

拟薄水铝石-海藻酸铝固定化酵母生产乙醇

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

(1. 南开大学 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: 在原位合成拟薄水铝石中加入酵母和海藻酸钠, 搅拌并冷冻后制备固定化酵母, 以甘蔗废糖蜜生产乙醇。通过复合材料固定化酵母增殖机理发现, 固定化酵母数达 4.1×10^9 个/mL, 批式发酵中 14 h 消耗了 90.5% 的总糖; 40 d 连续流动中, 稀释率为 0.100 h^{-1} 时, 最大载体乙醇产率为 $52.0 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{h})$ 。SEM 表征表明, 该固定化酵母细胞密度高, 孔道结构丰富, 利于细胞的繁殖生长和物质传送。乙醇发酵过程彻底, 速率快, 残糖水平低, 原料利用率和发酵乙醇质量浓度均超过传统工艺。

关键词: 拟薄水铝石; 海藻酸铝; 固定化酵母; 甘蔗废糖蜜; 燃料乙醇; 复合载体

中图分类号: TQ 920.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9954(2009)12-0047-04

Immobilization yeast of Al alginate-based pseudo-boehmite for ethanol production

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

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

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

Abstract A new kind of carrier for the immobilization yeast to produce ethanol from sugar cane molasses was made by in-situ synthetic pseudo-boehmite ($\alpha\text{-AlOOH}$) mixed with yeast and Na alginate. The results show that the composite carrier has a biology capacity of 4.1×10^9 n/mL. 90.5% of total sugar was consumed after 14 h in the batch fermentation. The maximum carrier ethanol productivity of $52.0 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{h})$ appeared at the dilution rate of 0.100 h^{-1} in the 40 d continuous flow alcohol fermentation. The scanning electron microscopy (SEM) of the carriers reveals that the composite carrier is much more porous than $\alpha\text{-AlOOH}$ and Ca alginate, which facilitates the transmission of substrates and products between carriers and medium. The experiments show that the composite carrier of Al alginate-based $\alpha\text{-AlOOH}$ has higher carrier ethanol productivity, lower residual sugar concentration than the traditional technology, and can get higher conversion ratio of material and ethanol mass concentration.

Key words pseudo-boehmite; Al alginate; immobilization yeast; sugar cane molasses; fuel ethanol; composite carrier

开发生物质能源是我国能源发展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^[1]。各种乙醇发酵方法中, 固定化酵母乙醇发酵具有可缩短发酵时间、减小反应器体积、实现连续自动化生产等优点, 是当今乙醇生产已运用的重要技术^[2], 其中固定化载体材料性能的优劣, 对固定化乙醇发酵的速度和产率具有重要影响^[3]。近年来国内外对酵母固定化材料进行了广泛研究^[4-6], 已报道的固定化载体包括壳聚糖、桔子皮、废弃谷壳、海藻酸钙、丝瓜复合凝胶等材料。

拟薄水铝石 (化学式简写为 $\alpha\text{-AlOOH}$) 是一种

含有 1—2 个水分子的有孔半结晶状氢氧化铝, 为结晶 $\gamma\text{-氧化铝}$ 的前驱体。因其具备的纳米级孔道和巨大比表面积而在催化、吸附及分离方面有较大的应用价值^[7], 在生物技术领域里, 其孔径较大且对细胞无毒性, 使其应用于固定体积较大的微生物细胞成为可能。以拟薄水铝石为增强体掺入海藻酸钠基体形成复合材料, 既具备海藻酸盐对酵母细胞良好的包埋性、亲和性及生物负载量大的特点, 又具有拟薄水铝石优良的机械性能和通透性, 对提高固定化酵母发酵生产乙醇的效率非常有利^[8]。复合材料的相关研究还未见文献报道。

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (973 计划) (2003CB615801); 国家自然科学基金资助项目 (20777039, 20573059); 云南省院校合作基金项目 (2005YX39)

作者简介: 郑春明 (1979—), 男, 博士研究生, 助理研究员, 主要研究方向为材料和化学工程; 关乃佳, 通讯联系人, 电话: (022) 23509140, E-mail: guann@nankai.edu.cn

本文以拟薄水铝石改性海藻酸铝为固定化酵母材料研究甘蔗废糖蜜乙醇发酵,发现该载体机械强度高、酵母负载量大、性能稳定,为燃料乙醇工业提供一种新型有产业化应用前景的酵母固定化材料。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料

酿酒干酵母,广东丹宝利酵母有限公司;海藻酸钠、氯化铝,天津市博迪化工有限公司;糖蜜,云南建水东糖糖业有限公司;其余试剂均为国产分析纯试剂。

发酵液是将甘蔗废糖蜜稀释到 35°Bx(对应总糖质量浓度约为 170 g/L),其余营养盐添加量见文献[9]。

1.2 拟薄水铝石改性海藻酸铝复合材料固定化酵母(复合固定化酵母)的制备

80℃搅拌条件下,在 100 mL浓度为 0.5 mol/L的氯化铝溶液中逐步滴加浓度为 4 mol/L的 NaOH溶液,并控制成胶最终 pH值为 7.0 搅拌均匀后静置 30 min,得到乳白色凝胶,待冷却后再加入蔗糖培养基复苏酿酒酵母 1 g,将海藻酸钠 4 g用 100 mL无菌水溶解后,缓慢加入上述凝胶中,并及时搅拌均匀, -5℃冷冻 4 h后于室温解冻,使用无菌水浸泡冲洗后用质量分数 1%的 AgNO₃检测冲洗液至无白色沉淀出现,得乳白色凝胶固体,即形成原位合成拟薄水铝石改性海藻酸铝复合材料固定化酵母,4℃下保存备用。

1.3 固定化酵母的批式及连续发酵

批式发酵条件为将 120 mL不同载体固定化酵母,放入 1.5 L柱状发酵罐中,加入 1.1节培养基使发酵总体积为 1 L,保持 pH=4.0 在 30℃下连续或间隔 2 h通入无菌空气 3—20 min发酵,至培养基中残糖质量浓度降低至稳定为一次培养结束,定时取样测定发酵效果。

连续发酵条件为 10 L填充床反应器,将复合固定化酵母放入反应器中,使载体空体积率为 12%,使用 1.1节中发酵液以不同的流速连续发酵,连续或间隔 1 h通入无菌空气 10—30 min,开始时稀释率为 0.063 h⁻¹,待反应器建立起稳定状态后,改变发酵液稀释率,定时取样测定发酵效果。

1.4 酵母细胞数以及糖与酒精质量浓度的测定

酵母细胞数的测定如文献[10]所述。其中糖醇转化率 η 为

$$\eta = \frac{\rho}{(\rho_0 - \rho_r) \times 0.5183} \quad (1)$$

式中: ρ 为乙醇质量浓度, g/L; ρ_0 为糖初始质量浓

度, g/L; ρ_r 为残糖质量浓度, g/L; 0.5183为糖醇理论转化系数。总糖、残糖质量浓度用斐林试剂溶液滴定,酒精质量浓度用蒸馏酒精密度计法。

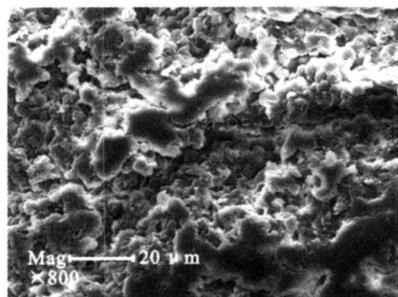
1.5 载体显微结构及其包埋酵母的增殖特征测定

复合固定化酵母分别在质量分数为 50%、80%和 100%乙醇中处理,室温干燥 12 h,样品表面再经离子溅射仪表面喷金处理后,使用 Shimadzu SS-550型扫描电镜进行样品的显微形态观察,电压为 200 kV。

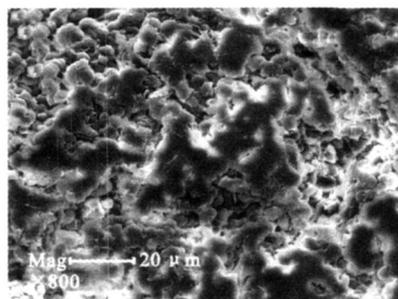
2 结果与讨论

2.1 不同载体固定化酵母的生长增殖情况对比

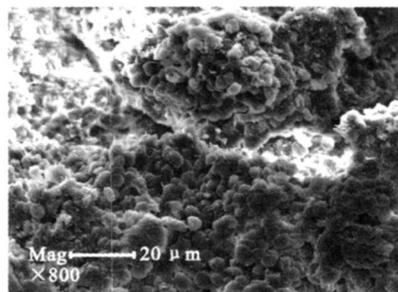
对拟薄水铝石、海藻酸铝、复合固定化酵母按 1.2节及文献[8]制备增殖培养 80 h后测定固定化酵母数。复合固定化酵母数为 4.1 × 10⁹个/mL,而纯拟薄水铝石仅为 4.0 × 10⁷个/mL,纯海藻酸钙为 2.4 × 10⁹个/mL。上述 3种材料 SEM图见图 1。



(a) 吸附于纯 α -AlOOH 表面的酵母



(b) 包埋于海藻酸铝中的酵母



(c) 包埋于复合材料中的酵母

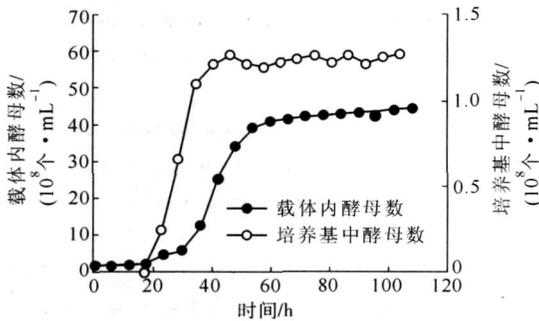
图 1 不同载体材料固定化酵母细胞的 SEM 照片

Fig 1 SEM images of immobilized yeast embedded by different carriers

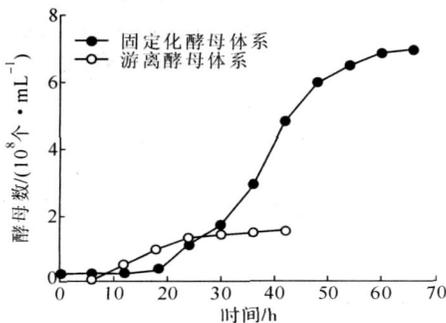
从图 1 中看出, 酵母在复合材料表面及内部大量增殖, 固定化酵母数量明显较高, 与纯拟薄水铝石、海藻酸铝载体相比, 复合材料与酵母有更好的兼容性, 结构更为通透, 这可能是由于其结合了静电/价键与包埋的双重作用^[11], 既发挥了海藻酸盐包埋对酵母负载的稳定性和牢固性, 同时拟薄水铝石的改性, 又有助于改善复合材料的通透性, 有利于细胞的繁殖生长和物质传送, 为提高发酵效率和产率奠定了基础。

为进一步研究固定化材料对酵母生长和繁殖的影响, 将复合固定化酵母与游离酵母的生长增殖进行对比, 如图 2。

从图 2(a)中可以看出, 复合固定化酵母生长停滞期为 18 h, 对数生长期为 42 h, 比生长速率为 0.39 h^{-1} , 而培养基游离酵母比生长速率为 0.73 h^{-1} , 这是培养基游离酵母自身增殖与固定化酵母增殖后释放部分酵母到培养基中累加作用的结果^[12]。而固定化酵母对数生长期比培养基中游离酵母的对数生长期延长了几乎 1 倍 (42 h 相对于 21 h)。



(a) 复合固定化酵母及释放到培养基酵母的增殖曲线



(b) 固定化酵母体系(载体+培养基)及游离酵母增殖曲线

图 2 复合材料、固定化酵母体系(载体+培养基)及游离酵母体系内酵母的增殖曲线

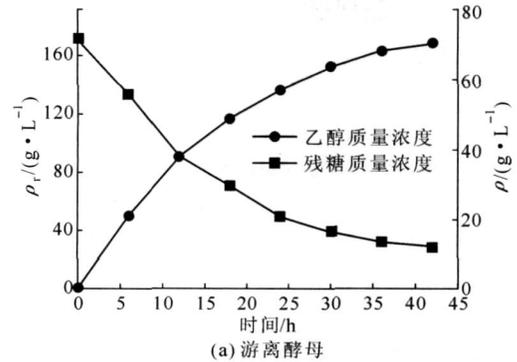
Fig 2 Growth curves for cells in immobilized yeast system and free cells

在图 2(b)中发现, 固定化体系(载体+培养基)存在较长的生长停滞期和对数生长期(分别为 18 h 和 36 h 比游离体系的 6 h 和 18 h), 酵母总数也高于

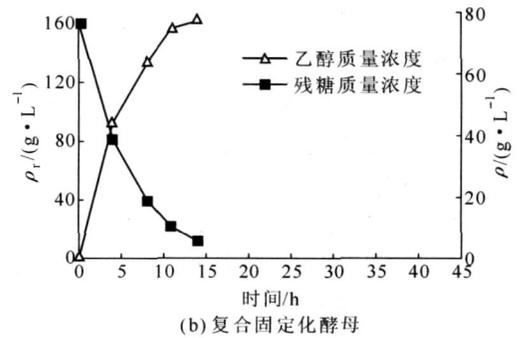
游离体系 (6.9×10^8 个/mL 比 1.5×10^8 个/mL), 这是延长的生长时间和较高的比生长速率共同作用的结果^[13]。固定化酵母增殖释放到培养基酵母与游离酵母比生长速率基本相同, 说明固定化对酵母生理学特征没有负面影响, 仍保持原有生理活性^[14]。

2.2 复合固定化酵母与游离酵母批式发酵性能

图 3 对比了复合固定化酵母与游离酵母(酵母数 1.6×10^8 个/mL, 接种量 12%) 的发酵性能。



(a) 游离酵母



(b) 复合固定化酵母

图 3 复合固定化酵母与游离酵母发酵性能

Fig 3 Fermentation results between immobilized yeast embedded by composite carrier and free yeast system

游离酵母体系 42 h 内消耗了 79.0% 总糖(质量浓度 172 g/L), 乙醇质量浓度 70.4 g/L, 糖醇转化率 94.3%; 复合固定化酵母 14 h 消耗了 90.5% 总糖(质量浓度 165 g/L), 乙醇质量浓度 77.4 g/L, 载体乙醇产率 $46.1 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{h})$, 糖醇转化率 98.3%, 复合固定化酵母发酵具有明显优势。对比 2.1 节中固定化体系和游离酵母数分别为 6.9×10^8 个/mL 和 1.5×10^8 个/mL, 复合固定化酵母与增殖游离出酵母的共同发酵应是固定化体系具有明显优势的重要原因^[8]。

2.3 复合固定化酵母连续流动发酵制备乙醇

复合固定化酵母连续流动发酵情况如图 4。随着稀释率升高, 乙醇产率不断升高, 乙醇质量浓度则不断下降。当稀释率为 0.100 h^{-1} 时, 载体乙醇产率最大, 为 $52.0 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{h})$ 。材料在 40 d 系统运行中

没有破损,发酵达到稳定状态后,稀释率变化对乙醇质量浓度影响较小,说明发酵体系有较好的操作稳定性^[12]。

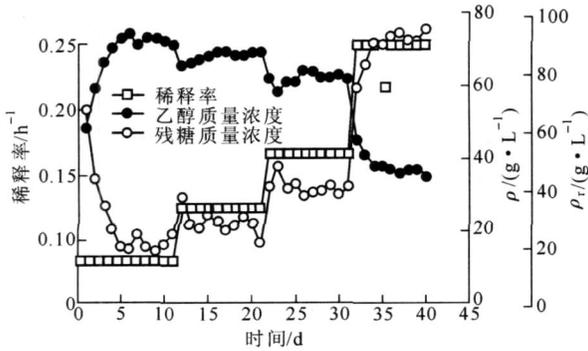


图 4 复合材料连续流动发酵实验结果

Fig 4 Continuous ethanol fermentation in a fixed-bed reactor with immobilized yeast embedded by composite carrier

3 结论

(1)采用原位合成拟薄水铝石改性海藻酸钠复合材料制备固定化酵母,与海藻酸铝固定化酵母相比,酵母包埋量提高。

(2)通过研究复合固定化酵母增殖机理,发现酵母固定化后对数生长期延长,但比生长速率相同,仍保持原有生理活性。

(3)将复合固定化酵母应用于甘蔗废糖蜜生产乙醇,40 d连续流动发酵实验中,当稀释率为 0.100 h⁻¹时,最大载体乙醇产率达 52.0 g/(L·h),发酵过程彻底,速率快,残糖水平低,原料利用率和发酵乙醇质量浓度均超过游离发酵工艺,为燃料乙醇工业提供一种新型有产业化应用前景的酵母固定化材料。

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] 张君, 刘德华. 世界燃料酒精工业发展现状与展望[J]. 酿酒科技, 2004, 125(5): 118-121.

[3] 刘振, 周兴国, 曾爱武, 等. 稻谷生料发酵生产乙醇研究[J]. 化学工程, 2006, 34(3): 49-52.
 [4] 黄祖新, 陈由强, 张彦定, 等. 甘蔗生产燃料乙醇发酵技术的进展[J]. 酿酒科技, 2007, 160(10): 81-84.
 [5] CHUM H L, OVEREND R P. Biomass and renewable fuels[J]. Fuel Processing Tech, 2001, 71(1/2/3): 187-195.
 [6] KOURKOUTAS Y, BEKATOROU A, BANAT IM, et al. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review[J]. Food Microbiology, 2004, 21(4): 377-397.
 [7] 高志贤, 程昌瑞, 谭长瑜, 等. 拟薄水铝石酸分散性能的研究[J]. 石油炼制与化工, 1999, 30(2): 16-19.
 [8] PLKINGTON 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.
 [9] 谢振根, 杨励生, 何嘉波, 等. 固定化增殖酵母酒精发酵新技术研究, 第3报, 并流型膜状固定化增殖细胞反应器研制[J]. 江苏食品与发酵, 1995(2): 28-47.
 [10] LI Xianzhen. The use of chitosan to increase the stability of calcium alginate beads with entrapped yeast cells[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 1996, 23(3): 269-272.
 [11] YU Jianliang, ZHANG Xu, TAN Tianwei. An novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production[J]. J Biotech, 2007, 129(3): 415-420.
 [12] 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.
 [13] NEDOVIC V A, OBRADOVIC B, LESKOSEK-CUKALOVIC J, et al. Electrostatic generation of alginate microbeads bated with brewing yeast[J]. Process Biochem, 2001, 37(1): 17-22.
 [14] COVERTIA, BORGHIM D, ZILLIM, et al. Kinetics of alcohol fermentations carried out in rotating biological surface reactors[J]. Biotechnol Bioeng, 1987, 29(1): 16-23.

新书介绍 ——《现代煤化工新技术》

本书全面论述了现代煤化工的基础工艺、技术路线、气化下游产品、新技术的进展及发展方向,以科学发展煤化工为指导思想,客观评述了各类煤化工新技术的优缺点。可供从事煤化工科研开发、工程设计的专业技术人员、地方政府和煤炭企业的管理人员、院校相关专业师生参考。原化工部副部长潘连生为本书作序。

作者: 唐宏青

编辑: 王丽

出版时间: 2009年 11月

出版社: 化学工业出版社

书号: 978-7-122-06665-7

字数: 760千字

定价: 128.00元(精装)