

《Maize straw 玉米桿》→《Alkali pretreatment》→《Batch/Fed batch EH》

Chen, M., M., J. Zhao, L. Xia. 2008. Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars. Carbohydrate Polymers 71: 411–415.

《背景》

木質纖維素生質能包括農業廢棄物、廢紙與木屑等，是一種價廉、可再生與豐沛之資源。木質纖維素材料內之多醣體包括纖維素與半纖維素，可被水解成單醣，如葡萄糖與木糖。這些單醣可進一步用來生產乙醇、木糖醇、有機酸與其它化學物。多醣體之水解通常以水解酵素來催化。酵素水解之產率高於酸催化水解。纖維水解酶之高成本使得大規模之酵素水解製程受到限制。

以前之研究利用 solid-state fermentation 方法，由 *Trichoderma reesei* ZU-02 產製低成本之 cellulase。然而製得之纖維水解酶之纖維雙醣酶較弱，限制了將纖維雙醣轉換成葡萄糖之能力。累積之纖維雙醣反而回頭抑制纖維水解酶之活性。因此改進纖維水解酶系統之纖維雙醣酶活性，對提高酵素水解之產率是很重要的。

《目的》

玉米桿是非常豐沛之農業廢棄物之一，在中國每年約有 250 百萬噸之產量。現階段都採焚燒方式處理，不僅缺乏效率，且造成環境污染。

利用玉米桿作為原料，經鹼前處理後，先後採用批次式 (Batch) 與饋料批次式 (Fed-batch)，以 *T. reesei* ZU-02 產製之 cellulase 與由 *Aspergillus niger* ZU-07 產製之 cellobiase 進行酵素水解，產製還原醣，並探討酵素活性、酵素劑量、基質濃度、表面活性劑 (surfactant) 對酵素水解之影響。

《物料與特性 Lignocellulosic material and characterization》

將玉米桿研磨至可通過 20-mesh 篩網，再以清水移除沾黏之泥土，經過濾與風乾，於 4 °C 下儲存於塑膠袋中。玉米桿之組成為 cellulose 38.7%、hemicellulose 21.7%、lignin 19.3%、others 20.3%。

《鹼前處理 Pretreatment》

利用鹼前處理去木質化。以 2% 之 NaOH，於 80 °C 下處理 1 h。前處理後之固態前處理物以自來水清洗至中性，於 50°C 下乾燥。去木質化後之前處理物組成為 cellulose 64.1%、hemicellulose 24.6%、lignin 8.6%、others 2.7%。

《微生物與酵素生產》

使用之酵素包括由 *Trichoderma reesei* ZU-02 生產之纖維水解酶 cellulase 與由 *Aspergillus niger* ZU-07 生產之纖維雙醣酶 cellobiase。

Cellulase 係根據 Xia 之方法，利用玉米穗軸殘渣作為 *Trichoderma reesei* ZU-02 之基質，採固態醱酵方式產製。在 seed culture 部分，係將 *Trichoderma reesei* ZU-02 孢子由斜面瓊脂植入 seed medium，在有氧條件、30°C 下培養 48 小時。固態醱酵方式部分，將 10% 之 seed culture 植入 solid medium，在培養器內，於 28-30°C 下培養 7 天。Solid medium 之組成包括：corn cob 66%、wheat bran 30%、(NH₄)₂SO₄ 2%、Urea 0.5%、

KH₂PO₄ 0.5%、MgSO₄·7H₂O 0.5%、CaCl₂ 0.45%、CoCl₂ 0.05%。Cellulase 之 Filter paper activity (FPU) 為 146 IU/g of dry koji、cellobiase activity (CBU) 為 12 IU g of dry koji。Cellobiase 係根據 Shen 之方法，在 seed culture 部分，係將 *A. niger* ZU-07 孢子懸浮液植入 seed medium，在有氧條件、30°C 下培養 48 小時。固態醱酵方式部分，將 5% 之 seed culture 植入 solid medium，在錐形燒瓶內，於 30°C 下培養 7 天。Solid medium 之組成包括：corn cob 55%、wheat bran 44%、KH₂PO₄ 0.5%、MgSO₄·7H₂O 0.5%、CoCl₂ 0.1%。Cellobiase 之 Cellobiase activity (CBU) 為 376 CBU/g of dry koji，Filter paper activity (FPU) 幾乎為 0。

《批次酵素水解 Batch enzymatic hydrolysis》

批次式酵素水解係於容積為 250 mL 之錐形瓶 (Erlenmeyer flask) 中裝填 100 mL 之前處理物與 0.05 M 之檸檬酸緩衝溶液混合物、劑量不等之 cellulase 與 cellobiase，使用迴轉式震盪器 (Orbital shaker) 於 pH 值為 4.8、溫度為 50°C、震盪頻率為 150 rpm 等條件下，進行水解反應，且定期取樣進行醱分析。

《饋料批次式酵素水解 Fed-batch enzymatic hydrolysis》

饋料批次式酵素水解係在容積為 2 L 之反應器內，於 pH 值為 4.8、溫度為 50°C 等條件下進行。試驗起始階段，基質濃度為 80 g/L、酵素劑量為 20 FPU/g substrate 與 10 CBU/g substrate (2:1)。反應期間，於第 6、12 小時分兩批次加入前處理物使最終基質濃度提高至 110 g/L，並在加入前處理物時，同時添加一定量之 cellulase，每批次加入劑量為 10 FPU/g fed substrate。總水解時間為 72 小時。

《Analysis》

Cellulase 活性測定係採用 IUPAC 程序：1×6 cm 之 Whatman no. 1 filter paper、1 mL 之 0.05 M 檸檬酸鹽緩衝液與 0.5 mL 之稀釋後酵素溶液，於 50 °C 下反應 30 min，測定還原醱濃度，據以計算 FPU。) (Cellobiase 活性測定：1 mL 之 15 mM 纖維雙醱溶液、1 mL 之稀釋後酵素溶液，於 50 °C 下反應 30 min，測定還原醱濃度，據以計算 CBU。) (Xylanase 活性測定係根據 Bailey 之方法。

纖維素含量之測定方法為 HNO₃ – ethanol method，木質素含量之測定方法為 72% H₂SO₄ method，半纖維素含量之測定方法為 two-brominating method，還原醱濃度測定係採用 DNS 方法。

Glucose、xylose、cellobiose、arabinose、ethanol 與 glycerol 之測定採用 HPLC。

酵素水解之產率計算公式 **Hydrolysis yield (%) = reducing sugar×0.9×100/polysaccharide in substrate.**

《Result- Enzymatic hydrolysis by cellulase from *T. reesei* ZU-02》

圖 1 為基質濃度 80 g/L 下，使用劑量為 20 FPU/g substrate 之 cellulase，於 pH 4.8 與 50 °C 下水解 60 小時期間，水解液測得之 Cellobiose、Glucose、Xylose、Arabinose、還原醱濃度與水解率。結果顯示，還原醱濃度與水解產率在水解 48 小時後分別達 52.0 g/L 與 65.9%，並趨向飽和。水解液中可檢測出木糖與阿拉伯糖，顯示 *Trichoderma reesei* ZU-02 cellulase 中應含有聚木醱酶 (Xylanase)，無須在水解系統中再添加工木醱酶。

在水解液中發現大量之纖維雙醱，表示在 *T. reesei* ZU-02 cellulase 中之 cellobiase 活性較差，劑量 20 FPU/g substrate 之水解系統中只有 1.64 CBU/g substrate 之 cellobiase。累積之纖維雙醱會回頭抑制 cellulase 之活性

，這表示酵素對於纖維雙糖所導致之最終產物抑制效果之敏感性高於葡萄糖。

〈Result- Effects of cellobiase activity on enzymatic hydrolysis〉

為減低纖維雙糖累積所導致之抑制作用，將 cellobiase 加入水解系統，強化 cellobiase 總活性。使用劑量為 20 FPU/g substrate 之 cellulase 下，還原糖濃度與水解產率隨 cellobiase activity 增加而增加。當 cellobiase activity 達 11 CBU/g substrate，再添加 cellobiase 也無助於水解產率之增加。）

圖 2 為基質濃度 80 g/L 下，使用劑量為 20 FPU/g substrate 與 10 CBU/g substrate 之 cellulase 與 cellobiase，於水解 48 小時期間，水解液測得之 cellobiose、glucose、xylose、arabinose、還原糖濃度與水解率。結果顯示，加入之 cellobiase 提高 cellobiase activity 之緣故，使得水解期間之 cellobiose 濃度一直維持在較低水準。由於纖維雙糖累積所造成之抑制作用被大幅度降低，導致較高之還原糖濃度與產率，在水解 48 小時後，水解產率為 81.2%，還原糖濃度為 64.1 g/L。

〈Effects of cellulose dosage〉

以基質濃度 80 g/L、pH 4.8 與 50 °C 等條件下，比較不同 cellulase 劑量下之水解產率。如圖 3。當酵素劑量僅為 7 FPU/g substrate 時，液化時間由一般所需之 3~4 小時，延長至 12 小時，顯示 7 FPU/g substrate 是不足的。其它劑量下，水解產率皆在前 12 小時快速增加，然後緩慢下來。最佳之酵素劑量為 20 FPU/g substrate 與 10 CBU/g substrate。再增加酵素劑量亦無助於提高水解產率。

〈Effects of substrate concentration〉

在酵素劑量為 20 FPU/g substrate 下，觀察基質濃度對酵素水解之影響。結果顯示，基質濃度在 30~80 g/L 範圍內，水解產率差異不大。基質濃度 30 g/L 者，第 48 小時之水解產率為 84.3%，高於基質濃度 80 g/L 者。之前之研究顯示，高基質濃度者，因為產物之抑制作用、酵素之鈍化與基質之反應性降低，水解產率反而降低。過高之基質濃度會出現混合與熱傳問題。

〈Result - Effects of surfactant on enzymatic hydrolysis〉

Non-ionic surfactant Tween-80 was evaluated for its ability to improve the enzymatic hydrolysis of pretreated straw samples. (非離子界面活性劑 Tween-80 有助於前處理物之酵素水解。) Hydrolysis was performed at 80 g/L substrate concentration using enzyme dosage of 20 FPU/g substrate for 48 h. As results shown in Fig. 5, the addition of surfactant Tween-80 improved the enzymatic hydrolysis effectively. (圖 5 顯示在基質濃度 80 g/L、酵素劑量 20 FPU/g substrate 下，添加不同濃度之 Tween-80 對於水解率之影響。) Adding 5 g/L Tween-80 increased the hydrolysis yield from 81.2% to 87.3%, i.e. an increase of 7.5%. (添加 5 g/L 者，水解率由 81.2% 增加至 87.3%。) Eriksson, Borjesson, and Tjerneld (2002) have reported that the improved conversion of lignocellulose with the addition of non-ionic surfactant can be explained by the reduction of the unproductive enzyme adsorption to the lignin part of the substrate. The possible mechanism is that the hydrophobic interaction of surfactant with lignin occurs on the lignocellulose surface, which releases the non-specifically bound enzyme (Eriksson et al., 2002). (添加非離子界面活性劑可以增加轉換率之原因，在於界面活性劑可以降低 unproductive enzyme 吸附到基質之木質素。其可能之機制為界面活性劑與木質素之疏水基間之交互作用可以釋出 non-specifically bound enzyme

。)

《Result - Feed-batch enzymatic hydrolysis》

研究顯示，要從木質纖維素生產乙醇之製程，要能有效取得乙醇，乙醇濃度必須高於 40 g/L，連帶地，fermentation broth 內之可醱醱糖濃度則必須超過 80 g/L。要從水解過程中得到較高濃度之還原糖，唯有使用較高濃度之基質。然而高濃度之基質，會導致混合與熱傳導困難等問題。若採用饋料批次式酵素水解，這些問題就可以避免。因為基質是循序加入，反應物之黏度可以保持在較低之水準。

由圖 6 可發現，當基質濃度由 80 g/L，經兩批次添加增至 110 g/L，還原糖濃度可達 89.5 g/L，水解產率可達 83.3%，葡萄糖濃度可達 56.7 g/L，適合後續之醱醱製程。