

# 改性无纺布-壳聚糖固定化酵母 生产燃料乙醇

郑春明<sup>1,2</sup>, 孙晓红<sup>1</sup>, 章福祥<sup>1</sup>, 杨雅丽<sup>1</sup>, 武光军<sup>1</sup>, 关乃佳<sup>1</sup>

(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:**采用含酵母的壳聚糖溶液经木质素磺酸钠交联的方法包埋固定化在环氧氯丙烷改性的聚丙烯无纺布上。以甘蔗废糖蜜为原料, 研究固定化酵母的发酵及增殖机理发现, 酵母包埋量达  $3.7 \times 10^9$  /mL, 在批式发酵中, 初始糖质量浓度 167 g/L、填充率 12%、pH 4.0、温度 34℃ 时, 发酵成熟醪酒精质量浓度达 78.2 g/L、残糖质量浓度 12.8 g/L、发酵周期缩短至 10.5 h。连续流动发酵实验中, 材料使用 40 d 没有破损, 乙醇发酵过程彻底, 速率快, 残糖水平低, 原料利用率和发酵醪乙醇浓度均超过传统工艺。

**关键词:**改性无纺布; 壳聚糖; 复合材料; 固定化酵母; 发酵; 燃料乙醇

中图分类号: TQ920.6

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2009)01-0052-03

## Chloroepoxy propane modified nonwoven-chitosan immobilized yeast for fuel alcohol production

ZHENG Chun-ming<sup>1,2</sup>, SUN Xiao-hong<sup>1</sup>, ZHANG Fu-xiang<sup>1</sup>, YANG Ya-li<sup>1</sup>, WU Guang-jun<sup>1</sup>, GUAN Nai-jia<sup>1</sup>

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

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

**Abstract:** Chitosan embedded with yeast is cross linked through sodium lignosulphonate with the polypropylene (PP) nonwoven modified with chloroepoxy propane. The fermentation effects of material composite, shapes, initial concentration, and packing ratio of immobilized yeast are studied. The immobilized yeast has a biological capacity of  $3.7 \times 10^9$  /mL. The results show that the maximal ethanol concentration, residual sugar concentration, and the fermentation time of the immobilized yeast are 78.2 g/L, 12.8 g/L and 10.5 h, respectively, when the sugar concentration, packing ratio, pH, and the temperature are 167 g/L, 12 %, 4.0 and 30℃, respectively. In 40 days of the continuous fermentation process the results of immobilized yeast remains stable without significant change of membrane shape and size. The experiments show that the immobilized yeast of polypropylene (PP) nonwoven-based chitosan has higher carrier ethanol productivity, lower residual sugar concentration, and can get a higher conversion ratio of material and ethanol concentration than those with the traditional technology.

**Key words:** modified PP nonwoven; chitosan; composite material; immobilized yeast; fermentation; fuel alcohol

现今燃料乙醇生产以粮食为主, 而未来我国燃料乙醇发展更多应依靠非粮食原料<sup>[1]</sup>。甘蔗废糖蜜乙醇发酵, 不与人争粮, 并具有发酵速度快, 免糖化蒸煮, 可蔗糖-乙醇联产连续生产等优势, 是目前研究的热点之一<sup>[2]</sup>。其中固定化酵母载体材料性能的优劣, 对燃料乙醇产率具有决定性的影响<sup>[3-4]</sup>。目前常见的固定化载体包括壳聚糖、海藻酸钙、聚丙烯酰胺、桔子皮、废弃谷壳等多种材料, 但大多存在机械强度差、对微生物活性有损伤、负载量低等缺陷<sup>[5]</sup>。以壳聚糖固定化酵母为例, 在酵母可存活 pH

条件下, 壳聚糖溶解度较低, 使得胶体成型强度低, 物质转移限制受影响, 将其与海藻酸盐等高分子材料反应或者负载在氧化铝、木炭等吸附剂上可获得更好机械强度的刚性基体结构<sup>[6]</sup>, 然而以上材料也存在负载量低、易染菌酸败的缺陷, 仍需进一步完善。笔者首次以经环氧氯丙烷改性的低密度聚丙烯无纺布为载体, 将包埋有酵母的壳聚糖溶液使用木质素磺酸钠交联固定在改性无纺布上, 发现该载体具有微生物负载量大、机械强度高、性能稳定的特点, 用于糖蜜酒精发酵, 发酵过程彻底、速率快、残糖

收稿日期: 2008-09-22

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

作者简介: 郑春明(1979-), 男, 博士生, 助理研究员, 主要从事生物材料合成及应用研究, 0871-8023356; 关乃佳(1956-), 女, 教授, 博士生导师, 主要研究方向为物理化学与材料物理与化学, 022-23500341。

水平低,原料利用率和发酵醪乙醇浓度均超过传统工艺,是一种良好的生物催化剂固定化载体。

## 1 实验部分

### 1.1 主要实验材料

酿酒干酵母,广东丹宝利酵母有限公司;无纺布,深圳稳德福无纺布有限公司;壳聚糖,浙江金壳化工有限公司;环氧氯丙烷;木质素磺酸钠,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;其余试剂均为市售化学纯。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),其余营养盐添加量如文献[7]所示。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 环氧氯丙烷改性无纺布(CP-PPNW)的制备

取 40 g/m<sup>2</sup> 低密度(厚度 3 mm)聚丙烯无纺布(PPNW)40 g,浸泡于 6 mol/L NaOH 中 24 h,水洗后放入 3 mol/L HCl 中和 24 h 以洗涤除杂,再于 6 mol/L NaOH 溶液条件下加入 60 mL 环氧氯丙烷(CP),50℃下反应 3 h,40℃下反应 1 h,水洗后加入 3 mol/L HCl 中和至中性,得环氧氯丙烷改性无纺布载体,记为 CP-PPNW。

#### 1.2.2 酵母细胞在壳聚糖-环氧氯丙烷改性无纺布(CTS/CP-PPNW)载体上的固定化

将壳聚糖(CTS)2.5 g 放入 500 mL 0.085 mol/L 醋酸溶液中搅拌均匀,待 CTS 溶解后,使用 0.5 mol/L NaOH 调整溶液 pH 至 4.0。

将上述 CTS 溶液和酵母 1.0 g 混合搅拌均匀后,放入 CP-PPNW 充分浸渍,并去除载体表面多余的浸渍液,再将其放入 4℃ 0.2 mol/L 木质素磺酸钠溶液中交联 1 h,使用灭菌生理盐水清洗固定化酵母以除去多余的木质素磺酸钠溶液,重复冲洗 3~4 次,得物记为 CTS/CP-PPNW。

#### 1.2.3 固定化酵母初始包埋酵母菌数的选择

将酵母按不同初始包埋浓度分别加入壳聚糖溶液(500 mL)中,并按 1.2.2 过程所述制备固定化酵母。

#### 1.2.4 CTS/CP-PPNW 固定化酵母的发酵

批次发酵使用 2.5 L 柱状发酵罐,连续发酵使用 10 L 填充式生物反应器,发酵过程均参照文献[7]进行。

### 1.3 酵母包埋量、糖浓度、酒精含量的测定

酵母包埋量的测定如文献[8]所述。总糖、残糖含量用斐林试剂滴定,酒精含量用蒸馏酒精比重计法。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同固定化载体组分发酵性能与游离发酵的对比

为研究无纺布经环氧氯丙烷及壳聚糖改性前后酵母固定化性能的变化,将 PPNW、CP-PPNW、CTS/CP-PPNW 3 种载体发酵性能与游离发酵进行了对比,如表 1 所示。CTS/CP-PPNW 的固定化性能最好,这可能是由于酵母的固定化是改性无纺布交联与壳聚糖包埋的双重作用,固定化能力较单一组分改性进一步提高,增加了固定化酵母浓度,从而增强了发酵能力,降低了残糖浓度,提高了乙醇浓度<sup>[9]</sup>。

表 1 不同无纺布固定化载体发酵性能与游离发酵的比较

发酵介质	游离	PPNW	CP-PPNW	CTS/CP-PPNW
酵母浓度/10 <sup>8</sup> ·mL <sup>-1</sup>	1.6	0.8	23	37
乙醇质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	70.4	68.8	74.4	78.2
发酵时间/h	42	53	14	10.5
残糖质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	28	26.1	13.5	12.8

### 2.2 CTS/CP-PPNW 固定化酵母不同实验条件对发酵性能的影响

CTS/CP-PPNW 固定化酵母比游离酵母发酵具有明显优势,既利用了改性无纺布良好的机械性能和通透性,延长了固定化酵母使用寿命,又发挥了壳聚糖对酵母优良的包埋亲和性。为了优化 CTS/CP-PPNW 固定化酵母的发酵性能,以甘蔗废糖蜜为原料,对固定化酵母形状、初始包埋菌数和填充率对发酵性能的影响进行了研究。

表 2 为不同形状 CTS/CP-PPNW 固定化酵母对发酵性能的影响。无纺布分为膜状(膜厚 3 mm)和块状立方体(边长为 3 mm)2 种。由表 2 看出,膜状在酒精发酵各项指标上均优于块状立方体,而二者固定化菌数差别不大。根据文献报道<sup>[7,10]</sup>,固定化材料以块状最为普遍,但由于流体压力作用,会造成粒子变形,粒子间过多接触,粒间空隙率和粒子传质面积下降,同时发酵液流动混乱,杂质更易吸附于块状载体表面,使其表面利用率低,发酵能力下降。为避免上述块状载体的弊端,故选择膜状构型。

表 2 形状对 CTS/CP-PPNW 固定化酵母发酵性能的影响

固定化材料形状	酵母浓度/10 <sup>8</sup> mL <sup>-1</sup>	乙醇质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	发酵时间/h	残糖质量浓度/g·L <sup>-1</sup>
膜状	37	78.2	10.5	12.8
块状	32	70.2	12.5	17.5

不同初始包埋菌量 CTS/CP-PPNW 固定化酵母的发酵性能如表 3 所示。从表 3 可以得出,材料内初始包埋菌量越大,增殖后载体内酵母浓度越高,发酵速度越快,而酒精浓度则出现略微上升的趋势,这可能是由于发酵彻底,残糖低及固定化酵母发酵节省了一部分酵母增殖所需糖分,从而提高了乙醇浓度。综合考虑,选择材料最佳初始包埋菌数为  $3.5 \times 10^8/\text{mL}$ 。

表 3 初始酵母浓度对 CTS/CP-PPNW 固定化酵母发酵性能的影响

初始酵母浓度/ $10^8 \text{ mL}^{-1}$	0.12	0.56	3.50
增殖酵母浓度/ $10^8 \text{ mL}^{-1}$	1.0	4.9	37.0
增殖酵母存活率/%	68	86	82
发酵时间/h	43.0	28.5	10.5
乙醇质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	72.8	75.6	78.2
载体乙醇产率/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	10.8	22.1	62.1

载体填充率与发酵系统的生产强度密切相关,不同填充率对 CTS/CP-PPNW 固定化酵母发酵性能的对比结果如表 4 所示。

表 4 不同填充率对 CTS/CP-PPNW 固定化酵母发酵性能的影响

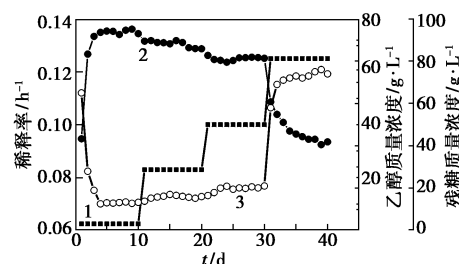
	填充率/%			
	9	12	15	18
乙醇质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	78.4	78.2	76.4	74.8
发酵时间/h	12.5	10.5	10.0	9.5
载体乙醇产率/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	69.7	62.1	50.9	43.5

由表 4 可以看出,填充率越大,酵母含量越多,发酵速度越快,但是用于酵母生长、繁殖的糖量也越多,酒精浓度则随填充率的增加而出现降低的趋势,不能单纯用提高填充率的方法提高燃料乙醇生产强度,选择填充率既要考虑发酵速度又要考虑酒精转化率<sup>[11]</sup>,故填充率选择为 12%。

### 2.3 CTS/CP-PPNW 固定化酵母发酵稳定性实验

图 1 为 CTS/CP-PPNW 固定化酵母连续流动发酵实验图。随着连续流动发酵稀释率升高,成熟醪平均乙醇浓度不断降低。当稀释率为 0.100/h,载体乙醇产率最大,为  $54.1 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{h})$ ,但残糖浓度较高。材料在 40 d 运行过程中没有破损,且稀释率增加时,生物质浓度变化幅度较小,说明发酵体系具有较好的操作稳定性<sup>[12]</sup>。发酵过程中,有大量  $\text{CO}_2$  产生,但尚未破坏发酵体系的平衡。固定化酵母包裹生物膜,发酵醪酸败污染的情况也没有出现。这可

能是由于高的酵母浓度导致酵母在载体中占据优势,且乙醇的生产也抑制了杂菌的生长<sup>[13]</sup>。



1—稀释率;2—乙醇质量浓度;3—残糖质量浓度

图 1 CTS/CP-PPNW 材料的连续流动发酵实验

## 3 结语

首次制备了环氧氯丙烷改性无纺布-壳聚糖固定化酵母(CTS/CP-PPNW)。它对甘蔗废糖蜜乙醇发酵具有速率快,残糖水平低,原料利用率和发酵醪乙醇浓度均超过传统工艺的特点。批式发酵中,在初始糖质量浓度  $167 \text{ g/L}$ 、填充率 12%、pH 4.0、温度  $34^\circ\text{C}$  情况下,发酵成熟醪酒精质量浓度达  $78.2 \text{ g/L}$ 、残糖质量浓度  $12.8 \text{ g/L}$ 、发酵周期 10.5 h。连续流动发酵实验中,材料连续使用 40 d 没有破损,乙醇质量浓度平均为  $75.1 \text{ g/L}$ ,显示了良好的操作稳定性和产业化实用性。

## 参考文献

- [1] 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(10):81-84.
- [2] 高寿清.国外燃料乙醇发展趋势[J].食品与发酵工业,2000,27(12):59-62.
- [3] 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(5):118-121.
- [4] Chum H L, Overend R P. Biomass and renewable fuels[J]. Fuel Processing Tech, 2001, 71(1/2/3):187-195.
- [5] 汪东武,王治业,彭章普,等.固定化酵母在甘蔗糖蜜酒精发酵中的问题探讨[J].甘肃科学学报,2006,18(1):64-65.
- [6] Chen K S, Ku Y A, Lee C H, et al. Immobilization of chitosan gel with cross-linking reagent on PNIPAAm gel/PP nonwoven composites surface[J]. Materials Science and Engineering C, 2005, 25(4):472-478.
- [7] 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:第三报.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.
- [8] Li X. 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.
- [9] 广东省微生物研究所.一种酵母固定化载体和制造方法:中国,1114983A[P].1996-01-17.

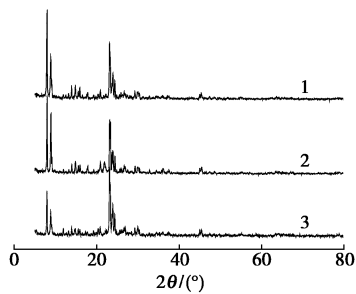
(下转第 56 页)

连接管路全部加热并保温在 160℃ 以上,使所有产物气化进入色谱,经自动六通阀切换进行色谱采样。

马尔文粒度仪分析表明,所用 ZSM-5 的颗粒度平均值在 10 μm 左右,在这样小的催化剂上基本可以排除催化剂的内扩散影响。本实验中在 350 ~ 550℃ 的温度范围内,TCD 谱图不出现甲醇、二甲醚以及 CO 和 CO<sub>2</sub> 峰,说明在所有实验条件下甲醇都完全转化,而催化剂的积碳量在短时间的反应中一般都较小,可认为甲醇在 Ag/ZSM5 催化剂上全部转化为烃类和水。

## 2 结果与分析

图 1 为不同 Si/Al 比的 ZSM-5 分子筛负载 Ag 后的 XRD 谱。随着硅铝比不同,2θ 为 8° 左右的峰与 25° 的峰的峰强度比值发生变化。但这些峰均为 ZSM-5 分子筛的特征峰,谱图并没有发现 Ag<sub>2</sub>O 晶相存在,说明浸渍过程中 Ag 离子以很小的颗粒 (< 3 nm 的 XRD 检测限)或单分散于 ZSM-5 载体上。同时 45° 左右的峰信息对比说明,在 Ag 担载量相同的情况下,本方法不对 ZSM-5 分子筛的骨架结构产生影响。



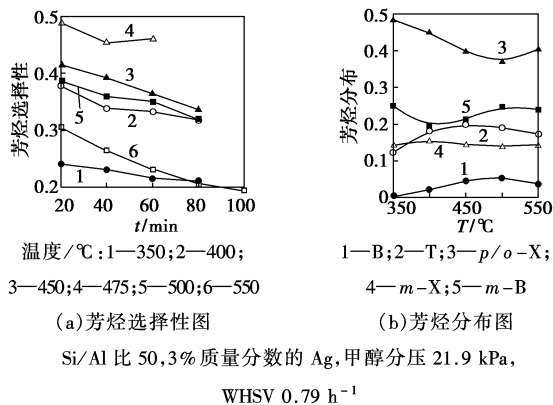
Si/Al 比: 1—25; 2—50; 3—150

图 1 Ag/ZSM-5 (Ag 质量分数 3%) 的 XRD 图

### 2.1 温度对甲醇芳构化反应影响

如图 2(a) 所示,芳烃的选择性首先随着反应温度的升高而升高,到 475℃ 时达到最大值,此时初始的芳烃选择性约为 50%。说明在较高的温度下,催化剂才有足够的活性分解甲醇及生成芳烃。在此过程中发生的主要是小分子烃类齐聚、环化进而芳构化。但是进一步升高反应温度,芳烃的选择性大幅

度下降。由于在 500 ~ 550℃ 下没有检测到 CO 与 CO<sub>2</sub>,说明此时主要进行的副反应可能为芳烃生成后的进一步脱氢碳化。而积碳失活导致 550℃ 时芳烃的选择性下降速率最大。在负载 Zn 的催化剂上也发现类似现象,且催化剂的失活更加严重<sup>[3]</sup>。



(a) 芳烃选择性图

(b) 芳烃分布图

Si/Al 比 50, 3% 质量分数的 Ag, 甲醇分压 21.9 kPa, WHSV 0.79 h<sup>-1</sup>

图 2 不同温度下的芳烃选择性和分布图

如图 2(b) 所示,不同温度下芳烃的分布有所不同。在全部温度范围内,对/邻二甲苯 (*p/o-X*) 的选择性始终最高,苯的选择性始终最低。这是由于甲醇烷基化能力较强,很容易通过亲电攻击加成到苯环等富电子体系当中,所以在甲醇芳构化过程中,生成的芳烃会与未反应的甲醇发生烷基化反应形成二甲苯与多甲基苯 (*m-B*)。相比较而言,多甲基苯的含量是对/邻-二甲苯的一半左右,二甲苯 (*m-X*, *p/o-X*) 在芳烃中的总选择性为 60% ~ 73%。这是由于 ZSM-5 分子筛具有一定的择形作用,分子动力学直径小于二甲苯的分子可方便地从分子筛晶穴扩散出来,从而优先生成。但随着温度的升高,二甲苯脱甲基的速率加快,所以二甲苯含量显著减少,而苯与甲苯含量有一定的提高。多甲基苯的选择性与温度关系不大,说明多甲基苯比二甲基苯具有一定的稳定性,且其主要生成途径由轻质芳烃的甲醇烷基化反应而来。

### 2.2 分子筛硅铝比对芳烃选择性影响

图 3 表明不同酸性的 ZSM-5 对甲醇芳构化反应的选择性有很大影响。随着硅铝比的降低,芳烃选择性升高。由于烃类的芳构化需要强酸性催化剂

(上接第 54 页)

[10] 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.  
 [11] 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.

[12] 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.  
 [13] Najafpour G, Younesi H, Ku S, et al. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Bioresour Technol, 2004, 92(3): 251 - 260. ■