

# 生物氧化产碱去除半纤维素水解物中的有机酸

刘胜男<sup>1,2</sup> 覃香香<sup>1</sup> 张厚瑞<sup>1\*</sup> 蔡爱华<sup>1</sup> 林兰英<sup>2</sup>

(1. 中国科学院广西植物研究所 广西 桂林 541006)

(2. 广西师范大学生命科学学院 广西 桂林 541004)

**摘要:** 叁形毕赤酵母 *Pichia galeiforms* B-10 对半纤维素水解物中的有机酸具有良好的降解活性, 影响它脱酸活性的最主要因素是水解物初始 pH。将半纤维素水解物初始 pH 值调节至 5.0 以上而无需其他处理, *Pichia galeiforms* B-10 便可发挥良好的脱酸发酵性能。*Pichia galeiforms* B-10 代谢有机酸盐可产生碱性物质, 使水解液 pH 升高。在 pH 值 > 5.0 的条件下, 只要调节补酸(补加低 pH 值水解物)的速率与代谢耗酸速率相平衡, 发酵体系即可始终处于有利于酵母快速代谢有机酸的高 pH 环境。这种生物氧化产碱连续脱酸发酵方式, 可有效降低中和半纤维素水解物的外加用碱量, 具有降低成本, 减少新污染物的优势。

**关键词:** 半纤维素水解物, 生物氧化产碱, 有机酸

## Removal of Organic Acid from Hemicellulose Hydrolysate by Bio-oxidation to Produce Alkali

LIU Sheng-Nan<sup>1,2</sup> QIN Xiang-Xiang<sup>1</sup> ZHANG Hou-Rui<sup>1\*</sup> CAI Ai-Hua<sup>1</sup>  
LIN Lan-Ying<sup>2</sup>

(1. Guangxi Institute of Botany, Chinese Academy of Science, Guilin, Guangxi 541006, China)

(2. Life Science College, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004, China)

**Abstract:** *Pichia galeiforms* B-10 has a good ability to degrade organic acid in hemicellulose hydrolysate, and this depickling activity of the strain is mainly affected by the initial pH value of hydrolysate. If the initial pH value of hemicellulose hydrolysate was adjusted above 5.0, *Pichia galeiforms* B-10 would exhibit an excellent capability of depickling fermentation without any other treatment. During the metabolism of organic acid salt by *Pichia galeiforms* B-10, alkali products were generated and this caused the raising of pH value. Therefore, under the condition of pH > 5.0, if only the acid supplying speed (by adding hydrolysate with low pH value) was adjusted to be in balance with the acid metabolizing speed, the fermentation system would always be kept in a high pH circumstance which was advantageous to the metabolism of organic acid by yeast. This mode, by using bio-oxidation to produce alkali for the continuous depickling fermentation, effectively reduced the addition of alkali during the neutralization of hemicellulose hydrolysate, and finally lowered the processing cost and generated less pollutant.

**Keywords:** Hemicellulose hydrolysate, Bio-oxidation to produce alkali, Organic acid

木质纤维素是地球上最丰富的可再生资源,主要由纤维素、半纤维素与木质素组成。半纤维素约占其总量的 20%–30%,它很容易被稀酸水解生成以木糖(五碳糖)为主要成分的半纤维素水解物,可用于发酵生产木糖醇、燃料乙醇等一系列化工产品<sup>[1-2]</sup>。但是稀酸水解半纤维素生成可发酵性糖的同时,会伴随生成一系列有机酸,其中以醋酸为主要成分,还包括少量的甲酸、丙酸、丁酸、苯甲酸和异戊酸<sup>[3-5]</sup>在内的对微生物代谢有毒的副产物,影响发酵过程。要改善半纤维素水解物的发酵性能,必须除去这些有机酸<sup>[6-7]</sup>。除去半纤维素水解液中以醋酸为主的有机酸,已经报道的方法有活性炭吸附<sup>[8]</sup>、胺抽提<sup>[9]</sup>、离子交换膜<sup>[10]</sup>、电渗析<sup>[11]</sup>和离子排斥<sup>[12]</sup>等。不过,半纤维素水解物的理化脱酸由于成本高或因产生新的污染物而限制了其实际应用的潜力。

许多酵母可以利用醋酸为唯一碳源生长,因此利用代谢醋酸的酵母可以实现半纤维素水解物脱酸。Henry Schneider<sup>[3]</sup>等曾利用一株酿酒酵母糖类营养缺陷突变体除去亚硫酸盐硬木制浆废液中的醋酸,但是他所用的酵母具有易复性的缺点。林兰英<sup>[13]</sup>发现,盔形毕赤酵母(*Pichia galeiforms*)可利用多种有机酸,不仅对半纤维素水解物具有很强的脱酸活性,且不代谢其中的木糖。本文进一步研究以 *Pichia galeiforms* B-10 为生物脱酸菌株,研究了影响半纤维素水解物生物脱酸的主要因素,探讨其适宜的生物脱酸条件,以期为半纤维素水解物生物脱酸工艺的建立提供更充分的科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试菌株

供试菌株 *Pichia galeiforms* B-10,本实验室从纤维水解工厂环境分离,它在中国典型培养物保藏中心的保藏编号为 CCTCC M 209245,普通麦芽汁培养基斜面培养,4°C 保存。

### 1.2 种子培养

培养基配方(g/L):葡萄糖 50,酵母膏 5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 3, CaCl<sub>2</sub> 0.2。灭菌条件:糖、盐分开灭菌,1×10<sup>5</sup> Pa,灭菌 20 min。250 mL 三角瓶装液体培养基 50 mL,接种一环斜面培养物,200 r/min、30°C 摇床培养 24 h。

### 1.3 半纤维素水解物制备

干燥的蔗渣按固:液=1:3.5与1% HCl混合,蒸汽压力 0.18 MPa/cm<sup>2</sup>水解 40 min。压滤收集水解液,用 10% KOH 调节至 pH 3.0,抽滤去除沉淀,即得半纤维素水解物。这种水解物的可溶性固形物含量为 8.5%,其中木糖含量 78.9% (W/W)。4°C 冷藏,使用时按要求进一步处理。

### 1.4 水解物预处理

真空蒸发:水解物用 R-200 旋转蒸发仪(瑞士, Buchi) 75°C 真空蒸发浓缩至 1/2 体积,以除去其中的挥发性物质。浓缩过的水解物再用去离子水稀释,还原至原体积。

活性炭吸附:按 100 mL 水解物加入粉末活性炭 0.19 g (GA-T1,江西怀玉山三达活性炭有限公司),50°C 恒温条件下搅拌 60 min,抽滤去除活性炭粉末,得活性炭吸附处理水解物。

pH 值调节:制备好的 pH 3.0 的水解物,或经真空蒸发、活性炭吸附处理过的水解物,再用 10% KOH 分别调至要求的 pH 值,过滤去除调节 pH 所产生的沉淀,用于考察不同预处理与 pH 值调节联合效应。

### 1.5 氧化脱酸发酵条件

通气量:250 mL 三角瓶按不同装液量加入蔗渣水解物,按 2% (V/V)种量接入新鲜的种子液,30°C、200 r/min 摇瓶培养 60 h,通过不同装液量评估通气量对生物脱酸效果的影响。

连续脱酸发酵:250 mL 三角瓶、装液量 50 mL,水解液初始 pH 5.0,接种量 2% (V/V),30°C、200 r/min 摇床培养。待发酵液 pH 升至一定值后,从摇瓶中移出总体积 10% 的发酵液,沉淀离心收集细胞,并用相同体积 pH 3.0 的新鲜水解液调匀收集的细胞,一起返回摇瓶。通过进、出料的体积和速率调节维持发酵液处于要求的 pH 范围。

### 1.6 检测方法

细胞干重:离心发酵液收集菌体,去上清液。沉淀反应用去离子水洗涤 3 次,加水至原体积,依次取 1、2、3、4、5 mL 加水定容至 11 mL,分别取 1 mL 稀释 100 倍,于 T6 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器有限公司)利用比浊法测定 600 nm 处吸光值。剩余 10 mL 菌体离心,于 85°C 烘箱中干燥至恒重。菌体干重为纵坐标,以菌体稀释 100 倍

吸光值( $OD_{600}$ )为横坐标, 绘出细胞干重标准曲线。测定发酵液  $OD$  值, 通过标准曲线换算出细胞干重。

糖类: HPLC 法, 510 色谱仪, 410 示差折光检测器(美国, Waters), BC-100  $Ca^{2+}$  碳水化合物柱(美国, BENSON)。检测条件: 超纯水 0.5 mL/min, 柱温 85°C, 进样量 20  $\mu$ L。

总有机酸: pHS-2C 型精密酸度计(上海雷磁仪器厂), 使用前校正。测定水解液的 pH, 以其变化情况代表总有机酸量的变化, pH 上升表示有机酸被消耗。

醋酸: Agilent 1100 HPLC 色谱仪, 色谱柱, Symmetry 5  $\mu$ m C18 柱, 柱温为室温, 流动相为甲醇 : 0.2%磷酸 = 1 : 3, 流速为 1.0 mL/min, 二极管阵列紫外检测器。进样量: 10  $\mu$ L, 检测波长: 198 nm。

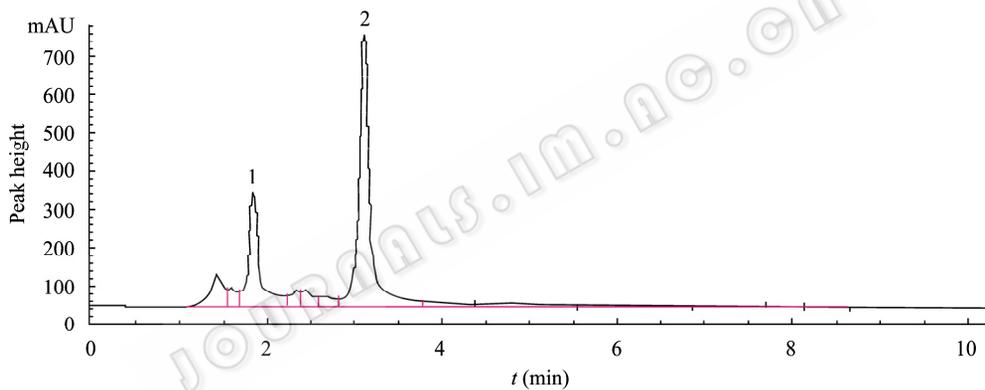


图 1 蔗渣水解物蒸发冷凝液 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC analysis of bagasse hydrolysate evaporation condensate

注: 1: 醋酸; 2: 糠醛。

Note: 1: Acetic acid; 2: Furfural.

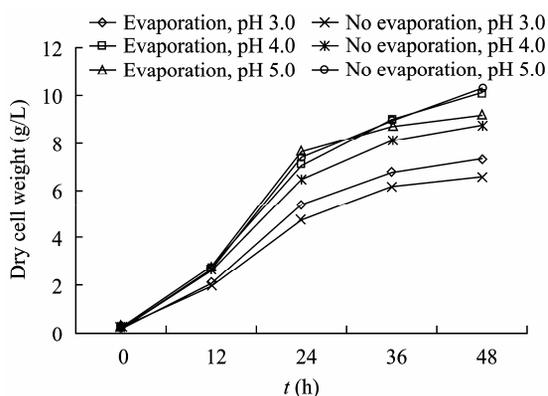


图 2 蒸发处理蔗渣水解液对酵母细胞生长的影响

Fig. 2 The effect of evaporation of bagasse hydrolysate on the growth of yeast cells

## 2 结果与分析

### 2.1 不同预处理对生物脱酸的促进作用

**2.1.1 真空蒸发:** 真空蒸发(浓缩因子: 2)过程产生的冷凝液所含主要挥发性物为糠醛, 以及少部分醋酸(图 1)。无论未经真空蒸发的水解物, 还是经过真空蒸发之后再用水还原回蒸发前体积的蒸发处理水解物, 提高初始 pH 值都是 *Pichia galeiformis* B-10 获得高细胞增长速率的最主要因素。虽然在初始 pH 值 3.0、4.0 的条件下, 蒸发处理水解物的细胞密度略高于不经真空蒸发水解物的细胞密度, 但增加的幅度 < 10%。当初始 pH 值提高至 5.0, 则两者之间的细胞密度几无差异。显然, 只要将水解物的初始 pH 值调节至 5.0 左右, 即可基本消除其中挥发性有毒成分对 *Pichia galeiformis* B-10 细胞生长的抑制作用(图 2), 而不必再对水解物进行蒸发浓缩处理。

无论水解物是否经过真空蒸发处理, 在初始 pH 值 3.0 的条件下接种 *Pichia galeiformis* B-10, 发酵 48 h 之后细胞干重均升高至 5 g/L 以上, 但水解液 pH 值上升均不足 0.2 pH 单位。如果水解物的初始 pH 值调节至 4.0 或 5.0, 则接种 24 h 之后发酵液的 pH 便可分别上升 1 或 1.5 个单位(图 3)。

初始 pH 值 3.0 的条件下, *Pichia galeiformis* B-10 细胞的生长并不使水解物发酵液的 pH 显著升高; 将初始 pH 调节至 4.0 或 5.0, 细胞增长过程同时使发酵液的 pH 显著升高。半纤维素稀酸水解物用碱调节至 pH 值 3.0 时, 主要是无机酸被中和, 以醋酸为主的有机酸主要以分子酸的形式存在。在这种条

件下, *Pichia galeiformis* B-10 对有机酸的代谢显然不会引起培养基 pH 的显著变化。如果将水解物 pH 值调节至 4.0 或 5.0, 则大量的醋酸已经被中和成盐, 酵母利用醋酸盐之后必然生成碳酸盐, 使培养基的 pH 升高。

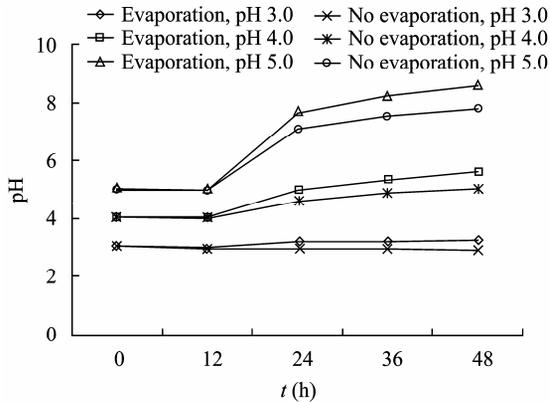


图 3 蒸发处理对水解物发酵液 pH 变化的影响  
Fig. 3 The effect of evaporation on the pH change of hydrolysate fermentation broth

**2.1.2 活性炭吸附:** 利用活性炭吸附处理蔗渣水解物, 可以去除一部分水解液中的有毒物质, *Pichia galeiformis* B-10 细胞在其中的生长情况略好于未经活性炭吸附的水解物, 但是与蒸发处理水解液的情况类似, 提高初始 pH 值才是 *Pichia galeiformis* B-10 获得高细胞增长速率(图 4)和加速脱酸过程(图 5)的最主要因素。将水解液初始 pH 调节至 5.0, 活性炭处理已经无明显提高发酵液的细胞密度和有效促进脱酸过程的作用。显然, 对于 *Pichia galeiformis* B-10 的脱酸发酵而言, 将水解液初始 pH 调节至 5.0 之后不必再进行活性炭预处理。

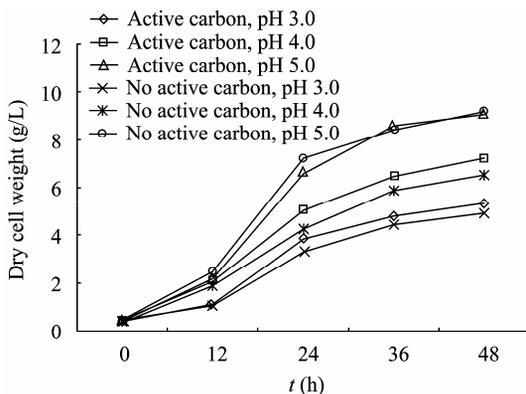


图 4 活性炭吸附处理蔗渣水解物对酵母细胞生长的影响  
Fig. 4 The effect of active carbon adsorption of bagasse hydrolysate on the growth of yeast cells

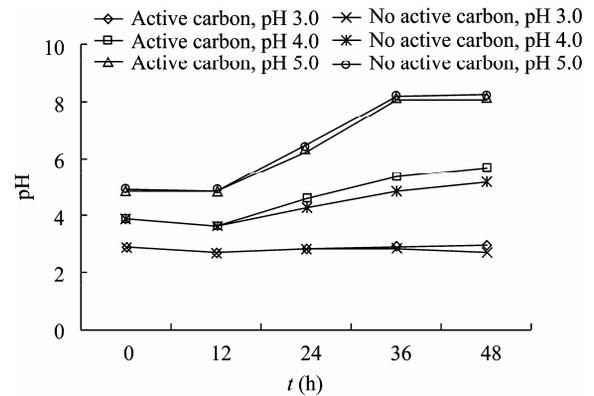


图 5 活性炭吸附对水解物发酵液 pH 变化的影响  
Fig. 5 The effect of active carbon adsorption of bagasse hydrolysate on the pH change of fermentation broth

## 2.2 水解物发酵液醋酸含量的变化

半纤维素水解物的有机酸以醋酸为主, *Pichia galeiformis* B-10 脱酸发酵前 HPLC 检测的醋酸峰明显(图 6A), 发酵后醋酸峰几乎完全消失(图 6B)。初始 pH 5.0 的水解物经脱酸发酵后可升至 pH 8.0 (图 3, 图 5)左右。碱性的环境条件表明: *Pichia galeiformis* B-10 已经代谢除去水解物中以醋酸为主的有机酸。根据 HPLC 检测脱酸前后醋酸减少量 4.7 g/L。

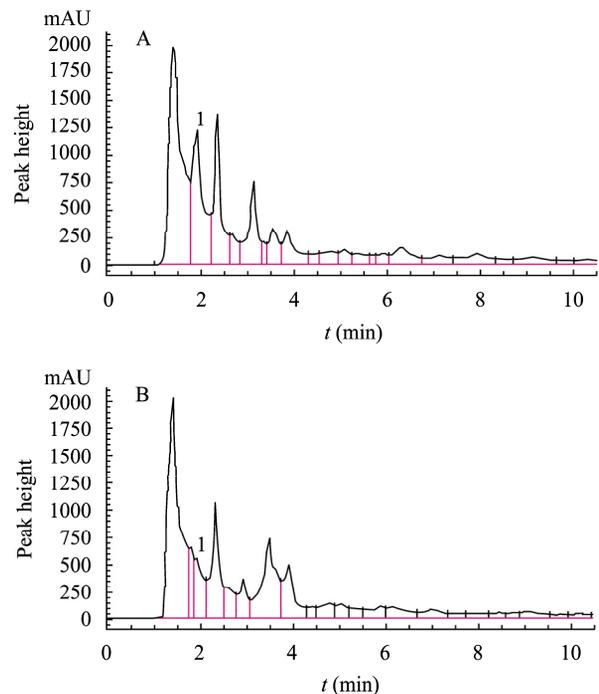


图 6 发酵前后蔗渣水解物中醋酸含量的变化  
Fig. 6 The content variation of acetic acid in bagasse hydrolysate before and after fermentation

注: A: 发酵前; B: 发酵后; 1: 醋酸。

Note: A: Before fermentation; B: After fermentation; 1: Acetic acid.

### 2.3 水解物生物脱酸过程的糖分变化

蔗渣半纤维素水解物中主要糖类包括 D-葡萄糖、D-木糖和 L-阿拉伯糖, 其中葡萄糖占总糖的 6.5%, 木糖占 78.9%, 阿拉伯糖占 11.5%左右(图 7)。接种 *Pichia galeiforms* B-10 之后, 水解物的葡萄糖被消耗(图 7B), 随后有机酸被消耗(图 6B), 培养基 pH 上升(图 3, 图 5)。但即使经过很长时间的培养, 水解物中的木糖, 阿拉伯糖, 以及其他一些未知成分的杂糖始终未见被消耗的迹象(图 7B)。

显然除葡萄糖外, *Pichia galeiforms* B-10 对半纤维素水解物中葡萄糖之外的糖类均缺乏同化利用的能力。用 *Pichia galeiforms* B-10 除去水解物中的有机酸, 不会造成主要糖类的损失。

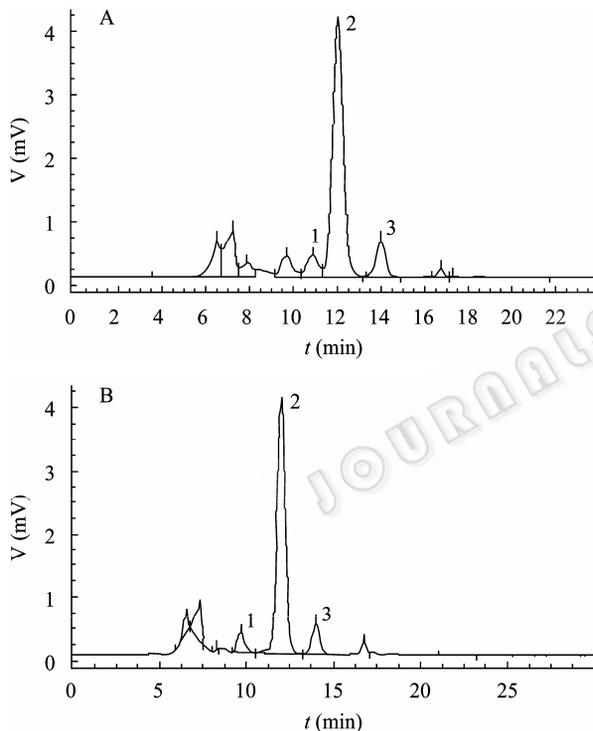


图 7 蔗渣水解物发酵前后的不同糖类的含量变化

Fig. 7 The content variation of sugar components in bagasse hydrolysate before and after fermentation

注: A: 发酵前; B: 发酵后; 1: 葡萄糖; 2: 木糖; 3: 阿拉伯糖。

Note: A: Before fermentation; B: After fermentation; 1: D-glucose; 2: D-xylose; 3: L-arabinose.

### 2.4 通气量对脱酸速率的影响

纯净的有机酸钾盐呈碱性, 接种后水解液培养基升至 pH 7.0 意味着其中的分子态有机酸已经消耗完毕。在初始 pH 5.0 的条件下, 在试验装料量范围内, 装料量越少, 即通气量越大, *Pichia galeiforms* B-10 耗酸的速度越快(图 8)。250 mL 三角瓶装液量

由 25 mL 提高至 150 mL, 培养基至 pH 7.0 所需要的时间由 15 h 延长至 60 h 左右。

伴随着通气量的增大脱酸速度逐渐加快, 主要是高的通气水平为细胞增殖提供了足够的氧, 加快了细胞增殖速率, 从而缩短了脱酸时间。

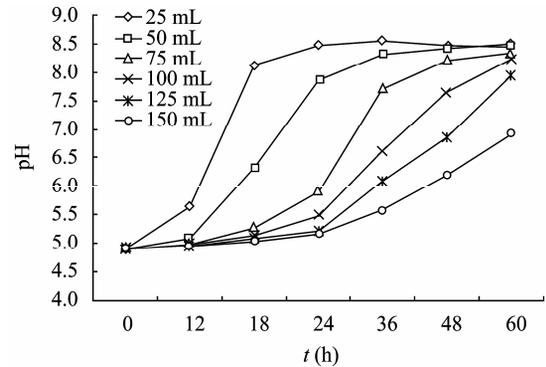


图 8 摇瓶不同装液量与蔗渣水解物发酵液 pH 变化的关系

Fig. 8 The relationship between the medium loading of shake-flask and the pH change of bagasse hydrolysate fermentation broth

### 2.5 连续脱酸发酵

摇瓶装料量 50 mL 条件下, pH 5.0 的蔗渣半纤维素水解物经 *Pichia galeiforms* B-10 脱酸发酵 24 h, 发酵液 pH 值升至 7.0, 表明脱酸完全(图 3、5、8)。移出装料量体积 10% (5 mL) 的发酵液, 离心收集沉淀细胞, 用 5 mL, pH 3.0 的水解物调匀细胞并返回摇瓶, 约 12 h 后可再次升至 7.0。继续按前述方法移出发酵液, 收集细胞, 及用新鲜的水解液调匀沉淀细胞并返回摇瓶, 如此循环利用细胞, 补料脱酸 10 次, *Pichia galeiforms* B-10 的脱酸速率未见下降, 随补料批次增加, 细胞密度增大, 脱酸时间呈不断缩短的趋势(图 9)。

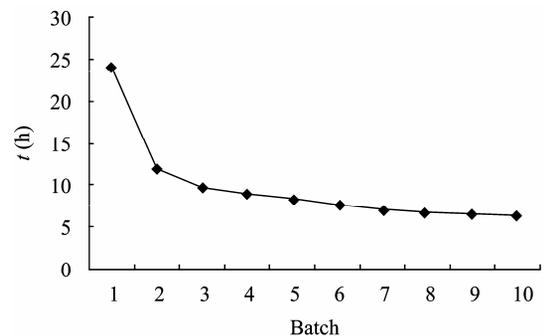


图 9 循环利用细胞补料发酵批次与脱酸效率的关系

Fig. 9 The relationship between the fed-batch of recycle cell fermentation and the efficiency of acid removal

提高初始 pH 可降低半纤维素水解物中有机酸对 *Pichia galeiforms* B-10 的抑制作用, 提高细胞增长速率(图 2), 改善脱酸效果(图 3), 但以碱液直接中和有机酸提高初始 pH 值的方法, 不仅提高成本, 而且加入的碱金属离子最终将成为环境污染物。

*Pichia galeiforms* B-10 代谢有机酸盐的过程中, 首先是氧化有机酸根生成  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CO}_2$  再与金属离子(本实验主要为钾离子)作用生成碳酸盐, 使发酵液的 pH 升高。当水解物的 pH 升高至一定值之后再流加低 pH 值的水解物, 只要调节补料加酸速率与氧化产碱的速率相平衡, 则发酵体系可长期稳定于快速脱酸的高 pH 状态。本质上, 这是利用生物氧化有机酸盐产生的碱性物质, 提高水解物的 pH 值, 使酵母始终处于快速代谢有机酸的高 pH 环境。生物氧化产碱代谢特性的利用, 可以大量节约调节水解物 pH 的外加用碱量, 使脱酸发酵更为经济、便捷、环保。

### 3 讨论

盔形毕赤酵母 *Pichia galeiforms* B-10 可有效代谢半纤维素水解物中的有机酸, 影响它脱酸发酵活性的最主要因素是水解物初始 pH 值。将蔗渣半纤维素水解物初始 pH 值调节至 5.0 以上, 不经其它任何处理 *Pichia galeiforms* B-10 即可发挥良好的生物脱酸发酵活性。

*Pichia galeiforms* B-10 对半纤维素水解物进行脱酸发酵不会造成主要糖类的损失。*Pichia galeiforms* B-10 对半纤维素水解物进行脱酸发酵, 即使脱酸完全, 水解物发酵液 pH 升至碱性条件也不会利用其中的木糖、阿拉伯糖等主要糖类, 使它们得到有效保存。

*Pichia galeiforms* B-10 代谢有机酸盐产生碱性物质, 利用这一特性可大量节约调节水解物 pH 值的外加用碱量。*Pichia galeiforms* B-10 氧化代谢水解物中的有机酸, 发酵体系 pH 升高至一定值 ( $\text{pH} \geq 5.0$ ) 之后, 可直接流加低 pH (约为 pH 3.0) 的水解液进行脱酸发酵。尤其是, 只要调节发酵体系的补料加酸速率与代谢耗酸速率相平衡, *Pichia galeiforms* B-10 细胞即可长时间维持于能快速代谢有机酸的高 pH 状态。这种生物氧化产碱连续脱酸发酵方式, 有效解决了水解物生物脱酸需要在较高

pH 值条件下进行, 与调节 pH 值的用碱最终将成为环境污染物, 并提高生物脱酸成本的矛盾, 使半纤维素水解物的生物脱酸工艺更加经济、环保。

### 参考文献

- [1] 龚霄, 贺稚非, 陈盼, 等. 发酵法生产木糖醇研究进展. 粮食与油脂, 2008(3): 44-48.
- [2] 王晓娟, 王斌, 冯浩, 等. 木质纤维素类生物质制备生物乙醇研究进展. 石油与天然气化工, 2007, 36(6): 452-461.
- [3] Schneider H. Selective removal of acetic acid from hardwood-spent sulfite liquor using a mutant yeast. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 19(2): 94-98.
- [4] Larsson S, Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B, et al. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme and Microbial Technology*, 1998, 24(3/4): 151-159.
- [5] Naoyuki O, Mayumi S, Kazuaki N, et al. Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using *Ureibacillus thermospaericus* for bioethanol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 106(2): 128-133.
- [6] Tihany AM, Silvio SS. Inhibition of microbial xylitol production by acetic acid and its relation with fermentative parameters. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2000, 84/86(1/9): 801-808.
- [7] 丁兴红. 利用玉米芯半纤维素水解液发酵生产木糖醇的研究. 浙江大学博士学位论文, 2006.
- [8] Sarah AP, Thomas RH. Effect of agitation on removal of acetic acid from pretreated hydrolysate by activated carbon. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2003, 106(1/3): 353-364.
- [9] Lee YM, Kang JS, Nam SY, et al. Removal of acetic acid with amine extractants from fermentation broth using hydrophobic hollow-fiber membrane contactor. *Separation Science and Technology*, 2001, 36(3): 457-471.
- [10] Han B, Carvalho W, Canilha L, et al. Adsorptive membranes and resins for acetic acid removal from biomass hydrolysates. *Desalination*, 2006, 193(1/3): 361-366.
- [11] 李浔, 夏畅斌, 颜涌捷, 等. 双极膜电渗析处理生物质水解液的过程性能研究. 应用化工, 2006, 35(5): 325-331.
- [12] 李浔, 颜涌捷, 李庭琛, 等. 树脂离子排斥法分离酸糖. 太阳能学报, 2005, 26(4): 529-532.
- [13] 林兰英. 木质纤维汽爆水解物脱毒菌株的筛选及其脱毒机理研究. 广西师范大学硕士学位论文, 2009.