

廢稻稈資源化——食用級葡萄糖溶液之製備

王志恒^a, 陳文華^b, 賴進此^c, 徐振哲^a, 萬本儒^{a*}

^a 國立台灣大學化學工程學系

^b 核能研究所

^c 食品工業發展研究所

*Email: benzuwan@ntu.edu.tw

Abstract

本研究以核能研究所提供之廢稻稈纖維素固渣為原料，以酵素為觸媒行水解反應生成食用級葡萄糖溶液，期望副產物formic acid、HMF (hydroxymethylfurfural) 及furfural濃度可被控制在食用範圍，並期望相關成果可在未來糧食危機時，解決部分短缺問題。本研究之初發現反應系統有質傳阻抗問題，在纖維素固渣與溶液比例(固液比)2 w/v% (1 g of cellulose dry weight in 50 mL water)、反應時間24 hr、以攪拌翼混和反應溶液的情況下，葡萄糖產率僅為58.2%；而於反應器底層添加球磨用玻璃珠，由反應當中之攪拌研磨來減小固渣及增加質傳後，則可使產率提升至69.2%，並且各副產物濃度符合食用標準。為了增加葡萄糖濃度，以及增加單位溶液之熱量，本研究嘗試增加反應器中固液比濃度10倍(*i.e.*, 20 w/v%)，結果產率由69.2%降至53.2%，葡萄糖濃度則可由6.85 g/L增至53.1 g/L，但是HMF副產物濃度已超過食用標準。為降低該副產物濃度，本研究已研發浸泡程序清洗固渣原料，結果顯示酵素水解反應後之副產物濃度確實能隨清洗水量之提高而降低。當浸泡水重量增為10倍固渣重量、浸泡時間為30 min，清洗後之纖維素固渣其酵素水解後可製備出濃度為49.4 g/L(熱量為197 kcal/L)之葡萄糖液，各副產物濃度已符合食用標準。

Keywords: Enzymatic hydrolysis, Ball milling, Washing, Food-grade glucose.

NSC Project No. : NSC 102-2623-E-002-012-ET

1 Introduction

木質纖維素(如農業廢棄物、廢稻稈、蔗渣等)是大量存在於地表上之材料，在台灣，每年廢稻稈產生量約有150萬公噸之多，若經適當程序處理，從廢稻稈中可提煉出五碳糖以及六碳糖，此醣類可轉化為纖維酒精、生質能源或furfural等高價化學品。目前台灣核能研究所已建立廢稻稈轉化為纖維酒精之程序，藉由高溫稀酸可將五碳糖水解出來，剩餘纖維素固渣以酵素水解出六碳糖(葡萄糖)溶液，此醣類經發酵生成酒精，蒸餾純化後作為能源使用。然而該程序較為繁雜，最後之蒸餾純化程序因耗能而降低整體生產效率。而葡萄糖是屬於人類可以吸收獲取熱量的食物之一，若能直接將纖維素酵素水解後的葡萄糖溶液研發作為食品，不僅可大量減少工廠程序、增加單位廢稻稈使用效率，同時可以開拓人類食物新來源，有望在未來發生糧食危機時解決缺糧困境。

纖維素反應成葡萄糖有多種不同水解方式，如高溫稀酸水解、酵素水解等。稀酸水解以硫酸作為催化劑^[1-3]，反應時間約10 - 30 min，然而formic acid、HMF、furfural等酸的降解物亦同時生成^[1]，這些副產物對人體具些許毒性，在製備食用級葡萄糖液時，並不希望這些副產物產生。而以酵素為催化劑有葡萄糖選擇率高之優勢，且formic acid、HMF、furfural等毒性物質僅微量產生，但需要較長反應時間24 - 72小時^[4,5]。

本研究以核能研究所提供之纖維素固渣為原料，以製備食用級葡萄糖液為考量，採用酵素水解方式進行製備。研究中以兩個方向為主軸，其一為改善酵素水解效率，反應器中添加研磨用玻璃珠以改善質傳問題，並探討玻璃珠數目對葡萄糖產率的影響。其二為增加葡萄糖液食用熱量，藉由提高反應中纖維素固渣量來增加葡

葡萄糖濃度，並且嘗試控制formic acid、syringaldehyde、HMF、furfural等毒性物質濃度在可食用範圍。

美國食品藥物管理局GRAS(Generally Recognized As Safe)規範中，由於formic acid、syringaldehyde、HMF、furfural等物質皆存在於一般天然食物中，雖具些許毒性，但只要低於攝取限制以下就不會對人體造成危害。Formic acid的攝取標準為每公斤人體每日8 mg/kg^[6]，furfural為每公斤人體每日54 mg/kg^[7]；HMF普遍存在於蜂蜜中，以蜂蜜食用標準限制濃度為30 ppm^[8]；syringaldehydes濃度須低於20 ppm^[9]。因此以60公斤人而言，每日formic acid攝取限制為480 mg、furfural為3240 mg，本研究中所製備出的葡萄糖液皆以上述標準來判斷食用性。

2 Materials and Methods

2.1 纖維素原料

纖維素原料(纖維素固渣)含水量為46.9 wt%；乾重組成cellulose 43%，xylan 4.0%，其餘成分為lignin及ash。核研所新開發之前處理程序—酸催化蒸氣爆裂(acid-catalyzed steam explosion)，以農業廢棄物廢稻稈為進料，處理條件為浸泡於1.3 wt%稀硫酸，先加熱100 - 110°C，雙軸輾壓轉速1.7 rpm，再將含酸廢稻稈送至下一反應槽，以蒸氣爆裂185°C、2分鐘處理^[4]，經處理後得木糖溶液以及纖維素固渣。本研究以纖維素固渣為原料進行酵素水解反應。

2.2 酵素水解

水解反應在玻璃反應器或錐形瓶中進行，固液比2w/v% (纖維素固渣乾重1 g與水溶液量50 mL)，反應溫度50°C，pH=5，醋酸緩衝液50 mM，酵素使用Novozyme Cellic CTec 3，酵素量為15 FPU/g cellulose。玻璃反應器在溶液底層添加5 mm玻璃珠，以機械式攪拌翼600 rpm攪拌，反應器與攪拌翼直徑比為1.5 (反應器直徑6 cm/攪拌翼直徑4 cm)；錐形瓶反應器250 mL，以磁石攪拌子進行攪拌。本研究分別改變固液比(為2 w/v%、10 w/v%、20 w/v%)、球磨玻璃珠的數量、以及纖維素固渣的浸泡清洗程序，並探討葡萄糖產率以及溶液食用性。

2.3 纖維素固渣之浸泡清洗程序

將纖維素固渣浸泡於去離子水中，水與固渣重量比分別為5:1或10:1，浸泡10分鐘或30分鐘後過濾，濾餅(清洗後之纖維素固渣)則進行之後酵素水解反應。

2.4 分析方法

反應後之溶液以0.22 µm過濾頭(PVDF材質)過濾，注射於高效液相層析儀(High-performance liquid chromatography, HPLC)進行分析，並定量溶液中葡萄糖、木糖、formic acid、syringaldehyde、HMF及furfural濃度。使用column為Transgenomic Technologies公司的ICSep ICE-ORH-801 column，沖提液為5 mM H₂SO₄，流速0.6 mL/min，column溫度為35°C。

3 Results and Discussion

3.1 以球磨方式改善葡萄糖產率

研究初期進行再現性的實驗，期望達到核能研究所文獻中的葡萄糖產率 70.4 - 76.0%^[4] (反應條件：50°C、固液比 2 w/v%、pH = 5、酵素濃度 15 FPU/g cellulose、反應時間 24 hr)。以錐形瓶(磁石攪拌子攪拌)進行再現實驗，產率確實可達到 70.0 ± 0.1%。然而，由於實際生產將增加反應體積及提高固液比，整體溶液黏度會上升，磁石攪拌必須改為較高扭力之機械式攪拌翼攪拌。因此本研究在相同反應條件下，改以玻璃反應器及機械式攪拌翼(未添加玻璃珠)以檢驗再現性，結果產率降低為 58.2 ± 1.6%。之後曾改變攪拌翼轉速(200 - 800 rpm)、攪拌翼大小(3 cm 及 4 cm)、以及反應器形狀差異，都無法提高及再現水解產率。

經由光學顯微鏡觀察(Fig. 1)，機械式攪拌翼攪拌反應後之剩餘纖維素固渣，粒徑明顯較大；而以磁石攪拌子攪拌反應後的則較為細緻，因此可能是該反應系統能得較高產率 70%的原因。根據此現象推測，溶液底部的磁石攪拌子應可提供物理剪切力磨碎纖維素固渣，使酵素能與較小顆粒固渣反應；也就是能在反應中改善質傳阻力而提升水解效率。反之，機械式攪拌翼無法提供磨碎效果，使得水解效率較低。本研究因此添加球磨用玻璃珠於機械式攪拌翼反應器底層，嘗試在反應攪拌當中將纖維素固渣磨碎，以提升水解效率，實驗結果如 Fig. 2 及 Fig. 3 所示。Fig. 2 顯示當玻璃珠增添至 25 顆以上，葡萄糖產率確實可增加至約 70%之再現值。Fig. 3 則顯示隨反應時間產率之變化，未添加玻璃珠(0 顆)的產率在各階段都明顯偏低。

當提高反應器中固液比濃度至 10 倍(*i.e.*, 至 20 w/v%)，溶液黏度將會升高，研究中亦探討高固液比情況下改變玻璃珠數目的影響，由 Fig. 4 可以看出添加 30 顆玻璃珠的情況下，葡萄糖產率由未添加之 46.7% 提升至 53.2%。

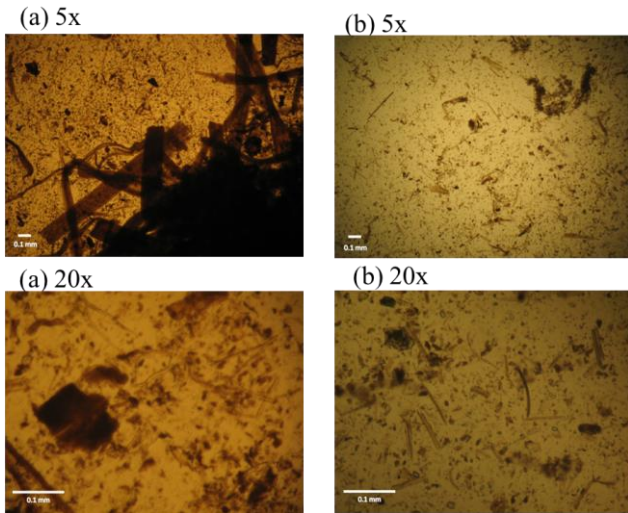


Figure 1: 光學顯微鏡下反應完後之纖維素固渣:(a)機械式攪拌器, 400 rpm, 葡萄糖產率 59.2%; (b) 磁石攪拌器, 產率 70.1%。

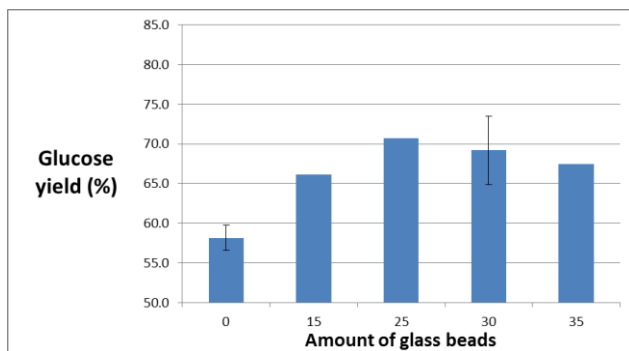


Figure 2: 玻璃珠數目與酵素水解產率影響(2 w/v%, 反應 24 hr)。

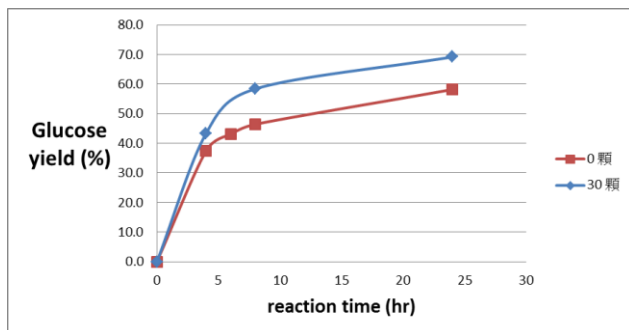


Figure 3: 不同玻璃珠數目下酵素水解產率隨時間變化影響(2 w/v%)。

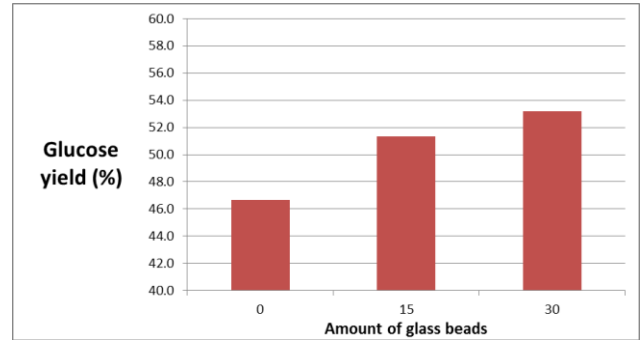


Figure 3: 玻璃珠數目與酵素水解產率影響(20 w/v%, 反應 24 hr)。

3.2 固液比影響及食用性分析

在 2 w/v% 低固液比的情況下，酵素水解所得葡萄糖濃度為 6.85 g/L，每公升溶液可提供 27 大卡的熱量，而一位 60 公斤男性一天需要從碳水化合物獲取熱量為 1170 大卡，即使忽略酵素水解液毒性，得一天飲用 41.8 公升才能達到熱量需求，遠超過人體一天飲水約 2 - 3 公升之負擔。若將反應固液比提高，每公升酵素水解液應可提供較多熱量。Table 1 分別為 2 w/v%、10 w/v%、20 w/v% 固液比下的酵素水解葡萄糖產率結果及各副產物濃度，由於 syringaldehyde 副產物之 HPLC 分析幾乎沒有訊號，其濃度遠低於 20 ppm 之食用限制標準，故不須討論 syringaldehyde 濃度。

Table 1: 固液比對葡萄糖產率及副產物濃度之影響

| 固液比 (w/v%) | 產率 (%) | Glucose (g/L) | Formic acid (g/L) | HMF (g/L) | Furfural (g/L) |
|------------|--------|---------------|-------------------|-----------|----------------|
| 2 | 69.2 | 6.85 | 0.034 | 0.013 | 0.055 |
| 10 | 67.1 | 33.2 | 0.184 | 0.058 | 0.291 |
| 20 | 53.2 | 53.1 | 0.361 | 0.130 | 0.443 |

反應條件：50°C、pH = 5、酵素濃度 15 FPU/g cellulose、反應時間 24 hr、轉速 600 rpm、30 顆玻璃珠

Table 1 結果顯示隨著固液比提高，葡萄糖濃度隨之上升，2 w/v%、10 w/v% 及 20 w/v% 所得溶液熱量分別為每公升 27 大卡、133 大卡及 212 大卡(1 g 葡萄糖可提供人體 4 大卡熱量計)。然而，副產物濃度也隨固液比提高而同時上升，在 10 w/v% 及 20 w/v% 時，HMF 濃度已超過 30 ppm (0.03 g/L) 以下之食用標準。

3.3 纖維素固渣原料之浸泡清洗影響及食用分析

核能研究所提供之纖維素固渣原料，由於是從廢稻稈經由酸處理及蒸氣爆裂而來，應含有酸及酸的降解殘留物(formic acid、HMF 及 furfural)，會導致之後酵素水解液中含過多副產物。為降低副產物濃度，本研究將纖維素固渣原料浸泡於水中清洗，期望能提高水解液食

用的可能性。Table 2 是浸泡時間為 10 分鐘，不同浸泡水量對固液比 20 w/v% 之酵素水解影響結果。

Table 2: 浸泡水量對葡萄糖產率及副產物濃度之影響

| 浸泡水量：固渣量 | 產率 (%) | Glucose (g/L) | Formic acid (g/L) | HMF (g/L) | Furfural (g/L) |
|----------|--------|---------------|-------------------|-----------|----------------|
| 0 | 53.2 | 53.1 | 0.361 | 0.130 | 0.443 |
| 5:1 | 56.0 | 53.6 | 0.138 | 0.050 | 0.292 |
| 10:1 | 62.1 | 62.1 | 0.128 | 0.036 | 0.290 |

反應條件：固液比 20 w/v%、50°C、pH = 5、酵素濃度 15 FPU/g cellulose、反應時間 24 hr、轉速 600 rpm、30 顆玻璃珠

由結果可知隨著浸泡水量上升，不但副產物含量隨之下降，而且葡萄糖產率會提昇，顯示清洗程序確實能對酵素水解反應及減少副產物濃度有正面影響，但是 HMF 的濃度依然超過食用標準。為進一步清洗固渣原料殘留物，本研究將浸泡水量:固渣量 10:1 之浸泡程序時間延長至 30 min，發現所得之固渣料行酵素水解後，液體中所含的 formic acid、HMF 及 furfural 濃度分別能進一步降為 0.098 g/L、0.028 g/L 及 0.251 g/L，HMF 濃度已低於 30 ppm (0.03 g/L) 之食用標準，但是葡萄糖濃度也降為 49.4 g/L，顯示進一步的浸泡清洗程序會清洗掉固渣中部份纖維素，而使酵素水解反應產生較少的葡萄糖，不過該葡萄糖液已符合食用標準，可提供每公升 197 大卡熱量。如果一天飲用 3.0 公升，應能獲得 591 大卡的熱量，且 formic acid 攝取量為 294 mg(低於 60 公斤人體每日攝取量 480 mg)，furfural 攝取量為 753 mg(低於 3240 mg)。該熱量雖不足以提供一整天所需 1170 大卡碳水化合物熱量，但初步看起來在糧食短缺時，已經可以幫助解決部分食物熱量需求的問題。

4 Conclusions

本研究反應初期發現以機械式攪拌翼攪拌溶液有質傳上的問題，必須在溶液底層添加玻璃珠，才能由研磨方式有效改善纖維素固渣與酵素間的質傳，提升葡萄糖的產率。當提高固液比進行水解反應，雖然所得之葡萄糖液單位熱量可上升，但副產物濃度及相關毒性也隨之提高，而無法達到食用標準。若增加纖維素固渣原料之浸泡清洗程序，隨後酵素水解所產生之葡萄糖液則可食用，所以目前本研究已經可以從廢稻稈中提煉出每公升 197 大卡食用級的葡萄糖液。

Acknowledgments

感謝國科會研究經費支持；感謝核能研究所提供纖維素原料，以及指導酵素水解實驗的操作；感謝食品科學研究所對於食用性標準的指導。

References

- [1] K. Karimi, S. Kheradmandinia, M. J. Taherzadeh*, "Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis", *Biomass Bioenergy*, **30**, pp. 247–253, 2006.
- [2] N. Mosier, C. Wyman, B. Dale, R. Elander, Y. Y. Lee, M. Holtzapple, M. Ladisch*, "Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass", *Bioresource Technology*, **96**, pp. 673–686, 2005.
- [3] Y. Sun, J. Cheng*, "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review", *Bioresource Technology*, **83**, pp. 1–11, 2002.
- [4] Wen-Hua Chen*, Ben-Li Pen, Ching-Tsung Yu, Wen-Song Hwang, "Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production", *Bioresource Technology*, **102**, pp. 2916–2924, 2011.
- [5] U. Mais, A. R. Esteghlalian, J. N. Saddler, S. D. Mansfield*, "Enhancing the enzymatic hydrolysis of cellulosic materials using simultaneous ball milling", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **98-100**, pp. 815-832, 2002
- [6] U.S. Food and Drug Administration, "Formic acid", *Database of SCOGS Reviews*, Report No.: 71, CFR Section: 186.1316, 2006.
- [7] T. B. Adams, J. Doull, J. I. Goodman, I. C. Munro, P. Newberne, P. S. Portoghesi, R. L. Smith, B.M. Wagner, C. S. Weil, L. A. Woods, R. A. Ford*, "The FEMA GRAS assessment of furfural used as a flavour ingredient", *Food and Chemical Toxicology*, **35**, pp. 739-751, 1997.
- [8] 經濟部標準檢驗局, CNS 1305 N5024.
- [9] R.L. Smith, S.M. Cohen, J. Doull, V.J. Feron, J.I. Goodman, L.J. Marnett, P.S. Portoghesi, W.J. Waddell, B.M. Wagner, T.B. Adams, "GRAS Flavoring Substances 21", *Food Technology*, **57**, No. 5, pp. 46-59, May 2003.