

## 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  $\text{CaCO}_3$  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  $V_{\text{sample}}$ ), 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  $C_{\text{sample}}$ 。
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:  $C_{\text{corrected}} = \frac{V_{\text{sample}}}{V_{\text{final}}} \times C_{\text{sample}}$

$V_{\text{sample}}$  = 選定之樣品加料前之體積 (mL)。

$V_{\text{final}}$  = 選定之樣品加料後之體積 (mL)。

$C_{\text{sample}}$  = 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): %  

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

$C_{\text{actual}}$  = 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)。

$C_{\text{spike}}$  = 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  $V_{\text{sample}}$ )，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  $\mu\text{m}$  濾片 (Filter) 之注射器 (Syringe) 過濾取樣，放入 HPLC 之自動取樣瓶 (Autosampler vials)。
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  $C_{\text{sample}}$ 。
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：
$$C_{\text{corrected}} = \frac{V_{\text{sample}}}{V_{\text{final}}} \times C_{\text{sample}}$$

$V_{\text{sample}}$  = 選定之樣品加料前之體積 (mL)。

$V_{\text{final}}$  = 選定之樣品加料後之體積 (mL)。

$C_{\text{sample}}$  = 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) :

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

$C_{\text{actual}}$  = 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)。

$C_{\text{spike}}$  = 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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$ 。

## 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  $\mu\text{L}$ ，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。