

《Olive tree》⇒《Steam explosion/Liquid hot water》⇒【Delignification】⇒《EH》

**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.**

### 《背景》

Lignocellulosic resources 是一種再生、低成本且來源豐沛之能源。利用 Lignocellulosic resources 生產乙醇不僅可以解決環境與廢棄物問題，更可以降低溫室氣體排放與減緩石化燃料短缺之壓力。

從木質纖維素生產乙醇之製程包括前處理、酵素水解與醱酵等三個步驟。其中，前處理與酵素水解之目標在於把碳水化合物高分子聚合物切斷成 low-molecular weight sugars，以便微生物可以把它們醱酵成乙醇，而前處理步驟又特別賦予「透過半纖維素與木質素之移除，提高纖維素在水解步驟中可消化性」之目的。在前處理方法中，hydrothermal pretreatments 可以在無需化學品下，打破木質纖維素之結構。在 hydrothermal pretreatments 中，高壓熱水前處理法與蒸汽爆裂前處理法已經廣泛地應用於農業廢棄物。此外，為了提高前處理後之纖維素可消化性，鹼性過氧化氫去木質化程序也已經被應用在許多 biomass 上。

水解是生物轉換之關鍵步驟，可使用酸或酵素。酵素水解相較於酸水解，具有設備成本低、葡萄糖產率高與不會產生降解產物等優點，但酵素之使用卻又是乙醇生產成本較高之因素之一。木質素未能在前處理過程中移除而殘留在前處理物內，除了限制酵素水解之效率外，也造成降解產物之產生。從整體經濟成本考量，從醱酵中得到之乙醇濃度越高越好，而從酵素水解過程中取得之葡萄糖濃度也是越多越好。如何可以取得較高濃度之葡萄糖？其中之一條途徑就是酵素水解之基質越多越好，然而，使用大量基質之結果，卻衍生攪拌困難與葡萄糖抑制酵素之後遺症。

在橄欖樹栽種中，剪除殘枝有其必要性。剪除之殘枝中，直徑小於 5 cm 之細枝與葉子佔 70%，其餘直徑大於 5 cm 之木材佔 30%。過去之處理方式：fire wood or burnt in small、local industries、left or burnt in the field、paper production。現在，則已經被開始考慮作為生產乙醇之料源。

### 《目的》

本研究以橄欖樹剪下之殘枝作為料源，探討基質劑量、黏稠度對酵素水解之葡萄糖濃度與產率之影響。在前處理部分，則除採用高壓熱水與蒸汽爆裂前處理等方法外，並選擇性地在 LHW、SE 前處理後，再以鹼性過氧化物（alkaline peroxide,  $H_2O_2$ ）去木質化（delignification）處理，觀察去木質化處理程序對於前處理物之影響。

### 《料源》

橄欖採收後，收集含有細枝與葉子之殘枝作為料源，先在田間剝碎後，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。

橄欖樹剪下之殘枝組成包括：纖維素（以葡萄糖代表） $25.0\pm 1.2\%$ 、半纖維素糖  $15.8\%$ （木糖  $11.1\pm 0.6\%$ 、其他糖  $4.7\pm 0.6\%$ ）、酸不可溶木質素（AIL） $16.6\pm 0.5\%$ 。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 18.8%。其他如乙醯基 (acetyl group)、灰分與萃取物 (extractive)，分別佔 2.5%、3.4%與 31.4%。萃取物內含有 7.9%之葡萄糖，將在前處理過程釋出流入前處理液中。

### 《高壓熱水前處理 Liquid Hot Water》

高壓熱水 (LHW) 前處理部分，係於容積為 2 L 之反應槽內，置入 200 g 之料源與固液比 (solid/liquid ratio) 為 1/5 (w/v) 之水，於 3 MPa 之壓力經 50 分鐘加熱至 210°C，並於高溫下持續 10 分鐘，然後於 5 分鐘內降溫至 100°C。該反應槽具有一電子加熱器與磁性攪拌器，其溫度及速度控制器與 furnace power control 及 motor speed control 結合在一起。

### 《蒸汽爆裂前處理 Steam Explosion》

蒸汽爆裂前處理部分，係先將 200 g 之料源與 1 L 之水，經隔夜浸泡後，濾除多餘水分 (料源之含水率為 50%)，置入容積為 2 L 之反應槽內 (該反應槽最高承受之壓力為 4.12 MPa)，以飽和蒸汽加熱至 240°C，經 5 分鐘停留後，予以爆裂，於旋風筒 (Cyclone) 中回收爆裂後之物料。

### 《前處理後之物料處理》

兩種前處理都共有三批次，前處理後將三批次之物料混合，然後將混合之物料經固液分離後分別回收，不可溶之前處理物 (本文稱為 Water-insoluble fiber) 以水清洗後，分析纖維素、半纖維素醣與 AIL 含量。

### 《鹼性過氧化處理 Alkaline peroxide treatment – 去木質化處理》

去木質化處理部分，係於基質濃度 4 % (w/v) 下，將 LHW 與 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經水洗至中性 pH 後，予以乾燥、秤重，分析纖維素、半纖維素醣與 AIL 含量。

### 《酵素水解部分》

酵素水解部分，係於基質濃度 2、5、10、20、30 % (w/v) 下，將 LHW、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 (Cellulytic complex) Celluclast 1.5L 與劑量為 15 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，反應期間並取樣分析葡萄糖濃度。

### 《Analysis》

料源組成分析採用 NREL 方法。分析項目包括 cellulose、hemicellulose、acid-insoluble lignin。

前處理後，前處理物之組成比照料源組成分析方法。

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

酵素水解液之 glucose 含量利用 HPLC 分析。

### 《結果－前處理物組成分析》

表 1 列出料源與經 LHW 及 SE 前處理後之前處理物組成。基於「基質濃度 5% 下，最高酵素水解產率」與「前處理物最高纖維素收率」，選定之高壓熱水前處理條件為【210 °C for 10 min】，蒸汽爆裂前處理條件為【240 °C for 5min、water impregnation】。在前處理條件下，前處理物總重量收率分別為 56±0.8% 與 51.0±0.6%，纖維素含量分別為 22.8%、22.2% based on dry weight of raw material，流失量約為 10%，然因半纖維糖（木糖與其他可溶糖）成分幾乎全部溶解，使得前處理物之纖維素相對含量分別提高為 40.7%（LHW）、43.5%（SE），多於料源內之纖維素含量。前處理物之 AIL 含量多於料源，顯示前處理過程中，糖或糖降解產物與其他來自萃取出之成分發生濃縮反應（Recondensation reaction），導致 AIL 中出現類木質素之結構。

### 《結果－前處理液組成分析》

從前處理液之葡萄糖與半纖維糖含量來看，經 LHW 前處理者，前處理液之葡萄糖與半纖維糖收率分別為 2.8 g glucose/100 g raw material 與 1.3 g hemicellulosic sugars /100 g raw material；經 SE 前處理者，前處理液之葡萄糖與半纖維糖之收率分別為 5.4 g glucose 與 5.4 g hemicellulosic sugars /100 g raw material。由於前處理液應包含由料源萃取出之葡萄糖（萃取出物內含有 7.9% 之葡萄糖），故從前處理液實際測得之葡萄糖含量來看，確知應有一部分之葡萄糖在前處理過程中被降解而造成損失，否則前處理液之葡萄糖含量不應如此低。

由前處理液內之糖種類來看，採 SE 前處理者，主要為寡糖，佔總糖之 76.5%，採 LHW 前處理者，有 45.5% 為寡糖。

### 《結果－高壓熱水後之酵素水解》

兩種前處理方法下之前處理物，於基質濃度 2 ~ 30% 下進行酵素水解，得知基質濃度越高者，所得之葡萄糖濃度越高，連帶地，乙醇醱酵濃度也會較高，而生產成本也必然較低。然而這也有缺點，因為高濃度之水解會造成攪拌混合困難與最終產物對酵素產生抑制作用。

圖 1 為經 LHW 前處理後之前處理物於基質濃度 2 ~ 30% 下進行酵素水解，所得之葡萄糖濃度與水解時間關係。結果顯示，經 LHW 前處理者，於酵素水解初期，葡萄糖濃度快速上升，然後逐漸緩下來。以基質濃度 2% 者為例，第 24 小時獲得之葡萄糖為第 72 小時之 67%。前 24 小時水解所釋出之葡萄糖濃度佔最終葡萄糖濃度之百分比，隨基質濃度之增加而增加。當基質濃度為 30% 時，第 24 小時獲得之葡萄糖濃度為第 72 小時之 78%。在基質濃度 30% 下，水解 72 小時獲得之葡萄糖濃度為 61 g/L。

### 《結果－蒸汽爆裂後之酵素水解》

圖 2 為經 SE 前處理後之前處理物於基質濃度 2 ~ 30% 下進行酵素水解，所得之葡萄糖濃度與水解時間關係。經 SE 前處理者，不管基質濃度高低，第 24 小時獲得之葡萄糖濃度平均約為第 72 小時之 83%。惟經 SE 前處理者，最終葡萄糖濃度卻比 LHW 前處理者低。以基質濃度 30% 者為例，最終葡萄糖濃度為 52 g/L，低於 LHW 前處理者之 61 g/L。

另外一差異在於經 SE 前處理者，前處理物之密度低於 LHW 前處理者，使得酵素水解溶液較難 access 與 wet 前處理物，這也就是何以基質濃度為 30%時只有在第 72 小時才出現前處理物之崩潰與溶解（圖 2 中，基質濃度為 30%者，只有在第 72 小時出現數據）；然而，20%之基質濃度已被認為是相當高之基質濃度，據作者了解，並沒有文獻探討過基質濃度超過 20%之酵素水解。事實上，基質濃度 $\geq$ 10%時，就會發生混合困難之問題。

表 2 為 LHW 與 SE 前處理後，不同基質濃度下，水解第 4、8、12、24、48、72 小時測得之酵素水解產率。結果顯示，以 LHW 前處理後之前處理物為對象，經 72 小時酵素水解後之水解產率隨基質濃度增加而降低，但葡萄糖濃度則隨基質濃度之增加而增加（圖 1）。在酵素水解初始階段，當基質濃度低於 20%，不同基質濃度間之水解產率差異不大，當基質濃度為 30%，水解產率相對其他條件下之水解產率低。這顯然與最終產物之抑制性及攪拌困難之總和效應有關，而這些問題在基質濃度 $\leq$ 20%時，並不會出現。

以 SE 前處理後之前處理物為對象者，除基質濃度 20%者之外，基質濃度對酵素水解產率之影響不大。至於基質濃度 30%者，前面提到之攪拌問題從水解一開始即發生。

把操作條件考慮進來，LHW 前處理且基質濃度 20%及 SE 前處理且基質濃度 10%者，可獲得濃度較高之葡萄糖溶液。從水解 72 小時之產率來看，使用 LHW 前處理者，酵素水解產率較高。若從水解前 24 小時之產率來看，基質濃度低於 10%時，使用 SE 前處理者，酵素水解產率較高。）

值得注意者，就算有再高之葡萄糖濃度，前處理物中仍有部分纖維素沒有被水解。如何充分利用纖維素？去木質化是一種可嘗試之步驟。因為前處理後之前處理物仍留有 50%之木質素，若能移除木質素，將有助於提高纖維素相對含量，增加葡萄糖濃度與水解產率。

### 《結果－從木質素含量看鹼性過氧化物前處理效果》

作者 2006 年發表之文章提到，有 80%以上之木質素在去木質化階段被移除，且有去木質化處理者之酵素水解產率高於未經去木質化處理者。

表 3 列出 LHW 與 SE 前處理或未經前處理，再去木質化處理後 water-insoluble fibers 之組成。從料源、前處理物 (Table 1) 與去木質化處理後 (Table 3) 之 AIL 含量來看：在以原料之乾重為基礎下，料源、經 LHW、SE 前處理後之前處理物之 AIL 含量分別為 16.6%、27.7%、24.8% (表 1)，若將料源、LHW、SE 前處理後之前處理物再經去木質化處理，則 AIL 含量分別變為 17.3%、12.2%、11.2%。相對於以 LHW、SE 前處理後之前處理物 AIL 含量，去木質化處理使得溶解之木質素分別達為 56% ( $(27.7-12.2) \div 27.7$ ) 與 54.8% ( $(24.8-11.2) \div 24.8$ )。若相對於料源之 AIL 含量，AIL 分別減少 26.5% ( $(16.6-12.2) \div 16.6$ ) 與 32.5% ( $(16.6-11.2) \div 16.6$ )。

從表 3 來看，去木質化處理後仍含有相當高之 AIL 含量。一如 Shevchenko et al.之報告，前處理程序可能造成木質素化學結構上之巨大改變，導致木質素更加聚集且難以移除。由於 olive tree pruning 含有約 30% 之樹葉，其萃取物含量高過 olive tree wood。這也就是前處理後之 olive tree wood 可以移除之木質素多於前處理後之 olive tree pruning 之原因。

### 《結果－從纖維素含量看鹼性過氧化物前處理效果》

木質素溶解下，雖然有葡萄糖損失之事實，但纖維素『相對』含量依然增加。25.0%、40.7%、43.5% (表 1) 增加為 38.3%、56.7%、60.2% (表 3)。在以料源乾重為基礎下，料源、經 LHW、SE 前處理後之前處理物纖維素含量分別 25%、22.8%、22.2% (表 1)。若將料源、經 LHW、SE 前處理後之前處理物再經去木質化處理，則纖維素含量分別變為 27.1%、18.7%、20.0% (表 3)。相對於以 LHW、SE 前處理者，去木質化處理使得葡萄糖之損失分別達 18% ( $(22.8 - 18.7) \div 22.8$ )、10% ( $(22.2 - 20.0) \div 22.2$ )。

### 《結果－從半纖維素含量看鹼性過氧化物前處理效果》

Hemicellulosic-derived sugars were not affected by delignification. For comparison purposes, raw material without pretreatment was submitted to the same delignification procedure as pretreated materials. As deduced from Table 3, no lignin removal is detected, while the solubilized material (near 30%) may correspond to extractive content. (從料源、前處理物與去木質化處理後之半纖維醣含量來看，半纖維醣幾乎已在 LHW 或 SE 前處理階段溶解，故其含量在去木質化處理階段變化已不大。從表 3 也看出，若未經 LHW 或 SE 前處理而直接去木質化處理時，幾乎無法移除木質素，溶解之成分可能只是萃取物。

### 《結果－去木質化後之酵素水解》

去木質化處理後之處理物進一步予以酵素水解，酵素水解條件與僅經 LHW、SE 前處理之前處理物相同。圖 3 與圖 4 分別為先經 LHW 與 SE 前處理，再以去木質化處理後之酵素水解結果。經去木質化處理後之酵素水解所得葡萄糖濃度高於僅經前處理者。以基質濃度 30%者為例，先經 LHW 前處理、再去木質化處理者，可於水解時間 72 小時後獲得 73 g/L 之葡萄糖濃度，優於僅經 LHW 前處理者之 61 g/L；先經 SE 前處理、再去木質化處理者，可獲得 65 g/L 之葡萄糖濃度，優於僅經 SE 前處理者之 52 g/L。

以去木質化處理後之處理物所含潛在葡萄糖 (potential glucose) 為基準，如表 3，計算酵素水解產率，並彙整於表 4。比較表 2 與表 4 可推論，以 LHW 前處理者，去木質化處理並無法提高水解產率，甚至出現產率減少之情形。可能之因素包括：1.較高葡萄糖濃度所導致之最終產物抑制作用；2.先採 LHW 前處理再去木質化處理者，所含纖維素較高，在酵素劑量固定下，每單位纖維素可分配到之酵素較少，導致水解產率較低。

先經 LHW 前處理者，不管是否再經去木質化處理，經 72 小時之酵素水解，其產率隨基質濃度之增加而降低。惟不管採用 LHW 或 SE 前處理方式，葡萄糖濃度則隨基質濃度之增加而增加。

By contrast, enzymatic hydrolysis was enhanced by delignification on SE-pretreated solids, except for high consistency hydrolysis (20 and 30%) where glucose inhibition is clearly evidenced. In our previous work on enzymatic hydrolysis of SE-pretreated olive tree wood, delignification also resulted in a yield improvement compared to just pretreated material [16]. In the case of SE-pretreated residues, delignification improved both yields and concentrations but only until a certain consistency level (10%); beyond this point, enzymatic hydrolysis yields of delignified materials are worse than those of just steamed ones. This is now clearly attributable to glucose inhibition, as physical concerns are independent of

whether or not the material was delignified (for the same substrate concentration). These results are in agreement with those reported by Zhu et al. [26], who suggest that, among several factors affecting sugar yield decreases at high substrate concentrations, end-product inhibition is the main one. (對照之下，以 SE 前處理者，除了基質濃度較高者 (20%、30%) 外，去木質化處理有助於提高酵素水解產率。作者先前以 olive tree wood 作為料源之研究，也指出經去木質化處理後水解產率高於僅經前處理者。經 SE 前處理者，去木質化處理有助於提高酵素水解產率，但僅限於某一程度之濃度以下，超過該程度，水解產率反而比僅經 SE 前處理者差。此結果與 Zhu et al. 相符合。Zhu et al. 指出高基質濃度下影響醣產率降低之因素中，最終產物之抑制作用是最主要的。)

### 《結論》

1. 前處理後之 olive tree pruning 可於基質濃度超過 20% 下，作為酵素水解之料源。)
2. 經 LHW 前處理者，以基質濃度以 20% 為佳，可經酵素水解得到濃度為 52 g/L 之葡萄糖與 64% 之水解產率。)
3. 去木質化程序可增加葡萄糖濃度，但在高基質濃度下，因最終產物抑制作用反而降低水解產率。)
4. Research on process configuration, for example conversion of glucose as it is formed by a simultaneous saccharification and fermentation scheme (to avoid end-product inhibition) or enzymatic hydrolysis conditions (to reduce the fraction of recalcitrant cellulose) should be investigated.