

### 3. 纖維乙醇之製程 (Cellulosic ethanol process)

#### 3.3 酵素水解製程

相對於化學水解製程 (Chemical hydrolysis process)，利用酵素 (Enzymes) 水解纖維之研究，一直到第二次世界大戰期間，美軍為了瞭解造成南太平洋叢林中軍服與設備變壞之原因才開始，有趣的是，進行之研究原本要防止纖維素被水解，最後卻成為研究纖維水解酶 (Cellulase) 之起源。

1960 年代初期，當從纖維素水解取得糖分，成為食物來源之可能管道後，研究者開始探討如何提高酵素之水解能力。1960 年代中期，當以與 *Trichoderma reesei* 同類之纖維水解酶製備細胞外酵素 (Extracellular enzyme) 之技術被發現後，纖維水解酶在科學與商業上之應用成了熱門之議題；1973 年，美軍認定纖維水解酶是一種可以將固體廢棄物轉換成食物與能源產物之工具。

目前，採用酵素水解製程之生質乙醇工廠有加拿大之 Iogen/Petro 公司與美國之 BC International 公司 (BCI)。(U.S. DOE, 2006c)

酵素水解製程包括前處理 (Pretreatment)、酵素水解 (Enzymatic hydrolysis)、醱酵階段 (Fermentation)、產物分離與純化 (Product separation and purification) 等四步驟；其中，酵素水解與醱酵程序分開進行者，稱為「分開酵素水解與醱酵製程 (Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF)」(Alfani et al., 2000; Cantarella et al., 2004; Chen et al., 2007; Kim and Holtzaple, 2005; Larsson et al., 1997; Martín et al. 2002; Mohammed, 1996b; Öhgren et al., 2007b; Palmqvist et al., 1996; Sharma et al., 2002b; Sharma et al., 2004; Stenberg et al., 1998; Tengborg et al., 1998;)，如圖 5 所示；合併進行者稱為「同步糖化與醱酵製程 (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF)」(Alfani et al., 2000; Ballesteros et al., 1991; Ballesteros et al., 1993; Ballesteros et al., 2002b; Ballesteros et al., 2004; Cantarella et al., 2004; Chang et al., 2001; Chen and Jin, 2006; Dawson and Boopathy, 2007; Eklund and Zacchi, 1995; Hari Krishna et al., 1998; Hari Krishna et al., 1999; Hari Krishna et al., 2001; Karimi et al., 2006; Kádár et al., 2004; Martín et al., 2006; Oh et al., 1996; Öhgren et al., 2007b; Palmqvist et al., 1996; Rudolf et al., 2005; Saha et al., 2005a; Saha et al., 2005b; Sassner et al., 2006; Södeström et al., 2003; Sreenath et al., 2001; Stenberg et al., 2000a; Stenberg et al., 2000b; Tucker et al., 2003; Zhu et al., 2006b; Zhu et al., 2006d)，如圖 6 所示。

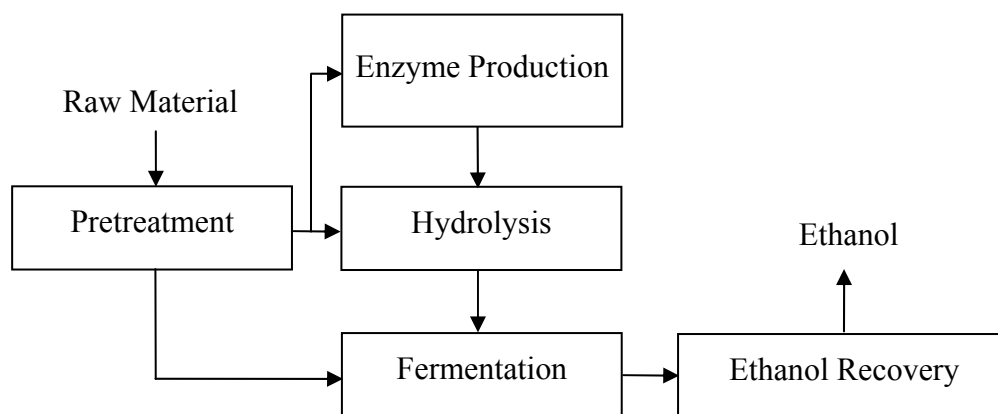


圖 5 水解與醱酵分離之酵素水解製程 (Szengyel, 2000)

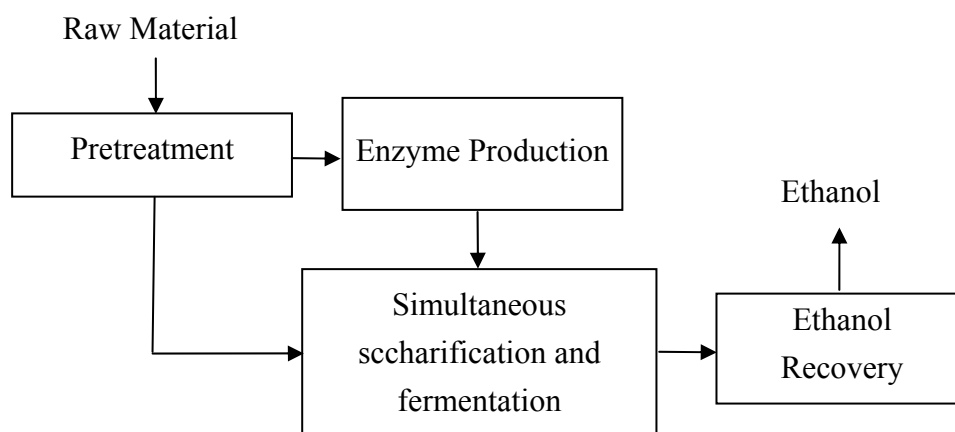


圖 6 醱化與醱酵同步之酵素水解製程 (U.S. DOE, 2006d)

### 3.3.1 前處理 (Pretreatment)

前處理是提高木質纖維素水解效率與降低生產成本之最有效程序 (McMillan, 1994)。一般而言，木質纖維素因本身之異質性 (Heterogeneous)，加上結構上木質素與半纖維素對於纖維素之保護作用與護套 (Sheathing) 效果、纖維素之結晶性 (Crystallinity) 與接觸表面積不足等問題，使得酵素無法有效地進入木質纖維素內層，對纖維素進行水解，因此透過前處理程序，加入添加物 (Additives) 或能量來瓦解木質素與半纖維素對纖維素之保護作用，破壞木質纖維素之結構與增加孔隙性 (Porosity)，使得酵素容易接近纖維素 (圖 7)，進而將碳水化合物轉換成可醱酵糖 (Fermentable sugars) (McMillan, 1994; Sun and Cheng, 2002; Mosier et al., 2005)。在利用前處理程序提高後續酵素水解之醱化效率時，也必須防止副產品對後續之水解與醱酵程序產生抑制作用。

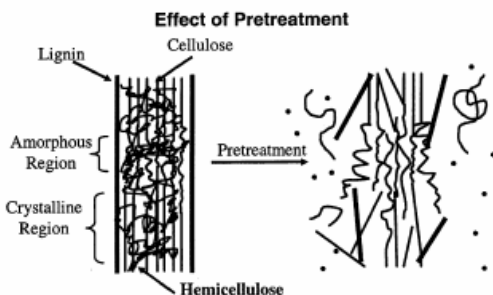


圖 7 木質纖維素之前處理目的 (Mosier et al., 2005)

前處理可依其添加物種類、瓦解纖維素保護層與結晶結構之方式，分為物理方法、物理式化學方法、化學方法及生物性方法 (Sun and Cheng, 2002; Mosier et al., 2005)，包括：機器粉碎前處理 (Mechanical comminution pretreatment) (Millet et al., 1976)、裂解前處理 (Pyrolysis pretreatment) (Fan et al., 1987)、蒸汽爆裂前處理 (Steam explosion pretreatment) (Alfani et al., 2000; Ballesteros et al., 2002a; Ballesteros et al., 2004; Cantarella et al., 2004; Cara et al., 2006; Cara et al., 2007; Kaar et al., 1998; Kristensen et al., 2007; Martín et al., 2002; Martín et al., 2006; Mohammed, 1996a; Mohammed, 1996b; Nunes and Pourquie, 1996; Sharma et al., 2002a; Sharma et al., 2002b; Sharma et al., 2004; Södeström et al., 2003; Tucker et al., 2003)、蒸汽前處理 (Steam pretreatment) (Eklund and Zacchi, 1995; Eklund et al., 1995; Hari Krishna et al., 1998; Hari Krishna et al., 1999; Larsson et al., 1997; Öhgren et al., 2007a; Öhgren et al., 2007b; Palmqvist et al., 1996; Rudolf et al., 2005; Sassner et al., 2006; Södeström et al., 2003; Stenberg et al., 1998; Stenberg et al., 2002b; Stenberg et al., 200a; Tengborg et al., 1998)、高壓熱水前處理 (Liquid hot water pretreatment) (Cara et al., 2007; Kristensen et al., 2007; Sreenath et al., 1999; Sreenath et al., 1999; Sreenath et al., 2001; Sreenath et al., 2001)、酸前處理 (Acid pretreatment) (Chen et al., 2007; Curreli et al., 2002; Dawson and Boopathy, 2007; Dien et al., 2006; Karimi et al., 2006; Saha et al., 2005a; Saha et al., 2005b; Silverstein et al., 2007; Wen et al., 2004)、過氧化氫前處理 (Peroxide pretreatment) 或去木質化處理 (Delignification treatment) (Ballesteros et al., 2002b; Cara et al., 2006; Cara et al., 2007; Curreli et al., 1997; Curreli et al., 2002; Dawson and Boopathy, 2007; Hari Krishna and Chowdary, 2000; Hari Krishna et al., 1998; Hari Krishna et al., 1999; Hari Krishna et al., 2001; Öhgren et al., 2007a; Saha et al., 2006; Silverstein et al., 2007; Yáñez et al., 2006; Zhu et al., 2006a; Zhu et al., 2006b)、鹼前處理 (Alkaline pretreatment) (Curreli et al., 1997; Curreli et al., 2002; Hari Krishna et al., 1998; Hari Krishna et al., 1999; Sharma et al., 2002a; Silverstein et al., 2007; Zhu et al., 2005a; Zhu et al., 2005b; Zhu et al., 2006c; Zhu et al., 2006d; Zhu et al., 2006e)、微波前處理 (Microwave pretreatment) (Kitchaiya et al., 2003; Zhu et al., 2006e)、鹼加微波前處理 (Microwave/Alkali pretreatment) (Zhu et al., 2005a; Zhu et al., 2005b; Zhu et al., 2006a; Zhu et al., 2006b; Zhu et al., 2006c; Zhu et al., 2006d; Zhu et al., 2006e)、酸加微波前處理 (Microwave/Acid pretreatment) (Zhu et al., 2006a; Zhu et al., 2006b)、石灰前處理法 (Lime pretreatment) (Chang et al., 2001; Hari Krishna et al., 2001; Kaar and Holtzapple, 2000; Kim and Holtzapple, 2005)、臭氧前處理 (Ozone pretreatment) (Silverstein

et al., 2007)、濕式氧化 (Wet oxidation pretreatment) (Martín et al., 2006)、多階式前處理法 (Multi-step pretreatment) (Cara et al., 2006; Cara et al., 2007; Curreli et al., 1997; Curreli et al., 2002; Eklund and Zacchi, 1995; Eklund et al., 1995; Larsson et al., 1997; Öhgren et al., 2007a; Palmqvist et al., 1996; Södeström et al., 2003; Stenberg et al., 1998; Stenberg et al., 2002b; Stenberg et al., 200a; Tengborg et al., 1998; Yáñez et al., 2006; Zhu et al., 2006a; Zhu et al., 2006b; Zhu et al., 2006e) 等。

### 3.3.1.1 機器粉碎前處理 (Mechanical comminution pretreatment)

將木質纖維素經過切碎、研磨可達到縮小纖維素結晶之效果。一般而言，材料經過切碎後，尺寸可達 10-30 mm，但經過研磨後，尺寸可進一步縮小到 0.2-2 mm，且研究結果發現，在縮小晶格尺度上，使用震動球磨研磨機器比傳統之球磨研磨機有更顯著之效果 (Millet et al., 1976)。

### 3.3.1.2 裂解前處理 (Pyrolysis pretreatment)

裂解除了可以用來產製生質燃油外，也是木質纖維素原料之前處理方法之一。

將木質纖維素原料經過高於 300°C 加熱處理後，部分原料快速分解成氣體產物和殘餘炭，再將經過裂解處理後之木質纖維素放在弱酸環境中 (1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、97°C) 歷經 2.5 小時，會使其中高達 80-85% 比例之纖維素轉換成糖。研究也發現：若在裂解反應過程中加入氯化鋅或碳酸鈉當作催化劑，可以使纖維素在較低之溫度下發生分解。(Fan et al., 1987)

### 3.3.1.3 蒸汽爆裂前處理 (Stream explosion pretreatment)

蒸汽爆裂法是處理木質纖維素最常使用之前處理方法 (McMillan, 1994)，具有能源與化學物需求較低等優點。一般而言，蒸汽爆裂法是將木質纖維素原料置於高溫高壓之環境中，然後迅速將壓力減小，使木質纖維素原料歷經爆炸性之減壓過程，其所需時間從數秒鐘到數分鐘不等，其間歷經溫度從 160°C 到 260°C、壓力從 0.69Mpa 到 4.83Mpa 之變化。影響蒸汽爆裂法之因素有停留時間 (Residence time)、溫度、濕度與原料顆粒大小等 (Duff and Murray, 1996)。

### 3.3.1.4 高壓熱水前處理 (Liquid hot water pretreatment)

高壓熱水處理法係將木質纖維素原料通過經壓縮之熱水。

高壓熱水前處理法之處理器有順向式 (co-current)、逆向式 (counter-current) 和流水式 (flow-through) 等三種形式。順向式反應器是將木質纖維素原料與水一起於前處理反應器內加熱，並適當控制停留時間。逆向式反應器是將木質纖維素原料與水以相反方向流過前處理反應器。水流式反應器是利用熱水流經固定在反應器內之木質纖維素原料，同時將溶解於超臨界水之木質纖維素原料帶出反應器。

### 3.3.1.5 稀釋酸前處理 (Diluted-Acid hydrolysis pretreatment)

稀釋酸處理法是木質纖維素原料前處理方法中，相當成功之一種方法。該方法係將木質纖維素原料浸泡在溫度為 160-220°C 之稀釋酸溶液中，於歷經數秒鐘到數分鐘不等之時間後，將木質纖維素原料中之半纖維素水解成木糖或是其他糖類，而後分解成糖醛，是早年用來製造糖醛之方法。

由於稀釋酸處理後之酵素水解環境需求較為溫和，因此稀釋酸處理後之水解液必須經過酸鹼中和或用水沖洗至中性，否則過酸之水解液不僅會降低酵素之活性，甚至導致酵素之失效。

### 3.3.1.6 石灰前處理 (Lime pretreatment)

石灰前處理法是將石灰溶於水後，噴灑在木質纖維素原料上，然後存放一段時間，其中，木質纖維素原料必須先研磨至尺寸小於 10mm。使用石灰前處理法所需溫度較其他前處理法來得低，約在 50-65°C 間，所需處理時間則需數小時到數日，才能獲得較顯著效果。

## 3.3.2 酵素 (Enzymes)

酵素是一群水解酵素 (Hydrolytic enzymes) 之總稱。自然界中可以分泌酵素之微生物 (Microorganism)，包括細菌 (Bacteria) 與真菌 (Fungi)：

1. 細菌為單細胞生物，能獨立生存與增殖，常用來產製酵素者包括：*Clostridium*、*Cellulomonas*、*Bacillus*、*Thermomonospora*、*Ruminococcus*、*Bacteriodes*、*Erwinia*、*Acetovibrio*、*Microbispora* 與 *Streptomyces*；其中，以 *Cellulomonas fimi* 與 *Thermomonospora fusca* 之研究與應用最多。雖然可水解纖維素之細菌，特別是厭氧者，如 *Clostridium thermocellum* 與 *Bacteroides cellulosolvens* 所產製之酵素具有較高之活性，但因厭氧菌之生長速率較低，且產製之濃度較低，加上主要為  $\beta$ -glucosidase，故對結晶之纖維素分解能力較低。(Duff and Murray, 1996; Sun and Cheng, 2002)
2. 真菌廣泛存在大自然中，為多細胞所組成，所產製之酵素為細胞外酶，具有易於分離與萃取等優點，加上產製之酵素結構合理，對於纖維素之水解能力較強 (齊，2000)，因此商業化之酵素製程主要以真菌為主。常見用來產製酵素之真菌包括：*Sclerotium rolfsii*、*Phanerochaete chrysosporium*、*Trichoderma sp.*、*Aspergillus niger*、*Schizophyllum* 與 *Penicillium variable*；其中，以 *Trichoderma sp.* 之研究與應用最多。(Duff and Murray, 1996; Sun and Cheng, 2002)

### 3.3.2.1 酵素之作用

從纖維素之結構與其在酵素作用下之分解過程來看，酵素至少包含三種主要之纖維

水解酶群：內切型纖維素水解酶 (Endo- $\beta$ -1,4-gulcanase, E.C. 3.2.1.4.)、外切型纖維素水解酶 (Exo- $\beta$ -1,4-gulcanase, E.C. 3.2.1.91) 與  $\beta$ -葡萄糖苷酶 ( $\beta$ -glucosidase, E.C. 3.2.1.21) (齊, 2000; 尤, 2003; 戴, 2004)：

1. 內切型纖維水解酶又稱為 CMCase、Cx cellulose、Carboxymethylcellulase、Endoglucosidase、 $\beta$ -1,4-gulcan glucanhydrolase 或  $\beta$ -1,4-D-gulcan-4-gulcanhydrolase，主要用於纖維素分子內部之非結晶區，隨機水解其中之  $\beta$ -1,4-gulcanosidic linkages，並將長鏈纖維素分子切斷，產生大量具有還原性末端之小分子纖維素。
2. 外切型纖維水解酶又稱為 C1、Avicelase、Cellobiohydrolase、Exocellobiohydrolase、 $\beta$ -1,4-D-gulcan cellobiohydrolase 或 Cellulose- $\beta$ -1,4-D-gulcan cellobiohydrolase，主要用於分解結晶型之纖維素，由還原端 (Reducing ends) 或非還原端 (Non-reducing ends) 將纖維素以纖維雙糖為單位予以分解 (Bisaria and Mishra, 1989; Bhat and Bhat, 1997)。
3.  $\beta$ -葡萄糖苷酶又稱為 Cellobiase (纖維雙糖酶)、 $\beta$ -1,4-gulcanosidase 或  $\beta$ -1,4-gulcanhydrolase，主要用以將纖維雙糖或短鏈之纖維寡糖 (Cellooligosaccharide) 自非還原端起，以葡萄糖為單位予以分解，降低纖維雙糖對於內切型纖維水解酶或外切型纖維水解酶活性之抑制作用。

透過三者間彼此之協同作用機制 (Synergy mechanism)，由內切型纖維水解酶首先用於纖維素之非結晶區，以非特異性 (Random) 之方法將長鏈之纖維素分子打斷，然後由外切型纖維水解酶作用，經與內切型纖維水解酶之協同作用，使纖維素分子之結晶區，與非結晶區同時水解成纖維雙糖與寡糖，最後由  $\beta$ -glucosidase 將纖維雙糖與寡糖水解成葡萄糖，如圖 8 所示 (Ghose, 1976; Bisaria and Ghose, 1981; 齊, 2000)。

合成酵素之微生物可能是好氧的 (Aerobic) 或厭氧的 (Anarerobic)、中溫的 (Mesophilic) 或高溫的 (Thermophilic)，因此不同微生物合成之酵素組成結構亦不同，對纖維素之水解能力當然也就不同，要使用多少劑量之酵素，或如何與其他之酵素搭配組成混合型之酵素，成為纖維乙醇製程重要之課題。以 *Trichoderma reesei* 產製之酵素為例，其包含四種主要之水解酶 (Unsitalo et al., 1991; Szengyel, 2000)：外切型纖維水解酶 (Cellobiohydrolase) CBH I、CBH II、內切型纖維水解酶 (Endoglucosidase) EG I 與 EG II 各約 60%、20%、10% 與 10%。由於所含內切型纖維水解酶之活性較低，加上葡萄糖苷酶活性 (Cellobiase activity) 不高，無法有效分解纖維雙糖，而必須搭配其他之酵素，如  $\beta$ -glucosidase，以避免纖維雙糖之累積對內切型纖維水解酶或外切型纖維水解酶之活性產生抑制作用。

### 3.3.2.2 酵素之活性

酵素之活性 (Enzyme activity) 係以一固定時間內生成物之產量為判斷基準。

由於酵素系統 (Enzymatic system) 相當複雜，且酵素在進行纖維水解過程中，涉及酵素與基質間之交互作用，因此酵素之活性可以分成個別酵素與整體酵素之活性。用來測定活性之基質也可分成可溶性基質 (Soluble substrate) 與不可溶性基質 (Insoluble substrate) 二類，前者包括 Carboxymethyl-cellulose (CMC) 與 Hydroxyethyl-cellulose (HEC)，後者則包括棉 (Cotton)、Avicel 與 Filter paper 等；其中，Filter paper 自從 1984 年 IUPAC (The International Union of Pure and Applied Chemistry) 之生物技術委員會 (Commission on Biotechnology) 提出測定酵素活性之標準程序後，即成為一標準且價格低廉之基質，而 FPA (Filter Paper Assay) 也成為廣泛用來測定酵素活性之標準程序 (Xiao et al., 2004)，該程序係利用二硝基水楊酸 (Dinitrosalicylic acid, DNS) 測定基質釋出之葡萄糖濃度。

依據 IUPAC 推薦之 FPA，酵素之活性可以定義如下：

$$\text{FPU/mL} = \left( \frac{A_{540} \text{ sample}}{A_{540} / \text{mg standard}} \right) \frac{5.55 \mu\text{mole}}{\text{mg}} \times \frac{1}{60 \text{ min}} \times \frac{1}{\text{X mL}}$$

FPU (Filter Paper Unit) = 平均每分鐘釋出等值於一  $\mu\text{mole}$  之葡萄糖。Enzyme amount, which releases 1  $\mu\text{mol}$  of glucose equivalents from Whatman no. 1 filter paper in 1 min

$A_{540}$  sample = The absorbance obtained from the DNS assay for each cellulase assay。

$A_{540}/\text{mg standard}$  = The standard used for the standard FPA assays。

5.55  $\mu\text{mole}/\text{mg}$  = The number of  $\mu\text{moles}$  of glucose in 1 mg。

60 min = The assay incubation time。

X mL = The volume of suitably diluted enzyme that was assayed。

表 2 為個別酵素與整體酵素活性測定之基質及判斷依據；其中，用來判斷活性之生成物可歸納成三類：基質之某些物理性質改變、降解後某些產物之增加或基質量之減少 (Mullings, 1985; Szengyel, 2000)。

One unit of FPU is defined as the enzyme amount, which releases 1  $\mu\text{mol}$  of glucose equivalents from Whatman no. 1 filter paper in 1 min. One unit of  $\beta$ -glucosidase activity is defined as the enzyme amount, which converts 1  $\mu\text{mol}$  of cellubiose to 2  $\mu\text{mol}$  of glucose in 1 min.

表 2 酵素之活性測定 (Mullings, 1985)

Enzyme	Substrates	Products
endo- $\beta$ -1,4-gulcanase,	1.Carboxymethyl-cellulose	Regucing sugar and/or loss in

E.C. 3.2.1.4.	2.Hydroxyethyl-cellulose 3.Amorphous cellulose	viscosity
exo- $\beta$ -1,4-gulcanase, E.C. 3.2.1.91	1.Crystalline cellulose (Cotton) 2.Avicel 3.Cellodextrins 4.Heterobiosides	1.Cellobiose 2.Cellobiose 3.Cellobiose 4.4-Nitrophenol/glucose
$\beta$ -glucosidase, E.C. 3.2.1.21	1. Cellobiose 2.Cellodextrins	1.Glucose 2.Glucose/ Cellodextrins
Cellulase	1.Filter Paper 2.Avicel 3.Hydrocellulose 4.Dyed cellulose 5.Tritiated cellulose 6.Thread	1.Reducing sugar/loss in weight/reduction on absorbance 2.Dye release 3.Scintillation counts 4.Breaking strength

### 3.3.2.2 酵素活性之測定

酵素活性之測定 (Assay) 項目包括：Carboxymethyl cellulose (CMCase) activity、Xylanase activity、 $\beta$ -Glucosidase activity、 $\beta$ -xylosidase activity、 $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activity 與 Ferulic acid esterase activity，測定方法如下 (Saha et al., 2005b)：

1. Carboxymethyl cellulase (CMCase) 與 xylanase activities 之測定，係於包含 1% (w/v) 羧基甲基纖維 (carboxymethyl cellulose) 與 1% (w/v) 麥木聚糖 (Oat spelt xylan) 之反應混合物 0.5 mL 中，添加 50 mM 之醋酸鹽緩衝劑 (Acetate buffer) 與適量之稀釋酵素溶液 (Dilute enzyme solutions)，於 pH 值 5.0、溫度 50°C 等條件下，經 30 分鐘之培養後，以雙硝基柳酸 (Dinitrosalicylic acid, DNS) 法測出反應物中所含還原糖 (Reducing sugars) 釋出量，並以每分鐘釋出 1  $\mu$ mol 還原糖 (Reducing sugars) 所需之酵素量作為酵素活性之單位 (Unit, U)。
2.  $\beta$ -Glucosidase activity、 $\beta$ -xylosidase activity 與  $\alpha$ -L-arabinofuranosidase activity 之測定，係於包含 4 mM p-nitrophenyl $\beta$ -D-glucoside、2 mM p-nitrophenyl  $\beta$ -D-xyloside 與 1 mM p-nitrophenyl- $\beta$ -L-arabinofuranoside 之反應混合物 1.0 mL 中，添加 50 mM 之醋酸鹽緩衝劑與適量之稀釋酵素溶液，於 pH 值 5.0、溫度 50°C 等條件下，經 30 分鐘之培養後，以 1 mL、0.5 M 之冰冷碳酸鈉 ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 終止反應，然後以波長 405 nm 之光線測量反應物之吸光值，換算對-硝基苯 (*p*-nitrophenyl) 之釋出量，並以每分鐘釋出 1  $\mu$ mol *p*-nitrophenyl 所需之酵素量作為酵素活性之單位 (Unit, U)。
3. Ferulic acid esterase activity 之測定，係於包含 0.9 mM 之 methyl ferulate 與 0.45% 之 Dimethyl sulfoxide (DMSO) 之反應混合物 0.55 mL 中，添加 50 mM 之醋酸鹽緩衝劑與適



量之稀釋酵素溶液，於 pH 值 5.0、溫度 50°C 等條件下，經 15 分鐘之培養後，以 50 $\mu$ l、20%之甲酸 (Formic acid) 終止反應，經離心分離 (14000 rpm, 10 min)，並以 Milli-Q filtered water 稀釋兩倍後，利用高效率液態層析儀 (High performance liquid chromatography, HPLC) 測定分析阿魏酸 (Ferulic acid) 含量，並以每分鐘釋出 1  $\mu$ mol 阿魏酸所需之酵素量作為酵素活性之單位 (Unit, U)。

### 3.3.3 表面活性劑 (Surfactants)

利用木質纖維素作為生產乙醇之料源，得面對兩個瓶頸，一是需要高劑量之酵素才得以提高纖維素轉換率，二是酵素容易被吸附在水解後之殘留物上，造成酵素回收困難，因此有研究者試圖在酵素水解過程中加入非離子清潔劑 (Nonionic detergents) 與蛋白質 (Protein) 等表面活性劑 (Surfactant)，如 Bovine serum albumine (BSA)、Poly ethylene glycol (PEG) 2000、PEG 4000、PEG 6000、Berol 08、Tween 80 等，藉以提高纖維素轉換成可溶解糖之產率，研究者認為讓加入之表面活性劑吸附在木質纖維素之木質素上，可以遏止酵素與木質素間無生產性之互動，降低酵素在水解期間被吸附到基質 (Substrate) 之可能，當然也有研究者認為，加入之表面活性劑可以改變基質之本質 (Nature)，增加纖維素之可接觸面積，甚至有研究者認為表面活性劑對酵素具有穩定性之效果，有效防止酵素在水解期間出現變性 (Denaturation) 現象。(Kristensen et al., 2007)

Kristensen et al. (2007) 以麥桿 (Wheat straw) 與雲杉 (Spruce) 作為原料，採用逆向式 (Counter-current) 高壓熱水 (Liquid hot water, LHW) 與蒸汽爆裂 (Steam explosion, SE) 予以前處理，然後進行酵素水解，並選擇性添加表面活性劑 (Surface active additives) Bovine serum albumine (BSA)、Poly ethylene glycol (PEG) 2000、PEG 4000、PEG 6000、Berol 08、Tween 80 等，探討不同前處理方式之效果、表面活性劑對於酵素水解之影響、表面活性劑對酵素被吸附之影響、表面活性劑濃度對酵素水解之影響與表面活性劑對酵素穩定性之影響等。研究結果發現：(1) 添加表面活性劑，有助於提高纖維素轉換率，並微幅增加聚木糖轉換率；(2) 添加之表面活性劑濃度越高，纖維素轉換率越高，最佳之表面活性劑濃度約在 0.025~0.05g/g DM；(3) 歷經 24 小時酵素水解後，由水解液測得之 Endoglucanase activity 顯示添加表面活性劑有助於降低酵素被吸附在基質上之比例，提高纖維素之轉換率；(6) 歷經 24 小時酵素水解後，由酵素混合物測得之 Endoglucanase activity 來看，有添加表面活性劑者，酵素活性降低之幅度為 1.7~5.2%，低於未添加表面活性劑者之 5.4%。

### 3.3.4 排毒方法 (Detoxification methods)

前處理後固狀或液狀物料除含有可醱酵糖 (Fermentable sugars) 外，也可能含有對後續製程產生抑制作用之脂肪酸 (Aliphatic acids)、呋喃衍生物 (Furan derivatives) 與酚醛複合物 (Phenolic compounds) 等物質，應設法於醱酵前予以排除。用來移除常見於基質

之酚醛複合物、醋酸 (Acetic acid)、糠醛 (Furfural)、甲糠醛 (5-hydroxy-methyl-furfural; HMF) 等物質，提高基質可醱酵性之方法有蒸餾水洗滌排毒法 (Rinsing with distilled water)、二相液體接觸排毒法 (Two-phase liquid contacting)、酵素排毒法 (Enzymatic detoxification) 與化學排毒法 (Chemical detoxification) 法。蒸餾水洗滌排毒法將前處理物以蒸餾水攪拌洗滌或反覆洗滌 (Rinsing)，再真空過濾。二相液體接觸排毒法係將蒸餾水與醋酸乙酯 (Ethyl acetate) 加入潮濕之前處理物，經攪拌過濾後以蒸餾水沖洗 (Flushing)，再真空過濾。化學排毒法 (Chemical detoxification) 或氫氧化鈣全面浸灰排毒法 (Overliming with  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) 將一定濃度之  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  加入水解液或前處理物，經攪拌後，將水解液過濾以  $\text{H}_2\text{SO}_4$  調整 pH 值，或將懸浮液 (Suspension) 過濾除去多餘之液體，取得之浸灰後前處理物再經沖洗步驟，逐步降低洗出液之 pH 值，再真空過濾。酵素排毒法係將 Phenoloxidase laccase (*Coriolus versicolor*) 溶液以去離子水 (Deionised water) 經過透析 (Dialysed) 增加容積，再將一定濃度、透析過之 Phenoloxidase laccase 溶液加入基質，於特定之 pH 值、溫度與震盪頻率下反應排毒 (Martín et al., 2002; Cantarella et al., 2004)。

Martín et al (2002) 以蔗渣 (Sugarcane bagasse) 作為原料，利用蒸汽爆裂法 (Steam explosion) 分別於溫度 205°C (標示為 H205) 與 215°C (標示為 H215) 下前處理 10 分鐘，再以混合酵素予以水解，然後採用酵素排毒法 (Enzymatic detoxification) 與化學排毒法 (Chemical detoxification) 進行水解液 (Hydrolysates) 之排毒，排毒後之水解液再利用不同之酵母菌來進行醱酵以產製乙醇，探討不同排毒方法移除抑制物之效果、排毒方法對於水解液醱酵效果之影響。研究結果發現：(1) 酵素排毒法移除酚醛複合物之效果比化學排毒法明顯，約有 80 % 之酚醛被移除，但對於其他抑制物之排除效果則不大；(2) 化學排毒法對於 H205 之醋酸、呋喃衍生物與酚醛複合物之移除效果分別為 18%、25% 與 17%，高於 H215 者；(3) H205 經化學排毒處理後，水解液中之葡萄糖幾乎全部被醱酵，但未經排毒處理者，在醱酵 12 小時後，仍有葡萄糖未被醱酵；(4) H205 經化學排毒處理後，水解液中之木糖，在醱酵 12 小時後有 33% 被醱酵，若經酵素排毒處理後，則有 31% 被醱酵，若未經排毒處理，則僅有 19% 被醱酵，至於水解液中之阿拉伯糖 (Arabiose)，則不論有無經過排毒處理，幾乎沒有被利用；(5) H205 未經過排毒處理者，乙醇產率為 0.38 g/g glucose (0.13 g/g dry bagasse)，經酵素與化學排毒處理者，乙醇產率分別為 0.47 與 0.52 g/g glucose (0.16 與 0.18 g/g dry bagasse)，優於 H215 者。

Cantarella et al. (2004) 以白楊木 (Poplar wood) 作為原料，經蒸汽爆裂 (Steam explosion) 前處理後，採用蒸餾水洗滌 (Rinsing with distilled water)、二相液體接觸 (Two-phase liquid contacting)、或氫氧化鈣全面浸灰 (Overliming with calcium hydroxide,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) 等排毒法 (Detoxification methods) 排毒，再以分開酵素水解與醱酵製程 (Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF) 或同步糖化與醱酵製程 (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF) 產製乙醇，比較評估不同排毒法之效果。研究結果發現：(1) 僅靠提高酵母菌濃度，尚不足以克服蒸汽前處理後所產生之抑制物質，意即使用較高之酵母

菌濃度進行 In-site 排毒外，必須在酵素水解前輔以其他之排毒方法，才能有效提高纖維素轉換乙醇之效率；(2) 三種排毒方法中最有效者為氫氧化鈣全面浸灰排毒法，最差者為二相液體接觸排毒法。

### 3.3.5 分開酵素水解與醱酵製程 (Separate Hydrolysis and Fermentation)

所謂「分開酵素水解與醱酵製程 (Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF)」係指先利用纖維水解酶，將前處理後、纖維素含量相對多數之固態物料（前處理物）分解成可溶解糖 (Soluble sugars)，再利用微生物將酵素水解階段所得含有可醱酵糖 (Fermentable sugars) 之水解液 (Hydrolysate) 醱酵成乙醇等二階段程序。

#### 3.3.5.1 酵素水解階段 (Enzymatic hydrolysis step)

酵素水解係指以前處理後之物料（前處理物或（與）前處理液）作為基質，利用一定劑量之纖維水解酶，於一定之溫度、pH 值、震盪頻率與基質濃度等條件下，將前處理後之物料水解成包含葡萄糖在內之還原糖之過程。影響酵素水解階段之因素，包括基質濃度、纖維水解酶之活性、水解溫度與 pH 值等。(Sun and Cheng, 2002)

基質濃度是影響酵素水解產率與初始反應速率之主要因素之一。在基質濃度較低之情況下，增加濃度有助於增加產率與速率 (Chenug and Anderson, 1997)，但過高之濃度反而會對基質產生抑制作用 (Substrate inhibition)，造成水解速率降低。對基質產生抑制作用之範圍，則由基質與酵素之比例來決定 (Hung and Penner, 1991)，而基質與酵素之比例又與纖維素之結晶性、聚合 (Polymerization) 程度、接觸表面積與木質素之含量等有關，有效移除木質纖維素原料中之木質素，可以巨幅提高水解速率 (McMillan, 1994)。

纖維水解酶之活性一部分受到纖維雙糖之抑制，另一部分則受到葡萄糖之影響，而排除或降低抑制作用之方法，包括使用較高劑量 (Dosage or Loading) 之纖維水解酶、補充  $\beta$ -glucosidases、移除水解中產出之糖與使用糖化與醱酵同步之酵素水解製程等。

#### 3.3.5.2 醱酵階段

醱酵是指運用微生物，如酵母菌、細菌，使有機物分解之生物化學反應過程。影響因數包括基質濃度、基質成分、醱酵時間、溫度、酸鹼度與植入之微生物濃度等 (Sharma et al., 2002b)。

將前處理液與酵素水解所得含有木糖、樹膠醛糖 (五碳糖)、葡萄糖、甘露糖與半乳糖 (六碳糖) 等之水解液，經過中和調理至適當之酸鹼程度後，加上適當濃度之微生物，如 *Candida kefyr*、*Candida shehatae*、*C. lignosa*、*C. insectosa*、*Pichia stipitis*、有呼吸缺陷之 *Saccharomyces cerevisiae* 菌株 (Farone and Cuzens, 1998)、*Candida shehatae* FPL-702 (Sreenath et al., 2001)、*Saccharomyces cerevisiae* ATCC 96581 (Martín et al., 2002)、*Saccharomyces cerevisiae* TMB

3001 (Martín et al., 2002)、*Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* (Sharma et al., 2002b; Sharma et al., 2004)、*Escherichia Coli* FBR5 (Saha et al., 2005a; Saha et al., 2005b)、*Clostridium* 與 *Zymomonas mobilis* (Farone and Cuzens, 1998)，以及適當之營養分，如鎂 (Magnesium)、氮 (Nitrogen)、鉀 (Potassium)、磷酸鹽 (Phosphate) 或維他命 (Vitamins) 等 (Farone and Cuzens, 1998)，於特定之溫度下，將前處理液或 (與) 水解液中可能存在之雙醣切斷成單醣，然後將單醣轉換成乙醇、有機物與副產品；或加入葡萄糖氧化酵素 (Glucose oxidase) 以將水解液中之木糖轉化成乙醇，或採用專長於轉換六碳糖之 *Saccharomyces cerevisiae* 或 *Kluveromyces marxianus* 以回收五碳醣作為其他用途等。

由於醱酵過程產生之乙醇或其他揮發性產物，對微生物有壓抑作用，導致醱酵速率降低，因此揮發性產物可藉由醱酵槽之 CO<sub>2</sub> 冷卻循環系統予以移除、冷凝、收集與純化。

### 3.3.6 同步醱化與醱酵製程 (Simultaneous saccharification and fermentation)

所謂「同步醱化與醱酵製程 (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF)」係指前處理後，在同一反應槽內同步使用纖維水解酶與醱酵用微生物，一方面將纖維素轉換成葡萄糖，半纖維素轉換成木糖與樹膠醣糖，一方面則利用基因改後過微生物 (Genetically engineered microbes) 將葡萄糖、木糖與樹膠醣糖醱酵成乙醇之過程。

由於同步醱化與醱酵製程中，醱化與醱酵反應在同一反應槽同步進行，除具有操作簡單與生產效益外，製程中水解產生之醣直接被轉換成乙醇，可減少醣對纖維水解酶活性之抑制作用，且無菌條件 (Sterile conditions) 之要求也較低 (Sun and Cheng, 2002)，但因酵素水解之較佳溫度 (40~60°C) 比醱酵程序之較佳溫度 (25~35°C) 為高，製程若採取較高溫之操作條件，則宜選擇兼具水解與醱酵能力之微生物，如 *Trichoderma reesei* cellulase、 $\beta$ -glucosidase 與 H1-55 (Oh et al., 1996)、*Candida shehatae* FPL-702 (Sreenath et al., 2001)、*Trichoderma reesei* cellulase 與 *Saccharomyces cerevisiae* D5A (Laser et al., 2002; Tucker et al., 2003)、*Kluveromyces marxianus* CECT 10875 (Ballesteros et al., 2004) *Kluveromyces marxianus* Y 01070 (Kádár et al., 2004)、*Trichoderma reesei* cellulase 與 10% (v/v) *Saccharomyces cerevisiae* YC-097 (Zhu et al., 2006b; Zhu et al., 2006d)、*Saccharomyces cerevisiae* (Cantarella et al., 2004; Chen and Jin, 2006; Karimi et al., 2006; Rudolf et al., 2005)、*Mucor indicus* CCUG 22424 (Karimi et al., 2006)、*Rhizopus oryzae* CCUG 28958 (Karimi et al., 2006)。

影響同步醱化與醱酵製程之因子除了基質濃度、酵素之活性、溫度與 pH 值外，還包括基質饋料方式、乙醇與酵母菌濃度。

Ballesteros et al. (2002b) 選用耐熱型酵母菌菌株 *Kluveromyces marxianus* CECT 10875 與纖維水解酶 (Cellulase) Celluclast 1.5L，並採用同步醱化與醱酵製程 (Simultaneous saccharification and fermentation process; SSF) 從回收之紙張轉換出葡萄糖與乙醇，比較不

同基質 (Substrates) 濃度、基質加入方式 (Batch 或 Fed-batch) 與酵素劑量 (Enzymatic loading) 對乙醇濃度與產率之影響。研究結果顯示：(1) 在標準 SSF 製程下，基質濃度為 5% (w/v)、酵素劑量為 45 FPU/g 者，乙醇產率最高，約為理論值之 80.3%，與預期之『高酵素劑量與低基質濃度可增加 SSF 製程之乙醇產率』相符，但高劑量之酵素有成本較高、低濃度之基質有產糖濃度較低、高濃度基質有混合不易等問題；(2) 在相同之基質濃度 10% (w/v) 下，饋料批次式 SSF 製程之乙醇濃度為 17.7 g/L、產率為 79.7%，優於標準 SSF 製程之 12.6 g/L、56.4%。

Chen and Jin (2006) 以結晶狀纖維素 (Crystalline cellulose) 作為原料，探討不同溫度下，乙醇濃度與酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 對於酵素水解與纖維水解酶 *Penicillium decumbens* 活性之影響，以及影響之可逆性 (Reversibility)，其結果顯示：(1) 當乙醇濃度大於 2% (v/v)，則乙醇之存在會對結晶狀纖維素之酵素水解產生抑制作用；(2) 乙醇對於酵素水解之抑制作用，將限制還原糖轉換成乙醇之效率，以及最終乙醇產率，然於乙醇自 SSF 製程移走之後，酵素活性即可恢復；(3) 酵素受乙醇之影響所導致之變性 (Denaturation) 具有可逆性，且乙醇對於 *Penicillium decumbens* 之活性影響亦具有可逆性；(4) 酵母菌對於 *Penicillium decumbens* 之 Filter Paper Activity 與  $\beta$ -Glycosidase activity 幾乎沒有影響。

Zhu et al. (2006b) 以稻草 (Rice straw) 作為原料，經酸加微波 (Microwave/acid)、鹼加微波 (Microwave/alkali) 與  $H_2O_2$  處理等三個階段 (Microwave/acid/alkali/ $H_2O_2$ ) 後，進行批次式 (Batch) 同步醱化與醱酵製程 (Simultaneous Saccharification and Fermentation; SSF)，以 Orthogonal experiment 找出批次式 SSF 製程之最佳條件，然後以部份之最佳條件 (初始 pH 值與反應溫度) 作為饋料批次式 (Fed-batch) SSF 製程之條件，探討饋料批次式 SSF 製程之最佳條件，並比較批次式與饋料批次式 SSF 製程產出乙醇濃度與乙醇產率。研究結果顯示：批次式 SSF 製程之最佳操作條件為基質濃度 10% (w/v)、反應物初始 pH 值 5.3、反應溫度 40°C、酵素劑量 15 mg/g substrate、反應時間 72 小時，且在該條件下產出之乙醇濃度為 29.1 g/L，乙醇產率 (Yield) 為 61.3%，酵素消耗量為 5.15 mg/g ethanol。饋料批次式 SSF 製程之最佳操作條件為反應物初始 pH 值 5.3、反應溫度 40°C、酵素劑量 12.5 mg/g substrate、基礎培養基之營養成分濃度提高為批次式 SSF 製程者之 1.8 倍、初次饋料時間 36 小時、饋料模式 (3g、3g、2g、2g)，且在該條件下產出之乙醇濃度為 57.3 g/L，乙醇產率為 60.3%，酵素消耗量為 4.36 mg/g ethanol。由於饋料批次式 SSF 製程可解決高基質濃度所衍生之混合問題，提高產製乙醇之濃度，降低酵素與培養基養分之消耗量，是一種有效、具有發展潛力之乙醇製程。

### 3.3.7 SHF 製程與 SSF 製程之比較

Alfani et al. (2000) 以麥桿 (Wheat straw) 作為原料，先經蒸汽爆裂 (Steam explosion) 前處理後，比較分開酵素水解與醱酵製程 (Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF) 與同步醱化與醱酵製程 (Simultaneous sccharification and fermentation, SSF)：(1) SSF 製程

完成乙醇轉換所需時間比 SHF 製程短；(2) SSF 製程最大之乙醇產率佔理論產率 (Theoretical ethanol yield) 之比例低於 SHF 製程者；但乙醇生產速率 (Ethanol productivity, g/L·h) 則高於 SHF 製程者；(3) SSF 製程僅需一個反應槽，所需投資與操作成本較低；(4) SSF 製程中，葡萄糖轉換成乙醇之比例較接近理論值 (Stoichiometric value)；(5) SHF 製程中，纖維素轉換成葡萄糖之比例高於 SSF 製程者。

Öhgren et al. (2007b) 利用麥桿 (Corn stover) 作為原料，先經蒸汽前處理 (Steam pretreatment) 後，以全部漿狀物 (Whole slurry) 或洗過並加醣之漿狀物 (Washed slurry with additional sugars) 作為基質，利用分開酵素水解與醱酵製程 (Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF) 或同步醱化與醱酵製程 (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF) 產製乙醇，並探討基質種類與聚木糖水解酶 (Xylanase) 對於製程之影響。研究結果顯示：(1) 就 SHF 製程而言，前處理液內之抑制物對於酵素水解具有顯著且負面之衝擊；(2) 就 SSF 製程而言，以含有抑制物之全部漿狀物作為基質，乙醇產率高於以洗過並加醣之漿狀物作為基質者；(3) 使用洗過並加醣之漿狀物作為基質之 SHF 製程，乙醇產率低於以全部漿狀物作為基質之 SSF 製程，顯然 SSF 製程優於 SHF 製程；(4) 添加聚木糖水解酶 (Xylanase) 有助於提高乙醇產率。

### 3.3.8 產物分離與純化

將醱酵槽中之 Fermentation beer (醱酵產物與微生物) 離心分離，回收微生物，再以蒸餾程序取得乙醇，而殘留之木質素、未分解之纖維素、半纖維素、灰分與其他有機物則經收集再利用。

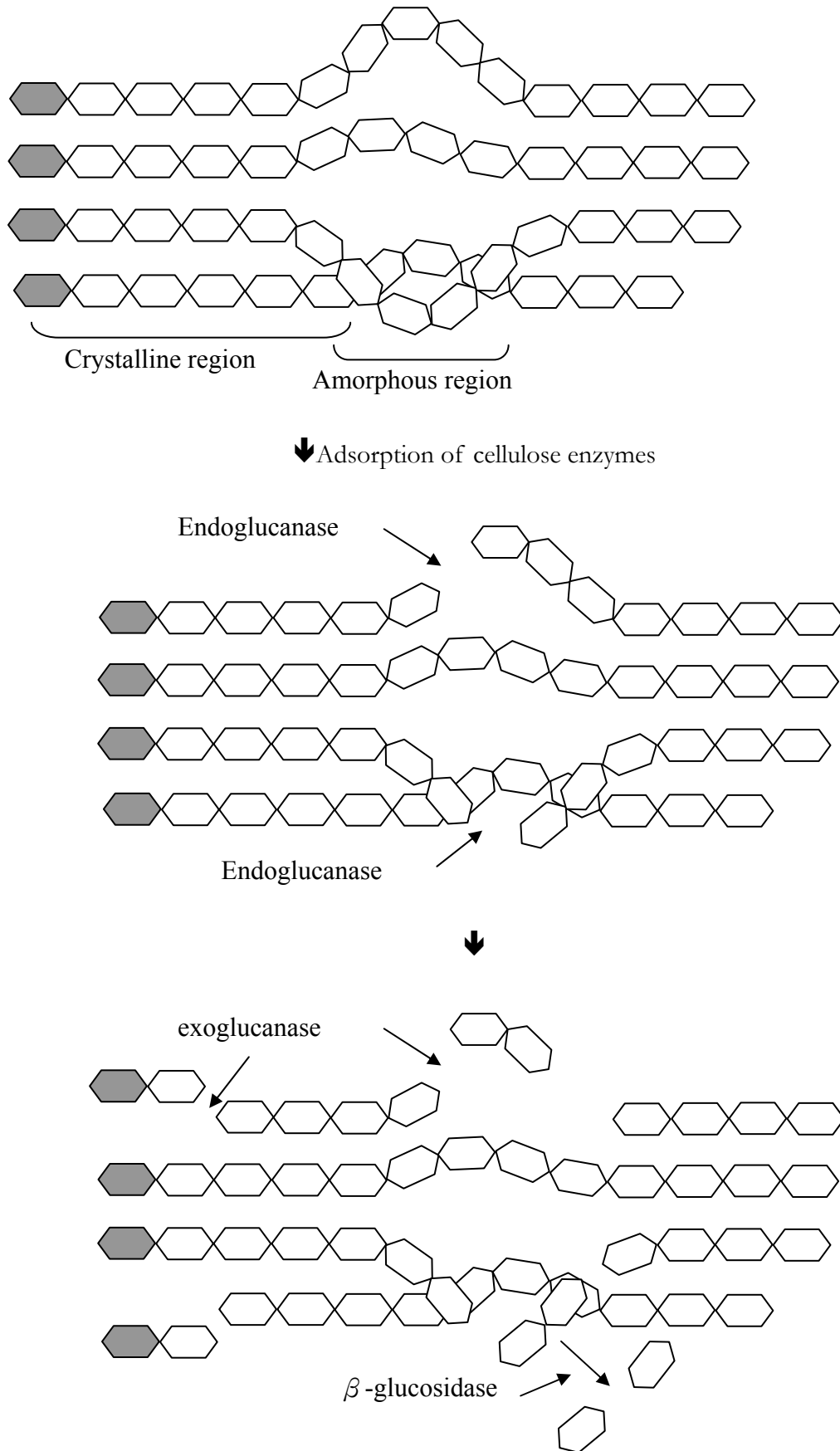


圖 8 纖維水解酶作用機制 (Béguin, 1987)

## 參考資料

- Alfani, F., A. Gallifuoco, A. Saporosi, A. Spera, M. Cantarekka. 2000. Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 25: 184-192.
- Ballesteros, I., J. M. Oliva, M. Ballesteros, J. Carrasco. 1993. Optimization of the simultaneous saccharification and fermentation process using thermotolerant yeasts. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 39/40: 201-211.
- Ballesteros, I., J. M. Oliva, M. J. Negro, P. Manzanares, M. Ballesteros. 2002a. Enzymic hydrolysis of steam exploded herbaceous agricultural waste (*Brassica carinata*) at different particule sizes. *Process Biochemistry* 38: 187-192.
- Ballesteros, I., M. Ballesteros, A. Cabanãs, J. Carrasco, C. Martín, M. J. Negro, F. Saez, R. Saez. 1991. Selection of thermotolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of cellulose to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 28/29: 307-315.
- Ballesteros, M., J. M. Oliva, M. J. Negro, P. Manzanares, I. Ballesteros. 2004. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry* 39:1843-1848.
- Ballesteros, M., J. M. Oliva, P. Manzanares, M. J. Negro, I. Ballesteros. 2002b. Ethanol production from paper material using a simultaneous saccharification and fermentation system in a fed-batch basis. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 18: 559–561.
- Béguin, P. 1987. Cloning of cellulase gene. *Critical reviews in biotechnology* 6:129-162.
- Bhat, M. K. and S. Bhat. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances* 15:583-620.
- Bisaria, V. S. and S. Mishra. 1989. Regulatory Aspects of Cellulase Biosynthesis and Secretion. *Critical Reviews in Biotechnology* 9:61-103.
- Bisaria, V. S. and T. K. Ghose. 1981. Biodegradation of Cellulosic Materials - Substrates, Microorganisms, Enzymes and Products. *Enzyme and Microbial Technology* 3:90-104.
- Cantarella, M., L. Cantarella, A. Gallifuoco, A. Spera, F. Alfani. 2004. Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSF. *Process Biochemistry* 39: 1533-1542.
- Cara, C., E. Ruiz, I. Ballesteros, M. J. Negro, E. Castro. 2006. Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. *Process Biochemistry* 41: 423–429.
- Cara, C., M. Moya, I. Ballesteros, M. J. Negro, A. González, E. Ruiz. 2007. Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass. *Process Biochemistry* 42: 1003-1009.
- Chang, V. S., W. E. Kaar, B. Burr, M. T. Holtzaple. 2001. Simultaneous saccharification and



- fermentation of lime-treated biomass. *Biotechnology Letters* 23: 1327–1333.
- Chen, H. Z. And S. Y. Jin. 2006. Effect of ethanol and yeast on cellulase activity and hydrolysis of crystalline cellulose. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 1430-1432.
- Chen, M, L. Xia, P. J. Xue. 2007. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. *International Biodeterioration and Biodegradation* 59: 85-89.
- Cheung, S. W. and B. C. Anderson. 1997. Laboratory investigation of ethanol production from municipal primary wastewater solids. *Bioresource Technology* 59:81-96.
- Curreli, N., Agelli, M, Pisu, B.,Rescigno, A., Sanjust, E., Rinaldi, A. 2002. Complete and efficient enzymic hydrolysis of pretreated wheat straw. *Process Biochemistry* 37: 937–941.
- Curreli, N., M. B. Fadda, A. Rescigno, A. C. Rinaldi, G. Soddu, F. Sollai, S. Vaccargiu, E. Sanjust, A. Rinaldi. 1997. Mild alkaline/oxidative pretreatment of wheat straw. *Process Biochemistry* 32(S): 665-670.
- Dawson, L. and R. Boopathy. 2007. Use of post-harvest sugarcane residue for ethanol production. *Bioresource Technology* 98: 1695–1699.
- Dien, B. S., Hans-Joachim G. Jung, K. P. Vogel, M. D. Casler, JoAnn F. S. Lamb, L. Iten, R. B. Mitchell, G. Sarath. 2006. Chemical composition and response to dilute-acid pretreatment and enzymatic saccharification of alfalfa, reed canarygrass, and switchgrass. *Biomass and Bioenergy* 30(10): 880-891.
- DOE. 2006c. U.S. Department of Energy: Energy Efficiency and Renewable Energy. Available at: [www.eere.energy.gov/biomass/enzymatic\\_hydrolysis.html](http://www.eere.energy.gov/biomass/enzymatic_hydrolysis.html). Accessed 10 April 2006.
- DOE. 2006d. U.S. Department of Energy: Energy Efficiency and Renewable Energy. Available at: [www.eere.energy.gov/biomass/process\\_description.html](http://www.eere.energy.gov/biomass/process_description.html). Accessed 10 April 2006.
- Duff, S. J. B. and W. D. Murray. 1996. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology* 55:1-33.
- Eklund, R, M. Galbe, G. Zacchi. 1995. The influence of SO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> impregnation of willow prior to steam pretreatment. *Bioresource Engineering* 52: 225-229.
- Eklund, R. and G. Zacchi. 1995. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated willow. *Enzyme and Microbial Technology* 17: 255-259.
- Fan, L. T.,M. M. Gharapuray, Y. H. Lee. 1987. Cellulose hydrolysis *Biotechnology Monographs*, p. 57. Berlin:Springer-Verlag.
- Farone, W. A. and J. E. Cuzens. 1998. Method of producing sugars using strong acid hydrolysis. U.S. Patent No. 5,726,046.
- Ghose, T. K. 1976. Cellulase biosynthesis and hydrolysis of cellulosic substances., p. 39-74 *Advances in biochemical engineering*, Vol. 6. Berlin: Springer-Verlag.
- Hari Krishna, S. and G. V. Chowdary. 2000. Optimization of Simultaneous Saccharification and

- Fermentation for the Production of Ethanol from Lignocellulosic Biomass. *Journal of agricultural and food chemistry* 48: 1971-1976.
- Hari Krishna, S., G. V. Chowdary, D. S. Reddy, C. Ayyanna. 1999. Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated *Antigonum leptopus* (*Linn*) leaves to ethanol. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 74: 1055-1060.
- Hari Krishna, S., K. Prasanthi, G. V. Chowdary, C. Ayyanna. 1998. Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated sugar cane leaves to ethanol. *Process Biochemistry* 33(8): 825-830.
- Hari Krishna, S., T. J. Reddy, G. V. Chowdary. 2001. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource Technology* 77: 193-196.
- Huang, X. L. and M. H. Penner. 1991. Apparent Substrate-Inhibition of the *Trichoderma-Reesei* Cellulase System. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39:2096-2100.
- Kaar, W. E., C. V. Gutierrez, C. M. Kinoshita. 1998. Steam explosion of sugarcane bagasse as a pretreatment for conversion to ethanol. *Biomass and Bioenergy* 14(3): 277-287.
- Kaar, W. E. and M. T. Holtzapple. 2000. Using lime pretreatment to facilitate the enzymic hydrolysis of corn stover. *Biomass and Bioenergy* 18: 189-199.
- Kádár, Z., Z. Szengyel, K. Reczey. 2004. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Industrial Crops and Products* 20:103-110.
- Karimi, K., G. Emtiazi, M. J. Taherzadeh. 2006. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 138-144.
- Kim, S. and M. T. Holtzapple. 2005. Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource Technology* 96: 1994-2006.
- Kitchaiya, P., P. Intanakul, M. Krairiksh. 2003. Enhancement of Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Wastes by Microwave Pretreatment Under Atmospheric Pressure. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 23(2): 217-225.
- Kristensen, J. B., J. Börjesson, M. H. Bruun, F. Tjerneld, H. Jørgensen. 2007. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 888-895.
- Larsson, M., M. Galbe, G. Zacchi. 1997. Recirculation of process water in the production of ethanol from softwood. *Bioresource Technology* 60: 143-151.
- Laser, M., D. Schulman, S. G. Allen, J. Lichwa, M. J. Antal, L. R. Lynd. 2002. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. *Bioresource Technology* 81:33-44.
- Martín, C., M. Galbe, C. F. Wahlbom, B. Hahn-Hägerdal, L. J. Jönsson. 2002. Ethanol production

from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* 31: 274–282.

Martín, C., Y. González, T. Fernández, A. B. Thomsen. 2006. Investigation of cellulose convertibility and ethanolic fermentation of sugarcane bagasse pretreated by wet oxidation and steam explosion. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 81: 1669-1677.

McMillan, J. D. 1994. Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production, p. 294-324, In M. E. Himmel, et al., eds. *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, Vol. 566. ACS, Washington, DC.

Millett, M. A., M. J. Effland, D. P. Caulfield. 1976. Influence of fine grinding on the hydrolysis of cellulosic materials-acid versus enzymatic. *Advances in Chemistry Series* 181:71-89.

Mohammed, M. 1996a. Effect of steam explosion on the physicochemical properties and enzymatic saccharification of rice straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 59: 283-297.

Mohammed, M. 1996b. Saccharification and alcohol fermentation of steam-exploded rice straw. *Bioresource Technology* 55: 111-117.

Mosier, N., C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y. Y. Lee, M. Holtzapple, M. Ladisch. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 96:673-686.

Mullings, R. 1985. Measurement of Saccharification by Cellulases. *Enzyme and Microbial Technology* 7:586-591.

Nunes, A. P., J. Pourquoi. 1996. Steam explosion pretreatment and enzymatic hydrolysis of eucalyptus wood. *Bioresource Technology* 57: 107-110.

Oh, K. K., T. Y. Kim, Y. S. Jeong, S. I. Hong. 1996. Bioconversion of cellulose to ethanol by the temperature optimized simultaneous saccharification and fermentation. *Renewable Energy* 9:962-965.

Öhgren, K., R. Bura, J. Saddler, G. Zacchi. 2007a. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. *Bioresource Technology* 98: 2503-2510.

Öhgren, K., R. Bura, G. Lesnicki, J. Saddler, G. Zacchi. 2007b. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. *Process Biochemistry* 42(5): 834-839.

Palmqvist, E., B. Hahn-Hägerdal, M. Galbe, M. Larsson, K. Stenberg, Z. Szengyel, C. Tengborg, G. Zacchi. 1996. Design and operation of a bench-scale process development unit for the production of ethanol from lignocellulosics. *Bioresource Technology* 58: 171-179.

Palmqvist, E., B. Hahn-Hägerdal, M. Galbe, M. Larsson, K. Stenberg, Z. Szengyel, C. Tengborg, G. Zacchi. 1996. Design and operation of a bench-scale process development unit for the production of ethanol from lignocellulosics. *Bioresource Technology* 58: 171-179.

- Rudolf, A., M. Alkasrawi, G. Zacchi, G. Lidén. 2005. A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. *Enzyme and Microbial Technology*. 37(2): 195-204.
- Saha, B. C., M. A. Cotta. 2006. Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw. *Biotechnology progress* 22: 449-453.
- Saha, B. C., L. B. Iten, M. A. Cotta, Y. V. Wu. 2005a. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry* 40:3693-3700.
- Saha, B. C., L. B. Iten, M. A. Cotta, Y. V. Wu. 2005b. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol. *Biotechnology Progress* 21:816-822.
- Sassner, P., M. Galbe, G. Zacchi. 2006. Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated *Salix* at high dry-matter content. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 756-762.
- Sharma, S. K., K. L. Kalra, G. S. Kocher. 2004. Fermentation of enzymatical hydrolysate of sunflower hulls for ethanol production and its scale-up. *Biomass and Bioenergy* 27: 399-402.
- Sharma, S. K., K. L. Kalra, H. S. Grewal. 2002a. Enzymatic saccharification of pretreated sunflower stalks. *Biomass and Bioenergy* 23: 237-243.
- Sharma, S. K., K. L. Kalra, H. S. Grewal. 2002b. Fermentation of enzymatically saccharified sunflower stalks for ethanol production and its scale up. *Bioresource Technology* 85:31-33.
- Silverstein, R. A, Y. Chen, R. R. Sharma-Shivappa, M. D. Boyette, J. Osborne. 2007. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresource Technology* 98: 3000-3011.
- Södeström, J., L. Pilcher, M. Galbe, G. Zacchi. 2003. Two-step steam pretreatment of softwood by dilute H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> impregnation for ethanol production. *Biomass and Bioenergy* 24: 475-486.
- Sreenath, H. K., R. G. Koegel, A. B. Moldes, T. W. Jeffries, R. J. Straub. 2001. Ethanol production from alfalfa fiber fractions by saccharification and fermentation. *Process Biochemistry* 36:1199-1204.
- Sreenath, H. K., R. G. Koegel, A. B. Moldes, T. W. Jeffries, R. J. Straub. 1999. Enzymic saccharification of alfalfa fibre after liquid hot water pretreatment. *Process Biochemistry* 35: 33-41.
- Stenberg, K., M. Bollók, K. Réczey, M. Galbe, G. Zacchi. 2000a. Effect of Substrate and Cellulase Concentration on Simultaneous Saccharification and Fermentation of Steam-Pretreated Softwood for Ethanol Production. *Biotechnology and Bioengineering* 68(2):204-210.
- Stenberg, K., M. Galbe, G. Zacchi. 2000b. The influence of lactic acid formation on the simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of softwood to ethanol. *Enzyme and Microbial Technology* 26(1): 71-79.

Stenberg, K., C. Tengborg, M. Galbe, G. Zacchi. 1998. Optimisation of steam pretreatment of SO<sub>2</sub>-impregnated mixed softwoods for ethanol production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 71(4): 299-308.

Tengborg, C., K. Stenberg, M. Galbe., G. Zacchi, S. Larsson, E. Palmqvist, B. Hahn-Hägerdal. 1998. Comparison of SO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> impregnation of softwood prior to steam pretreatment on ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 70-72:3-15.

Tucker, M. P., K. H. Kim, M. M. Newman, Q. A. Nguyen. 2003. Effects of Temperature and Moisture on Dilute-Acid Steam Explosion Pretreatment of Corn Stover and Cellulase Enzyme Digestibility. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 105–108: 165-177.

Uusitalo, J. M., K. M. H. Nevalainen, A. M. Harkki, J. K. C. Knowles, M. E. Penttila. 1991. Enzyme-Production by Recombinant *Trichoderma-Reesei* Strains. *Journal of Biotechnology* 17:35-49.

Wen, Z. Y., W. Liao, S. L. Chen. 2004. Hydrolysis of animal manure lignocellulosics for reducing sugar production. *Bioresource Technology* 91: 32-39.

Xiao, Z. Z., R. Storms, A. Tsang. 2004. Microplate-based filter paper assay to measure total cellulase activity. *Biotechnology and Bioengineering* 88:832-837.

Yáñez, R., J. L. Alonso, J. C. Parajó. 2006. Enzymatic saccharification of hydrogen peroxide-treated solids from hydrothermal processing of rice husks. *Process Biochemistry* 41: 1244-1252.

Zhu, S. D., Y. X. Wu., Z. N. Yu, Q. M. Chen, G. Y. Wu, F. U. Yu, C. W. Wang, S. W. Jin. 2006c. Microwave-assisted alkali pre-treatment of wheat straw and its enzymatic hydrolysis. *Biosystems Engineering* 94 (3): 437-442.

Zhu, S. D., Y. X. Wu, Z. N. Yu, J. T. Liao, Y. Zhang. 2005a. Pretreatment by microwave/alkali of rice straw and its enzymic hydrolysis. *Process Biochemistry* 40: 3082-3086.

Zhu, S. D., Y. X. Wu, Z. N. Yu, C. W. Wang, F. U. Yu, S. W. Jin, Y. G. Ding, R. A. Chi, J. T. Liao, Y. Zhang. 2006a. Comparison of Three Microwave/Chemical Pretreatment Processes for Enzymatic Hydrolysis of Rice Straw. *Biosystems Engineering* 93(3):279-283.

Zhu, S. D., Y. X. Wu, Z. N. Yu, X. A. Zhang, C. W. Wang, F. U. Yu, S. W. Jin, Y. F. Zhao, S. Y. Tu, Y. P. Xue. 2005b. Simultaneous Saccharification and Fermentation of Microwave/Alkali Pre-treated Rice Straw to Ethanol. *Biosystems Engineering* 92 (2): 229-235.

Zhu, S. D., Y. X. Wu, Z. N. Yu, X. A. Zhang, C. W. Wang, F. U. Yu, S. W. Jin. 2006d. Production of ethanol from microwave-assisted alkali pretreated wheat straw. *Process Biochemistry* 41: 869-873.

Zhu, S. D., Y. X. Wu, Z. N. Yu, X. Zhang, H. Li, M. Gao. 2006e. The effect of microwave irradiation on enzymatic hydrolysis of rice straw. *Bioresource Technology* 97:1964-1968.

Zhu, S. D., Y. X. Wu, Y. F. Zhao, S. Y. Tu, Y. P. Xue, Z. N. Yu, X. A. Zhang. 2006b. Fed-Batch simultaneous saccharification and fermentation of Microwave/Acid/Alkali/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pretreated rice straw for production of ethanol. *Chemical Engineering Communications* 193:639-648.

尤立智。2003。嗜高溫纖維分解菌纖維分解酵素的探討。碩士論文。台北：台灣大學生物

產業機電工程學研究所。

齊倍慶。2000。從堆肥中篩選纖維素分解酵素生產菌及其酵素性質研究。碩士論文。新竹：國立清華大學生命科學研究所。

戴上凱。2004。熱穩定性纖維素分解細菌分離株之特性探討與親緣關係之研究。博士論文。高雄市：國立中山大學生物科學研究所。