

# 在生物量发酵工艺及酵母菌培养工艺中检测有机酸

田边彩乃

## 优势

- ◆ 对于组分复杂的生物发酵样品中的有机酸，可以实现选择性地高灵敏度分析。
- ◆ 可以在短时间内高效地分离乳酸、甲酸、乙酸等多种有机酸，快速确认发酵条件。
- ◆ 在生物燃料，特别是第二代生物燃料的研发方面，可以提高研发的工作效率。

## 前言

生物乙醇是一种碳中和的可再生能源，作为防止温室效应对策和石油替代燃料，在世界范围内广为研究。此外，为防止粮食不足和价格飞涨，在开发第二代时采用秸秆和木材等非食用植物的纤维素或半纤维素作为原料。但是，第二代生物燃料需要很多纤维成分的分解、发酵工艺。在这一过程中产生的乙酸等有机酸会阻碍发酵，对于生成的乙醇产率造成很大影响。因此，掌握发酵过程中的有机酸动态是乙醇产率管理当中非常重要的一点。

本文中使用了 Nexera 有机酸分析系统，监测生物量发酵试样及酵母培养液的有机酸随时间的变化。本系统中采用的柱后 pH 缓冲 - 电导检测法下，通过色谱柱分离后与 pH 缓冲试剂混合，可以高灵敏度且可选择地检出有机酸。本系统非常适合分析生物量发酵液等夹杂组分角度的试样。此次与高效分析用色谱柱 Shim-pack™ Fast-OA 相组合，使分析时间缩短一半，得以迅速地确认发酵时有无问题。

## 标准试样的分析

Shim-pack Fast-OA 是一款离子排斥型聚合物填充色谱柱，对有机酸的高效分析进行了优化。使用以往产品 Shim-pack SCR-102H (连接 2 根) 和 Shim-pack Fast-OA (连接 3 根) 的 9 种组分有机酸混合标准试样的色谱图如图 1 所示。表 1 所示为分析条件。

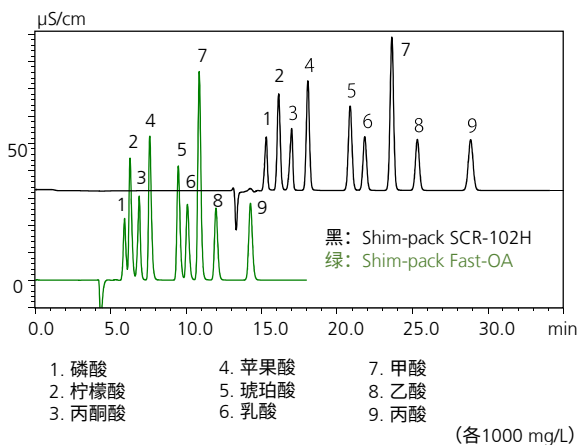


图 1 9 种组分有机酸混合标准试样的色谱图  
上段: Shim-pack SCR-102H (连接 2 根)  
下段: Shim-pack Fast-OA (连接 3 根)

表 1 分析条件

系统	: Nexera 有机酸分析系统
柱	: Shim-pack SCR-102H (300 mm × 8.0 mm I.D., 7 μm) <sup>*1</sup> × 2 (常规)
柱	: Shim-pack Fast-OA (100 mm × 7.8 mm I.D., 5 μm) <sup>*3</sup> × 3 (高速)
流动相	: 有机酸分析系统试剂盒 <sup>*5</sup>
流速	: 1.0 mL/min
pH 缓冲液	: 有机酸分析系统试剂盒 <sup>*5</sup>
混合器	: MR 20
柱温	: 40 °C
进样量	: 10 μL
瓶	: 岛津瓶, LC, 1.5 mL, 玻璃材质 <sup>*6</sup>
检测	: 电导检测器

\*1 P/N : S228-17893-91, \*2 P/N : S228-17924-91, \*3 P/N : S228-59942-41  
\*4 P/N : S228-59942-42, \*5 P/N : S228-61465-91, \*6 P/N : S228-15652-92

## 实际生物糖化工工艺发酵样品的分析

实际生物糖化工工艺发酵样品的有机酸发酵前及发酵 48 小时后的色谱图如图 2 所示。此外，为筛选而监测的各有有机酸面积值变化如图 3 所示。这里所用的酵母菌 (TOYOTA XyloAce™) 可以将通常被认为是阻碍发酵的物质乙酸转换为乙醇。图 3 表明，经 48 小时发酵后，乙酸减少了 97% 以上。此外，在代谢过程中产生的抑制发酵过程的物质、甲酸、乳酸呈增加趋势。而且，在 17 分钟左右可以观察到已生成乙醇产生的负峰。

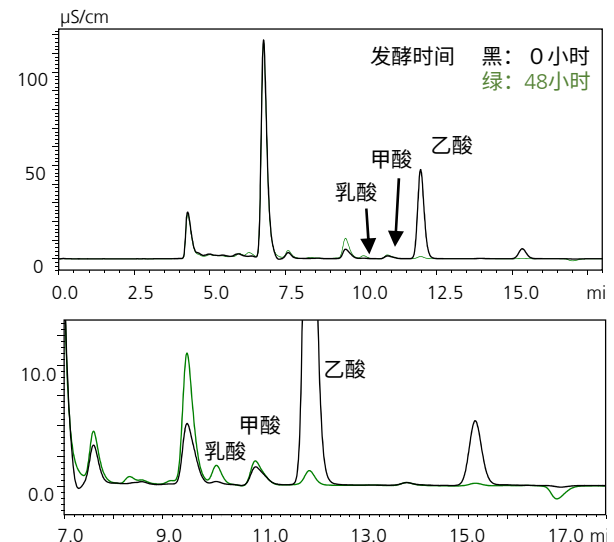


图 2 实际生物糖化工工艺发酵样品的色谱图  
(上段: 整体、下段: 放大)

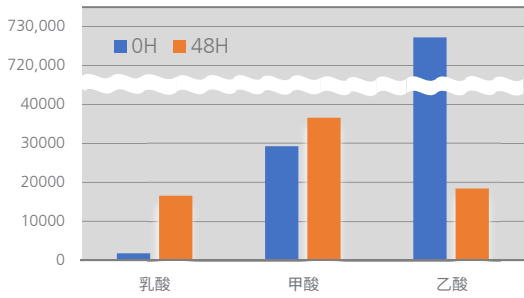


图3 实际生物糖化工工艺发酵前后各有机酸的面积值变化

## ■ 木质素类生物糖化工工艺发酵样品的分析

木质素类生物糖化工工艺发酵 6~40 小时的色谱图如图 4 所示，其发酵监测结果如图 5 所示。与前项相同，乙酸随发酵时间的增加而减少，甲酸和乳酸稍有增加。通过 Fast-OA 色谱柱的高分辨率和具有高选性的 pH 缓冲 - 电导检测法，即使是一般情况下容易保留时间重叠的组分乳酸和甲酸，也可以实现分离。

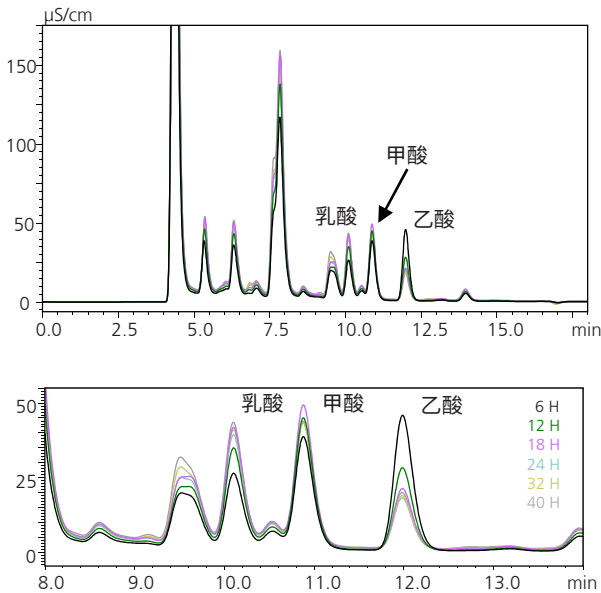


图4 木质素类生物糖化工工艺发酵样品的色谱图  
(发酵 6~40 小时样本的重叠绘制 (上段: 整体、下段: 放大))

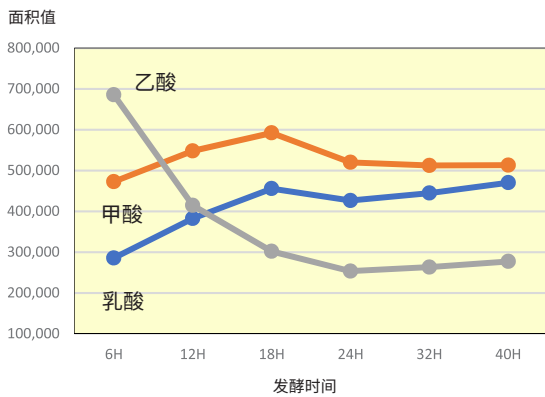


图5 木质素类生物糖化工工艺发酵监测结果

Nexera、Shim-pack 是岛津制作所株式会社在日本及其他国家的商标。  
XyloAce 是丰田汽车株式会社在美国及其他国家的商标或注册商标。

## ■ 糖蜜培养液的分析

在糖蜜中培养的样品色谱图如图 6 所示，其培养监测结果如图 7 所示。可以确认随着培养时间的增加，乳酸、甲酸、乙酸大幅减少。这表明酵母菌经培养后增殖，因此糖缺乏，酵母菌培养过程中的副产物有机酸被代谢。

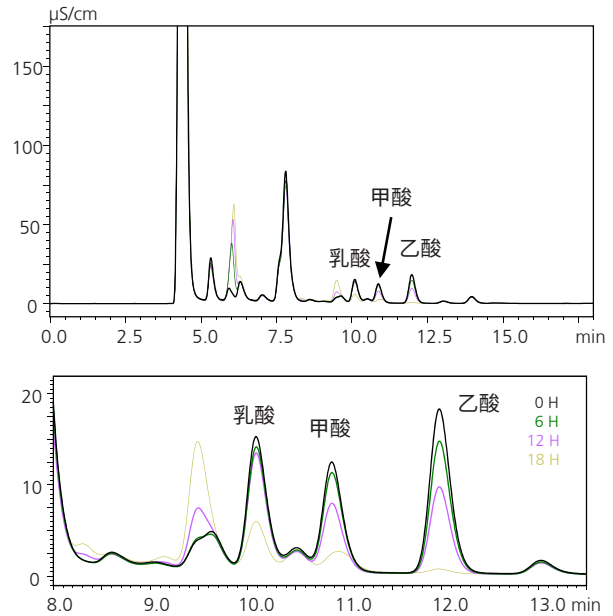


图6 糖蜜培养液的色谱图  
(培养 0~18 小时样本的重叠绘制 (上段: 整体、下段: 放大))

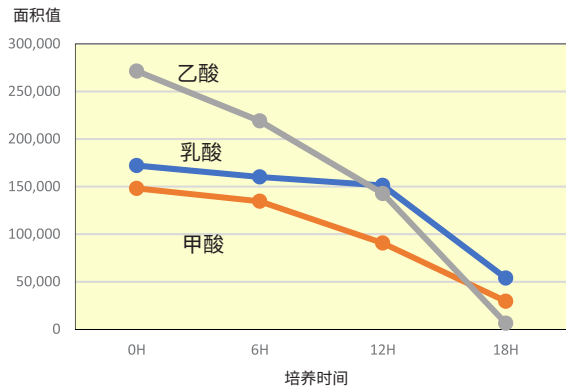


图7 糖蜜培养液的培养监测结果

## ■ 结论

本文介绍了通过 Nexera 有机酸分析系统和 Shim-pack Fast-OA 色谱柱的组合，高精度、高效分析组分较多的生物发酵样品中有机酸的事例。本系统对于正在世界范围内开展的生物燃料研发业务的效率提高方面做出重要贡献。

< 致谢 >

感谢丰田汽车株式会社亚久里生物事业部保谷典子女士为本研究提供样品。

岛津应用云



岛津企业管理(中国)有限公司  
岛津(香港)有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话: 800-810-0439  
400-650-0439

免责声明:

\* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售;  
\* 本资料中的所有信息仅供参考, 不予任何保证。  
如有变动, 恕不另行通知。

第一版发行日: 2020 年 11 月