

การผลิตชีวภัณฑ์จากเซลล์โกลด์โดยไข่เชื้อคู้



นายพิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ลหุสาขาวิชาวิทยาศาสตรสิ่งแวดล้อม

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย


พ.ศ. 2527

ISBN 974-563-547-2

009840

I16686305

BIOGAS PRODUCTION FROM CELLULOSE BY CO-CULTURE



Mr, Pipat Sribenjalux

ศูนย์วิทยทรัพยากร

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Interdepartment of Environmental Science

Graduate School

Chulalongkorn University

1984

Thesis Title Biogas Production From Cellulose by Co-culture
By Mr.Pipat Sribenjalux
Interdepartment Environmental Science
Thesis Advisor Assistant Professor Pin-Chawee Vejjanukroh, Ph.D.



Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in
Partial Fulfillment of Requirements for the Master's Degree

S. Bunnag

.....Dean of Graduate School
(Associate Professor Supradit Bunnag, Ph.D.)

Thesis Committee

Pairath Saichuae

.....Chairman
(Associate Professor Pairath Saichuae)

Pin-Chawee Vejjanukroh

.....Member
(Assistant Professor Pin-Chawee Vejjanukroh, Ph.D.)

S. Sujattanonta

.....Member
(Assistant Professor Suthirak Sujarittanonta, Ph.D.)

Chaufah Thongthai

.....Member
(Assistant Professor Chaufah Thongthai, Ph.D.)

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตชีวก๊าซจากเซลลูโลสโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์
ชื่อ	นายพิพัฒน์ ศรีเบญจลักษณ์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิ่น-ฉวี เวชยานุเคราะห์
สหสาขา	วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
ปีการศึกษา	2526

บทคัดย่อ



แบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลลูโลสจำนวน 3 สายพันธุ์ซึ่งคัดเลือกมาจาก 113 สายพันธุ์ ได้นำมาใช้ในการทดลอง โดยให้ชื่อว่า สายพันธุ์ CU1, CU3 และ CU4 พบว่า ทั้งสามสายพันธุ์เมื่อย่อยเซลลูโลสแล้วจะได้ อะซิเตท ชัคซีเนท ก๊าซไฮโดรเจน และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แบคทีเรียที่สร้างก๊าซมีเทนจำนวน 5 สายพันธุ์ ซึ่งคัดเลือกมาจาก 51 สายพันธุ์ ได้นำมาใช้ในการทดลอง โดยให้ชื่อว่า สายพันธุ์ Sc1, Sc2, Sc3, Sc4 และ Sc5 พบว่า ทั้งห้าสายพันธุ์สามารถย่อยก๊าซไฮโดรเจนและบางทีอะซิเตทเป็นสารเริ่มต้นในการผลิตก๊าซมีเทน จำนวนโมโครโมลของสารที่เกิดจากการย่อยสลายเซลลูโลสบริสุทธิ์ต่อหนึ่งกรัมของเซลลูโลสในโมโน-คอลเจอร์มีดังต่อไปนี้คือ อะซิเตท 541-547 ชัคซีเนท 53-83 ไฮโดรเจน 5750-7625 และคาร์บอนไดออกไซด์ 1750-220 ส่วนการย่อยสลายเซลลูโลสโดยโค-คอลเจอร์พบว่า อะซิเตทเป็นกรดที่เกิดได้มากที่สุด (87%) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ก็จะมีปริมาณลดลง (455-1650) สำหรับก๊าซไฮโดรเจนนั้นตรวจไม่พบ ส่วนก๊าซมีเทนจะค่อยเกิดขึ้น 1350-2850 การย่อยสลายเซลลูโลสในขยะเซลลูโลส 5 ชนิด คือ เปลือกกล้วย กระจ่าง ฟางข้าว หญ้าแพรก และผักตบชวา สายพันธุ์ CU1 และ Sc4 ถูกนำมาใช้ในการทดลอง ผลการทดลองพบว่า จำนวนโมโครโมลของสารที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายเซลลูโลสในขยะเซลลูโลสมีดังต่อไปนี้ คือ อะซิเตท 116-892 ก๊าซไฮโดรเจน 0-6125 และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 0-110 ส่วนในการย่อยสลายเซลลูโลส โดยโค-คอลเจอร์นั้น พบว่า อะซิเตทเป็นกรดที่เกิดได้มากที่สุด 249-757 (100%) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะลดลง 60-1050 และเช่นเดิมคือ ก๊าซไฮโดรเจนจะตรวจไม่พบ ปริมาณก๊าซมีเทนจะค่อย ๆ


เกิดขึ้น 60-2120 นอกจากนี้ยังพบอีกว่าจำนวนสุดท้ายของสารที่เกิดขึ้น และเซลล์โลลล์ที่ถูกย่อยสลายจะแตกต่างกันในระหว่างชนิดของยยะเซลล์โลลล์ที่ใช้ และยังแตกต่างกันในระหว่างสภาพของยยะเซลล์โลลล์ (ในสภาพปกติ หรือถูกปรับด้วยต่าง) ในจำนวนยยะเซลล์โลลล์ทั้ง 5 ชนิด ผลการทดลองพบว่า ยยะกระตางน่าจะเป็นวัตถุที่ดีที่สุดสำหรับใช้ในการผลิตชีวก๊าซโดยโค-คัลเจอร์ ซึ่งประกอบด้วยแบคทีเรียที่คัดเลือกทั้งสองชนิด คือ CU1 + Sc4



ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Thesis Title . Biogas Production from Cellulose by Co-culture
Name Mr.Pipat Sribenjalux
Thesis Advisor Assistant Professor Pin Chawee Vejjanukron, Ph.D.
Interdepartment Environmental Science
Academic Year 1983

ABSTRACT



Three from 113 strains of the cellulolytic bacteria were selected and named CU1, CU3 and CU4. Acetate, succinate, H₂ and CO₂ were the fermentation products of cellulose. Five from 51 strains of the methanogens were selected and named Sc1, Sc2, Sc3, Sc4 and Sc5. H₂ and may be acetate were utilized for CH₄ production. The fermentation of cellulose by the selected cellulolytic bacteria in the absence and presence of the selected methanogens is described. In the mono-culture, micromoles of products per gram of cellulose fermented were : acetate, 541-547; succinate, 53-83; H₂, 5750-7625; and CO₂, 1760-2220. In the co-culture of cellulose fermentation, acetate was the major acid production (87%), carbon dioxide decreased (455-1650), and hydrogen did not accumulate. Substantial amounts of methane were produced in the co-cultures (1350-2450). The cellulolytic bacteria strain CU1, and the methanogen strain Sc4 were used in the co-culture systems of the fermentation of five kinds of individual substrates (cellulosic wastes), such as pineapple peel, waste paper, straw, bermuda grass and water hyacinth. In all mono-culture systems,

micromoles of product per gram of substrates fermented were:

acetate. 116-892 (100 %); H_2 , 0-6125; and CO_2 , 0-1100.

In the co-cultures acetate was also the major product (249-757), carbon dioxide decreased (60-1050) and hydrogen could not be detected. Substantial amount of methane were produced in the co-culture (60-2120). The total amounts of fermentation products and degree of cellulose degradation were varied in different kinds of the tested substrate and also in different conditions, i.e., actual and alkali-treated. From five tested substrates, waste paper, the highest cellulose content, was the best substrate for biogas production by the co-culture of the selected strains.

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT



The author wishes to express his utmost appreciation and sincere gratitude to his thesis advisors. Dr. Pin-Chawee Vejjanukroh for her valuable suggestion, assistance and time spent discussing various aspects in the field, and encouragement during the thesis work.

It is a pleasure to acknowledge the Department of General Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, for offering laboratory facilities in this Research

I would like to express my appreciation to Mr. Pairath Saichuae, Dr. Chaufah Thongthai, Dr. Suthirak Sujarittanonta, the members of thesis committee, for their advices.

I am thanks to gas Chromatography Unit of Central of scientific Instrument and echnology, Chulalongkorn University, for her generous help.

Very special thanks are due to the following persons ; Dr. Jariya Suchareekul; Mr. Nimit Bumrungjit for their valuable suggestion and encouragement.

Promotions from Kunying Rabiab Kunakasem, Mrs. Kruewal Somana, Bechthai Bangkok Equipment and Chemical Co., Ltd., National Energy Authority, Mr. Sumeth Techapaiboon and Alcoholic Products Dealer Association are cordially grateful and also for financial assistance

to partly undertake the research work, the author is indebted to Graduate School, Chulalongkorn University.

As a last opportunity, I would like to express the wholeheartedly thanks and appreciation to my father and mother for their moral support and encouragement.



ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTENTS



Page

THAI ABSTRACT.....	d
ENGLISH ABSTRACT.....	f
ACKNOWLEDGEMENT.....	h
CONTENT.....	j
LIST OF TABLES.....	n
LIST OF FIGURES.....	p
ABBREVIATIONS.....	r
CHAPTER	
1 INTRODUCTION.....	1
2 BACKGROUND.....	3
2.1 Anaerobic Fermentation and Biogas	
Production.....	3
2.2 Biogas Digestion.....	3
2.2.1 Microbes in Biogas Digester.....	3
2.2.2 Environmental Factors.....	4
2.2.3 Hydrogen Gas as a Key Regulatory Role	4
2.3 Cellulosic Wastes as Resources.....	6
2.3.1 Nature and Availability of Cellulose	6
2.3.2 Enzymatic Hydrolysis of Cellulose	7
2.3.3 Biological Utilization of Cellulosic	
Waste.....	8
2.4 Anaerobic Cellulolytic Bacteria.....	9
2.4.1 Rumen : A Novel Habitat.....	9
2.4.2 Culture Media.....	12

CONTENTS



CHAPTER	Page
2.4,3 Isolation Technique.....	13
2.4.4 Known Anaerobic Cellulolytic Bacteria	14
2.5 Methanogenesis.....	14
2.5.1 Definition.....	18
2.5.2 Substrates.....	18
2.5.3 Metabolic Pathways.....	19
2.6 Methanogenic Bacteria.....	20
2.6.1 History and Characteristics	21
2.6.2 New Trend of Taxonomic Schemes.....	21
2.6.3 Culture Media.....	23
2.6.4 Isolation Technique.....	26
2.7 Biogas Production from Pure Culture	26
3 Materials and Methods.....	31
3.1 Source of Microorganisms.....	31
3.1.1 Source of Cellulolytic Bacteria.....	31
3.1.2 Source of Methanogens.....	31
3.2 Raw Materials and Sources.....	32
3.3 Media.....	33
3.3.1 Media for General Bacteria.....	33
3.3.2 Media for Cellulolytic Bacteria.....	34
3.3.3 Media for Methanogenic Bacteria.....	34
3.3.4 Media for Multiple strains or Mixed Cultures.....	34

CONTENTS

CHAPTER		Page
3	3.4 Samples and Cultivation Procedures.....	34
	3.4.1 Procedures for General Bacteria....	36
	3.4.2 Procedures for cellulolytic Bacteria	36
	3.4.3 Procedures for Methanogens.....	37
	3.4.4 Procedures for Mixed Culture.....	38
	3.5 Fermentation of Cellulose by Co-culture and Mixed culture	38
	3.6 Fermentation of Some Cellulosic Wastes by Co- culture and Mixed culture	40
	3.6.1 Actual Wastes as Substrates	40
	3.6.2 Pretreated Wastes as Substrates	41
	3.7 Chemical Analysis Procedure.....	41
	3.7.1 Analysis of Gaseous Products	41
	3.7.2 Analysis of Acid Products	42
	3.7.3 Determination of Cellulose content...	43
4	Results	49
	4.1 Some Bacterial Organisms in Digestion Tank	49
	4.2 Isolation and Selection of Pure Culture,....	49
	4.2.1 Cellulolytic Bacteria	49
	4.2.2 Methanogens.....	56
	4.3 Fermentation of Cellulose by Co-culture,....	67
	4.4 Fermentation of Cellulosic Wastes by Co-culture	70

CONTENTS

CHAPTER	Page
5 Discussion and Conclusion.....	82
REFERENCES	89
APPENDICES	109
Appendix A--Structure of Co M and F ₄₂₀	110
Appendix B--Media	111
Appendix C--Condition of Chromatopac, Standard curve and Calculation Method	121
Appendix D--Preparation of Carrier Plates, Solvents and Sprey Reagents.....	124
Appendix E--Preparation of Reagents, Standard Curve and Calculation Method of Cellulose Determination	127
Appendix F--Fermentation of Cellulose by Co-culture	129
BIOGRAPHY	142

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
2.1	Known anaerobic cellulolytic bacteria	15
2.2	Examples of some co-cultures in the production of ethanol and some fatty acids	29
2.3	Examples of some co-cultures and tri-cultures in the production of biogas	30
3.1	List of the co-cultures	39
3.2	The relative distance move of the acids	46
4.1	Acid production activity of three selected strains of cellulolytic bacteria.....	54
4.2	H ₂ , CO ₂ Production from cellulose fermentation of three selected strain of cellulolytic bacteria	57
4.3	H ₂ , CO ₂ utilizing capacity of the tested methanogen Sc1-Sc5.....	65
4.4	H ₂ , CO ₂ utilizing capacity of the tested methanogen Sc1-Sc5.....	66
4.5	Remained cellulose in the fermentation of cellulose (20mg) by mono-cultures of cellulolytic bacteria CU1, CU3 and CU4 and by co-culture with methanogens Sc1, Sc2, Sc3, Sc4 and Sc5.....	68
4.6	Acid production in the fermentation of cellulose (20mg) by mono-cultures of cellulolytic bacteria CU1, CU3 and CU4 and by co-culture with Sc1, Sc2, Sc3, Sc4 and Sc5	69

LIST OF TABLES

Table		Page
4.7	Gas Production from the fermentation of cellulose (20 mg) by the selected strain of cellulolytic bacteria, CU1 alone and individually plus methanogen strain Sc1, Sc2, Sc3, Sc4 and Sc5 for 20-day incubation	71
4.8	Gas production from fermentation of 20 mg α -cellulose fiber.....	72
4.9	Gas production from fermentation of 20 mg α -cellulose fiber.....	73
4.10	Cellulose fermentation product by six co-culture	74
4.11	Cellulosic wastes fermentation by CU1, CU1+Sc4 and mixed culture.....	75
4.12	Degree of cellulose degradation in cellulosic waste by CU1 and CU1+Sc4.....	77
4.13	Acid production in cellulosic wastes fermentation	78
4.14	Gas product on from fermentation of cellulosic wastes.....	79
4.15	Gas production in the fermentation of cellulosic wastes by the cellulolytic bacteria CU1+methanogen Sc4	80
5.1	The amount of methane production compared with the former investigation.....	87

LIST OF FIGURES

Figure		Page
2.1	Schematic representation of the major lines of prokaryotic descent, show Archaeobacteria	24
2.2	New taxonomy treatment for methanogenic bacteria based on 16S RNA comparative cataloging.....	25
3.1	Collecting device	35
3.2	Anaerobic cylinder.....	35
3.3	Continous thin layer chromatography technique	44
3.4	Twelve hours continuous thin layer chromatography plate sprayed with indicators	44
3.5	Separation of bacterial fermentation acids by continuous thin layer chromatography.....	45
4.1	Colonial characteristic of cellulolytic bacteria CU1	50
4.2	Morphological characteristic of cellulolytic bacteria CU 1	50
4.3	Colonial characteristic of cellulolytic bacteria CU 3	52
4.4	Morphological characteristic of cellulolytic bacteria CU3	52
4.5	Colonial characteristic of cellulolytic bacteria CU4	52

LIST OF FIGURES

Figure		Page
4.6	Morphological characteristic of cellulolytic bacteria CU4	53
4.7	Remained cellulose contents and pH reduction in cellulose fermentation by 3 selected strains of cellulolytic bacteria CU1, CU3 and CU4	55
4.8	Gaseous products of cellulose fermentation by 3 selected strains of cellulolytic bacteria CU1, CU3 and CU4	58
4.9	Colonial characteristic of methanogen Sc1.....	59
4.10	Morphological characteristic of methanogen Sc1	59
4.11	Colonial characteristic of methanogen Sc2.....	61
4.12	Morphological characteristic of methanogen Sc2	61
4.13	Colonial characteristic of methanogen Sc3	62
4.14	Morphological characteristic of methanogen Sc3	62
4.15	Colonial characteristic of methanogen Sc4	63
4.16	Morphological characteristic of methanogen Sc4	63
4.17	Colonial characteristic of methanogen Sc5.....	64
4.18	Morphological characteristic of methanogen Sc5	64
4.19-4.30	Fermentation products of cellulose by co-culture (See Appendix F.).....	129-141
5.1	Scheme showing the fermentation of cellulose waste by cellulolytic bacteria CU1 and methanogen Sc1	85

ABBREVIATION

CO ₂	=	Carbon Dioxide
H ₂	=	Hydrogen
CH ₂ ^{CH₄}	=	Methane
O ₂	=	Oxygen
NaOH	=	Sodium Hydroxide
DNA	=	Deoxyribonucleic Acid
G + C	=	Guanine + Cytosine
RNA	=	Ribonucleic Acid
16S rRNA	=	Sixteen Svedberg Units Ribosomal RNA
tRNA	=	Transfer RNA
EMB	=	Bacto Eosin Methylene Blue Agar
NA	=	Bacto Nutrient Agar
SS	=	Bacto Salmonella-Shigella Agar
TSI	=	Bacto Triple Sugar Iron Agar
MSA	=	Bacto Mannitol Salt Agar
RFCA	=	Rumen Fluid Cellulose Agar
RFCB	=	Rumen Fluid Cellulose Broth
CB	=	Cellulose Broth
BMA	=	Balch's Medium Agar
BMB	=	Balch's Medium Broth
VSLA	=	VSL Agar
VSLB	=	VSL Broth
°C	=	Degree Celcius

Kg	=	Kilogram
g	=	Gram
mg	=	Milligram
ml	=	Milliliter
UV	=	Ultraviolet ray
lb	=	Pound
μ l	=	Microliter
$^{\circ}$ k	=	Degree Kelvin
m	=	Metre
Temp	=	Temperature
mA	=	Milliampere
min	=	Minute
cm	=	Centrimetre
mm	=	Millimetre
G	=	Gravity
W	=	Weight
V	=	Volume
m μ	=	Milimicron
μ mol	=	Micromole
m mol	=	Millimole

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

KEYWORDS

Biogas	=	Gas production from anaerobic fermentation
Cellulolytic bacteria	=	Bacteria which can utilized cellulose as a sole carbon source
Methanogen	=	Bacteria which can produce gas methane
Mono-culture	=	Fermentation by one kind of bacteria
Co-culture	=	Fermentation by one cellulolytic bacteria plus one methanogen
Tri-culture	=	Fermentation by three kind of organisms



ศูนย์วิจัยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย