

行政院原子能委員會
97 年度科技計畫期末報告

纖維轉化酒精前瞻性量產技術發展

計畫編號：A-EE-05

執行單位：核能研究所

計畫主持人：王○寶

報告日期：97 年 12 月 24 日

目 錄

壹、基本資料	1
貳、計畫目的、計畫架構與主要內容	1
一、計畫目的	1
二、計畫架構(含樹狀圖)	1
三、計畫主要內容	2
參、計畫經費與人力執行情形	3
一、計畫經費執行情形：	3
(一)計畫結構與經費(金額單位：千元)	3
(二)經資門經費表	4
二、計畫人力運用情形：	6
(一)計畫人力(人年)	6
(二)主要人力投入情形計畫人力(人/月)	7
肆、計畫已獲得之主要成就與量化成果(output)	9
一、學術成就(科技基礎研究)(權重_40_%)	32
二、技術創新(科技整合創新)(權重_30_%)	33
三、經濟效益(產業經濟發展)(權重_10_%)	34
四、社會影響(民生社會發展、環境安全永續)(權重_10_%)	35
五、其它效益(科技政策管理及其它)(權重_10_%)	37
陸、與相關計畫之配合	40
柒、後續工作構想之重點	40
捌、檢討與展望	40
玖、附件	43

政府科技計畫成果效益報告

壹、基本資料

計畫名稱：纖維轉化酒精前瞻性量產技術發展

主 持 人：王○寶

審議編號：97-2001-03-0206

計畫期間(全程)：96 年 1 月 日至 98 年 12 月 日

年度經費：118,638 千元 全程經費規劃：436,287 千元

執行單位：核能研究所

貳、計畫目的、計畫架構與主要內容

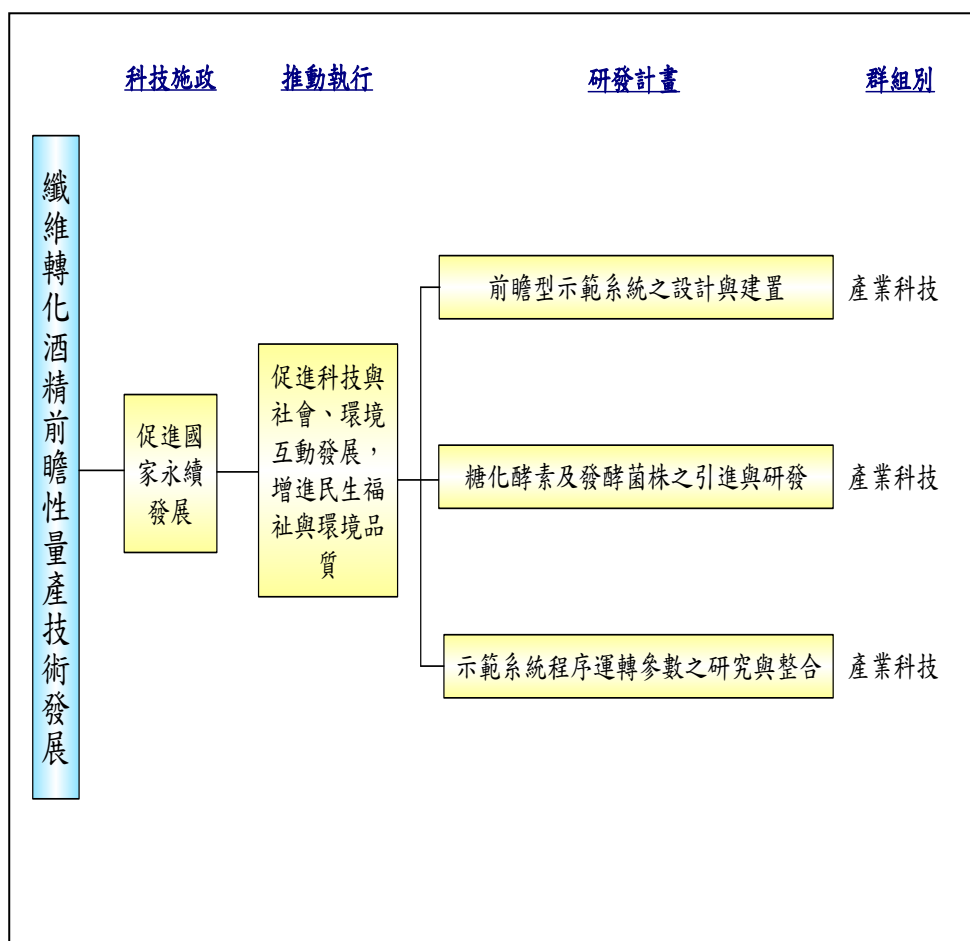
一、計畫目的

本項「纖維轉化酒精前瞻性量產技術發展」計畫，係透過纖維轉化酒精示範測試系統之建置，以建立我國纖維轉化酒精所需自主量產技術，同時為因應未來國內使用酒精汽油之情境，將協助建構國內酒精汽油使用環境與各項推動工作。因此，本計畫之總目標擬定如下：

1. 建置日進料量 1 噸規模之纖維轉化酒精前瞻性測試設施。
2. 整合國內具有微生物基因改良專長之學研機構，開發酒精轉化程序所需之關鍵酵素，建立我國生質酒精產製技術之競爭力。
3. 完成纖維轉化酒精程序各單元之整合，並建立示範測試系統運轉條件及評估之能力。

二、計畫架構(含樹狀圖)

本計畫涵蓋(一)前瞻型示範系統之設計與建置；(二)糖化酵素及發酵菌株之引進與研發；(三)示範系統程序運轉參數之研究與整合等三項分項計畫。其中，第一分項計畫之執行內容係將建置一日進料量 1 公噸的纖維轉化酒精示範測試廠，同時完成運轉測試之準備工作。至於第二分項計畫之目的在於開發纖維酒精量產技術研發所必要之生物資源，而本計畫中之第三分項計畫則將進行程序放大研究，以建立示範測試廠運轉測試所需之各項操作參數。



三、計畫主要內容

本計畫依據國科會 96 年 7 月 11 日召開之第 176 次委員會議，決議通過本計畫自 97 年轉由行政院原子能委員會主辦。97 年之計畫內容包括：

1. 建置進料量 1 噸/纖維轉化酒精示範測試廠，進行程序設備採購與廠房工程。
2. 開發高活性纖維素水解酵素，提供示範測試廠所需之酵素。
3. 以每批次 10 公斤進料之實驗系統進行系統放大研究，建立示範測試廠運轉測試所需之各項操作參數。

參、計畫經費與人力執行情形

一、計畫經費執行情形：

(一)計畫結構與經費(金額單位：千元)

細部計畫 (分支計畫)		研究計畫 (分項計畫)		主持人	執行機關	備註
名稱	經費	名稱	經費			
纖維轉化 酒精前瞻 性量產技 術發展	118,638			王○寶	核能研究所	
		前瞻型示範系 統之設計與建 置	100,952	魏○揚	核能研究所	
		糖化酵素及發 酵菌株之引進 與研發	10,026	黃○松	核能研究所	
		示範系統程序 運轉參數之研 究與整合	7,660	門○中	核能研究所	

(二)經資門經費表

項目 會計科目		預算數(執行數)/元				備註
		主管機關預算	自籌款	合計		
				流用後預算數 (實際執行數)	占總經費%	
一、經常支出						業務費 流出 8,670 千 元至設 備費
1.人事費						
2.業務費		28,678,000		20,008,000 (18,216,933)	16.86% (15.36 %)	
3.差旅費						
4.管理費						
5.營業稅						
小計		28,678,000		20,008,000 (18,216,933)	16.86% (15.36 %)	
二、資本支出						由業務費 流入8,670 千元
1.設備費		89,960,000		98,630,000 (40,681,802)	83.14 % (34.29 %)	
小計		89,960,000		98,630,000 (40,681,802)	83.14 % (34.29 %)	
合計	金額	118,638,000		118,638,000 (58,898,735)	100% (49.65%)	
	占總經費%	100%		100% (49.65 %)		

請將預算數及執行數並列，以括弧表示執行數。

與原計畫規劃差異說明：

本計畫為全程計畫之第二年，惟第一年計畫為能源局補助計畫，因立法院審議於96年7月通過，能源局於9月方與本所簽約，致本計畫96年度與97年度計畫重疊達9個月。計畫同仁雖竭力以赴，仍難達預定進度，主要影

響因素如下：

1. 因 96 年度預算於 96 年 7 月通過，故簽約延後，致原規劃 96 年度應完成測試廠設備與工程細部設計及廠房整修工程進度也順延落後。本測試廠房係採舊廠房再利用，因安全考慮及適應新建築耐震消防法規等，變動因素複雜，尤以發酵槽區空間高度與設備之相互搭配設計，同時考量所區景觀，經數度檢討方將發酵廠房型式及位置裁示定案，工程細部設計因而延後整體設計，設備購案採購時程亦隨之順延。
2. 本計畫所建測試廠屬開發性質，設備建置與建廠工程之採購無法以統包方式發包，需採個案發包，而各購案間之界面協調及確認費時，超出預期時間，影響工作進度。

計畫預估保留款

(單位：元)

項目名稱	費用別	97 預算	預估保留款
1.管件及桶槽設備及安裝	設備費	35,700,000	24,446,383
2.發酵槽設備及安裝	設備費	35,000,000	29,600,000
3.固液分離系統	設備費	10,110,000	1,300,000
4.水電、消防及通風	設備費	2,200,000	2,200,000
5.其他：纖維轉化酒精廠發酵區設備鋼構工程	設備費	7,990,000	399,500
6.工程及設備建置監造費	業務費	2,052,000	1,730,416
合 計			56,676,299

二、計畫人力運用情形：

(一)計畫人力(人年)

計畫名稱	執行情形	總人力	研究員級	副研究員級	助理研究員級	助理
分支計畫 纖維轉化 酒精前瞻 性量產技 術發展	原訂	20	1.4	3.7	7.8	7.1
	實際	18.7	1.4	3.5	7.4	6.4
	差異	-1.3	0	-0.2	-0.4	-0.7
分項計畫 前瞻型示 範系統之 設計與建 置	原訂	12	1.4	2.1	3.8	4.7
	實際	11.2	1.4	2	3.6	4.2
	差異	-0.8	0	-0.1	-0.2	-0.5
分項計畫 糖化酵素 及發酵菌 株之引進 與研發	原訂	3	0	0.5	1.1	1.4
	實際	2.8	0	0.4	1	1.4
	差異	-0.2	0	-0.1	-0.1	0
分項計畫 示範系統 程序運轉 參數之研 究與整合	原訂	5	0	1.1	2.9	1
	實際	4.7	0	1.1	2.8	0.8
	差異	-0.3	0	0	-0.1	-0.2

說明：

研究員級：研究員、教授、主治醫師、簡任技正、若非以上職稱則相當於博士滿三年、或碩士滿六年、或學士滿九年之研究經驗者。

副研究員級：副研究員、副教授、總醫師、薦任技正、若非以上職稱則相當於博士、碩士滿三年、學士滿六年以上之研究經驗者。

助理研究員級：助理研究員、講師、住院醫師、技士、若非以上職稱則相當於碩士、或學士滿三年以上之研究經驗者。

助理：研究助理、助教、實習醫師、若非以上職稱則相當於學士、或專科滿三年以上之研究經驗者。

(二)主要人力投入情形計畫人力(人/月)

姓名	計畫職稱	投入人月數 及工作重點	學、經歷 及專長	姓 名
王○寶	主持人	5 人月 總計畫督導與執行	學 歷	碩士
			經 歷	研究員
			專 長	化學工程
門○中	分項 主持人	5 人月 分項計畫督導與執行	學 歷	博士
			經 歷	研究員
			專 長	分析化學
魏○揚	分項 主持人	6 人月 分項計畫督導與執行	學 歷	博士
			經 歷	副研究員
			專 長	化學工程
黃○松	分項 主持人	2 人月 分項計畫督導與執行	學 歷	碩士
			經 歷	副研究員
			專 長	原子能工程
陳○泉	副研究員	6 人月 計畫管理	學 歷	碩士
			經 歷	副研究員
			專 長	化學
逢○芳	副研究員	2 人月 菌株發酵	學 歷	碩士
			經 歷	副研究員
			專 長	原子能工程
蔡○策	副工程師	8 人月 系統工程	學 歷	博士
			經 歷	副工程師
			專 長	化學工程
林○翔	副工程師	2 人月 菌株發酵	學 歷	碩士
			經 歷	國防役
			專 長	物理

劉○毅	顧問	8 人月 酵素純化發酵	學 歷	博士
			經 歷	顧問
			專 長	分子生物科技
翁○翔	副工程師	8 人月 酒精純化	學 歷	博士
			經 歷	副工程師
			專 長	環境工程
郭○倫	副工程師	2 人月 酵素水解與發酵	學 歷	博士
			經 歷	助理工程師
			專 長	環保工程
陳○華	副工程師	2 人月 前處理	學 歷	博士
			經 歷	副工程師
			專 長	化學工程
潘○立	副研究員	2 人月 公共系統與廢水廢 水處理	學 歷	博士
			經 歷	副研究員
			專 長	水資源及環境工程
郭○穗	副研究員	2 人月 系統工程	學 歷	博士
			經 歷	副研究員
			專 長	化學工程
陳○希	副工程師	2 人月 樣品分析	學 歷	博士
			經 歷	副工程師
			專 長	化學

與原計畫規劃差異說明：

本計畫規劃全年應投入 20 人年，實際投入 18.7 人年，主要原因為同時間亦有 96 年能源局補助計畫在執行(960901-971031)，雖然如此，本計畫亦盡最大努力推動各項工作。本計畫集本所具化工、生物、機電、化學分析等專長之人員執行前處理、酵素水解、發酵、蒸餾脫水、分析、電力、儀控、管線、土木建築、廢水處理等工作。

肆、計畫已獲得之主要成就與量化成果(output)

表一 科技計畫之績效指標

計畫類別 績效指標	1 學術研究	2 創新前瞻	3 技術發展 (開發)	4 系統發展 (開發)	5 政策、法規、制度、規範、系統之規劃 (制訂)	6 研發環境建構 (改善)	7 人才培育 (訓練)	8 研究計畫管理	9 研究調查	99 其他
A 論文			v							
B 研究團隊養成			V							
C 博碩士培育			V							
D 研究報告										
E 辦理學術活動			v							
F 形成教材										
G 專利			v							
H 技術報告			v							
I 技術活動			v							
J 技術移轉			V							
S 技術服務										
K 規範/標準制訂										
L 促成廠商或產業團體投資										
M 創新產業或模式建立										
N 協助提昇我國產業全球地位或產業競爭力										
O 共通/檢測技術服務										
T 促成與學界或產業團體合作研究			v							
U 促成智財權資金融通										
V 提高能源利用率										
W 提昇公共服務										

計畫類別 績效指標	1	2	3	4	5	6	7	8	9	99
	學術研究	創新前瞻	技術發展 (開發)	系統發展 (開發)	政策、法規、制度、規範、系統之規劃 (制訂)	研發環境建構 (改善)	人才培育 (訓練)	研究計畫管理	研究調查	其他
X 提高人民或業者收入										
P 創業育成										
Q 資訊服務										
R 增加就業										
Y 資料庫										
Z 調查成果										
AA 決策依據										

表二 請依上表勾選合適計畫評估之項目填寫初級產出、效益及重大突破

	績效指標	初級產出量化值	效益說明	重大突破
學術成就(科技基礎研究)	A 論文	國外期刊 3 篇	研發成果發表於國外期刊，可增加國際能見度	
	B 研究團隊養成	以委外合作方式建立 3 個學、研團隊 1. 交通大學生物科技所 楊○雄教授 2. 屏東科技大學陳○嘉教授 3. 元智大學元智大學 化材系/生技所莊○鑫教授	1. 本計畫欲建立廠內酵素生產技術，首先要有酵素生產菌株。交大與屏科大團隊則協助篩選潛力菌株供核研所建立酵素生產技術，此對降低酵素成本將有很大效益 2. 元智大學團隊則協助建立發酵廢液薄膜生物處理技術，此對後續廢水處理將更具競爭力	
	C 博碩士培育	5 位碩士生參與委託計畫執行	建立酵素菌株篩選與基因工程技術、以及廢液薄膜處理技術，使這些學生及技術後續能投入生質燃料之研究	
	E 辦理學術活動	協辦 2008 生質燃料研討會 1 場	核研所與中央研究院於 2008 05 30 於中研院合辦 2008 biofuel workshop，核研所在會中發表 4 篇論文，會議約 120 人參加。此會達到研發技術交流之目的	

	績效指標	初級產出量化值	效益說明	重大突破
	G 專利	申請 4 件	1. 以擠壓混酸配合熱水溶洗前處理程序，提升纖維生質原料經稀酸水解所產生水解液中木糖之濃度及產率之方法 2. 關於一種濃縮醣類及降低發酵抑制物濃度之方法，尤其係指一種發酵程序前濃縮醣類及降低發酵抑制物濃度之方法，其係應用於酒精發酵或其他需要濃縮醣類並降低醋酸、呋喃甲醛及羥甲基糠醛等發酵抑制物濃度之領域。 3. 一種用於含水纖維物料之固液分離機，係為適用於高溫高壓環境下進行連續式處理之裝置	1. 本發明專利能提升纖維原料水解液木糖濃度之方法 2. 此程序可同時濃縮醣類並降低發酵抑制物，如醋酸、呋喃甲醛及羥甲基糠醛之濃度，可增加醣類轉化酒精之轉化率。 3. 此裝置可將含水之纖維物料進行擠壓脫水程序，以取得含有纖維物料有用物質之液體，並將擠壓成型之纖維物料予以碎裂以便進行後續之物料輸送作業。
(科技整合創新)	H 技術報告	發表 21 篇	將纖維酒精建廠預製程技術寫成技術報告，作為訓練教材以達傳承功能	

		績效指標	初級產出量化值	效益說明	重大突破
		I 技術活動	1. 參加 4 場研討會，發表 6 篇專題報告 2. 辦理 1 場記者會，透過大愛及公視電視台拍攝研發設施與成果	研發設施與成果透過媒體與研討會方式可達到政策宣導與教育推廣之目的	
		J 技術移轉	未來以技轉方式給 2-3 家廠商	建立纖維酒精量產廠，估計年產 30 萬公秉之酒精 產值將達 78 億台幣	
展	經濟發 益(產業 經濟效	T 促成與學界或產業團體合作研究	促成與學界之合作案有 3 件	建立纖維酒精創新技術，應用於酒精製程	
社會影響	其他		未來初期年產 30 萬公秉纖維酒精	達到 CO ₂ 減量功能，CO ₂ 年減量 63 萬噸	

一、主要成就

本計畫以三個分項計畫進行，其執行成果分述如下：

(一).日進料 1 噸纖維轉化酒精示範測試廠之建置。

本年度工作除配合 96 年度之細部工程設計執行成果，繼續執行各項設備建置與相關水電、消防、通風等工程外，亦積極開發需自行設計之前處理酸解反應器、稻稈解捆及切割系統、發酵槽等重要流程設施。以稻稈為生質原料之纖維轉化程序，累積之工程經驗尚未普及，酸解過程中其親水沾附之特性造成傳輸上困難，相對增加前處理設備設計之難度。年度中除積極累積實驗測試設備之運轉經驗，並與機械製造廠商共同研擬噸級測試廠前處理設備之設計開發；配合酸解反應前處理設備之規範需求，設計規劃預處理設備應具備功能及其機器裝置，務求降低勞

力需求及工作安全；酸解後固液分離設備尋求較適合本土技術可應用之裝置，並降低程序上之物料損失。

發酵槽設計雖有既有技術參考，但需配合廠房限制及簡單大型化思考，以滿足未來設備繼續放大之可能性及經濟性，且相關設計亦需適合連續發酵、共發酵等操作；酵素水解設備因需配合高固液比操作，其桶槽型狀及攪拌翼型式必須特殊考慮；發酵液及酵素水解液因含菌體等蛋白質物資，有效之固液分離及適當回收使用則以高速離心設備配合，以滿足降低成本及適合酒精純化設備之進料固含量限制；另配合發酵程序之群體化及降低傳送過程管線累積及污染，高度較充足之獨立發酵場地，亦為規劃建置之重要工作。

相關之工作成就詳述如下：

1. 發酵槽設計與製作:

發酵工業有相當歷史，其桶槽之設計從簡單至繁雜均有，須視發酵物本身之發酵條件而定。其影響操作成本及固定成本最巨之因素為發酵過程之滅菌與避免感染，為了充份滅菌須作設備及發酵液之滅菌，使用相當之蒸汽，成本負擔重。本工作在仔細考量下，簡化滅菌需求及並減少程序中為隔離雜菌感染之無菌隔離閥設計，改由操作條件及管線配置等方法避免感染之機率，以節省建造成本及操作成本。本年度完成發酵槽及酵素水解槽設計圖件審查及材料鋼板查驗，發酵槽及酵素水解槽等設備已依規範製作完成，經過壓力容器檢驗程序合格後，預定年底可送交本所安裝。發酵槽採立式設計，桶槽高度與直徑比約 2.0；酵素水解槽採臥式設計，採用雙螺旋式攪拌設計，可滿足高固液比(大於 20%)需求，且克服反應初期黏度大之問題，並符合液化後溶液之繼續攪拌功能。目前製作中之發酵桶槽(圖 1-1)，內部為避免物料沾附，要求 400 mesh 以上之拋光；外部因不影響操作且成品非食品或藥物，為節省製作成本不要求拋光。酵素水解槽因須滿足酵素水解及未來作為共水解及發酵槽使用，設計上採可有效攪拌固體及液體之功能設計。為加速酵素水解液化期之攪拌混合效果，預水解槽設有循環切割幫浦。

2. 發酵單元固液分離設備設計與採購:

完成發酵單元固液分離設備之規劃設計及提出採購。五碳醣溶液加入過飽和硫酸鈣中和去除發酵抑制物後，採用板框過濾方式回收醣

液；酵素水解後之木質素殘渣採用薄膜擠壓板框過濾機，可降低濾餅含水率至 50%以下。板框過濾機之機架已製作完成(圖 1-2)；板框因考慮材料腐蝕問題，採用一體成型之塑鋼材料。

發酵液菌體分離採用高速離心分離機，菌種可回收使用並減少過濾過程酒精之損失。生質酒精之分離純化過程中，首先為將發酵液進行菌液分離，避免進入蒸餾純化過程中之酒精溶液含有過多之菌體，使蒸餾效率降低；且經由分離得到之菌體亦可經由無菌方式回收再進入發酵槽，降低菌體生產或購買之成本。噸級測試廠以酵母菌進行發酵，包括木糖發酵後含 *Pichia stipitis* 之酒精溶液及以 *Saccharomyces cerevisiae* 發酵葡萄糖後之醱酵液。為先評估工業上常用之兩大類連續式離心機（管狀式 (Tubular centrifuge) 及碟片式 (Disc stack centrifuge)），何者適用於上述溶液之菌液分離，進行實驗室測試。由離心力測試結果得知，兩種發酵液在 5000G 以上之離心力有極佳分離效果，5000G 以下分離效果急速下降，因此噸級測試廠採用離心力可達 13000G 之連續式碟片離心機。目前設備已製作中，離心機之基礎配合廠房增建亦已完成施作。

3. 發酵廠房鋼構增建:

配合發酵場區適當高度以求管線能依重力方式流動並減少管線積料之需求，完成鋼構廠房增建設計，並依據相關工程規範，完成發酵鋼構廠房之發包作業、放樣、基礎挖掘、植筋、灌漿、地板機械粉光、鋼構、壁面等工程，年度內將完成廠房興建及週遭管架鋼構。圖 1-3 為興建中之發酵廠房鋼構。發酵槽基礎及相關操作平台已配合整體設計及施作，廠房完成後可接續發酵槽安裝及相關配管及儀控工程。

4. 管線及桶槽製作安裝:

測試廠管線桶槽採購於 10 月 29 日公告招標，並於 97 年 11 月 18 日開標成功，由台欣工業公司承作。圖 1-4 為管線配置之壹例，本年度完成設計圖件確認及購入管線及鋼板材料。管線配置所需之管架已施工完畢。

5. 原物料解捆裝及切割系統設計規劃:

稻稈收集及運送亦為纖維轉化酒精成本必須考量之重點。稻稈含水量高，運送成本增加且儲存容易腐爛損失，故通常於收割時曝曬於田野，乾燥後再予以收集。收集時使用機具捆裝使成方便運送之稻草捆。然而預處理程序須將其解除捆裝，以利後續之切割。圖 1-5，為預處理系統之設計規劃示意圖，使用牧草飼料混合機之理念來作為解捆裝之機制。

6. 薄膜生物反應器(MBR,membrane bioreactor)之建置:

纖維酒精製程廢液中含有高有機質屬於營養性廢液，若以生物法處理，高有機質經生物降解程序，將破壞其成分，若能加以利用則是營養性的資源。有鑑於廢液資源化的趨勢，近年來各種新型、改良型的高效廢水處理技術應運而生，其中薄膜技術，特別是薄膜生物反應器組合技術在有機廢水處理中的應用格外引人注目。此技術是經由薄膜分離技術中固液分離特性來強化生物處理系統的一種組合技術。它將薄膜分離技術中的超過濾、微過濾薄膜組件與生物處理工程中的生物反應器（圖 1-6）結合起來，以薄膜組件代替傳統的二級重力沉澱池，顯著的提高系統的固液分離的能力，使系統出水水質和容積負荷都得到有效的提高，另串聯奈米或逆滲透薄膜組件進行高級處理，能達到水資源回收再利用之最大效益。本年度完成實驗級薄膜生物反應器設備採購，已完成安裝，尚在進行系統測試。

(二).完成國內高活性纖維素水解酵素 50L 規模試產，酵素總活性達 100 FPU/mL。

鑑於本分項計畫於 96 年度計畫中已完成國內外纖維素水解酵素之活性組成分析及各酵素之糖化效率測試(以酸催化前處理稻稈渣料為測試對象)，發現 Novozyme 公司之 Celluclast 1.5L + Novozyme188、Genencor 公司之 Accellerase 1000 等兩種國外水解酵素及國內試產之水解酵素的糖化效率，雖然均符合三天內達 80 %之需求，不過經評估國內外所蒐集之相關資訊發現，近期內國外水解酵素之售價仍然偏高，大量採購並引進至國內使用應不具可行性，建議仍應持續發展國內自產纖維素水解酵素之技術與能力，並致力於降低水解酵素之生產成本，藉以生產符合噸級測試廠之酵素水解程序運轉研究需求之纖維素

水解酵素。

根據前一年度之評估結果，本分項計畫於 97 年度以建立國內自產水解酵素之技術為工作重點。其中，本研究團隊首先針對國外酵素保存及產品穩定性進行探討，以作為未來國內酵素生產之酵素保存方法及品質要求之參考。另外，本研究亦開始進行酵素試產研究，同時發展酵素粗萃液濃縮技術，並以酵素生產規模達 50L 以上，最高酵素總活性達 100 FPU/mL 為目標，再藉此研究過程，檢討最適酵素生產方法及評估合理的酵素粗萃液濃縮倍數，朝符合計畫之酵素水解糖化效率要求及降低生產成本的方向，研發纖維素水解酵素之生產方法。

目前本分項計畫已完成預定之工作目標，其研究成果摘要說明如下：

1. 國內外水解酵素保存及產品穩定性之測試：初步結果顯示，國外水解酵素及國內試產酵素於酵素產品總活性值方面均具有合理的穩定性，但國外水解酵素具有較佳的保存性，其詳細分述如下：

- (1) 產品保存測試：本部份研究以 Novozyme 公司生產之水解酵素 Celluclast 1.5L 為測試對象，其測試結果顯示該產品於到貨時之酵素總活性為 60 FPU/mL，比活性值為 1.6 FPU/mg protein，在經過一年之 4°C 環境下保存後，再次量測其酵素總活性值發現仍為 60 FPU/mL(表 2-1)，此顯示該酵素活性在此保存條件下並未有顯著衰減的情形，故初步推測該酵素產品可能有另行添加特定的穩定劑。由於國內試產之水解酵素粗萃液並無法在上述長時間下仍維持相同的活性值，故生產後必須於短期間使用，否則勢必需要另行開發水解酵素活性之穩定化的保存方法。

- (2) 產品穩定性測試：本部份研究分別以 Novozyme 公司生產之水解酵素 Celluclast 1.5L 及國內試產之水解酵素為測試對象。在國外酵素產品穩定性測試方面，如表 2-1 所示，於不同時間採購之兩批水解酵素 Celluclast 1.5L 的總活性值分別為 60 FPU/ml(比活性值 1.7FPU/mg protein)及 52FPU/ml(比活性值 1.6FPU/mg protein)；另外國內於不同時間試產之兩批水解酵素的總活性值分別為 46 FPU/ml(比活性值 1.5FPU/mg protein)及 41FPU/ml(比活性值 1.6FPU/mg protein)。基本上，各批生產之酵素粗萃液的活性值即可能因種菌量、發酵條件控制的情形及收槽時間等因素而略有差異，再經酵素粗萃液濃縮操作時，亦可能因操作條件的差異而使

濃縮倍數有所不同，故綜合生產及濃縮操作之變數，其最終酵素總活性值略有差異應屬合理。因此，由上述結果可知，於不同批次採購或生產之水解酵素的總活性值均相當接近，此顯示在固定的生產方式下，國外水解酵素及國內試產酵素於總活性值方面均能維持合理的穩定性。

2. 國內自產纖維素水解酵素之策略及生產研究規劃：本研究評估結果將發展 In-house 廠內生產酵素之技術為研發策略，並以腐生真菌之酵素生產技術為近期發展重點，其詳細內容分述如下：

- (1) 國內自產水解酵素之策略：目前蒐集相關研究資訊發現，除了降低酵素生產成本為影響酵素生產策略的主要因素外，酵素液的運輸成本亦為重要考量。其中，水解酵素若有運輸需求時，則必須考量提高酵素粗萃液之濃縮倍數，藉以達到降低水解酵素溶液體積之需求，同時必須開發酵素活性穩定化之方法，克服運輸期間的保存問題。基於以上酵素生產問題，在評估國際上水解酵素之發展趨勢後發現，目前已逐漸朝向廠內就地生產(In-house production)的方式生產酵素，除了不必考量酵素運輸成本及運輸期間的保存問題外，亦可根據酵素水解程序之需求，調整酵素濃縮倍數，將不需要因應必須盡量減少水解酵素溶液體積之需求，而相對地增加酵素液濃縮之成本。因此，本研究建議國內水解酵素供應策略應與國際發展趨勢接軌，亦即發展廠內就地生產水解酵素技術，屆時水解酵素生產技術並可與酵素水解程序整合為單一的技術移轉項目。

- (2) 根據上述酵素生產策略，本研究於國內自產水解酵素之生產規劃如下：

- A. 近期以腐生真菌為水解酵素生產菌株，並利用菌株突變技術及建立最適酵素生產之發酵參數，提升酵素粗萃液之總活性值；中長期將選殖水解酵素基因，並基因改良酵母菌為酵素表現系統，使其發酵時同時具有水解酵素之生產能力，藉以減少腐生真菌生產之水解酵素的添加量。

- B. 採用廠內就地生產策略後，先前提高酵素粗萃液濃縮倍數以降低酵素溶液運送體積之需求已大幅降低，故後續將建立酵素粗萃液之濃縮技術，並評估及確認合理的酵素總活性值及濃縮倍

數。本年度預定以酵素總活性值為 100 FPU/ml 為酵素粗萃液之濃縮目標，藉以掌握酵素液濃縮之困難點與操作經驗，同時藉此提出酵素總活性值及濃縮倍數之建議。

C. 在研究發展方面，中長期酵素表現系統之研發將與學術單位合作；近期關於腐生真菌之篩選與評估工作，則與核研所策略聯盟之中研院進行合作研究；核研所主要負責酵素生產菌株之培養、酵素誘導生產及酵素生產發酵技術之研究。

3. 纖維素水解酵素試產研究：本研究先行測試國內試產酵素之糖化效率，再探討其工程放大研究之酵素產出活性，同時針對酵素液濃縮後合理的總活性值進行評估與討論：

(1) 國內自產水解酵素之糖化效率測試：目前本研究選用 *T. reesei* QM9414 及 *T. reesei* Rut C30 等兩株腐生真菌作為纖維素水解酵素生產研究用之菌株，初步結果顯示在相同的誘導碳源下，菌株 *T. reesei* Rut C30 所生產的酵素粗萃液能夠具有較高的總活性值。另外，測試該水解酵素試產實驗所取得之酵素對酸催化前處理稻稈渣料的糖化效率發現，本研究試產之水解酵素於三天內的糖化效率為 75%，若另添加 Novozyme188 (主要組成為 β -glucosidase 酵素)，則糖化效率提升至 85 %，較國外 Novozyme 公司水解酵素 Celluclast 1.5L + Novozyme188 之 80% 的糖化效率為佳，此顯示國內試產酵素若能提高 β -glucosidase 酵素的活性，則該酵素組成較國外酵素更為適合應用於稻稈的酵素水解，故國內以真菌生產酵素確實具有應用潛力(圖 2-1)。

(2) 國內纖維素水解酵素 50L 規模以上試產研究：為因應噸級廠酵素水解運轉測試之需求，有必要進行酵素生產之工程放大(scale-up)發酵研究，並建立其最適操作參數。目前以 *T. reesei* Rut C30 為生產菌株，當酵素生產實驗規模由 1L 瓶杯實驗放大至 5L 發酵槽時，其酵素粗萃液的總活性值可由 1.1 FPU/ml 提高至 2.5 FPU/ml，其主要原因在於發酵槽可以有效地控制發酵過程中的酸鹼值與通氣量。為使工程放大實驗所生產之酵素可以應用於每批次 10 公斤進料實驗系統之酵素水解程序的運轉研究，以建立 In-house 廠內酵素生產之操作經驗，本研究進一步將酵素試產規模由預計之 50L 提升至 100L，並完成 100L 酵素生產發酵系統及其酵素粗萃液濃

縮設備之設置(圖 2-2)。目前 100L 酵素試產結果顯示，其酵素粗萃液的總活性值於反應時間 72 小時可達最高值 2.5FPU/ml，與 5L 發酵槽所得之最高活性值 2.7FPU/ml 相近，但較 1L 瓶杯實驗所得之總活性值 1.2FPU/ml 為佳，此顯示本研究於酵素生產測試規模由實驗室放大至 100 L 發酵槽已有具體成果(圖 2-3 所示)。

- (3) 酵素粗萃液濃縮提高總活性研究：本研究首先利用酵素工業較常使用的超過濾技術進行酵素粗萃液濃縮測試研究，經初步測試 10~100kD 等不同孔徑之薄膜發現，酵素粗萃液體積約可濃縮的倍數介於 9~12 倍，蛋白質濃度及酵素總活性約可提高的濃縮倍數約介於 5-10 倍之間，其濃縮效果及最適操作參數視所生產之酵素粗萃液的蛋白質濃度及酸鹼值等因素而定，故未來仍有精進空間。參考目前超過濾濃縮之操作經驗及商業水解酵素所測得之總活性值，預估超過濾法可提高的酵素液總活性值約介於 15~40FPU/ml 之間。此外，本研究亦測試冷凍乾燥法濃縮酵素粗萃液之效果，酵素液總活性值經濃縮可提高至 109FPU/ml，體積濃縮倍數約 55 倍，酵素活性濃縮倍數約 43 倍，但所需操作時間達 56 小時 (表 2-2)。
- (4) 酵素液總活性值合理化評估：由上述內容可知，以技術面而言，酵素粗萃液經超過濾法濃縮後，再利用冷凍乾燥法即可將總活性值提高至 100FPU/ml，但相對地增加酵素液濃縮步驟會同時增加酵素生產成本；另由每批次 10 公斤進料實驗系統之酵素水解程序的運轉研究經驗發現，當每克纖維素對應之水解酵素活性為 15FPU，酵素水解之初始固液比設定為 25%時，則需額外添加的液體量約為發酵槽容積的 40%，其中，10%的液體添加量若保留為酸鹼值調整用的緩衝空間，則最大可容許的酵素液添加量約為發酵槽容積的 30%(亦即 100L 發酵容積最大可容許酵素液添加量約 30L)，此時酵素液總活性值僅需達到 2-3 FPU/ml，添加 30L 酵素液及可滿足上述酵素劑量維持在 15FPU/g cellulose 的要求，不過，若設定每批酵素生產量需滿足兩星期酵素水解程序連續運轉時的用量(設每批酵素生產所需時間約 1 星期，酵素液濃縮加上保持彈性所需工作時間約 1 星期，故每批生產量須滿足兩星期酵素用量)，則此情況下酵素生產所需發酵槽總容積需為酵素水解發酵

槽的 8 倍，大幅增加發酵設備投資成本；相對地若濃縮酵素液提高酵素液之總活性值，則酵素生產所需的發酵槽容積均可相對地減小；酵素生產之發酵槽設備投資成本與酵素液總活性值之相對關係圖如圖 2-4 所示，由圖中可知當酵素液總活性值提高至 30FPU/ml 以上時，酵素生產之發酵槽投資成本可降低的幅度即較為有限，然而上述內容亦提及酵素液總活性值提升至 40FPU/ml 以上時，酵素液除了需以超過濾法濃縮外，尚需額外使用冷凍乾燥法等其他酵素液濃縮技術方可達到。因此，若考量設備投資、酵素濃縮成本，初步研判合理的酵素液總活性值可能介於 20-40FPU/ml 之間，未來將會根據實際操作結果，並參考此評估方法，進一步確認合理的酵素液總活性值。

(三).示範系統程序運轉參數之研究與整合

本分項研究主要進行各程序之操作條件放大研究，以提供示範測試廠運轉測試時所需之操作參數；本計畫自 96 年起開始依據實驗室研究之結果，進行每批次 10 公斤進料之實驗系統各程序之最適操作研究，包括稻稈原料前處理、纖維素酵素水解、五碳糖及六碳糖發酵、酒精蒸餾及脫水等單元程序，97 年工作重點為訂定各單元程序之最適化操作條件，並測試其操作的穩定性，其次由各單元程序之研發人員提出設計改善與提升效能的方案，再根據整體評估之結果，進行各單元程序功能提昇之研發工作，本年度已依計畫進度完成前處理系統、水解糖化系統及發酵示範系統之最適操作條件訂定，以及擬定或進行其功能提升方案。本分項計畫同時亦進行纖維轉化酒精製程相關程序界面整合之研究工作，主要包括原料組成分析、固液分離操作、污泥資源化、用水合理化、質能平衡估算與成本推估模式等等之研究，其中本土生質原料組成分析及生質原料快速分析系統之建置已於 96 年完成，本年度的工作重點則為固液分離最適操作條件及操作方法訂定、示範系統污泥資源化研究、提出用水合理化之精進方案及建立程序運作之質量平衡計算方法。本年度各項研究工作之執行成果分別說明如下：

1.前處理程序最適化操作條件之研究

纖維轉化酒精整體程序中，前處理是足以影響後續酵素水解、發酵、蒸餾等及產量的重要程序，但現階段以稻稈為生質原料之纖維轉化程序之前處理設備工程經驗尚未普及化，因此本研究團隊自 95 年度起

即針對稻稈之前處理程序及設備進行研發，以稀酸水解程序為基礎進行最佳操作參數研發，同時自行設計與建置 2 升 (進料量: 80-100 g /batch) 之批次酸催化蒸汽爆裂實驗設備，並於 96 年度放大至 6 升 (進料量: 100-300 g /batch)，96 年度亦同時開發了擠壓混酸配合批次熱水溶洗前處理程序及設備，並應用於每批次 10 公斤進料之實驗系統。本年度(97)係以提供示範測試廠運轉測試時所需之操作參數與前處理設備反應器型式設計為前提，而以程序放大及連續式操作為研發標的。因此除了以稻稈為生質原料，利用每批次 10 公斤進料擠壓溶洗前處理實驗系統進行最佳操作參數研發外，另自行設計與建置兩套生質原料到前處理設備，分別是『20 升蒸汽爆裂反應系統』及『小型連續式螺旋輸送生質物前處理設備』。前者用以了解爆裂後渣料特性及探討閃化槽最佳型式；後者則擬應用於連續式酸催化蒸汽爆裂程序最適操作參數研究，且其各單元設備設計過程及操作經驗亦可作為噸級前處理設備設計之參考。其詳細內容分述如下：

- (1).建立擠壓混酸配合後續熱水溶洗前處理程序：此前處理程序係藉由擠壓混酸配合熱水溶洗，提升纖維生質原料經稀酸水解所產生木糖水解液中木糖的濃度與轉化率，同時保留大部份葡萄糖於固體殘渣中，以降低後續發酵反應槽尺寸及蒸餾能耗。其中，擠壓混酸係以本計畫於 96 年度配合纖維生質原料及加酸所設計開發之雙軸擠壓機前處理設備進行，主要方法為經打碎裁切至適當尺寸的稻稈原料，以連續進料出料方式進行擠壓混酸，同時破壞其結構。熱水溶洗乃將經擠壓混酸處理後之稻稈以飽和蒸汽在適當的溫度及時間下進行蒸煮，將半纖維素中的木糖溶洗出來之程序，接著再經壓榨設備進行固液分離，將反應後之固體及水溶液予以分離，其所得之水溶液即稱為木糖水解液，固體殘渣主要包含纖維素、木質素與少量半纖維素，分別作為後續發酵及酵素水解程序之原料。擠壓混酸主要操作參數有進料速率及加酸速率、稀酸濃度、螺桿轉速及平均加熱溫度；而熱水溶洗主要操作參數為每批進料量、操作溫度、壓力及時間。為取得最適操作條件，本研究團隊以稻稈為原料分別針對上述操作參數，以水解液中木糖、葡萄糖、醋酸、呋喃甲醛等濃度及木糖轉化率為指標，進行測試。所得最適操作條件為：進料及酸量速率分為 5-7kg/h 及 10-14kg/h，固液比 40-50%，混酸量為 3%，雙軸

擠壓機之螺桿轉速 40rpm、混酸溫度為 120°C；而熱水溶洗溫度及時間分別為 130°C 及 20 分鐘。在此條件下水解液的木糖的濃度可提升至 50-60 g/L，同時木糖轉化率可達 80-90 % (圖 3-1)。

(2).設計與建置『20 升蒸汽爆裂反應系統』及『小型連續式螺旋輸送生質物前處理設備』：就木糖轉化酒精之利用率而言，以酸催化法為最普遍效果較佳之方法，但若於高溫高壓操作下所產生的木糖不但會降解損失，且會產生不利後續發酵程序之抑制物，因此稀酸水解需在溫和條件下才能得到較高的產率，但此溫和條件對木質纖維原料結構之破壞是有其限制的，故一般可結合物理方法以補不足。蒸汽爆裂被認為是耗能低且最有效的方法，其原理為利用蒸汽或其它氣體將生質原料加熱後並保持一定時間，利用高溫和高壓導致木質素的軟化，然後迅速開閥降壓，造成纖維素晶體的爆裂，達到木質素和纖維素分離的目的。本研究計畫係選定酸催化結合蒸汽爆裂為前處理程序，分別設計與建置批次及連續式之反應系統，即『20 升蒸汽爆裂反應系統』與『小型連續式螺旋輸送生質物前處理設備』。各系統分述如下：

A.『20 升蒸汽爆裂反應系統』設計與建置—本研究係以本所 96 年度所建置『6 升蒸汽爆裂反應設備』之設計與操作經驗為基礎，同時參考國際文獻中蒸汽爆裂反應設備，成功地設計與採購『20 升蒸汽爆裂前處理設備』並已建置完成(圖 3-2)。本套設備可以提供高溫高壓 (壓力可達 25kg/cm²) 之蒸汽爆裂反應效能之研發，故除了可在不受溫度及壓力限制下，釐清加酸與否蒸煮與爆裂相互間及對後續酵素水解之影響外；其所得渣料特性及閃化接收槽設計與操作經驗可應用於噸級前處理設備設計與建置。

B.『小型連續式螺旋輸送生質物前處理設備』之設計與建置—因纖維原料前處理屬開發性之程序，因此為能提供噸級前處理設備之設計參數，本研究團隊以每小時 10kg 稻稈進料，配合酸催化蒸汽爆裂前處理程序為設計基礎，開發建置可連續操作之『小型連續式螺旋輸送生質物前處理設備』。此設備(圖 3-3)具有兩組反應器且皆有加酸設計，同時具有擠壓脫水設計，因此不但可以進行二階段稀酸水解及蒸汽爆裂程序之研究外，也可作為連續式酸催化蒸汽爆裂程序最適操作參數研究，預期其各單元設備之設計過程及

操作經驗可放大至噸級之前處理設備。

2. 酵素水解程序最適化操作條件之研究

鑑於一般直立式發酵槽應用於高固液比酵素水解操作時，當初始固液比(初始固體乾重/水解槽內總液體量 $\times 100\%$)由 5~10%提高 20%以上時，其酵素水解之糖化效率容易發生大幅降低的情形，因此根據先前直立式反應槽之操作經驗，97 年度酵素水解程序之研發重點著重於自行研發臥式酵素水解反應槽，並測試其運轉效能及建立最適操作條件，以精進高固液比酵素水解程序之操作，其研究成果分述如下：

(1).完成臥式水解槽之設計與建置：根據直立式水解槽之高固液比操作經驗，當固液比提高至 20%以上時，由於水解槽內的固含體會因重力因素下沉，使得直立式水解槽之攪拌軸無法充分發揮其混合功能，此時水解槽以高固液比操作時，其所含高黏滯度之流體會產生質傳限制，致使調整酸鹼值用之鹼劑及分解纖維素之水解酵素添加時容易發生分布不均的情形，進而降低酵素水解之糖化效率。有鑒於此，本研究團隊將水解反應槽改為臥式設計，藉以改善上述高固液比操作之問題。本年度研發之臥式水解槽外觀如圖 3-4，該臥式水解槽具原位滅菌功能，操作容積 ~60 L，可與目前 10kg 操作容量相互搭配，並設置有前處理固形物粉碎機，可改善饋料速度，並提高渣料進料尺寸之均勻性。另外，該水解槽之攪拌設計採用斜傾刮板葉片，可用於混合高黏滯度流體，並能夠避免固體渣料殘留於槽壁；同時該水解槽上方亦設計有八個進料口，可同步添加酵素或菌體，提高酵素及菌體分配之均勻性，故該臥式水解槽除了可應用於酵素水解程序外，亦可進一步用於同步糖化及發酵程序(SSF)操作之測試。另外，本計畫研發之臥式水解槽所建立相關操作參數，將可提供未來噸級廠水解槽功能設計改善之依據。

(2).完成臥式水解槽運轉效能測試：本研究以臥式水解槽分別測試 15%、20%及 25%等三種初始固液比條件之酵素水解效果發現，當初始固液比提高至上述高固液比範圍時，其所得糖化效率可達未受質傳限制之低固液比(~2%)操作所得糖化效率值的 95%以上，此顯示該臥式水解槽之攪拌設計，應用於擠壓溶洗槽製備之渣料的酵素水解操作時，確實可使高黏滯度流體均勻混合，降低質傳限制，此結果已優於先前直立式水解槽設計；此外，若進一步與國外相關研究結

果比較(圖 3-5)，可發現當初始固液比為 25%時，其糖化效率僅約未受質傳限制之低固液比操作所得糖化效率值的 70%左右，此顯示本計畫研發之臥式水解槽的混合功能確實領先國際相關研究。另外，各批次酵素水解測試亦顯示，當酵素添加劑量為 30 FPU/g cellulose、固液比 25%、pH 4.5-5.0 及反應溫度 50°C 的操作條件下，酵素水解反應溶液之葡萄糖濃度將可達 80 g/L (圖 3-6)。

- (3).建立高固液比酵素水解之監測參數：為精進酵素水解之操作，本研究亦嘗試建立相關監測參數。圖 3-7 為不同批次測試之流體黏滯度與反應時間的關係圖，由圖中可知，當初始固液比維持在 15-25%的範圍內，無論改變纖維素水解酵素添加量(15 FPU/g cellulose 或是 30FPU/g cellulose)或是改變添加之纖維素水解酵素種類(Celluclast 1.5L+Novozyme188 或 Accellerase 1000)，其流體黏滯度於 12 小時內均可降低至 300~400 cP 以下，此顯示在攪拌功能設計有效減輕質傳限制的情況下，酵素水解作用可迅速地降低高固液比流體的黏滯度，此結果將有助於評估未來以分批饋料方法操作時，各批次饋料時間之間隔，而各批次饋料可允許的固液比則可視情況於 15-25%之間彈性調整；另一方面，本研究另建立反應時固液比及流體黏滯度之相關性，發現 15-25%固液比所對應之黏滯度介於 300-3500cP 之間(圖 3-8)，當固液比降低至 15%以下時，流體即能具有相當良好的流動性。由於高黏滯度流體對於酵母菌的發酵作用可能會有抑制性的影響，故研究結果顯示在固液比於 15%以下或酵素水解反應時間達 12 小時後的環境下，酵母菌應可發揮既有之發酵功能，此結果可用於同步糖化及發酵程序(SSF)之工程放大研究。

3.發酵程序最適化操作條件之研究

- (1).本研究自 96 年起開始就葡萄糖發酵及木糖發酵程序進行操作最適化之研究，其中，葡萄糖發酵菌株為 *Saccharomyces cerevisiae*，目前已建立最適操作參數，其酒精生成率可維持 95%以上；木糖發酵菌株為 *Pichia stipitis*，由於其發酵效能受到木糖水解液的變動性影響較高，同時涉及水解液去毒性調理、種菌條件及發酵參數等多種因素的影響，且目前國際上亦無發酵規模達 100L 之木糖發酵工程放大研究之測試結果發表，故 96 年度木糖發酵之研究重點著重於建立過齡

化法(overliming)去毒性調理技術、不同前處理條件製備之木糖水解液對於木糖發酵酒精產率的影響及探討降低水解液中醋酸抑制效應之發酵條件等木糖發酵工程放大研究，其木糖發酵之酒精生成率約介於 70-80%之間，97 年則承繼上述研究成果，針對 100L 發酵實驗之木糖發酵菌種菌方法及木糖發酵操作參數最適化進行探討，藉以進一步提昇木糖發酵之酒精生成率，其研究成果分述如下：建立木糖發酵菌之種菌方法：由於先前研究顯示當木糖發酵之初始菌量較低時，相對地其酒精生成率亦會有降低的情形，因此於 100L 木糖發酵研究測試前，有必要先行建立種菌槽培養菌體之最適操作條件，已取得足夠種菌量。本研究中 100L 木糖發酵槽所對應之種菌槽規模為 30L，於反應溫度 30℃ 下，經測試攪拌轉速、通氣量、槽壓及酸鹼值等不同參數及 YPD (Yeast extract, peptone, and dextrose)、YPX (Yeast extract, peptone, and xylose)及 YPH (Yeast extract, peptone, xylose-rich hydrolysate)等三種培養基質後，本研究種菌槽中菌體隨反應時間增加之增長量如圖 3-9，其中三種培養基質所得之菌體增長量的差異性非常有限，YPD 及 YPH 為基質所得之菌體量會略高於 YPX 的培養結果，因此本研究初步將先以 YPD 為培養基質進行種菌操作，據以探討木糖發酵之最適化操作參數。

- (2). 確認過鹼化法作調理之對木糖發酵酒精生成率之效益：本研究利用 96 年度所建立之過鹼化法操作條件，就反應溫度 160℃ 之溶洗條件所製備之水解液進行去毒性調理，經檢測分析後發現該過鹼化法操作確實可有效移除原水解液中的糠醛等抑制物；本研究進一步分別測試過鹼化法調理前後之木糖發酵的酒精生成率發現，未經過鹼化法調理之木糖發酵結果顯示(圖 3-10a)，其木糖利用率較為緩慢，且至 72 小時後木糖轉化為酒精的作用即呈現停滯的情形，仍有約 50% 的木糖尚未轉化為酒精，此時酒精生成率亦僅 60% 左右；相反地，木糖水解液經過鹼化法調理後，其木糖發酵所需要之反應時間可以有效的縮短，至 40 小時左右水解液中的木糖已完成被利用，同時酒精生成率也能明顯的提升(圖 3-10b)。
- (3). 建立木糖發酵之最適操作條件：本研究經測試曝氣量(0.005~0.5vvm)、攪拌轉速(50rpm~150rpm)及酸鹼值(pH=4~7)等重要參數後，木糖轉化酒精之效率率已可提升至 85%(圖 3-11)，同時木糖利用

速率亦提升 20%，此結果不僅為目前國際已公佈之木糖發酵研究中測試規模最大者，其酒精生成率亦達國際領先水準。將來希望繼續透過反應參數之調整，再提升木糖轉化酒精之能力，同時測試較高糖濃度之水解液發酵情形，提高纖維酒精廠採用木糖發酵生產酒精之潛力。

4.固液分離最適操作條件之研究

固液分離的方法很多，例如批式離心機分離菌體殘骸和其他沈澱物，工業上處理大量沈澱物則須採用連續流動離心機。除了離心機外，在固液分離程度上過濾往往比離心的成本低且更有效率。例如比較膜過濾與離心分離特性，MF 濾可分離的粒子約需 5,000~10,000G 的離心力方能去除，而 UF 分離的粒子更小，需要 10,000~100,000G 的超高速離心機才能達到分離效果。加以較高速離心設備規模不易放大且能源耗損成本高，膜過濾在工程上有其潛在應用的優勢。薄膜過濾分離技術利用其具有分子與離子特有的分離特性，成功應用於生化產業程序中產品的澄清、濃縮、分離及純化等。中空纖維膜聚偏二氟乙烯(PVDF)中空纖維膜(hollow fiber)是一種可分離高固液比的薄膜過濾材料，材質本身具有化學穩定性、機械强度高、耐氧化性能及抗污染性等特點，應用於稀酸水解木質素水解液中含有抑制菌種生長和發酵抑制產物乙酸、糠醛、5-羥甲基糠醛的分離。解除底物的抑制、產物的回饋抑制和葡萄糖分解阻遏效應，不易產生菌種老化和變異問題等優點。將其應用於稀酸水解液的乙醇發酵，利用中空纖維膜常用的 0.10 與 0.45 μm 孔徑濾膜，以內壓逆向流動(counter current)過濾方式，適用於稀酸水解液中高固液比發酵液的分離與濃縮處理，除了提高乙醇發酵液的酒精產率外，並具有簡化程序與降低能源消耗等優點。使用膜過濾對於高剪切應力之微生物更是一大優點，主要缺點在於濾膜之清洗維護及程序設備之建立。

本年度完成固液分離最適操作條件及操作方法訂定，以五碳糖發酵液固液比約 7-10%為測試液，使用桌上型離心機進行菌種固液分離測試；結果顯示離心機的轉速大於 15,000 rpm，澄清液的固含量低於 0.05 vol.%，可達到菌種的完全分離。

5、製程廢液處理及用水合理化之研究

一般纖維轉化酒精廠，大都是以農作物收成後利用價值低之莖

葉，藉由發酵轉化程序製成酒精，以作為綠色燃料對全球石油危機與環境污染的解決途徑之一，亦為生態永續經營好方法。以稻草生產酒精目前尚無具規模的生產工廠，但是先導及測試等小量生產廠，國外已見報導；本所於民國 96 年開始設計及建立日處理 1 噸稻草之測試廠，以驗證程序方法並建立設施設計能力，同時獲取寶貴的建廠與運轉經驗。美國再生能源研究所報告提到纖維酒精之製程與本所稻草生產酒精流程與其類似，全廠依化工設施特性分為 9 區，A100 為原料準備，A200 為纖維素前處理，A300/A400 為醱化及發酵，A500 為酒精蒸餾，A600 為酒精精餾，A700 為廢水處理，A800 為酒精貯存及公用設施，A900 為預留之設施。就化工設備之特性設計之噸級廠其設備流程與作業用水如圖所示，A100 為固體處理用水不多，A200 為提高醱化濃度亦儘量減少用水，A300/ A400 與 A200 情形相似，但是程序加水量及清洗設備以本單元最多。依據本所噸級測試廠設計之用水量設計，由估算得到合理的生產用水及合理的廢水產生量，由製程用水平衡估算，製程用水量為 26.8 噸，將生產廢液 17.4 噸，因此，對於製程廢液處理及合理用水實為重要。計畫預期處理方式如下：

- (1).以木質纖維素為原料轉化纖維酒精所產生的製程廢液，其主要成分有醋酸（0.46%）、Furfural（0.49%）、Hydromethyl Furfural（0.08%）、水（98.8%）及少量木糖與纖維素糖等，與製酒（蜜糖發酵酒精）、食品（味精及酵母）等廢液屬於營養性污染物，讓其排放將使水體消耗溶氧量，造成水體惡臭，但若善加以利用則是營養性的資源。因此，本計劃為達到排放水零污染與廢液資源化的目的，計畫將酒精製程廢液分兩各方向進行處理，其一廢液濃縮，將濃縮液以化學方法進行降解、縮合、脫水的作用，及添加無機肥製成多元性、多功能之復合肥料。另生物法處理之污泥，可經由改質或添加鬆散材料（例木屑、飛灰等）製成有機培養土，可達到良性循環的治理與資源化之最佳效益。
- (2).美國國家再生能源實驗室(NREL)估計每生產 1 加侖的纖維酒精約需 6 加侖的水。經濟部技術處之調查，我國行業單位產值用水量以造紙業最高為 30.1 噸/萬元，食品業為 6.2 噸/萬元，水的來源以行業分食品、紡織及造紙以地下水為主，金屬基本工業以回收水為主，工業用水量最多的前幾名依次為化學材料、造紙、紡織、食品；稻草

生產酒精之製程與造紙、食品兩項產業相近，該等單位產值用水量偏高值得我們注意並採取節水措施。估算噸級纖維轉化酒精製程部份初始進水水量 26,753 (L)，運轉後產生蒸餾水 9,720 (L)，此部份回歸製程使用；產生廢水 17,366 (L)，經處理儘可能的回用，於計算廠用用水量時，回用之水不是每日進(補)量，補水量(Fresh water demand)方為全廠作業之單位產品進水(公升 Water/公升 EtOH)。由以上結算之用水量評估本廠單位進水(公升 Water/公升 EtOH)之情形，以檢討及改進。可從製程需水、冷卻水補水及一般用水予以討論。

(a)製程需水：26,753 L，蒸餾水回用 9,720 L，70%廢水回用 12000 L，尚不足 5033 L，以 NF 處理水補充，考慮 NF 之進料效率，則需自來水 $5033 \div 0.7 = 7190$ (L/d)。

(b)冷卻水補水 1920L/h 以 30%回用廢水補充 5366(L/d)，尚不足 $15360 - 5366 = 9994$ (L/d)，進自來水。

(c)一般用水 6000L/日，須進自來水。

用水管理方案 1；

上述(a)(b)(c)相加為全廠每日進水量：

$$7190 + 9994 + 6000 = 23184 \text{ (L/d)}$$

$$23184 \div 238 = 97 \text{ (公升 Water/公升 EtOH)}$$

與國外用水參考基準，每單位酒精使用 6 倍水比較，超出太多。

用水管理方案 2；

冷卻水補水為工廠運轉之最大耗水原因^(10,15,16)，佔全場用水 70~73%，若將之降到 500(L/d)補水，則

一般用水降到 1000(L/d)，

$$\text{則：} 7190 + 500 + 1000 = 8690 \text{ (L/d)}$$

$$8690 \div 238 = 36 \text{ (公升 Water/公升 EtOH)}$$

用水管理方案 3；

製程用水減少，即儘可能減少清洗發酵槽。目標為將 7190(L/d)減少至合理的情形如 3000(L/d)，同時冷卻水補水降到 500(L/d)補水，一般用水降到 1000(L/d)。

$$\text{則：} 3000 + 500 + 1000 = 4500 \text{ (L/d)}$$

$$4500 \div 238 = 18.9 \text{ (公升 Water/公升 EtOH)}$$

用水管理方案 4；

製程用水減少，發酵槽不清洗。再將 7190(L/d) 減少至 1000(L/d)，同時冷卻水補水降到 100(L/d)補水，一般用水降到 500(L/d)。

則： $1000 + 100 + 500 = 1600(\text{L/d})$

$1600 \div 238 = 6.7(\text{公升 Water/公升 EtOH})$

由以上方案之比較，噸級廠用水要達到 6 (L/ L EtOH)之 NERL 評估不是不可能之事。

6. 質量平衡計算之研究

為了解生質原物料主要成份在處理過程中，於各個單元程序或設備的質量變動及能量消耗情形，以作為運轉評估及功能提升之基礎，因此需要建立纖維素轉化酒精製程之質能平衡估算模式，並先以 10 公斤級實驗系統的測試數據進行計算分析，再以噸級測試設施之設計基準計算其理論質量流程，推估其穩定運轉時的酒精生產效能，下年度則將進行製程能量平衡估算。

本年度完成實驗系統之初步質量平衡計算，就已建置完成之前處理、纖維素水解、木糖/葡萄糖發酵、以及酒精溶液蒸餾純化脫水等主要單元設備，建立各單元程序運轉之質量平衡計算程式，並依據以稻稈為原料進行批次運轉測試之結果，進行全系統之質量平衡計算，初步測試運轉與質量平衡推估結果顯示，纖維酒精實驗系統之整體產率相當偏低，經過進一步之計算分析，發現除了需要改善水解及發酵操作條件提昇其轉化率之外，在製程及操作方面之損耗超過 40%，有必要設法精進部份設備之效能，並改善運轉管理作業，方能達到預期的整體功能。其次根據噸級測試設施的製程及工程設計基準，進行整體設施質量流程的理論計算，以乾稻稈含纖維素 31.3%及 Xylan 18.7%之主要成份，於稀酸水解結合蒸汽爆裂前處理程序木糖轉化率 70%、纖維素水解程序葡萄糖轉化率 80%、木糖發酵程序酒精轉化率 70%、葡萄糖發酵程序酒精轉化率 95%，以及 4 組固液分離設備固體濾餅含水率 60%、水洗糖液置換率 70%等設計條件下，日進料 1 噸之乾稻稈(假設含泥土等雜質 3%)經轉化後，估算可得到濃度 1.6%的酒精溶液 10,249 kg，再送至酒精蒸餾及脫水系統處理，以蒸餾程序回收率 98%、脫水後酒精濃度高於 99.5%計算，可產出酒精約 116.2 kg ~ 160.8 kg，視使用分子篩吸附或滲透蒸發脫水程序而異。

二、 量化成果

年度計畫指標為論文 3 篇，技術報告 5 篇及專利 4 篇。本年度完成國外期刊論文申請 1 篇，獲得 2 篇；會議論文 1 篇；專利申請 4 篇；技術報告 21 篇。

伍、評估主要成就及成果之價值與貢獻度 (outcome)

一、學術成就(科技基礎研究)(權重 40 %)

今年度發表 3 篇國際期刊論文，各論文摘要如下：

- (一) Promoting the formation of an active synthetase/tRNA complex by a non-specific tRNA-binding domain】：在纖維酒精的研發工作中，利用分子生物技術進行發酵菌種的基因工程改良，一直扮演著相當重要的角色。無論是發展共發酵菌、同步水解發酵菌甚至是單純提升菌種的酒精產率，都可以透過基因工程的改良而達到效果。然而，由於生物體本身的基因調控機制相當複雜，要單方面使微生物表現外源性的基因而不影響其既有的生理特性，徹底的研究其基因調控機制是必需的。本研究” Promoting the formation of an active synthetase/tRNA complex by a non-specific tRNA-binding domain” 探討酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 於基因轉譯(translation)的過程中，tRNA synthetase 上不同的 tRNA binding domain 序列對於調控胺醯化 (aminoacylation) 所扮演的角色。本次的研究成果除了強化了非專一性的 tRNA binding domain 對於酵母菌細胞中 tRNA 胺醯化的重要性，也同時對 aminoacyl-tRNAs 的形成機制提供了一個更深入的見解，有助於更進一步的釐清酵母菌的基因調控機制。(已發表於國外期刊, *Journal of Biological Chemistry*)[*J. Biol. Chem.*, Vol. 283, Issue 45, 30699-30706 (2008)]
- (二) Removal of arsenic from groundwater by electro-ultrafiltration】：The objective of this study was to examine the removal of arsenic from groundwater by a laboratory scale electro-ultrafiltration (EUF) system. Two groundwater samples taken from I-Ian County located in the northeastern part of Taiwan were studied. These well waters were selected based on their As(III) and As(V) contents; the As(III) to As(V) ratios of the well water were 1.8 and 0.4 for Well-#1 and Well-#2, respectively. In the absence of electrical voltage, the total arsenic removal efficiencies were 1% and 14% for Well-#1 and Well-#2 samples, respectively, using 100-kDa membranes. The higher As removal efficiency of Well-#2 than that of Well-#1 sample might be attributed to different charge characteristics of As(V) and As(III). Upon the application of an electrical voltage of 25 V to the ultrafiltration (UF) system, it was able to reduce the total arsenic concentrations in both groundwater samples by over 79%. The result

suggested the possible association between As(III) species and dissolved organic matter which enhanced the As removal. (已發表於國外期刊, Desalination) [Desalination, Vol. 234, Issue1-3, 402 - 408 (2008)]

- (三) Electro-ultrafiltration study on Aldrich humic substances with different molecular weights】: This study examined the effect of molecular weight (MW) fractions on electro-ultrafiltration (EUF). MW fractions fractionated from Aldrich humic substances (AHSs) were defined as G1 (3000 to >20,000 Da), G2 (500 to 3000 Da) and G3 (<400 to 500 Da) by using gel fractionation chromatography (GFC). G3 exhibited the largest flux decline in the absence of an electric field. The decline may be attributed to the relatively small MW and apparent electrophoretic mobility (AEM) of G3. The result from atomic force microscopy (AFM) roughness analysis suggested that G3 possibly blocked the membrane pore, but G1 and G2 were possibly accumulated on the membrane surface. In the presence of an electric field, both flux and removal were simultaneously increased due to the electrokinetic phenomena. However, the extent of the flux decline was higher for G1 than that for G2. It was postulated that electrochemical reactions changed the characteristics of membrane and AHSs. (已送國外期刊, Separation and Purification Technology, 審查) [Separation and Purification Technology, 63(2008) 23 - 29]

二、技術創新(科技整合創新)(權重30%)

今年度申請 4 篇專利，其中一篇為美國專利，各專利摘要如下：

- (一) 【發酵程序前濃縮醣類及降低發酵抑制物濃度之方法】：本發明關於一種發酵程序前濃縮醣類及降低發酵抑制物濃度之方法，其步驟包括：將含醣類及發酵抑制物之水解液進行 pH 調整；將該含醣類之水解液進行初步固液分離，以去除水解液中大顆粒；將該含醣類之溶液以一半透膜濃縮並降低該發酵抑制物，得到含醣類之濃縮溶液。本發明能提高醣類的濃度，再進行發酵，故能增加發酵後酒精的濃度，以節省純化酒精之成本及減少發酵槽的體積，本發明也能降低醋酸等發酵抑制物濃度，以利於後續發酵之進行。(申請中華民國發明專利，申請案號: 097125405)
- (二) 【METHOD OF SIMULTANEOUSLY CONCENTRATING AND DETOXIFYING SUGARS BEFORE FERMENTATION】：A

method for concentrating sugars and decreasing fermentation inhibitor concentrations simultaneously before fermentation is disclosed. The method includes the steps of adjusting the pH value of a hydrozylate containing sugars and fermentation inhibitors; separating solid and liquid in the hydrozylate, for removing large particles in the solution; and applying a semi-permeable membrane, for concentrating the sugars and decreasing the total concentration of the fermentation inhibitors in the hydrozylate, so as to obtain a concentrated solution. By the aforesaid method, the sugar concentrations in the hydrozylate are increased, thereby increasing the concentration of ethanol in the subsequent fermentation. Therefore, the cost of purifying ethanol and the volume of the fermentation tank are both reduced. Moreover, the total concentration of the fermentation inhibitors, such as acetic acid, furfural and hydroxymethyl furfural (HMF), is decreased, favoring onset of fermentation. (申請美國發明專利，申請案號:12/208,261)

- (三) 【提升木糖發酵之酒精產率的方法】：一種提升木糖發酵之酒精產率的方法，係將纖維生質原料經由稀酸進行前處理後，使其產生木糖水解液，再以過鹼化法去除該木糖水解液中之發酵抑制物，並同時調整木糖水解液之酸鹼值至發酵作用所需維持之弱酸性環境、以及控制木糖發酵參數，藉以提升木糖發酵酒精產率。(申請中華民國發明專利，申請案號: 096148863)
- (四) 【用於含水纖維物料之固液分離機】：本發明為一種用於含水纖維物料之固液分離機，係為適用於高溫高壓環境下進行連續式處理之機構，至少包含一耐壓容器、複數組傳動機具、二組擠壓滾輪、二片進料導引板、二組彈簧壓緊裝置、二組送料滾輪及一碎料輪所構成。本創作並使用同一馬達同時驅動各組滾輪及其碎料輪，藉以該傳動機具傳遞動力，並由該彈簧壓緊裝置調整改變施加於該擠壓滾輪之壓擠力量，藉此可針對含水之纖維物料進行擠壓脫水程序，以取得含有纖維物料有用物質之液體，並將擠壓成型之纖維物料予以碎裂以便進行後續之物料輸送作業。(申請中華民國發明專利，申請案號: 097141815)

三、經濟效益(產業經濟發展)(權重 10 %)

- (一) 本計畫擬於 2007-2009 年完成日進料 1 噸之纖維酒精程序測試設施，以開發國內稻稈纖維產製酒精 SHF 程序，並能因應兼容 SHCF、SSF 與 SSCF 程序，提供國內酵素水解與發酵菌種研究之測試平台，以及量產廠設計規劃之依據。

- (二) 開創新能源新興產業，扶植酵素產業，提升酵素性能及降低其生產成本，以提供國內纖維酒精產業之市場需求。此外提供產業技術移轉，協助建立纖維酒精量產廠，以配合國內推動 E3 酒精汽油政策。
- (三) 明年本計畫完成後，將逐步展開技轉工作。未來國內若建立 2-3 家量纖維酒精量產廠，若以年產 30 萬公秉酒精為初期目標，每年 CO2 減量將達 63 萬噸，年產值為 78 億台幣。

四、社會影響(民生社會發展、環境安全永續) (權重 10 %)

- (一) 利用稻草含有大量木質纖維素之農作廢棄物生產酒精，不僅可解決農業廢棄物之處理處置問題，且不會發生與人爭糧之顧慮，同時所產製之纖維酒精，可做為未來原油供應不足時之替代燃料，分散能源供給之風險。
- (二) 纖維酒精做為替代燃料已證實具有降低二氧化碳排放量及提升能量產出之效益，有助於減輕化石燃料使用所造成之溫室效應，可提高環境安全度，並兼具環保教育意義。
- (三) 發展廠內就地(In-house)酵素生產技術不僅可減少酵素運輸所衍生之二氧化碳排放及能源使用需求，提升纖維酒精能量產出之效益，亦可協助我國發展工業酵素產業。
- (四) 透過學研合作，利用基因工程技術及其他生命科學研究方法篩選纖維素分解菌株及建構其高效率表現系統，可培養具有實作經驗之生技專才，同時在研究期間所發展之各項新技術，亦可創造新產業及就業機會。
- (五) 97 年 5 月 30 日核研所與中央研究院合辦 2008 生質燃料研討會，本次研討會討論議題包括纖維酒精發展與製程、微生物發酵與酵素生產、生質能經濟、其他生質燃料等。與會人員逾 120 人，核研所在會中發表 4 篇專題演講。
- (六) 97 年 2 月 18 日於原能會舉行記者會，專題報告:第二代生質能源－纖維酒精，與記者溝通纖維酒精之發展現況及其效益。
- (七) 97 年 3 月接受大愛電視台訪問，完成/生活新能源 /纖維酒精之節目錄製，以宣導纖維酒精之技術發展與效益。
- (八) 97 年 5 月 29 日參加拿大駐台代表處舉辦之再生能源研討會，專題報告:加拿大纖維酒精之發展現況，並說明國際纖維酒精發展現況與挑戰。
- (九) 97 年 10 月 8 日受邀參加第六屆石油策略規劃與管理研討會，專題報告:生質能源朝向非糧化發展之前景，並說明其產業化之挑戰。

五、其它效益(科技政策管理及其它)(權重 10 %)

(一)學術合作案件

本年度與元智、交大、屏科大等學校合作開發發酵廢液薄膜處理技術、纖維素水解酵素及纖維分解酵素基因工程技術等，共有 3 件委託案，研發成果摘要說明如下：

編號	計畫名稱	研究單位	研發成果
1	纖維酒精發酵廢液薄膜處理技術之先期研究	元智大學化材系/生技所	1.從纖維酒精廢液中篩選出三株菌株對酒精廢液具有降解能力之菌株，經菌種分離、純化與鑑定後，證實分別為 <i>Bacillus cereus</i>、<i>Bacillus</i> sp. 與 <i>Lactobacillus</i> sp.。 2.纖維酒精廢液殘糖分析證實：廢液中富含高濃度纖維二糖（580 mg/L）及部分木糖（85 mg/L）與木糖醇（60 mg/L）。以致微生物分解較差。 3.完成纖維酒精廢水在 MF、UF 處理程序基本參數變化及不同薄膜材料之影響。 4.投 <i>Separation Science and Technology</i> "Flux Decline and Fouling Analysis in Dead-End Ultrafiltration of Waste Solutions Discharged from Cellulosic Ethanol Pilot Plant" SCI 學術期刊論文。
2	菌種最適培養條件評估及發酵製程放大研究——纖維酒精之高活性纖維素水解酵素開發	交通大學生物科技學系暨研究所	1.從虎尾大學羅朝春教授之本土菌種庫中篩選出約 400 支生產纖維素水解酵素的木黴菌菌株，根據其生長速度與分解能力大小等定性篩選，已獲得一株 <i>Trichoderma koningii</i> strain TK23 較佳之菌株。 2.已從 <i>Trichoderma reesei</i> RNA 中以 PCR 選殖出外切型纖維素水

			解酵素 I (Cellobiohydrolase I) 之 DNA 片段及從 <i>Trichoderma reesei</i> 及 <i>Trichoderma Koningii</i> strain TK32 之 RNA 中各選殖出 β-葡萄糖苷酵素 (β-1,4-glucosidase) 全基因片段。持續進行內切型纖維素水解酵素 (endoglucanase) 類似基因選殖，已完成第一個基因修飾菌株，具水解酵素活性 80 FPU/mL、~1.5-2.0 FPU/mg 蛋白質。 3. 已自 Novozyme 188 商業纖維素水解酵素大量純化出一個分子量為 70 kDa 蛋白，蛋白濃度 >10 mg/mL，且具有 β-葡萄糖苷酵素活性。並且培養出四個類似晶體。
3	高活性纖維分解酵素基因之選殖及表達	屏東科技大學生物科技研究所	1. 自黃牛瘤胃中分離出一株具有稻桿與多種纖維質分解能力之瘤胃真菌 <i>Neocallimastix patriciarum</i>。 2. 該菌株可利用羧甲基纖維、濾紙、avicel、稻桿、甘蔗渣、棉花等多種受質為生長碳源，其利用效率由高至低分別為稻桿>濾紙=avicel=甘蔗渣>棉花>羧甲基纖維。 3. 目前已選殖其外切型纖維水解酵素基因，並建構其表現系統，且該表現系統已能產生外切型纖維水解酵素之活性。

(二)人才培訓

本年度在人才培訓方面，計培訓碩士生 5 人，摘要說明如下：

培訓類別	姓名及單位	工作月數	在本研究計畫內擔任之具體工作性質、項目
☐ 研究助理 ☒ 碩士生 ☐ 博士生	姓名：沈○翔 就讀學校系所： 元智大學生技所	10	纖維酒精廢水處理之生物菌種篩選與測試
☐ 研究助理 ☒ 碩士生 ☐ 博士生	姓名：洪○致 就讀學校系所： 元智大學化材所	10	纖維酒精發酵廢液薄膜生物處理程序測試
☐ 研究助理 ☒ 碩士生 ☐ 博士生	姓名：陳○延 就讀學校系所： 元智大學化材所	10	纖維酒精發酵廢液薄膜生物處理程序測試
☐ 研究助理 ☒ 碩士生 ☐ 博士生	姓名：張○源 就讀學校系所： 交通大學生物科技學系暨研究所	8	進行商業纖維素水解酵素分離純化與特性探討
☐ 研究助理 ☒ 碩士生 ☐ 博士生	姓名：陳○珉 就讀學校系所： 屏東科技大學生物科技研究所	12	題目：瘤胃纖維素分解菌之篩選及基因選殖 內容：以特定基質自黃牛瘤胃選殖具多種纖維素分解能力之厭養菌株，並進行菌種鑑定及其纖維素分解酵素基因序列之比對，進而選殖出可轉殖於表現系統之基因。

陸、與相關計畫之配合

- 一. 搭配核研所新能源計畫之研發成果，將成果應用於本計畫噸級測試廠之設計與建置。
- 二. 結合電漿生質物氣化之研究，提供程序中木質素固體廢棄物作為電漿氣化之原料，使木質素能做其他用途，達到生質物全株利用之功能。
- 三. 本所纖維酒精研發團隊已與中研院建立研發纖維酒精技術發展之共識，並已建立合作研究之策略聯盟。核研所將持續與中研院南科中心合作，以核研所之測試平台，測試水解酵素的糖化能力。

柒、後續工作構想之重點

- 一. 97 年已發包之發酵槽製作、桶槽管線、固液分離系統、低壓配電盤、儀表控制、通風、消防等工程皆為跨年度之工作，98 年將積極予以完成。
- 二. 小型螺旋輸送生質物前處理反應器已設置完成，98 年將進行性能測試與功能改善，所建立之運轉經驗將作為建置噸級前處理設備之參考。
- 三. 利用學術合作所篩選之纖維素水解菌株，以 100L 發酵槽試產酵素。
- 四. 開發共發酵菌株以建立共發酵程序，作為建置 SSCF 程序之基礎。
- 五. 研發廢水處理薄膜生物反應器技術，簡化傳統生物法處理程序以增加資源回收。
- 六. 以稻稈為原料，其環境效益與成本效益之評估。

捌、檢討與展望

目前纖維酒精產業化的主要瓶頸係生產成本偏高，其經濟競爭力尚不如玉米酒精及甘蔗酒精。因此，近年來根據各國的研究經驗與相關評估資料，降低纖維酒精之生產成本為提高其經濟競爭力之首要方法。基於國內生技及化工等人才充沛，建議應整合相關單位之研發能量，方有機會加速纖維酒精技術之產業化，其具體方案建議如下：

- 一. 開發農業廢棄物收集技術：國內最大宗農業廢棄物為稻稈，年產量可達 149 萬噸，若以全部可耕地種植稻米，則最大稻稈產量可達 300 公噸，約可轉換為 60-75 萬公秉的纖維酒精，可滿足國內全面推動 E5 酒精汽油及部分推動 E10 酒精汽油之需求。目前農糧署已開始研發稻稈產製生質燃料所需機具，而核研所亦已積極研發稻稈酒精技術，故建議兩單位應建立合作策略聯盟，儘速建立稻稈原料成本資訊，並開發具競爭力之稻稈收集、運輸及儲存技術，方能加速稻稈酒精量產技術之研發進程。另外，稻稈亦為亞洲地區年產量最多之農業廢棄物，故國內若能建立稻稈收集技術，不僅有助於國內纖維酒精量產技術之建立，亦有利於產業至亞洲地區進行纖維酒精產業佈局。
- 二. 開發陸基纖維能源作物：由於國內土地資源有限，因此發展高纖維產量之能源作物亦為重要方向。目前農委會亦委請農業試驗改良場進行狼尾草、芒草及蘇丹草等纖維作物之選育及栽培計畫。根據國外相關資料顯示，若纖維能源作物每公頃年產量可達 15-20 噸以上，即能有效降低纖維原料成本。因此，建議現階段農委會可與核研所針對纖維能源作物生產酒精技術先行進行實驗室規模之合作研究，開發稻稈酒精以外之纖維酒精技術，使國內料源可以多樣化。
- 三. 開發海基能源作物：由於生命科學技術日新月異，近期國外已開始著重微藻生產酒精之潛力。目前發現可利用基因轉殖技術能使微藻具有生產纖維素或單糖之能力，若能配合光合生物反應器，將可發展微藻生產酒精技術藍綠藻生產纖維素做為纖維酒精之料源。由於農委會水產試驗所偏向油藻開發研究，台電綜合試驗所偏向民生產品研究，因此用於燃料酒精生產之微藻研究建議可尋求學術單位(如中山大學、輔英科技大學及海洋大學等)之研究經驗，研發可直接生成纖維素或葡萄糖之基因重組微藻，屆時再結合酵素水解技術及葡萄糖發酵技術即可生產酒精，核研所則可憑藉化工專長負責光合生物反應器測試廠之建置。此部分建議可先成立三年期計畫投入微藻藻種及基因改良之先期研究。
- 四. 發展纖維酒精量產技術及前瞻性生化製程：由現階段所公佈的資料顯示，目前大部分的纖維酒精先導工廠或驗證廠仍以分批水解及發酵程序(Separate/Sequent Hydrolysis and Fermentation, SHF)為主要程序測試目標。不過，基於同步糖化及發酵程序(Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) 及同步糖化及共發酵程序(Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation, SSCF)具有提升酵素水解速率、降低葡萄糖損失量及節省發酵槽設備投資成本等優點，目前普遍認為需要採用 SSF 程序及下一世代的 SSCF 程序生產酒精，才能有效地降低生產成本，展現商業競爭力。由於核研所已

建置完整的研究設施，故在程序開發方面建議可成立五年期之計畫，由核研所負責利用已建置之測試廠，執行 SSF 程序量產技術之發展研究。

- 五. 根據上述前瞻性生化製程 SSCF 程序研發之需求，水解酵素及酒精生成菌的研發為降低纖維酒精生產成本的最關鍵之生物資源研究項目。其中，水解酵素的研發重點係包括開發低成本酵素生產技術及降低酵素使用量等兩大方向；酒精生成菌研發方向主要為開發可同時轉化多種單糖(葡萄糖及木糖)為酒精之基因重組發酵菌株，除了需要具備高酒精生成能力外，尚需具備合理的穩健性(robustness)，以避免纖維酒精製程中所產生之水解液(hydrolysates)的抑制效應。目前國內中研院及許多學術單位均具有水解酵素及酒精生成菌之研發能力，核研所亦已建立相關研究設備與技術，故建議應由中研院及許多學術單位進行先期研究，另規劃五年期研究計畫，由核研所針對製程需求，針對上述單位先期研究所研發之酵素與菌株，進行進一步的基因改良、演化馴養及發酵技術之開發，建立下一代纖維酒精之關鍵技術。
- 六. 鑑於國內市場有限，未來國內發展纖維酒精產業勢必需要朝國際化發展，但目前國內並無專責單位協助進行相關佈局研究。因此建議應積極協調出專責單位協助產業進行商業佈局研究，並可優先調查南美洲、非洲及東南亞等地區投資設廠之可行性。

填表人： 王○寶 聯絡電話：

傳真電話： E-mail：

*計畫主管機關審閱後 簽名：

玖、附件

量化成果清單

國際期刊論文

計畫年度	計畫編號	論著類型	題 名	申請人	INER 編號	核准時間
2008	AEE0501	國外學術期刊	以外加電場超過濾程序去除不同分子量大小腐植質	魏○洲	INER-5616	2008/5/15
2008	AEE05	國外學術期刊	Removal of arsenic from groundwater by electro-ultrafiltration	陳○瓊	INER-5195	2008/2/18
2008	AEE05	國外學術期刊	Promoting the formation of an active synthetase/tRNA complex by a non-specific tRNA-binding domain	陳○恆	INER-5523	2008/9/17

專 利

計畫年度	發明人	專 利 名 稱	國別	種類	執行計畫名稱	計畫編號	申請案號
2008	陳文 恆 林鼎翔黃 瓊芳周聖 炘許登傑 郭家倫黃 文松門立 中王嘉寶	提升木糖發酵之酒精產率的方法	中華民國	發明	纖維轉化酒精 前瞻性 量產技 術發展	A-EE-05	096148863

2008	翁○翔 魏○洲 蔡○諺 魏○揚	發酵程序前濃縮醣類及降低發酵抑制物濃度之方法	中華民國	發明	纖維轉化酒精 前瞻性 量產技 術發展	A-EE-05	097125405
2008	翁○翔 魏○洲 蔡○諺 魏○揚	發酵程序前濃縮醣類及降低發酵抑制物濃度之方法	美國	發明	纖維轉化酒精 前瞻性 量產技 術發展	A-EE-05	12/208, 261
2008	蔡○晉 任○熹 陳○華 魏○揚	用於含水纖維物料之固液分離機	中華民國	發明	纖維轉化酒精 前瞻性 量產技 術發展	A-EE-05	097141814

研究報告

計畫年度	計畫編號	論著類型	題 名	申請人	INER 編號	核准時間
2008	AEE05	研究報告	纖維酒精專案計畫超時例會議事彙整報告(第三輯)	陳○瓊	INER-5385R	2008/7/14
2008	AEE05	技術手冊及技術程序書	10 公斤級纖維酒精研發系統電力及中央監控設備製作	徐○演	INER-OM-1215R	2008/8/6
2008	AEE05	技術手冊及技術程序書	10 公斤級纖維酒精程序研發設施公用設備製作及操作手冊	徐○演	INER-OM-1204R	2008/6/18
2008	AEE05	研究報告	密度計量測原理及於生質酒精程序研發之應用	陳○希	INER-5387	2008/7/14
2008	AEE05	研究報告	影響纖維素分解酵素之因子	高○達	INER-5821	2008/10/30
2008	AEE05	作業程序書	小型連續式螺旋輸送生質物前處理設備設計及製作規範書	蔡○晉	INER-SOP-0136R	2008/10/14
2008	AEE05	研究報告	稻稈水熱前處理程序之最適化條件研究	伍○義	INER-5786R	2008/10/27

2008	AEE05	研究報告	100L 木糖發酵之初步測試結果	林○翔	INER-5639H	2008/10/14
2008	AEE05	作業程序書	噸級纖維酒精測試廠品保作業導引	邱○甲	INER-SOP-0143R	2008/10/16
2008	AEE05	委託計畫報告	菌種最適培養條評估及發酵製程放大研究	陳○恆	INER-A1718H	2008/10/27
2008	AEE0501	研究報告	纖維酒精測試廠酒精溶液蒸餾回收系統操作控制	王○輝	INER-5625R	2008/10/13
2008	AEE0501	研究報告	纖維酒精製程之稀酸水解液膜過濾濃縮技術評估	蔡○諺	INER-5553R	2008/10/9
2008	AEE0501	研究報告	纖維酒精製程之稀酸水解產物過濾裝置評估	蔡○諺	INER-5552R	2008/10/9
2008	AEE0502	作業程序書	發酵系統單元設備之標準操作程序書	周○炘	INER-SOP-0128R	2008/8/12
2008	AEE0502	作業程序書	纖維水解系統設備與中央監控之標準操作程序書	周○炘	INER-SOP-0131R	2008/9/17
2008	AEE0502	委託計畫報告	新穎性酒精發酵菌株篩選與研究-委託研究初步成果	周○炘	INER-A1710H	2008/10/24
2008	AEE0503	研究報告	纖維酒精廠生產成本分析模式之建立	魏○洲	INER-5528H	2008/9/26
2008	AEE0503	研究報告	核研所纖維轉化酒精研發系統公斤級前處理程序操作條件研究	陳○華	INER-5569H	2008/10/9
2008	AEE0503	研究報告	20 升蒸汽爆裂前處理系統設計、建置與測試	陳○華	INER-5630H	2008/10/15
2008	AEE0202	研究報告	引進工業用纖維素水解酵素於纖維酒精生產之評估	郭○倫	INER-5431H	2008/8/6
2008	AEE0501	研究報告	薄膜過濾分離技術在生物工業之應用	詹○裕	INER-5852	2008/11/12



圖 1-1 施工製造中之發酵桶槽



圖 1-2 發酵單元板框過濾機機架



圖 1-3 興建中之發酵廠房鋼構

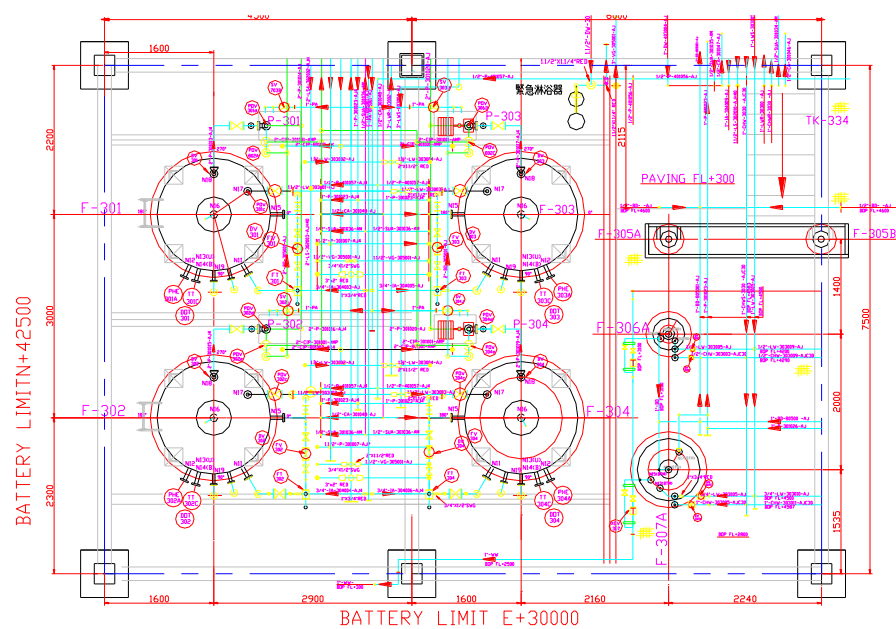


圖 1-4 管線配置規劃範例(五碳發酵槽)

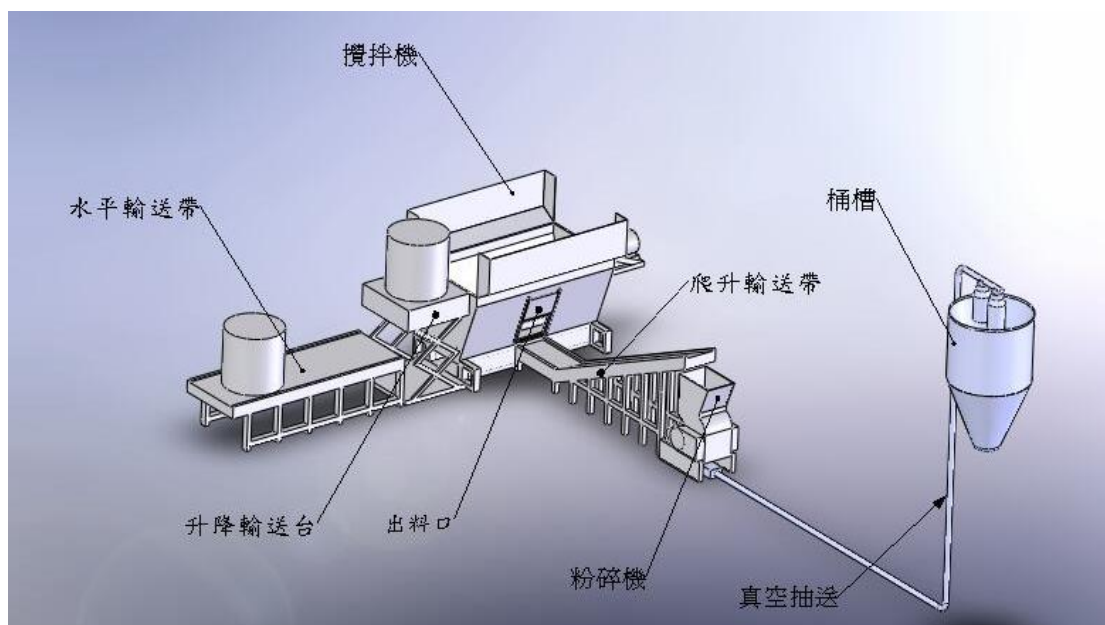


圖 1-5 生質物料解捆裝及切割系統示意圖

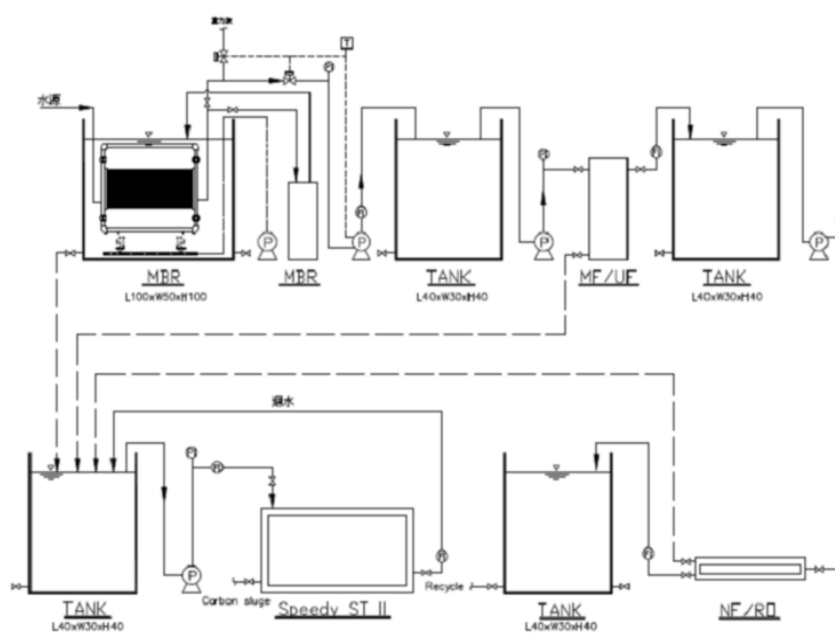


圖 1-6 薄膜生物反應處理流程圖

表 2-1 不同纖維素水解酵素之活性分析結果

酵素編號*	總活性(1) (FPU/ml)	總蛋白質(2) (mg/ml)	比活性(1)/(2) (FPU/mg protein)
A	46 (第一批試產)	30	1.5
	41 (第二批試產)	25	1.6
B	60(第一批)	36	1.7
	60(第一批保存一年)	37	1.6
	52(第二批新購)	33	1.6
C	60	43	1.4
D	53	20	2.6
E	53	36	1.5
F	27	19	1.4
G	11	31	0.4

* A: 國內試產之水解酵素

B: Novozyme 生產之水解酵素 Celluclast 1.5L

C: Genencor 生產之水解酵素 Spezyme CP

D: Genencor 生產之水解酵素 Accellerase 1000(新品)

E: Novozyme 生產之水解酵素 Cellubrix L

F: Novozyme 生產之水解酵素 Viscozyme L

G: Novozyme 生產之纖維雙糖酶 Novozym188

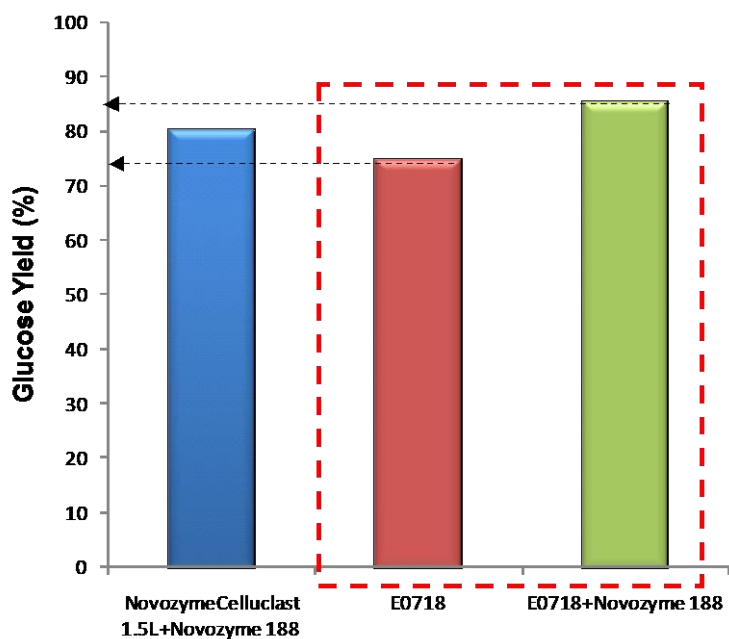


圖 2-1 本研究真菌生產酵素與國外酵素糖化效率之比較
(E0718 為酵素生產代號)



圖 2-2 100L 酵素生產發酵槽及其酵素粗萃液濃縮設備

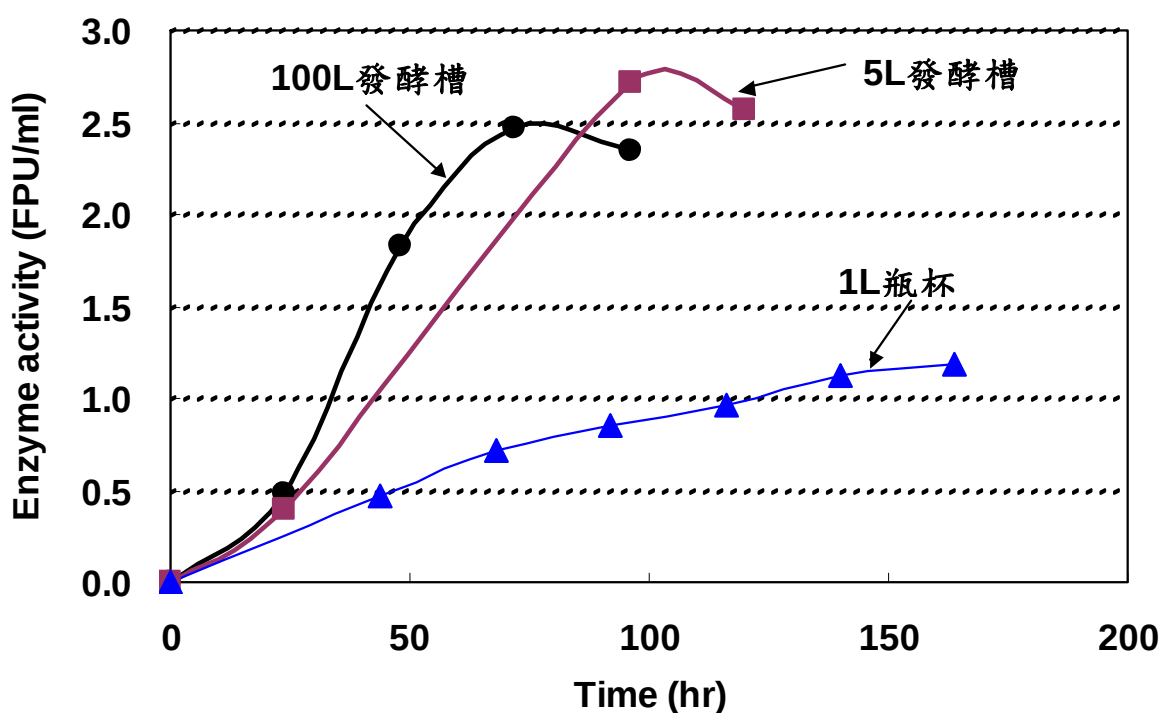


圖 2-3 不同發酵規模下酵素粗萃液總活性值隨反應時間之變化

(●：100L 發酵槽；■：5L 發酵槽；▲：1L 瓶杯)

表 2-2 酵素粗萃液超過濾法及冷凍乾燥法之濃縮結果比較

濃縮方法	初始活性 (FPU/ml)	濃縮後活性 (FPU/ml)	體積濃縮倍率	活性濃縮倍率
超過濾法	0.6	4.6	11.4	7.4
冷凍乾燥法	2.6	108.8	54.9	42.5

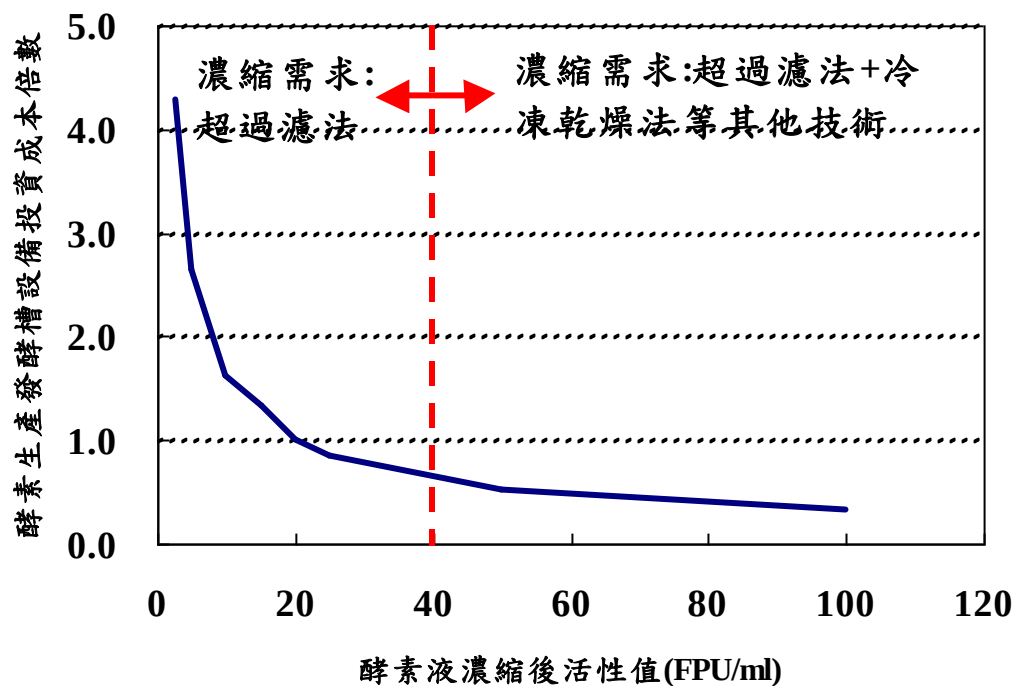


圖 2-4 酵素液濃縮後活性值與酵素生產發酵槽設備投資倍數相關關係圖
(設對應之酵素水解槽投資成本倍數為 1.0)

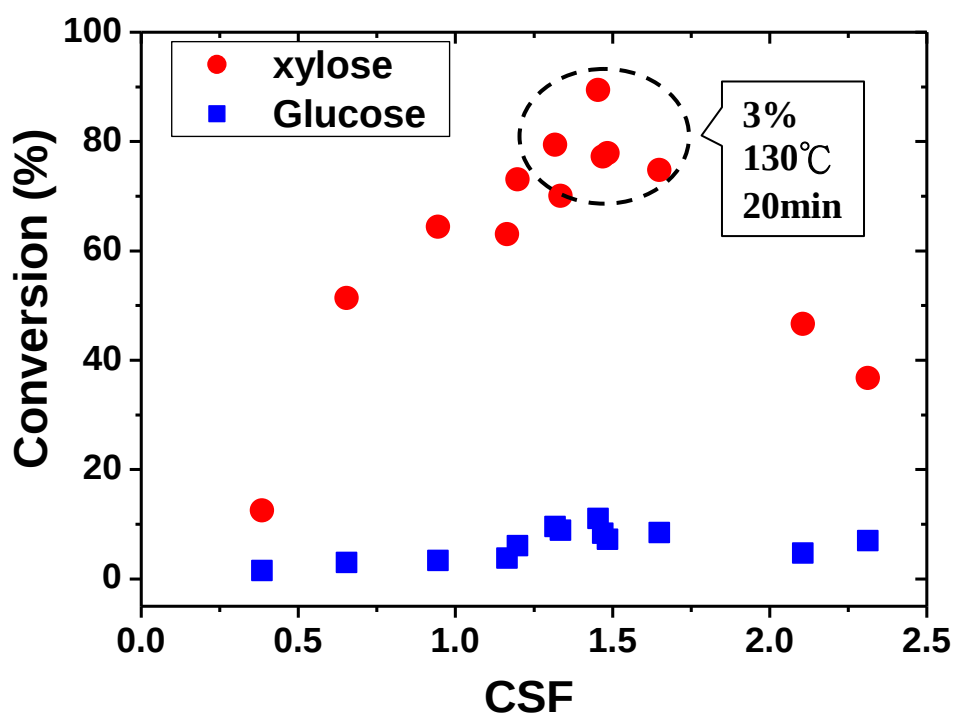


圖 3-1 前處理程序轉化率與操作條件參數關係圖



圖 3-2 20 升蒸汽爆裂反應系統

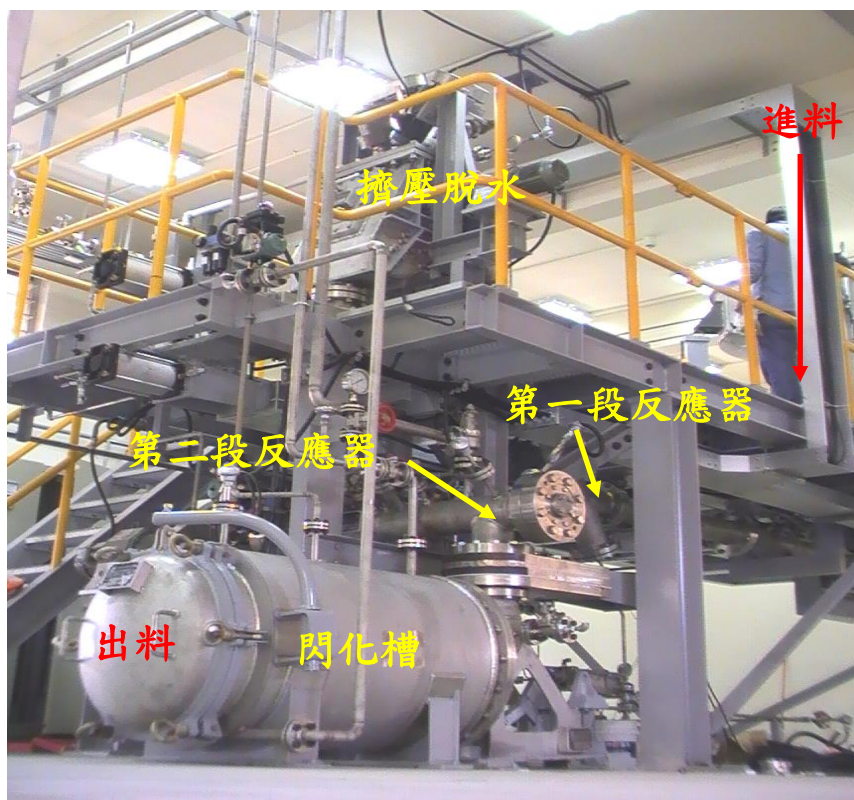


圖 3-3 小型連續式螺旋輸送生質物前處理設備



圖 3-4 100L 臥式水解槽

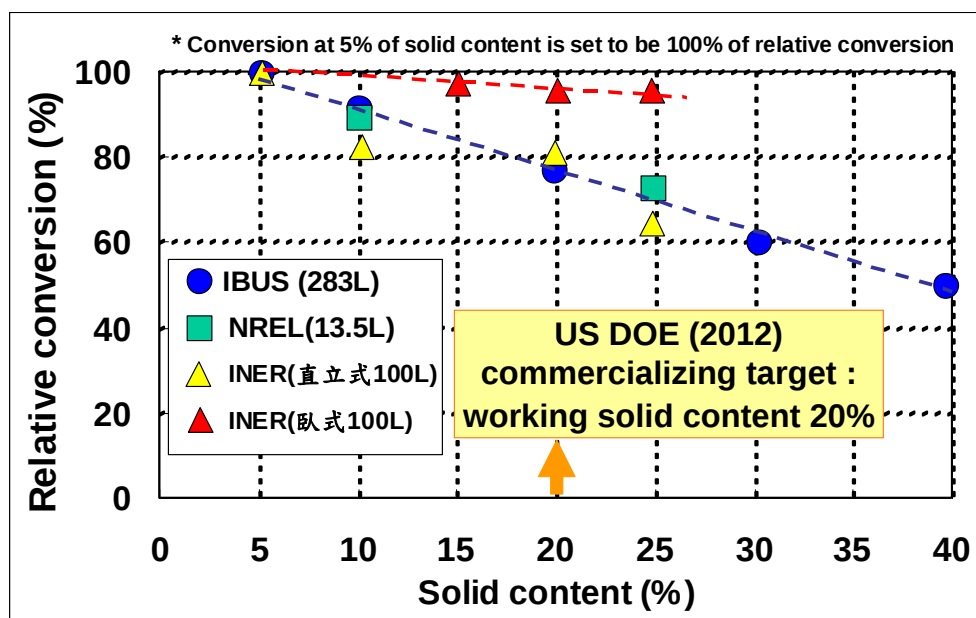


圖 3-5 不同初始固液比與相對水解效率之關係

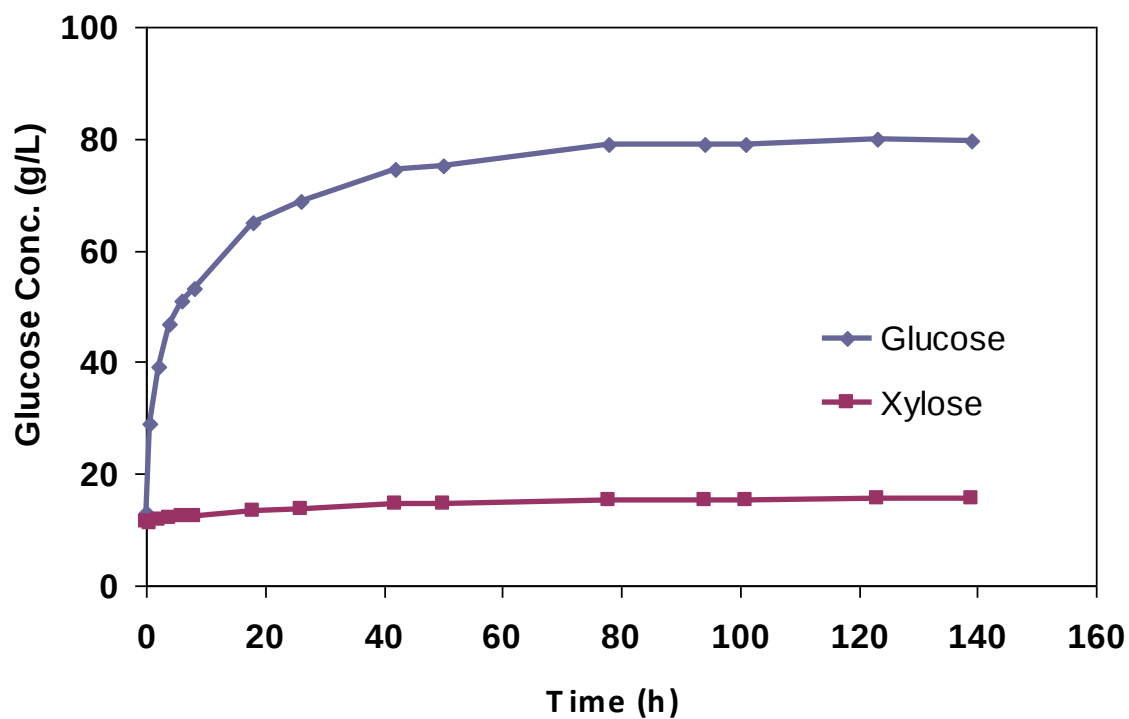


圖 3-6 臥式水解槽反應溶液葡萄糖濃度隨時間之變化

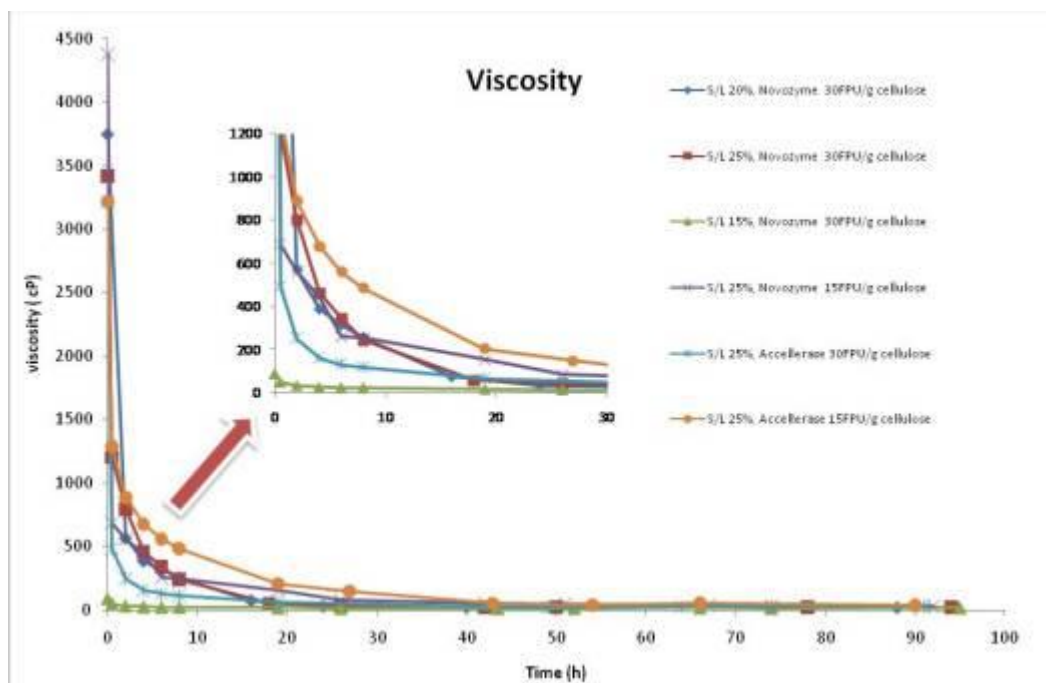


圖 3-7 臥式水解槽反應溶液黏滯度隨時間之變化

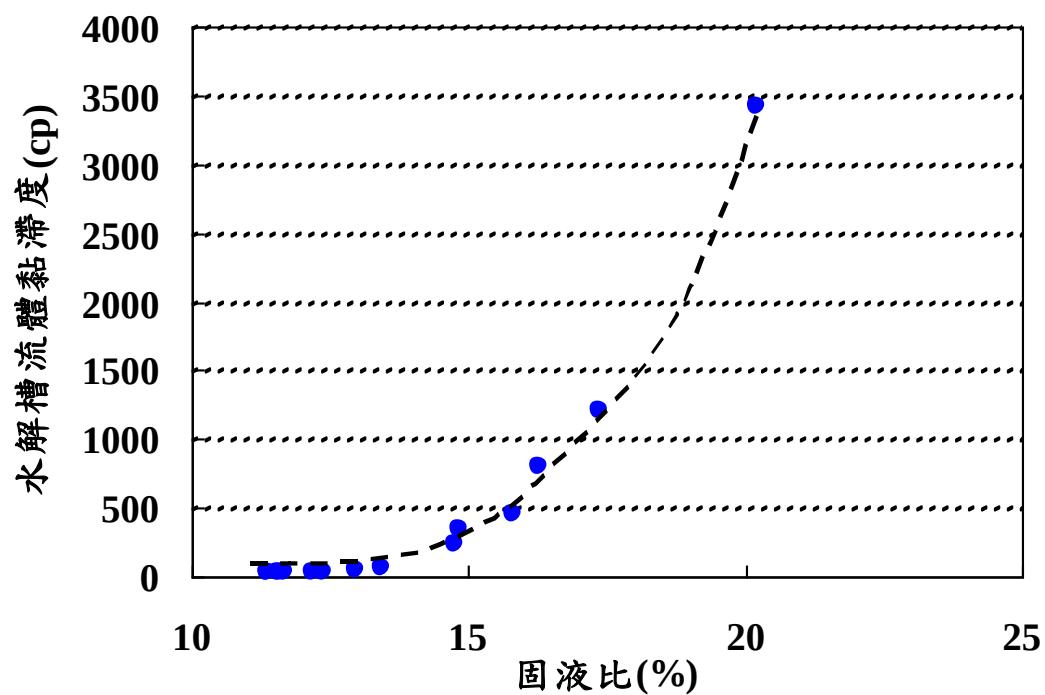


圖 3-8 酵素水解操作時固液比與流體黏滯度之關係

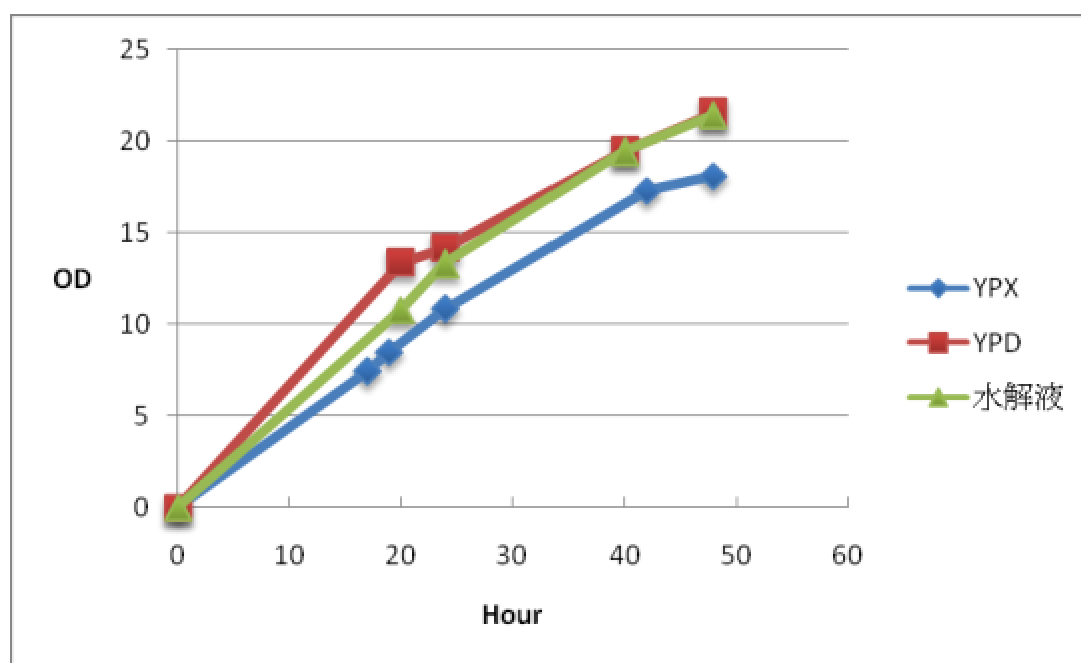


圖 3-9 不同培養基質之種菌培養的菌體增長情形

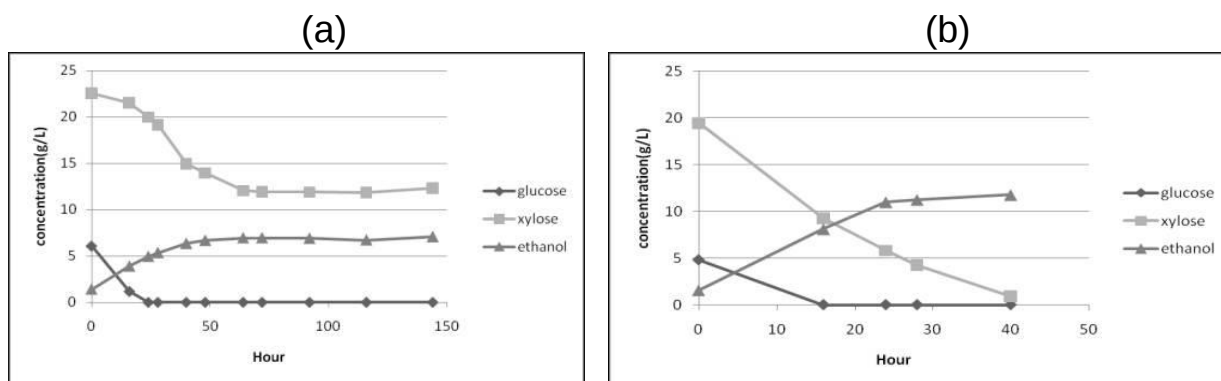


圖 3-10 木糖水解液經過鹼化法調理前後之木糖發酵結果

a.未經過鹼化法 調理；b.經過鹼化法調理

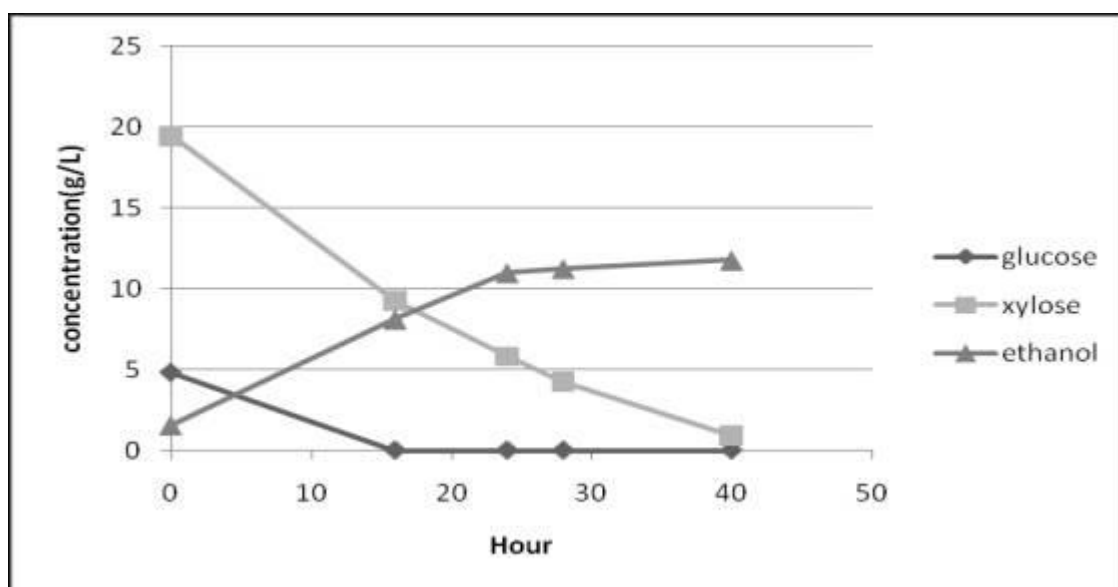


圖 3-11 木糖發酵經最適化操作研究後之酒精生成情形

參考文獻

1. 門○中, 郭○倫, 陳○希, 湯○彥, “生質物之纖維轉化酒精程序探討,” INER-3732(2005)。
2. R. Wooley, M. Ruth, J. Sheehan, K. Ibsen, H. Majdeski, A. Galvez, “Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Pre-hydrolysis and Enzymatic Hydrolysis ,Current and Futuristic Scenarios,” NREL/TP-580-26157 (1999).
3. A. Aden, M. Ruth, K. Ibsen, J. Jechhura, K. Neeves, J. Sheehan, B. Wallane, “Lignocellulosic Biomass to Ethanol Process Design and Economics Utilizing Co-Current Dilute Acid Pre-hydrolysis and Enzymatic Hydrolysis for Corn Stover,” NREL/TP-510-32438 (2002).
4. Y. H. Percival Zhang, , “New Processing Steps Cheaper Cellulosic Ethanol Production,” Energy Virginia Conference, Lexington , VA (2006).
5. Z. Olujic, “Distillation Equipment/Process Intensification Related Research at the TU Delft,” DAE EFCE WP Meeting, Hyvinkaa, Finland (2003).
6. 邵信, ”創新廢水處理方法與推廣,” 加拿大環境技術研討會, Post Globe 2002, Taipei.
7. O.A. Nguyen, J.H. Dickow, B.W. Duff, J.D. Farmer, D.A. Glassner, K.N. Ibsen, M.F. Ruth, D.J. Schell, I.B. Thompson, M.P. Tucker, “NREL/DOE Ethanol Pilot-Plant Current Status and Capabilities,” Bioresource Technology, 58, 189 (1996).
8. Y. Sun, J. Cheng, “Hydrolysis of Lignocellulosic Materials for Ethanol Production: A Review, Bioresource Technology, 83, 1(2002).
9. H. Jorgensen, “ Current Status on Biorefineries in Denmark,” www.biorefinery.nl/fileadmin/biorifinery/.
10. C. Nielsen, “Bioenergy Innovation and Opportunities,” www.nordicenergy.net (2007).
11. C. N. Hamelinck, G. Hooijdonk, A. P. C.Faaij: Ethanol from lignocellulosic

- biomass: techno-economic performance as development progresses (2005a).
12. C. N. Hamelinck, G. Hooijdonk, A. P. C. Faaij, “ Ethanol from Lignocellulosic Biomass: Techno-Economic Performance in Short-, Middle- and Long-Term,” *Biomass and Bioenergy*, 28,384 (2005b).
 13. L. R. Lynd, P. J. Weimer, W. H. Zyl, and I. S. Pretorius, “Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology,” *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 506 (2002).
 14. M. Greenbank, M.R. Rosene, “Process for Dehydrating Ethanol,” US Patent 4465875 (1984).
 15. Y. Maeda, M.Kai, “Recent Progress in Per-vaporation Membranes for Water/Ethanol Separation,” Robert Y.M. Huang edited, “Per-vaporation membrane separation processes,” Elsevier ,USA (1991).
 16. M. Roza, E. Maus, “Industrial Experience with Hybrid Distillation-Per-vaporation or Vapor Permeation Application ”, *ICHEME* (2006).
 17. M. Goel, “Energy-Efficient Ethanol Dehydration with Zeolite Membrane Based Processes”, *International Conference on Biofuels 2004*, September 16-17, New Delhi, India (2004).
 18. C. Strătuță, F. Oprea, D. Mihăescu, “New Process for Ethanol Dehydration,” *Scientific Conference Meeting "35 Years of Petroleum-Gas University Activity," Ploiesti*, November 27, Romanian (2002).
 19. R. J. Wooley, V. Putsche, “Development of an ASPEN PLUS Physical Property Database for Biofuels Components,” NREL, Golden, CO, Report MP-425-20685, April 1996. <http://www.afdc.doe.gov/pdfs/3955.pdf>
 20. L. P. Walker, D.B. Wilson, “Enzymatic Hydrolysis of Cellulose: An Overview,” *Bioresource Technology*, 36, 3 (1991).
 21. Genencor International, (NREL)/DOE subcontract with Genencor for cellulose cost reduction for bioethanol: enzyme sugar platform and advanced pretreatment interim stage reviews (2003).

22. Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., Pretorius, I.S., Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 506 (2002).
23. Novozymes, Novozymes: advancing cellulosic ethanol (2007).
24. NREL, Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis for corn stover, NREL Technological Report, NREL/TP-510-32438 (2002).
25. Sánchez , J., Cardona, C.A., Trend in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks . *Bioresource Technology* 99, 5270 (2008).
26. U.S.DOE, Biomass multi-year program plan (2007)
27. USDA, The new world of biofuels: implications for agriculture and energy. EIA Energy Outlook, Modeling, and Data Conference (2007).
28. 許○傑、郭○倫、黃○松、門○中，纖維素水解酵素活性分析之研究，核研所技術報告 INER-4747H (2007)。
29. 郭○朝，開發生質酒精的的催化劑－酵素，生物技術產業年鑑 2007 (2007)。
30. 郭○倫、許○傑、黃○松、門○中，引進工業用纖維素水解酵素於纖維酒精生產之評估，核研所技術報告 INER-5431H (2007)。
31. Farrel, A.E., Plevin, R.J., Turner B.T., Jones, A.D., O'Harw M., Kammen, D.M., Ethanol can contribute to energy and environmental goals. *Science* 311(1), 506 (2006).
32. Zhang, H.P., Himmel E.M., Mielenz, J.R., Outlook for cellulose improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnol. Adv.* 22, 452 (2006).
33. Fan, Z. and Lynd, L.R., Conversion of paper sludge to ethanol, II: Process design and economic analysis. 30, 35 (2007).
34. Cardona, C.A., Sánchez, O.J., Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*. 98, 2415 (2007).

35. Palmqvist E., Hahn-Hägerdal B., Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. 74, 25 (2000).
36. N'Diaye, S., Rigal, L., Larocque, P., Vidal, P.F., Extraction of hemicelluloses from poplar, populus tremuloides, using an extruder-type twin-screw reactor: a feasibility study. *Bioresource Technology*. 57, 61 (1996).
37. Overend, R.P., Chornet, E., Fractionation of lignocellulosic by steam-aqueous pretreatments. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A321*, 523 (1987).
38. Chum, H.L., Johnson, D.K., Block, S.K., Overend, R.P., Pretreatment -catalyst effects of combined severity parameter. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 24/25, 1 (1990).
39. Ye Sun, Jiayang Cheng, "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review, " *Bioresource Technology* 83, 1 (2002).
40. Nathan Mosier , Charles Wyman , Bruce Dale , Richard Elander ,Y.Y. Lee , Mark Holtzapple , Michael Ladisch , "Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass," *Bioresource Technology* 96, 673 (2005).
41. Cara, C., Ruiz, E., Ballesteros, I., Negro, M.J., Castro, E., Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. *Process Biochemistry* 41, 423 (2006).
42. Jin, S., Chen, H., Fractionation of fibrous fraction from steam exploded rice straw. *Process Biochemistry* 42, 188 (2007).
43. Zimbardi, F., Viola, E., Nanna, F., Larocca, E., Cardinale, M., Barisano, D., Acid impregnation and steam explosion of corn stover in batch processes. *Industrial Crops and Products* 26, 195 (2007).
44. Ruiz, E., Cara, C., Manzanares, P., Ballesteros, C., Castro, E., Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks. *Enzyme and Microbial Technology* 42, 160 (2008).

45. E. Palmqvist, B. Hahn-hagerdal. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates II : inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology* 74, 25 (2000).
46. J. R. Almedia, T. Modig, A. Petersson, B Hahn-Hagerdal, G Liden, M F Gowra-Grauslund. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Chem Technol Biotechnol.* 82, 340 (2007).
47. T. D Ranatunga, J Jervis, R F. Helm, J. D. McMillian, R. J. Wooley. The effect of overliming on toxicity of dilute acid pretreated lignocellulosic: the role of inrganics, uronic acids and ether-soluble organics. *Enzyme Microb Technol.* 27, 240 (2000).
48. F. K. Agbogbo Kenvin S. Wenger. Production of ethanol from corn stover hemicelluloses hydrolyzate using *Pichia stipitis*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 24, 723 (2007).
49. F. K. Agbogbo, K S. Wenger. Effect of pretreatment chemicals on xylose fermentation by *Pichia Stipitis*. *Biotechnol Lett.* 28, 2065 (2006).
50. F. K. Agbogbo, G. Coward-Kelly, M Torry-Smith, K. S. Wenger. Fermentation of glucose/xylose mixture using *Pichia Stipitis*. *Process Biochem.* 41, 2333 (2006).
51. Z. L Liu, P J. Slininger, S. W. Gorsich. Enhanced Biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by Newly Developed Ethanologenic Yeast Strains. *Appl Biochem Biotechnol.* 121 (2005).
52. F. K. Agbogbo, F. D. Haagenzen, D. Milam, K. S. Wenger. Fermentation of Acid-pretreated Corn Stover to Ethanol Without Detoxification Using *Pichia stipitis*. *Appl Biochem Biotechnol.* 145, 53 (2007).
53. M. J Teherzadeh, L. Gustasson, C. Niklasson, G Liden. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Sccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 53, 701 (2000).