

文章编号: 1001-8719(2008)增刊-0127-04

HY 分子筛改性海藻酸钙复合载体的酵母固定化 及在燃料乙醇制备中的应用

郑春明^{1,2}, 孙晓红¹, 于爱敏¹, 武光军¹, 章福祥¹, 杨雅莉¹, 关乃佳¹

(1. 南开大学 化学学院新催化材料科学研究所, 天津 300071; 2. 南开大学 云南研究院, 云南 昆明 650091)

摘要: 乙醇汽油是目前重点推广的新型可再生能源之一。燃料乙醇新生产方法的研究对乙醇汽油的推广具有重要意义。介绍了一种改性 HY 分子筛与海藻酸钙形成复合载体固定化酵母的方法。制备的复合载体材料生物负载量可达 $4.3 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$; 经反复使用 60 d, 仍具有良好的生物活性, 并保持了较高的发酵水平; 应用于批式糖蜜酒精发酵工艺中, 可使发酵时间缩短至 16 h。

关键词: HY 分子筛; 海藻酸钙; 复合载体; 固定化酵母; 燃料乙醇; 发酵

中图分类号: TQ920.6 **文献标识码:** A

YEAST IMMOBILIZATION OF ALGINATE-BASED MODIFIED HY ZEOLITE FOR FERMENTATION OF FUEL ETHANOL

ZHENG Chun-ming^{1,2}, SUN Xiao-hong¹, YU Ai-min¹, WU Guang-jun¹,ZHANG Fu-xiang¹, YANG Ya-li¹, GUAN Nai-jia¹

(1. Institute of New Catalytic Materials Science, College of Chemistry, Nankai University, Tianjin 300071, China;

2. Yunnan Institute, Nankai University, Kunming 650091, China)

Abstract: Alcohol gasoline is one of new regenerative energy resource which should be promoted with emphasis. Research on new kind of alcohol fermentation method has the vital significance for its further application. In this paper, HY zeolite is modified with silane coupling agent 3-aminopropyl-triethoxysilane (APTES), and mixed with alginate embedded with yeast as a hybrid carrier. Such composite carrier has a biology capacity of $4.3 \times 10^9 \text{ ml}^{-1}$, and can use repeatedly at least 60 d, maintaining the high fermentation velocity. The fermentation time for a batch process was reduced to only 16 h.

Key words: HY zeolite; Ca alginate; composite carrier; yeast immobilization; fuel ethanol; fermentation

开发生物质能源是我国能源战略的重要组成部分, 而燃料乙醇是生物质能源发展的重要方向之一。乙醇的生产方法分为化学合成法和发酵法, 其中化学合成法受原油价格高涨的影响, 受到很大制约, 因此燃料乙醇的生产现主要采用发酵法^[1]。其中固定化酵母发酵可以提高生产效率、降低劳动强度、缩短发酵时间、减小反应器体积、减少能耗、实现连续自动化生产, 是当今发酵生产乙醇的重要技术。固定化酵母细胞载体材料性能的优劣对乙醇

发酵的速率和产率具有决定性的影响^[2], 因此对新型固定化酵母载体的研究成为燃料乙醇生产研发中的热点。

酵母固定化载体主要有海藻酸钙、聚乙烯醇、聚丙烯酰胺等有机材料, 活性炭、氧化铝、分子筛等无机材料, 以及改性复合材料等。有机固定化材料一般固定化的酵母密度大, 但生化稳定性差、机械强度低, 工业化应用受到一定限制。无机固定化材料具有较好的机械性能、通透性和可再生性, 可

收稿日期: 2008-09-15

基金项目: 国家重点基础研究发展计划“973”项目(2003CB615801)、国家自然科学基金(20573059, 20777039)、云南省院省校合作基金项目(2005YX39)资助

通讯联系人: 关乃佳, Tel: 022-23500341; E-mail: guannj@nankai.edu.cn

提高固定化酵母的机械强度,增强发酵产物的流通和传质,但仅靠物理或化学吸附作用与微生物进行结合,其作用力较弱,微生物易在反复冲洗过程中脱落,从而影响其发酵效果^[3]。将有机材料与无机材料相复合,制备有机-无机复合载体,即利用有机材料对酵母细胞好的包埋亲和性能,酵母细胞繁殖速率快,可充分发挥无机材料优良的机械性能和通透性,延长了材料的使用寿命,能有效提高固定化酵母发酵生产燃料乙醇的效率^[4]。

笔者将 HY 分子筛通过硅偶联剂 γ -氨基丙基三乙氧基硅烷(APTES)进行孔表面处理,使其表面带有伯氨基反应官能团,将它与包埋有酵母的海藻酸钙凝胶相混合,制备 HY 分子筛改性海藻酸钙有机-无机复合载体固定化酵母。对制备的复合载体固定化酵母进行了 SEM 及细胞包埋量分析,考察了不同材料对固定化酵母的批式发酵性能和稳定性的影响,发现复合载体对酵母具有良好的包埋效果,为燃料乙醇生产提供了一种新型有产业化潜力的固定化酵母载体。

1 实验部分

1.1 材料

酿酒干酵母(安徽安琪酵母有限责任公司产品)、海藻酸钠、有机硅偶联剂等高分子聚合物(天津市博迪化工有限公司产品)、HY 分子筛(南开大学新催化材料科学研究所产品)、甘蔗废糖蜜、葡萄糖、蔗糖(云南建水东糖糖业有限公司产品),其余试剂均为国产分析纯试剂。

发酵培养基组分为蔗糖 120 g/l、硫酸铵 10 g/l、磷酸二氢钾 25 g/l、硫酸镁 5 g/l、酵母浸膏 20 g/l,使用 4 mol/l 硫酸调节 pH 值为 4.0。将甘蔗废糖蜜稀释到 35.°Bx(对应总糖质量浓度约为 170 g/l),再加入硫酸铵 10 g/l,磷酸二氢钾 25 g/l,使用 4 mol/l 硫酸调节 pH 值为 4.0,制备成发酵液。

以上发酵液体使用前均在 116℃ 蒸汽下灭菌 20 min。

1.2 HY 分子筛改性海藻酸钙固定化酵母的制备

1.2.1 H_2N 改性 HY 分子筛(H_2NHY)的制备^[5]

HY 分子筛、APTES 和丙酮(质量比为 1:2:20)在搅拌条件下 110℃ 蒸馏 24 h。然后将分子筛过滤,用乙醇和蒸馏水洗涤去除残余的硅,再将 APTES 改性分子筛在 110℃ 下干燥过夜,标为 H_2NHY 分子筛。

1.2.2 改性 HY 分子筛海藻酸钙复合载体(H_2NHY -海藻酸钙复合载体)固定化酵母的制备

称取海藻酸钠 2 g,用 100 ml 无菌水加热煮沸至溶解,按实验设计加入 1.2 g H_2NHY 分子筛后再加入海藻酸钠 2 g,搅拌均匀,与用蔗糖溶液复活的酿酒干酵母 1 g 充分混合,再加入无菌水定容至 200 ml,加入总体积 0.01% 的双环氧乙烷进行交联,继续搅拌至均匀,滴入 5% 氯化钙溶液造粒,固化 4 h 后洗涤制得,标为 H_2NHY -海藻酸钙复合载体固定化酵母。

1.3 不同载体固定化酵母批式发酵实验

批式发酵条件为将不同载体固定化酵母各 120 ml,放入 1000 ml 的柱状发酵罐中,加入发酵液使发酵总体积为 1000 ml,保持 pH 值为 4.0,在 30℃ 下通气发酵,直至发酵液中残余糖浓度降低至稳定为一次发酵结束。

1.4 酵母细胞包埋量、糖浓度、酒精含量的测定

酵母细胞包埋量的测定^[6]:取 5 ml 固定化酵母放入 5% 的柠檬酸钠溶液中,并定容至 50 ml。间歇振荡,完全溶解后,立即稀释,经亚甲基蓝染色后,用血球计数板在显微镜下计算总细胞数及细胞存活率,取 3 次的平均值,然后计算包埋菌数。包埋菌数=血球计数板计数活细胞数目×稀释倍数/载体体积。

总糖、残糖含量用斐林试剂溶液滴定,酒精含量用蒸馏酒精比重计法测定。

1.5 不同载体固定化酵母的显微结构及比表面积测定

将不同载体固定化酵母样品首先在 50%、80% 和 100% 乙醇中分别浸泡 2 h,于 80℃ 下过夜真空干燥。处理后样品表面经离子溅射仪表面喷金处理,使用 Shimadzu SS-550 型扫描电镜观察样品显微结构,电压 200 kV。通过低温液氮吸附法测定处理后样品的比表面积和孔径分布,仪器为美国 TriStar 3000 型孔径测试仪,测定前将样品在 80℃ 下真空处理至系统真空度为 0.8 Pa 左右,然后以容积法获得 N_2 的低温(77 K)吸附等温线,通过 BET 和 BJH 法分别计算样品的比表面积和孔径分布。

2 结果与讨论

2.1 H_2NHY 、海藻酸钙、 H_2NHY -海藻酸钙复合载体固定化酵母性能对比

为了对比不同载体固定化酵母的浓度,对其包

埋菌数和细胞存活率进行了测定, 结果如表 1 所示。从表 1 可以看出, 复合材料固定化酵母浓度明显高于 H₂NHY 分子筛及海藻酸钙固定化酵母浓度。与 H₂NHY 分子筛相比, H₂NHY-海藻酸钙复合载体酵母存活率也有提高。图 1 为复合载体和海藻酸钙固定化酵母的 SEM 图。从图 1 可以看出, 酵母在复合载体内大量增殖, 其固定化酵母浓度明显高于纯海藻酸钙中的酵母浓度。以上表征都说明, 复合载体的固定化酵母浓度均高于单一载体的固定化酵母浓度, 这是由于 H₂NHY 分子筛单独作为固定化载体时, 是利用吸附和价键作用使酵母结合于载体表面; 海藻酸钙是利用包埋作用使酵母固定于载体内部; 而复合载体材料, 结合了

H₂NHY 分子筛的物理吸附和价键作用及海藻酸钙的包埋作用, 既有利于酵母的固定和附着, 又有利于物质的传质, 从而提高了固定化酵母浓度^[7]。

表 1 载体种类对固定化酵母浓度及存活率的影响
Table 1 Effect of carriers on the immobilized yeast cell concentration and surviving fraction

Carrier	Immobilized cell concentration × 10 ⁸ / ml ⁻¹	Surviving fraction / %
H ₂ NHY	6	65
Ca alginate	32	86
H ₂ NHY-alginate composite	43	83

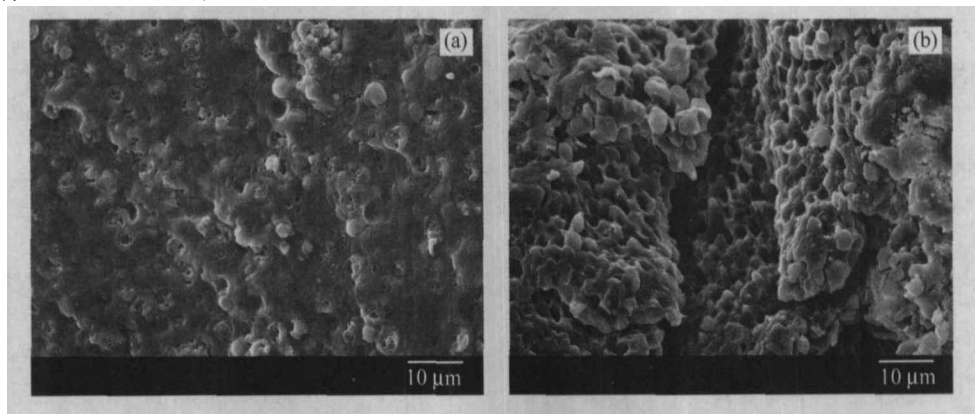


图 1 海藻酸钙和复合载体固定化酵母的 SEM 图

Fig. 1 SEM images of immobilized yeast cells embedded by the alginate and H₂NHY-alginate composite carrier
(a) Ca alginate; (b) H₂NHY-alginate composite carrier

2.2 H₂NHY、海藻酸钙、H₂NHY-海藻酸钙复合载体固定化酵母的发酵性能与游离发酵的对比

H₂NHY、海藻酸钙、复合载体 3 种固定化酵母的发酵性能与游离发酵的对比如图 2 所示。由图 2 可以看出, H₂NHY、海藻酸钙、复合载体 3 种固定化发酵系统分别经过 30、20 和 16 h 完成发酵, 复合载体固定化酵母的发酵时间最短。这是因为复合载体由 H₂NHY 分子筛、海藻酸钙复合而成, 其既能借助改性分子筛的物理吸附和价键结合作用, 又能利用海藻酸钙对酵母细胞的包埋作用, 增加了固定化细胞的浓度, 且 H₂NHY 分子筛具有规则的孔道和大的比表面积, 利于载体中发酵营养物质和代谢产物的传质, 从而提高了体系的发酵效率。

表 2 为载体种类对固定化酵母比表面积的影响。从表 2 可以看出, 海藻酸钙比表面积很小, H₂NHY 分子筛比表面积较大, 而 H₂NHY 海藻酸钙复合载体的比表面积明显比海藻酸钙的大, 有

利于发酵营养物质和代谢产物在载体中的传质。

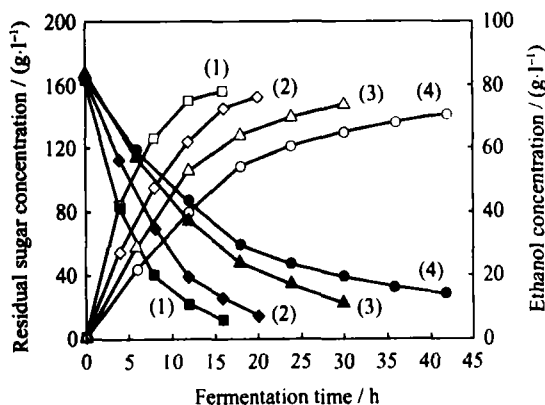


图 2 H₂NHY、海藻酸钙、H₂NHY-海藻酸钙复合载体的发酵性能与游离发酵的对比

Fig. 2 The comparison of the fermentation kinetics between immobilized yeasts embedded by different composite carriers and free cells system
■ Residual sugar concentration; □ Ethanol concentration
(1) Alginate-based H₂NHY; (2) Alginate; (3) H₂NHY; (4) Free cell system

表 2 用于固定化酵母的 3 种载体的比表面积

Table 2 Specific surface area of three carriers used for immobilized yeast

Sample	Specific surface area / (m ² · g ⁻¹)
H ₂ NHY zeolite	419.20
Ca alginate	6.72
H ₂ NHY-Alginate composite carrier	86.07

2.3 复合载体固定化酵母细胞生产乙醇的批式重复发酵

为了研究复合载体在长时间下的使用性能,对复合载体固定化酵母生产乙醇的批式重复发酵过程进行了研究,结果如图 3 所示。从图 3 可以看出,乙醇质量浓度都基本保持在 70 g/l 以上并逐步上升,最终达到了 77 g/l 左右。载体内固定化酵母细胞和游离出的酵母细胞浓度均随发酵进程而不断升高,复合载体固定化酵母可重复使用 60 d,并保持了 95% 的原始发酵活性(图 3 仅表示了前 30 d)^[8]。这说明,复合载体具有良好的生物相容性,可长时间保持酵母细胞的生物活性,从而可在燃料乙醇发酵生产过程中重复使用。

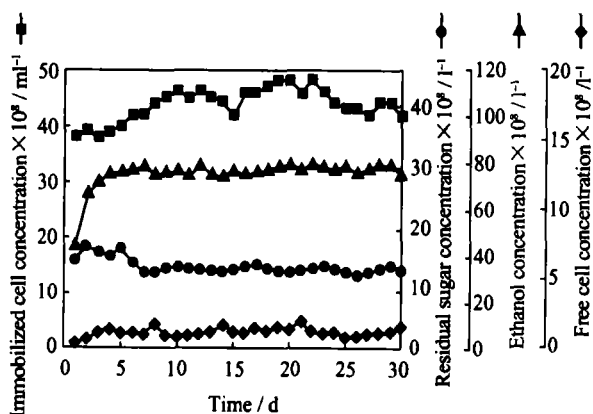


图 3 复合载体固定化酵母生产乙醇的批式重复发酵过程
Fig. 3 Fermentation kinetics of immobilized yeasts in composite carrier during ethanol production in repeated fed-batch culture

3 结论

研究了表面改性的 HY 分子筛-海藻酸钙复合载体固定化酵母用于糖蜜酒精发酵过程,并对其进行了包埋量及 SEM 表征。制备的复合载体材料生物负载量可达 4.3×10^9 ml⁻¹, 应用于批式糖蜜酒精发酵工艺中,可使发酵时间缩短至 16 h,经反复使用 60 d,仍具有良好的生物活性,并保持了较高的发酵水平,是燃料乙醇工业具有产业化应用前景的新型酵母固定化载体。

参 考 文 献

- [1] 张以祥. 燃料乙醇与车用乙醇汽油[M]. 北京: 中国石化出版社, 2004.
- [2] CHUM H L, OVEREND R P. Biomass and renewable fuels[J]. Fuel Processing Tech, 2001, 71(1-3): 187-195.
- [3] KOURKOUTAS Y, BEKATOROU A, BANAT I M, et al. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review[J]. Food Microbiology, 2004, 21(4): 377-397.
- [4] PILKINGTON P H, MARGARITIS A, MENSOUR N A, et al. Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: A review[J]. J Inst Brew, 1998, 104(1): 19-31.
- [5] ZHAN B Z, WHITE M A, LUMSDEN M. Bonding of organic amino, vinyl, and acryl groups to nanometer-sized NaX zeolite crystal surfaces[J]. Langmuir, 2003, 19: 4205-4210.
- [6] 张明霞. 猕猴桃酵母固定化技术的研究[M]. 西安: 西北农林科技大学, 2003.
- [7] YU J L, ZHANG X, TAN T W. An novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production[J]. J Biotech, 2007, 129(3): 415-420.
- [8] DEJAN B, BOJANA O, IDA L C, et al. Immobilization of yeast cells in PVA particles for beer fermentation[J]. Process Bio, 2007, 42(9): 1348-1351.