

# 闊葉樹紙漿生質酒精的製備 —高基質濃度酵素水解及高濃度水解物的發酵—

蘇裕昌\*、呂紹華\*\*

## Production of Bioethanol from Hard Wood Pulps Enzymatic Hydrolysis with High Consistency Substrates and Fermentation with High Concentration Hydrolyzates

Yu-Chang Su\* Shao-Hua Lu\*\*

### Summary

This paper demonstrated using peg mixer which is commonly used in the pulp bleaching process, and successfully conduct cellulose hydrolysis at high substrate consistency. Enzymatic hydrolysis with 20% substrate consistency of unbleached pulp of hardwood (UBHW) and an organic solvent pretreatment of aspen (OPP) obtained hydrolyzate with high glucose concentration, wherein the enzyme hydrolysis of OPP for 48 hours hydro late glucose of 158 g/L concentration, which is the highest ever obtained from enzyme hydrolysis of lignocellulosic materials. Furthermore, fermentation of OPP & UBHW enzymatic hydrolysate with high sugar content were conducted for bio-ethanol production, concentration reached to 60 g/L or more, and this concentration is far are the highest ever had than previously documented.

Adapting the pulping equipment were typically designed for using treatment for high-medium concentration of fibrous material. This paper applied to the high concentration of hydrolysis can be a practical way to overcome difficulty during lab. Results provided a new way to carry out lignocellulose hydrolysis and fermentation at high concentrations. This resulted in biomass conversion research a step forward in industrialization, and a path to explore and interact with the enzyme substrate reaction efficiency.

**Key words:** Enzymatic hydrolysis, high consistency. Substrate hydrolysis, high concentration hydrolyzates fermentation, Bio-ethanol production, Peg-Mixer

### 一、緒言

對可再生的木質纖維原料如木材及農業殘留物等進行生物轉換成液態燃料，有助於降低溫室氣體的排放和減輕化石燃料短缺的壓力 (Wyman and Hinman, 1990; Galbe and Zacchi, 2002)。典型的木質纖維素轉換成乙醇的過程，以生物程序為基礎者分成四個主要步驟：(1). 以前處理後去除部分或完全的木質素及半纖維素。(2). 經酵素水解將多醣轉變為單醣。(3). 將糖發酵成乙醇。(4). 回收並進行蒸餾精緻乙醇。儘管現今科學知識及製造技術對生物轉化過程的商業化有許多的進展，但生質物對生質燃料之轉化過程經濟上可行性仍有待進一步發展 (Sun and Cheng, 2002); (Van Wyk, 2001)。雖然製程中大部分的步驟仍有改進的空間，但酵素水解已經被認為是木材轉換乙醇過程中需要突破的瓶頸步驟。

傳統木質纖維素的酵素水解通常在固形分 5% 以下的濃度進行，其結果為水解後糖的濃度低於 5%，隨後發酵後的乙醇濃度更低於 2% (w/w)。相較之下，以澱粉為主的基質(如玉米)通常含有絕乾重 20% 以上的基質，最終酵素水解和發酵後的乙醇濃度可超過 10% (w/w)。由上述的原因可能為題高加木質纖維素水解過程的基質，導致後續糖和乙醇產量提高。這種方法將會帶來生物轉化製程更具經濟效益，例如減少水解和發酵時的成本及營運開銷，甚至減少後續蒸餾、蒸餾及其他下游製程的能源消耗。根據先前經濟技術的評估，建議如提昇到 5-8% (w/w) 的基質濃度，可以降低將近 20% 的總生產成本 (Stenberg et al., 2000; Wingren et al., 2003)。若進一步增加基質濃度，將會更有效地節省成本。然而，當時的研究無論是將水解和發酵分開進行 (Separate hydrolysis and fermentation, SHF) 還是同時糖化發酵

(Simultaneous saccharification and fermentation, SSF)，均無法在 10% 以上的基質濃度條剪下進行有效水解。這類研究確認了一些高濃度水解的障礙如：(1). 高濃度的纖維材料降低了物質傳遞速度。(2). 高濃度的基質會同時產生高濃度的抑制物質。(3). 高濃度的糖份會導致對最終產物的生成具嚴重的抑制作用。

不同於以澱粉為主的原料，以木質纖維素為主的基質是屬於高聚合度 (DP) 的纖維材料，在水中懸浮時，纖維會互相交織成纖維絮狀物、或者產生更大規模的網狀結構，而導致基質本身的黏度大大增加。而當物質在基質上傳遞時遇到顯著阻礙會產生所謂流變性 (Rheological) 的問題，由於自由水的存在有限，因此需要花費更長的時間去液化或懸浮基質以進行有效的水解。此問題在製漿造紙的領域中早已被發現，此流變性的問題令人聯想到製漿領域中纖維懸浮液的打漿，及處理高濃度基質時，也更常出現在木漿漂白製程。工業漂白設備的設計可以用來處理各種濃度的紙漿，通常最大可達到 35%，因此中、高濃度的攪拌設備可以有效的打破濃度 20% 以上的紙漿懸浮液中之纖維絮凝及網狀結構。在本研究中，探討使用高濃度的攪拌設備的釘柱攪拌機 (Peg mixer) 進行兩種材料進行研究如(1).未漂白闊葉樹紙漿 (Unbleached hardwood pulp, UBHW) 以及 (2). 白楊木的有機溶劑處理紙漿 (Organosolv pretreated poplar, OPP) 等的高濃度木質纖維素基質之酵素水解、及後續的高濃度水解物發酵的可行性。

## 二、試驗材料與試驗方法

### 1. 試驗材料/基質:

(1). 未漂白闊葉樹牛皮漿 (UBHW)：來源自加拿大牛皮漿廠。

(2). 白楊木的有機溶劑處理紙漿 (OPP)：在加拿大製漿造紙研究所試驗室製備處理，將白楊木片置於 50% (w/w) 乙醇水溶液中，添加 1.25% 硫酸為催化劑，在 170°C 蒸煮 60 分鐘 (Pan et al., 2006)。

### (3). 基質之處理及分析

根據 PAPTAC (Pulp and Paper Technical Association of Canada, 加拿大紙漿和造紙技術協會) 的標準程序 (G. 13 及 G. 20)，使用丙酮作為溶劑，進行 UBHW 和 OPP 抽出成份的含量測定。根據 PAPTAC 標準程序 G.8 及 G.9 進行總木質素含量 (酸可溶木質素及酸不可溶木質素) 的測定。並收集木質素分析所得到的濾液，並將其用於糖分析。經由

DX-600 離子層析儀 (Dionex DX-600 Ion Chromatograph system) 以 AS-50 自動進樣器 (AS-50 Autosampler) 和 GP-50 梯度幫浦 (GP50 gradient pump)，去離子水以 1 ml/min 的流量用作沖提液 (Eluent)。進行分離，可以得知濾液中的單糖包括阿拉伯糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖等。UBHW 和 OPP 的黏度測定是依據 Scandinavian 紙廠標準測試法 SCAN-C 15:62。UBHW 和 OPP 中纖維素的聚合度 (DP) 的大小由紙漿樣品的黏度法測定。

### 2. 酵素

Celluclast 1.5 L (纖維素酶) 和 Novozym 188 ( $\beta$ -glucosidase)，取自北美諾維信 (Franklinton, NC)。Celluclast 的活性為每毫升 80 濾紙單位 (FPU/ml)，Novozym 188 的活性為每毫升 450 纖維二糖 (Cellobiose) 單位 (CBU/ml)。將基質水解糖化酵素的使用劑量為每克纖維素基質使用 20 FPU Cellulase 並補充 80 CBU 的  $\beta$ -glucosidase。

### 3. 在震盪培養瓶 (Shake flasks) 中進行酵素水解的方法

批次水解的實驗在 500 ml 的燒瓶中進行，反應液中包含有 200 mM 醋酸緩衝液 (pH 值 4.8) 以及前述各種不同濃度的基質和酵素劑量，所有燒瓶固定在一個控制環境的搖床。水解酵素與各種濃度的基質在 50°C、轉速 200 rpm 的條件下處理 96 個小時。纖維素-葡萄糖轉換率被定義為葡萄糖在水解溶液中的含量除以基質中纖維素的含量 (換算成葡萄糖)。

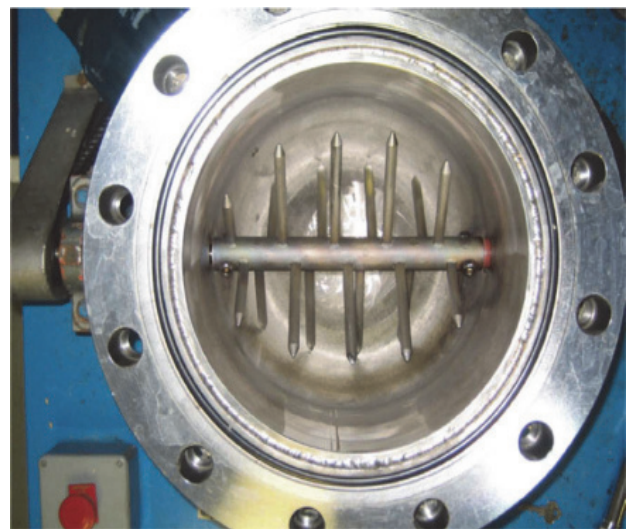


圖 1. 實驗所使用之釘柱攪拌機 (Peg-Mixer) 的內腔構造

#### 4. 在釘柱攪拌機 (Peg-Mixer)中進行酵素水解

實驗所使用之釘柱攪拌機，由加拿大製漿造紙研究所製造(Pointe Claire, QC) (如圖 1)，在本項實驗中被用來進行高濃度 UBHW 及 OPP 的水解。釘柱攪拌機具有 9000 公升的作用體積，以及約以 800 公克(絕乾重)基質用於批次水解，除了攪拌速度定於 20 rpm，其他條件與震盪培養(溫度、pH 值、酵素用量)相同。在放入釘柱攪拌機進行水解之前，先將基質、酵素和緩衝溶液在哈伯氏攪拌器進行充分的混合。

#### 5. 水解產物的發酵

發酵實驗使用工業用的釀酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 菌株 (T2 酵母，由 Tembec Inc., Témiscaming, Québec 提供)。酵母細胞接種在 250 ml YEPC 培養基中 (1% 酵母萃取物、2% 消化蛋白質、2% 葡萄糖)，在 30°C (200 rpm) 震盪培養 24 小時。酵母細胞的收集方式為在 4°C 下以 5000 g 離心 10 分鐘，所得沉澱物以 10 ml 儲存噬菌體的緩衝溶液 (Phage storage buffer, PSB) 洗滌三次。酵母細胞依照這種準備方式後，隨後分別接種到 60 ml 預水解液、或是純的葡萄糖溶液，最終的酵母細胞濃度為 5.5 mg/ml。

在發酵前將葡萄糖及水解液的 pH 值以 50% 的氫氧化鈉調整至 6.5，在這之後加入 0.3% 酵母萃取物、0.5% 消化蛋白質和磷酸氫二鉍 ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ )，直到最終濃度達 20 mM。發酵實驗在含有 60 ml 水解液之 125 ml 血清瓶中進行，裝置在 30°C 震盪培養發酵 96 小時。

#### 6. 糖、乙醇、和酵素抑制劑的分析

在水解的過程中，在不同的反應時間取 0.5 ml 的試樣，隨後立即以 0.45  $\mu\text{m}$  的過濾膜 (Millipore, Bedford, MA) 過濾，然後用上述分離管柱分析法分析濾液中的葡萄糖濃度，

所有數據都由三重複試驗取得平均值。在發酵液中每隔一定時間取樣 0.5 ml，分別測定乙醇和葡萄糖的濃度，樣本經由離心去除酵母細胞，接著以 0.45  $\mu\text{m}$  的過濾膜進行過濾後，如同前述使用 HP 6890 系列 GC 系統測定乙醇濃度，及使用 HPLC 方法測定葡萄糖濃度。

#### 7. 數據分析

所有批次水解和發酵的實驗結果都是根據至少六個樣本在相同條件下重複進行兩批試驗的平均值，每個時間點取三個樣本，其平均值與標準差由 7SR2 (OriginLab Corp., Northampton, MA) 軟體計算之。

### 三、試驗結果與討論

闊葉樹未漂漿 (UBHW) 及白楊木的有機溶劑處理紙漿 (OPP) 的化學組成

如表 1 所示，UBHW 含有約 80% 的纖維素及 19.6% 的木聚醣含量，並僅有少量的木質素及抽出成分，因此 UBHW 可以代表理想的預處理木質材料。為了測試是否同樣高濃度的水解方法可以應用於其他種材料，有機溶劑預處理白楊木 (OPP) 之準備使用前述的預處理條件 (Pan et al., 2006)。以前述條件將白楊木進行有機溶劑預處理，其中含有大約 87% 的纖維素與少量木質素。OPP 木質素含量比 UBHW 略高，兩者最顯著的差異是 OPP 中檢測到較多的丙酮萃取物，這些萃取物可能大部分來自於易溶於丙酮的低分子量酚類化合物。先前的研究 (Pan et al., 2006) 所發現其木質素含量比現在測到的還要高，只是他們在分析木質素前未進行有機溶劑萃取，這些酚類化合物在酸水解時會產生沉澱因而計算到木質素含量之中。

表 1. 闊葉樹未漂漿 (UBHW) 及白楊木的有機溶劑處理紙漿 (OPP) 的化學組成 (Zhang et al., 2009)

Components	weight percentage%
<b>Unbleached Hardwood pulp (UBHW)</b>	
Acetone extractives	0.19+0.02
Cellulose (as glucan)	79.1+ 0.4
Cellulose (as glucose)	84.3+0.4
Xylan	19.6+0.4
Lignin	
Acid soluble	0.63 + 0.04
Acid insoluble	1.06 + 0.03
<b>Organosolv pretreated pulp (OPP)</b>	
Acetone extractives	8.17+ 0.06
Cellulose (as glucan)	86.5+0.04
Cellulose (as glucose)	92.3+0.4
Xylan	1.46+0.03
Lignin	
Acid soluble	0.34+0.01
Acid insoluble	2.08+0.01

2. 濃度 2% 與 5% UBHW 條件下的的酵素水解反應

首先確定震盪培養瓶中以濃度 2% 及 5% (w/w) 的 UBHW 進行酵素水解使用 20 FPU/g 與 80 CBU 的酵素性評估, 如圖 2A 所示, 以濃度 2% 的 UBHW 基質進行酵素水解 24 小時可得到濃度 17 g/L 的葡萄糖, 而在濃度 5% 的基質下進行水解, 僅可得到約 40 g/L 濃度的葡萄糖。圖 2B

為酵素水解後纖維素-葡萄糖的轉換率, 數據顯示經過 24 小時水解反應, 濃度 2% UBHW 基質者的轉化率較高。若基質濃度提高到 5% 則轉換率在 48 小時後也約僅有濃度 2% 的 95%, 推論此結果可能是受到反應最終產物之抑制作用所導致 (Xiao et al., 2004)。

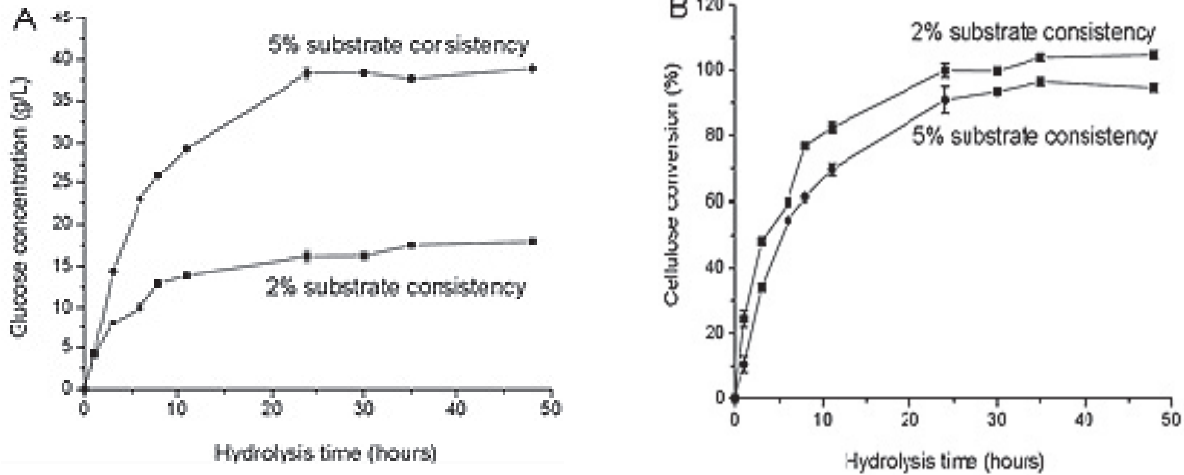


圖 2. UBHW 酵素水解時變化基質濃度對葡萄糖收率 (A) 及纖維素-葡萄糖轉換率 (B) 的影響(Zang et al.,2009)

水解酵素： 20 FPU Cellulase+ 80 CBU β-glucosidase / g 基質， pH= 4.8， 50°C、200 rpm 濃度 2% , 5%

3. 闊葉樹未漂漿 (UBHW) 的高濃度水解

為了探討 UBHW 在不同基質濃度下水解的可能性, 濃度從 2% 至 20% 每組試驗間濃度差 3%。結果顯示增加基質濃度會導致基質本身中的游離水的降低。因此, 水解初期的基質濃度越高, 則液化基質本身所需的時間就越長。表 2 顯示在震盪培養瓶中進行 UBHW 基質濃度 20% 的酵素水解, 培養 40 小時後才出現基質的液化現象。結果顯示, 震盪培養方法所花費的時間過長, 並不適合用來評估木質纖維素原料的高濃度水解。

表 2. 在震盪培養瓶及釘柱攪拌機中進行 UBHW 不同基質濃度的酵素水解時培養液的液化時間比較 (Zhang et al.,2009)

A：在震盪培養瓶進行酵素水解時							
基質濃度(%)	2	5	8	11	14	17	20
液化時間(h)	0	0	2.5	6	12	28	40
B：在釘柱攪拌機中進行酵素水解時							
基質濃度(%)	2	20					
液化時間(h)	0	1					

在以澱粉為主原料的生物乙醇生產中, 高濃度水解 (濃度 20% 以上) 與高濃度發酵是常見的手法。然而, 木質纖維素基質與澱粉基質的原料性質上完全不同, 常在低濃度 (< 4%) 的條件下, 將纖維材料懸浮在豐富的游離水中, 使得懸浮液很容易混合與轉移時進行水解作業。然而, 當基質濃度提升到 8%, 纖維與纖維之間會發生更大程度的相互作用, 而大幅增加纖維與纖維間的網狀結構。更由單一品質的懸浮纖維變成膨潤, 且由空氣包覆的纖維團 (Duff and Titchener, 1975)。如表 2 所示, 這在混合作業產生的漿團以及因水解導致游離水顯著減少時產生了流變性的問題, 可得知高濃度基質在震盪培養瓶中液化時本問題會顯著的發生, 必須經有效的攪拌破壞纖維狀結構間的纏繞, 是成功進行高濃度木質纖維素水解的關鍵。

釘柱攪拌機是製漿造紙工業中常用來處理中濃度紙漿 (8-15%) 的設備, 通常應用於進行氧化脫木質素 (Oxygen delignification) 反應始為使反應均勻使使用之設備, 不過也被認為能有效使 UBHW 在高濃度進行均勻混合紙漿。如表 2 所示的結果證明這種設備可以大大提高 UBHW 基質在酵素中的液化率, 解決了高濃度水解時攪拌方面的問題。使用柱攪拌機, 相較於震盪培養瓶花了 40 小時, 釘柱攪拌機

將濃度 20% 的 UBHW 液化僅花費 1 小時，因此往後再進行基質濃度 20% 的 UBHW 水解性評估時皆以釘柱攪拌機行之。一般認為，高濃度基質將在水解產物中提高纖維二糖 (Cellulose) 的濃度，會反過來提高對纖維二糖分解酶及內切葡聚糖酶 (Cellobiohydrolases 和 Endoglucanases) 產生活性的抑制。因此，選擇使用 2.0 FPU 的 Cellulase 與 80 CBU  $\beta$ -glucosidase 之混合物處理每克的纖維素。如圖 3A 所示，在 UBHW 濃度 20% 水解時，水解液中葡萄糖濃度顯著地提升，葡萄糖含量在培養 96 小時後達到 144 g/L，這是目前文獻所記載木質纖維素基質以批次水解所產生最高的葡萄糖濃度。

濃度 2% UBHW 的水解同樣在釘柱攪拌機中進行 (如圖 3)，並比較其在震盪培養瓶中進行試驗 (圖 2) 所產生的結果。其兩者的纖維素-葡萄糖轉化率曲線 (圖 3) 皆在培

養 24 小時後可達到 100%。然而，在基質濃度 20% 的情況下，在 96 小時後纖維素-葡萄糖的轉化率僅有約 84%。延長水解的時間，葡萄糖濃度僅略為增加 (數據未顯示)。通常情況下 cellulose 水解纖維素的情形如圖 3B 兩條曲線所示，一開始的對數生長期及隨後的緩慢的增加，此結果與 Ramos et al., 1993)，因為許多因素會導致水解轉化率趨緩，在這些因素中，水解產物如纖維二糖、及葡萄糖成了阻礙水解的因素 (Tengborg et al., 2001)。根據統計，最終產物的抑制作用以在高濃度基質水解將更為嚴重。先前的研究已經證明在水解的過程若含有 100 g/L 濃度的葡萄糖的生成，將會減少 80% 纖維素分解酵素 (Cellulase) 的水解能力 (Xiao et al., 2004)。因此基質濃度 20% 下的水解與 2% 者相比，較低的轉化率是因為系統中較高葡萄糖含量的抑制作用所導致。

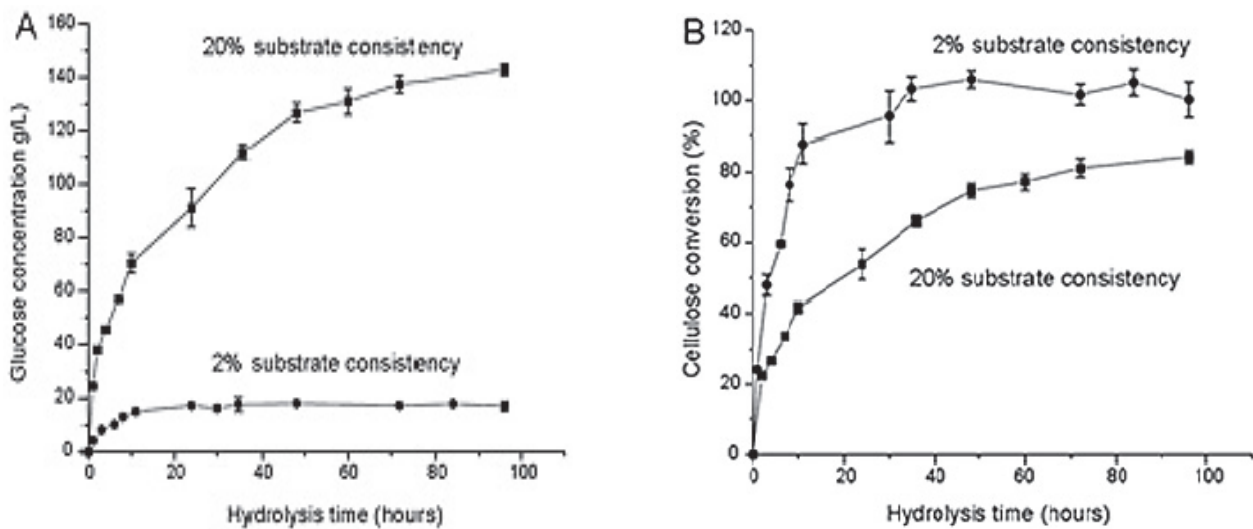


圖3. 釘柱攪拌機中進行 UBHW 酵素水解時變化基質濃度(2%,20%) 對葡萄糖收率 (A) 及纖維素-葡萄糖轉化率 (B) 的影響 (Zhang et al.,2009)( 其他酵素水解條件如圖 2)

#### 4. 有機溶劑預處理白楊木紙漿 (OPP) 的高濃度水解

進行 OPP 的水解條件與 UBHW 相同，在基質濃度 2% 與 20% 的條件下分別在釘柱攪拌機中進行水解。如圖 4 所示，OPP 在濃度 2% 具有高水解性，酵素水解 12 小時後產出 16.8 g/L 的葡萄糖 (圖 4A)，佔 OPP 中可利用之纖維素 (如葡萄糖) 的 91%。所有纖維素在酵素水解 60 小時後轉換成葡萄糖。而在濃度 20% 基質條件下進行水解，其葡萄糖濃度較高。在水解了 48 小時後，其葡萄糖濃度甚至高於

UBHW，達到了 158 g/L，所得到的葡萄糖相當於 85% 的纖維素-葡萄糖轉化率，即使超過 48 小時後，葡萄糖濃度仍有些微的增加。

另外，同時進行在高濃度的 OPP 分別使用較低酵素劑量 (3 與 10 FPU/g) 的水解酵素試驗，觀察其水解效果 (如圖 5)。可明顯發現當酵素劑量的降低會導致生成糖的濃度的降低，同時也降低纖維素-葡萄糖的轉化率，然而，減少了 50% 的酵素使用量，生成糖的濃度由 158.2 g/L 變化為 124.5 g/L，僅減少約 21%。即使酵素使用量僅使用 3 FPU/g，仍可

在 96 小時後獲得超過 80 g/L 的葡萄糖 (圖 5A) 及 43% 的纖維素-葡萄糖轉化率 (圖 5B)。

基質濃度 30% 的 OPP 之水解性也在試驗中被確認, 如同圖 6 所示, OPP 的濃度由 20% 增加到 30%, 結果所生成葡萄糖的濃度在水解 96 小時後大幅增加 21%。但是, 其纖維素-葡萄糖轉換率較在濃度 20% 者低。不得不提的是,

最初 OPP 基質的固形份含量稍微低於 30% (27%), 因此基質在酵素水解前必須在水解前先行脫水作業。雖然有機會進一步提高在高濃度基質水解時水解液中糖的濃度, 但酵素水解時基質濃度 20-30% 是木質纖維素水解較實際的範圍。

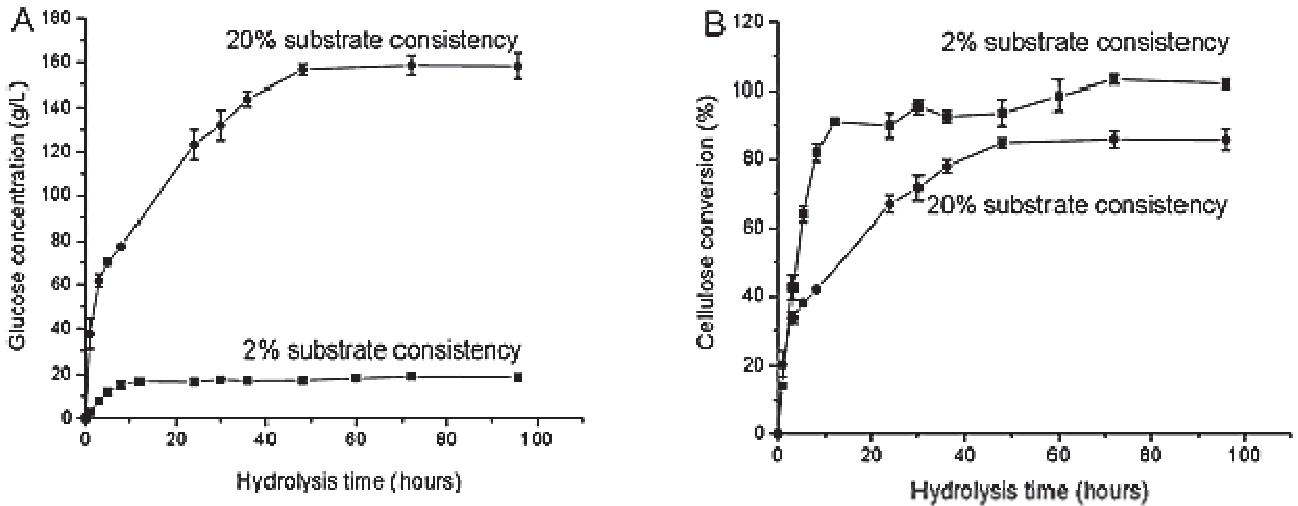


圖 4. 在釘柱攪拌機中進行 OPP 酵素水解時變化基質濃度(2%, 20%) 對葡萄糖收率 (A) 及纖維素-葡萄糖轉換率 (B)的影響 (Zang et al.,2009) (其他酵素水解條件如圖 2)

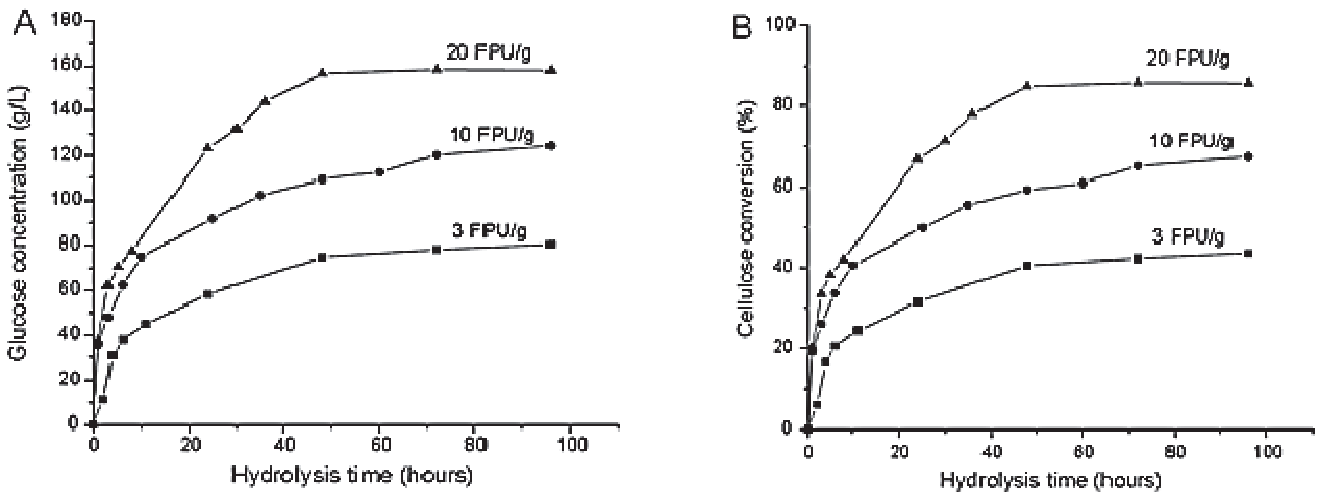


圖 5. 在釘柱攪拌機中進行 OPP 酵素水解時基質濃度 20% 變化酵素劑量對葡萄糖收率 (A) 及纖維素-葡萄糖轉換率 (B)的影響 (Zang et al.,2009) (酵素劑量 20, 10, 3 FPU/g, 其他水解條件如圖 2)

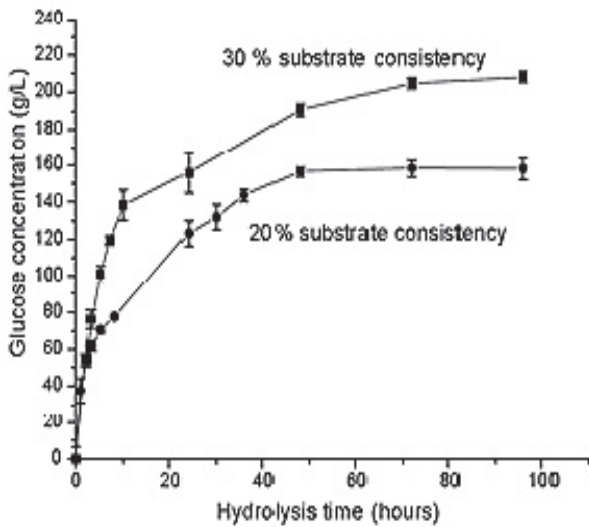


圖 6. 在釘柱攪拌機中進行 OPP 酵素水解時變化基質濃度 (20% ,30%) 對葡萄糖收率 (A) 及纖維素-葡萄糖轉換率 (B)的影響 (Zang et al.,2009) (其他水解條件如圖 2)

### 5. UBHW 和 OPP 的高濃度水解產物的乙醇發酵

如前述，水解濃度 20% 的 UBHW 和 OPP 所獲得之水解產物幾乎可以代表批次酵素水解木質纖維素所能獲得之最高濃度葡萄糖。但切合實際的高濃度水解產物發酵的相關研究資料很少，可以預測在高濃度的基質的水解所生成的可能在發酵時的抑制物含量的也可能增加(文獻)。因此，關鍵是該用何種酵母菌去發酵這些水解產物 ADD(文獻)。

經基質濃度 20% 的 UBHW 與 OPP 經過 24 小時水解後的高濃度產物，被用來進行後續的發酵試驗。使用在與 UBHW 與 OPP 水解液約略濃度相若的兩組葡萄糖溶液被用為對照組，發酵前 UBHW 水解物的葡萄糖濃度約為 112 g/L，而對照組的純葡萄糖溶液為 110 g/L。發酵實驗進行 96 小時，在過程中可觀察到隨發酵時間的增加葡萄糖濃的度降低、乙醇被產出。酵母在純葡萄糖溶液中顯現良好的發酵結果，幾乎所有糖都在發酵 12 小時後被消耗掉，此時的乙醇產量達到 44 g/L 接著曲線則開始持平(圖 7)(圖 8)。經 96 小時的發酵反應，最終發酵液中的乙醇濃度達到 48.4 g/L，其葡萄糖-乙醇的轉化率約為理論產量的 86%。(根據理論發酵每 1 克葡萄糖能生成乙醇 0.51 克)。上述結果顯示酵母菌也能夠有效的利用 UBHW 水解液中的高濃度葡萄糖生成乙醇。與對照組的葡萄糖液相比較，UBHW 水解液在發酵初期有個明顯的遲滯期，在發酵 36 小時後，乙醇的產量為 46 g/L，而最終乙醇濃度為 50.4 g/L，約達到理論產量的 88%。

另外，測試 OPP 水解液發酵性的實驗採用相同的試驗方法與條件，對照組使用 150 g/L 的純葡萄糖溶液，而 OPP 水解液的初始葡萄糖濃度約為 149 g/L。酵母在對照的葡萄糖液中再次表現出良好的發酵結果，在 12 小時內幾乎所有葡萄糖皆消耗完畢，並且產生出 60 g/L 的乙醇 (圖 9 和 圖 10)。

OPP 產出的最終乙醇濃度為 62.3 g/L，雖比對照組略高，然而其葡萄糖-乙醇的轉化率偏低，與理論質相比僅分別為 86% 及 81%。顯示以 OPP 水解液發酵時在發酵的初期有個明顯的遲滯期，在發酵 24 小時後達到最大的乙醇產量，最終發酵的乙醇產量為 63.1 g/L，相當於理論產量的 83%。

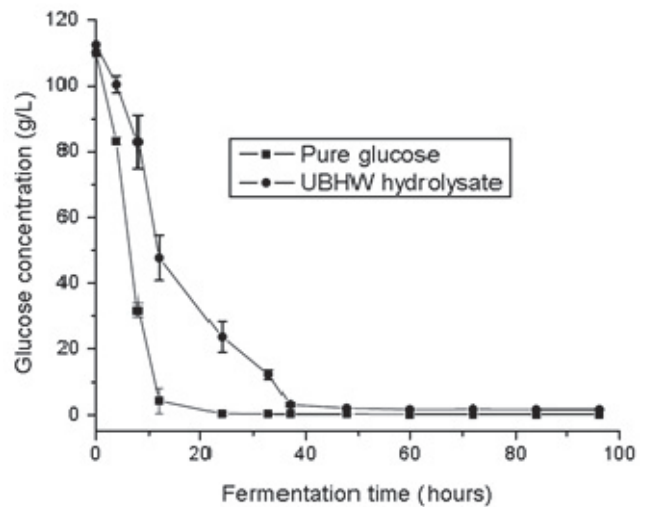


圖 7. UBHW 水解液及葡萄糖經酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 發酵時葡萄糖的經時降低量 (Zang et al.,2009)

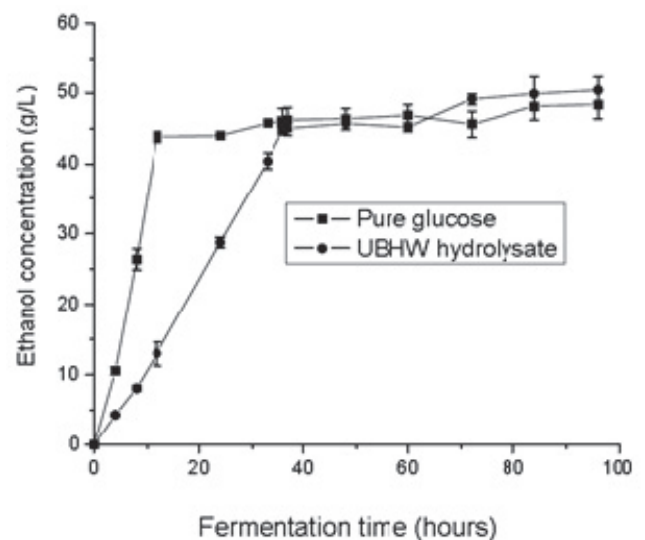


圖 8. UBHW 水解液及葡萄糖經酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 發酵時乙醇的經時生成量 (Zang et al.,2009)

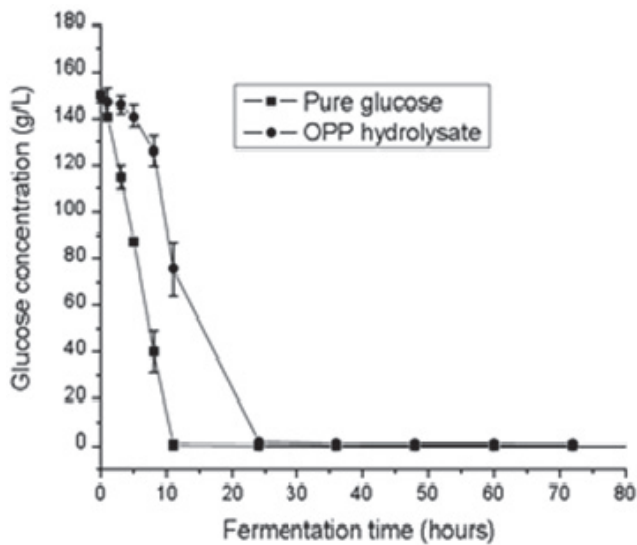


圖 9. OPP 水解液及葡萄糖經酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 發酵時葡萄糖的經時降低量(Zang et al.,2009)

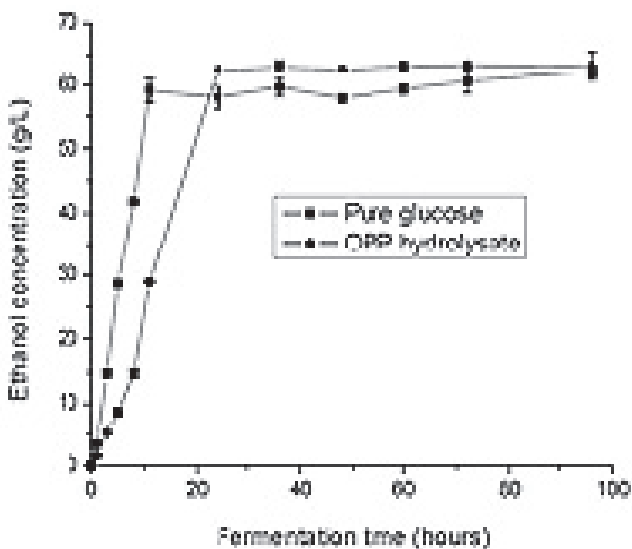


圖 10. OPP 水解液及葡萄糖經酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 發酵時乙醇的經時生成量(Zang et al.,2009)

比較 UBHW 與 OPP 的水解性，發現 OPP 在高濃度表現出比 UBHW 更加，觀察 OPP 水解的過程，其原因有可能因其起始材料具有高纖維素含量之故。雖然 UBHW 與 OPP 的纖維素－葡萄糖轉換率在高濃度水解 96 小時後相差不多 (分別 84%與 85%)，但 OPP 的水解被證明有較高的初始反應速率。兩者的初水解的前一個小時反應速率分別為 0.204 g/g/h 及 0.146 g/g/h。

探討其中的差異的原因，推論為論兩種基質的纖維素的黏度、與其聚合度 (DP) 不同為主要原因，OPP 具有非

常低的黏度 (2.67 mPa · s) 及 DP = 207，而 UBHW 的黏度為 40.3 mPa · s 和 DP = 1643。OPP 是在高溫、酸性條件下製成的紙漿，可能是在預處理的過程導致大分子降解，而具較低的黏度與 DP，使 OPP 較容易受纖維素分解酵素水解。此外，從結果來看，UBHW 中的木聚糖、以及 OPP 中的丙酮抽出物對於高濃度基質的水解性影響並不顯著。

高濃度水解不僅可以降低水解容器的成本，更重要的是還提供了濃縮的葡萄糖供後續的發酵使用，這將省去很多的蒸餾成本。若葡萄糖的濃度由 1.5% 提升到 16%，可以省去 6 倍的發酵後的蒸餾成本 (Zacchi and Axelsson, 1989)。

而 *S. cerevisiae* 酵母菌一般可以容忍到 180 g/L 的高酒精濃度 (Lin and Tanaka, 2006)。從上述結果可以看出，這種工業用的酵母菌可以在 12 小時內可消耗大部分的葡萄糖。當初始葡萄糖濃度由 110 g/L (UBHW 的純葡萄糖對照組) 增加到 150 g/L (OPP) 的純葡萄糖對照組會使得最終乙醇產量由 0.44 g/g 降至 0.42 g/g，推論其原因，可能是因為葡萄糖的抑制作用所導致。當基質 (葡萄糖) 濃度超過 150 g/L，會開始對發酵的產量產生很大的抑制作用。當基質濃度高於 150 g/L，收率在 0.45 左右，而當基質濃度在 150 g/L 以下則發酵後的產物則隨基質濃度提升呈線性降低 (Thatipamala et al., 1992)。

## 五、結論

本文證實使用一般常用於製漿漂白時的過程之釘柱攪拌機，可以成功在高基質濃度下進行纖維素的酵素水解。成功的在水解基質濃度 20% 下水解的未漂白闊葉樹紙漿 (UBHW) 和有機溶劑預處理白楊木 (OPP) 生成高葡萄糖濃度的水解液，其中酵素水解 OPP 在 48 小時產出 158 g/L 的葡萄糖，這是目前木質纖維素經酵素水解所獲得最高的葡萄糖濃度。若再以將高含糖量的 UBHW 和 OPP 酵素水解液進行發酵，可生產高濃度乙醇達 60 g/L 以上，此濃度遠高於以往的文獻記載。

採用一般用來處理中、高濃度的纖維物質製漿漂白設備的設計，但將其應用於高濃度水解也能成為一種實用的方法以克服實驗室所遇到的問題。試驗結果提供了一種新方法去進行木質纖維素的在高濃度水解和發酵，使得生物質轉化的研究在工業化向前邁進了一步，並開啟了一個路徑去探討基質與酵素的交互作用及反應效率。

## 六、參考文獻

1. Zhang, Xiao., W. Qin, M. G. Paice and John N. Saddler 2009



- High consistency enzymatic hydrolysis of hardwood substrates. *Bioresource Technology* 100 (23): 5890–5897
2. Cara, C., Moya, M., Ballesteros, I., Negro, M.J., Gonzalez, A. and Ruiz, E. 2007 Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass. *Process Biochemistry* 42:1003–1009.
  3. Jorgensen, H., Vibe-Pedersen, J., Larsen, J. and Felby, C 2007 Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. *Biotechnology and Bioengineering* 96:862–870.
  4. Larsson S., E. Palmqvist, B. Hahn-Hagerdal, C. Tengborg, K. Stenberg, G. Zacchi, N.O. Nilvebrant 1999 The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology*, 24 (1999), pp. 151–159
  5. Cara, C., Moya, M., Allesteros, I., Negro, M.J., Gonzalez, A., Ruiz, E., 2007. Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass. *Process Biochemistry* 42, 1003–1009.
  6. Duff, G.G., Titchener, A.L., 1975. The disruptive shear stress of pulp networks. *Svensk. Papperstidning nr. 13*, 474–479.
  7. Galbe, M., Zacchi, G., 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 618–628.
  8. Jorgensen, H., Vibe-Pedersen, J., Larsen, J., Felby, C., 2007. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. *Biotechnology and Bioengineering* 96, 862–870.
  9. Lin, Y., Tanaka, S., 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* 69, 627–642.
  10. Palmqvist, E., Hahn-Hagerdal, B., 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology* 74, 25–33.
  11. Pan, X.J., Gilkes, N., Kadla, J., Pye, K., Saka, S., Gregg, D., Ehara, K., Xie, D., Lam, D., Saddler, J., 2006. Bioconversion of hybrid poplar to ethanol and co-products using an organosolv fractionation process: optimization of process yields. *Biotechnology and Bioengineering* 94, 851–861
  12. Ramos, L.P., Breuil, C., Saddler, J.N., 1993. The use of enzyme recycling and the influence of sugar accumulation on cellulose hydrolysis by *Trichoderma* cellulases. *Enzyme and Microbial Technology* 15, 19–25.
  13. Robinson, J., Keating, J., Boussaid, A., Mansfield, S.D., Saddler, J.N., 2002. The influence of bark on the fermentation of Douglas-fir whitewood prehydrolysates. *Applied Microbiology and Biotechnology* 59, 443–448.
  14. Stenberg, K., Bollok, M., Reczey, K., Galbe, M., Zacchi, G., 2000. Effect of substrate and cellulase concentration on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated softwood for ethanol production. *Biotechnology and Bioengineering* 68, 204–210.
  15. Sun, Y., Cheng, J.Y., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83, 1–11.
  16. Tengborg, C., Galbe, M., Zacchi, G., 2001. Reduced inhibition of enzymatic hydrolysis of steam-pretreated softwood. *Enzyme and Microbial Technology* 28, 835–844.
  17. Thatipamala, R., Rohani, S., Hill, G.A., 1992. Effects of high product and substrate inhibitions on the kinetics and biomass and product yields during ethanol batch fermentation. *Biotechnology and Bioengineering* 40, 289–297.
  18. Van Wyk, J., 2001. Biotechnology and the utilization of biowaste as a resource for bioproduct development. *Trends in Biotechnology* 19, 172–177.
  19. Wingren, A., Galbe, M., Zacchi, G., 2003. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnology Progress* 19, 1109–1117.
  20. Wyman, C.E., Hinman, N.D., 1990. Ethanol – fundamentals of production from renewable feedstocks and use as a transportation fuel. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 24 (5), 735–753.
  21. Xiao, Z.Z., Zhang, X., Gregg, D.J., Saddler, J.N., 2004. Effects of sugar inhibition on cellulases and beta-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 113 (16), 1115–1126.
  22. Zacchi, G., Axelsson, A., 1989. Economic evaluation of pre-concentration in production of ethanol from dilute sugar solutions. *Biotechnology and Bioengineering* 34, 223–233

---

\*蘇裕昌 國立中興大學森林學系教授

\*Dr. Yu-Chang Su, Professor, Dept. Of Forestry, National Chung Hsing University.

\*\*呂紹華 國立中興大學森林學系碩士班研究生

\*\* Shao-Hua Lu, Master student, Dept. of Forestry, National Chung Hsing University.