餘纖維素，分別為 0.55 ± 0.03 與 1.10 ± 0.20 g/L 之纖維素濃度，在瓶底會殘留一些瓦楞紙被分解後的褐色碎渣，而報紙的纖維降解情形較差，尚有少許紙片未被分解，並殘留粉末狀之報紙纖維，可能是印刷油墨或製程中添加的物質與纖維結合緊密造成纖維分解菌群不容易分解，因此在 14 天後仍有纖維素殘渣存於培養基中。

在此實驗組之稻稈，取部份稻稈檢測纖維素含量，可測得約為 $7\pm 0.05\%$ ，推測其中可被利用之纖維素較少，以稻稈培養時，取出之樣品中並沒有檢測到纖維素，培養至第 14 天的稻稈沒有很明顯的瓦解情形，只出現一些細長的絲狀纖維殘渣，且空白組的稻稈沒有此現象。

以此混合菌群對不同來源纖維素之降解能力，發現混合菌群對於稻稈與報紙的分解情況不佳，但在 α -纖維素、濾紙、影印紙與瓦楞紙培養時之纖維素降解幾乎可完全被分解，表示此混合菌群的確可應用在廢棄紙類上的處理。

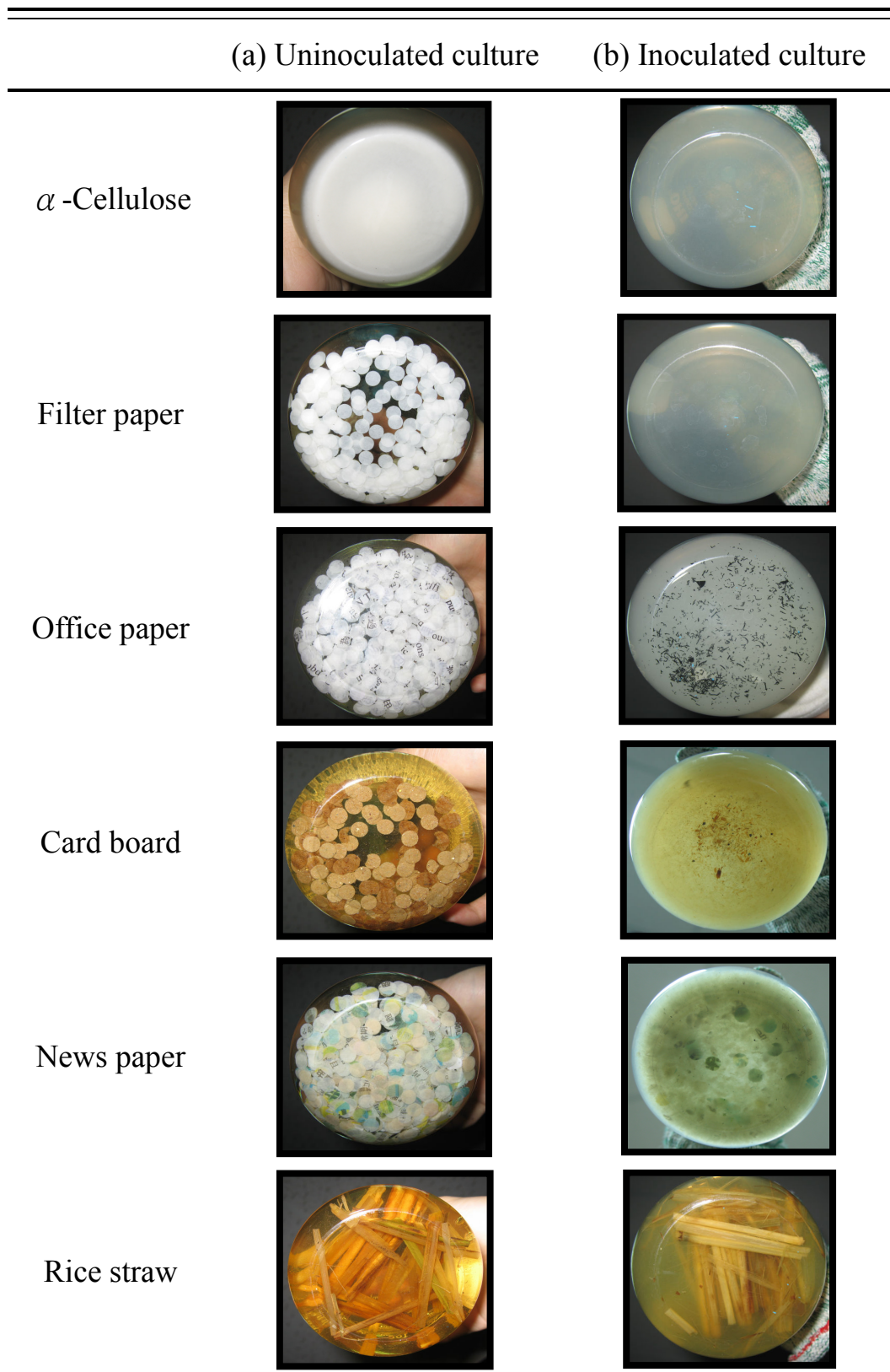


Fig. 4.32 Photopictures of biodegradation of cellulose from different sources by the mixed culture. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 0.8 g of different source of cellulose at 70°C . (a) Un-inoculated culture as blank ; (b) Inoculated cultures for 14 days.

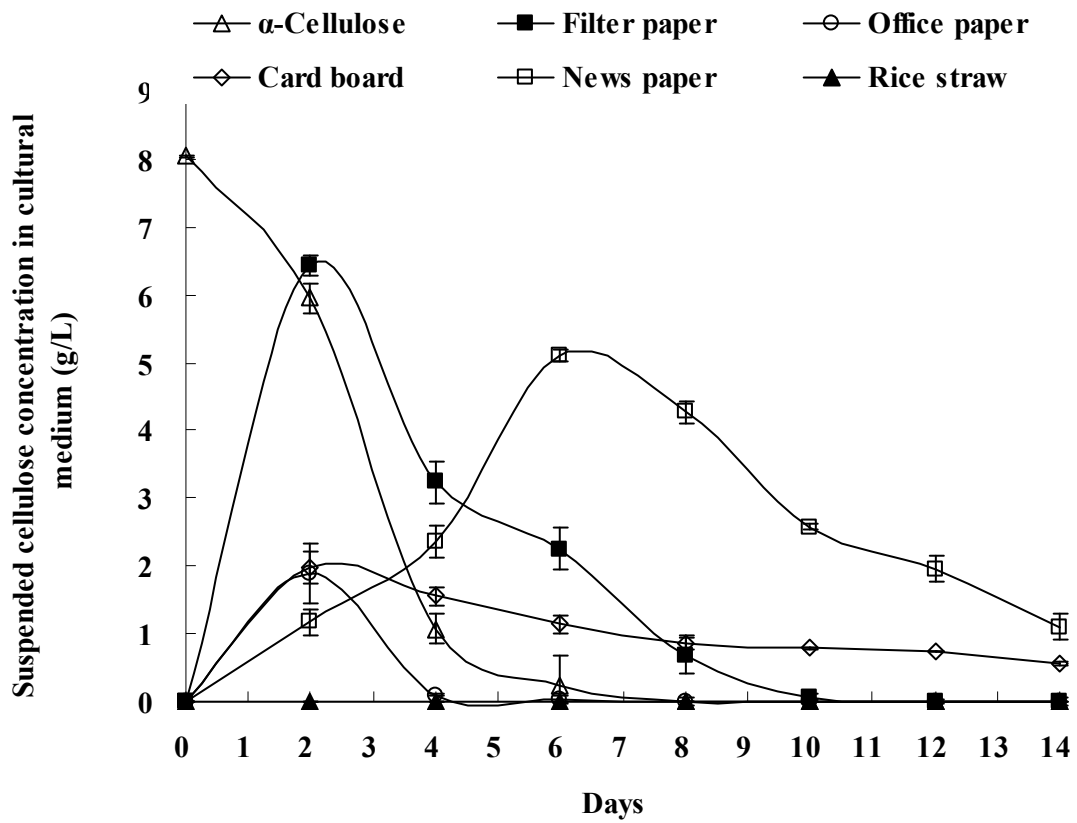


Fig. 4.33 Cellulose concentration in cultural medium during biodegradation of cellulose from different sources under anaerobic condition by the mixed culture at 70°C. Cultivation of mix thermophilic anaerobic were grown in 100 ml of liquid medium with 8 g/L of different cellulose sources.

由於厭氧降解碳水化合物會產生有機酸，導致培養基 pH 值下降，因此量測各培養基培養至第 14 天之最終 pH 值 (Fig. 4.34)，以 α -纖維素、濾紙與影印紙培養時，最終 pH 值分別為 4.9 ± 0.02 、 4.9 ± 0.15 與 5.0 ± 0.04 ，表示培養基因纖維素被微生物完全分解而酸化，最終 pH 值都接近 5.0 左右，且此 3 種紙類之纖維素純度較高，因此產生很明顯的酸化情形。

然而瓦楞紙、報紙與稻稈經過培養後之最終 pH 值分別為 5.8 ± 0.01 、 6.3 ± 0.02 與 6.7 ± 0.06 ，表示此 3 種紙類來源培養後的酸化情形皆低於 α -纖維素、濾紙與影印紙培養時，歸因於此 3 種紙類來源之纖維素純度較低，被消耗之纖維素所轉換生成之揮發酸濃度有限。且其中以報紙之纖維降解程度偏低許多，也會使反應後酸化程度降低。另外在稻稈為來源培養時發現無明顯纖維降解現象，初始之 pH 值與最終 pH 值分別為 7.1 ± 0.02 與 6.7 ± 0.06 ，酸化情形較低。

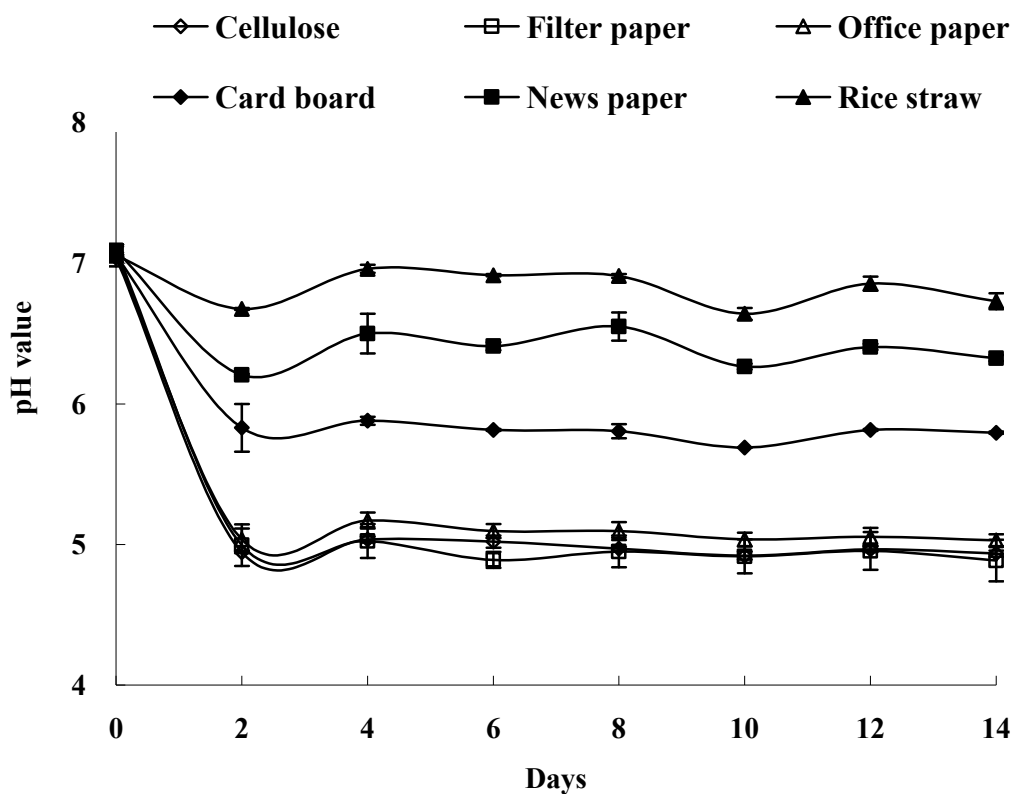


Fig. 4.34 Change of pH in medium during biodegradation of cellulose from different sources by the mixed culture at 70°C. Cultivation of mix thermophilic anaerobic were grown in 100 ml of liquid medium with 8 g/L of different cellulose sources.

另外針對不同纖維素來源培養時之生長情形如 Fig. 4.35，添加瓦楞紙培養時之蛋白質濃度最高，為 94.10 ± 3.1 mg/L，依序為影印紙、濾紙、 α -纖維素、報紙與稻桿，其各別最高之蛋白質濃度分別為 75.92 ± 1.9 、 72.53 ± 0.9 、 67.42 ± 3.7 、 60.64 ± 2.8 與 35.71 ± 1.8 mg/L，其中以稻桿培養時，生成之生物量最低，可能是因為稻桿之纖維素含量低，且稻桿中之纖維被外層的木質素包覆住不容易被菌群所利用，纖維分解菌群可利用碳源減少，導致對於稻桿的利用性低。

但在甲烷生成量 (Fig. 4.36)，卻與生物量生成及纖維降解情形有很大差異，添加瓦楞紙培養時有最高生成量 2127 ± 47 μ mole 生成，其次依序為報紙、稻桿、 α -纖維素、濾紙與影印紙，其最高甲烷生成量分別為 1989 ± 18 、 1421 ± 19 、 1195 ± 47 、 983 ± 83 與 720 ± 49 μ mole，培養在影印紙時生成之甲烷量最低，在此實驗中發現添加瓦楞紙與報紙培養時有最高甲烷生成量，且瓦楞紙、報紙及稻桿之可被利用之纖維素含量較低，因而酸化累積量低於利用高純度纖維培養時之累積酸，使最終 pH 值仍在 5.0 以上，因而有較高之甲烷生成量。

而 α -纖維素、濾紙與影印紙之纖維素含量接近 100%，其纖維利用效率較高，可能因纖維素被分解生成揮發性有機酸累積，使 pH 下降至 5.0 左右，因 pH 過酸對甲烷菌群有抑制反應導致甲烷生成量較低，尤其是培養在影印紙時生成甲烷速率最低，因影印紙在第 4 天可被完全分解，有較快的分解速率，使酸化累積而 pH 值下降至 5.0，過酸的環境抑制甲烷生成，也因為影印紙含有影印碳粉，在製程中添加的漂白劑與其它未知物質，不利於甲烷生成菌群的生長，因此甲烷產率較低。

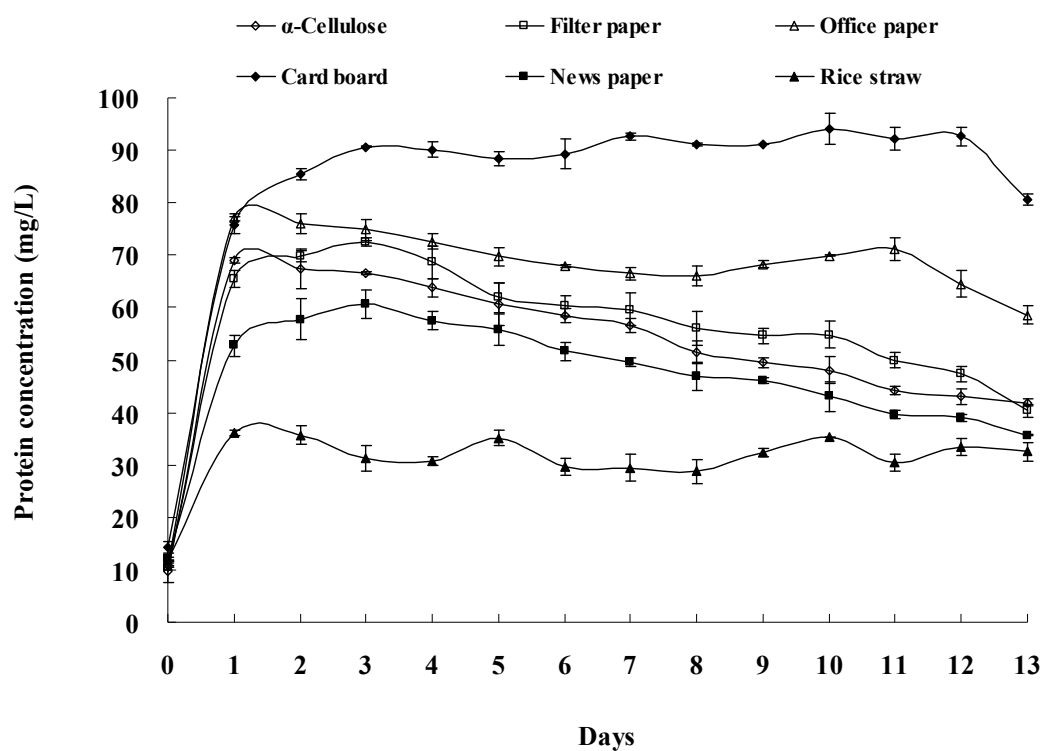


Fig. 4.35 Protein concentration of mix cultures under anaerobic condition. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 8 g/L of different source.

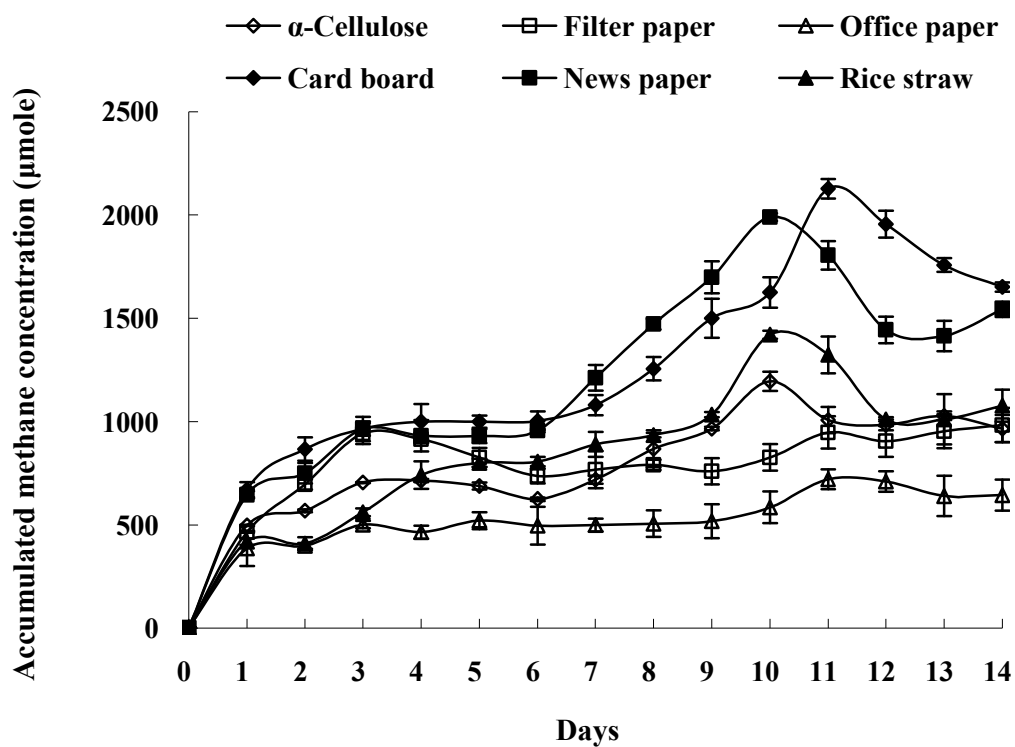


Fig. 4.36 Methane production from cellulose bioconversion with different sources by mixed culture. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 8 g/L of cellulose from different sources.

比生長速率與甲烷生成率 Fig. 4.37，皆以瓦楞紙培養時之比生長速率與最大甲烷生成率最高，分別為 $0.92 \pm 0.00 \text{ day}^{-1}$ 與 $0.90 \pm 0.00 \mu\text{mole day}^{-1}$ ，其中以稻稈培養時，比生長速率低，而最大甲烷生成速率與瓦楞紙相當，皆因於稻稈降解情形不佳，而不致於使揮發酸累積，因此 pH 值在 6.8 左右，此 pH 值為菌群降解纖維素產甲烷之最佳 pH 值，因此造成以稻稈為碳源時有相當的甲烷生成速率。以影印紙培養至第 4 天時，幾乎可將影印紙完全降解，期間 pH 值在第 2 天降至 4.9 左右，而過酸的環境導致甲烷生成菌群受抑制，因有最低之甲烷生成速率。

但是在比甲烷生成率，發現以報紙培養時有最高比甲烷生成率，為 $1.43 \pm 0.02 \mu\text{mole CH}_4 \text{ day}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$ 生成。其次依序為瓦楞紙、稻稈、濾紙、 α -纖維素與影印紙，其比甲烷生成率分別為 1.34 ± 0.03 、 1.30 ± 0.01 、 1.05 ± 0.01 、 1.03 ± 0.01 與 $0.84 \pm 0.02 \mu\text{mole CH}_4 \text{ day}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$ 生成 (Fig. 4.38)，瓦楞紙、報紙與稻稈培養之比甲烷生成率相當，表示此結果對於廢棄纖維質經厭氧嗜熱混合菌群轉換為再生能源具有應用性。

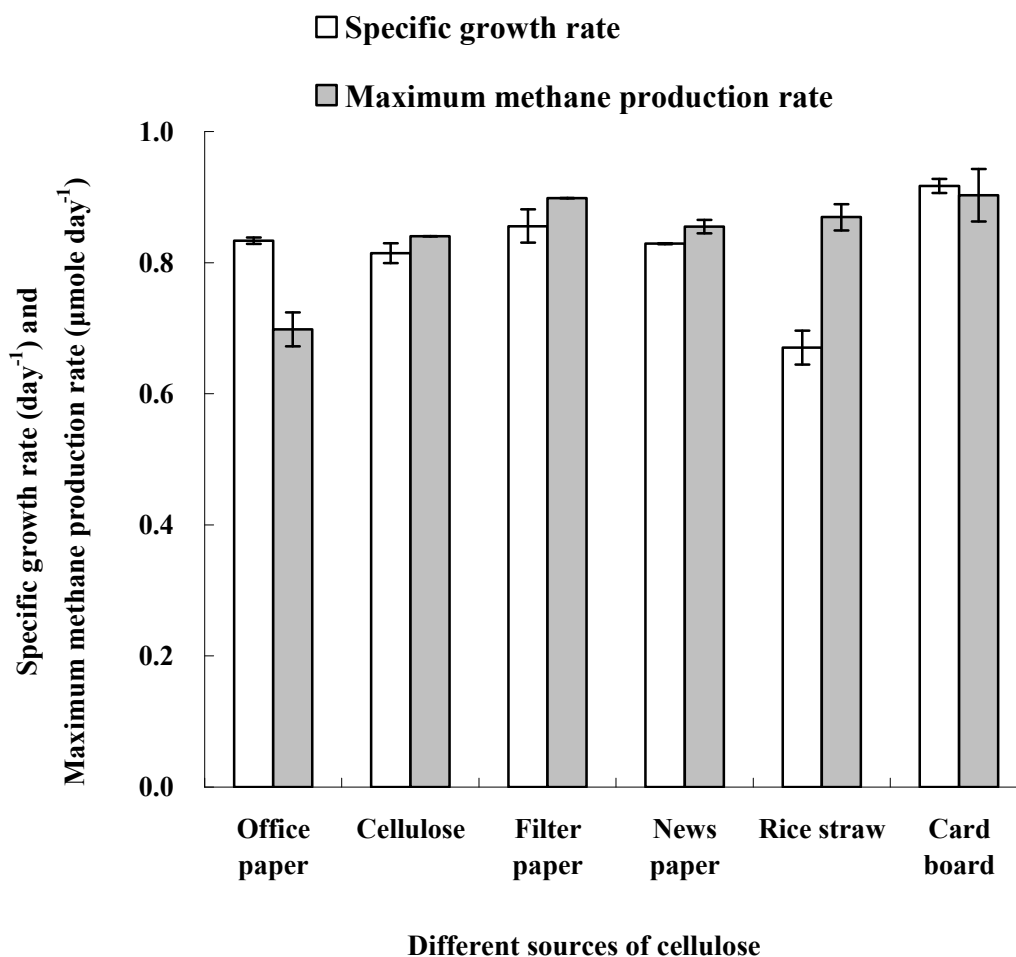


Fig. 4.37 Specific growth rate (day⁻¹) and maximum methane production rate (μmole day⁻¹) from cellulose bioconversion with different sources by the thermophilic anaerobes. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 8 g/L of cellulose from different sources.

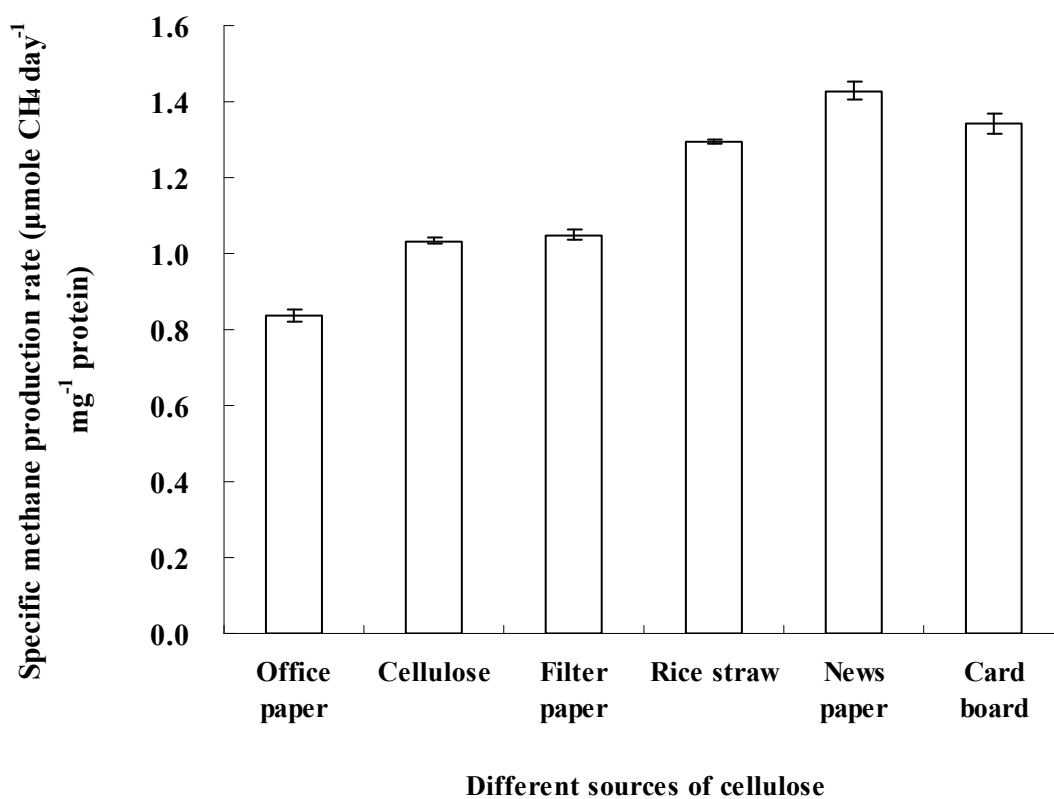


Fig. 4.38 Specific methane production rate ($\mu\text{mole CH}_4 \text{ day}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) from cellulose bioconversion with different sources by thermophilic anaerobes. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 8 g/L of cellulose from different sources.

4.5 不同濃度之 NaHCO_3 添加之探討

4.5.1 最佳 NaHCO_3 添加濃度

在前面的實驗中發現纖維被分解後會造成酸化累積，造成 pH 值下降 (pH 5.0)，過酸的環境對於甲烷菌群造成抑制，降低甲烷生成效率，因此以碳酸氫鈉補充鹼度，增加酸化之緩衝範圍，減低微生物在生長時被抑制。以 100 ml 的培養體積，添加不同濃度的 NaHCO_3 培養，測試菌群生長之最佳鹼度添加量，添加濃度範圍為 2、4、5、6 g/L，分別觀察微生物生長、纖維素降解及甲烷生成情形與最終 pH 值，並檢測 TCOD、SCOD 及醋酸濃度，培養後發現以 6 g/L NaHCO_3 之添加時有最高甲烷生成，生成的醋酸濃度隨 NaHCO_3 濃度增加而減少。

因此，再設計 8、10、12 g/L 的 NaHCO_3 濃度添加進行培養，分別觀察微生物生長及甲烷生成情形與最終之 pH 值。

添加範圍為 2、4、5、6 g/L NaHCO_3 培養時，在添加 5 與 6 g/L 培養時有最快的降解速度 (Fig. 4.39)，在第 5 天可完全分解纖維，其各別之最終 pH 值分別為 4.9 ± 0.01 與 5.3 ± 0.01 (Fig. 4.40)；而添加 4 g/L 培養時則需要 6 天可將纖維分解 (最終 pH 值為 4.7 ± 0.00)；最低之降解速度為添加 2 g/L NaHCO_3 培養時，需 8 天可將纖維素完全分解 (最終 pH 值為 4.7 ± 0.02)，降解速度明顯的降

低許多。將 Fig. 4.39 換算為纖維降解速率如 Table 4.2 所示，添加 5 與 6 g/L NaHCO₃ 培養時，有最高的纖維降解速率，約為 2.0 g L⁻¹day⁻¹，但最終之 pH 值皆為酸性。

如 Fig. 4.40 所示，培養至第 3 天時，添加 5 與 6 g/L NaHCO₃ 的培養基之 pH 值即分別下降至 5.0±0.01 與 5.6±0.06，而在第 4 天後趨於穩定；但添加 2 g/L NaHCO₃ 培養 2 天時，pH 值為 4.7±0.04，在第 2 天後 pH 變化值即穩定，表示添加 2 g/L 鹼度太低且緩衝範圍小，導致酸化情形較快且完全，也因此造成纖維分解菌群因酸化產生抑制的情形，降低分解速率。5 與 6 g/L NaHCO₃ 緩衝範圍較大，因此，添加量為 5 或 6 g/L NaHCO₃ 培養時，因酸化速度減緩，可提高纖維降解速率。

但此組實驗之最終 pH 變化值皆為酸性，因此另外設計其它更高濃度之碳酸氫鈉添加測試，添加 8、10、12 g/L 的 NaHCO₃ 培養之初始 pH 值分別為 7.6±0.01、7.8±0.04 與 7.9±0.01，培養後其各別培養基中之最終 pH 值分別為 6.2±0.01、7.1±0.06 與 7.7±0.01 (Fig. 4.40)。

且添加 8 g/L NaHCO₃ 的培養情況在第 5 天後 pH 值下降趨於穩定，但添加 10 g/L 與 12 g/L 的 NaHCO₃ 培養時，pH 值的變化在第 3 天後穩定，且培養至第 10 天時，觀察培養瓶，發現仍有部份

纖維素殘渣，表示纖維被分解不完全，酸化反應趨緩，因此 pH 值變化不大。但添加 8 g/L 的 NaHCO_3 進行培養，在第 4 天觀察發現無纖維素殘渣存在，且最終之 pH 值接近中性，此環境比其它 NaHCO_3 添加濃度更適於最終產物甲烷生成。

添加 2、4、5、6、8、10、12 g/L 的 NaHCO_3 進行培養時之生物量生成情形如 Fig. 4.41 所示。培養第 3 天時，添加 4、5 與 6 g/L 的 NaHCO_3 最高之蛋白質濃度分別為 89.96 ± 3.37 、 94.99 ± 1.15 與 94.29 ± 0.96 mg/L；而以 8 g/L 添加時，培養至第 5 天時才有最高 90.88 ± 0.23 mg/L 蛋白質生成，最低之蛋白質濃度生成則是在添加 2、10、12 g/L 的 NaHCO_3 進行培養時，其蛋白質濃度分別為 65.94 ± 3.06 、 50.62 ± 0.84 、 7.66 ± 0.84 mg/L。

在添加不同濃度 NaHCO_3 影響實驗中，纖維素分解轉化為生質量之產率如 Table 4.3，添加 4、5、6、8 g/L 的 NaHCO_3 進行培養時，生成蛋白質產率約在 $11 \text{ mg protein g}^{-1} \text{ cellulose}$ 左右，添加 2 與 10 g/L 的 NaHCO_3 進行培養之生成率偏低，最低生成率為添加 12 g/L NaHCO_3 之 $0.96 \pm 0.20 \text{ mg protein g}^{-1} \text{ cellulose}$ ，表示過低或過高的 NaHCO_3 濃度培養會對於微生物造成抑制作用，使生物量減少而導致纖維素降解率低，添加 4、5、6 與 8 g/L 的 NaHCO_3 進行培養，會有較高的生物量之生成。

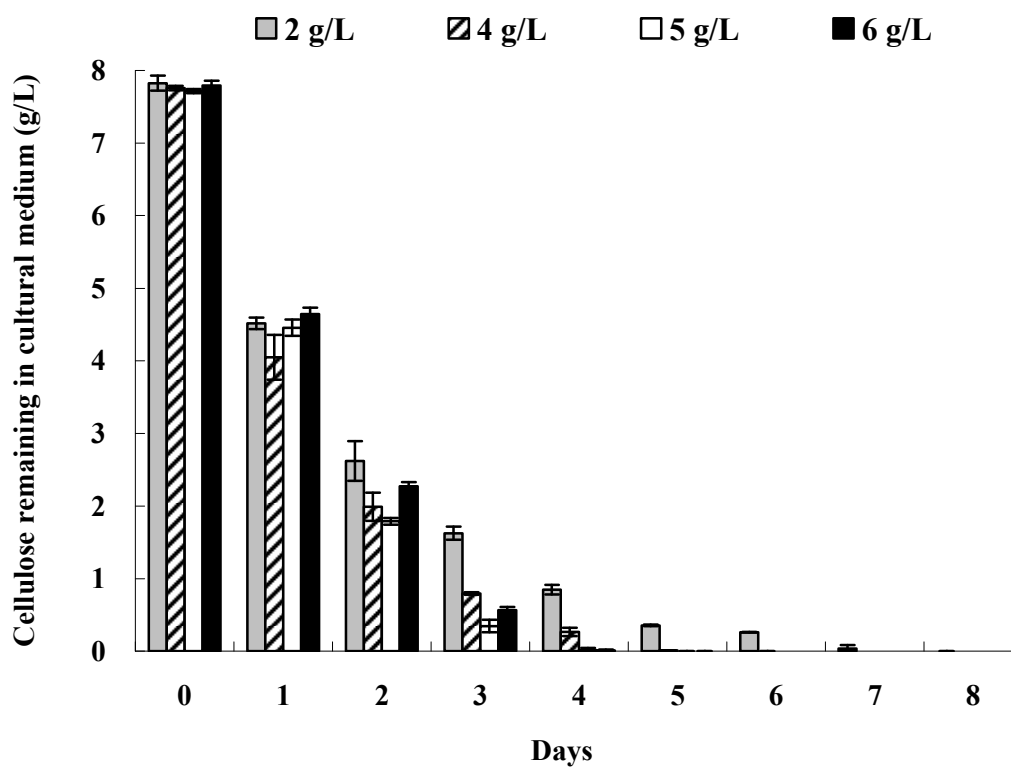


Fig. 4.39 Cellulose degradation of mix cultures grown at different concentrations of NaHCO_3 . Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 8 g/L α -cellulose.

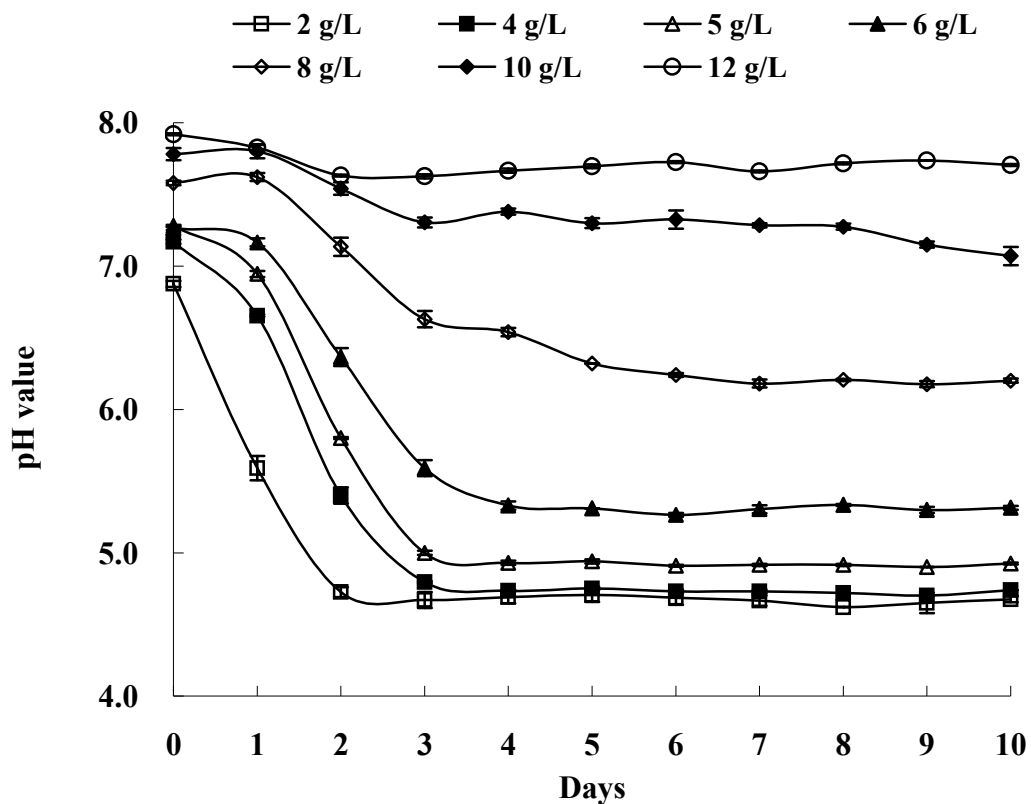


Fig. 4.40 Change of pH value in cultural medium during cellulose degradation of mix cultures under anaerobic condition. Cultures of mix thermophilic anaerobic were grown at different NaHCO₃. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 8 g/L α -cellulose.

Table 4.2 Cellulose degradation rate of mixed culture with different concentrations of NaHCO₃.

	NaHCO₃ concentrations added (g/L)			
	2	4	5	6
Cellulose degradation rate g L ⁻¹ day ⁻¹	1.14±0.01	1.60±0.00	2.00±0.04	2.00±0.00

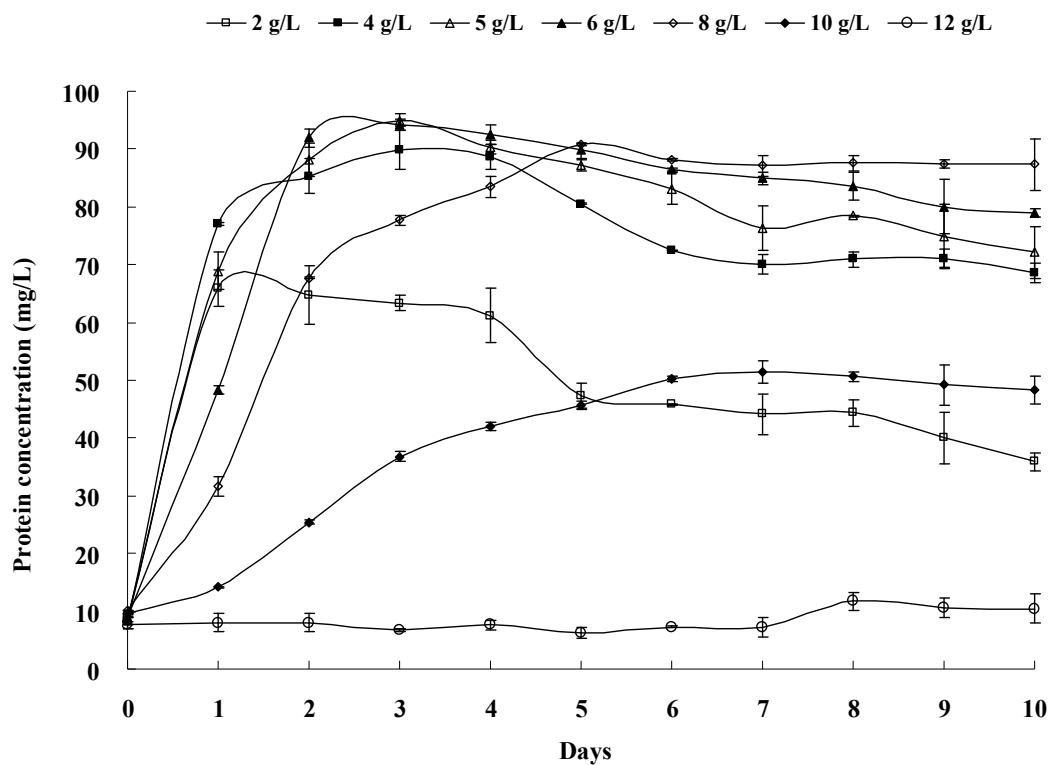


Fig. 4.41 Protein concentration of mix culture grown at different concentrations of NaHCO₃. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 8 g/L α -cellulose.

Table 4.3 Biomass yield (measured as protein concentration) from cellulose biodegradation by the mixed culture growth at different concentrations of NaHCO₃.

	NaHCO ₃ concentrations added (g/L)						
	2	4	5	6	8	10	12
Biomass yield							
mg protein	8.24±0.08	11.25±0.42	11.87±0.14	11.79±0.44	11.36±0.03	6.33±0.11	0.96±0.20
g ⁻¹ cellulose							

不同濃度 NaHCO_3 下混合菌群降解纖維素產生甲烷情形如 Fig. 4.42 所示，添加 8 g/L 的 NaHCO_3 進行培養時，生成最高甲烷生成量為 $4287 \pm 73 \mu\text{mole}$ ，其次為添加 10、6、4、5 與 2 g/L 的 NaHCO_3 ，分別為 3036 ± 27 、 1921 ± 75 、 1723 ± 63 、 1616 ± 44 與 $1339 \pm 66 \mu\text{mole}$ 。

不同濃度 NaHCO_3 的添加會改變培養基之鹼度，從而影響纖維素分解產生最大甲烷之產率。如 Table 4.4 所示，添加 8 g/L 的 NaHCO_3 進行培養時之每單位纖維素被消耗可生成之甲烷量最高，其次為 10 g/L 的 NaHCO_3 添加，添加 12 g/L 的 NaHCO_3 進行培養時，纖維素生成甲烷量降低，因此，高鹼度對於甲烷生成菌群造成抑制，pH 值偏鹼性除了使其生成之生物量低，使纖維素降解反應不佳，使副產物 VFAs 生成量低，因而添加 10 與 12 g/L NaHCO_3 之 pH 值沒有明顯的下降，而這些容易被利用的酸類減少的情況下，相對的甲烷菌群可利用的基質也會減少，因此生成量降低。

另外在 8 g/L 的 NaHCO_3 進行培養時，皆有最高之比生長率與甲烷生成率 (Fig. 4.43)，分別為 $0.97 \pm 0.00 \text{ day}^{-1}$ 與 $0.94 \pm 0.01 \mu\text{mole day}^{-1}$ ，最低為添加 12 g/L 的 NaHCO_3 培養。以比甲烷生成率表示時 (Fig. 4.44)，與 Fig. 4.42 有相同的結果，因此，添加 8 g/L 的 NaHCO_3 為最佳濃度。

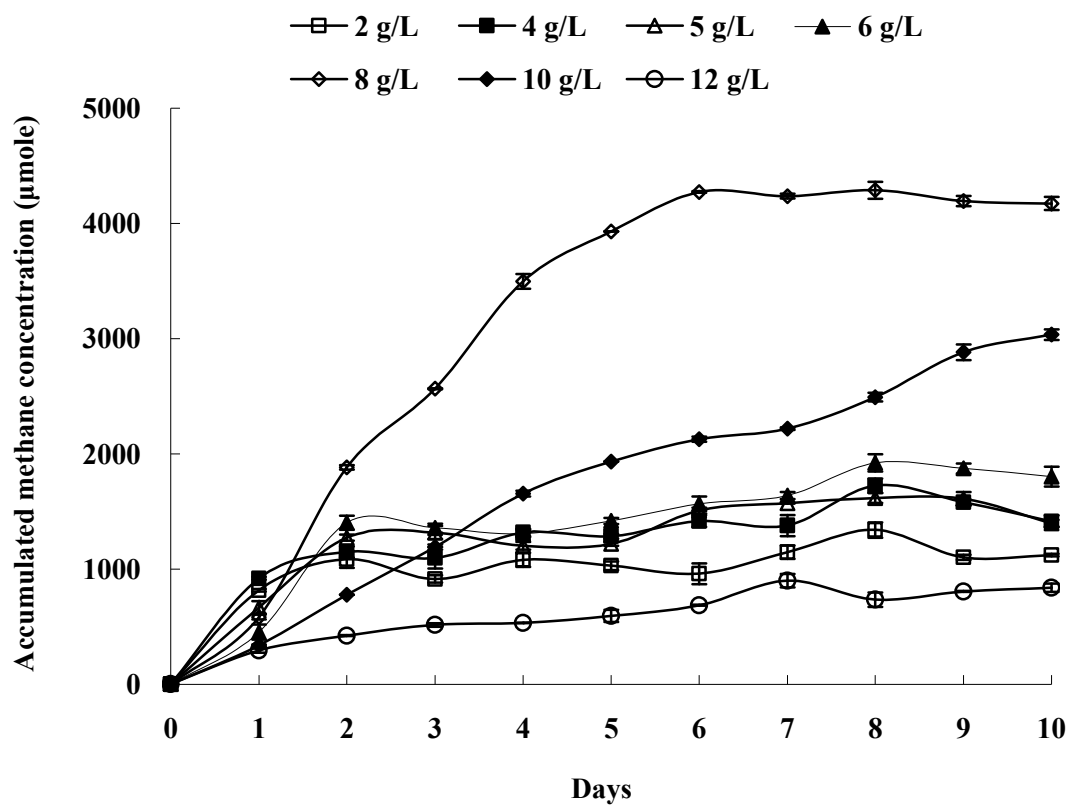


Fig. 4.42 Methane production from bioconversion of cellulose by mix culture grown with different concentrations of NaHCO₃. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 8 g/L α -cellulose.

Table 4.4 Methane production yield from cellulose bioconversion by the mixed culture with different concentrations of NaHCO₃.

	NaHCO ₃ concentrations added (g/L)						
	2	4	5	6	8	10	12
Methane yield μmole CH ₄ g ⁻¹ cellulose	167±8	215±3	202±1	240±7	563±4	379±5	113±4

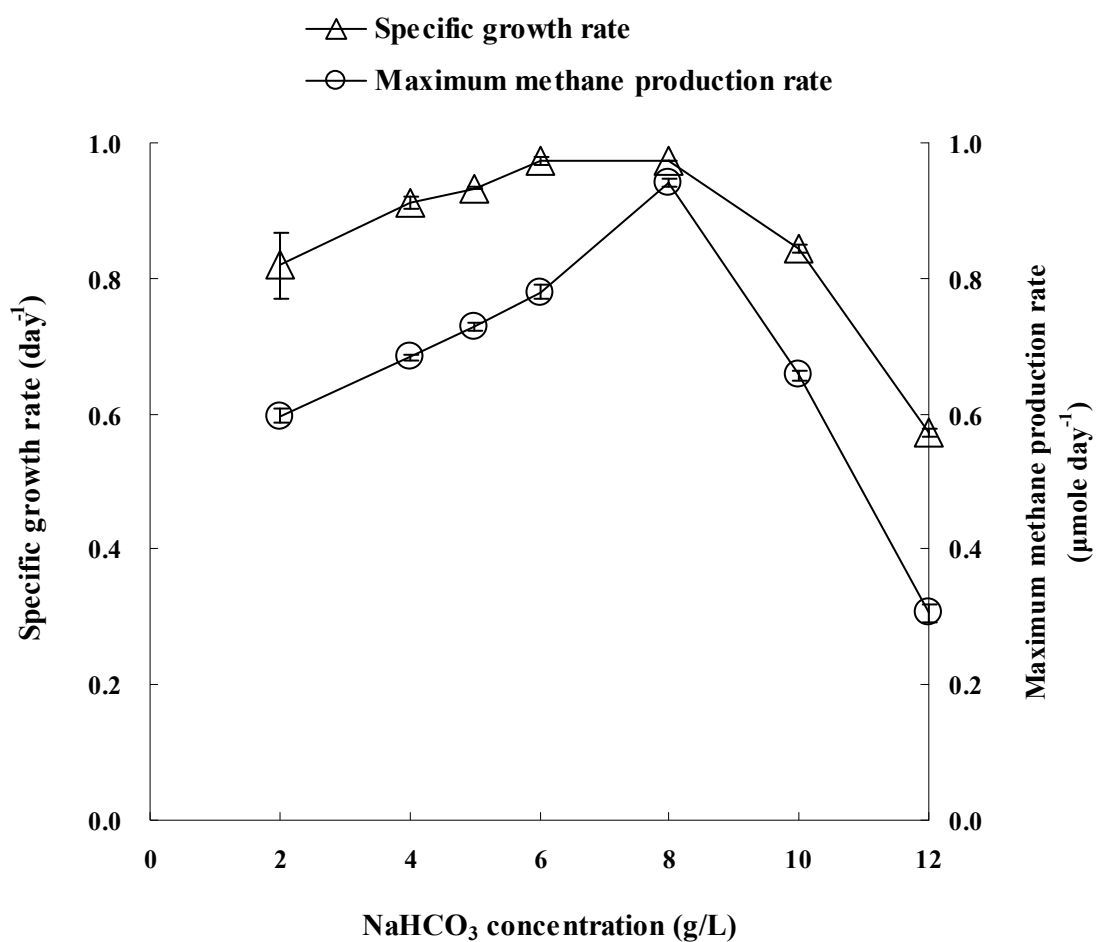


Fig. 4.43 Specific growth rate (day^{-1}) and maximum methane production rate ($\mu\text{mole day}^{-1}$) from cellulose bioconversion by mixed culture grown with different concentrations of NaHCO_3 . Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 8 g/L α -cellulose.

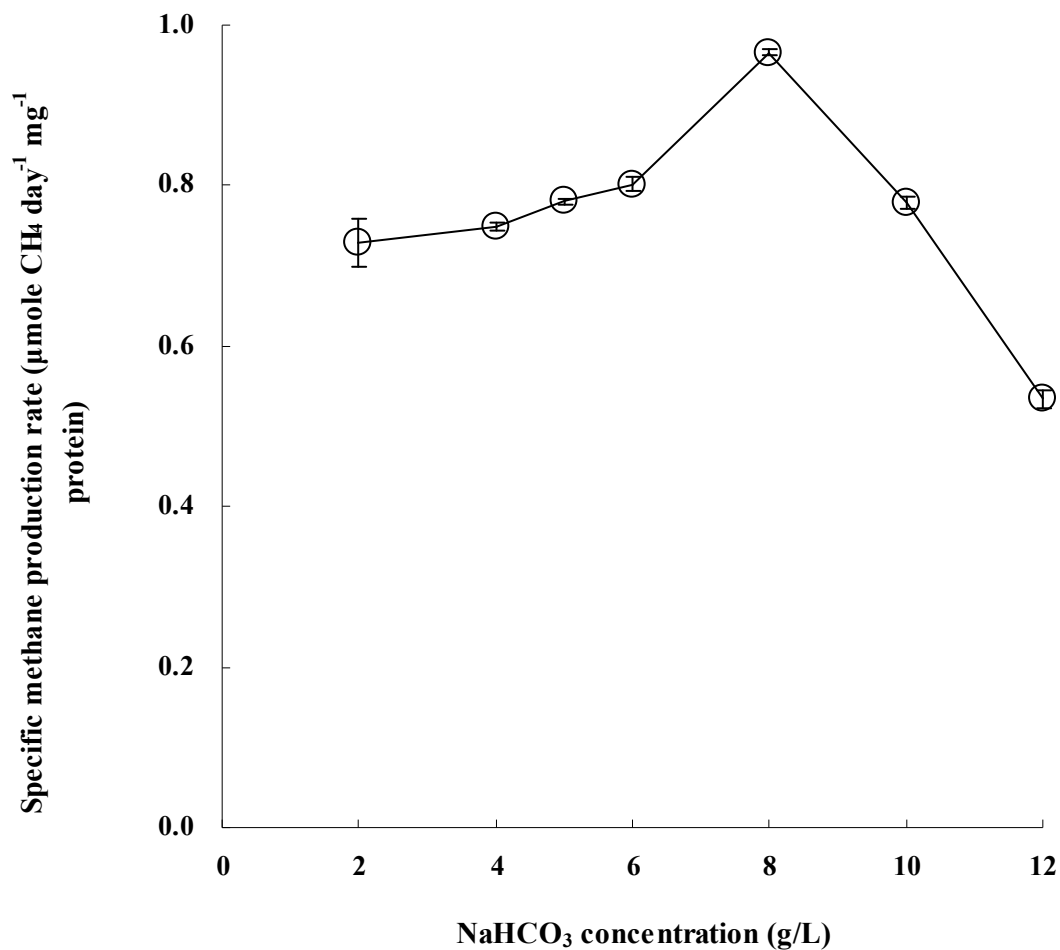


Fig. 4.44 Specific methane production rate ($\mu\text{mole CH}_4 \text{ day}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ protein}$) from cellulose bioconversion by mixed culture grown with different concentrations of NaHCO₃. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 8 g/L α -cellulose.

4.5.2 不同 NaHCO₃ 添加時對揮發性有機酸產生之影響

有機物在厭氧生物降解時會產生揮發性脂肪酸 (volatile fatty acids, VFAs)，其中以乙酸最為常見。添加 2、4、5、6 g/L NaHCO₃ 培養時，隨纖維素被分解而生成揮發性脂肪酸，以 acetic acid (100%) 直接稀釋成 60 mM，取 1 μl 注入 GC-FID 分析，在 retention time 2.193 分鐘出現 acetic acid 標準品之 peak (Fig. 4.45 A)，再取 1 μl 之實驗樣品注入 GC-FID 分析後，在 retention time 2.189 分鐘出現 peak (Fig. 4.45 B)，表示樣品中也含有乙酸。

因此，以乙酸濃度代表 VFAs 生成進行探討，添加 2 g/L NaHCO₃ 培養時 (Fig. 4.46) 生成的乙酸濃度最高，有 85±1.2 mM 生成，培養在 4、5、6 g/L NaHCO₃，其最大之乙酸生成濃度分別為 58±1.6、41±1.3、30±0.5 mM。

在 2 g/L 的 NaHCO₃ 進行培養時，有最高之比乙酸生成率 (Fig. 4.47)，為 0.945±0.02 mM day⁻¹，添加 6 g/L 的 NaHCO₃ 培養時，比乙酸生成率 (specific acetate production rate) 最低，僅為 0.217±0.01 mM day⁻¹，此結果與 Fig. 4.46 一致，表示低鹼度培養時乙酸之生成速率快，造成酸的累積，最終 pH 為 4.7，導致纖維降解與甲烷生成速率受抑制；而高鹼度培養時乙酸生成速率很低，相對的乙酸累積較少，最終 pH 為 5.3，既可以使纖維素被分解的速率加快，

還可增加甲烷產量，表示乙酸生成濃度隨 NaHCO_3 添加量的增加而減少。

此研究中 VFAs 形成除了含有高濃度之乙酸外，還包括其它少量的酸類生成，因此，以 GC-FID 分析時，在 retention time 2.189 分鐘 (acetic acid) 前後會出現一些較小的 peak (Fig. 4.45 B)，經比對後其中含有 Propionic acid、Isobutyric acid、Butyric acid、Isovaleric acid，但在培養第 6 天後，大部份的小 peak 積分面積皆有變小的情形。

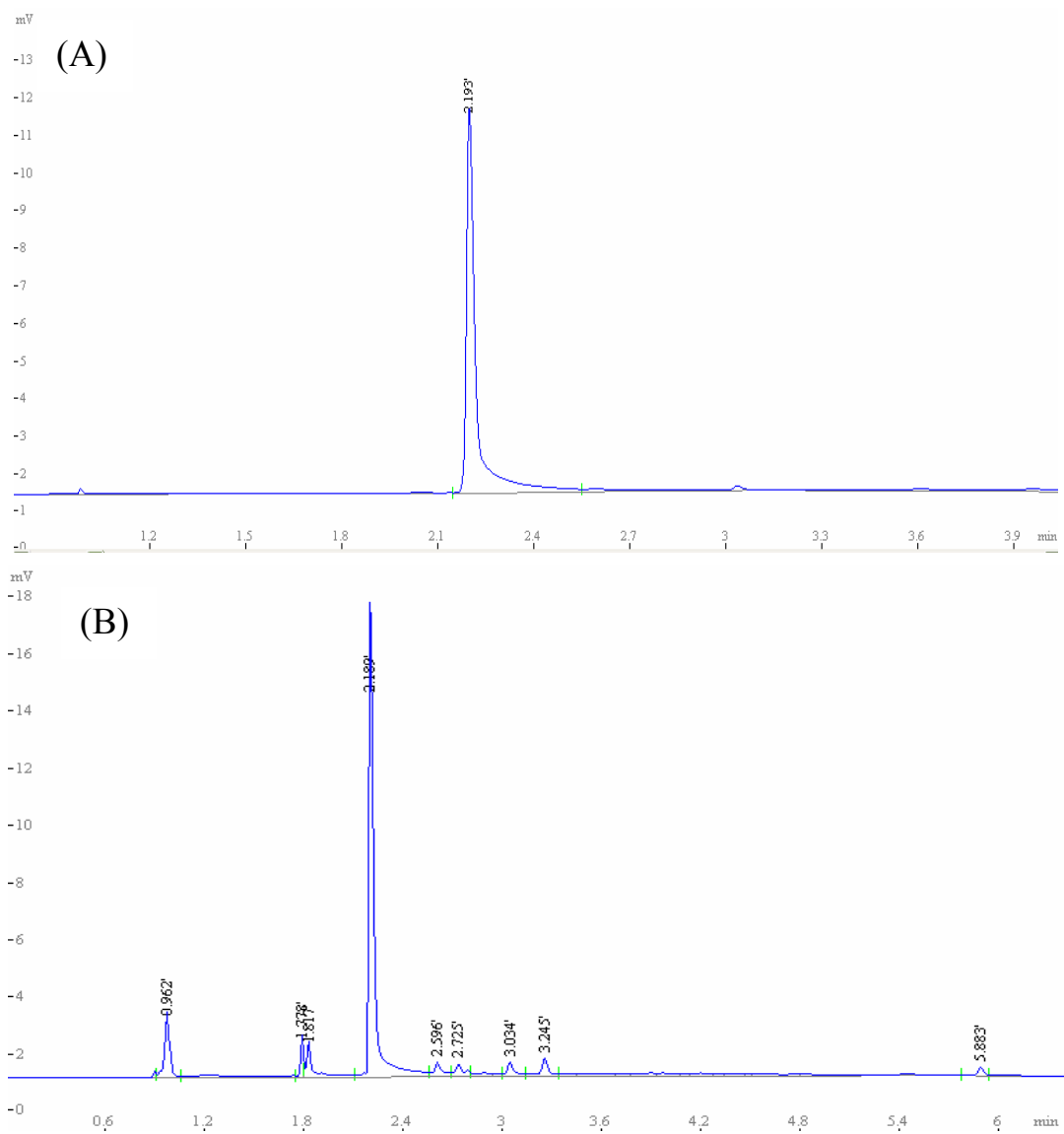


Fig. 4.45 GC-FID Chromatogram of acetate as VFAs produced from anaerobic bioconversion of cellulose by mixed culture. (A), 60mM acetate standard ; (B), direct injection of cultural medium grown with 8 g/L of α -cellulose. Both injection volume of standard and sample is 1 μ l.

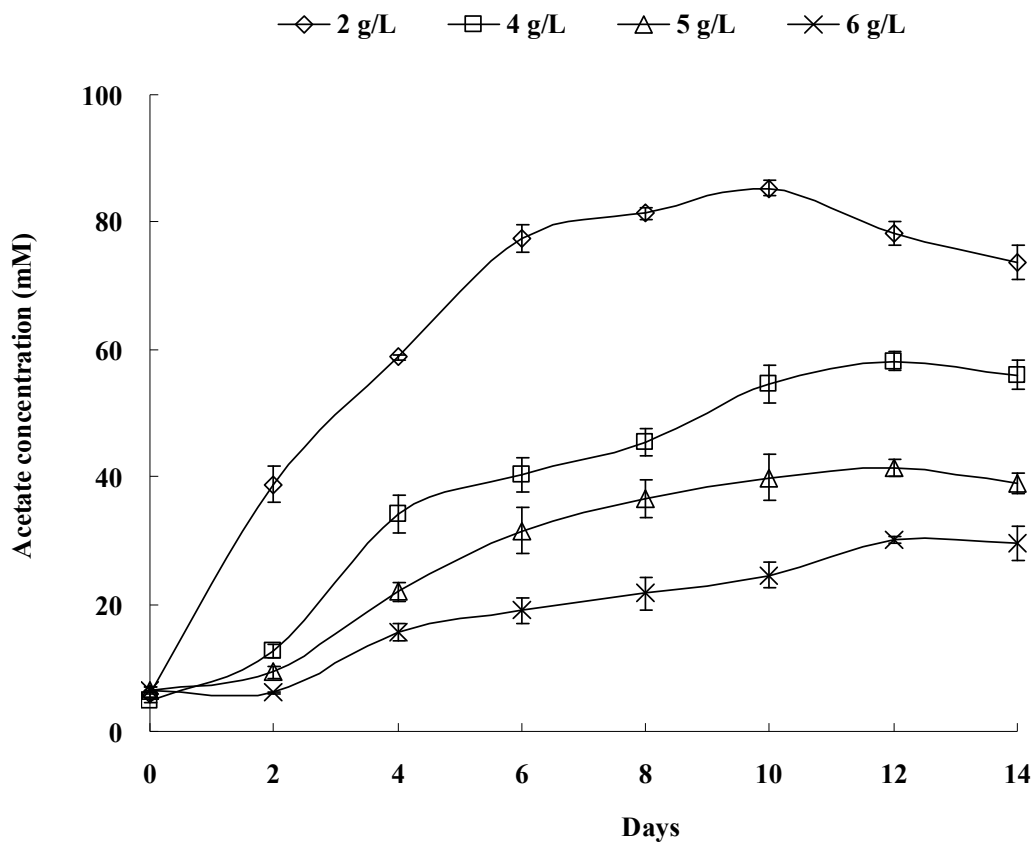


Fig. 4.46 Acetate production from bioconversion of cellulose by mix thermophilic anaerobes. Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 8 g/L α -cellulose at different concentrations of NaHCO_3 .

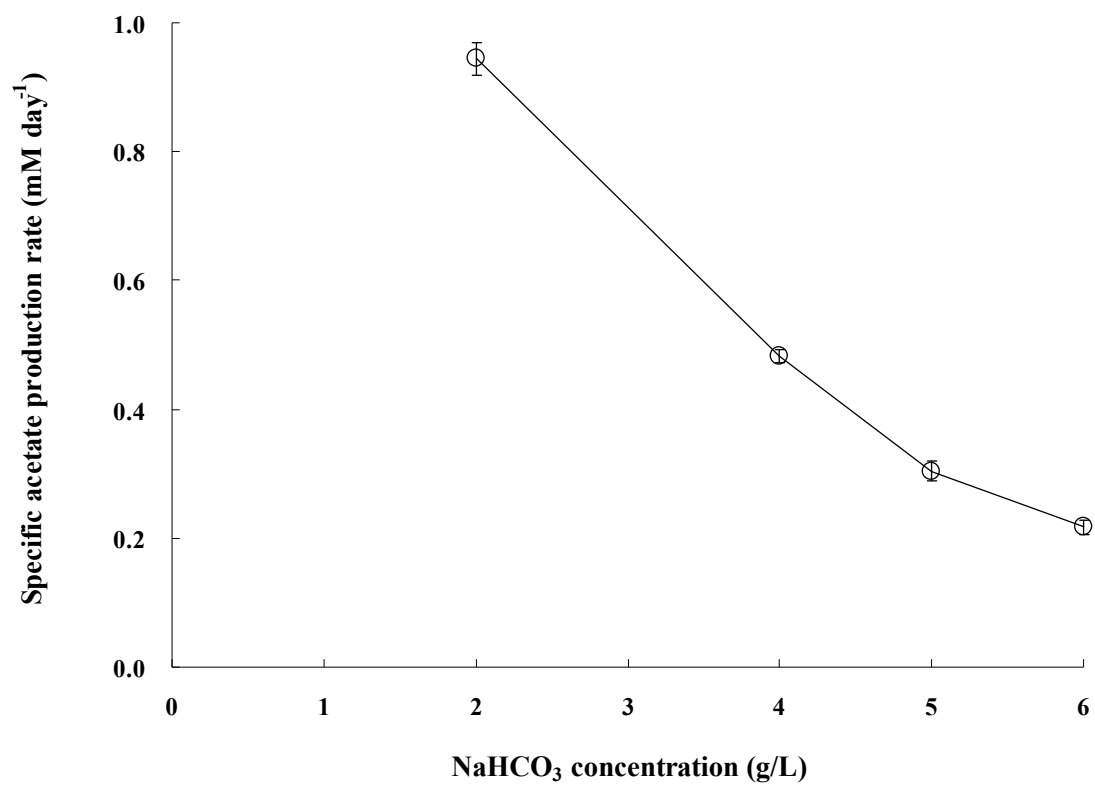


Fig. 4.47 Specific acetate production rate (mM acetate day⁻¹) from cellulose bioconversion by thermophilic anaerobes and cultured at different concentrations of NaHCO₃. Cultivation in 100 ml of liquid medium with 8 g/L α -cellulose.

4.5.3 不同濃度 NaHCO₃ 對 TCOD 影響

添加 2、4、5、6 g/L NaHCO₃ 培養時，在不植菌之空白組可測得約 8781 mg/L 之 TCOD (Fig. 4.48)，植入混合菌群後，TCOD 有明顯的降解情形，最低 TCOD 濃度分別為 5000±120、4250±59、3875±236、3729±120 mg/L，而 TCOD 隨著纖維素被分解所生成乙酸的累積，在第 4 天後開始有明顯上升的情形。

添加 2、4、5、6 g/L NaHCO₃ 培養之最終 TCOD 分別為 6116±58、4876±275、4669±0、4463±175 mg/L (Fig. 4.48)，對照 Fig. 4.49，發現其各別之 SCOD 最高濃度為 6083±59、4625±0、4333±59、4042±118 mg/L，最終 TCOD 變化值與最高的 SCOD 變化濃度相當符合，表示第 4 天之後增加的 TCOD 可能為乙酸生成時，造成 SCOD 累積。

以 TCOD 去除百分比表示 (Table 4.5)，發現添加 2、4、5、6 g/L NaHCO₃ 培養時，TCOD 隨著鹼度的增加而去除效率越高，添加 6 g/L NaHCO₃ 培養時，TCOD 之去除率最佳。

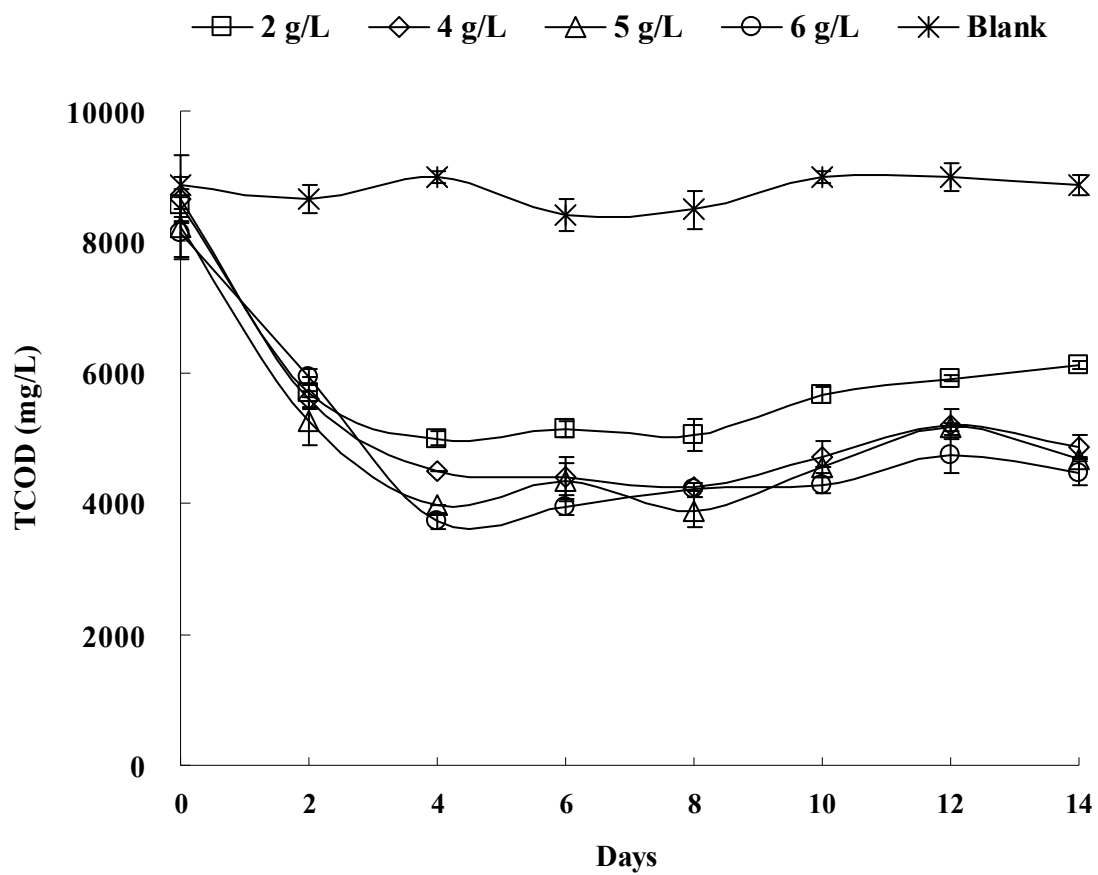


Fig. 4.48 TCOD concentration of mix cultures under anaerobic condition. Cultures of mix thermophilic anaerobic were grown at different concentrations of NaHCO_3 . Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 8 g/L α -cellulose.

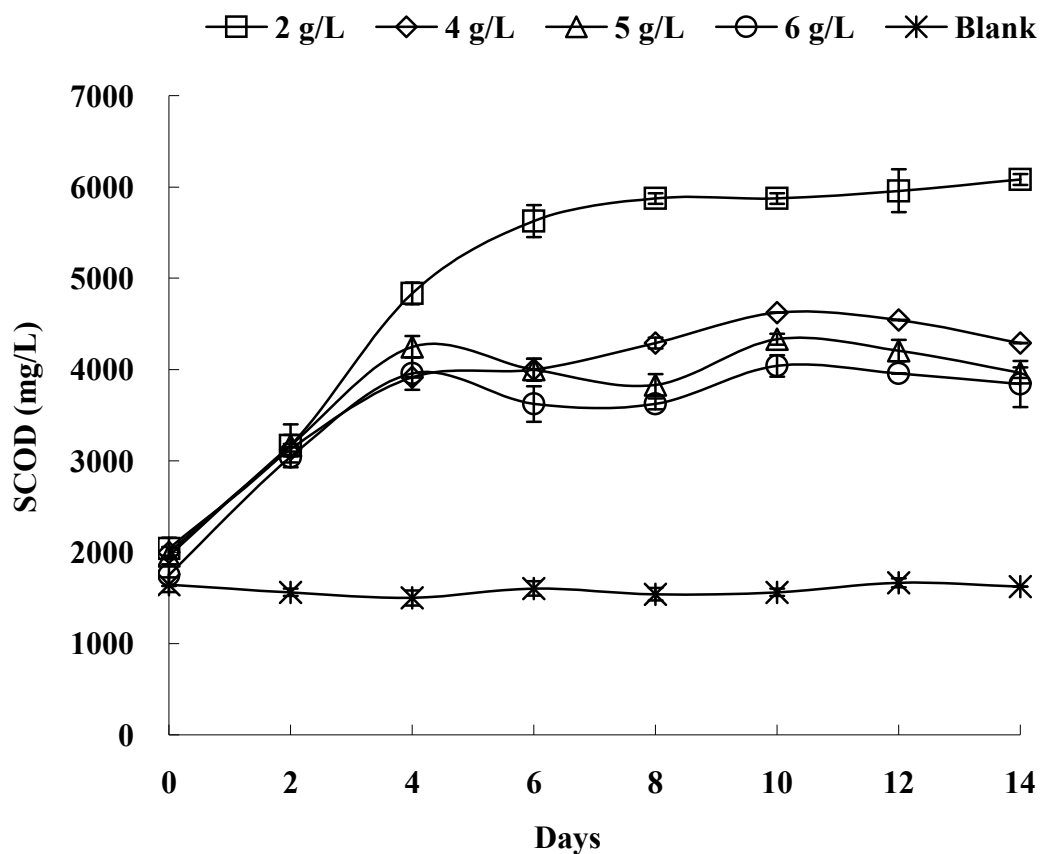


Fig. 4.49 SCOD concentration of mix cultures under anaerobic condition. Cultures of mix thermophilic anaerobic were grown at different concentrations of NaHCO_3 . Cultivation was conducted in 100 ml of liquid medium with 8 g/L α -cellulose.

Table 4.5 Percentage of TCOD removal of the mixed culture at different concentrations of NaHCO₃.

NaHCO₃ concentrations added (g/L)				
	2	4	5	6
TCOD removal %	41.58±0.23	50.83±1.31	52.86±2.83	54.17±3.50

4.6 討論

將實驗中較佳參數之數據以線性回歸比較其相關性 (Table 4.6)，統合纖維素降解條件探討，發現 6 g/L NaHCO₃ 培養時有最高的相關性 (0.99)，而生物量與甲烷生成則為 8 g/L NaHCO₃ 培養時有最高的相關性，分別為 0.93 與 0.99，高於其它參條件培養之相關性，表示這些研究參數中，碳酸氫鈉的添加有較大的影響。

綜合上述之最佳參數進行纖維降解測試與其他文獻比較如 Table 4.7 所示，以最佳生長溫度而言，本研究之溫度遠高於其它文獻之培養溫度，且纖維降解效率可完全降解，而文獻中 Hu *et al.* (2004) 及 Kato *et al.* (2004) 兩位學者之纖維降解系統，降解效率分別僅達 75 及 25%，而本研究之嗜熱混合菌群之纖維降解率高於其它文獻，但在甲烷生成量則低於其它文獻，可能原因為本研究之纖維降解系統雖然有較高之降解速率，但所產生之代謝物質，不可被完全利用於甲烷化之過程，造成代謝產物的累積，進而抑制後續礦化步驟。在實際應用上，此研究菌群對於其他纖維素來源的紙類具較佳之降解性，因此可應用於處理含纖維素之廢棄物。

Table 4.6 Comparison with correlation coefficient of cellulose bioconversion and cultures at different conditions.

Cultured conditions	Correlation coefficient (r^2)		
	Cellulose degradation	Protein production	Methane production
70°C	0.81	0.86	0.87
pH 6.8	0.74	0.71	0.96
8 g/L α -cellulose	0.92	0.87	0.92
1 g/L yeast extract	0.91	0.87	0.82
1 g/L Peptone	0.97	0.86	0.91
6 g/L NaHCO ₃	0.99	0.75	0.88
8 g/L NaHCO ₃	-	0.93	0.99

Table 4.7 Comparison of cellulose biodegradation efficiency and methane production with different sources of microorganisms.

Cellulose degradation rate (g/L/day)	Cellulose degradation efficiency (%)	Methane (mM)	Bacterial source	Substrate type	Substrate concentration (g/L)	Cultured days	°C	pH	Reference
1.50	75	*	Goat rumen	Cellulose	7.5 g/L	5	40	6.8	Hu <i>et al.</i> (2004)
0.08	100	10	Freshwater sediments	α -Cellulose	1 g/L	12	50	7.3	Tabassum and Rajoka. (2000)
0.25	25	*	CSK + M356**	Filter paper	2 g/L	8	50	7.0	Kato <i>et al.</i> (2004)
0.78	87	10	rumen	Cellulose	7 g/L	9	39.5	7.0	Hu <i>et al.</i> (2005)
1.66	100	4	Recycled paper-pulping plant	α -Cellulose	8 g/L	5	70	6.8	This study

*, data not available.

** , mix culture of *Clostridium straminisolvens* CSK1, *Pseudoxanthomonas* sp. M1-3, *Brevibacillus* sp. M1-5 and *Bordetella* sp.

M1-6 (namely CSK + M356).