

## 《Olive tree wood》⇒《Steam explosion》⇒【Delignification】⇒《EH》

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.

### 《背景》

利用木質纖維素作為生產燃料乙醇之一種可再生料源，持續激發更多之興趣。在木質纖維素料源中，使用農業廢棄物還兼具有解決廢棄物處置問題之優點。

在地中海地區國家，種植超過 8 百萬公頃之橄欖樹。每年必要之剪枝作業，產生非常多之木質纖維素廢棄物，預估每公頃有 3000 公斤。剪下之殘枝裡頭有 30% 之木材，因幾乎沒有工業上之用途，僅能分離出來作為燃料。到目前為止，沒有研究是利用橄欖木材作為生產乙醇之料源。

前處理在生物轉換過程中具關鍵性之角色，除必須要能提高醣之形成外，又得必須避免碳水化合物之降解或流失，以及避免抑制物之生成危及後續水解與醱酵製程。當然，還得具有成本效益。各種前處理方法中，蒸汽爆裂法已普遍應用。蒸汽爆裂法是讓料源曝露於高壓之蒸汽中，然後迅速減壓，造成木質纖維素結構之瓦解、纖維素之水解、木質素之 depolymerization 與 defibration 等，進而提高纖維素之可親近性。蒸汽爆裂前處理法有其優點，但也有可能之問題必須考慮。

為了提高前處理物之可消化性，鹼性過氧化氫去木質化步驟已經被應用到如草本廢棄物、蒸汽爆裂處理後之硬木與軟木、酸前水解後之物料上，具有利於環境與降低毒性等優點。其他去木質化程序，如 Na-chlorite extraction，也已經被應用到蒸汽爆裂處理之物料。

### 《目的》

以橄欖樹木 (olive tree wood) 為料源，從前處理物對於酵素水解之敏感度 susceptibility，纖維醣與半纖維醣之收率等評估溫度對於前處理效果之影響，以及於前處理後再予以去質化處理之必要性。

### 《料源》

橄欖採收後，收集桿徑較粗之橄欖木作為料源，先於室溫下風乾至含水率約 10%，然後以 hammer mill 研磨至顆粒小於 10 mm，經一批批均質化後儲存備用。表 1 彙整料源之組成。纖維素（以葡萄糖代表）與酸不可溶木質素（AIL）含量分別為 34.4% 與 18%，低於 eucalyptus、白楊樹與雲杉等木材。若加上可在水解過程中被溶解之酸可溶木質素（acid soluble lignin），則總木質素含量為 20.4%。其他，半纖維素醣佔 20.3%（木糖（Xylose）佔 16.0%、甘露糖（Mannose）1.4%、半乳糖（Galactose）佔 1.0%、阿拉伯糖（Arabinose）佔 1.9%），落在櫟樹與白楊等硬木之範圍；乙醯基（acetyl group）、灰分與萃取物（extractive），分別佔 1.8%、1.7% 與 15.4%。萃取物內含有非結構性成分，如 waxes、fats、tannins、sugars、resins 與 colouring matter。

### 《蒸汽爆裂前處理 Steam Explosion》

蒸汽爆裂前處理部分，係取 200 g 之料源置入容積為 2 L 之反應槽（該反應槽最高承受之壓力為 4.12 MPa

), 再以飽和蒸汽加熱至 190、210、230、240° C, 停留 5 分鐘, 經爆裂後排入旋風筒 (cyclone) 中回收, 冷卻至 40° C, 過濾分離前處理物 (本文稱為 Water-insoluble fiber) 與前處理液 (本文稱為 Water-soluble extract 或 prehydrolysate), 前者分析葡萄糖 (Glucose)、木糖 (Xylose)、甘露糖 (Mannose)、半乳糖 (Galactose)、阿拉伯糖 (Arabinose) 與酸不可溶木質素 (AIL) 之含量 (表 2), 後者分析葡萄糖 (Glucose)、木糖 (Xylose)、甘露糖 (Mannose)、半乳糖 (Galactose)、阿拉伯糖 (Arabinose)、醋酸 (Acetic acid)、甲酸 (Formic acid)、糠醛 (Furfural)、羥甲糠醛 (Hydroxymethylfurfural; HMF) 含量、pH 值 (表 3)。

### 《鹼性過氧化氫去木質化處理 Alkaline peroxide delignification》

去木質化處理部分, 係於基質濃度 4 % (w/v) 下, 將 SE 前處理後之前處理物置入 1 % (w/v) 之 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液, 經以 4 M 之 NaOH 調整 pH 值至 11.5, 再於溫度 80° C 下處理 45 分鐘。去木質化處理後之前處理液予以過濾, 取得去木質化處理後之處理物 (稱為 Solid fraction) 經水洗至中性 pH 後, 予以乾燥、秤重, 分析分析葡萄糖 (Glucose)、木糖 (Xylose)、甘露糖 (Mannose)、半乳糖 (Galactose)、阿拉伯糖 (Arabinose) 與酸不可溶木質素 (AIL) 之含量。(表 4)

### 《酵素水解 Enzymatic hydrolysis》

酵素水解部分, 係於基質濃度 10% (w/v) 下, 將 SE 前處理後 (或進一步去木質化處理後) 之前處理物、劑量 15 FPU/g substrate 之水解纖維素複合體 (Cellulolytic complex) Celluclast 1.5L 與劑量為 12.6 IU/g substrate 之 β-葡萄糖苷酶 (β glucosidase) Novozyme 188 等置入 0.05 M 之檸檬酸鈉緩衝液 (sodium citrate buffer, pH 4.8), 並於反應溫度 50° C 下, 使用 150 rpm 之旋轉搖盪器 (rotary shaker), 進行 72 小時之水解反應, 反應期間每隔 24 小時取樣分析葡萄糖濃度。

### 《Analysis》

料源與前處理物組成分析採用 NREL 方法。分析項目包括 cellulose、hemicellulose、acid-insoluble lignin。

前處理液之 glucose、xylose、arabinose、mannose、galactose 等糖含量利用 HPLC 分析。

酵素水解液之 glucose 含量利用 HPLC 分析。

前處理液之 furfural 與 hydroxymethylfurfural 含量利用 HPLC 分析。

前處理液之 acetic acid 與 formic acid 含量利用 HPLC 分析。

### 《結果—蒸汽爆裂後之前處理物》

表 2 彙整不同前處理溫度下, 前處理後總重量收率與前處理物之組成。結果顯示, 總重量收率【=前處理物重量÷料源乾重】隨前處理溫度之提高而降低, 由 190° C 之 54.2%, 降低至 240° C 之 40.4%, 降低之因素主要來自於半纖維素之溶解。

### 《半纖維糖》

半纖維素之溶出醣部分，阿拉伯糖在最低溫度下即已完全溶解，其他如木糖 (Xylose)、甘露糖 (Mannose) 與半乳糖 (Galactose) 等之溶解度隨前處理溫度提高而增加。

### 《纖維素》

纖維素相對含量，隨前處理溫度之提高而增加，由 190° C 之 50.5%，上升到 230° C 之 64.4%，惟在前處理溫度提高到 240° C 時，因本身之大量溶解，導致含量下降為 56.2%。若從相對於料源乾重之角度來看，則纖維素之絕對含量由 190° C 之 27.4%，下降為 240° C 之 22.7%，顯示蒸汽爆裂過程確實有部分纖維素被溶解。

### 《AIL》

The contents in acid-insoluble lignin (AIL) of the pretreated residue referred to raw material (data in brackets in Table 2) decrease in general with temperature showing a slight solubilisation; this result agrees with that reported for steam exploded poplar biomass [17].

(酸不可溶木質素 (AIL) 相對含量，因半纖維素之溶解而隨前處理溫度之提高而呈現微幅增加，由 190° C 之 31.4%，增加為 240° C 之 38.2%。若從相對於料源乾重之角度來看 (表中括弧內之數字)，則 AIL 絕對含量隨前處理溫度之提高而降低，由 190° C 之 17.0%，下降為 240° C 之 15.4%，顯示蒸汽爆裂過程確有部分木質素被溶解。)

### 《結果—蒸汽爆裂後之前處理液》

The composition of filtrates after pretreatment and posthydrolysis is shown in Table 3. Sugars (glucose as well as hemicellulosic-derived sugars) were recovered mainly in oligomeric form in the water-soluble fraction and only a small amount of monosaccharides was detected; considerable amounts of oligomers as a result of steam pretreatment have also been reported by other authors [18,19]. Oligomers cannot be directly metabolised by microorganisms and a hydrolysis of oligosaccharides in an acid-catalysed step (posthydrolysis) is needed to obtain a sugar solution suitable as a fermentation media. (表 3 彙整不同前處理溫度下前處理液之組成。前處理液內之醣分主要為寡醣，只有一小部分為單醣。一如其他研究報告，這種以寡醣為主之現象，係來自於蒸汽爆裂前處理之結果。由於寡醣無法被微生物代謝，進一步之酸催化步驟—後水解 posthydrolysis 具有必要性。)

### 《Acetic acid、furfural、HMF》

表 3 中也可看出前處理液內之醋酸 (Acetic acid)、甲酸 (Formic acid)、糠醛 (Furfural)、羥甲糠醛 (Hydroxymethylfurfural; HMF) 含量。這些物質其實就是酵母菌成長之抑制物。醋酸係來自半纖維素之乙酰基 (-COCH<sub>3</sub>)，糠醛與羥甲糠醛則為五碳醣與六碳醣之降解產物，甲酸是糠醛與羥甲糠醛在高溫與酸環境下所形成。依據觀察，在前處理溫度為 230° C 時，前處理液之醋酸與甲酸含量皆達到最高值，而在該溫度下，前處理液之醣濃度則降低。Furfural 與 HMF 則除了在最高前處理溫度下比較明顯外，其它之前處理溫度下濃度皆不大。雖然，前處理液內之降解產物可以部分被解讀為來自前處理物內五碳醣與六碳醣之流失，

也有可能是來自半纖維素與其他物質因降解產物揮發與濃縮反應所產生之流失。

### 〈pH〉

前處理液之 pH 值範圍為 3.3~3.7。前處理溫度越高，pH 值越低。

### 〈纖維素與半纖維素收率〉

圖 1 為各種前處理溫度下，前處理物與前處理液內之纖維素與半纖維素收率（以料源內之纖維素與半纖維素為基準）。由前處理物內之纖維素收率，可以看出部分纖維素被溶解。儘管前處理之纖維素收率越高越好，但整體製程之最佳化與如何確保基質最高利用率之關鍵因素還是在於「前處理物內之纖維素對於酵素水解之敏感度」與「前處理液內之半纖維糖收率」。前處理物內之半纖維糖收率，隨前處理溫度之上升而降低，由 37% 下降至 5%。

至於前處理液內之半纖維糖收率，在前處理溫度為 190 與 210 °C 時，還超過 40%。當前處理溫度升高為 230 與 240 °C 時，半纖維糖收率則降低。

因為糖降解之關係，導致高半纖維素溶解度並不相等於高半纖維糖收率：1. 前處理溫度為 230、240 °C 時，半纖維素之溶解度高於 95%，但前處理液內之半纖維糖收率卻低於 30%；2. 前處理溫度為 190、210 °C 時，半纖維素之溶解度低於 95%，但前處理液內之半纖維糖收率則高於 40%。

### 〈結果—去木質化後 Alkaline peroxide delignification〉

經去木質化後之處理物組成彙整於表 4。去木質化後之重量收率 = 去木質化後之處理物重量 ÷ 蒸汽爆裂前處理後之前處理物乾重。去木質化處理後之處理物重量收率，隨蒸汽爆裂溫度之增加而降低，由 190 °C 之 69.1%，降低至 230 °C 之 57.8%，240 °C 時又回升為 58.9%，其主要因素係來自於木質素之被溶解，且前處理溫度越高，溶解度越大。木質素溶解之結果，纖維素在前處理物內之相對含量隨前處理溫度之提高而增加，由 190 °C 之 64.0%，上升到 230 °C 之 90.3%，惟在前處理溫度提高到 240 °C 時，因本身之大量溶解，導致含量下降為 85.8%。進一步檢視前處理溫度為 230 °C 者，纖維素含量由未經去質化處理者之 64.4% 提高至有經去木質化處理者之 90.3%。

表 4 括弧內之數字係相對於料源重量之組成 = 相對組成 × total gravimetric recovery × delignified solid recovery。以相對於料源重量之 Glucose 含量為例：24.0 (表 4) = 64.0 × 54.2% × 69.1%。表 5 為蒸汽前處理與去木質化處理後葡萄糖、半纖維糖與 AIL 相對於蒸汽爆裂前處理物與料源之收率。以相對於料源之葡萄糖收率為例：69.7% = 24.0% ÷ 34.4% (表 1)；以相對於蒸汽爆裂前處理物之葡萄糖收率為例：87.5% = 24.0% ÷ 27.4% (表 2)。

蒸汽前處理溫度越高，越有助於去木質化之效果。AIL 含量由 190 °C 之 20.7%，下降至 240 °C 之 12.5%。若從相對於原料乾重之角度來看，AIL 含量由 190 °C 之 7.8%，下降為 240 °C 之 3.0%。殘留之木質素含量僅為原有 18% 之 20% 左右。Heitz et al. 之研究也指出，隨前處理條件嚴苛程度之提高，先蒸汽爆裂前處理再以 NaOH 去木質化後，殘留之木質素由 90% 下降至 10%。其理由來自：越高之蒸汽溫度，對纖維素結構之破壞越深入，越有助於木質素在去木質化階段之溶解。

在去木質化處理過程中，也有部分醣因此而流失，這個事實對半纖維醣而言相當重要，雖然半纖維醣在前處理物內之含量已經很低。值得注意者，過氧化氫是一種相當強之氧化劑，會與所有木材成分不分青紅皂白地產生反應，造成醣降解。醣之溶解除除了發生在化學處理階段外，也發生在水洗階段。

### 《結果一酵素水解後之葡萄糖濃度》

表 6 彙整先以不同溫度蒸汽爆裂前處理，再經或未經去木質化處理後，於 72 小時酵素水解過程中，第 24、48、72 小時測得之水解液葡萄糖濃度 (g/L)。葡萄糖濃度隨酵素水解時間或蒸汽爆裂溫度之增加而增加，惟以 240° C 前處理者，葡萄糖濃度反而下降。比較有無再經去木質化處理之酵素水解產率，顯示有經去木質化處理者，酵素水解結果優於未經去木質化處理者，且未經去木質化處理者，葡萄糖濃度並未隨水解時間之拉長而增加。以前處理溫度 190° C 為例，僅經蒸汽爆裂前處理者，於 72 小時之酵素水解後可獲得濃度為 3.1 g/L 之葡萄糖，若在蒸汽爆裂前處理後再經去木質化處理者，獲得之葡萄糖濃度提高至 39.6 g/L。超過 10 倍。

蒸汽爆裂前處理後再經去木質化處理者，酵素水解之結果確實較佳，不管前處理溫度高低，提高酵素水解敏感度之效果非常明顯，以前處理溫度 190° C 者為例，有無再經去木質化處理之葡萄糖釋出濃度就差了 10 倍。在葡萄糖濃度與水解時間之關係方面，有再經去木質化處理者，葡萄糖濃度隨水解時間之增加而增加，未經去木質化處理者，葡萄糖濃度並未隨水解時間之拉長而增加。有再經去木質化處理者之葡萄糖濃度最高為 51.3 g/L，這個結果已經讓水解液很適合作為醱酵培養基 fermentation broth，而不需要再經過任何高成本之濃縮程序。

圖 2 為有無再經去木質化處理者，經 72 小時酵素水解後測得之酵素水解產率 (=72 小時水解後之葡萄糖濃度÷前處理物內之潛在葡萄糖)。結果顯示，有再經去木質化處理者，明顯有助於酵素水解產率。

與預期有些出入者，在於最高之酵素水解產率 61.9%發生在前處理溫度為 190° C 時，且水解產率隨蒸汽爆裂溫度之提高而降低。由於本研究使用之基質濃度為 10%，在高溫下要維持較高之葡萄糖濃度，恐怕得面對葡萄糖之抑制作用。為了驗證葡萄糖之抑制作用，將基質濃度由 10% (w/v) 降低至 2% (w/v)，則酵素水解產率反而隨蒸汽爆裂溫度之提高而增加，在前處理溫度 190、210、230、240° C 下，酵素水解產率分別為 51.3、65.8、76.5、77.3%，顯見當基質濃度為 10% (w/v) 時，水解產率確實受到葡萄糖抑制作用之影響。

Ramos et al. 以 eucalyptus、aspen 與 spruce wood 作為料源，先以蒸汽爆裂前處理再經去木質化處理，於基質濃度 10% 下，獲得 50、60 與 70% 之酵素水解產率。Robinson et al. 於基質濃度 5% 下獲得 84.3% 之水解產率與 40 g/L 之葡萄糖濃度。

### 《結果一整體產率 Overall process yields》

表 7 彙整不同前處理溫度下，先以蒸汽爆裂前處理後之前處理液與前處理物醣收率，以及再經去木質化處理後之處理物醣含量，然後再予以酵素水解之產率。結果顯示，前處理液內醣收率最高者，為前處理溫度為 190 與 210° C。加計前處理後之前處理液醣收率與酵素水解後之葡萄糖收率所得之 overall process yield 顯示，最高值係來自先以 190° C 蒸汽爆裂前處理再經去木質化處理者，在該條件下可於前處理階段由 100 g 之料源獲得 14.0 g 之醣，並於酵素水解階段獲得 14.8 g 之醣，總計 28.8 g，為理想值 54.7 g 之 52.6%。

即料源內之 potential sugars 有一半以上可用來轉換成乙醇。較高之蒸汽溫度，反而降低整體製程產率，但所得之葡萄糖濃度卻較濃，適合於有效之乙醇轉換製程。SSF 製程移除最終產物之抑制作用。

### 《結論 Conclusions》

最佳之製程是先於 190° C 下蒸汽爆裂前處理，再經去木質化處理後，然後於基質濃度 10% (w/v) 下水解 72 小時。可於前處理階段由 100 g 之料源獲得 14.0 g 之醣，並於酵素水解階段獲得 14.8 g 之醣，總計 28.8 g，為理想值 54.7 g 之 52.6%。即料源內之 potential sugars 有一半以上可用來轉換成乙醇。