

# 以向日葵葉柄為料源之 饋料批次式酵素水解生質酒精製程

謝志誠<sup>1</sup>、楊哲維<sup>2</sup>、張思賢<sup>2</sup>、陳韋任<sup>2</sup>、劉安琪<sup>3</sup>

1. 國立台灣大學生物能源研究中心、生物產業機電工程學系教授，本文通訊作者
2. 國立台灣大學生物產業機電工程學系研究生
3. 國立台灣大學生物產業機電工程學系研究助理

## 摘 要

本研究以廢棄之向日葵葉柄為料源，從不同前處理條件中，找出最適酵素水解者為：先以 4% NaOH，於固液比 1:20、80 rpm、大氣壓及 103°C 下浸泡 180 分鐘，再以 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，於固液比 1:50、85°C、pH 11 下浸泡 45 分鐘。前處理後之物料，於基質濃度 5%、pH 4.5 及 50°C 條件下，以纖維水解酶及葡萄糖苷酶混合之酵素水解 72 小時，先由葡萄糖產率及成本效益，找出最佳酵素組合 (FPU/CBU) 及酵素基質比 (FPU/g、CBU/g)，再討論基質濃度對酵素水解效率之影響。然後，於高基質濃度 15% 下探討不同模式之饋料批次式酵素水解效率，所得之水解液利用酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* BCRC 21685 予以醱酵。結果顯示：最佳酵素組合為 FPU/CBU = 21/4.2，最佳酵素基質比為 21 FPU/g 及 4.2 CBU/g，採分批饋入酵素及前處理物者，水解效率最佳，後續醱酵效率亦最佳，所得之葡萄糖濃度及產率分別為 31.86 mg/mL，41.86%，比批次式酵素水解者增加 13.18%。在未經過排毒及高溫滅菌處理及添加葡萄糖下，不僅可以順利啟動醱酵，並於第 18、24 小時，獲得理論產率 94.31%、94.78% 之乙醇，且醱酵 24 小時後，殘餘之葡萄糖含量低於 1%。

**關鍵詞：**向日葵葉柄、生質乙醇、前處理、饋料批次、酵素水解、醱酵

## BIOETHANOL PRODUCTION FROM SUNFLOWER STALKS BASED ON FED-BATCH ENZYMATIC HYDROLYSIS

Jyh-Cherng Shieh<sup>1</sup>, Che-Wei Yang<sup>2</sup>, Szu-Hsien Chang<sup>2</sup>,  
Wei-Jen Chen<sup>2</sup>, An-Chi Liu<sup>3</sup>

1. Professor, Bioenergy Research Center/Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University, Corresponding Author.

2. Graduate Student, Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University
3. Research Assistant, Department of Bio-Industrial Mechatronics Engineering, National Taiwan University

## ABSTRACT

In this work, bioethanol production from wasted sunflower stalks based on fed-batch enzymatic hydrolysis was studied. To reduce cellulose crystallinity and improve the hydrolysis yield, various alkaline and alkaline/oxidative pretreatments were investigated. According to the recovery of glucose after enzymatic hydrolysis of the pretreatment solid, a two-step chemical pretreatment was proposed. It consisted of a first alkaline step ( 4% NaOH, 5% (w/v) solids concentration, 103°C, 80 rpm, and 180 min. ) and a second alkaline/oxidative step ( 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> , 2% (w/v) solids concentration, 85°C, pH 11, and 45 min.). Because of the complex structure of polysaccharides and limitation of individual enzyme, enzymatic hydrolysis was carried out by hybrid enzyme which was a mixture of cellulase from *Trichoderma reesei* C2730 (Celluclast® 1.5L) and cellobiase from *Aspergillus niger* (Novozyme® 188). The optimal FPU/CBU and loading of hybrid enzymes were identified as 21/4.2, 21 FPU/g substrate, and 4.2 CBU/g substrate. Further increase in FPU/CBU ratio and enzyme dosage did not increase in the glucose yield based on cost-benefit. The effects of substrate concentration on enzymatic hydrolysis showed that high substrate concentration usually resulted in lower hydrolysis yield. However, raising substrate concentration would lead to high glucose concentration. To overcome the mixing and heat transfer problems occurred due to high substrate concentration, two kinds of fed-batch enzymatic hydrolysis were applied. The proposed fed-batch hydrolysis process was started with a batch hydrolysis containing 5 g/100 mL of substrate concentration and hybrid enzymes with 105 FPU and 21 CBU. After the initial batch, pretreatment solid and hybrid enzyme were added at 6 and 12 h giving a final substrate concentration of 15 g/100 mL. After 72 h of hydrolysis, the glucose concentration and yield reached 31.86 mg/mL and 41.86%, higher than that obtained from the batch process 13.18%. Hydrolysate, without sterilization and detoxification, was then fermented with *Saccharomyces cerevisiae* BCRC 21685 for 24 h. The final ethanol concentration level reached 15.40 mg/mL, about 94.78% theoretical yield. Glucose residue was less than 1%.

**Keywords:** Sunflower stalk, Bioethanol, Pretreatment, Fed-batch, Enzymatic Hydrolysis, Fermentation

## 一、前言

生質乙醇(Bioethanol)，泛指以生質物(Biomass)為原料所產製之乙醇，可單獨或與汽油混合使用，是一項具有潛力之替代燃料。由於部分料源為重要之糧食作物，若用來產製乙醇，將影響糧食供應平衡，衝擊糧食市場。

向日葵為重要之油料作物，並具田間觀賞功能。收穫後殘留之葉柄(Stalk)或籽殼(Seed hull)等廢棄物含有木質纖維素(Lignocellulose)，可經前處理(Pretreatment)、水解(Hydrolysis)、醱酵(Fermentation)、產物分離與純化(Separation/Purification)等步驟轉製成生質乙醇。不僅可避免衝擊糧食市場，更可連帶解決農業廢棄物問題，是爭議最少之選擇。

前處理為以添加物或能量破壞木質纖維素之結構與增加孔隙性(Porosity)之過程，是提高木質纖維素水解效率之重要程序(Mosier et al., 2005)。前處理方法與條件之選用，除考量料源構造與成本因素外，亦必須防止副產品對後續製程之影響(Sun and Cheng, 2002)。條件嚴苛之前處理雖有利於酵素水解之效率，卻易導致呋喃衍生物(Furan derivatives)與酚醛複合物(Phenolic compounds)等抑制物(Inhibitor)之釋出，且釋放量隨條件之嚴苛度而增加(Stenberg et al., 1998; Södeström et al., 2003; Cara et al., 2006)。以向日葵葉柄或籽殼為例，常見之前處理方法包括採用 HCl、H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 等之酸前處理(Acid pretreatment)、NaOH、鹼性過氧化物(Alkaline peroxide, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)之鹼前處理(Alkaline pretreatment)(Bonilla et al., 1990; Jiménez and Bonilla, 1993; Farid et al., 1983; Sharma et al., 2002a; Ruiz et al., 2006)及蒸汽爆裂前處理(Steam explosion pretreatment)(Sharma et al., 2002b; Sharma et al., 2004; Ruiz et al., 2006; Ruiz et al., 2008)。其他，尚有先以高壓熱水(Liquid hot water)或蒸汽爆裂前處理，再以鹼性過氧化物處理(Cara et al., 2007; Öhgren et al., 2007)；亦有輔以微波(Microwave)照射者(Zhu et al., 2006)。前處理條件之探討，則以酸或鹼濃度、溫度及時間等為主。

水解為將醣類分子鏈結成之纖維，利用硫酸或酵素(Enzyme)予以解構並釋出葡萄糖等醣類分子之過程。前者，已於第二次世界大戰期間商轉；後者，則直到 1970 年代中期才開始發展。稀酸水解者，因醣降解造成產率降低，限縮經濟可行性；濃酸水解者，雖產率可達近 100%，卻有酸成本過高、設備腐蝕及環境衝擊等問題；酵素水解者，有酵素成本高、活性低、易受產物抑制等缺點，卻有設備成本低與環境友善等優點(Wright 1988; Duff and Murray, 1996)。近年來，酵素水解已成為生質酒精製程之主流。

影響酵素水解之因素包括酵素活性、酵素基質比(Enzyme/Substrate ; E/S)、基質濃度(Substrate concentration)與水解條件(溫度、pH 值等)(Sun and Cheng, 2002)。依纖維之結構，水解酵素(Hydrolytic enzymes)至少要包含內切型(Endo-)、外切型(Exo-)葡聚醣酶與 β-葡萄糖苷酶(β-glucosidase)，才能透過三者間之協同作用機制(Synergy mechanism)，將長鏈之纖維打斷，水解成葡萄糖等單醣體(Bisaria and Ghose, 1981; Mansfield et al., 1999)。然因不同微生物所生產之酵素對纖維之水解能力不同，以 *Trichoderma reesei* 為例，所產酵素之纖維雙醣活性(Cellobiase activity)較低，無法有效分解纖維雙醣，若搭配 β-葡萄糖苷酶，則可避免纖維雙醣累積所產生之抑制作用，並提高還原醣濃度與產率(Wen et al., 2004; Chen et al., 2008)。酵素基質比與纖維之結晶程度、接觸面積與木質素之含量等有關。酵素基質比越高者，越有助於提高水解產物之濃度與產率，惟添加劑量大於某一程度後，對產物濃度與產率之助益反而不大(Wen et al., 2004)。因此，從酵素成本考量，增加酵素基質比之邊際效益應加以評估(Zhu et al., 2005)。Kristensen et al. (2007)則認為添加表面活性劑(Surface active additives)可以改變基質之本質，增加可接觸面積，有效防止酵素出現變性(Denaturation)現象。基質濃度影響酵素水解產率與初始速率，基質濃度較低時，增加濃度有助於增加產率與速率；然過高之基質濃度將導致混合與熱傳導困難等問題(Rudolf et al., 2005)，對酵素產生抑制作用，造成水解產率與速率降低

(Chenug and Anderson, 1997; Wen et al., 2004)。惟從後續醱酵之觀點，採用較高之基質濃度仍有其必要性。若採用饋料批次式酵素水解，循序加入基質，讓反應物黏度保持在較低之水準，比批次式酵素水解具有反應時間較短且產率較高等優點(Chen et al., 2007; Chen et al., 2008)。

醱酵程序中，影響乙醇產率之因子包括水解液濃度、成分、醱酵時間、溫度、酸鹼度、植入之微生物濃度及營養液之補充等(Olsson and Hägerdal, 1996. Sharma et al., 2002b)。其中，水解液因含有醱酵難度較高之五碳醣及對微生物產生抑制作用之物質，是必須面對之問題。由於五碳醣之含量約佔木質纖維素材料之 6~28%，若要獲得較高之乙醇產率，則必須慎選能醱酵五碳醣之微生物，特別是以硬木作為料源者。抑制物之數量及特性除與料源有關外，也與前處理及水解程序有關(Olsson and Hägerdal, 1996)。以蒸汽前處理樺木(Birchwood)為例，就可從水解液中分離出 60 種以上之抑制物(Buchert et al., 1990)。將抑制物於醱酵前排除，已經驗證確實有助於提高醱酵性，探討過之方法有蒸餾水洗滌排毒法(Rinsing with distilled water)、酵素排毒法(Enzymatic detoxification)與化學排毒法(Chemical detoxification)等(Martín et al., 2002; Cantarella et al., 2004)。

本研究以廢棄之向日葵葉柄為料源，經低溫乾燥後粉碎成小於 40 mesh 之顆粒，從不同條件之鹼或先鹼後過氧化氫前處理中，找出最適酵素水解之前處理條件。再以 Cellulclast<sup>®</sup> 及 Novozyme<sup>®</sup> 酵素，由前處理物之酵素水解產率及成本效益，找出最佳 FPU/CBU 之混合酵素及最佳酵素基質比，並於批次式酵素水解模式下，討論基質濃度對酵素水解效率之影響。然後，於高基質濃度 15% 下，探討不同模式之饋料批次式酵素水解效率，再利用酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* BCRC 21685 予以醱酵。

## 二、材料與方法

### (一)材料

向日葵葉柄取自臺南縣學甲鎮田間，先清洗並切成小段，置入低溫烤箱 (DCM45, 臺灣 Channel 公司) 於 103°C 下烘乾，再以磨碎機 (DM-6, 臺灣佑崎機械有限公司) 研磨至顆粒小於 40 mesh，置入低溫烤箱烘乾備用。使用之酵素為市售之纖維水解酶(Cellulase) Cellulclast<sup>®</sup> 1.5L from *Trichoderma reesei* C2730 (美國 Sigma-Aldrich Inc.) 及葡萄糖苷酶 Novozyme<sup>®</sup> 188 from *Aspergillus niger* (美國 Sigma-Aldrich Inc.)。醱酵用酵母菌為 *Saccharomyces cerevisiae* BCRC 21685，由臺灣大學動物科學技術研究所提供。酵素水解及酵素活性測定使用檸檬酸鈉緩衝溶液(Citrate buffer solution)，係以 0.1 M 之檸檬酸溶液與 0.1M 之檸檬酸鈉溶液混合配製，並以 0.1 M 之 NaOH 及 0.1 M 之 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 滴定至所需 pH 值。

### (二)成份分析

料源及前處理物之組成分析係參考 National Renewable Energy Laboratory 提供之 Chemical Analysis and Testing Laboratory Analytical Procedures (NREL, Golden, CO)。纖維素及半纖維素含量係以料源經二階段 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 水解後，分解成之單醣體含量(Monomers content)為基準。將待測物置入烤箱，於 103°C 下烘乾至恆重後，取其 0.3 ± 0.01 g，直接以 72% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 於 30±1°C 下水解 2 小時，再加入去離子水將酸濃度稀釋成 4% (w/w)，於滅菌釜 (TM-327, 臺灣東明儀器公司) 以 121±3°C 水解 1 小時。所得之水解液，利用高效率液態層析儀(High performance liquid chromatography, HPLC)測定葡萄糖、木糖之含量。醯基含量(O-Acyl group content)係利用 HPLC 測定水解液之醋酸含量。木質素(Lignin)分為酸可溶木質素(Acid soluble lignin, ASL)及酸不可溶木質素(Acid insoluble lignin, AIL)，前者利用分光光度計 (DR/2010, 美國 Hach company)，以波長 240 nm 紫外光量

測水解液之吸光值並推算之；後者則為經二階段水解後殘留下來，扣除灰分後之物質。灰分為將待測物以 575°C 鍛燒後殘留下來之物質。其他成分則包括未測定之萃取物及其他未知成分。HPLC 由四元溶劑梯度混合送液泵浦 (Quaternary gradient pump) (PU-2089 Plus, 日本 Jasco Inc.) 搭配折射檢知器 (Refractive index detector) (RI-2031 Plus, 日本 Jasco Inc.)、分析管柱 (Column) (ICSep ICE-COREGEL-87H3, 美國 Transgenomic Inc.) 與訊號轉換器 (ADC) (LC-NET II/ADC, 日本 Jasco Inc.) 等組成。操作時，以 0.008 N 之硫酸溶液為流動相，流速為 0.5 mL/min，管柱溫度為 70°C。

前處理液及水解液之成份分析係先配置已知濃度之葡萄糖、木糖、醋酸、乙醇等標準品之溶液，利用 HPLC 測定對應濃度之波峰位置及面積，建立標準品之檢量線。實測時，將待測物注入離心管，經離心機 (Centrifuge 5415C, 德國 Eppendorf International) 以 3000 rpm 運轉 5 分鐘後，以針筒抽取上清液 (Supernatant)，再以針筒過濾 (Φ13 mm, 0.45 μm nylon membrane, 美國 PALL Life Sciences) 濾除固體雜質，並利用超音波洗淨器 (DC400H, 臺灣華夏科學有限公司) 去除氣泡，然後注入 HPLC 之樣品閥，由測得層析圖之波峰位置、面積及標準品之檢量線，判斷待測物之成份及其濃度。

### (三) 酵素活性測定

酵素活性之測定係依 IUPAC (The International Union of Pure and Applied Chemistry) 推薦之酵素活性測定標準程序 (Filter Paper Assay, FPA) (Ghose, 1987; Xiao et al., 2004)。測定項目包括濾紙纖維酶活性 (Filter Paper Unit, FPU) 及纖維雙醣活性 (Cellobiase Unit, CBU)。

FPU 之測定以 Whatman Grade No. 1 Filter Paper (1.0 × 6.0 cm, Whatman Ltd.) 為基質，利用至少稀釋 50 倍之待測酵素，於 pH 4.8、50°C 下水解 60 分鐘，混入配置之二硝基水楊酸 (Dinitrosalicylic acid, DNS) 試劑，再利用分光光度計，以波長 540 nm 之紫外光量測水解液之吸

光值，計算酵素之 FPU：

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

其中， $A_{540}$  sample 為水解液之吸光值； $A_{540}/\text{mg standard}$  為每 mg 葡萄糖標準溶液之吸光值。5.55 μmole/mg 為每 mg 葡萄糖之莫耳數 (μ moles)。X mL 為待測稀釋後之酵素體積。

CBU 之測定以纖維雙醣為基質，準備至少兩種比例之待測酵素稀釋液，於 pH 4.8、50°C 下水解 60 分鐘，分別測定葡萄糖濃度，並擇定其中釋出之葡萄糖量最接近且分別大於及小於 1 mg 者，內插算出可釋出 1 mg 葡萄糖之待測酵素稀釋倍率 Y，據以計算酵素之 CBU：

$$CBU = Y \times 0.0926 \mu\text{mol/min/mL}$$

### (四) 前處理

將料源以不同濃度之 NaOH，於不同溫度及浸泡時間下前處理，或於鹼前處理後施予 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浸泡，由前處理物之組成及其可水解效率，擇定最適之前處理條件。

鹼前處理部分，將研磨後之料源置入低溫烤箱，於 103°C 下烘乾至恆重，使用迴轉式震盪器 (KS OS-701, 臺灣華夏科學有限公司) 及市售水浴槽，於固液比 1:20、80 rpm 下，分別以 (I) 0.5% NaOH、95°C、90 分鐘；(II) 4.0% NaOH、95°C、90 分鐘；(III) 4.0% NaOH、103°C、180 分鐘等條件鹼前處理。而後以濾袋固液分離，取得之液體稱為「前處理液」，利用 HPLC 分析其成份；取得之固體稱為「前處理物」，以清水沖洗至中性，於 103°C 下烘乾至恆重，分析其組成並備用。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 前處理部分，將條件 (III) 鹼前處理後之前處理物，再於固液比 1:50、85°C、pH 11 下，以 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浸泡 45 分鐘 (條件 IV)。而後予以固液分離、烘乾、分析並備用。

四種不同條件之前處理物，於基質濃度 5%、pH 4.5、50°C 及 90 rpm 下，以 1.25 mL 之

Cellulast®予以水解 72 小時，分析水解液之葡萄糖及木糖含量。

#### (五) 酵素水解

本研究以最佳前處理條件之前處理物為基質，先分二階段找出最有利於葡萄糖產率之酵素組合、酵素基質比，再探討基質濃度對葡萄糖產率之影響。首先，取 5 g 之前處理物，於基質濃度 5 %、pH 4.5、50°C 及 90 rpm 等水解條件下，以每單位 g 之前處理物為基準，分別添加 FPU/CBU 為 21/1.125 之單一酵素(Cellulast®) 及 FPU/CBU 為 21/2.1、21/4.2、21/6.3、21/8.4、21/10.5 之混合酵素 (Cellulast®與 Novozyme®組合)，經 72 小時水解後測定葡萄糖產率，找出最有利於水解之酵素組合 (FPU/CBU)。再於相同之水解條件下，以不同劑量之最佳酵素組合水解 72 小時，測定不同酵素劑量下之葡萄糖產，找出最有利於水解之酵素基質比(FPU/g、CBU/g)。然後以 5、10、15、20 g 之前處理物，配製濃度為 5 %、10%、15%、20%之基質溶液，分別於 pH 4.5、50°C 及 90 rpm 下，依最佳酵素基質比一次添足相對劑量之最佳混合酵素，進行 72 小時之水解，測定不同基質濃度下之葡萄糖產率。其中，葡萄糖產率為水解後釋出葡萄糖佔前處理物纖維素含量之比例，定義如下： $\text{Glucose Yield \%} = \text{g of Glucose} / \text{g of cellulose in pretreatment solid}$ 。

#### (六) 饋料批次式酵素水解

取 15 g 之前處理物，於 pH 4.5、50°C 及 90 rpm 等水解條件下，探討饋料方式對葡萄糖產率之影響。採用之饋料方式分成：(I)先投入 5 g 前處理物並一次饋足 15 g 前處理物所需劑量之最佳酵素組合，再分別於第 6 及 12 小時分批饋入 5 g 之前處理物；(II)先投入 5 g 前處理物及 5 g 前處理物所需劑量之最佳酵素組合，再分別於第 6 及 12 小時分批饋入 5 g 之前處理物與對應劑量之最佳酵素組合。

#### (七) 醱酵

將 21 g 之 YM broth (美國 Difco Inc.) 溶於

1000 mL 之蒸餾水中，於 121°C 下高壓滅菌 15 分鐘，製備活化酵母菌及接種物(Inoculum)之營養液。然後，將 1 g 之酵母菌置入 100 mL 之營養液，調配 1 % (w/v)之菌液，取 10 mL 之菌液置入 90 mL 之營養液，於恆溫培養箱 (S300R，臺灣一升科技公司) 中、37°C 下活化 6 小時。活化後之菌液經 10 倍系列稀釋後，分別加入含有 10 mL YM agar (美國 Difco Inc.) 之培養皿，經 48 小時後觀察所得菌落，以菌落數小於 300，並為最大者，其所對應之稀釋後菌液即為醱酵之接種物。觀察所得菌落數及稀釋倍數，據以計算接種物之濃度。然後，於三角錐瓶中，注入 100 mL 之水解液及 10 mL 之接種物，使用恆溫培養箱，於 37°C 及 120 rpm 下醱酵，每隔 6 個小時取樣，檢測葡萄糖、木糖、醋酸及乙醇濃度。

每一試驗皆為三重覆，並取其平均值。

### 三、結果與討論

#### (一) 組成分析

料源組成，如表 1。因本研究對於前處理、酵素水解及醱酵效率之評估，係以葡萄糖及木糖為主，略去甘露糖、阿拉伯糖、半乳糖及萃取物等含量之分析，故所得組成分佈經與 Ruiz et al. (2008)比較發現，在僅以木糖(15.39%)代表半纖維素下，半纖維素含量低於 Ruiz et al.之 20.2% (包含木糖 16.1%、甘露糖 1.7%、阿拉伯糖 1.0%、半乳糖 1.4%)，若僅比較木糖含量，兩者

表 1 料源組成

組成	乾重, %	Ruiz et al. (2008)
纖維素 (葡萄糖)	32.63	33.8
半纖維素	15.39	20.2
木質素 (AIL、ASL)	19.15 (10.58、8.57)	17.3 (14.6、2.7)
灰分	7.41	9.6
乙醯基	3.02	2.5



相異不大。木質素部分，總含量相近，但 ASL 及 AIL 含量誤差較大。

## (二)前處理

四種不同前處理條件所得前處理液及前處理物之組成分析，如表 2、表 3。前處理液並無檢測出抑制醱酵之糠醛(Furfural)及羥甲糠醛(Hydroxymethylfurfural, HMF)。醋酸係來自料源之多醣體醯基，以條件 IV 者最有利醋酸之釋出，降低前處理物乙醯基含量，避免其對後續醱酵之抑制性。由於前處理液之葡萄糖及木糖濃度過低，加上濃度偏高之醋酸，預期醱酵效率不佳，故未將前處理液進一步醱酵處理。前處理物之回收率隨前處理條件之嚴苛程度而降低，但相對之纖維素佔乾物比例卻未隨之增加，應與條件 IV 於鹼前處理後增加之中途沖洗，導致物料及纖維素含量大量流失有關，不僅造成前處理物回收率之降低，也連帶降低纖維素之含量。為確實評估前處理效果，進一步將前處理物予以酵素水解，由水解液成份(表 4)來看，水解所得葡萄糖、木糖濃度、葡萄糖產率最高者，為條件 IV 者。因此，基於後續醱酵考量，本研究以條件 IV 者為最適前處理條件。在該條件下，纖維素含量隨由 32.63 % 增為 50.74%，然因物料回收率偏低，導致纖維素回收率僅 59.76% ( =  $50.74\% \times 38.43\% \div 32.63\%$  )。顯示兩階段前處理間之沖洗，不僅造成物料流失，並連帶影響纖維素之回收率。

表 2 不同前處理條件下前處理液組成

Table 2 Composition of pretreatment liquor resulting from different pretreatment conditions

前處理條件	葡萄糖 mg/mL	木糖 mg/mL	醋酸 mg/mL	糠醛 mg/mL	羥甲 糠醛 mg/mL
I	0.12	0.16	1.90	ND	ND
II	0.25	0.16	2.01	ND	ND
III	0.32	0.21	2.33	ND	ND
IV	0.43	0.30	2.72	ND	ND

表 3 不同前處理條件下前處理物組成

Table 3 Composition of pretreatment solid resulting from different pretreatment conditions

前處理條件	回收率	纖維素	半纖維素	木質素
I	63.77%	34.69%	14.70%	29.22%
II	49.23%	44.33%	11.02%	28.01%
III	42.39%	52.74%	9.08%	21.27%
IV	38.43%	50.74%	8.87%	19.90%

表 4 不同前處理條件後前處理物之酵素水解液成份(酵素水解條件: Celluclast<sup>®</sup> 1.25 mL、基質濃度 5 %、pH 4.5、50°C、90 rpm、72 小時)

Table 4 Composition of hydrolysate resulting from hydrolysis of pretreatment solids. Hydrolysis conditions: Celluclast<sup>®</sup> 1.25 mL, substrate concentration 5%, pH 4.5, 50°C, 90 rpm, 72 h.

前處理條件	葡萄糖 mg/mL	木糖 mg/mL	葡萄糖 產率%
I	3.82	0.45	22.02
II	7.33	1.21	33.07
III	9.86	1.96	37.39
IV	10.85	2.30	42.77

## (三)酵素水解

Celluclast<sup>®</sup> 與 Novozyme<sup>®</sup>之活性經測定分別為 84 FPU/mL 與 4.50 CBU/mL、16 FPU/mL 與 370 CBU/mL。由於 Celluclast<sup>®</sup>之纖維雙醣活性不高，無法有效分解纖維雙醣，為避免其活性易受到纖維雙醣之抑制，並為將纖維雙醣或短鏈之纖維寡醣(Cellooligosaccharide)分解成單醣，添加有利於分解纖維雙醣之適量 Novozyme<sup>®</sup>有其必要性。

### 1. 最佳酵素組合

取 5 g 之前處理物，於基質濃度 5 %、pH 4.5、50°C 及 90 rpm 下，以每單位 g 之前處理物重量為基準，分別添加 FPU/CBU 為 21/1.125 之單一酵素及 FPU/CBU 為 21/2.1、21/4.2、21/6.3、21/8.4、21/10.5 之混合酵素水解 72 小時後，測得之葡萄糖產率如圖 1。結果顯示，使用混合酵素可提升葡萄糖產率，且產率隨 FPU/CBU 之增加而增加。以市售之 Cellulclast® 及 Novozyme® 每 mL 單價分別為 55 元及 20 元計算，21/2.1 比 21/1.125 者，成本增加 0.18%，葡萄糖產率增加 14.47%；21/4.2 比 21/2.1，成本增加 0.39%，葡萄糖產率增加 4.91%；之後，成本增加維持在 0.39%，但產率增幅降至 1% 以下。為成本效益考量，選擇 FPU/CBU = 21/4.2 為最佳酵素組合。

### 2. 最佳酵素基質比

取 5 g 之前處理物，於基質濃度 5 %、pH 4.5、50°C、90 rpm 下，以 FPU/CBU 為 21/4.2 之最佳混合酵素，劑量分別為(90 FPU、18 CBU) (105 FPU、21 CBU) (120 FPU、24 CBU) (135 FPU、27 CBU) (150 FPU、30 CBU) 之混合酵素水解 72 小時後，測得之葡萄糖產率如圖 2。結果顯示，葡萄糖產率隨混合酵素基質比之增加而增加。由於基質比為 21 FPU/g、4.2 CBU/g 之酵素成本比 18 FPU/g、3.6 CBU/g 者，增加 14.28%，葡萄糖產率增幅為 16.24%；若使用酵素基質比再往上增加至 24 FPU/g、4.8 CBU/g，酵素成本增加 14.28%，但葡萄糖產率之增幅則僅為 1.46%；再往上增加，葡萄糖產率之增幅則已不及 1%。基於成本考量，每 g 前處理物添加混合酵素之最佳劑量為 21 FPU、4.2 CBU。即，最佳酵素基質比為 21 FPU/g、4.2 CBU/g。

### 3. 基質濃度之影響

取 5~20 g 之前處理物，調配濃度為 5%、7.5%、10%、15% 與 20% 之基質溶液，並依最佳酵素基質比 21 FPU/g、4.2 CBU/g，分別一次投足所需劑量之混合酵素 (21 FPU/g × g of

pretreatment solid、4.2 CBU/g × g of pretreatment solid) 進行 72 小時之批次式水解 (Batch enzymatic hydrolysis)，測得水解液之產物濃度與葡萄糖產率如表 5。結果顯示，基質濃度越高，一方面因攪拌不易，二方面因高葡萄糖濃度對酵素活性之抑制作用，造成葡萄糖產率下降。因此，從產率之觀點來看，以低基質濃度者為佳；然從後續製程之觀點，高葡萄糖濃度之水解液則有助於醱酵之啟動。

表 5 基質濃度對水解產物之影響 (酵素水解條件：pH 4.5、50°C、90 rpm、72 小時)

Table 5 Effects of substrate concentration on products from hydrolysis. Hydrolysis conditions: pH 4.5, 50°C, 90 rpm, 72 h.

基質濃度	葡萄糖 mg/mL	木糖 mg/mL	葡萄糖產率%
5.0%	13.03	2.65	51.36
10.0%	21.94	5.33	43.24
15.0%	28.15	7.18	36.99
20.0%	32.50	7.28	32.03

### 四、高基質濃度之饋料批次式水解

為獲得較高葡萄糖濃度之水解液，並探討饋料方式對水解效率之影響。以最終基質濃度 15% 為目標，於 pH 4.5、50°C 及 90 rpm 下，取 15 g 之前處理物，分三梯次於第 0、6、12 小時饋入，所需酵素劑量(315 FPU、63 CBU)則分別採用一次饋足及搭配饋入之前處理物分三梯次饋入。於歷經總計 72 小時之酵素水解後，結果顯示：一次饋足酵素劑量並分批饋入前處理物者(I)，所得葡萄糖濃度、木糖之濃度分別為 30.09、6.09 mg/mL，葡萄糖產率為 38.87%；分三次饋入酵素劑量及前處理物者(II)，產物濃度與產率分別為 31.86、8.62 mg/mL、41.17%。如表 6。兩者皆優於批次式酵素水解者，且分批饋入酵素及前處理物者優於一次饋足酵素劑量者。因此，分批饋入前處理物者(II)可避免初始濃度過高，導致之攪拌不易、混合與熱傳導困難等問



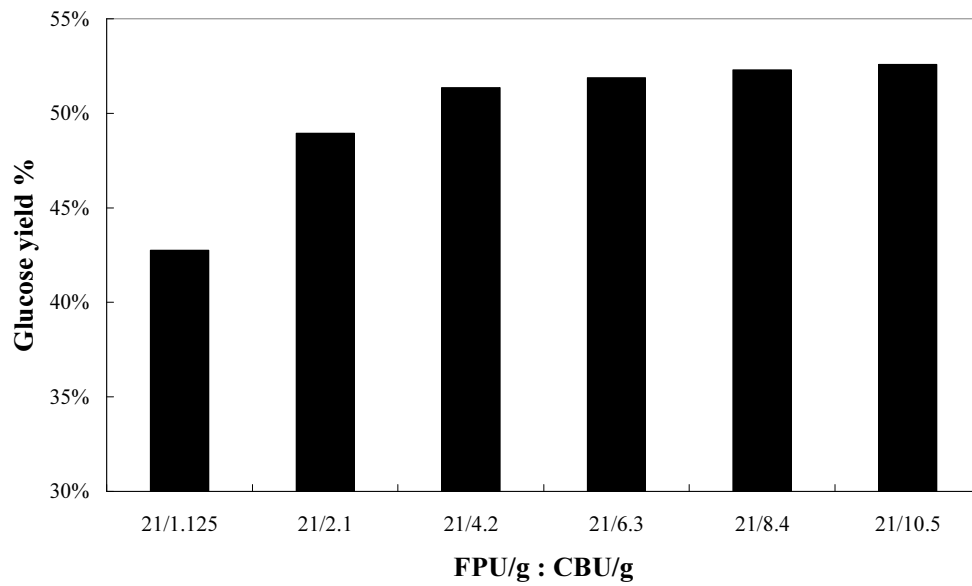


圖 1 FPU/CBU 對葡萄糖產率之影響 (水解條件: 基質濃度 5%、pH 4.5、50°C、90 rpm、72 小時)

Fig.1 Effects of FPU/CBU on the yield of glucose. Hydrolysis conditions: substrate concentration 5%, pH 4.5, 50°C, 90 rpm, 72 h

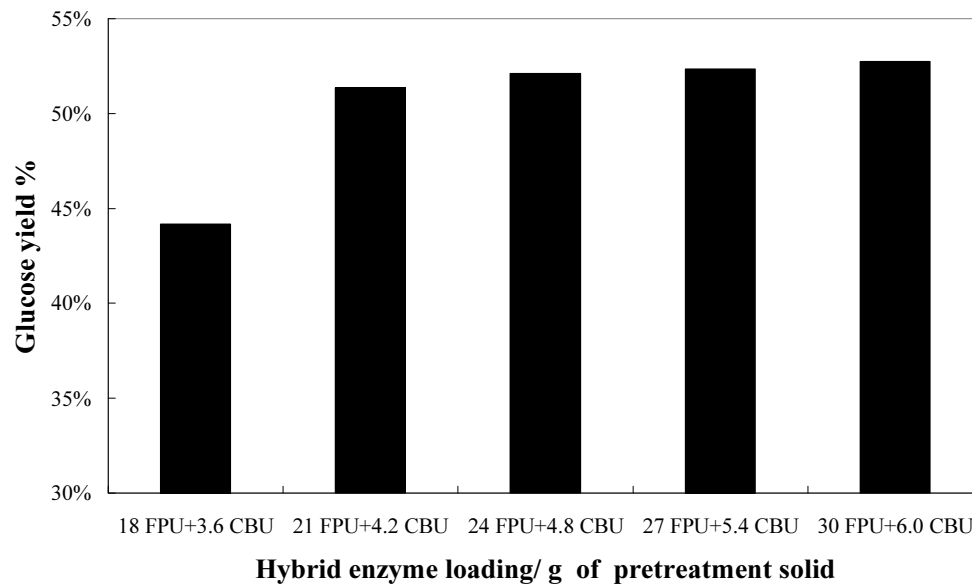


圖 2 混合酵素基質比對葡萄糖產率之影響 (水解條件: 基質濃度 5%、pH 4.5、50°C、90 rpm、72 小時)

Fig.2 Effects of enzyme loading/Substrate on the yield of glucose. Hydrolysis conditions: substrate concentration 5%, pH 4.5, 50°C, 90 rpm, 72 h

表 6 饋料方式對水解產物之影響 ( 酵素水解條件: pH 4.5、50°C、90 rpm、72 小時 )

Table 6 Effects of fed batch operation on products from hydrolysis. Hydrolysis conditions: pH 4.5, 50°C, 90 rpm, 72 h.

饋料方式	水解時間	葡萄糖 mg/mL	木糖 mg/mL	葡萄糖產率%
一次饋足酵素、分批饋入前處理物 ( I )	24h	20.48	4.63	26.91
	48h	25.77	5.68	33.86
	72h	30.09	6.09	39.53
分三次饋入酵素劑量及前處理物 ( II )	24h	19.66	4.12	25.83
	48h	26.51	5.80	34.83
	72h	31.86	8.62	41.86

題，且有助於提高葡萄糖產率。一次饋足酵素者 (I)，雖有助於提高初期之葡萄糖產率，卻導致酵素之抑制效應，終期葡萄糖產率反而低於分批饋入酵素者(II)。

#### (五) 醱酵

取基質濃度 15%，經批次或饋料批次式酵素水解後之水解液各 90 mL，未經過排毒及滅菌處理下，分別加入 10 mL 之接種物，於 37°C 及 120 rpm 下進行醱酵，每隔 6 個小時取樣，檢測葡萄糖、木糖、醋酸與乙醇濃度。歷經 24 小時醱酵，期間之葡萄糖與乙醇濃度變化，如圖 3。結果顯示，採取分批饋入酵素劑量及前處理物者 (II)，醱酵效率最佳，所得乙醇濃度為 15.40 mg/mL，達理論產率 (31.86 mg glucose × 0.51 mg ethanol/mg glucose) 之 94.78%，殘餘之葡萄糖含量低於 1%；且醱酵第 18 小時，即已達最高值之 99.5%。

從水解液所含木糖及醋酸產物之變化來看 (圖 4)，木糖之消化程度與速率遠低於葡萄糖，顯示在選用之酵母菌下，木糖之利用率仍有限。醋酸產出濃度增幅最大者，雖為乙醇產出濃度最大且為葡萄糖殘留量最少者，因所得乙醇濃度未達理論值，故酵母菌是否受到醋酸之抑制有待進一步評估 (Lawford and Rousseau, 1993; Wikandari et al., 2010)。

#### 四、結論

本研究以臺灣臺南田間廢棄之向日葵葉柄作為原料，成功地經前處理、酵素水解與醱酵等程序產製乙醇。既可提升向日葵之再利用價值，又可連帶解決農業廢棄物問題，並避免以糧食作物作為料源所衍生之糧食競爭問題。

前處理之目的在破壞木質纖維素之結構，提高後續之水解效率。因此，本研究從四種不同前處理條件中，選擇醋酸釋出量最多且前處理物酵素水解所得葡萄糖及木糖濃度最高者作為最適條件：先於 103°C 下，以 4.0% NaOH 鹼前處理 180 分鐘，再於固液比 1:50、85°C、pH 11 下，以 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浸泡 45 分鐘者。

前處理方法及其效果外，酵素之種類、劑量與基質濃度等亦為影響水解效率之參數。由於習用之 Cellulclast<sup>®</sup> 纖維雙醣活性不高，無法單獨分解纖維雙醣，故添加適量、纖維雙醣活性較高之 Novozyme<sup>®</sup>。經從葡萄糖產率及成本效益考量，得知混合酵素之最佳 FPU/CBU 為 21/4.2，最佳基質比為 21 FPU/g、4.2 CBU/g；即每 g 前處理物添加混合酵素之最佳劑量為 21 FPU、4.2 CBU。基質濃度對水解效率之評估顯示，基質濃度越低者，雖葡萄糖產率相對較高，但葡萄糖濃度偏低，除非添加葡萄糖，否則水解液無法直接醱酵；基質濃度越高者，雖葡萄糖產率偏低

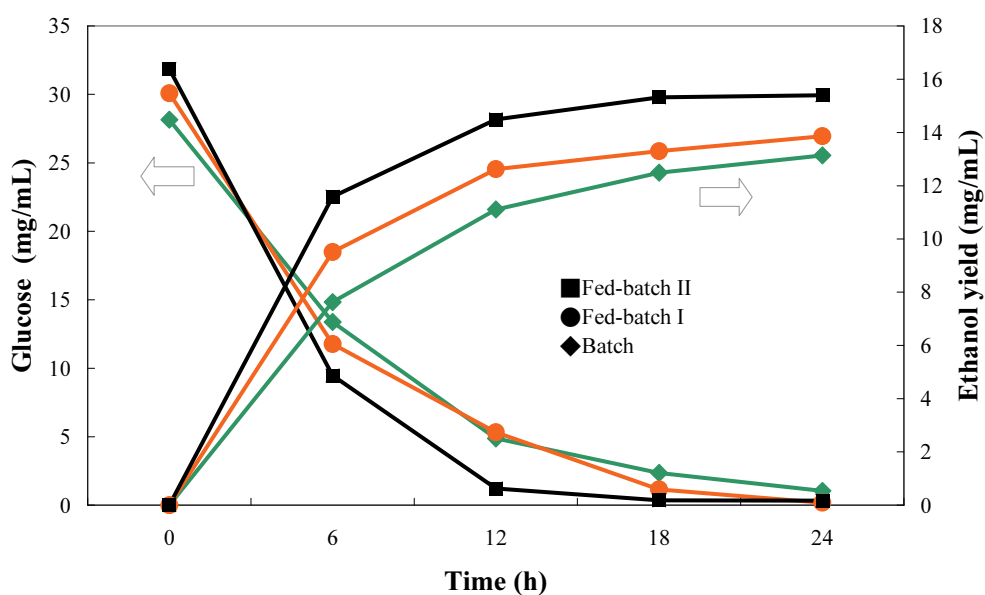


圖 3 醱酵過程水解液內之乙醇及葡萄糖變化 (醱酵條件：37°C、120 rpm、接種物劑量 10% (v/v))

Fig.3 Time course of ethanol production and glucose residue in the hydrolysate. Fermentation conditions: 37°C, 120 rpm, Inoculum loading 10% (v/v).

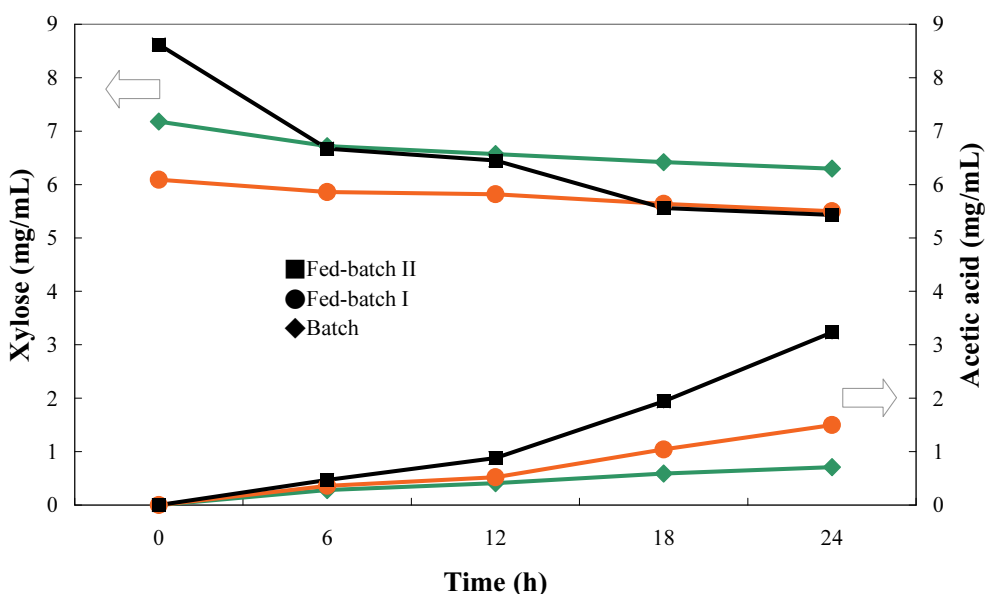


圖 4 醱酵過程水解液內之醋酸及葡萄糖變化 (醱酵條件：37°C、120 rpm、接種物劑量 10% (v/v))

Fig. 4 Time course of acetic acid production and xylose residue in the hydrolysate. Fermentation conditions: 37°C, 120 rpm, Inoculum loading 10% (v/v).

，較高之葡萄糖濃度則有利於醱酵之啟動。

分批饋入酵素及前處理物之饋料批次式酵素水解最有利於降低高基質濃度之負面效應，並獲得較高濃度葡萄糖。所得濃度及產率分別為 31.86 mg/mL，41.86%，比批次式酵素水解者增加 13.18%。所得之水解液可在無須經過排毒及滅菌處理下，獲得所得 15.40 mg/mL 之乙醇，達理論產率之 94.78%，殘餘之葡萄糖含量低於 1%；且醱酵第 18 小時，即可達最高值之 99.5%。

總結來看，纖維素含量 32.63 % 之料源經最適前處理條件後，纖維素含量增為 50.74%，因物料回收率偏低，導致纖維素回收率僅 59.76%。偏低之回收率應與兩階段前處理間之沖洗有關。於基質濃度 5% 下，5 g 之前處理物經最適酵素水解條件後，可獲得 1.303 g 之葡萄糖，產率僅為 51.36%，雖降低基質濃度，有助於提高葡萄糖產率，卻不利於醱酵。相較於採行蒸汽爆裂前處理法者，本研究先鹼後  $H_2O_2$  浸泡之前處理法，雖可免除醱酵階段之排毒及滅菌程序，降低成本，但就水解效率而言，仍有改進之處。高基質濃度下，透過分批饋入酵素及前處理物之方式，有助於提高水解效率；若為減低累積之葡萄糖對酵素之抑制作用，則可考慮採行同步醱化與醱酵製程 (Simultaneous saccharification and fermentation process, SSF) (Sun and Cheng, 2002)。

## 五、致謝

感謝台灣大學生物能源中心提供材料費，資助研究計畫。

## 六、參考文獻

1. Bisaria, V. S. and T. K. Ghose. 1981. Biodegradation of Cellulosic Materials - Substrates, Microorganisms, Enzymes and Products. *Enzyme and Microbial Technology* 3:90-104.
2. Bonilla, J. L., A. Chica, J. L. Ferrer, L. Jiménez, and A. Martín. 1990. Sunflower stalks as a possible fuel source. *Fuel* 69:792-794.
3. Buchert, J., K. Niemela, J. Puls, and K. Poutanen. 1990. Improvement in the fermentability of steamed hemicellulose hydrolysate by ion exclusion. *Process Biochemistry International* 25(5): 176-180.
4. Cantarella, M., L. Cantarella, A. Gallifuoco, A. Spera, and 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.
5. Cara, C., E. Ruiz, I. Ballesteros, M. J. Negro, and E. Castro. 2006. Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. *Process Biochemistry* 41: 423-429.
6. Cara, C., M. Moya, I. Ballesteros, M. J. Negro, A. González, and 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.
7. Chen, M., J. Zhao, and L. Xia. 2008. Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars. *Carbohydrate Polymers* 71: 411-415.
8. Chen, M., L. Xia, and P. J. Xue. 2007. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. *International Biodeterioration and Biodegradation* 59: 85-89.
9. Cheung, S. W. and B. C. Anderson. 1997. Laboratory investigation of ethanol production from municipal primary wastewater solids. *Bioresource Technology* 59:81-96.
10. 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.
11. Farid, M. A., H. M. Shaker, and A. I. El-Diwany. 1983. Effect of peracetic acid, sodium hydroxide and phosphoric acid on cellulosic materials as a pretreatment for enzymatic hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology* 5:421-424.
  12. Ghose, T. K. 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 59, 257-268.
  13. Jiménez, L., and J. L. Bonilla. 1993. Acid-hydrolysis of sunflower residue biomass. *Process Biochemistry* 28:243-247.
  14. Kristensen, J. B., J. Börjesson, M. H. Bruun, F. Tjerneld, and H. Jørgensen. 2007. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 888-895.
  15. Lawford, H. G. and J. D. Rousseau. 1993. The effect of acetic acid on fuel ethanol production by *Zygnomonas*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 39/40:687-699.
  16. Mansfield, S. D., C. Mooney, and J. N. Saddler. 1999. Substrate and Enzyme Characteristics that Limit Cellulose Hydrolysis. *Biotechnology Progress* 15: 804-816.
  17. Martín, C., M. Galbe, C. F. Wahlbom, B. Hahn-Hägerdal, and 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.
  18. Mosier, N., C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y. Y. Lee, M. Holtzapple, and M. Ladisch. 2005. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology* 96:673-686.
  19. National Renewable Energy Laboratory (NREL). Chemical Analysis and Testing Laboratory Analytical Procedures: LAP-002 (1996), LAP-003 (1995), LAP-004 (1996), LAP-005 (1994), LAP-010 (1994) and LAP 017 (1998). NREL, Golden, CO, USA.
  20. Öhgren, K., R. Bura, J. Saddler, and G. Zacchi. 2007. Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover. *Bioresource Technology* 98: 2503-2510.
  21. Olsson, L., B. H. Hägerdal. 1996. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology* 18:312-331
  22. Rudolf, A., M. Alkasrawi, G. Zacchi, and 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.
  23. Ruiz, E., C. Cara, M. Ballesteros, P. Manzanares, I. Ballesteros, and E. Castro. 2006. Ethanol production from pretreated olive tree wood and sunflower stalks by an SSF process. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 129-132:631-643.
  24. Ruiz, E., C. Cara, P. Manzanares, M. Ballesteros, and E. Castro. 2008. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme and Microbial Technology* 42: 160-166.
  25. Sharma, S. K., K. L. Kalra, and G. S. Kocher. 2004. Fermentation of enzymatic hydrolysate of sunflower hulls for ethanol production and its scale-up. *Biomass and Bioenergy* 27: 399-402.
  26. Sharma, S. K., K. L. Kalra, and H. S. Grewal. 2002a. Enzymatic saccharification of pretreated sunflower stalks. *Biomass and Bioenergy* 23: 237-243.
  27. Sharma, S. K., K. L. Kalra, and H. S. Grewal.



- 2002b. Fermentation of enzymatically saccharified sunflower stalks for ethanol production and its scale up. *Bioresource Technology* 85:31-33.
28. Södeström, J., L. Pilcher, M. Galbe, and G. Zacchi. 2003. Two-step steam pretreatment of softwood by dilute  $H_2SO_4$  impregnation for ethanol production. *Biomass and Bioenergy* 24: 475-486.
29. Stenberg, K., C. Tengborg, M. Galbe, and G. Zacchi, 1998. Optimisation of steam pretreatment of  $SO_2$ -impregnated mixed softwoods for ethanol production. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 71(4): 299-308.
30. Sun, Y. and J. Y. Cheng. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* 83:1-11.
31. Wen, Z. Y., W. Liao, and S. L. Chen. 2004. Hydrolysis of animal manure lignocellulosics for reducing sugar production. *Bioresource Technology* 91: 32-39.
32. Wikandari, R., R. Millati, S. Syamsiyah, R. Muriana, and Y. Ayuningsih .2010. Effect of Furfural, Hydroxymethylfurfural and Acetic Acid on Indigenous Microbial Isolate for Bioethanol Production. *Agricultural Journal* 5(2): 105-109.
33. Wright, J. D. 1988. Ethanol from biomass by enzymatic hydrolysis. *Chemical engineering progress* 8:62-74.
34. Xiao, Z. Z., R. Storms, and A. Tsang. 2004. Microplate-based filter paper assay to measure total cellulase activity. *Biotechnology and Bioengineering* 88:832-837.
35. Zhu, S. D., Y. X. Wu, Z. N. Yu, J. T. Liao, and Y. Zhang. 2005. Pretreatment by microwave/alkali of rice straw and its enzymic hydrolysis. *Process Biochemistry* 40: 3082-3086.
36. Zhu, S. D., Y. X. Wu, Z. N. Yu, X. Zhang, H. Li, and M. Gao. 2006. The effect of microwave irradiation on enzymatic hydrolysis of rice straw. *Bioresource Technology* 97:1964-1968.

收稿日期：2010 年 10 月 1 日

修改日期：2010 年 11 月 24 日

接受日期：2010 年 12 月 10 日