

4. 分析項目與方法

4.4 前處理液、水解液與醱酵液之測定項目與方法

前處理過程或前處理後所得之前處理液 (Pretreatment liquor)、酵素水解過程或酵素水解後所取得之水解液 (Hydrolyzate)、醱酵過程或醱酵後所取得之醱酵液 (Fermentation broth) 測定項目包括：單糖 (Monomeric sugars)、纖維雙糖 (Cellobiose)、乙醇 (Ethanol)、還原糖 (Reducing sugar)、副產品 (Byproducts) 與降解產物 (Degradation products)。

4.4.1 單糖與纖維雙糖含量 (Monomeric sugars/Cellobiose content)

構成生質物料主要成分之碳水化合物 (Carbohydrates) 為一種由葡萄糖 (Glucose)、木糖 (Xylose)、阿拉伯糖 (Arabinose)、半乳糖 (Galactose)、甘露糖 (Mannose) 等單糖 (Monosaccharides) 分子聚合而成之多醣體 (Polysaccharides)。

生質物料內之多醣體可藉由物理、物理式化學、化學或生物等前處理方法與酵素之作用而分解成可溶解糖 (Soluble sugars)，釋入前處理液與水解液中，故藉由高效率液態層析儀 (High performance liquid chromatography, HPLC) 搭配葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖與纖維雙糖檢量線，從前處理液、水解液與醱酵液測定葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖及纖維雙糖 (Cellobiose) 等待測成分 (Components to be quantified) 之濃度，即可進一步探討評估前處理、酵素水解與醱酵階段之效果，其步驟如下：

1. 充分攪拌待測之樣品，並取一小部分樣品檢測其 pH 值。
2. 若 pH 值低於 5 或高於 9 則利用 CaCO_3 中和待測樣品之 pH 值至 5~6。
3. 依需要稀釋樣品之濃度，務使樣品內之糖濃度落在檢量線之線性範圍 (Linear range)。
4. 以 HPLC 級之水調配出系列濃度 (1.2~24.0 mg/mL) 之葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖與纖維雙糖標準溶液，據以建立葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖與纖維雙糖之檢量線 (Calibration line)。若使用 HPX-87C column，則可採用濃度 0.2~12.0 mg/mL 之葡萄糖、木糖與阿拉伯糖混合標準溶液，以建立葡萄糖、木糖與阿拉伯糖之檢量線。若使用 HPX-87H column，則可採用濃度 0.2~12.0 mg/mL 之葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖與纖維雙糖混合標準溶液，以建立葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖與纖維雙糖之檢量線。
5. 針對標準溶液，另準備一個來源不同、量已知之葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖與纖維雙糖所組成之檢量線查核標準溶液 (Calibration verification)。

standard, CVS), 用來查核標準檢量線之品質。在標準檢量線建立後, HPLC 使用期間, 穿插測定 CVS 之成分濃度與回收率, 若發現與標準檢量線相對偏差過大, 則應考慮重新製備標準檢量線。

6. 於同一批待測樣品中, 選定一代表性樣品 (體積 V_{sample}), 加入已知量之特定成分 (Components of interest), 於執行測定分析期間, 每隔一定數量之樣品測定後, 即穿插測定加料後樣品之特定成分濃度與回收率, 藉以發展出品質管制計畫。加料後樣品之特定成分濃度應落在標準檢量線之線性範圍。若測定之結果無法被接受, 則必須重新分析; 若重新分析結果仍無法被接受, 則最後一次與可接受結果之間之樣品皆必須重新分析。
7. 以具 $0.2 \mu\text{m}$ 濾片 (Filter) 之注射器 (Syringe) 過濾取樣, 放入 HPLC 之自動取樣瓶 (Autosampler vials)。
8. 搭配待測成分之標準檢量線, 利用 HPLC 測定 CVS 之、樣品與加料後樣品 (Spiked sample) 內所含待測或特定成分之濃度 (mg/mL)。
9. 計算樣品內待測成分之含量 C_{sample} 。
10. 計算 CVS 之成分回收率 (Recovery of each sugars in the CVS): %

$$\text{CVS}_{\text{recovered}} = \text{Concentration detected by HPLC} \times 100\% \div \text{Known concentration of CVS before HPLC analysis}.$$

11. 修正加料後樣品之特定成分之濃度: $C_{\text{corrected}} = \frac{V_{\text{sample}}}{V_{\text{final}}} \times C_{\text{sample}}$

V_{sample} = 選定之樣品加料前之體積 (mL)。

V_{final} = 選定之樣品加料後之體積 (mL)。

C_{sample} = 選定之樣品加料前, 利用 HPLC 測得之特定成分濃度 (mg/mL)。

$C_{\text{corrected}}$ = 選定之樣品加料後, 修正之特定成分濃度 (mg/mL)。

12. 計算特定成分回收率 (Recovery of spike): %

$$\text{Spike}_{\text{recovered}} = \frac{C_{\text{actual}} - C_{\text{corrected}}}{C_{\text{spike}}} \times 100\%$$

C_{actual} = 選定之樣品加料後, 利用 HPLC 測得之特定成分濃度 (mg/mL)。

$C_{\text{corrected}}$ = 選定之樣品加料後, 修正之特定成分濃度 (mg/mL)。

C_{spike} = 添加至選定之樣品之特定成分濃度 (mg/mL)。

4.4.2 副產品與降解產物含量 (Byproducts / Degradation products content)

生質物料產製乙醇之過程，除了藉物理、物理式化學、化學或生物等前處理方法與酵素之作用，將纖維素與半纖維素分解成可醱酵糖 (Fermentable sugars)，並進而將醱酵成乙醇 (Ethanol) 外，也會在製程中形成醱之降解產物 (Degradation product) 與其他副產品，如糠醛 (Furfural)、羥甲糠醛 (Hydroxymethylfurfural, HMF)、琥珀酸 (Succinic acid)、乳酸 (Lactic acid)、甘油 (Glycerol)、醋酸 (Acetic acid)、甲酸 (Formic acid)、木糖醇 (Xylitol) 等，故藉由高效率液態層析儀 (High performance liquid chromatography, HPLC) 搭配乙醇、糠醛、羥甲糠醛、琥珀酸、乳酸、甘油、醋酸、甲酸、木糖醇之標準檢量線，從前處理液、水解液與醱液測定乙醇、糠醛、羥甲糠醛、琥珀酸、乳酸、甘油、醋酸、甲酸、木糖醇等待測成分 (Components to be quantified) 之濃度，即可進一步探討評估前處理、酵素水解與醱階段之效果，其步驟如下：

1. 充分攪拌待測之樣品，並取一小部分樣品檢測其 pH 值。
2. 製備 0.01 N 之 H_2SO_4 作為 HPLC 之移動相 (Mobile phase)。
3. 以 HPLC 級之水調配出系列濃度之乙醇 (1.0~15.0 mg/mL)、糠醛 (0.02~5.0 mg/mL)、羥甲糠醛 (0.02~5.0 mg/mL)、琥珀酸 (0.2~10.0 mg/mL)、乳酸 (0.2~10.0 mg/mL)、甘油 (0.2~8.0 mg/mL)、醋酸 (0.2~12.0 mg/mL)、甲酸 (0.2~6.0 mg/mL)、木糖醇 (0.2~6.0 mg/mL) 標準溶液，據以建立待測成分之標準檢量線 (Calibration line)。由於琥珀酸與乳酸、甘油與甲酸之滯留時間 (Retention time) 相當接近，因此在準備混合標準溶液前應先確保使用之 HPLC 能否有效分離滯留時間相近之成分，若無法有效分離，則應考慮清洗或更換管柱 (Column)，或避免將滯留時間相近之成分標準溶液混合。
4. 針對標準溶液，另準備一個來源不同、量已知之乙醇、糠醛、羥甲糠醛、琥珀酸、乳酸、甘油、醋酸、甲酸、木糖醇所組成之檢量線查核標準溶液 (Calibration verification standard, CVS)，用來查核標準檢量線之品質。在標準檢量線建立後，HPLC 使用期間，定期測定 CVS 之成分濃度與回收率，若發現與標準檢量線相對偏差過大，則應考慮重新製備標準檢量線。檢量線查核標準溶液所含成分之濃度應落在標準檢量線之線性範圍 (Linear range)。
5. 於同一批待測樣品中，選定一代表性樣品 (體積 V_{sample})，加入已知量之特定成分 (Components of interest)，於執行測定分析期間，每隔一定數量之樣品測定後，即穿插測定加料後樣品之特定成分濃度與回收率，藉以發展出品質管制計畫。加料後樣品之特定成分濃度應落在標準檢量線之線性範圍。若測定之結果無法被接受，則必須重新分析；若重新分析結果仍無法被接受，則最後一次與可接受結果之間之樣品皆必須重新分析。

6. 以具 0.2 μm 濾片 (Filter) 之注射器 (Syringe) 過濾取樣，放入 HPLC 之自動取樣瓶 (Autosampler vials)。
7. 搭配待測成分之標準檢量線，利用 HPLC 測定 CVS、樣品與加料後樣品 (Spiked sample) 內所含待測或特定成分之濃度 (mg/mL)。
8. 計算樣品內待測成分之含量 C_{sample} 。
9. 計算 CVS 之成分回收率 (Recovery of each component in the CVS) : %

$$\text{CVS}_{\text{recovered}} = \text{Concentration detected by HPLC} \times 100\% \div \text{Known concentration of CVS before HPLC analysis}$$
。

10. 修正加料後樣品之特定成分濃度：
$$C_{\text{corrected}} = \frac{V_{\text{sample}}}{V_{\text{final}}} \times C_{\text{sample}}$$

V_{sample} = 選定之樣品加料前之體積 (mL)。

V_{final} = 選定之樣品加料後之體積 (mL)。

C_{sample} = 選定之樣品加料前，利用 HPLC 測得之特定成分濃度 (mg/mL)。

$C_{\text{corrected}}$ = 選定之樣品加料後，修正之特定成分濃度 (mg/mL)。

11. 計算特定成分回收率 (Recovery of spike) :

$$\% \text{Spike}_{\text{recovered}} = \frac{C_{\text{actual}} - C_{\text{corrected}}}{C_{\text{spike}}} \times 100\%$$

C_{actual} = 選定之樣品加料後，利用 HPLC 測得之特定成分濃度 (mg/mL)。

$C_{\text{corrected}}$ = 選定之樣品加料後，修正之特定成分濃度 (mg/mL)。

C_{spike} = 添加至選定之樣品之特定成分濃度 (mg/mL)。

4.4.3 乙醇濃度 (Ethanol concentration)

利用氣相層析法 (Gas chromatography, GC) 測定醱酵過程中醱酵液所含乙醇濃度之步驟如下：

1. 選擇氣相層析系統 (Gas Chromatography, GC)

氣相層析系統必須配備完整之管端注射器和相關配件，包括火燄離子偵測器 (Flame ionization detector, FID)、管柱組件、記錄器、氣體和注射針等，並有數據處理系統以量測尖峰面積或高度。

2. 檢液之製備 (Preparation of sample)

2.1 取醱酵漿狀物 (Fermentation slurry) 經離心分離 (6000 rpm, 5 min) 後, 以具 0.45 μm 濾片 (Filter) 之注射器 (Syringe) 過濾取出上清液 (Supernatant)。

2.2 於濾出之上清液中加入內標準品溶液, 作為檢液。

2.3 檢液含有 0.9 g/L 之內標準品溶液, 且乙醇濃度應落在檢量線範圍內。

3. 氣相層析系統之準備 (Preparation of GC)

4. 內標準品溶液之製備 (Preparation of Internal standard spiking solution)

利用異丙醇 (Isopropanol) 製備內標準品溶液 (Internal standard spiking solution), 以相同之比例分別加入乙醇操作標準溶液、檢液。

5. 乙醇操作標準溶液與檢量線之製備 (Preparation of Ethanol working standards solution and calibration line)

利用 200 proof ethanol 配置 3~6 份, 分別含有 0.9 g/L 內標準品溶液之 0.1 g/L~5.0 g/L 之乙醇操作標準溶液 (Ethanol working standards solution)。分別取 1 μL 注入氣相層析儀分析之, 以濃度比為 X 軸, 尖峰面積比為 Y 軸, 經迴歸分析求得標準檢量線: $Y=a+bX$, a、b 為常數。

6. 中間檢量線查核溶液與檢量線查核標準溶液之製備 (Preparation of intermediate calibration verification solution and calibration verification standard solution)

利用來源不同之 200 proof ethanol 配置 1~3 個中間檢量線查核溶液 (Intermediate calibration verification solution), 再以 1:10 比例利用內標準品溶液稀釋中間檢量線查核溶液, 以製備檢量線查核標準溶液, 即檢量線查核標準溶液含有 0.9 g/L 之內標準品溶液。檢量線查核標準溶液之濃度應落在標準檢量線之線性範圍 (Linear range)。

7. 操作條件 (Conditions)

7.1 層析管柱溫度 (Column temperature) :

7.2 注入埠溫度 (Inlet temperature) : 175°C。

7.3 偵測器溫度 (Detector temperature) : 250°C。

7.4 載流氣體流速 (Carrier gas flowrate) : 30 mL / min。

7.5 FID 氣體流速: 依製造廠商建議。

7.6 注入量: 1 μL 。

8. 測定程序 (Procedure)

- 8.1 將製備而冷藏之檢液與各種標準溶液提高至室溫，並輕輕搖勻。
- 8.2 利用乙醇操作標準溶液製備標準檢量線。
- 8.3 利用檢量線查核標準溶液查核標準檢量線之品質，若與標準檢量線相對偏差過大，則應考慮重新製備標準檢量線。
- 8.4 取乙醇操作標準溶液與檢液各 1 μL ，分別注入氣相層析儀，就操作標準溶液與檢液所得之尖峰滯留時間 (Retention time) 比較鑑別之，由標準檢量線計算檢液之濃度比： $X = (Y - a) \div b$

其中，X 為檢液之濃度比 = 檢液之乙醇濃度 \div 檢液之內標準品濃度。
Y 為檢液之面積比 = 檢液之乙醇尖峰面積 \div 檢液之內標準品尖峰面積。
- 8.5 計算乙醇濃度 (w/v) = 檢液之濃度比 \times 檢液之內標準品濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) \times (1 $\text{g}/10^6 \mu\text{g}$)。
- 8.6 每隔一定數量之檢液測定後，即穿插利用檢量線查核標準溶液查核標準檢量線之品質。

4.4.4 還原糖濃度 (Reducing sugars concentration)

利用 DNS 試劑測定還原糖濃度之步驟如下：

1. 以 0.25 g 之 3,5-dinitrosalicylic acid 與 75 g 之酒石酸鉀鈉 (Rochelle salt) 溶於 50 mL、2 M 之 NaOH 中，再稀釋至 250 mL，製備之二硝基水楊酸 (Dinitrosalicylic acid, DNS) 試劑。
2. 取 0.7 mL、已知濃度為 0.1 mg/mL~5 mg/mL 之葡萄糖溶液，加入 7 mL 之二硝基水楊酸 (Dinitrosalicylic acid, DNS) 試劑中。
3. 於 100°C 之水中加熱 10 分鐘，靜置至室溫後，使用分光光度計測量其在波長為 570nm 之光線下之吸光值後，製備測定還原糖濃度之 DNS 標準曲線。
4. 依據 DNS 標準曲線，取 0.7 mL 之待測物樣品加入 7 mL 之 DNS 試劑，將混合液在 100°C 之水中加熱 10 分鐘後放至室溫，利用波長為 570 nm 之光照射，並以分光光度計測其吸光值，即可換算出還原糖濃度。