

纤维素水解液厌氧发酵产丁二酸发酵液中 有机酸和混合单糖的测定

姜 岷* 雷 丹 陈可泉 李 建 姚嘉 韦 萍

(南京工业大学制药与生命科学学院,材料化学工程国家重点实验室,南京 210009)

摘 要 对于以纤维素类原料(玉米皮)水解糖液作碳源厌氧发酵制备丁二酸的发酵液,利用 Aminex HPX-87H (300 mm × 7.8 mm i d, 5 μm)离子排斥色谱柱及折光示差检测器检测,以 0.005 mol/L H₂SO₄ 溶液 (pH 2.0)作流动相,在流速为 0.6 mL/min,柱温为 55 °C 时对发酵液进行检测,16 min 内能将发酵液中甲酸、乙酸、丁二酸、葡萄糖、木糖、阿拉伯糖完全分离定量。6 种物质线性相关系数均大于 0.999,方法的回收率为 99.3% ~ 102.1%;RSD 为 0.6% ~ 1.6%。本方法能够简便、快速测定丁二酸发酵体系中有有机酸及单糖的含量。

关键词 高效液相色谱,玉米皮水解液,丁二酸发酵液,有机酸,混合单糖

1 引 言

自 1991 年 Doyon 等^[1]首次报道了用 HPLC 在同一条件下同时检测有机酸和糖的混合标准溶液后,关于高效液相色谱法同时检测糖及有机酸的报道越来越多^[2~10]。有机酸发酵过程中底物和有机酸产物同时检测对于发酵过程监控具有指导意义。钱兵等^[8]以反相高效液相色谱法测定丙酸发酵液中有有机酸;白冬梅等^[9]利用 Eclipse XDB2C₈ 柱同时检测琥珀酸发酵液中的有机酸和葡萄糖;刘宇鹏等^[10]利用 Aminex HPX-87H 离子排斥色谱柱同时检测琥珀酸发酵液中的葡萄糖、有机酸及乙醇,但所检测的发酵液都只利用单一底物(葡萄糖)作为发酵碳源。当前利用木质纤维素资源制备生物基化学品已成为一种必然的趋势。木质纤维素的水解液成分复杂,若能采用 HPLC 同时检测发酵体系中混合糖及代谢产物,对于考察木质纤维素水解液的利用情况以及菌株代谢过程具有积极的意义。

丁二酸(又称琥珀酸)作为重要的 C₄ 平台化合物,被美国能源部认为是未来 12 种最具前景的生物炼制产品之一^[11]。目前利用木质纤维素资源生产丁二酸可有效降低生产成本,本课题组以玉米皮水解液作为生产琥珀酸放线杆菌培养的碳源,其中含有六碳糖(葡萄糖)和五碳糖(木糖和阿拉伯糖)以及少量乙酸等物质,成分较复杂。本实验选用 Aminex[®] HPX-87H 离子排斥色谱柱,利用示差折光检测器,建立了高效液相色谱法同时检测玉米皮稀酸水解液厌氧发酵制备丁二酸的发酵液中有有机酸和混合单糖的方法,对于利用木质纤维素资源制备其它有机酸产品具有参考价值。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Ultimate 3000 系列高效液相色谱仪(美国 Dionex 公司),含自动进样器,四元泵,柱温箱、化学工作站;R 101 型折光示差检测器(美国 Shodex 公司);Aminex[®] HPX-87H 型离子排斥色谱柱(美国 Bio-Rad 公司);SK2200H 超声清洗器(上海科导超声仪器有限公司);JS-HS 冷冻离心机(BECKMAN 公司);PHS-3C 精密 pH 计(上海雷磁仪器厂);HANGPENG FA1104 电子天平(上海天平仪器厂);SHB 循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司)。有机酸均为 Fluka 公司分析纯试剂;糖类均为国产分析纯试剂;H₂SO₄ 为优级纯试剂;实验用水为超纯水。

2.2 色谱分析条件

Aminex[®] HPX-87H 色谱分析柱(300 mm × 7.8 mm i d, 5 μm);Cation-H Refill Cartridges 保护柱

2008-09-16 收稿;2008-12-01 接受

本文系国家 863 计划(Na 2006AA02Z235)、国家自然科学基金(Na 20606017)和江苏省高技术研究计划(BG2007001)资助项目

* E-mail: jiangnin@njut.edu.cn

(30 mm ×4.6 mm);示差折光检测器;流动相:0.005 mol/L H_2SO_4 (pH 2.0);进样体积:20 μL ;流动相流速:0.6 mL/min;柱温:55 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3 混合标准溶液的配制

精确称取甲酸、乙酸、丁二酸、葡萄糖、木糖、阿拉伯糖各 100 mg,用流动相溶解并定容于 100 mL 容量瓶中,配置成 1.0 g/L 的有机酸及糖的标准混合溶液,再用流动相将标准溶液分别稀释至 0.02、0.04、0.06、0.08、0.1、0.2、0.4、0.6 和 0.8 g/L。

2.4 样品预处理

本实验所用的丁二酸发酵液是由琥珀酸放线杆菌 (*Actinobacillus succinogenes*) NJ113 (本实验室筛选保藏) 发酵培养获得。

取 5 mL 丁二酸发酵液,离心 (8000 r/min, 15 min) 除去菌体和碳酸镁,用流动相进行适当稀释,同时使有机酸游离出来,然后以 0.22 μm 孔径的针式滤头过滤,即得到待测样品。

取 1 mL 脱色精制的玉米皮水解糖液^[12],用流动相进行适当稀释,以 0.22 μm 孔径的针式滤头过滤,即得到待测玉米皮水解糖液样品。

3 结果与讨论

3.1 分析条件的选择

3.1.1 流动相的选择 Aminex HPX-87H 离子排斥色谱柱可以采用 H_3PO_4 或 H_2SO_4 作为流动相对有机酸和糖类进行分析^[3,4]。分别以 0.005 mol/L H_2SO_4 和 0.005 mol/L H_3PO_4 作为流动相对混合标样进行分离。结果表明,两种溶液均可以作为流动相分离单糖及有机酸的混合标准样品,但考虑到本实验的发酵液中含有 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} ,可能会与 H_3PO_4 产生不溶性沉淀而损伤色谱柱,因此选用 H_2SO_4 作为色谱流动相。

3.1.2 流动相 pH 值 (浓度) 的选择 对于离子色谱来说,流动相的离子强度对于有机酸的分离效果有着明显的影响^[2]。改变 H_2SO_4 浓度将流动相的 pH 值分别调至 1.7、2.0、2.3 和 2.5,以这几种不同 pH 值的 H_2SO_4 作为流动相分离混合标样,结果表明:流动相 pH 值 (浓度) 对糖类分离的影响很小,而对有机酸的保留时间有着较大影响。在所选择的各个 pH 值 (浓度) 条件下,各种物质都能得到良好地分离。考虑到较高浓度流动相对色谱柱和输液泵会造成一定程度的损害,而低浓度流动相又增加保留时间,经过分离图谱的比较,选择 0.005 mol/L H_2SO_4 (pH 2.0) 作为色谱分离流动相。

3.1.3 柱温的选择 有机酸在水溶液中存在离解平衡 $\text{HA} \rightleftharpoons \text{H}^+ + \text{A}^-$ 。温度升高时会增加溶质的离解,离子受 DONNAN 作用,虽然保留时间减少,但不利于有机酸的分离^[13];但温度降低又会增加保留时间。在色谱柱的使用温度范围内比较不同温度下的分离曲线图谱,选择最佳分离温度为 55 $^{\circ}\text{C}$ 。

3.1.4 流动相流速的选择 0.005 mol/L H_2SO_4 (pH 2.0) 作为流动相,在 55 $^{\circ}\text{C}$ 柱温下,分别以 0.4、0.5、0.6、0.7 和 0.8 mL/min 流速进样。结果发现,流速过高,分离度降低,柱压升高,不利于色谱柱的保护与长期使用;流速过低则分析时间长,柱效差。通过几个流速分离效果的比较,选择流速 0.6 mL/min 进行测定。在上述优化色谱条件下,16 min 内各有机酸和单糖均得到有效分离 (见图 1)。

3.2 回归分析与检出限

采用自动进样器分别吸取不同浓度 (0.02、0.04、0.06、0.08、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 g/L) 的混和标准溶液 20 μL ,在上述色谱条件下进样,线性回归处理峰面积 y 和有机酸及糖浓度 x (g/L),绘制 3 种有机酸及 3 种单糖的标准曲线,6 种物质的相关系数都大于 0.999,说明线性关系良好;通过分析无限稀释后的标准品母液,以 3 倍信噪比 (S/N) 计算最小检出限量,表 1

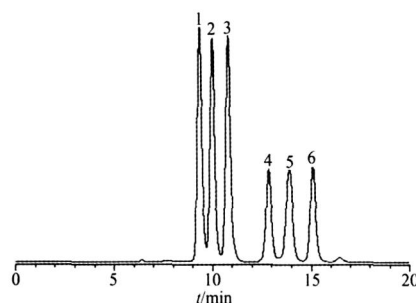


图 1 有机酸及糖混合标准溶液的色谱图

Fig 1 Chromatogram of standards mixtures

1. 葡萄糖 (glucose); 2. 木糖 (xylose); 3. 阿拉伯糖 (arabinose); 4. 丁二酸 (succinic acid); 5. 甲酸 (formic acid); 6. 乙酸 (acetic acid)。

列出了回归分析结果以及检出限，由表 1 可以看出，6 种物质的检出限都较低。

表 1 回归分析和检出限

样品 Sample	回归方程 Regression equation	线性范围 Linear range (g/L)	相关系数 Correlation coefficient (R)	检出限 Detection limit (mg/L)
甲酸 Fomic acid	$y = 515.7x + 7.2523$	0.04 ~ 1.0	0.9993	3.7
乙酸 Acetic acid	$y = 384.6x + 0.6358$	0.02 ~ 1.0	0.9999	1.9
丁二酸 Succinic acid	$y = 290.82x + 1.7664$	0.02 ~ 1.0	0.9999	1.3
葡萄糖 Glucose	$y = 198.05x - 0.327$	0.02 ~ 1.0	0.9999	4.3
木糖 Xylose	$y = 214.77x + 1.3662$	0.02 ~ 1.0	0.9998	5.1
阿拉伯糖 Arabinose	$y = 204.44x + 1.9927$	0.02 ~ 1.0	0.9999	4.3

3.3 回收率和精密度的测定

取同一发酵液 4 份，其中一份作本底，本方法分析 5 次，考察方法精密度；另 3 份各添加一定量的标准物质，考察回收率，结果见表 2。可见本方法的回收率高，且不受玉米皮水解液及发酵液中大量杂质的干扰。

表 2 回收率和精密度实验结果 (n = 5)

Table 2 Results of recovery and precision (n = 5)										
样品 Sample		本底值 Background (μg)		标准加入量 Standard added (μg)			测得量 Found (μg)		平均回收率 Recovery (%)	精密度 RSD (%)
甲酸	Fomic acid	1.95	4	8	12	5.83	10.11	14.07	100.2	0.6
乙酸	Acetic acid	2.08	4	8	12	5.95	10.29	13.79	99.3	0.8
丁二酸	Succinic acid	5.59	4	8	12	9.74	13.37	18.71	102.1	1.3
葡萄糖	Glucose	2.62	4	8	12	6.53	10.98	14.27	99.9	0.9
木糖	Xylose	2.46	4	8	12	6.29	10.91	14.11	99.8	1.6
阿拉伯糖	Arabinose	1.43	4	8	12	5.67	9.29	13.68	101.6	1.6

3.4 糖液及发酵液分析

取浓缩精制后的玉米皮水解糖液及发酵中期的发酵液进行色谱分析，测定各有机酸及单糖的含量，分析谱图见图 2。

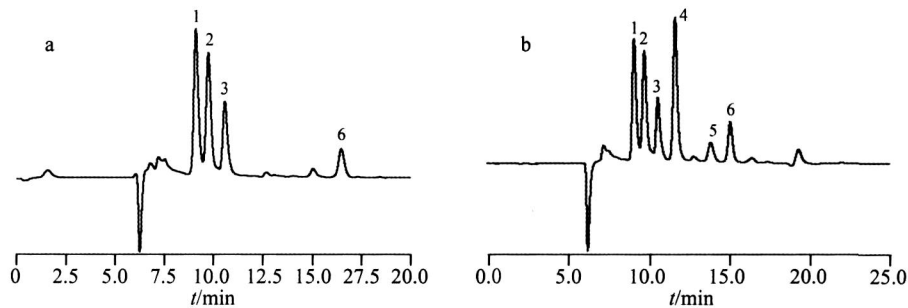


图 2 玉米皮水解糖液色谱图 (a)，丁二酸发酵液色谱图 (b)
Fig 2 Chromatogram of comhusk hydrolysate(a) and succinic acid fermentation broth(b)
1. 葡萄糖 (glucose); 2. 木糖 (xylose); 3. 阿拉伯糖 (arabinose); 4. 丁二酸 (succinic acid); 5. 甲酸 (fomic acid); 6. 乙酸 (acetic acid)。

检测到玉米皮水解糖液中有葡萄糖、木糖、阿拉伯糖及少量乙酸，以其作为发酵底物用 *Actinobacillus succinogenes* NJ113 厌氧发酵制备丁二酸，取发酵中期的发酵液样品进行定性及定量分析，结果证明：发酵液中的各种糖类及有机酸都能够准确分离并定量。本方法的建立，对于监测发酵过程中菌体对各种原料的利用情况及产物生成情况，确定菌体内的代谢通量分布，从而对发酵过程的优化控制具有重要的意义。

References

- 1 Doyon G, Gaudreau G, St-Gelais D, Bealieu Y, Randal C J. *Can. Inst. Sci. Technol.*, **1991**, 24: 87 ~ 94
- 2 Fischer K, Bipp H P, Bieniek D, Ketttrup A. *J. Chromatogr. A*, **1995**, 706: 361 ~ 373
- 3 V étte E, Qian F, Mangani F. *J. Chromatogr. A*, **1995**, 705: 195 ~ 203
- 4 Chinnici F, Spinabelli U, Riponi C, Amati A. *Journal of Food Composition and Analysis*, **2005**, 18: 121 ~ 130
- 5 Lefebvre D, Gabriel V, Vayssier Y, Fontagn -Faucher C. *Lebensm. Wiss u -Technol*, **2002**, 35: 407 ~ 414
- 6 Mullin W J, Emmons D B. *Food Research International*, **1997**, 30(2): 147 ~ 151
- 7 Molnár-Perl I. *J. Chromatogr. A*, **1999**, 845: 181 ~ 195
- 8 Qian Bing(钱 兵), Zhang Yan(章 燕), Li Sha(李 莎), Xu Hong(徐 虹). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **2007**, 35(11): 1651 ~ 1653
- 9 Bai DongMei(白冬梅), Du GuoMin(杜国民), Shen Fei(沈 菲). *Chinese Journal of Analysis Laboratory* (分析试验室), **2004**, 23(3): 15 ~ 18
- 10 Liu Yu-Peng(刘宇鹏), Zhen Pu(郑 璞), Sun Zhi-Hao(孙志浩). *Food and Fermentation Industries* (食品与发酵工业), **2006**, 30(12): 119 ~ 123
- 11 Weipy T, Petersen G. *Top Value Added Chemicals from Biomass*. USA: Oak Ridge, TN, U. S. Department of Energy, **2004**
- 12 JiangMin(姜 岷), Yao JiaMin(姚嘉), Wu Hao(吴 昊), Wan Yong-Min(万永敏), Sun Na-Ya(孙娜娅), Yu Li(于 丽). *Food and Fermentation Industries* (食品与发酵工业), **2007**, 33(10): 6 ~ 9
- 13 Mou Shi-Fen(牟世芬), Liu Kai-Lu(刘开录). *Ion Chromatography* (离子色谱). Beijing(北京): Science Press(科学出版社), **1986**: 77

Determination of Organic Acids and Monomeric Sugars in Fermentation Broth of Succinic Acid Production with Lignocellulose Hydrolysate

JANGMin*, LEIDan, CHEN Ke-Quan, LIJian, YAO Jia-Min, WEIPing

(State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Life Science and Pharmacy,
Nanjing University of Technology, Nanjing 21009)

Abstract In order to determine the organic acids and monomeric sugars in fermentation broth with the corn husk hydrolysate as carbon source, aminex HPX-87H ion exclusion column was used with refractive index detector. The mobile phase was 0.005 mol/L of sulfuric acid (pH 2.0) with flow rate of 0.6 mL/min at 55 °C. Organic acids and monomeric sugars in samples were completely separated within 16 min. All the correlation coefficients(r) of regression equations were above 0.999, and the recovery ranged from 99.3% to 102.1%. The relative standard deviations were in the range of 0.6% - 1.6%. By this method, organic acids and monomeric sugars can be easily, rapidly and effectively determined.

Keywords High performance liquid chromatography, corn husk hydrolysate, succinic acid fermentation broth, organic acids, monomeric sugars

(Received 16 September 2008; accepted 1 December 2008)