

《Softwood》⇒《Steam explosion》⇒【Delignification】⇒《EH》

Yang, B., A. Boussaid, S. D. Mansfield, D. J. Gregg, J. N. Saddler. 2002. Fast and efficient peroxide treatment to enhance the enzymatic digestibility of steam-exploded softwood substrate. *Biotechnology and Bioengineering* 77(6): 678-684.

《背景》

最近二十年間，有越來越多之研究評估將 wood residues 轉換成乙醇之可行性。許多國家，如加拿大、瑞典、美國與紐西蘭等，也有相當多之投入集中在由 softwood residues 產生之 wood wastes。儘管有密集之研究，但到目前為止，仍然沒有經濟上可行之製程可以為軟木與乙醇之生物轉換下定義。

過去，以酸或 SO_2 催化之蒸汽爆裂法已經廣泛地被應用，並可有效地用來取得單醣形式之半纖維醣，進而提高前處理物之酵素水解產率。研究結果也顯示，在嚴苛之前處理條件下，富含纖維素之前處理物可以完全地被酵素水解，然因降解現象之發生，導致相當大比例之醣流失。這些降解產物常對醱酵微生物產生抑制作用。之前以 Douglas-fir wood chips 作為料源之研究指出，降低前處理條件之嚴苛度，還是有可能獲得較高之半纖維醣收率，並限制抑制物之產生。然而，抽出半纖維素後剩下來富含纖維素之前處理物，需要較高劑量之酵素才能獲得較完整之水解。

為了提高低度或中度嚴苛條件下蒸汽爆裂前處理後之前處理之可水解性，需要額外之後處理 post-treatments 程序，例如二階段蒸汽爆裂。使用二階段蒸汽爆裂之主要缺點在於殘留之木質素仍然很高，殘留之木質素不僅會妨礙水解，也會限制酵素之循環回收。此外，來自降解所造成之醣損失在二階段蒸汽爆裂中會增加。

另一後處理 post-treatments 之替選方法就是鹼性過氧化氫處理法。鹼性過氧化氫處理法最早用於草本物料，接著也用來處理硬木基質。不管是草本或硬木基質，鹼性過氧化氫處理法可以讓大部分之 lignaceous material 被溶解與回收，有助於後續之酵素水解。然有研究指出，鹼性過氧化氫處理法用於軟木之效果低於硬木。儘管如此，將蒸汽爆裂前處理過之軟木，再於 pH 11.5 下，以 1%之 H_2O_2 處理，仍可見到酵素水解效果大幅度提升。

《目的》

本研究之重點在於利用鹼性過氧化氫處理法，提高蒸汽爆裂前處理後之軟木之酵素水解產率。

《料源》

以 Douglas-fir sapwood 與 heartwood wood 作為料源，先切削後，篩選出相對勻稱且尺寸約 $4 \times 4 \times 1\text{cm}$ 之碎片。

《蒸汽爆裂 Steam explosion》

每批乾重為 50 g 之碎片，於 195°C 、4.5 min 與 4.5% (w/w)之 SO_2 等條件下，予以蒸汽爆裂前處理。該條件係由 13 組試驗 – 五種不同之 SO_2 含量、溫度與時間中篩選出來，具有最高之纖維醣與半纖維醣收率，其他之條件不是有明顯之醣損失，就是前處理物難以酵素水解。

《鹼處理 Alkali treatment》

將蒸汽爆裂前處理後、水清洗過之物料，於基質濃度 5%、溫度 25、45 或 60°C、攪拌速度 800 rpm 下，以 0.4% (w/w) 之 NaOH 溶液萃取，然後過濾除可溶之物料後，殘留下來者即為不可溶於鹼之物料。鹼處理後之物料以 1.0 N 之 aqueous acetic acid 中和，再的去離子水徹底清洗。使用溫度為 25、45 或 60°C 之鹼處理分別稱為 cold、warm 或 hot alkali treatment。

《過氧化氫處理 Peroxide treatment》

將物料¹利用濃度 0.21%~1%不等之 H₂O₂，於基質濃度為 2%、溫度為 25 或 80°C、pH 為 11.5 等條件下，進行 12 h、1h、45 min、30 min、15 min 之過氧化氫處理。過氧化氫處理階段並未使用 NaOH 調整 pH 值，而是 The peroxide was first applied directly to the alkali-washed residue without adjusting the pH to 11.5, and then added to the water- washed substrate with pH adjusted to 11.5.

《水解試驗 Hydrolysis experiments》

Batch hydrolysis experiments were conducted at 2% solids concentration (g dry weight/100 mL) in 50 mM acetate buffer, pH 4.8, containing 40 mg/mL tetracycline and 30 mg/mL cycloheximide. Flasks were pre-incubated at 45°C on the rotary shaker at 150 rpm for 10 min, and the enzymes were added to start the hydrolysis after acclimation. Aliquots of 0.5 mL were taken at different times (0, 0.2, 1, 4, 8, 12, 24, 48, and 72 h), immediately chilled on ice, and centrifuged at 5,000g for 10 min. Total sugar analyses were performed carried out on the resultant supernatants. (將基質濃度 2% (w/V) 之物料置入 50 mM 之醋酸鹽緩衝液中，該緩衝液之 pH 值為 4.8，含有 40 mg/mL 之 tetracycline 與 30 mg/mL 之 cycloheximide。使用 rotary shaker，將燒瓶於 45°C 與 150 rpm 下，預培養 10 分鐘，然後加入酵素，至環境適應後啟動水解反應。)

《酵素 Enzymes》

用於水解試驗之酵素係由 Novo Nordisk 所提供。用於酵素水解之酵素係由 complete cellulase (Celluclast) 與 β -glucosidase (Novozym 188) 以 FPUase:CBUase=1:1.75 之比例混合而成。實際用於酵素水解之酵素劑量則以 FPUase/g cellulose 為單位，其中，FPU 為 Celluclast 與 Novozym 188 之活性和。Celluclast 之活性為 84 FPU/mL、500 carboxymethylcellulase (CMCase) IU/mL 與 50 β -glucosidase IU/mL，Novozym 188 之活性為 8 FPU/mL、32 CMCase IU/mL 與 480 β -glucosidase IU/mL。

《RESULTS AND DISCUSSION》

要將醣與木質素之降解產物最小化，且能提高酵素水解之功效，過去之研究都集中在使用不同嚴苛程度之蒸汽前處理方法上。過去之研究顯示，嚴苛程度較低之前處理可以產生富含半纖維醣，適合用來發酵之前處理液或稱為前水解液 pre-hydrolyzate，嚴苛程度較高之前處理則產生對酵素水解靈敏度較高之前處理物，前者之降解產物較低，後者之降解產物較高。當然，中度前處理條件者，可以在半纖維醣收率、前處理液可醱

¹ 物料應該有兩種，一種為鹼處理後之物料，另一種為蒸汽爆裂處理後之物料。

酵性與纖維素之酵素水解間獲得 compromise。)

本研究以 Douglas-fir wood 作為料源，於嚴苛程度屬於中度之條件 (195°C、4.5 min 與 4.5% SO₂) 下蒸汽前處理，前處理後料源中 88%之醣分被留在前處理物內【Loss=7.9 (G+H) ÷ 68.7 (C+H) = 12%】，即前處理物內有 C44.1、L28.6、H16.7，經水洗後可溶醣佔 43% (【WS to Fermentation 之 G+H=26.1】÷【前處理物內之 C+H=60.8】=43%)。圖 1²與原文不同。)

《木質素移除 Lignin removal》

從木質素移除之角度來看，最佳之後處理程序為結合鹼處理與過氧化氫處理。表 1 顯示，單獨之鹼處理即使在高溫下也無法大幅改變物料內之木質素含量。過去兩個研究以硬木為料源，發現單獨之鹼處理皆有利於木質素之移除且提高可消化性。但本研究以 0.4% (w/w) 之 NaOH 溶液分別於 25、45、60°C 予以鹼處理，卻發現仍有大部分之木質素殘留下來 (40%、38%、31%)。若在 cold alkali treatment 之後，添加 1% 之 H₂O₂，於 pH 值 11.5 下，氧化氫處理 12 小時，可明顯看出去木質化之效果，木質素含量降低至 16%。Kadla et al.指出，木漿漂白過程中，於鹼條件下過氧化氫與木質素之 aliphatic 及 aromatic 結構發生反應，導致去聚合作用，有效移除木質素。其它研究也顯示，鹼性過氧化氫處理已經用於 herbaceous residues、steam-exploded hardwoods 與 softwood materials。

《酵素水解 Enzymatic Hydrolysis》

以蒸汽爆裂前處理後之物料作為基質 (WI)，利用劑量 20 FPU/g cellulose 之酵素水解 48 小時後，水解率僅有 45%。若以先蒸汽爆裂前處理，再以鹼性過氧化氫處理後之物料作為基質 (WIAP)，酵素水解率可提高至 92%。由表 1 來看，儘管單獨之鹼處理會移除部分木質素，但隨後之酵素水解並沒有改善 (圖 1)。甚至以 hot alkali (60°C) 處理者比起僅以蒸汽爆裂前處理者，還出現醣產率微降之情形。這種負面現象也已被其他研究者發現，他們認為有部分木質素於鹼處理過程中重新分布，造成纖維素可供酵素 access 之表面積降低。

《最佳鹼性過氧化氫處理 Optimization of the Alkaline Peroxide Treatment》

過氧化氫處理分別以鹼處理後之物料與蒸汽爆裂處理後之物料作為基質，前者直接將過氧化氫加入鹼處理後之物料中，pH 值維持在 7.5，後者則將過氧化氫加入蒸汽爆裂處理後之物料，並利用 NaOH 調整 pH 值至 11.5。前者之 NaOH 用量為 0.118 g/g o.d. residue (用於鹼處理)，後者之 NaOH 用量為 0.038 g/g o.d. residue (用於調整 pH 值)。相較之下，前者之後續酵素水解效果並不好，意即在不經過鹼處理，而直接於 pH 值 11.5 下過氧化氫處理 12 小時，仍然可以獲得不錯之酵素水解效果。如此一來，當 NaOH 使用量從 0.118 g/g o.d. residue 降低至 0.038 g/g o.d. residue 時，仍可讓水解率從 45%提高至 92%。)

² 圖 1 內之數字代表 g。料源以 100 g 視之，其中有 68.7 g 之碳水化合物 (48.2 g 之纖維素、20.5 g 之半纖維素)，經蒸汽爆裂前處理後有 7.9 g 之碳化合物流失，剩下 60.8 g 之碳水化合物 (纖維素 44.1 g、半纖維素 16.7 g) 留在前處理物內，予以水洗後，留在前處理物內者剩下 34.7 g，有 26.1 g (葡萄糖 10.6 g、半纖維醣 15.5 g) 於前處理液內回收。如再進一步鹼性過氧化氫處理，則留在處理後物料內者有 30.3 g。總體而言，經過蒸汽爆裂前處理、水洗、鹼性過氧化氫處理與酵素水解後，總收率為 56.4 (=26.1 g+30.3 g) ÷ 68.7=82%。

以蒸汽爆裂前處理之物料作為基質，無需先行鹼處理，而直接進行鹼性過氧化氫處理，不僅可以縮短處理時間，也可以提高將後續之酵素水解率。若將鹼性過氧化氫處理之溫度提高為 80°C 且處理時間縮短為 45 分鐘，後續之酵素水解可將基質內之醣分完全 recovery。參考圖 3。

鹼性過氧化氫處理之溫度提高為 80°C，處理時間縮短為 45 分鐘，可將木質素含量由 46%減少至 8%。此結果與高溫下，過氧化氫與 lignaceous chromophoric compounds 快速反應，導致木質素分解之論點相符合。

在確認最佳 H₂O₂ 劑量部分，圖 4 顯示 H₂O₂ 劑量為 1%時，可以將基質內之纖維素完全水解。低 H₂O₂ 劑量，水解率大幅降低。

圖 5，以 1%之 H₂O₂，於 80°C、pH 11.5 下處理後，以劑量 20 FPU/g cellulose 之酵素水解 24 小時，可獲得完全之水解。若將酵素劑量降低至 10 FPU/g cellulose，則可在水解 48 小時後，獲得完全之水解。當以軟木作為基質時，過氧化氫處理可以降低酵素之劑量，進而降低乙醇之生產成本。當然這是在假設鹼性過氧化氫處理階段，醣損失最少之情況下。

由於過氧化氫是一種很強之氧化劑，因此在過氧化氫處理階段產生醣損失當然是不足為奇。到底在每一階段所造成之損失有多少？首先以 100 g 之料源為例，其中有 68.7 g 之碳水化合物（48.2 g 之纖維素、20.5 g 之半纖維素），經蒸汽爆裂前處理後有 7.9 g 之碳水化物流失，剩下 60.8 g 之碳水化合物（纖維素 44.1 g、半纖維素 16.7 g）留在前處理物內，予以水洗後，留在前處理物內者剩下 34.7 g，有 26.1 g（葡萄糖 10.6 g、半纖維醣 15.5 g）於前處理液內回收。如再進一步鹼性過氧化氫處理，則留在處理後物料內者有 30.3 g。總體而言，經過蒸汽爆裂前處理、水洗、鹼性過氧化氫處理與酵素水解後，總收率為 56.4（= 26.1 g + 30.3 g）÷ 68.7 = 82%。

《結論 Colclusion》

嚴苛程度屬於中度之條件下蒸汽前處理【195°C、4.5 min 與 4.5% SO₂】→鹼性過氧化氫處理【1% 之 H₂O₂、pH 11.5、80°C、45 min】→酵素水解【劑量 10 FPU/g cellulose、48 小時】→82%收率。】