

行政院原子能委員會
委託研究計畫研究報告

廢水產製聚羥基鏈烷酸酯類(PHA)菌株開發

Development of Polyhydroxyalkanoate (PHA) Production Strains
from Organic Wastewater

計畫編號：108B017

受委託機關(構)：逢甲大學

計畫主持人：朱正永 副教授

聯絡電話：04-24517250 轉 5323

E-mail address：cychu@mail.fcu.edu.tw

協同主持人：簡欣怡 助理教授

研究期程：中華民國 108 年 7 月至 109 年 2 月

研究經費：新臺幣 陸 拾 玖 萬元

核研所聯絡人員：涂瑋霖

報告日期：109 年 2 月 26 日

目 錄

目 錄	I
中文摘要	1
ABSTRACT.....	2
壹、計畫緣起與目的	3
貳、研究方法與過程	5
參、主要發現與結論	7
一、完成擇定 2 個汙水源，分析汙水水質，找出適合水解酸化潛力的汙水源	8
(一) 豬糞尿混合鳳梨皮渣汙水.....	9
(二) 食品產業廢汙水	11
二、完成開發 1 式揮發性脂肪酸生產定性定量方法	15
三、完成收集 PHA 分析技術文獻及評估。	20
(一) FT-IR & NMR	20
(二) GC-FID.....	20
(三) 螢光光譜分析法	21
四、完成建立 PHA 分析技術	24
五、完成建立 SBR 饋料策略離型評估，使其達成揮發性可溶性固體含 PHA 量為 15%~20%以上.....	30
六、完成測試驗證，以達成揮發性可溶性固體 VSS 含 PHA 量為 30%~40%以 上	33
肆、參考文獻	35

中文摘要

本計畫以污水進行厭氧發酵酸化處理，產製用以合成 PHA 碳源的揮發性脂肪酸 (volatile fatty acid, VFA)。擇定 2 個污水源，分析污水水質(TS、VS、COD 和 VFA 等性質)，找出適合水解酸化潛力的污水源(例如 VS 和 COD 對應 VFA 的影響)。開發 1 式揮發性脂肪酸生產定性定量方法，其中包含建立揮發性脂肪酸分析方法，透過厭氧酸化程序的操作參數調整(水力滯留時間、進料濃度)，並分析酸化產物的脂肪酸分布比例與濃度。建立廢水污泥產製 PHA 的循環型資源離型實驗數據，有助於廢水污泥的資源化利用且達成具競爭力的 PHA 生產技術，不僅符合國家循環經濟的政策且具有產業應用的效益。最後，本研究在食品產業廢汙水產製 VFAs 之母槽出流液可以有效的產出 PHAs，其揮發性可溶性固體含 PHA 量 PHAs/VSS 產率在 30.5-59.3%的範圍。

關鍵詞：厭氧發酵、酸化處理、揮發性脂肪酸、生活廢水、養豬廢水、循環經濟

Abstract

The project uses anaerobic fermentation acidification of sewage to produce volatile fatty acid (VFA) for the synthesis of PHA as carbon sources. Select two wastewater sources (domestic wastewater, pig wastewater or other), analyze the wastewater properties (TS, VS, COD and VFA) to find the source of wastewater suitable for hydrolysis acidification (such as the impact of VS and COD on VFA). Development a qualitative and quantitative method for the production of volatile fatty acids, which includes to establish an analysis method of volatile fatty acids, adjustment of operating parameters through anaerobic acidification procedures (HRT, fermentation temperature, pH and agitation rate), and analysis the distribution and concentration of fatty acid in acidified products. In addition, VFA was used to acclimate PHA dominant flora to establish PHA analysis technology, and the SBR feeding strategy model was established. Establishing the experimental data of the recycling model of waste water to produce PHA, which will contribute to the resource utilization of wastewater sludge and achieve competitiveness in PHA production technology, which not only conforms to the national circular economy policy but also has industrial application benefit. Finally, in this study, the effluent from the tank of VFAs produced from the wastewater of the food industry can effectively produce PHAs. The yield of volatile soluble solids containing PHA in the range of PHA / VSS was 30.5-59.3%.

Keywords: Anaerobic Fermentation, Acidification, Volatile Fatty Acid, Domestic Wastewater, Pig Wastewater, Circular Economy

壹、計畫緣起與目的

我國傳統農畜牧業、食品、紡織業等均會排放可產製用以合成 PHA 碳源的揮發性脂肪酸之生質廢棄物，如果能善加利用，則可提升該產業之價值。以食品工業為例，根據統計，我國每年所產出之家畜糞尿中，未經處理利用的部分達 1,649,8008 公噸，其能源潛勢高達 6,152.9 TJ；而根據農委會統計指出，民國 104 年國內毛豬總頭數約有 550 萬頭，由此可知每日待清除之養豬廢水、汙泥量相當可觀，因此如何妥善處理這些廢品，將是養豬農最重要之課題。

塑膠被稱為白色污染，是近年來環境的大敵。以聚乙烯為代表的塑膠，在自然條件下極難降解，在土裡埋 50—100 年仍舊安然無恙。由於塑膠廣泛應用於農業生產及日常生活中，所以其產量每年遞增，造成了這種人工化合物的大量積累。積累在農田中的塑膠可導致土壤板結，活力下降，防礙作物生長，可使作物減產 20—40%。而城市垃圾中的塑膠則危害著人畜的安全，有很多關於動物誤食塑膠致死的報導。然而隨著氣候變遷以及全球石油儲存量逐漸耗竭，全球消費者環保意識的提升，為了降低石化資源的依賴，全世界陸續提出限塑的政策並增加生質塑膠的需求，非石化來源的生質材料會是下一世代高分子材料應用的焦點。在眾多生質塑膠材料中，一類由微生物合成的化合物引起了人們的興趣，這類化合物為聚羥基鏈烷酸酯類 (Polyhydroxyalkanoates, PHA)，它們是由許多個 β -羥基化的飽和脂肪酸聚合而成的，脂肪酸可以是丁酸，戊酸或己酸等。因材料性質與傳統石化塑膠類似，且具有在自然環境下分解的特點，為現階段唯一能在海洋中自行分解的生質塑膠。

1925 年法國巴斯德研究所的一位研究人員從巨大芽孢桿菌中發

現了聚 β -羥基丁酸酯 (PHB) 顆粒，當時這一成果並未引起人們的注意，被鎖進科技檔案櫃裡。PHB 是 PHA 中的一種。後來的研究表明，很多種類的微生物都能產生 PHA。PHA 分子量很大，具有良好的柔韌性和抗張性，並具有良好的可塑性，在實際應用上無異於人工塑膠。它的最大優點是可被微生物降解掉，因此人們稱它為“生物可降解塑膠”。目前 PHA 主要可經由化學和生物兩大類方法合成，但由於化學合成法反應條件劇烈，存在污染環境的風險。而生物合成 PHA 的方法主要以微生物發酵法為主，但發酵過程需要優勢菌種培養、碳源、滅菌和萃取純化等耗能程序，導致其生產成本過高，進而限制其應用發展。有鑒於此，為提高 PHA 產量及降低發酵成本，本計畫規劃可穩定供應的污水為碳源，進行 PHA 優勢菌種的開發，據此建立合成 PHA 之發酵技術開發研究，預計經馴化策略可獲得具有代謝揮發性脂肪酸能力並生產 PHA 之發酵菌株，其 PHA 生成效率為 30%~40% g PHA/g VSS。本計畫完成後，可建立廢水污泥產製 PHA 的循環型資源離型系統，此將有助於廢水污泥的資源化利用且有機會達成具競爭力的 PHA 生產成本，不僅符合國家循環經濟的政策且具有產業應用的效益。

貳、研究方法與過程

所有的微生物一定有個適合其生長的环境，當其所在环境為最佳適合生長之條件，而能可有最佳的生長速率，反之則影響生長。一般影響的环境因子有外在物理條件如溫度、pH 以及水力滯留時間(Hydraulic Retention Time, HRT)等；在厭氧醱酵產氫過程中，酸化菌會將有機物質中較大分子分解代謝進而產生氫氣、二氧化碳及其它小分子的有機物(如揮發酸及醇類等)，當過多的產物累積在反應系統中，將會造成產物抑制的現象[1]，故選擇最適合菌體生長的环境條件下才能得生物最佳生長速率及最大產量。

水力滯留時間為反應槽設計與操作之其重要因子，當水力滯留時間下降會使有機負荷量(Organic Loading Rate, OLR)增加，單位時間內送入反應器之基質量會增加，故揮發性有機酸生產速度也會增加[2][3]。但在厭氧醱酵酸化程序中，為了避免微生物甲烷菌利用氫氣產甲烷，由於之生長速率較慢，使不利於揮發性有機酸生產的甲烷菌不及生長即被洗出(wash out)系統以抑制甲烷菌生成[4]。而利用調控水力滯留時間 來控制微生物生長的方法較佳，因其不需添加任何抑制劑即可達抑制效果，但因反應器設計上的不同，在調控不同的 HRT 上也會有不同的揮發性有機酸生產效率，或是將系統操作在酸性環境以抑制對 pH 敏感的甲烷菌。由變性梯度明膠電泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)分析顯示，隨著 HRT 逐漸遞減，反應器內的微生物種類也會逐漸由複雜趨向簡單。部分文獻表示當水力滯留時間太低會時有可能造成菌體發生 wash-out 現象[5]，而大幅降低揮發性有機酸生產率，故不同的反應器形式及不同的微生物會有不同的最適操作條

件[3][6]。水力滯留時間操作在 0.25 - 2 h 之間，為了保留菌體，反應器多辦會搭配濾材或固定化系統[7]，目前高速進料流實驗均為精緻糖類，以實際廢水為基質者非常少。

參、主要發現與結論

本計畫以污水進行厭氧發酵酸化處理，產製用以合成 PHA 碳源的揮發性脂肪酸 (volatile fatty acid, VFA)。擇定 2 個污水源，分析污水水質，找出適合水解酸化潛力的污水源。開發 1 式揮發性脂肪酸生產定性定量方法，其中包含建立揮發性脂肪酸分析方法，透過厭氧酸化程序的水力滯留時間操作參數調整，並分析酸化產物的脂肪酸分布比例與濃度。續以產出之 VFA 進行 PHA 優勢菌群的馴化建立 PHA 分析技術，建立 SBR 饋料策略雛型評估，使其達成揮發性可溶性固體(VSS，即微生物污泥) 含 PHA 量為 30%~40%。此將有助於廢水污泥的資源化利用且達成具競爭力的 PHA 生產技術。

一、完成擇定 2 個汙水源，分析汙水水質，找出適合水解酸化潛力的汙水源

本研究利用台中市黎明廢水處理廠之污泥經馴養後之酸化槽(圖 1)出流液植入 CSTR 中，並以鳳梨混養豬廢水、高有機質食品業廢水與生活污水三個汙水做為主要碳源，將其濃度調整至 25-100 g COD/L，直接導入酸化反應槽進行醱酵；利用 pH 控制器監測 pH 值，並以 1 M NaOH 作為鹼劑，使反應槽內環境維持在 $\text{pH} = 5.5$ ；槽體溫度利用水浴並以加熱控制器控制在 37°C ；磁石轉速控制在 280 rpm；而產出之氣體及液體經由出流口流經氣液分離槽進行分離，氣體流量則以濕式氣體流量計作監測，液體出流端採樣分析 VFAs 產量，並從三種汙水中找出最佳之產 VFAs 汙水，再以該汙水作為後續產 PHA 為主之汙水料源，企圖找出適合水解酸化以及產出最多 PHA 之潛力汙水源。

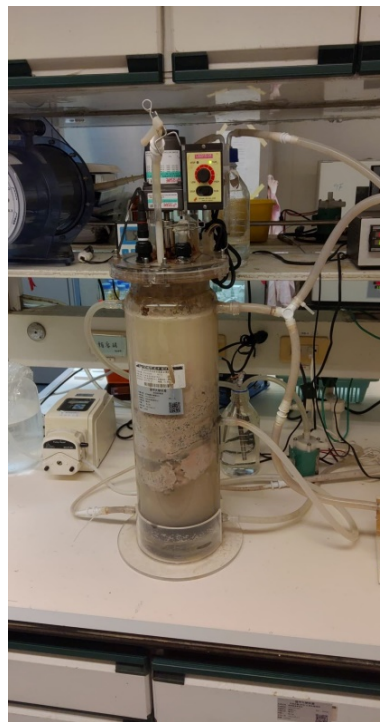


圖 1、連續流馴養後之酸化菌培養母槽

(一) 豬糞尿混合鳳梨皮渣汙水

本研究以 0.2 L CSTR 反應槽(圖 2)使用台中菜市場水果攤商廢棄鳳梨皮混南投畜牧場養豬廢水實驗，馴養後之酸化槽出流液植入 CSTR 來分析污水水質(TS、VS、COD 和 VFA 等性質)，廢水進料條件 COD 濃度為 110.43 g COD/L，水力停留時間 HRT 為 0.375 day，總固體濃度 TS 為 51.01 g/L，揮發性固體物濃度 VS 為 39.08 g/L。出流液樣品揮發酸 VFAs 分析結果如表 1 所示(GC-FID; SHIMADZU)，在產 VFAs 實驗中，發現乙酸、丁酸為主要液相代謝物，文獻中指出產 PHA 主要之前趨物主要為乙酸及丁酸(圖 3)，在測試條件下乙酸及丁酸佔非揮發性有機酸的比例約 12.5%。



圖 2、豬糞尿混合鳳梨皮渣汙水產 VFAs 反應槽

表1、豬糞尿混合鳳梨皮渣汙水產揮發酸VFA分析

Acetic	Butyric	VFAs/COD	(A+B) /COD	(A+B)/VS	(A+B) /VFAs
(mg/L)	(mg/L)	(%)	(%)	(%)	(%)
1406.25	113.12	1.9	0.23	3.9	12.5
± 126.56	± 13.56				

Note: A = Acetic acid, B = Butyric acid, VS = Volatile solids, VFAs = Volatile fatty acids

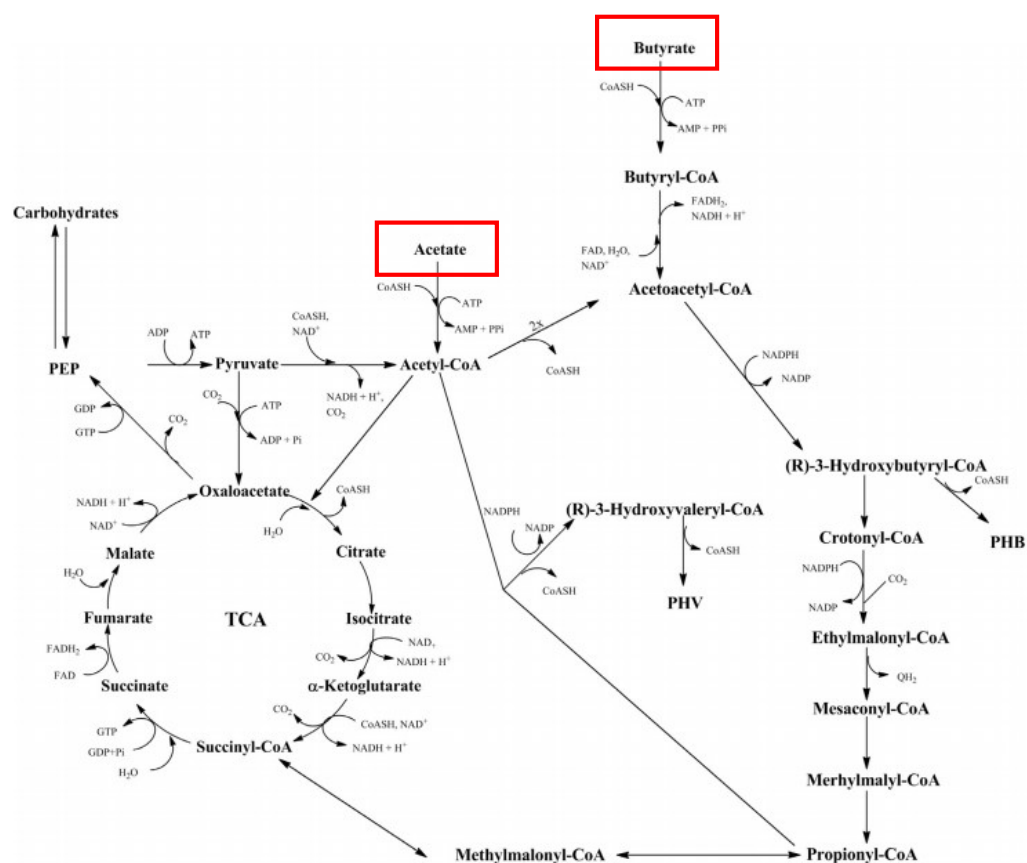


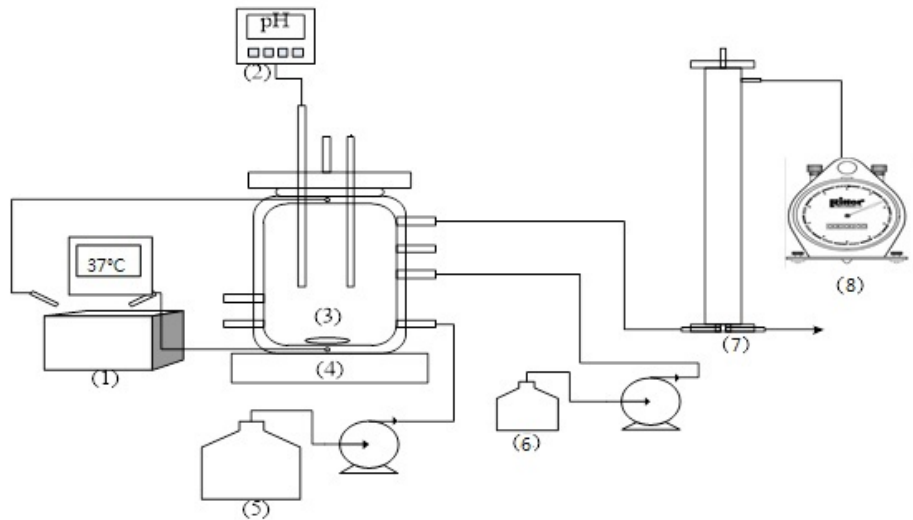
圖 3、PHA 主要之前趨物代謝路徑圖[8]

(二) 食品產業廢汙水

本研究以 1 L CSTR 反應槽使用中部食品產業廢汙水實驗，馴養後之酸化槽出流液植入 CSTR，並分析污水水質(TS、VS、COD 和 VFA 等性質)，找出適合水解酸化潛力的污水源，產酸程序流程如圖 4 所示(照片如圖 5)，廢水進料條件 COD 濃度為 100 g COD/L，原水濃度 556.48 ± 21.86 g COD/L，pH 5.04 ± 0.02 ，食品產業廢汙水原水水質分析如表 2 所示，總固體濃度 TS 為 437.9 ± 9.75 g/L，揮發性固體物濃度 VS 為 374.05 ± 8.80 g/L。

本研究以水力停留時間 2.5, 3, 2 day 分別進行 VFAs 產製，出流液樣品揮發酸 VFAs (HPLC Hitachi Chromaster 5450) 與氣態氫氣濃度分析結果如圖 6 所示，由圖 6 所知氫氣的測出可以代表主要揮發酸乙酸與丁酸的產出，若無氫氣的產出則主要揮發酸乙酸與丁酸的產量也隨之下降。整理不同水力停留時間揮發酸 VFAs 最佳數據如表 3 所示，在醱酵產 VFAs 實驗中，發現乙酸、丙酸、乳酸與丁酸為主要液相代謝物。文獻中指出產 PHA 主要之前趨物主要為乙酸及丁酸，乙酸、丁酸產量相對於總 COD 進料、揮發性固體物 VS 進料以及總揮發酸 VFAs 產物之產率整理如表 4。由表 1 及表 4 之乙酸與丁酸的產率比較可以得知，食品產業廢汙水具有乙酸、丁酸產量高、高利用率高和高總有機酸占比，有利於 PHA 之生成，其中在所有測試條件下乙酸與丁酸之非揮發性有機物的占比最佳為 49.7%，而為了提升食品產業廢汙水乙酸與丁酸產量相對於總 COD 進料產物之產率，條件為 HRT 4 day、進料基質濃度 50 g

COD /L、乙酸與丁酸產量相對於總 COD 進料(A+B) /COD_{in} 為 8.2 為最高。因此本計畫以食品產業廢水進行後續 PHA 生產之研究，該廢水為適合水解酸化潛力的汙水源。



- (1) Heater (2) pH detector (3) Bioreactor (4) Stir (5) Medium tank (6) NaOH (7) Gas-liquid separator (8) Wet gas meter

圖 4、食品產業廢汙水產製 VFAs 流程圖



圖5、食品產業廢汙水產製VFAs流程實際照片

表2、食品產業廢汙水原水水質分析

分析項目	濃度(g/L)
COD	556.48 ± 21.86
TS	437.9 ± 9.75
VS	374.05 ± 8.80
NH ₃ -N	3.61
Zn	0.011
總磷	21.1
Fe	0.09
Cu	0.119
總醣	36.49

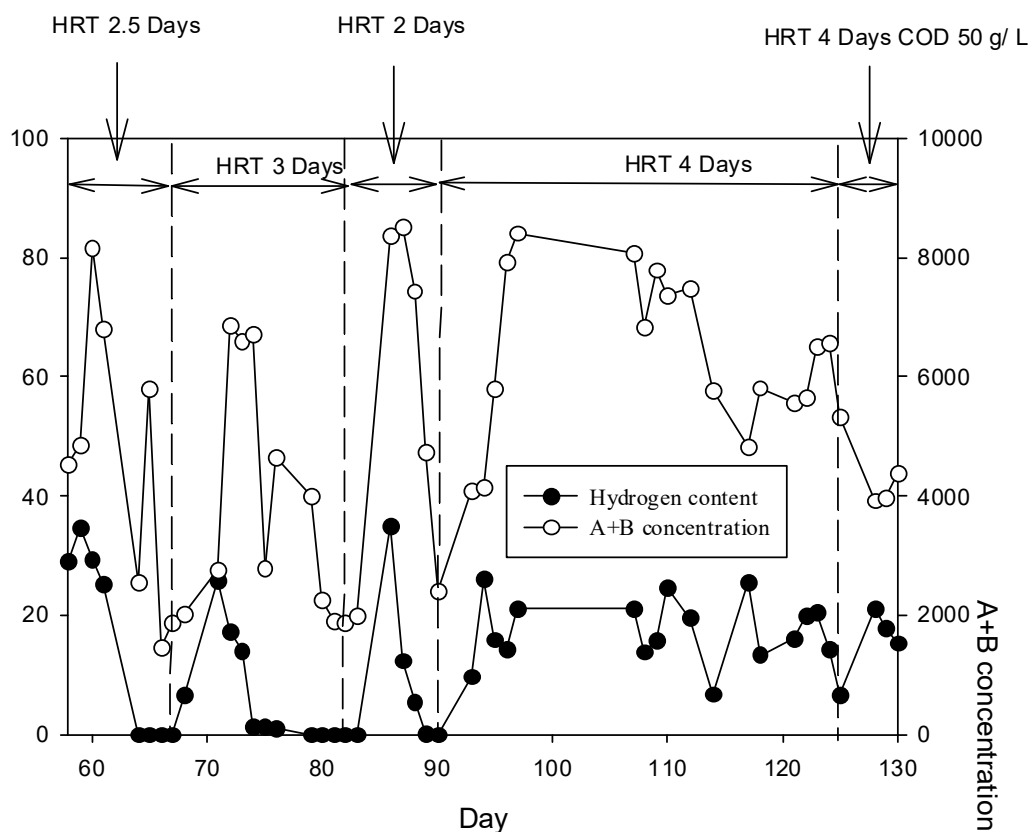


圖 6、不同 HRT 對氫氣、乙酸及丁酸之關係圖(A 代表乙酸 Acetic acid 以及 B 代表丁酸 Butyric acid)

表3、食品產業廢汙水產揮發酸VFA分析 (單位：mg/L)

HRT	2 day	2.5 day	3 day	4 day	4 day
CODin	100 g/L	100 g/L	100 g/L	100 g/L	50 g/L
檸檬酸	1175.45	1342.32	2093.7	1994.66	1511.14
乳酸	24367.1	16935.9	4027.32	2947.16	1770.62
乙醇	0	79.071	4319.59	2855.11	2493.00
乙酸	2134.48	2129.61	4519.90	4243.2	3239.39
丙酸	0	1736.58	670.99	822.79	614.55
丁酸	113.61	622.09	2202.08	1683.73	854.98

表4、食品產業廢汙水乙酸、丁酸產量相對於總COD進料、揮發性固體物VS進料以及總揮發酸VFAs產物之產率

HRT (d)	CODin (g/L)	A (mg /L)	B (mg /L)	VFA (mg/L)	VFAs /CODin (%)	(A+B) /CODin (%)	(A+B) /VFAs (%)
2.0	100	2134± 86	114± 69	27791	27.8	2.3	8.1
2.5	100	2130± 34	622± 9	22767	22.8	2.8	12.1
3.0	100	4520± 30	2202± 243	13514	13.5	6.7	49.7
4.0	100	4243±160	1684±629	14547	14.5	5.9	40.7
4.0	50	3240±205	855±102	10483	21.0	8.2	39.1

Note: A = Acetic acid, B = Butyric acid, VFAs = Volatile fatty acids

二、完成開發 1 式揮發性脂肪酸生產定性定量方法

本實驗完成開發以HPLC (Hitachi Chromaster 5450) (圖 7) 測量揮發性脂肪酸之定性定量方法。

型號：Hitachi Chromaster 5450 Refractive Index RI Detector, Hitachi Chromaster 5210 HPLC Autosampler, Hitachi Chromaster 5110 HPLC Pump。

管柱型號：ICE-99-9861-ICSep Coregel-87H3 Column 7.8x300 mm。

操作條件：Flow rate: 0.1-1.2 mL/min; Carry: 0.006N H₂SO₄; 管柱溫度35 °C。

樣品及機器準備動作：a.準備分析樣品及溶劑，樣品及溶劑皆須過濾及除氣，b. 打開PUMP及偵測器電源，c. 將各管路過濾器入口置入溶劑內。

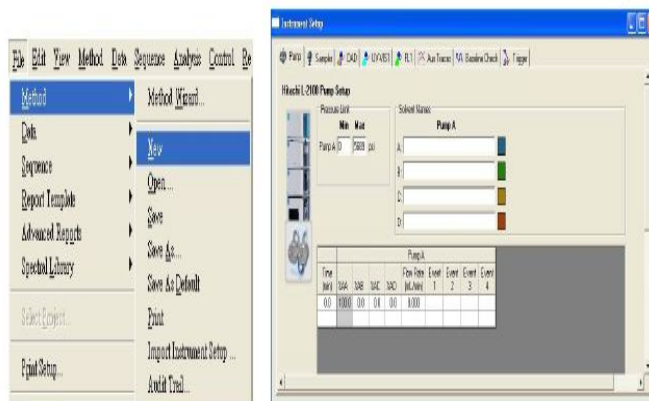


圖7、HPLC (Hitachi Chromaster 5450)照片

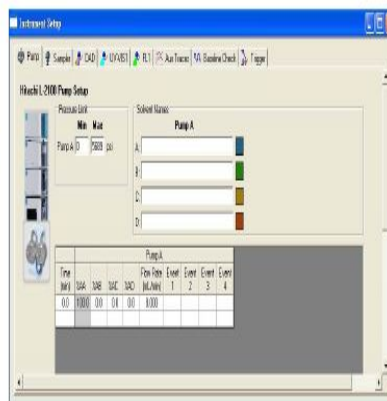
軟體使用：

a.點選EZChrom Elite後滑鼠雙擊儀器圖示。

b.產生新的Method：點選軟體上方的File->Method->New，如<圖1>所示，開啟後會有<圖2>的畫面，請設定好每一台儀器的參數。



<圖 1>



<圖 2>

c.儲存參Method：完成上一步驟後，請將Method 儲存起來。請進入軟體上方的File→Method→Save As，如<圖3>所示，開啟後會出現<圖4>的畫面，請在儲存於(I)：後方選擇您要儲存的路徑，並且在檔案名稱(N)：後方輸入你要的檔名，完成後

請按下儲存鍵。此時可以將<圖2>的視窗關閉。



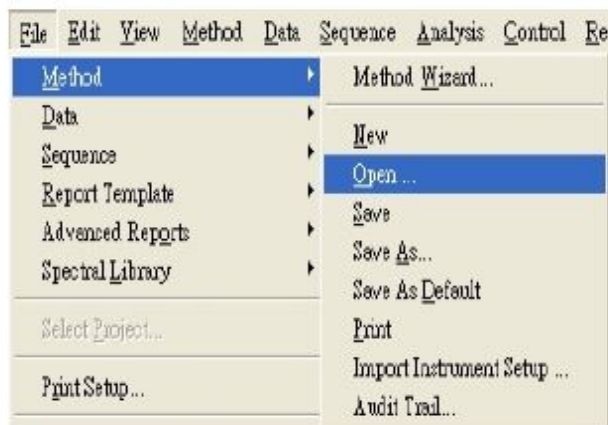
<圖 3>



<圖 4>

d. 設定好後請進入軟體上方的File→Method→Open，如<圖5>所示，先開啟等一下要操作的Method，開啟後可以按下軟體上方 Preview 鍵，此時儀器便會

開始平衡Column，並且可以從畫面中確認訊號是否平衡穩定。
如果穩定後，
請按下軟體上方Stop 鍵。



<圖 5>

e. 完成以上動作後即可以準備開始注射，請按下軟體上方的
Single Run 鍵會出現<圖6>畫面，請先設定以下參數：



<圖 6>

Sample ID：輸入樣品名稱

Method：請進入框框右邊的按鍵選擇您要分析樣品的條件。

Data path：選擇樣品分析完成後Data 要儲存的位置。

Data file：樣品分析完成後Data 要儲存的檔案名稱。(請注意不要有檔名重複的情況，不然會無法動作)

Number of reps：樣品注射要重複幾次。

f.按下Start儀器自動注入注入樣品。

本研究HPLC分析揮發性脂肪酸滯留時間與波峰強度關係結果如圖8所示， HPLC分析揮發性脂肪酸定性滯留時間如表5，HPLC分析揮發性脂肪酸定量校正線換算如表6所示。

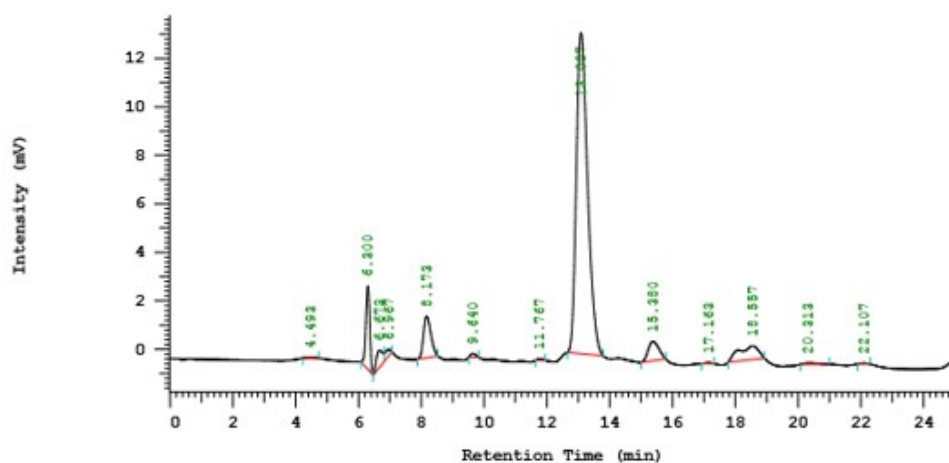


圖 8、本研究 HPLC 分析揮發性脂肪酸滯留時間與波峰強度關係

表 5、本研究 HPLC 分析揮發性脂肪酸定性滯留時間

Time	Name
6.300	葡萄糖
6.967	果糖
8.173	檸檬酸
9.640	丙酮酸
13.087	乳酸
15.380	乙酸
18.557	丙酸
20.313	乙醇
22.107	丁酸

表 6、本研究 HPLC 分析揮發性脂肪酸定量校正線表

Retention Time	VFAs	A	S	Y
		Area	Slope	實際濃度(g/ mL)
		積分面積	校正線斜率	換算 $Y = A * S$
8.173	檸檬酸	27359	4.46913E-09	0.000122271
13.087	乳酸	325086	7.98499E-09	0.00259581
15.380	乙酸	18583	9.87236E-09	0.000183458
18.557	丙酸	24522	5.8651E-09	0.000143824
20.313	乙醇	1626	8.14625E-09	1.32458E-05
22.107	丁酸	549	5.16475E-09	2.83545E-06

三、完成收集 PHA 分析技術文獻及評估

本研究已完成收集 PHA 分析技術評估，發現近期分析的方法主要有 3 種方法，如 FT-IR & NMR、GC-FID 以及誘導式螢光光度計分析法，以下說明：

(一) FT-IR & NMR

樣品前處理：將 5 克冷凍乾燥的污泥固體放入 250 ml 錐形屏中並加入 100 ml 氯仿，在 70°C 下放置 72 小時，過濾反應混合物中污泥固體，隨後使用 10 ml 體積的己烷沉澱剩餘的反應混合物。小心除去上層己烷部分，將殘留的沉澱部分空氣乾燥並稱重。[9][10]

檢測開始：使用 Varian 7000 FTIR 光譜儀 (Perkin-Elmer Inc., Wellesley, MA, USA)，在室溫 27°C 下通過傅里葉變換紅外光譜分析。

¹H NMR 和 ¹³C NMR。使用裝有 5mm Varian 探針 (ATB 和 SW) 的 Varian Mercury Plus NMR 光譜儀，使用溶劑氘代氯仿 (CDCl₃)，在 7.05T 下進行 NMR 光譜。¹H (300 MHz) 光譜以 45°脈衝持續時間，1.36 s 重複延遲和 16 次掃描完成。¹³C (75.46 MHz) 光譜以 45°脈衝持續時間，0.28 s 重複延遲和 300 次掃描完成。[10]

(二) GC-FID

樣品配置：污泥樣品用 0.6 毫升甲醛混合以抑制生物活性，並將樣品凍乾。共聚物聚 (3-羥基丁酸-共-3-羥基戊酸) 和多羥基-2-甲基戊酸 (PH2MV) 用於校正並且在分析期間作

為標準，與樣品相同的方式用 0.6 毫升甲醛混合凍乾處理。將凍乾的樣品稱重並轉移到帶有螺帽的玻璃管中。在所有管中加入苯甲酸作為內標準品避免操作條件變化所產生的誤差。

1.5 毫升丁醇和 0.5 毫升的鹽酸加入到各管中並在水浴 100 °C 下進行 8 小時。冷卻後，加入 2.5 mL 正己烷和 4 mL 超純水。將樣品玻璃管離心混合，將有機相轉移至 15 mL 乾淨管中。加入第二份 4 mL 超純水，並將管以 2500×g 離心 10 分鐘。提取有機相並轉移到 GC 測試樣品瓶中，通過在配備有 FID 檢測器和 HP-InnoWax 柱(30 m×0.53 mm×1 μm)的 Agilent Technologies (7820A) 氣相色譜儀中注入 1 μL 樣品進行分析，使用氦氣作為載氣，流速設定 54 mL min⁻¹，注射器的溫度為 220°C，檢測器的溫度為 275°C，將烘箱溫度設定為 70°C 維持 2 分鐘後，以 10°C/分鐘升溫至 160°C 後保持 2 分鐘，以定量 PHA 濃度。[11]

(三) 螢光光譜分析法

混合液生物質量的可偵測範圍光密度約為 600 nm(OB 600)，反應過程中之 PHA 含量可用螢光光譜法檢測，能快速並且定量化，是一種廣泛被接受的方法。測量方法如下：

從反應混合物中取出 3.8 mL 混合液，立即測量其 OD₆₀₀ 數值。之後加入 20 μL 尼羅紅 P 光染料，其濃度在 1 毫升丙酮中含有 1 毫克的尼羅紅螢光染料 (Sigma-Aldrich)，為了使螢光最大化，混合物反應因在 1-2 分鐘之間，可得到 DW(g/L) 濃度。

PHA 濃度螢光光譜分析法測試流程圖如圖 9 所示，由於

PHA-染料複合物的最大激發/發射峰值為 545/620 nm，用於光電倍增管電壓 650 V 的條件下測量，以螢光計(F97, LengGuang Technology, Shanghai) 設定激發/發射波長為 545/620 nm，由於染料本身在此波長範圍內沒有顯明顯峰值，故可比較以及偵測到 PHA 複合物正確的濃度。一開始立即測量測試是為了染料劑量足以與樣品中 PHA 結合得到正確的濃度。

乾重分析，校正 OD600 和螢光強度 545/620，是為了能在大量液體中生物質確定 PHA 的實際濃度。通過加熱 105°C 並離心的方式將污泥放置過夜來測量乾重 (DW)，並通過連續消化方法測定 PHA 含量。[12]

PHA 分析，將 50 mL 混合液離心，並將沉澱物與 10 mL 十二烷基硫酸鈉 (1%w/v, pH 10) 混合，並在 200 rpm, 37°C 下搖動直至完全分散。將混合物再次離心，依次用 20 mL 次氯酸鈉 (活性氯 > 6%) 和去離子水洗滌。並通過在 7000 g 離心 4 分鐘的條件下進行分離，將殘餘物在 105°C 下乾燥 24 小時。剩餘質量稱為 PHA 的量。PHA 的細胞百分比 (wt%) 為 PHA 含量除以生物量 DW，PHA 分析技術評估如表 7 所示。

1. 取3.8mL的混和液，馬上測量OD600數值

2. 之後加入20 μ L尼羅紅P光染料

3. 混合物反應因在1-2分鐘之間

4. 並在激發/發射峰值為545/620nm測量

5. 相互比較即可得到PHA 之濃度

圖 9、PHA 濃度螢光光譜分析法測試流程圖

表 7、PHA 分析技術評估

分析儀器	定性	定量	參考文獻
GC-FID	V	V	[13]
GC-MS	V	V	[10]
FTIR	V	X	[10]
NMR	V	X	[14]
螢光光度計	V	V	[15]

四、完成建立 PHA 分析技術

本實驗完成開發以 GC-FID (Gas Chromatography Detectors-flame ionization detector) 測量微生物聚合 PHA 塑膠之定性定量方法。

設備：型號-Thermo TRACE 1300 GC (圖 10), FID (flame ionization detector), Thermo Scientific™ AI/AS 1310, Chromeleon 7 Chromatography Data System (CDS)

管柱型號：Stabilwax-DA (Crossbond Carbowax polyethylene glycol) 30 meter, 0.32mmID, 0.25 μ m df, Max Prog Temp 260°C, Min Bleed at 250°C, Cat #11024, Series #1639245

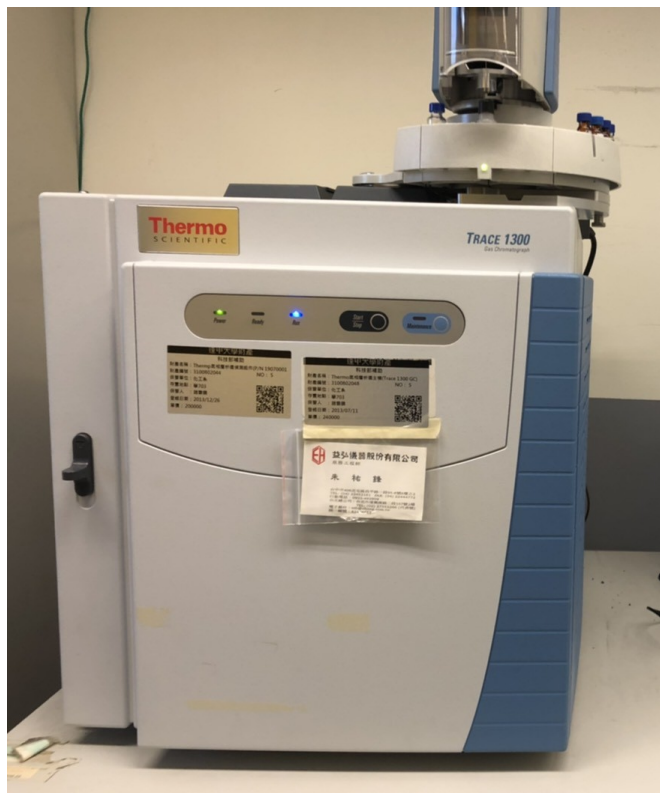


圖 10 Thermo TRACE 1300 GC

操作條件：管柱溫度 40°C，持續維持 10 分鐘後，以 10°C/min 加熱至 250°C，持續維持 10 分鐘。

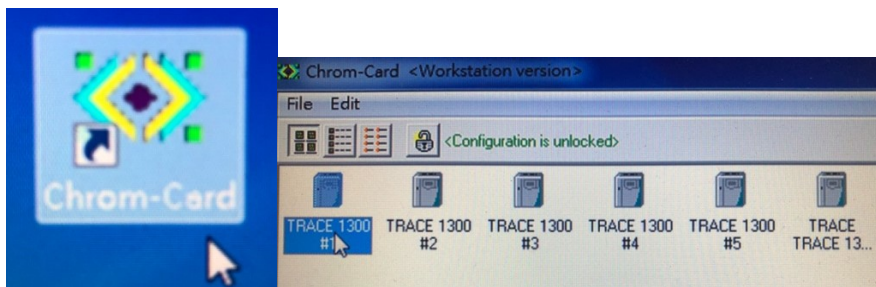
Max temperature: 260°C; Prep-run timeout: 10min;
Equilibration time: 0.50 min; Ready delay: 0.00 min

使用標準品及溶劑調配樣品，樣品和溶劑須過 0.22μ 濾膜，
打開空氣、氮氣、氫氣鋼瓶，打開電腦主機與氣相層析儀電。

軟體使用：

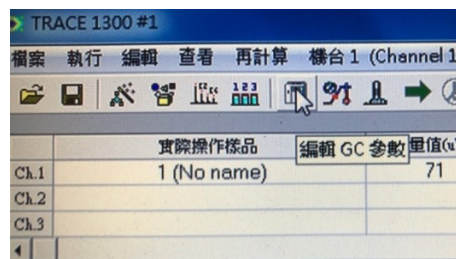
點選 Chrom-Card 後滑鼠雙擊儀器<圖 1>。

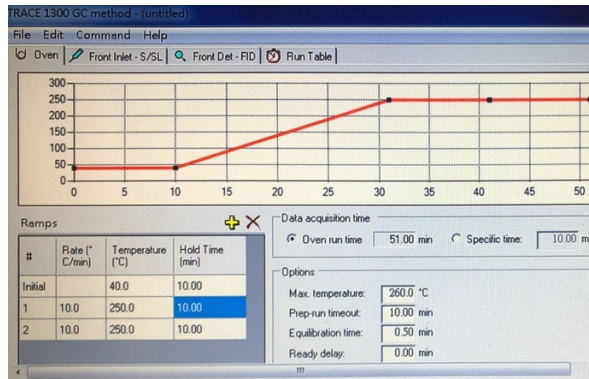
開啟後點選 TRACE 1300 GC #1 <圖 2>。



產生新的方法：編輯 GC 參數<圖 3> -> 設定管柱與升溫條件<圖 4>。

儲存方法：完成上一步驟後，將 Method 儲存並送出至 GC，
右上工具列 command->Send method to the GC，且完成 FID 點火程序。

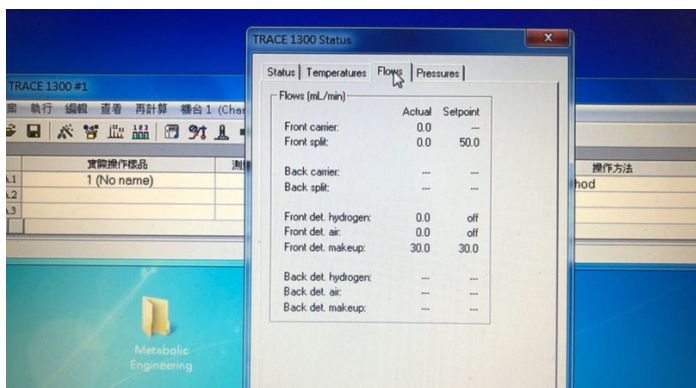




樣品表<圖 5>:分別設定ID->樣品名稱->檔案名稱->類型-->順序，設定完成後，點擊右下方確定按鈕。

ID	樣品名稱	檔案名稱	類型	S.A.	I.S.
1	Act.		Unk	1	1
2			Unk	1	1
3			Unk	1	1
4			Unk	1	1
5			Unk	1	1
6			Unk	1	1
7			Unk	1	1
8			Unk	1	1

完成樣品表設定->工具列->查看->GC 狀態<圖 6> ->等待 GC 準備完成->準備注射樣品。



<圖 6>

上述步驟都完成後，點擊開始分析樣品<圖 7>。



藥品：

1. 標準品 Poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid)natural origin, PHV content 8 mol%
2. 99.8%三氯甲烷
3. 99%甲醇
4. 95%硫酸

步驟方法：

1. 以三氯甲烷為溶劑，溶質為標準品 Poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid)natural origin, PHV content 8 mol%，以天秤量測，分別配出不同體積百分濃度之樣品。
2. 以 95%硫酸為溶質，99%的甲醇為溶劑，配出 10%的甲醇硫酸溶劑，加入第一步驟之樣品。
3. 再以 100°C 試管加熱器，四小時，催化 PHA 酯化成 3HB 及 3HV 過程，PHA 為 3HB+3HV。
4. 取出試管放置至室溫後，加水水洗。此時溶液出現分層，移除上層液-水相，取出下層液-油相溶液至質量筒量測體積。

5. 請準備針筒與 0.22 μ m 濾膜，將過濾後的液體蒐集至 GC 專用 Sample 瓶。以 GC-FID 檢測。
6. 用個別分離波峰(圖 13、表 8)的積分區域面積換算出個別之濃度(mg/L)。得到 3HB(圖 11)與 3HV(圖 12)之校正曲線方程式(表 9)。如下：

$$3\text{HB}: f(x)=0.0085x; R^2 = 0.9807$$

$$3\text{HV}: f(x)=0.0005x; R^2 = 0.8954$$

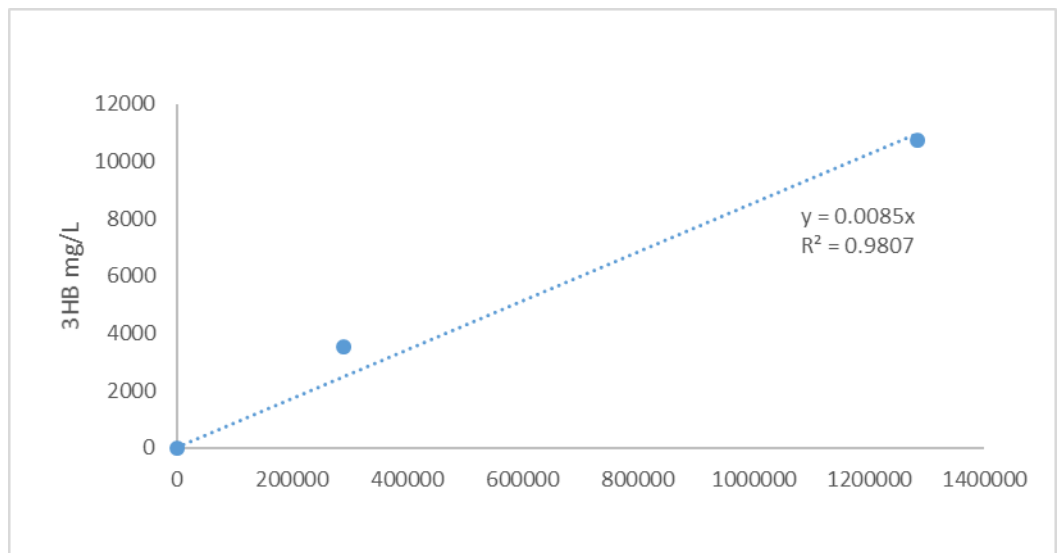


圖 11 3HB 減量線

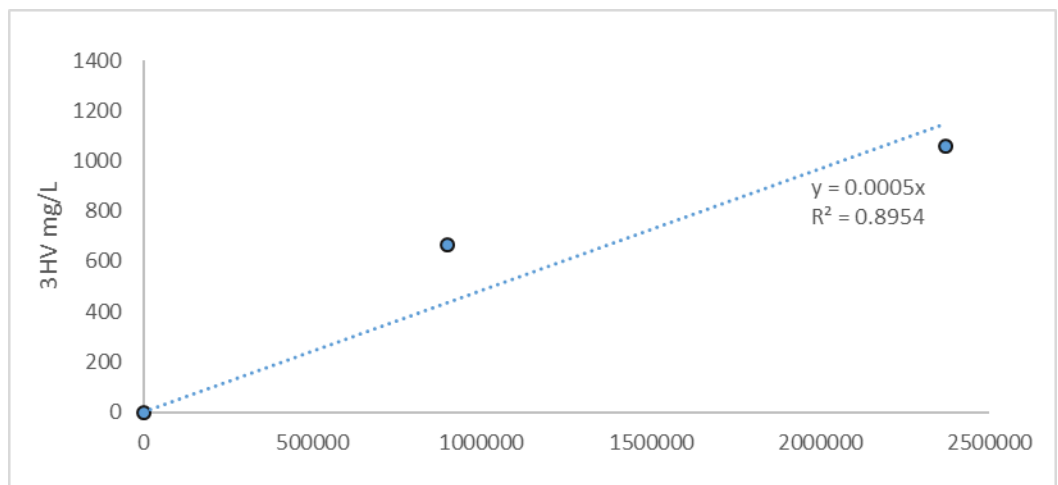


圖 12 3HV 減量線

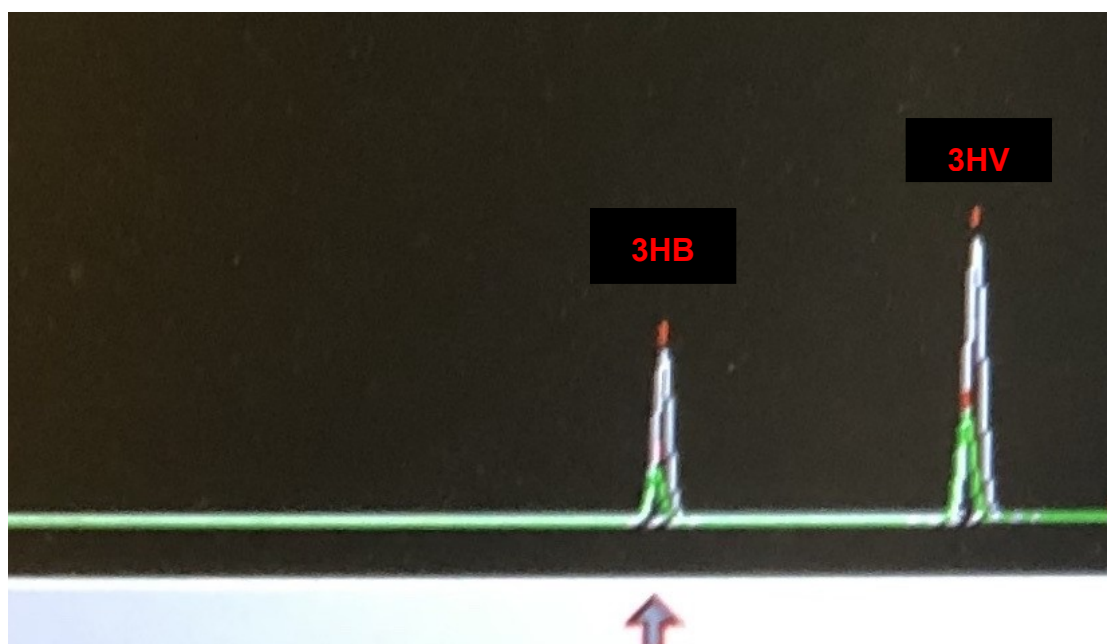


圖 13、GC-FID 分離波峰

表 8、本研究 GC 分析 PHAs 定性之滯留時間

Time	Name
9.4483-10.2400	3HB
12.6517-14.1533	3HV

表 9、本研究 GC 分析 PHAs 定量校正線表

Retention Time	PHAs	A Area 積分面積	S Slope 校正線斜率	Y 實際濃度(mg/ L) 換算 $Y = A \cdot S$
9.8067	3HB	1285166	0.0085	11800
13.3733	3HV	900700	0.0005	664.5

五、完成建立 SBR 饋料策略雛型評估，使其達成揮發性可溶性固體含 PHA 量為 15%~20%以上

本研究 SBR 饋料策略之 PHAs 生產實驗裝置圖如圖 14，照片如圖 15 所示。其反應體積為 400 mL，植種汙泥取自台南市牧場養豬廢水的耗氧池汙泥(MMC: Mixed Microbial Cultures)。實驗開始前將植種汙泥 MMC 沉澱，取出下層作為生產生物塑膠之菌種(體積為 200 mL)，並取前一階段食品產業廢汙水產製 VFAs 之母槽出流液或輔以蔗糖酸化產氫槽之出流液 200 mL 當成基質，馴化產 PHAs 的菌種。操作溫度設定為 35°C，用乳動幫浦從底部曝氣(每小時 27 L 空氣)，並使用攪拌磁石穩定攪拌。本研究於 2020 年 1 月 24 日啟動(第 1 天)，每日在操作 23 小時後，停止攪拌和曝氣，靜滯半小時後，移除上清液 200 mL，檢測上清液之溶氧 DO，在第 24 小時，加入新鮮的 VFAs 母槽出流液 200 mL 做為新的基質。以 24 小時為一單位，並重複操作，使反應器重複富含基質期與缺乏基質期數次，期間不取樣，直到系統達到穩定(期間約為 11 天，跨過農曆春節)。

第 12 天到第 17 天開始檢測上清液之化學需氧量 COD、總固體物 TS 以及揮發性可溶性固體 VSS 等。第 17 天後檢測下層生物質之生物塑膠含量(PHAs)，和揮發性可溶性固體含量(VSS)，實驗數據如圖 16 所示，由圖可以看出生物塑膠含量(PHAs)在食品產業廢汙水產製 VFAs 之母槽出流液輔以蔗糖酸化產氫槽之出流液可以有效的產出 PHAs，其揮發性可溶性固體含 PHA 量 PHAs/VSS 產率在 20 及 22 天達到 46.7%及 82.4%。

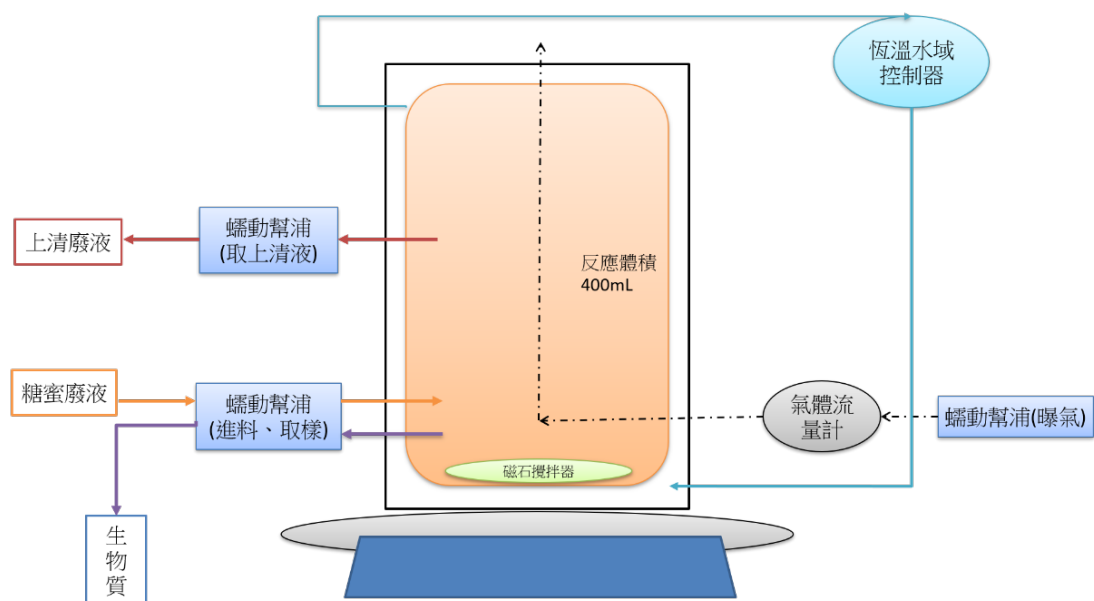


圖 14 生產 PHAs 之 SBR 饋料實驗裝置圖

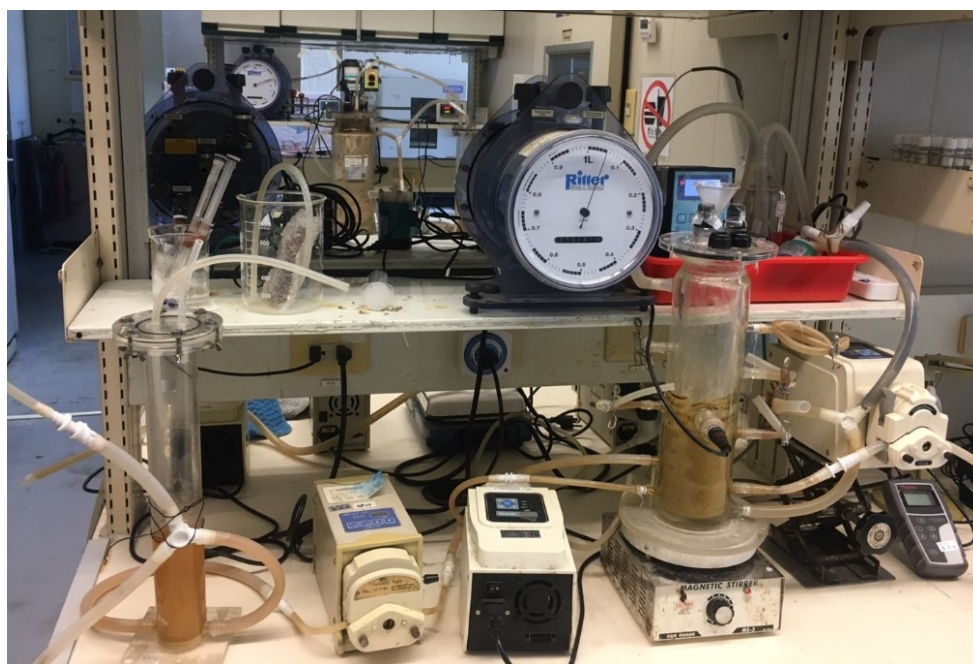


圖 15 生產 PHAs 之 SBR 饋料實驗裝置照片

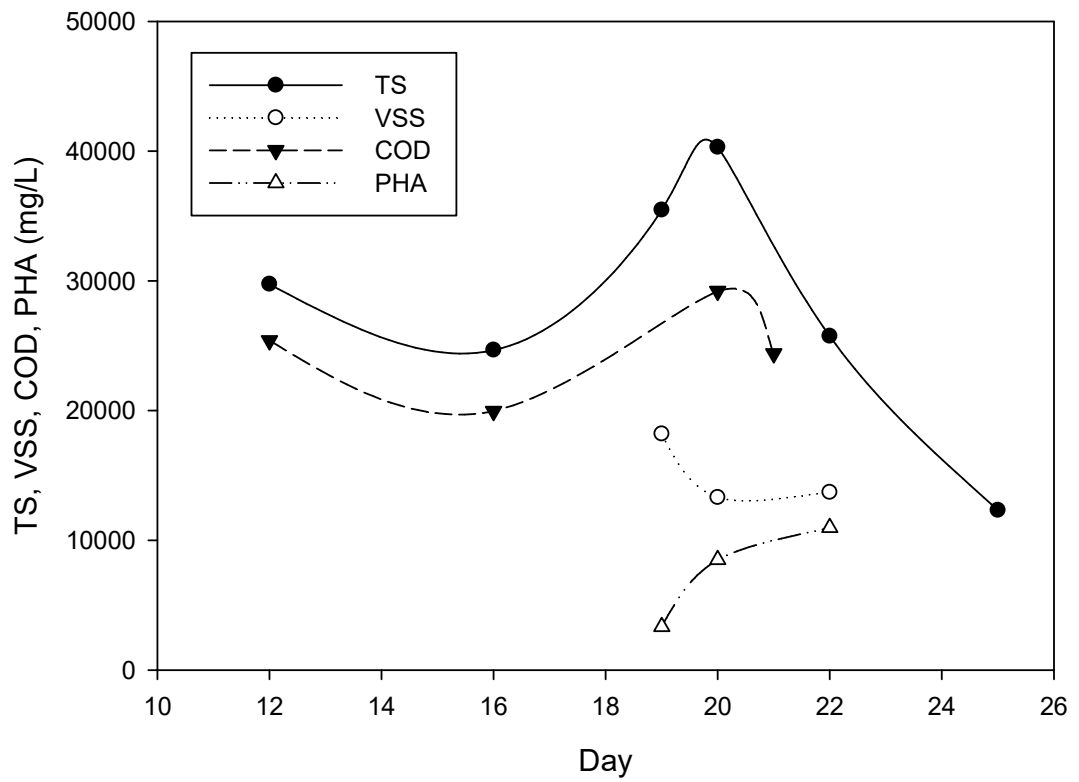


圖 16 以食品產業廢汙水產製 VFAs 之母槽出流液輔以蔗糖酸化產
氮槽之出流液產製生物塑膠 PHA

六、完成測試驗證，以達成揮發性可溶性固體 VSS 含 PHA 量為 30%~40%以上

為了完成以食品產業廢汙水產製 VFAs 之母槽出流液產製生物塑膠 PHA 測試驗證，以達成揮發性可溶性固體 VSS 含 PHA 量為 30%~40%以上。本研究在操作 26 天後開始以單一基質進料，也就是食品產業廢汙水產製 VFAs 之母槽出流液，其條件為 HRT 4 day、進料基質濃度 50 g COD /L、乙酸與丁酸產量相對於總 COD 進料(A+B) /COD_{in} 為 8.2，實驗數據如圖 17、表 10 所示，由圖可以看出生物塑膠含量(PHAs)在食品產業廢汙水產製 VFAs 之母槽出流液可以有效的產出 PHAs，其揮發性可溶性固體含 PHA 量 PHAs/VSS 產率在 29、31 及 32 天達到 59.3、55.8 及 30.5%。

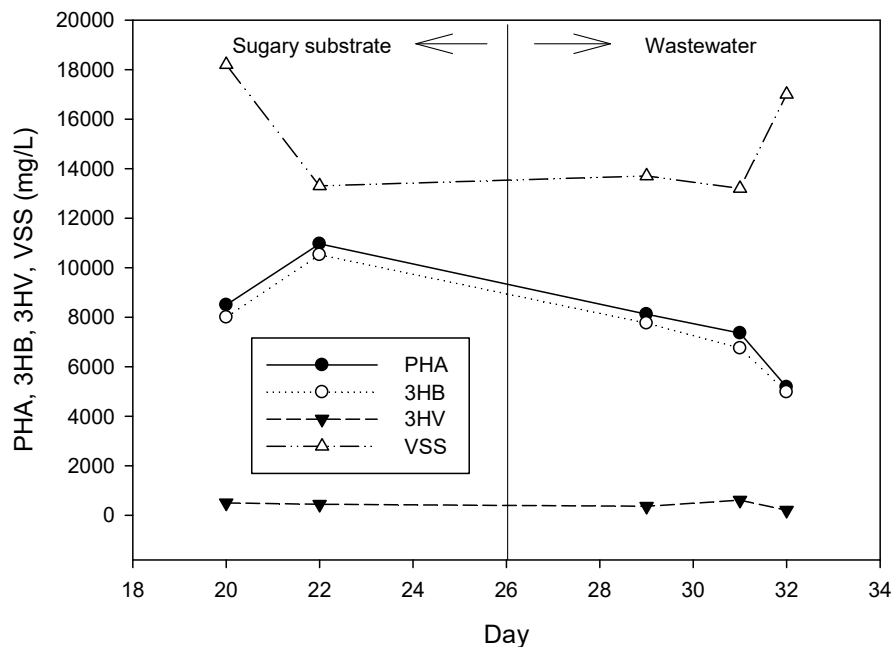


圖 17 以食品產業廢汙水產製 VFAs 之母槽出流液產製生物塑膠 PHA

表 10、以食品產業廢汙水產製 VFAs 之母槽出流液產製生物塑
膠 PHA 產出效益評估表

Day	DO(mg/L)	TS(mg/L)	VS(mg/L)	VSS(mg/L)	COD(mg/L)	PHA(mg/L)	PHA/VSS(%)
12	0.31	29740	19150		25400		
16	0.34	24660	14650		19950		
19	0.31	35460	28400		3332		
20	0.33	40300	25860	18200	29200	8497	46.7
22	0.31	25740	16740	13300		10966	82.5
29	0.34			13700	12000	8122	59.3
31	0.33			13200		7359	55.8
32	0.31			17000	17300	5181	30.5

肆、參考文獻

- [1] K.Hagos, J.Zong, D.Li, C.Liu, andX.Lu, “Anaerobic co-digestion process for biogas production: Progress, challenges and perspectives,” *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 76, pp. 1485–1496, Sep.2017.
- [2] P.Thanwised, W.Wirojanagud, andA.Reungsang, “Effect of hydraulic retention time on hydrogen production and chemical oxygen demand removal from tapioca wastewater using anaerobic mixed cultures in anaerobic baffled reactor (ABR),” *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 37, no. 20, pp. 15503–15510, Oct.2012.
- [3] S.-Y.Wu, C.-Y.Chu, andW.-Z.Yeh, “Aspect ratio effect of bioreactor on fermentative hydrogen production with immobilized sludge,” *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 38, no. 14, 2013.
- [4] R.Kothari, D. P.Singh, V. V.Tyagi, andS. K.Tyagi, “Fermentative hydrogen production – An alternative clean energy source,” *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 16, no. 4, pp. 2337–2346, May2012.
- [5] K.-S.Lee, Y.-S.Lo, Y.-C.Lo, P.-J.Lin, andJ.-S.Chang, “Operation strategies for biohydrogen production with a high-rate anaerobic granular sludge bed bioreactor,” *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 35, no. 6–7, pp. 605–612, Dec.2004.

- [6] K.-W.Jung, D.-H.Kim, S.-H.Kim, and H.-S.Shin, "Bioreactor design for continuous dark fermentative hydrogen production," *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 18, pp. 8612–8620, Sep.2011.
- [7] K.-S.Lee, P.-J.Lin, and J.-S.Chang, "Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers," *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 31, no. 4, pp. 465–472, Mar.2006.
- [8] P.Guerra-Blanco, O.Cortes, T.Poznyak, I.Chairez, and E. I.García-Peña, "Polyhydroxyalkanoates (PHA) production by photoheterotrophic microbial consortia: Effect of culture conditions over microbial population and biopolymer yield and composition," *Eur. Polym. J.*, vol. 98, pp. 94–104, Jan.2018.
- [9] M.Kumar, A.Gupta, and I. S.Thakur, "Carbon dioxide sequestration by chemolithotrophic oleaginous bacteria for production and optimization of polyhydroxyalkanoate," *Bioresour. Technol.*, 2016.
- [10] M.Kumar, P.Ghosh, K.Khosla, and I. S.Thakur, "Recovery of polyhydroxyalkanoates from municipal secondary wastewater sludge," *Bioresour. Technol.*, vol. 255, pp. 111–115, May2018.
- [11] G.Mannina, D.Presti, G.Montiel-Jarillo, and M. E.Suárez-Ojeda, "Bioplastic recovery from wastewater: A new protocol for

- polyhydroxyalkanoates (PHA) extraction from mixed microbial cultures,” *Bioresour. Technol.*, vol. 282, pp. 361–369, Jun.2019.
- [12] L.Qin, Y.Liu, andJ.-H.Tay, “Denitrification on poly- β -hydroxybutyrate in microbial granular sludge sequencing batch reactor,” *Water Res.*, vol. 39, no. 8, pp. 1503–1510, Apr.2005.
- [13] S.Wijeyekoon, C. R.Carere, M.West, S.Nath, andD.Gapes, “Mixed culture polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis from nutrient rich wet oxidation liquors,” *Water Res.*, vol. 140, pp. 1–11, Sep.2018.
- [14] A.Burniol-Figols, C.Varrone, S. B.Le, A. E.Daugaard, I.V.Skiadas, andH. N.Gavala, “Combined polyhydroxyalkanoates (PHA) and 1,3-propanediol production from crude glycerol: Selective conversion of volatile fatty acids into PHA by mixed microbial consortia,” *Water Res.*, vol. 136, pp. 180–191, Jun.2018.
- [15] Y.Zhang, A.Wusiman, X.Liu, C.Wan, D.-J.Lee, andJ.Tay, “Polyhydroxyalkanoates (PHA) production from phenol in an acclimated consortium: Batch study and impacts of operational conditions,” *J. Biotechnol.*, vol. 267, pp. 36–44, Feb.2018.