

生質木質纖維素生物轉換觀點之研究概述

Introduction to Bioconversion of Lignocellulosic Biomass

王嘉宏

工研院材化所(MCL/ITRI) 研究員

鑑於近年來全球對燃料需求持續增加，造成原油價格不斷上漲，預期未來幾年對於其它來源之生物能(bioenergy)的必然性需求將明顯大幅增長。在其它潛在生質資源中，「木質纖維素(lignocelluloses)」已被認定是作為生物燃料(biofuels)和其他相關衍生增值產品的最基本且主要之來源。現今的農業、工業和森林殘餘廢棄物中所含之木質纖維素，經估算佔世界上總生物量(biomass)的大多數，為了啟動以生質纖維素(cellulosic biomass)為原料之相關產品的工業性生產，將含纖維素組成物變成可發酵糖類之生物轉換(bioconversion)過程是必要的步驟。本文引述Kumar等人的論點，介紹生質纖維素在生物轉換上的影響因子及其產出的加值產品，也概述與木質纖維素生物轉換相關的當今生物技術。

In response to the rising price of crude oil due to the increasing fuel demand, the need for alternative sources of bioenergy is expected to increase significantly in the future. Among the conceivable bioenergy resources, lignocelluloses have been identified as the prime source for biofuels and other value-added products. Lignocelluloses, as agricultural, industrial and forest residuals, account for the majority of the total biomass present in the world. To originate the industrial production of cellulosic biomass, the bioconversion of the cellulosic components into fermentable sugars is the most crucial step. In the article, we will reference Kumar's point of view and introduce factors affecting cellulosic bioconversion with its extensive use in developing value-added products. In addition, several current adopting biotechnological aspects of lignocellulose bioconversion will also be discussed.

關鍵字/Key Words

木質纖維素(lignocelluloses)、生物轉換(bioconversion)、代謝工程(metabolic engineering)

一、前言

近年來全球面臨石化能源即將枯竭的困境，生物精煉(biorefinery)的思維重新受到矚目，世界各國紛紛展開了尋求以非石化基來源的生質原料，製備大宗化學品、化合物基材及燃料的新製造方式，為方興未艾的綠色工業注入一股活水。

地球表面每年吸收來自太陽光能所獲得的能量約 2.5×10^{21} Btu(1Btu=55.056 joules)，足足大於人類目前每年所需消耗能源 2.0×10^{17} Btu的12,000倍。現今所謂的生質原料，包括人類長久以來使用的穀物類作物(如：玉米、小麥、甘蔗和大豆等)之外，另一類是以「木質纖維素」為主要成分的生質原料，而這正是地球自太陽光所獲得之能量最直接的儲存形式，但目前卻因多項技術缺口尚未補足，使人類還無法有效率地利用此一蘊藏於地球上的龐大生質能寶藏。

二、纖維素分解酶在生物轉換過程所扮演的角色

要如何有效率地利用蘊含豐富能源的「木質纖維素」？由於其存在的形式已從地球上的植物，透過一連串的生長轉換，以不利於人類使用的樣貌留存，勢必得再經過特定程序的轉換才能使用。為了啟動以生質纖維素(cellulosic biomass)為原料之相關產品的工業性生產，將含纖維素組成物變成可發酵糖類之生物轉換(bioconversion)步驟，就成為必要且重要的程序。

包括細菌和真菌等多種微生物，具有能

將生質纖維素降解轉換成葡萄糖單體的能力。細菌的纖維素分解酶(cellulases)以多個分離的酵素單體組成一複合體形式存在，此由多個次單元構成的複合物稱為纖維素分解酶體(cellulosomes)；來自絲狀真菌的纖維素分解酵素系統，特別是*Trichoderma reesei*，包含了兩個外切葡聚糖酶(exoglucanases)或纖維二糖水解酶(cellobiohydrolases)，和至少四個外切葡聚糖酶，以及一個 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase)；這些酵素以協同合作的方式，扮演纖維素水解的催化工作。有各種物理參數，例如：酸鹼值(pH值)、溫度與吸附性以及化學因素，例如：氮、磷與酚化合物及其它抑制物質，這些因子皆會影響木質纖維素的生物轉換過程。

以微生物細胞生產纖維素分解酶的過程中，其關鍵取決於遺傳學與生物化學的調控，包括：誘導、異化作用或末端產物的抑制等。為了增加纖維素分解酶的產量，透過突變作用(mutagenesis)進行菌株改質方式，已有部分成效被報導；也有各式各樣的物理和化學方法，已用於開發細菌和真菌生產更高量的纖維素分解酶，但似乎目前的成果仍相當有限。

纖維素的生物轉換是一種複雜的過程，其反應需要經由含有內切葡萄糖苷酶(endoglucanases)、外切葡聚糖酶(exoglucanases)和 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase)，三種酵素的複合物之協同作用來達成。在發酵過程中，利用微生物共培養(co-cultivation)技術，能提高合乎需要之纖維素分解酶複合

體的產量；另外，有更多的研究者提出，藉由深入瞭解木質纖維素的生物降解作用之分子機制，並善用基因重組(recombinant DNA)技術，才能有效地開發真正具潛能之纖維素分解酶的生物製程(bioprocessing)，例如各種來源及種類之纖維素分解酶基因的選殖(cloning)與定序(sequencing)工作，藉由對其酵素蛋白本身特性的透徹瞭解，可節約纖維素分解酶的生產過程。除此之外，在木質纖維素經生物轉換後，提升人類對產出加值產品之分子機制的認知，未來代謝工程和遺傳學策略則將獨具潛能。

三、木質纖維素經生物轉換後之生質化學品和其他加值產品

生質木質纖維素經生物轉換過程後，對於有機化學品的生產，將具重要而有意義的貢獻。生質來源所獲得的糖，可選用合適的微生物透過發酵製程，快速地產出燃料酒精及化學商品；研究報導描述*B. coagulans*可經由發酵，將木質纖維素的己糖(hexoses)和戊糖(pentoses)轉換生產出乳酸。超過75%的有機化學品是經由五種初級的基礎化學品所產出，即乙烯(ethylene)、丙烯(propylene)、苯(benzene)、甲苯(toluene)和二甲苯(xylene)，可用來合成其它有機化合物。芳香族化合物能由分解木質素(lignin)而得；低分子量之脂肪族化合物，能透過將纖維素(cellulose)和半纖維素(hemicellulose)降解產生的糖，經發酵後生成之醇類衍生物而獲得。香草醛(vanillin)

和沒食子酸(gallic acid)是兩種最常被討論、深具應用潛力又引人興趣的單體產品。香草醛具有多種用途，包括在化學和醫藥工業作為生產除草劑、抗發泡劑、特定藥物，如罌粟鹼(papaverine)、左多巴(L-dopa)或抗菌劑的中間體；或生產日常家庭用品，如空氣清靜劑及地板亮光劑的添加等。由棕櫚樹廢棄物提煉的木糖(xylose)，可以生產木糖醇(xylitol)，較普遍常見的用途，包括代替蔗糖添加在食品內，作為一種增甜劑或抗菌劑，或是添加在口香糖及牙膏內。另外，已提出多種生物轉換方法，正在研究如何以微生物或其酵素，直接從半纖維素生產木糖醇；最近甚至有將生質木質纖維素轉換為可食用性蛋白質的構想，正處於積極研發階段。

四、木質纖維素在生物轉換過程中存在的影響因素

如果將木質纖維素的生物轉換過程，視為生物細胞中眾多代謝途徑的一項酵素催化反應，就如「代謝路徑組成」的模式一般，所有的代謝路徑皆由酵素及其受質所組成，酵素與細胞代謝的關係極為密切，因此只要控制酵素，即可控制生物細胞內的代謝路徑。相對於木質纖維素的轉換反應來說，整個轉換過程中最重要的關鍵在於，決定反應是否進行的各種「纖維素分解酶(或稱纖維素分解蛋白/酵素)」；然而只要與酵素活性有關的可能因子，便成為木質纖維素生物轉換過程中影響反應效率高低的因素；再加上傳統

菌種培養時發酵工程需考量的因素。整體而言，可能的影響變因分成物理因素與化學因子兩部分，分述如下：

(一)物理因素

1. 酸鹼值(pH)

不同的物理參數對纖維素的生物轉換都會造成一定的影響，而其中酸鹼值更是一項影響纖維素分解酶生產的重要因子。以黑麴黴(*Aspergillus niger*)為分析對象，探討酸鹼值與纖維素分解酶產量之關係，可觀察到pH值5.5時為最佳的纖維素分解酶生產條件。另一方面，對於採用紅色青黴(*Penicillium rubrum*)生產 β -葡萄糖苷酶，pH值在5.5~6.5範圍內則是最佳的反應環境。再者，pH值7.0則適合於採用棕黑腐殖黴(*Humicola fuscoatra*)生產胞外纖維素酶(extracellular cellulase)。因此，針對不同來源與種類的纖維素分解酵素，皆需做適度的酸鹼值控制，才能達成最佳化的生物轉換反應。

2. 溫度

溫度在木質纖維素的生物轉換效率上有極大的影響。就纖維素分解酶的活性與溫度兩者的反應相關性分析，多數微生物一般介於50~65℃之間有較佳的反應效率，例如：太瑞斯梭殼孢黴(*Thielavia terrestris*-255)、溫特麴黴(*Mycelieophthora fergussi*-246C)、溫特麴黴(*Aspergillus wentii*)、紅色青黴(*Penicillium rubrum*)、黑麴黴(*Aspergillus niger*)、華麗麴黴(*Aspergillus ornatus*)和粗糙鏈孢黴(*Neurospora crassa*)，即使這些微生物菌株的

較佳生長溫度在25~30℃之間，其所產生的纖維素分解酶卻適合更高之反應溫度。與此類似，以產紫青黴(*Penicillium purpurogenum*)、佛羅里達平菇(*Pleurotus florida*)和小平菇(*Pleurotus cornucopiae*)的野生菌株進行研究，28℃為最適生長溫度，但所產出之纖維素分解酶的最佳活性卻在50℃。目前的研究數據顯示，溫度對纖維素分解酶與受質之間的吸附性具影響力；在低於60℃的反應溫度下，吸附性與纖維素受質之糖化作用呈正相關型態，超出60℃的反應溫度時，由於高溫造成纖維素分解酶的蛋白質結構改變，甚至發生降解現象，使整體吸附作用大幅降低。

(二)化學因子

1. 碳源

許多不同種類的基質，可能來自農業或工業廢棄物，可能為合成或天然來源，以富含纖維的材料為例：廢棄紙漿、列印紙、混合廢紙、小麥桿、稻草、玉米穗軸、甘蔗渣、黃麻桿、花生殼、棉花殘片、木糖膠、落葉松木頭、木糖膠等，目前皆可被回收，提供作為纖維素分解酶進行生物轉換反應的基質。研究報告指出，利用黑麴黴(*Aspergillus niger*)以固態發酵方式進行轉化反應，當基質濃度低於12%時，隨著增加基質濃度而提高纖維素分解酶的產量，但若基質濃度超過12%後，則反而會降低生產水準。推測可能的原因是，球狀菌體中心位置的氧氣供給受限，以及提供能量以外的其它營養物已提早消耗殆盡。

2. 氮源

在多種氮源的影響效應上，例如：銨硫酸鹽 (ammonium sulfate)、銨硝酸鹽 (ammonium nitrate)、銨硫酸亞鐵 (ammonium ferrous sulfate)、銨氯化物 (ammonium chloride) 和鈉硝酸鹽 (sodium nitrate) 等，皆曾被研究分析。對於上述氮源的使用，採用銨硫酸鹽 0.5g/L 可達到纖維素分解酶的最高產量。但與上述結果形成對比的另一份報告 (Menon et al.) 則指出，當使用銨鹽作為氮源時，酵素性反應程度明顯降低。然而，又有其它的研究指出，當生產中額外添加玉米漿 (corn steep liquor) 0.8% v/v 時，具有提升 β -葡萄糖苷酶產量的效果。在以小麥禾桿、小麥麩皮與合成纖維素 (Sigma cell type-20) 的混合型纖維素作為生產反應的基質時，額外添加的玉米漿 (corn steep liquor) 也會誘導內切葡萄糖苷酶和外切葡聚糖酶，使產量提升 3~5 倍。不過，在培養基質中額外添加氮源，相形之下也增加了生產製程的原料成本。

3. 磷源

對於真菌而言，磷是在生長和代謝時的必要需求，是組成磷脂的重要成分，其涉及細胞膜的形成，磷除了扮演使核苷酸之間連結形成核酸股的重要角色以外，同時也涉及對碳水化合物化合物的新陳代謝，以及很多其它氧化反應和細胞內運作過程中的許多中間體、酵素及輔酶之形成。不同的磷源如：磷酸二氫鉀 (potassium dihydrogen phosphate)、焦磷酸鈉 (tetra-sodium pyrophosphate)、 β -甘油磷酸鈉

(sodium β -glycerophosphate) 和磷酸氫二鉀 (dipotassium hydrogen phosphate)，已被評估其在纖維素分解酶的生產上具影響效力。一項已被證實的研究數據指稱，磷酸二氫鉀在纖維素分解酶的生產反應上，是一種最有利之磷源選擇。

五、當今生物科技工藝於木質纖維素之生物轉換的應用

就生質木質纖維素在地球上的龐大蘊藏量而言，利用其製造生物燃料的作法堪稱合理可行；加上利用現今生物技術的手段，將生質木質纖維素轉換為高附加價值產品，更具有實質上顯著的意義。但由於各種障礙和技術缺口的存在，可再生能源的充分使用仍然是一項尚待深慮的議題。然而，隨著生物技術的進步，提升纖維素分解酶產量的各種方法及操作進程，仍陸續被開發與討論。

(一) 共培養發酵工程技術

纖維素基質經由生物轉換步驟，至下一階段驅產物 (例如：葡萄糖) 是一種複雜的過程，其中至少需要三種型態之酵素：內切葡萄糖苷酶、外切葡聚糖酶和 β -葡聚糖苷酶的協同催化才能達成。但到目前為止，包括細菌或真菌在內的所有微生物，皆存在一種或兩種所需分解酵素受限的情況；為了尋求解決方法，最新的報導指出，已有研究者試圖嘗試以需求互補的原則，將兩種以上具有生產纖維素分解酶能力的微生物，以「共培養」的方式進行反應，企圖大幅提升生質木

質纖維素的生物轉換率，目前進行中的例子如下：里氏木黴(*Trichoderma reesei* Qm 9123)和黑麴黴、毛黴屬(*Aspergillus ellipticus*)和煙麴黴(*Aspergillus fumigatus*)、里氏木黴(*Trichoderma reesei*)和黑麴黴等相關組合。

(二)人工演化之致突變技術

目前工業上發酵產品的主要生產菌株，多由運用菌種的突變和篩選方式獲得。利用微生物細胞進行纖維素分解酶的生產，其中主要經由對應的基因和生物化學的代謝調節所控制，包括誘導、代謝抑制或產物抑制等。即微生物在纖維素分解酶產出的情況下，進行某些代謝調控，造成某些酵素產量受到限制。因此，研究者利用突變的手段，將下述菌株進行改質，改善實例敘述如下：經突變篩選的短小芽孢桿菌(*Bacillus pumilus*)其纖維素分解酶產量，與原始菌株相較提高了4倍；利用突變處理里氏木黴(*Trichoderma reesei* Qm 6a)得到較高的纖維素分解酶之酵素活性；先利用UV、再利用NTG(100g/mL)進行化學突變處理後，從尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)得到高活性纖維素分解酶的突變株NTG-19，其和突變前的野生菌株相比，所產生的纖維素分解酶之酵素活性足足提升了80%左右。

(三)遺傳學之基因工程的操作技術

借鏡過去二十年在代謝工程上的研究，可成功地於非纖維素分解型厭氧菌的改質工程中得到代謝終端產物。相同地，此工程技術也可用於發展目前對纖維素分解型微生物，

在生產纖維素分解酶的代謝改質工程上，成功的實例包括：在大腸桿菌(*Escherichia coli*)和產酸克雷伯氏桿菌(*Klebsiella oxytoca*)提升酒精的生產；在丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)增加溶劑的產出，在酵母菌產出乳酸等。上述及其它更多的例子中，變更「代謝流(metabolic flux)」是最主要的中心策略，其採用的技術手段即：利用基因剔除法(gene knockout)，在不需要的代謝途徑進行阻斷；藉基因過表現法(gene overexpression)，在合乎需要的代謝途徑進行相關基因的強化。已有多種微生物菌株藉由代謝工程的改質，用於乳酸(lactic acid)、琥珀酸(succinic acid)、乙醇(ethanol)和丁醇(butanol)的生產，皆是成功的先例。

當各種物理和化學突變改質方法，被程式化並廣泛地用於提高木質纖維素分解酶產量時，基因重組技術和蛋白質工程也正以一強而有力之現代化方法姿態，被認為是有效地提升木質纖維素生物轉換效能的利器。基因重組技術具有改進木質纖維素分解酶各種特性，例如：產出量、專一活性、pH值適應度和溫度穩定性的潛能；其中可能藉由融合不同來源、特性相異或多重功能的蛋白質或酵素之基因片段，以重新組合的方式創建一種新的人工蛋白質/酵素(novel chimeric proteins/enzymes)，而此全新的蛋白質或酵素便具有達成生產反應所需的能力。

藉由基因重組技術和蛋白質工程，能改進對木質纖維素降解的分子機制，和木質纖維素分解型微生物的生物製程發展潛能之理解，也能幫助研究木質纖維素分解相關酵

素，彼此間協同及相互作用的調控機制，使有效率地將生質廢棄物轉換為具有高附加價值的產品，建立出一套在經濟上可行的發展系統。預期適合工業應用的木質纖維素分解酵素，其特性必須具有高吸附能力、高催化效率、高熱穩定性和低產物抑制性。為了達成該目標，目前尚有一些無法取得的相關研究資訊，仍有待積極地完成對各種與纖維素分解相關基因群的選殖和定序工作，如此將有助於在未來建立起一套實際可行的木質纖維素生物轉換系統。

六、結語

在面對能源的需求不斷增長，化石燃料供給來源卻不增反減的情況下，利用生質木質纖維素，為製造生物燃料提供了一項具永續性及再生性意義的新選擇。此外，不只是生物燃料，也可經由適當的技術，以生質木質纖維素為原料，生產具有高附加價值的產品，例如：可發酵糖、有機酸、溶劑、柔軟劑和其它化學品單體等。理論上以上的構想皆可能被實現，不過因為各種技術缺口仍存在，致使這些構想在落實層面並不是容易達成的任務。

生質木質纖維素在形態、組成結構上的複雜性和結晶性，是生物轉換過程中的主要

障礙之一；而生質木質纖維素的生物轉換過程，為了配合各種物理與化學反應條件的嚴苛要求，是一種複雜且多程序的催化反應。目前又無法從自然界中獲得所需要的理想化生物酵素系統，因此各種生物技術方法，正被探索式地逐步用於提升木質纖維素分解酶特性，期待能夠獲得理想化的生物轉換效率。也許當基因體學的資訊達到長足的進展時，人類將可突破生質木質纖維素的生物轉換困境，大規模地利用生質木質纖維素為原料，大量生產具有衍生性及再生性的高附加價值產品。

參考文獻

1. Antoni D, Zverlov VV, Schwarz WH (2007) Biofuels from microbes. *Appl Microbiol Biotechnol* 77:23–35
2. Farrell AE, Plevin RJ, Turner BT, Jones AD, O'Hare M, Kammen DM (2006) Ethanol can contribute to energy and environmental goals. *Science* 113:506–508
3. Jayani RS, Saxena S, Gupta R (2005) Microbial pectinolytic enzymes: a review. *Process Biochem* 40:2931–2944
4. Jin F, Cao J, Kishida H, Moriya T, Enomoto H (2007) Impact of phenolic compounds on hydrothermal oxidation of cellulose. *Carbohydr Res* 342:1129–1132
5. Kumar R, Singh S, Singh OV (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35:377–391
6. Lee SJ, Song H, Lee SY (2006) Genome-based metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for succinic acid production. *Appl Environ Microbiol* 72:1939–1948
7. Liu Y, Shi J, Langrish TAG (2006) Water-based extraction of pectin from Xavedo and albedo of orange peels. *Chem Eng J* 120:203–209