

学校代码：10251

学号：

華東理工大學

工程硕士学位论文

论文题目

工程领域

研究方向

论文作者

学校导师

企业导师

定稿时间： 年 月 日

分类号: 一定要写出 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学 硕士专业学位论文

指导教师姓名: _____

申请学位级别: _____ 专业名称: _____

论文定稿日期: _____ 论文答辩日期: _____

学位授予单位: _____

学位授予日期: _____

答辩委员会主席:

评 阅 人:

作者声明

我郑重声明：本人恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的结果。除文中明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何他人已经发表或撰写过的内容。论文为本人亲自撰写，并对所写内容负责。

论文作者签名：

年 月 日

玉米芯残渣原料发酵生产手性乳酸的研究

摘要

玉米芯残渣是以玉米芯为原料生产木糖醇过程中产生的富含纤维素的固体工业废渣。高光学纯度的乳酸因其作为生物降解材料聚乳酸 (PLA) 单体的应用, 受到越来越多的关注。本文对使用玉米芯残渣原料生产手性乳酸的过程进行了研究。首先研究了酶用量及固含量玉米芯残渣的酶解性能的影响, 葡萄糖浓度随着酶用量及固含量的增加而增加, 得率也是随酶用量的增加而增加, 随固含量的增加而降低, 最后酶用量确定为 15FPU/gDM; 在 10% 固含量下, 对片球乳酸菌 *Pediococcus acidilactici* DQ2 的 SSF 生产乳酸工艺条件进行了优化, 确定最优条件为温度 45°C、pH5.5, 可以不进行预糖化的条件下完成; 尝试用廉价的玉米浆代替营养盐组分中昂贵的酵母粉, 1/L 玉米浆可以代替 1/L 酵母粉和 1/L 蛋白胨, 降低了 98% 的蛋白胨成本。在最优条件下, 10% 固含量 SSF 可以获得 43.11g/L 乳酸, 产率为 0.90g/l/h, 得率为 73.4%。

为了提高所产乳酸的纯度, 通过基因工程改造获得产高光学纯度 L-乳酸的 *P. Acidilactici* TY112 以及产高光学纯度 D-乳酸的 *P. acidilactici* ZP26, 比较了原始菌株 *P. acidilactici* DQ2 与两株工程菌在合成培养基、玉米芯残渣水解液、玉米芯残渣 SSF 体系中的乳酸发酵性能。实验结果表明, 三株菌在初糖浓度为 50g/L 的合成培养基中的葡萄糖消耗及乳酸生成速率大致相当, 发酵 48h 可以完全消耗 43g/L 葡萄糖, 产生 36g/L 左右乳酸; 以 5% 玉米芯残渣水解液为原料, 在 37、40、42、45、48、50°C 6 个温度条件下进行了三株菌的乳酸发酵, DQ2 及 TY112 在 6 个温度条件下的乳酸产率及得率差异不大, 最优温度为 42°C, 该条件下低温条件下两株菌的乳酸得率为 86% 左右, 产率为 1.2g/l/h 左右。ZP26 的最大乳酸产率为 0.97g/l/h, 稍低于 DQ2 和 TY112; 进一步增加水解液固含量到 10、15%, 10% 固含量下, ZP26 的乳酸产量比 DQ2 和 TY112 低了 25%, 15% 固含量下, 三株菌的乳酸产量一致。SSF 体系中, ZP26 与 TY112 及 DQ2 乳酸产量的差异缩小了, 15% 固含量 SSF, ZP26 的乳酸产量比 TY112 及 DQ2 低了 4%。对比分析 SHF 及 SSF 实验结果, 乳酸片球菌更适用 SSF 模式。对其原因进行了探索, 发现纤维素酶对乳酸发酵起到了促进作用。

上述研究结果表明玉米芯残渣体系并不适合营养要求较高的乳酸片球菌, 因此选择另一株生产高纯度 L-乳酸且营养要求较低的菌株-凝结芽孢杆菌 B179 进行了研究, 发现该菌株只有在 pH7.0 的条件下才能实现高产率的乳酸生产, 不适用 SSF, 因此在 pH5.5 的玉米芯残渣水解液中对其进行了长期驯化, 驯化 93 次后获得的驯化菌株可以利用高固含量的玉米芯残渣水解液。

关键词: 乳酸片球菌; 玉米芯残渣; 乳酸; 高光学纯度

Study on production of chiral lactic acids from corncob residues feedstock

Abstract

Corn cob residues are abundant and high-cellulose content lignocellulosic materials from the xylitol production industries. Optically pure lactic acid has attracted more and more attentions due to its high potential for applications for polylactide acid (PLA) production. In this study, firstly, we investigated the effect of enzyme dosage and solid concentration on enzymatic hydrolysis of corncob residues, then optimized the simultaneous saccharification and fermentation conditions for lactic acid production using corncob residues and tried to replace the expensive nutrient component yeast extract with cheap corn steep liquor to lower the lactic acid production cost. The results showed that 43.11 g/L lactic acid was obtained at 10% solids loading (w/w) with the lactic acid yield and productivity of 73.4% and 0.90 g/L/hour, respectively. 30 g/L of corn steep liquor could compete with 10 g/L yeast extract for lactic acid production, while the nutrient cost for unit lactic acid produced was only 2% of that using yeast extract.

Two engineered strains, L-lactic acid producing *P. acidilactici* TY112 and D-lactic acid producing *P. acidilactici* ZP26, were used for L- or D-lactic acid production using corncob residues. The results showed that the lactic acid production of these strains in M-MRS medium was similar. Then, in corncob residues hydrolysate, the lactic acid production of ZP26 was lower than DQ2 and TY112 at the low solid loading. In SSF mode, the lactic acid production of ZP26 was lower than DQ2 and TY112 at 10 and 15% solid loading. The results show that the SSF mode was more suitable for *Pediococcus* strains.

Finally, *Bacillus coagulans* B179 for production of high optical purity L-lactic acid was studied. This strain produced lactic acid efficiently only at pH7.0, thus long-time domestication of B179 was carried out in corncob residues hydrolysates at pH 5.5. After 93 times transfer, the strain could use high solid loading hydrolysates was obtained.

Keywords: corncob residues; *Pediococcus acidilactici* DQ2; lactic acid; high optical purity

目录

第 1 章 文献综述.....	1
1.1 利用木质纤维素原料生产乳酸的必要性.....	1
1.2 生物转化木质纤维素生产乳酸.....	1
1.3 生物转化玉米芯工业残渣生产乳酸.....	3
1.3.1 玉米芯残渣的利用.....	3
1.3.2 玉米芯残渣的生物转化.....	4
1.3.3 生物转化玉米芯残渣的优势.....	4
1.4 乳酸生产菌株.....	5
1.3.1 细菌.....	5
1.3.2 霉菌.....	7
1.5 木质纤维素乳酸发酵的限制因素.....	8
1.6 课题研究内容及意义.....	10
第 2 章 利用玉米芯残渣生产乳酸.....	11
2.1 前言.....	11
2.2 实验材料.....	12
2.2.1 试剂和实验仪器.....	12
2.2.2 菌种及培养.....	13
2.2.3 原料与酶制剂.....	13
2.2.4 培养基.....	13
2.3 实验方法.....	13
2.3.1 玉米芯残渣酶解性能测定.....	13
2.3.2 同步糖化与发酵 (SSF) 玉米芯工业残渣生产乳酸- <i>P.acidilactici</i> DQ2.....	14
2.3.3 玉米浆对玉米芯工业残渣同步糖化与发酵生产乳酸的影响.....	14
2.3.4 合成培养基中生长及乳酸发酵的对比.....	14
2.3.5 玉米芯残渣水解液的制备.....	14
2.3.6 同步糖化与发酵 (SSF) 玉米芯工业残渣生产乳酸- TY112 及 ZP26.....	14
2.4 分析方法.....	14
2.4.1 玉米芯工业残渣组分测定.....	14
2.4.2 各种单糖和乳酸浓度测定.....	15
2.4.3 乳酸构型测定.....	15
2.4.4 玉米芯工业残渣总酚含量的测定.....	16
2.4.5 乳酸得率的计算.....	16
2.4.6 纤维素酶活测定.....	16
第 3 章 实验结果与讨论.....	17

3.1 玉米芯工业残渣的酶解性能.....	17
3.2 利用乳酸片球菌 <i>Pediococcus acidilactici</i> DQ2 对玉米芯工业残渣进行同步糖化与发酵 (SSF) 生产乳酸.....	18
3.2.1 同步糖化与发酵生产乳酸工艺的优化.....	18
3.2.2 玉米浆对玉米芯工业残渣同步糖化与发酵生产乳酸的影响.....	19
3.3 乳酸片球菌 <i>Pediococcus acidilactici</i> DQ2 及其工程菌 <i>Pediococcus acidilactici</i> TY112 和 <i>Pediococcus acidilactici</i> ZP26 的发酵性能对比.....	21
3.3.1 工程菌 <i>Pediococcus acidilactici</i> TY112 和 <i>Pediococcus acidilactici</i> ZP26 的来源 ..	21
3.3.2 乳酸片球菌 <i>Pediococcus acidilactici</i> DQ2 及其工程菌在合成培养基中的生长和发酵.....	22
3.3.3 乳酸片球菌在玉米芯工业残渣酶解液中的发酵性能.....	23
3.4 乳酸片球菌同步糖化与发酵玉米芯工业残渣的性能.....	28
3.4.1 温度条件优化.....	28
3.4.2 不同固含量的影响.....	31
3.5 SHF 与 SSF 差异原因探索.....	34
3.6 凝结芽孢杆菌 B179 的乳酸发酵.....	37
3.6.1 生长曲线.....	37
3.6.2 不同初糖浓度的影响.....	38
3.6.3 玉米芯工业残渣水解液中的生长曲线.....	38
3.6.4 pH 对乳酸发酵的影响.....	38
3.6.5 B179 的长期驯化实验.....	40
第 4 章 结论和展望.....	41
参考文献.....	43
致谢.....	48

第 1 章 文献综述

1.1 利用木质纤维素原料生产乳酸的必要性

乳酸是一种多用途的精细化学品, 广泛应用于药品、食品和化妆品生产中^[1]。目前, 乳酸作为生物降解材料聚乳酸单体的应用受到了越来越多的关注。聚乳酸作为医药及生物材料获得了相当多的应用, 如手术缝合线、药物缓释、骨科植入物、一次性产品等等, 可以有效减轻废物处理难题^[2]。乳酸有 L-乳酸及 D-乳酸两种同分异构体。高光学纯度的乳酸比乳酸混合物更有价值, L-乳酸可用于合成聚 L 乳酸, D-乳酸可用于合成聚 D 乳酸, 而 D、L 乳酸聚合而成的聚乳酸是不定形聚合物^[3]。聚 L-乳酸(PLLA)和聚 D-乳酸(PDLA)的立体复合物可以使其熔化温度较 PLLA 和 PDLA 提高 50°C^[1]。

乳酸的需求量每年以5-8%的速率不断增长^[4], 同时PLA的需求量也在不断增加, 然而乳酸单体的高生产成本限制了PLA的生产能力, 导致其仅为45万吨/年, 远远落后于年产2亿吨的塑料生产^[5]。为了实现作为PLA单体的应用及产业化, 乳酸的生产成本必须控制在0.8美元/Kg以下, 使得PLA的售价降低到现在价格的一半, 可以和石油基塑料进行竞争^[5]。乳酸可以通过化学合成及发酵两种途径获得。与化学合成相比, 发酵的条件更温和, 获得的乳酸光学纯度高, 因此90%的乳酸生产采用的是发酵工艺。为此, 近年来许多研究者致力于从生产菌株、发酵底物及发酵模式三个方面提高乳酸生产工艺效率。

原料成本是构成乳酸生产成本的要素。淀粉、糖及粮食作物是传统的乳酸生产原料, 是目前工业规模乳酸发酵主要的原料。但是淀粉、糖及食用作物的原料成本较高, 而且存在与人争粮的问题。另外, 原料成本并不会随着生产规模的扩大而降低, 因此目前大量的研究致力于寻找新的低成本原料。木质纤维素因其原料丰富、可再生等优点受到越来越多的关注。全球每年可以产生200亿吨植物生物质, 90%是木质纤维素, 其中的8-20亿吨是可利用的^[6]。利用木质纤维素生产乳酸可以解决众多环境问题, 且不会影响粮食安全。

1.2 生物转化木质纤维素生产乳酸

木质纤维素原料种类繁多, 包括林业及农作物废渣、城市固体废弃物、废纸及木头等。玉米芯工业残渣也是其中一种。

木质纤维素生物质主要由半纤维素(包含木聚糖、甘露聚糖及葡聚糖的非纤维素多糖)、纤维素(β -1, 4-葡聚糖组成的不溶性纤维)和木质素(复杂的多酚结构)构成^[7-8]。不同生物质中纤维素、木质素及半纤维素的含量各有差异。如软木木材中纤维素及半纤维素的总含量比硬木的低, 而木质素含量要比硬木高8%^[9], 因此选择乳酸发酵原料时需考量生物质各组分含量。

木质纤维素在细胞壁中的构型如图1.1^[10]所示, 纤维素、木质素、半纤维素相互缠绕在一起, 结构坚固, 可以有效抵抗水解作用。纤维素是D-葡萄糖以 β -1, 4糖苷键连接组成的同元多糖。连接的定向及氢键使得聚合物坚硬且难以打破。半纤维素是由戊糖(木

糖和阿拉伯糖)、己糖(半乳糖、葡萄糖和甘露糖)以及酸糖组成的短链分支状异源聚合物^[11]。半纤维素的分支不定型结构特性使得它比纤维素更易水解。软木的主要半纤维素糖类是甘露糖,而硬木和农业废渣的主要半纤维素糖类是木糖^[12]。木质素是苯基丙烷单元聚合而成的芳族聚合物。木质素可以帮助生物质抵抗化学和生物降解,因此很难用作发酵底物^[12]。

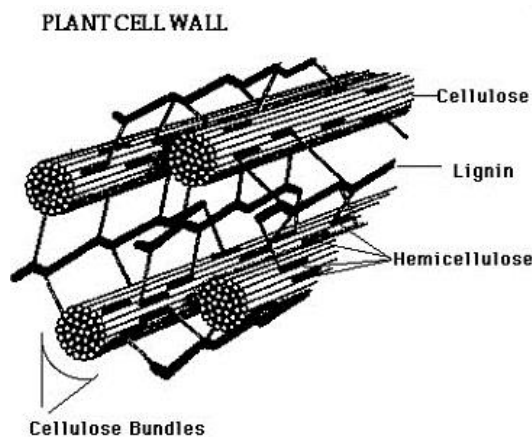


图1.1 木质纤维素的结构

Fig. 1.1 The structure of lignocellulose

尽管木质纤维素原料具有可持续性和可再生的优点,但是因其复杂性,应用于工业规模的乳酸生产还是困难重重。木质纤维素的生物转化需经过几个工序,将结构性碳水化合物转化为单糖,如葡萄糖、木糖、阿拉伯糖以及甘露糖,这些单糖再被乳酸生产菌株利用转化为乳酸。如图1.2所示,利用木质纤维素生产乳酸的工艺主要分为4个步骤:预处理-打破木质纤维素的结构;酶水解-木质纤维素在水解酶作用下分解为可发酵糖,如葡萄糖、木糖;发酵-乳酸生产菌株将糖类代谢为乳酸;乳酸的分离与纯化-对乳酸进行纯化,使其符合商业应用标准。

木质纤维素中纤维素、半纤维素与木质素结合紧密,能有效抵抗酶的降解^[13]。因此,需对其进行预处理,去除木质素,破坏纤维素和半纤维素的连接,增加酶可接触的面积,从而提高酶解效率^[14]。预处理方法包括物理方法(机械粉碎和微波处理法),化学方法(碱、稀酸、氧化剂和有机溶剂),综合法(蒸汽爆破法、氨和CO₂爆破处理)。实际生产中可以多种预处理方法组合使用。预处理工艺是木质纤维素生物转化的关键步骤。如果预处理不充分,得到的残余物不易被水解酶糖化,如果强度太强,产生的有毒化合物会抑制微生物的代谢和生长^[15]。

因此,如乳酸生产菌株不能耐受预处理后原料中的抑制物,还需对原料进行脱毒。常用的脱毒方法有物理法(水洗、活性炭吸附、溶剂萃取)、化学法(加入过量的固体Ca(OH)₂)和生物法(漆酶、利用抑制物的霉菌)^[16]。但是脱毒工艺的引入势必增加总的操作时间及生产成本。

纤维素乳酸的发酵主要有同步糖化发酵(SSF)与分步糖化发酵(SHF)两种工艺。SSF就是纤维素的糖化与乳酸发酵同时进行,菌体可以及时利用酶解获得的糖类,消除底物的反馈抑制,提高发酵效率。SSF具有简化乳酸生产工艺、减少设备、缩短生产周

期等优点，缺点是酶解和发酵的温度、pH 等条件不能协调控制，对菌种的要求较高。因此，为了兼顾糖化与发酵不同的条件，一般会对温度、pH 等条件进行优化，以获得更高的乳酸产率及得率。SHF 是先对纤维素原料进行水解，然后再进行发酵，优点是酶解和发酵可以分别在最优条件下进行，水解较完全，缺点是生产周期长、水解时产物对酶的抑制和发酵时高浓度糖的抑制。目前，纤维素乳酸生产的趋势是采用 SSF 模式。

传统的乳酸分离纯化方法，是先加入碳酸钙进行中和，然后经过过滤除菌、活性炭吸附脱色、蒸发、硫酸酸化等步骤获得乳酸和硫酸钙。进一步的纯化包括水解、酯化、精馏工艺。该方法的缺点是产生了大量硫酸钙，且硫酸的消耗量较大。近年来，还研究了其他的不产生硫酸钙的分离方法，如超滤、电渗析、纳滤、反应精馏等^[8]。与传统的分离方法相比，这些分离工艺具有能耗低、成本低的优点，此外，还有不需要能量密集型的相位变化、昂贵溶剂或吸附剂的优点，可以在分离的同时同步进行浓缩。

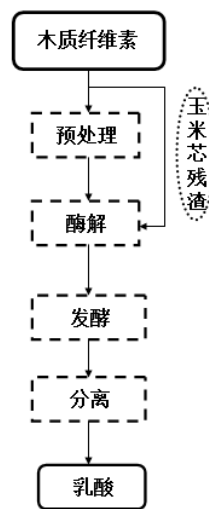


图1.2 纤维素乳酸生产工艺

Fig. 1.2 The process of cellulosic lactic acid production

1.3 生物转化玉米芯工业残渣生产乳酸

玉米芯工业残渣是利用玉米芯生产木糖（醇）及相关产品的过程中，将其半纤维组分酸解或酶解后剩余的固体残渣，主要成分为纤维素和木质素^[17]。生产 1 吨木糖可以产生 13-26 吨玉米芯工业残渣（含水量为 70-80%），我国的木糖（醇）相关企业每年大约产出 40-50 万吨的玉米芯工业残渣。玉米芯工业残渣含酸量高，如就地掩埋会对环境造成污染，因此合理利用玉米芯工业残渣就十分重要了。

1.3.1 玉米芯残渣的利用

目前玉米芯工业残渣的用途主要有以下几种：作为锅炉燃料直接燃烧、制作活性炭和乙酰丙酸、栽培食用菌等。朱锦明等^[18]研究了玉米芯残渣以硫酸和 ZSM-5 分子筛为催化计时转化为乙酰丙酸的产率，硫酸催化时的转化率为 35.97%，ZSM-5 分子筛为催化剂时的转化率为 27.61%。史秀丽等^[19]比较了用玉米芯残渣为原料的不同配方平菇菌丝生长情况及出菇时间、鲜菇产量以及经济效益。秦海青等经过反复试验确定了玉米芯残渣生产活性炭的最优工艺条件，并将活性炭用于水解液的脱色，有效降低了生产成本。

但是玉米芯残渣中纤维素含量较高,热值很低,并不利于焚烧,且含酸量高,极易造成锅炉腐蚀和空气污染。制作活性炭及乙酰丙酸的产品价值不高。因此还未实现玉米芯工业残渣的高效利用。

1.3.2 玉米芯残渣的生物转化

近年来,玉米芯工业残渣用于生物发酵的研究不断增多。Shen等^[17]使用一套装置将水解与发酵联合在一起,利用玉米芯残渣发酵生产乳酸。酶解过程在2L的罐中进行,酶用量为20FPA,与装有固定化纤维二糖酶的柱子连接在一起,有效消除纤维二糖的抑制作用,底物浓度为100g/L时,水解得率为82.5%。再与装有固定化德式乳杆菌细胞的柱子连接,就可进行乳酸的发酵。底物浓度为100g/L时,乳酸得率为92.4%,产率为0.938g/l·h。李秋园等^[20]研究了玉米芯残渣的酶水解及乙醇生产工艺,酿酒酵母利用10%固含量玉米芯残渣水解液,在pH5.0、32-34°C的条件下发酵36h,可以获得2.513%的乙醇。杜辉等^[21]以玉米芯工业残渣为原料,以米根霉LY-07为菌种,实现了乳酸和聚氨基葡萄糖的联产。

总体来说,关于玉米芯残渣发酵生产乳酸的研究远少于其他木质纤维素原料,由于原料的特殊性,国外研究的很少,主要是国内的研究。

王丽红^[22]采用分步糖化发酵模式利用玉米芯残渣发酵生产乳酸,先在pH4.8、50°C的条件下酶水解48h,获得葡萄糖浓度为41.76g/L的水解液。再以5:1比例混合的保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌为菌种进行乳酸发酵,条件为40°C,发酵32h获得2.12g/L乳酸。

孙甜甜^[23]采用SSF模式进行乳酸发酵,预糖化8h后接入*Bacillus coagulans* ID,发酵32h获得47g/L乳酸;Tang等^[24]以糠醛渣和玉米芯的混合物为原料,嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌为菌种,SSF获得40.74g/L乳酸,产率为0.34g/l/h,得率为0.87g/g。

1.3.3 生物转化玉米芯残渣的优势

相较于其他木质纤维素原料,玉米芯残渣具有以下优点:第一,不需要进行预处理。如图1.2所示,在以玉米秸秆、玉米芯、麦秆等农业废弃物及其他木质纤维素原料为原料进行乳酸发酵时,为了实现高效利用,都须对原料进行预处理。Cui等^[25]则将粉碎与碱法预处理相结合,对玉米秸秆原料进行了预处理。Zhao等^[26]同样采用多种预处理方法相结合的方法对玉米秸秆原料进行了处理,先对原料进行粉碎,然后在190°C、1.2MPa的高温高压下蒸汽爆破3min。虽然对各种预处理工艺进行了研究评价,但是预处理工艺应用本身就十分不利,会影响木质纤维素生物转化的经济性^[27]。预处理工艺成本较高,且会对酶水解及发酵工艺成本产生重要影响^[28]。而玉米芯工业残渣在酸性溶液中长时间蒸煮的过程中,经过长时间的高温酸水解,表面形成足够多的孔洞,已十分易于纤维素酶的吸附,已不需再进行预处理,有效节约了生产成本。

第二,不需要考虑五碳糖的利用。玉米芯残渣是玉米芯提取木糖后剩余的残渣,主要含纤维素和木质素,半纤维素含量较低。而其他木质纤维素原料的半纤维素组分含量都在20%以上,玉米芯的半纤维素含量为35%,玉米秸秆的半纤维素含量为26-31%,稻草的半纤维素的含量为25-50%^[8],因此这些原料酶解后五碳糖含量丰富。然而大多数乳

酸生产菌株都不利用五碳糖，即使可以利用，利用效率也不高，导致五碳糖的利用制约了纤维素乳酸生产的效益。

1.4 乳酸生产菌株

可用于木质纤维素乳酸生产的菌株多种多样，接着总结了近年来用于乳酸发酵的生产菌株。每种生物催化剂都较其他实现了一个或多个改进，如更广泛的底物范围、得率及产率的提高、营养需求较低，或者乳酸光学纯度的提高。发酵过程中菌体的混合培养可以实现多种代谢路径的组合，从而有效利用底物中的各个组份，提高乳酸产量。还可以采用基因工程方法提高菌体乳酸产量及光学纯度。

1.3.1 细菌

产乳酸细菌有野生型及工程菌株两种类型，乳酸菌、芽孢杆菌、大肠杆菌及谷氨酸棒杆菌都属于产乳酸细菌。细菌的乳酸发酵具有产生乳酸为D、L混合型乳酸，产生副产物、乳酸得率较低，营养要求较高，易感染噬菌体等缺点^[29-31]。许多研究致力于尝试各种方法克服这些代谢工程领域的难题：敲除D、L乳酸脱氢酶基因提高乳酸的光学纯度^[32]；敲除编码丙酮酸甲酸裂解酶（甲酸生成）、醇脱氢酶（乙醇生成）、乙酸激酶（乙酸生成）的基因，抑制副产物的生成，提高乳酸得率^[33]；开发新菌种，如可以利用合成培养基生产乳酸的大肠杆菌等等^[34]。

1.3.1.1 乳酸菌

乳酸菌是革兰氏阳性菌，可以通过糖酵解途径高得率高产率生产获得乳酸。各种乳酸菌的最适生长条件各不相同，在pH3.5-10.0，温度5-45°C的条件下可以生长。图1.2^[35]中显示的乳酸菌利用己糖和戊糖的代谢路径。根据获得的最终代谢产物，乳酸菌可以分为同型乳酸发酵及异型乳酸发酵菌。同型乳酸发酵菌拥有醛缩酶，主要的代谢产物是乳酸，因此适用于工业规模的乳酸生产。通常，乳球菌、链球菌、片球菌、肠球菌及一些乳酸杆菌属于同型乳酸发酵菌。异型乳酸发酵菌产生乳酸的同时还产生副产物，因此乳酸的最大得率仅为0.5g/g葡萄糖^[8]。明串球菌、酒球菌及一些乳酸杆菌属于异型乳酸发酵菌。

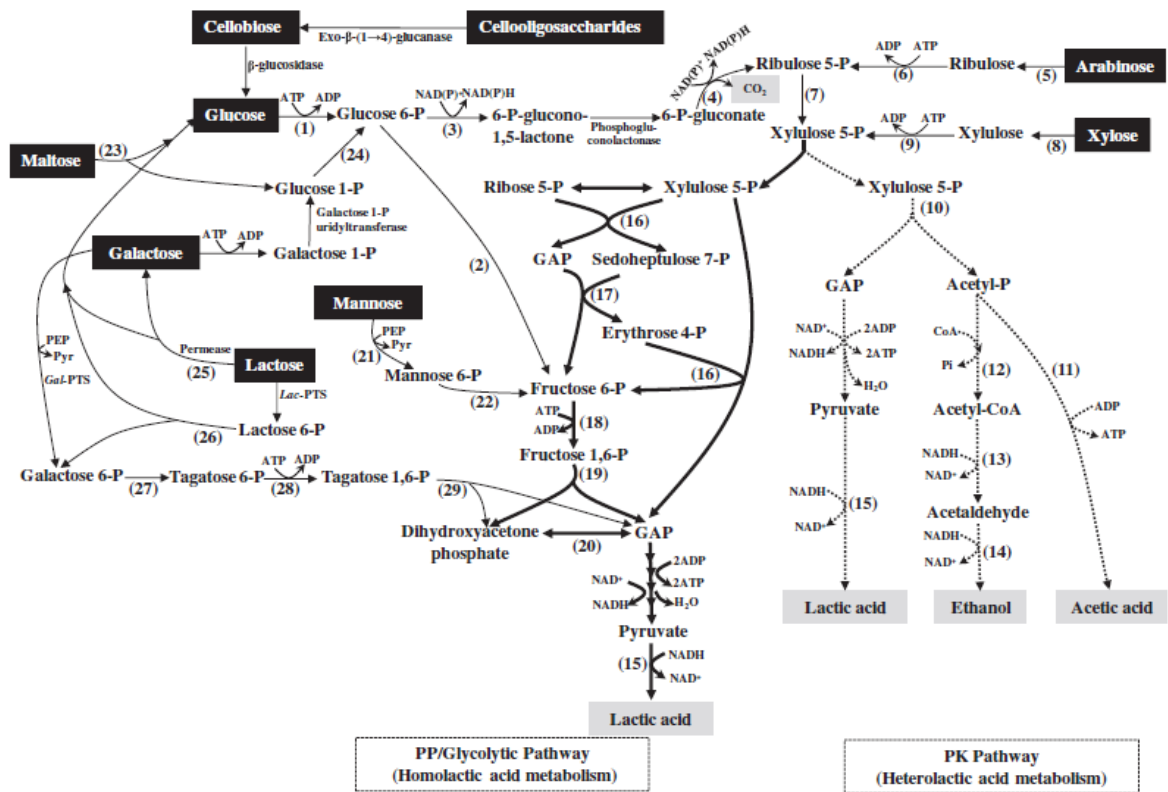


图1.2 乳酸菌糖代谢路径

酶: (1)己糖激酶; (2)葡萄糖-6-磷酸异构酶; (3)葡萄糖-6-磷酸脱氢酶; (4)6-磷酸葡糖酸脱氢酶; (5)阿拉伯糖异构酶; (6)核酮糖激酶; (7)核酮糖-5-磷酸-3-差向异构酶; (8)木糖异构酶; (9)木酮糖激酶; (10)磷酸转酮酶; (11)乙酸激酶; (12)磷酸转乙酰酶; (13)醛脱氢酶; (14)醇脱氢酶; (15)乳酸脱氢酶; (16)转酮醇酶; (17)转醛醇酶; (18)6-磷酸果糖激酶; (19)果糖二磷酸醛缩酶; (20)磷酸丙糖异构酶; (21)甘露糖磷酸转移酶系统; (22)磷酸甘露糖异构酶; (23)麦芽糖磷酸化酶; (24)葡萄糖磷酸变位酶; (25) β -半乳糖苷酶; (26) 磷酸- β -半乳糖苷酶; (27)半乳糖-6-磷酸异构酶; (28)塔格糖-6-磷酸激酶; (29)塔格糖-1,6-二磷酸醛缩酶。实线显示的是同型乳酸发酵路径。粗实线和虚线分别表示的是PP/糖酵解途径和PK途径。Lac-PTS:磷酸烯醇丙酮酸-乳糖 磷酸转移酶系统

Fig.1.2 Metabolic pathways for lactic acid production from various sugars by LAB.

Enzymes: (1) hexokinase; (2) glucose 6-phosphate isomerase; (3) glucose 6-phosphate dehydrogenase; (4) 6-phosphogluconate dehydrogenase; (5) arabinose isomerase; (6) ribulokinase; (7) ribulose 5-phosphate 3-epimerase; (8) xylose isomerase; (9) xylulokinase; (10) phosphoketolase; (11)acetate kinase; (12) phosphotransacetylase; (13) aldehyde dehydrogenase; (14) alcohol dehydrogenase; (15) lactate dehydrogenase; (16) transketolase; (17) transaldolase; (18) 6-phosphofructokinase; (19) fructose bisphosphate aldolase; (20) triosephosphate isomerase; (21) mannose phosphotransferase system; (22) phosphomannose isomerase (23) maltose phosphorylase; (24) phosphoglucomutase ; (25) β -galactosidase; (26) phospho- β -galactosidase; (27) galactose 6-phosphate isomerase; (28) tagatose 6-phosphate kinase; and (29) tagatose 1,6-diphosphate aldolase. Solid lines indicate the homofermentative pathway. Thick-solid lines and dashed lines indicate PP/glycolytic pathway and PK pathway, respectively. Lac-PTS: phosphoenolpyruvate-lactose phosphotransferase system.

以乳酸菌为菌种进行的乳酸发酵具有产率高、得率高等优点,然而大多数乳酸菌缺乏许多生物合成能力,导致其生长需要丰富的营养,如氨基酸、肽、核苷酸、维生素等,这提高了乳酸回收的难度及生产成本^[30,31,36]。

1.3.1.2 芽孢杆菌

近年来,芽孢杆菌-包括 *Bacillus coagulans*、*Bacillus subtilis*、*Bacillus stearothermophilus*, 用于乳酸发酵生产受到了越来越多关注。与乳酸菌相比较,芽孢杆

菌的乳酸生产具有许多优势：芽孢杆菌可以在含有少量氮源的无机盐培养基中生长发酵生产乳酸，Wang 等^[37]人从土壤中筛选获得的 *Bacillus licheniformis* BL1 可以在 50 °C 条件下利用无机盐培养基中的 150g/L 葡萄糖生产乳酸，产率为 0.7 g/L h；嗜碱菌种，如 Meng 等^[38]人筛选得到的 *Bacillus sp.* WL-S20 菌株，该菌株可以在 pH 9.0 的条件下，分批补料发酵获得 225g/L 乳酸，得率为 0.993g/g，可以降低染菌的风险；芽孢杆菌可以在高温条件下生产乳酸（≥50°C）。芽孢杆菌的这些优点可以降低冷却水成本，确保木质纤维素的 SSF 在最适温度下进行^[29,39-41]，且可以在高于 40 °C 的温度下进行不灭菌的开放式发酵^[42]。Ouyang 等^[43]人研究 *Bacillus coagulans* NL01 利用生物质来源的木糖在不灭菌的条件下进行的乳酸发酵。玉米秸秆水解液的初始糖浓度为 25.45g/L，该菌种发酵 48h 可以生成 18.2g/L 乳酸，并且可以同步利用葡萄糖、木糖和阿拉伯糖。此外，芽孢杆菌可以利用木质纤维素中的六碳糖及五碳糖生产乳酸。Patel 等^[41]的研究表明，*Bacillus coagulans* 36D1 可以通过磷酸戊糖途径以 1g/g 糖的高得率利用五碳糖获得乳酸。

1.3.1.3 大肠杆菌

大肠杆菌可以快速代谢己糖和戊糖，营养要求低，且易进行基因操作，因此当前有许多研究是关于大肠杆菌为工程菌株的乳酸发酵。野生型大肠杆菌的代谢产物一般是乙醇和几种有机酸（乳酸、乙酸、琥珀酸和甲酸）的混合物^[44]。为了提高乳酸产量，需对其进行代谢工程领域的改造^[44]。*E.coli* SZ63的4个基因发生了突变—丙酮酸甲酸裂解酶(pflB)、乙酸激酶(ackA)、醇脱氢酶(adhE)和延胡索酸还原酶(frdBC)，副产物的生成受到抑制，可以以高得率生产D-乳酸。Zhou等^[45]用*Pediococcus acidilactici*中的L-乳酸脱氢酶基因部分代替SZ63的D-乳酸脱氢酶基因，获得了SZ79菌株，驯化筛选得到SZ85菌株，SZ85在M9无机盐培养基中利用葡萄糖或木糖发酵乳酸的得率可以达到93-95%，纯度为98%（基于总的发酵产物），光学纯度大于99%。然而大肠杆菌工程菌株的乳酸产率（≤1.04g/l/h）、产量（≤62.5g/L）、乳酸耐受度明显低于乳酸菌和芽孢杆菌^[44]。因此，当前主要要解决的难题是利用便宜的资源实现高效率的乳酸生产。

1.3.1.4 谷氨酸棒状杆菌

谷氨酸棒状杆菌是好氧细菌，为革兰氏阳性，生长快速，无芽孢，不运动，可以在氧受限条件下可以释放少量有机酸^[46]。据报道，一些谷氨酸棒状杆菌工程菌株可以在缺氧条件下利用各种糖类，如L-阿拉伯糖、D-葡萄糖、D-木糖，生产混合酸（乳酸、琥珀酸和乙酸）^[47-48]。Jia等^[49]人对谷氨酸棒杆菌进行了基因改造—敲除L-乳酸脱氢酶基因并异源表达来自保加利亚乳杆菌的D-乳酸脱氢酶基因，获得*Corynebacterium glutamicum* Res167菌株。该工程菌株发酵16h可以获得17.9g/L的D-乳酸（光学纯度>99.9%），且乳酸产量比亲本株提高了32.3%。

1.3.2 霉菌

根霉属，特别是米根霉用于生产高纯度L-乳酸也获得了许多关注^[50-51]。与乳酸菌相比，米根霉具有一定优势：米根霉对营养要求简单，可有效降低生产成本^[52]；米根霉丝状或小球形态，使得其比细菌和酵母更易从发酵液中分离，从而降低分离工序成本，而

且菌体可以作为有价值的发酵副产物^[53]。霉菌生长的不同形态-分散的丝状形态、絮状、球状以及块状对发酵液的流变性质、氧气供应、乳酸生产影响较大。小球状的菌体是工业发酵的最佳形态，可以增强发酵液的流变性与质量传递，且可用于循环批次发酵^[54]。

米根霉等霉菌用于乳酸发酵也存在一定缺陷，如代谢产物中还含有乙醇、富马酸等副产物^[30]，乳酸的理论得率较低，米根霉的乳酸发酵需在有氧条件下进行，因此发酵过程中需要通气^[55]，米根霉的丝状形态增加了传质、混合以及乳酸回收的难度^[56]。

1.5 木质纤维素乳酸发酵的限制因素

生物质的抗性及预处理难题，酶的高成本及其反馈抑制，戊糖异型乳酸发酵产生的副产物，以及水解液中糖类多样性导致的碳源代谢物阻遏等因素影响了木质纤维素生物转化的有效性。

木质纤维素的高度结晶，特别是抗水解性是原料实现高效利用的主要障碍^[57]。虽然对各种预处理工艺进行了研究评价，但是预处理工艺应用本身就十分不利，会影响木质纤维素生物转化的经济性^[27]。预处理工艺成本较高，且会对酶水解及发酵工艺成本产生重要影响^[28]。另外，木质素作为一种物理屏障，可阻碍底物可消化组份的水解，从而限制了纤维素水解速率^[58]。研究者们尝试了许多方法以克服木质素对纤维素酶的非生产性吸附，如碱萃取以及加入蛋白质或聚乙二醇、吐温等添加剂^[59]。岳军等^[60]用50%的乙醇对玉米芯残渣中的木质素进行萃取，反应条件为210°C，反应60min，脱除53.26%木质素，萃取后的玉米芯残渣纤维素转化率比之前提高了14.58%。

另一个难题是预处理过程中抑制物的产生。释放抑制物的组成由木质纤维素原料种类、化学反应及预处理工艺特点决定。抑制物会干扰纤维素酶水解纤维素底物，还会抑制发酵微生物的生长^[61]。因此为了提高发酵效率，解决的方法之一是采用物理（水洗、活性炭吸附、溶剂萃取）、化学（加入过量的固体Ca(OH)₂）、生物（漆酶、利用抑制物的霉菌）等方法对原料进行脱毒^[16]。但是脱毒工艺的引入势必增加总的操作时间及生产成本。还有一种方法就是筛选耐受抑制物的微生物作为发酵菌种。如Walton等^[62]使用的凝结芽孢杆菌 MXL-9菌种，该菌种对制浆前半纤维素中所含的乙酸及钠盐等抑制物具有高耐受性，可以耐受30g/L乙酸、20g/L钠盐，则可以直接利用提取物进行乳酸发酵。

昂贵的酶生产成本，反馈抑制，以及水解预处理后生物质所必需的过多的酶用量都限制了木质纤维素乳酸的工业化^[28]。纤维素糖化过程中，糖化获得的葡萄糖和纤维二糖通过反馈抑制抑制了EG（内切葡聚糖酶）和CBH（纤维二糖酶）的活性，导致水解产物的积累较为缓慢^[63]。研究者开发了许多方法用于消除这种抑制，如提高纤维素酶体系中β-葡萄糖苷酶的活力，通过超滤或SSF及时除去水解过程中释放的糖类，优化纤维素酶的条件（温度、pH、酶用量），在水解过程中添加β-葡萄糖苷酶以避免纤维二糖的积累。

Shen等^[17]使用一套装置将水解与发酵联合在一起，利用玉米芯残渣发酵生产乳酸。酶解过程在2L的罐中进行，酶用量为20FPA，与装有固定化纤维二糖酶的柱子连接在一起，有效消除纤维二糖的抑制作用，底物浓度为100g/L时，水解得率为82.5%。再与装

有固定化德式乳杆菌细胞的柱子连接,就可进行乳酸的发酵。底物浓度为100g/L时,乳酸得率为92.4%,产率为0.938g/l/h。

木质纤维素水解液中存在六碳糖的同时,还含有五碳糖。大多数乳酸生产菌株都可以利用六碳糖。但对于五碳糖的利用,一些乳酸菌并不能代谢,一些乳酸菌通过磷酸转酮酶途径代谢,获得乳酸的同时会产生乙醇、乙酸等副产物,乳酸得率仅为0.6g/g戊糖。筛选优秀的乳酸生产菌或对菌体进行基因改造都可解决该难题。Abdel-Rahman等^[64]筛选获得的*Enterococcus mundtii* QU 25可以通过磷酸戊糖途径以1g/g的得率代谢戊糖获得乳酸。Patel等^[41]的研究表明,*Bacillus coagulans* 36D1可以通过磷酸戊糖途径以1g/g糖的高得率利用五碳糖获得乳酸。Okano等^[65]在植物乳杆菌中插入木糖同化基因,将原有的磷酸转酮酶途径改造为戊糖磷酸途径,实现了利用木糖和阿拉伯糖高得率生产乳酸的目标。或者采用混合培养的方式,将能够利用戊糖及己糖的两种菌混合培养,提高木质纤维素原料的利用率,如Cui等人^[25]以玉米秸秆为原料,混合培养*L. brevis* ATCC 367和*Lactobacillus rhamnosus*,SSF获得了20.95g/L乳酸,其中*Lactobacillus rhamnosus*是同型乳酸发酵菌,而*L. brevis* ATCC 367可以将葡萄糖、木糖、乳糖异型发酵为乳酸。

木质纤维素乳酸生产还存在获得乳酸浓度及纯度不高的问题,只有极少数菌种,如米根霉和凝结芽孢杆菌可以生产高光学纯度($\geq 99\%$)乳酸。且从上述提到的文章中可以看出,很少有乳酸产量大于100g/L。

为了获得性能优异的乳酸菌,除了从自然界进行筛选,对现有菌体进行基因工程改造外,还可以对现有菌体进行驯化。Bai等^[50]发酵乳酸使用的原料是玉米芯水解液,通过酸水解获得,使用的菌种是*R. oryzae* HZS6,通过驯化培养30代获得。菌株HZS6与它的亲本柱HM11相比较,底物利用效率和乳酸得率是后者的两倍。发酵78h可以完全消耗完玉米芯水解液中的糖类,获得77.2g/l乳酸,乳酸得率为79.6%,产率提高了115%;*Bacillus licheniformis* BL1是Wang等^[37]从土壤中筛选获得的嗜热产乳酸菌株,可以在50°C高温下广谱利用淀粉、葡萄糖、柠檬酸、甘油、蔗糖、果糖等碳源发酵生产乳酸。BL1在LB培养基及无机盐培养基中的最大产率分别为7.8g/l/h、0.7g/l/h,而且可以在20h内消耗完100g/L葡萄糖,48h内消耗完150g/L葡萄糖。无氧条件下,BL1不能利用木糖,但是有氧条件下可以利用,分析原因是能量限制导致的,因此对该菌株进行了驯化,获得BL2菌株,BL2可以48h内消耗完100g/L木糖,乳酸最大产率为7g/l/h。无氧条件下BL2 xylA及xylB的转录水平比BL1提高了5.1及6.2倍。作者又在无机盐培养基中对BL2进行了驯化,驯化68天后,获得了BL3菌株。相较于BL1,BL3在无机盐培养基中葡萄糖产率从0.7g/l/h提高到1.9g/l/h,木糖产率从0g/l/h提高到1.2g/l/h,葡萄糖产率从0.3g/l/h提高到0.8g/l/h。

还可以通过改进乳酸生产工艺,以提高乳酸产率及得率,实现木质纤维乳酸的工业化生产。如可以用超滤膜或离子交换树脂即时分离产物乳酸,以降低底物抑制,实现高产率乳酸生产。Min-Tian等^[66]通过电渗析系统实现了乳酸的高产率生产。研究还发现高细胞浓度循环发酵也可以提高乳酸产率。Shen等^[17]对德氏乳杆菌进行了固定化,实现了

循环发酵。还可以采用分批补料发酵模式，减少高浓度糖的抑制作用，提高乳酸发酵效率。

1.6 课题研究内容及意义

综上所述，乳酸，特别是高光学纯度乳酸的应用十分广泛，但是乳酸发酵的高成本限制了其工业化生产，本文研究了从原料、氮源两个方面降低其生产成本，利用玉米芯工业残渣发酵生产乳酸，不仅可以降低成本，还可以变废为宝，解决环境问题。本文主要比较了 *Pediococcus acidilactici* DQ2、产高纯度L-乳酸的工程菌株TY112及产高纯度D-乳酸的工程菌株ZP26在合成培养基、玉米芯残渣水解液及SSF体系中的乳酸发酵，研究了基因敲除对菌体乳酸发酵性能的影响，为工程菌株利用木质纤维素原料发酵生产乳酸的研究提供了样本。

第 2 章 利用玉米芯残渣生产乳酸

2.1 前言

乳酸是一种多用途的精细化学品, 广泛应用在食品、药品和化妆品生产中^[1]。目前, 作为生物降解材料聚乳酸单体的应用受到了越来越多的关注。D、L 乳酸聚合而成的聚乳酸是无法满足工业应用需求的不定形聚合物, 因此高光学纯度是乳酸作为 PLA 单体的先决条件^[3]。据报道, 聚 L-乳酸和聚 D-乳酸的立体复合物可以使其熔化温度相较聚 L-乳酸和聚 D-乳酸提高 50°C^[1]。

虽然 PLA 的需求正在不断增加, 但是原料的高成本限制了其生产能力, 许多研究者尝试寻找替代碳源、氮源及改进生产工艺等方法降低成本。使用木质纤维素原料为碳源可以降低生产成本。本文中使用的碳源就是木质纤维素原料中的一种—玉米芯工业残渣, 玉米芯工业残渣是利用玉米芯生产木糖(醇)及相关产品的过程中, 将其半纤维组分酸解或酶解后剩余的固体残渣, 主要成分为纤维素和木质素^[17]。我国的木糖(醇)相关企业每年大约产出 40-50 万吨的玉米芯工业残渣, 但由于缺乏合理的利用途径, 只能以极低的价格(每吨干固体约 50 元)作为锅炉燃料焚烧掉^[24]。同时由于玉米芯残渣中纤维素含量较高, 热值很低, 并不利于焚烧, 且含酸量高, 极易造成锅炉腐蚀和空气污染。利用玉米芯工业残渣生产纤维素乳酸具有如下优势: 第一, 原料丰富, 价格低廉; 第二, 原料中纤维素含量高; 第三, 与其它木质纤维素原料相比, 不需要进行高强度的预处理, 生产工艺更加简单; 第四, 玉米芯残渣中已经没有五碳糖, 不需要考虑五碳糖的利用。

高光学纯度乳酸生产菌株的获得主要有以下两个途径: 从自然界筛选获得, 如 *Bacillus coagulans* 36D1、*Bacillus sp.* WL-S20、*R. oryzae* GY18; 通过基因改造获得生产单一构型乳酸的新菌株, Okano K^[65]对 *L.plantarum* 的 *ldhD* 进行了敲除, 结果显示敲除菌株能够生产纯度达到 99.7% 的 L-乳酸, 并且其总乳酸产量并没有受到影响。敲除 L-乳酸脱氢酶基因并异源表达来自保加利亚乳杆菌的 D-乳酸脱氢酶基因的谷氨酸棒杆菌工程菌株发酵 16h 可以获得 17.9g/L D-乳酸(光学纯度 > 99.9%), 乳酸产量比亲本株提高了 32.3%。但是目前大多数关于基因改造菌株的乳酸生产研究都是以合成培养基或淀粉为原料, 极少研究木质纤维素作为原料的乳酸发酵。

本文的研究内容主要分为两部分, 第一部分旨在利用作者筛选到的优良的乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* DQ2 为乳酸生产菌株, 建立并优化以玉米芯工业残渣为原料高效生产乳酸的工艺, 同时尝试用廉价的营养物-玉米浆替代昂贵的酵母粉作为乳酸生产过程中的添加物, 为玉米芯工业残渣的高值化利用提供方案。第二部分的目标就是比较亲本株 *Pediococcus acidilactici* DQ2 及乳酸脱氢酶基因敲除菌株在合成培养基、玉米芯残渣水解液及玉米芯残渣 SSF 体系中乳酸发酵性能的差异, 探索乳酸脱氢酶基因敲除对菌体生长及乳酸发酵性能的影响。

2.2 实验材料

2.2.1 试剂和实验仪器

表2.1显示的是研究过程中使用的试剂，表2.2显示的是研究过程中使用的实验仪器。

表 2.1 试剂

Table 2.1 Reagents

试剂名称	规格	生产厂家
乙腈	HPLCG	上海星可生化有限公司
葡萄糖	BR	秦皇岛骊骅淀粉股份有限公司
L-乳酸钠	AR	Sigma公司
硫酸	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
柠檬酸氢二铵	AR	国药集团化学试剂有限公司
磷酸二氢钾	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
碳酸钙	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
硫酸镁	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
硫酸锰	AR	国药集团化学试剂有限公司
蛋白胨	BR	上海化学试剂采购供应站中心化工厂
酵母粉	BR	安琪酵母股份有限公司
无水乙酸钠	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
没食子酸	AR	阿拉丁
福林酚	AR	生物生工
四环素	AR	Sigma公司

表2.2 实验仪器

Table 2.2 Experiment equipments

仪器名称	规格	生产厂家
分光光度计	DU-800	Beckman 公司
高速冷冻离心机	J-26	Beckman 公司
台式低速冷冻离心机	5415R	Eppendorf 公司
电热恒温鼓风干燥箱	DHG-9140A	上海一恒科学仪器
纤维素分析仪	ANKOM 220	美国 ANKOM 公司
恒温水槽	ZC	宁波天恒
隔水式恒温培养箱	GHP-9160	上海一恒科学仪器
超低温冰箱	86C	Thermo 公司
马弗炉	SX2-2.5-10	上海博迅实业有限公司医疗设备厂
超声波清洗机	SB-5200D (10L, 300W)	宁波新芝生物科技

pH 计	PHS-3C	上海精密科学仪器有限公司
电子天平	BS423S	北京赛多利斯
立式振荡培养箱	HZ-2111KB	华利达
冰箱	BCD-239VC	海尔公司
冷柜	BC/BD-625GA	新飞集团
旋涡混合仪	MX-S	美国 SCIOLOGEX
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州苏洁净化
高效液相色谱	LC-20AD	岛津
超纯水纯化系统	Milli-Q	Millipore 公司
5L 反应器	5L	上海保兴生物设备工程有限公司
四联发酵罐	BIOTECH-3BG	上海保兴生物设备工程有限公司

2.2.2 菌种及培养

耐温且具有较强抗逆性的乳酸发酵菌种乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* DQ2 为本实验室从自然界分离纯化得到。

P.acidilactici TY112 是敲除 *P.acidilactici* DQ2 的 *ldhD* 获得的菌株, 可以生产纯度高达 99.88% 的 L-乳酸。*P.acidilactici* ZP26 是敲除 *P.acidilactici* DQ2 的 *ldhL* 获得的菌株, 可以生产纯度高达 99.2% 的 D-乳酸。

种子长期保存: 菌体接入 M-MRS 培养基中的, 在 42°C、150rpm 的条件下活化 12h, 与 30% 甘油混合后, 用液氮进行速冻, 保存在 -80°C 的冰箱中。

种子培养: 冻存管接入种子培养基中, 在 42°C、150rpm 的条件下活化 12h

2.2.3 原料与酶制剂

玉米芯工业残渣由山东康地恩生物科技有限公司 (山东, 青岛) 提供。玉米芯工业残渣各组份含量使用 ANKOM 220 纤维素分析仪和马弗炉进行测定。

实验中所用纤维素酶 Youtell 6[#] 购自上海尤特尔生化有限公司 (上海), 纤维素酶的酶活为 135.0 FPU/g, 纤维二糖的酶活为 344 IU/g。

2.2.4 培养基

(1) 乳酸片球菌 *P. acidilactici* DQ2、TY112 及 ZP26 种子培养基, 即优化后的 MRS 培养基 (Modified-MRS, M-MRS):

葡萄糖 20 g/L, 酵母粉 10 g/L, 蛋白胨 10g/L, 柠檬酸氢二铵 2 g/L, 硫酸镁 0.58 g/L, 硫酸锰 0.25 g/L, 磷酸二氢钾 2 g/L, 乙酸钠 5 g/L。115 °C 下灭菌 20 min。

(2) 发酵培养基:

与 M-MRS 培养基的成分相同, 除去葡萄糖。

2.3 实验方法

2.3.1 玉米芯残渣酶解性能测定

不同固含量的影响实验在酶用量为 15FPU/gDW 的条件下进行, 固含量梯度为 5%、10%、15%; 不同酶用量的影响实验在固含量为 15% 的条件下进行, 酶用量梯度为 7、10、15、20 FPU/gDW。使用 250mL 摇瓶进行实验, 装液量为 100mL, 条件

50℃, pH4.8, 150rpm, 加入 100 μ L 四环素溶液 (10mg/mL), 用于抑制微生物的生长。

2.3.2 同步糖化与发酵 (SSF) 玉米芯工业残渣生产乳酸- *P.acidilactici* DQ2

玉米芯工业残渣的同步糖化与发酵实验在带有螺带搅拌桨的 5L 发酵罐中进行。预酶解在 50℃、pH 4.8、150 rpm 的条件下进行, 预酶解结束后将温度和 pH 调整至所需, 并按 10% (v/v) 的接种量接入在 M-MRS 培养基中活化 12 小时后的乳酸片球菌开始进入同步糖化与发酵阶段, 于 150 rpm 持续 48 或 60 小时。纤维素酶用量为 15FPU/gDM, 用 5 M NaOH 调节 pH。实验中对固体含量 (分别为 5%, 10%, 15%, w/w)、预酶解时间 (分别为 0、3 和 6 小时)、同步糖化与发酵阶段的温度 (分别为 40、42、45、48 和 50℃) 和 pH 值 (5.0、5.5 和 6.0) 进行优化。

2.3.3 玉米浆对玉米芯工业残渣同步糖化与发酵生产乳酸的影响

实验在带有螺带搅拌桨的 5L 发酵罐中进行, SSF 条件: 15% 固含量, 酶用量为 15.0 FPU/g DM, 接种量为 10%, 不进行预糖化, 在 45℃ 条件下进行 48 小时。pH 用 5M NaOH 调节到 5.5。对照组使用的培养基为 M-MRS, 实验研究 10、20、30g/L 玉米浆代替 M-MRS 培养基中 10g/LYE 和 10g/L 蛋白胍的可行性。

2.3.4 合成培养基中生长及乳酸发酵的对比

生长曲线的测定实验在初糖浓度为 20g/L 的 M-MRS 培养基中进行, 条件为 42℃, 150rpm, 冻存管直接接种, 接种量为 10%。乳酸发酵对比实验在初糖浓度为 50g/L 的 M-MRS 培养基中进行, 条件为 42℃, 150rpm, 菌体先活化 12h, 接种量为 10%, 加入加入 1gCaCO₃/gGlucose 调节 pH, 每 12h 用 5M NaOH 调节 pH 到 5.5。

2.3.5 玉米芯残渣水解液的制备

10、15% 固含量玉米芯残渣混合浆液在 50℃、pH 4.8、150 rpm 的条件下糖化 48h, 纤维素酶用量为 15FPU/gDM, 用 5 M NaOH 调节 pH, 糖化后浆液 10000rpm 转速下离心 10min, 收集上清液。5% 固含量水解液由 10% 固含量水解液稀释一倍获得。

2.3.6 同步糖化与发酵 (SSF) 玉米芯工业残渣生产乳酸- TY112 及 ZP26

5%、10% 固含量玉米芯工业残渣的同步糖化与发酵实验在 3L 发酵罐中进行, 15% 固含量在带有螺带搅拌桨的 5L 发酵罐中进行。发酵在 pH5.5、150 rpm 条件下进行, 接种量为 10%, 纤维素酶用量为 15FPU/gDM, 用 5 M NaOH 调节 pH。实验中对固体含量 (分别为 5%, 10%, 15%, w/w) 和同步糖化与发酵阶段的温度 (分别为 42、45 和 48℃) 进行优化。

2.4 分析方法

2.4.1 玉米芯工业残渣组分测定

(1)原理: 玉米芯工业残渣中木质素、纤维素、半纤维素含量的测定使用的是 ANKOM 220 纤维素分析仪, 测定之前, 样品需在 105℃ 的烘箱中烘干。测定前还需配制中性和酸性洗涤剂, 酸性洗涤剂含有 Na₂EDTA、Na₂B₄O₇·10H₂O、十二烷基硫酸钠和乙二醇乙醚, 可以溶解样品中的淀粉、可溶性糖类、果胶、脂肪和蛋白质等物质, 样品洗涤后剩下的不溶物含有木质素、半纤维素、灰分和纤维素, 称为中性洗涤纤维。酸性洗涤剂是含有

CTAB（十六烷三甲基溴化胺）硫酸溶液，可以溶解中性洗涤纤维中的半纤维素，剩下的不溶物含有纤维素、灰分和木质素，称为酸性洗涤纤维。最后酸性洗涤纤维再用浓硫酸进行处理，溶解酸性洗涤纤维中的纤维素，剩下的不溶物是灰分和木质素，称为酸性洗涤木质素。使用差重法计算获得中性洗涤纤维、酸性洗涤纤维和酸性洗涤木质素含量。使用马弗炉进行灰分的测量。将上述实验中剩下的干燥的酸性洗涤木质素放入烘干的陶瓷坩埚中，一同放入马弗炉中，加热到 250°C，维持 30 分钟，然后加热到 575°C，维持 3 小时，停止加热，待降温到 105°C 后取出置于干燥器中，冷却到室温后进行称重。

(2) 样品中纤维素及半纤维素含量计算

$$\text{半纤维素}(\%) = \text{中性洗涤纤维}(\%) - \text{酸性洗涤纤维}(\%) \times \text{中性洗涤纤维}(\%) \quad (2-1)$$

$$\text{纤维素}(\%) = \text{酸性洗涤纤维}(\%) \times \text{中性洗涤纤维}(\%) - \text{酸性洗涤木质素}(\%) \times \text{酸性洗涤纤维}(\%) \times \text{中性洗涤纤维}(\%) \quad (2-2)$$

2.4.2 糖和乳酸浓度测定

糖浓度与乳酸浓度的测定：发酵液中糖浓度和乳酸浓度的测定采用高效液相色谱分析的方法，色谱柱为 Bio-radAminex HPX-87H 柱，柱温 65 °C，流动相 0.005 M H₂SO₄，流速 0.6 mL/min，检测器为 RID-10A 示差检测器。

2.4.3 乳酸构型测定

Megazyme 公司的 K-DLATE D/L-乳酸试剂盒用于测定乳酸构型。

L-乳酸的定量检测需要两步酶解反应。如反应（1）所示，L-乳酸在 L-乳酸脱氢酶（L-LDH）催化下被烟酰胺嘌呤二核苷酸（NAD⁺）氧化为丙酮酸。该反应是可逆反应，为了确保反应向右进行，需及时除去丙酮酸。因此，反应（2）应运而生，反应体系中含有大量 D-谷氨酸，丙酮酸在 D-谷氨酸-丙酮酸转氨酶（D-GPT）的催化作用下转化为 D-丙胺酸和 2-酮戊二酸。



根据以上两个反应中产生的 NADH 的量来计算 L-乳酸的量，340 nm 处吸光度值的增值就是 NADH 的量。

D-乳酸的定量检测同理，不同的是 D-乳酸是在 D-乳酸脱氢酶的催化下氧化为丙酮酸，其他相同。

表 2.3 L-乳酸浓度检测步骤
Table 2.3 Procedure for L-lactic acid

加入比色皿中的物质	空白	样品
蒸馏水（25 °C）	1.60 mL	1.50 mL
样品溶液	-	0.10 mL
溶液 1（双甘氨酸缓冲液）	0.50 mL	0.50 mL
溶液 2（NAD ⁺ ）	0.10 mL	0.10 mL
悬浮液 3（D-GPT）	0.02 mL	0.02 mL
混合，约 3 min 后读取溶液吸光度值（A ₁ ），然后加入以下物质开始反应：		
悬浮液 5（L-LDH）	0.02 mL	0.02 mL

混合，反应结束后（约 5 min）读取溶液吸光度值（ A_2 ）。

表 2.3 显示的是具体的测定步骤。D-乳酸浓度检测与 L-乳酸浓度检测相同，只需将 L-乳酸脱氢酶换成 D-乳酸脱氢酶。

D/L 乳酸浓度计算公式如下：

$$C = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta A_{D/L \text{ 乳酸}} \quad \text{g/L} \quad (2-3)$$

V 为最终体积=2.24 mL; MW 为 D/L 乳酸的分子量(g/mol); ε 是波长为 340 nm 时 NADH 的消光系数=6300($1 \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$); d 为光路=1 cm; v 为样品体积=0.1 mL; $\Delta A_{D/L \text{ 乳酸}} = A_2 - A_1$ (为保证实验的准确性, $\Delta A_{D/L \text{ 乳酸}}$ 需大于 0.1)

$$\text{D/L 乳酸的浓度为: } C = \frac{2.24 \times 90.1}{6300 \times 1 \times 0.1} \times \Delta A_{D/L \text{ 乳酸}} \quad \text{g/L} = 0.3204 \times \Delta A_{D/L \text{ 乳酸}} \quad \text{g/L} \quad (2-4)$$

乳酸光学纯度计算

$$\text{L-乳酸} = \frac{\text{L-乳酸浓度}}{\text{L-乳酸浓度} + \text{D-乳酸浓度}} \times 100\% \quad (2-5)$$

$$\text{D-乳酸} = \frac{\text{D-乳酸浓度}}{\text{L-乳酸浓度} + \text{D-乳酸浓度}} \times 100\% \quad (2-6)$$

2.4.4 玉米芯工业残渣总酚含量的测定

(1) 取玉米芯工业残渣（约 200 mg）加入 20 ml 95% 的甲醇后，置于 100 ml 广口瓶中，40°C 下 100 rpm 振荡过夜。

(2) 13000g 离心 5min，取 500 μ l 样品离出液（标样或 95% 甲醇做对照）置于干净的试管中，再加入 1 ml 15% (v/v) FC 试剂，漩涡振荡。（FC 试剂应提前于碱加入，避免空气氧化酚类物质）最后加入 4 ml 700 mM Na₂CO₃，室温下反应 2 h。

(3) 取上述样品（标样或空白）在 765nm 可见光下测定吸光值。

(4) 以没食子酸为标样稀释浓度梯度在 765nm 下测定吸光值与浓度的标准曲线。

2.4.5 乳酸得率的计算

同步糖化与乳酸发酵过程中，乳酸基于玉米芯工业残渣的得率计算公式如下：

$$\text{乳酸得率} = \frac{[\text{Lac}]_f \times V_f - [\text{Lac}]_0 \times V_0}{f \times W_{CR} \times 1.111 \times 1.0} \times 100\% \quad (2-7)$$

$[\text{Lac}]_0$ 和 $[\text{Lac}]_f$ 分别是发酵开始和结束时乳酸的浓度 (g/L), V_0 和 V_f 和分别是发酵开始和结束时发酵罐中液体的体积 (L), W_{CR} 是 SSF 中使用的玉米芯工业残渣的干重 (g), f 是干基玉米芯残渣中纤维素所占的质量分数 (g/g), 1.111 指的是纤维素与等价葡萄糖之间的转化系数, 1.0 是化学计算式中葡萄糖与乳酸之间的质量转化系数。

2.4.6 纤维素酶活测定

纤维素滤纸酶活测定方法改编自美国 NREL 的相关测定方法^[67]; 纤维二糖酶活测定方法改编自 Ghose 提出的方法^[68]。

第 3 章 实验结果与讨论

3.1 玉米芯工业残渣的酶解性能

玉米芯工业残渣是利用玉米芯生产木糖（醇）及相关产品的过程中，将其半纤维组分酸解或酶解后剩余的固体残渣，主要成分为纤维素和木质素^[17]。使用 ANKOM 220 纤维素分析仪以及马弗炉测定玉米芯工业残渣的实验结果表明，其纤维素含量为 58.15 ± 0.35 ，半纤维素含量为 9.05 ± 1.44 ，木质素含量为 14.02 ± 1.53 。玉米芯工业残渣的纤维素含量稍高于大多数木质纤维素生物质的纤维素含量，如 Guo 等^[69]使用的玉米芯的纤维素含量仅为 34.3，Sasaki 等^[70]使用的甘蔗渣的纤维素含量仅为 45.1，因此可以得出结论，玉米芯工业残渣是一种优良的纤维素原料。

另一方面，玉米芯工业残渣在酸性溶液中长时间蒸煮的过程中，经过长时间的高温酸水解，表面形成足够多的孔洞，已十分易于纤维素酶的吸附，已不需再进行预处理，有效节约了生产成本。

表3.1 不同酶用量及固含量对玉米芯残渣酶水解的影响

Table.3.1 Effect of enzyme loading and solid concentration on enzymatic hydrolysis of corncob residues

Solid concentration (w/w, %)	Enzyme loading (FPU/g DM)	Glucose (g/L)	Glucose yield (%, of theoretical)
5	15	31.57 ± 0.13	90.9 ± 0.4
10	15	60.20 ± 0.30	82.0 ± 0.4
15	15	92.39 ± 1.67	79.2 ± 1.4
15	7	65.76 ± 2.13	56.3 ± 1.8
15	10	77.75 ± 1.13	66.6 ± 1.0
15	15	91.06 ± 4.17	78.06 ± 3.57
15	20	98.92 ± 4.51	84.79 ± 3.86

糖化条件：具体条件如表3.1所示，pH用磷酸缓冲溶液控制在4.8，反应在50℃、150rpm条件下进行72小时。

Saccharification conditions: The detailed conditions were listed in this table. The pH value was adjusted to 4.8 with phosphate buffer, and the mixture was maintained at 50°C, 150 rpm for 72 hours.

SSF 过程中的限制性步骤就是酶水解，因此首先研究了玉米芯残渣的酶解性能，不同酶用量及不同固含量对玉米芯残渣酶水解的影响。结果如表 3.1 所示，酶用量相同，即为 15FPU/gDM 时，获得的葡萄糖浓度随着固含量的增加而增加，5%固含量可以获得 31.57g/L 葡萄糖，15%固含量获得葡萄糖浓度为 92.39g/L，但是得率却随着固含量的增加反而降低了，由原来的 90.9% 下降到 79.2%。因为木质素可以非生产性地吸附纤维素酶，因此得率的下降，分析原因可能是由于木质素浓度的增加造成的。还有可能是，固含量增加，导致体系的流动性及混合性能变差。固含量相同，即为 15% 时，获得的葡萄

糖浓度及得率都随着酶用量的增加而增加。酶用量为 15FPU/gDM 时, 最终的葡萄糖浓度为 91.06, 得率为 78.06, 酶用量为 20FPU/gDM 时, 最终的葡萄糖浓度为 98.92, 得率为 84.79, 比较两个酶用量下葡萄糖浓度及得率, 发现酶用量为 20FPU/gDM 时, 虽然葡萄糖浓度及得率稍有提高, 但是相对于纤维素酶的成本来说, 是不划算的, 因此综合考虑得率及经济性, 选择 15FPU/gDM 作为后续研究的酶用量。

3.2 利用乳酸片球菌 *Peciococcus acidilactici* DQ2 对玉米芯工业残渣进行同步糖化与发酵 (SSF) 生产乳酸

3.2.1 同步糖化与发酵生产乳酸工艺的优化

同步糖化与发酵工艺, 即纤维素的酶解与微生物发酵在同一个反应器中进行, 可以解除酶解产物-葡萄糖对纤维素酶的产物抑制, 并且提高反应器的利用率, 从而降低投资成本^[23]。同步糖化与发酵工艺已经成为纤维素乙醇和纤维素乳酸研究中最常用的生产工艺。

根据温度不同, 可将同步糖化与发酵过程分为两个阶段, 即预酶解阶段 (50 °C) 和同步糖化与发酵阶段 (根据发酵微生物的不同而定)。因此, 本研究首先优化了玉米芯工业残渣同步糖化与发酵生产乳酸的工艺, 包括同步糖化与发酵阶段的温度、预酶解阶段的时间、同步糖化与发酵阶段的 pH 和固体含量 (结果见表 3.2)。

表 3.2 预糖化时间、温度、pH 及固含量对利用玉米芯工业残渣SSF生产乳酸的影响

Table.3.2 Effect of prehydrolysis time, temperature and pH value at SSF stage and the solid concentration on the lactic acid production during simultaneous saccharification and fermentation of corncob residues

Temperatures (°C)	Prehydrolysis time (hours)	pH value	Solid concentration (w/w, %)	Lactic acid (g/L)	Lactic acid yield (% of theoretical)	Lactic acid productivity (g/L h)
40	0	5.5	10	30.56±2.29	58.8±4.4	0.64±0.05
42	0	5.5	10	33.67±2.08	64.8±4.0	0.70±0.04
45	0	5.5	10	43.11±1.24	82.9±2.4	0.90±0.03
48	0	5.5	10	31.5±1.28	60.6±2.5	0.66±0.03
50	0	5.5	10	22.23±1.05	42.8±2.0	0.46±0.02
45	0	5.5	10	43.11±1.24	82.9±2.4	0.90±0.03
45	3	5.5	10	35.65±0.88	68.6±1.7	0.74±0.02
45	6	5.5	10	39.66±0.72	76.3±1.4	0.83±0.02
45	0	5.5	10	43.11±1.24	82.9±2.4	0.90±0.03
45	0	5.0	10	39.91±0.17	77.3±0.3	0.83±0

45	0	6.0	10	36.35±1.32	69.9±2.5	0.75±0.03
45	0	5.5	5	30.01±0.18	128.8±0.3	0.625±0
45	0	5.5	10	43.11±1.24	82.9±2.4	0.90±0.03
45	0	5.5	15	52.36±0.11	62.1±0.1	1.09±0

SSF条件：预糖化阶段，纤维素酶用量为15.0 FPU/g DM，温度为50 °C，pH用5MNaOH调节到4.8；SSF阶段接种量为10%，pH用5MNaOH调节到实验所需值。SSF一共进行48小时。

SSF conditions: the enzyme dosage was 15.0 FPU/g DM, the temperature was 50 °C and the pH value was maintained at 4.8 with 5 M NaOH during prehydrolysis stage; the inoculation ratio was 10% (v/v) and the pH value was changed into different values with 5 M NaOH during SSF stage. The total SSF process lasted for 48 hours.

分析表 3.2 可知，随着同步糖化与发酵阶段温度的升高，发酵结束时乳酸浓度、乳酸得率和乳酸生产速率都随之增加，当温度达到 45 °C 时，发酵醪中的乳酸浓度、乳酸得率和乳酸生产速率都达到最高。但继续提高温度，发酵结束时的乳酸浓度、乳酸得率和乳酸生产速率反而开始降低。该实验结果与 Zhao 等^[26]的实验结果不符，Zhao 等^[26]优化后的温度为 48 °C，分析原因可能是由于原料及原料预处理方式的不同导致的。Zhao 等^[26]使用的原料是稀酸蒸汽爆破预处理后的玉米秸秆，并且经过生物脱毒，脱除了大部分抑制物，因此菌体的生长不存在环境压力，反而玉米秸秆中还含有丰富的营养物质，而玉米芯工业残渣在生产过程中产生的抑制物并未除去，可能会对菌体的生长产生抑制。总之，45°C 同时兼顾了纤维素酶的催化及乳酸菌的发酵，是 DQ2SSF 产酸的最优温度。

由于同步糖化与发酵阶段的温度较高（45°C，接近纤维素酶的最适温度），所以有无预酶解对乳酸浓度、乳酸得率和乳酸生产速率的影响不大。相反，随着预酶解时间的增加，由于乳酸菌接入体系时葡萄糖浓度的增加而导致发酵效率有所降低。接着，又考察了同步糖化与发酵阶段不同 pH 值对乳酸发酵的影响。结果表明，在 pH 值为 5.5 的条件下乳酸浓度、得率和生产速率可以达到最高值。pH 为 5.0 时，虽然有利于纤维素酶的催化作用，但是低 pH 条件下，培养基中存在较多未解离得乳酸，这些乳酸进入细胞内，为了能保持细胞内环境稳定，细胞需要消耗能量将质子泵出，容易导致细胞能量耗尽，从而死亡。然而较高 pH 虽然有利于菌体的生长，但是容易导致纤维素酶失活。因此，pH5.5 是 DQ2SSF 产酸的最适 pH。

最后，我们又考察了不同固体含量对玉米芯工业残渣发酵生产乳酸发酵性能的影响。结果表明，随着固体含量的增加，发酵醪中乳酸的浓度逐渐增加，但乳酸得率却逐渐降低。该结果与固含量对玉米芯工业残渣酶解的影响相一致。此外，我们测定了发酵所得乳酸的光学构型，其中 L-乳酸的含量为 63.4%，D-乳酸的含量为 36.6%。

3.2.2 玉米浆对玉米芯工业残渣同步糖化与发酵生产乳酸的影响

乳酸菌是一种对营养需求非常高的微生物。在乳酸的发酵成本中，营养组分，尤其

是酵母粉的成本可以占到乳酸总成本的 30% 左右^[71-72]。因此，用廉价的营养组分，尤其是廉价氮源来替代乳酸发酵培养基中的昂贵组分如酵母粉和蛋白胨是降低纤维素乳酸生产成本的关键。

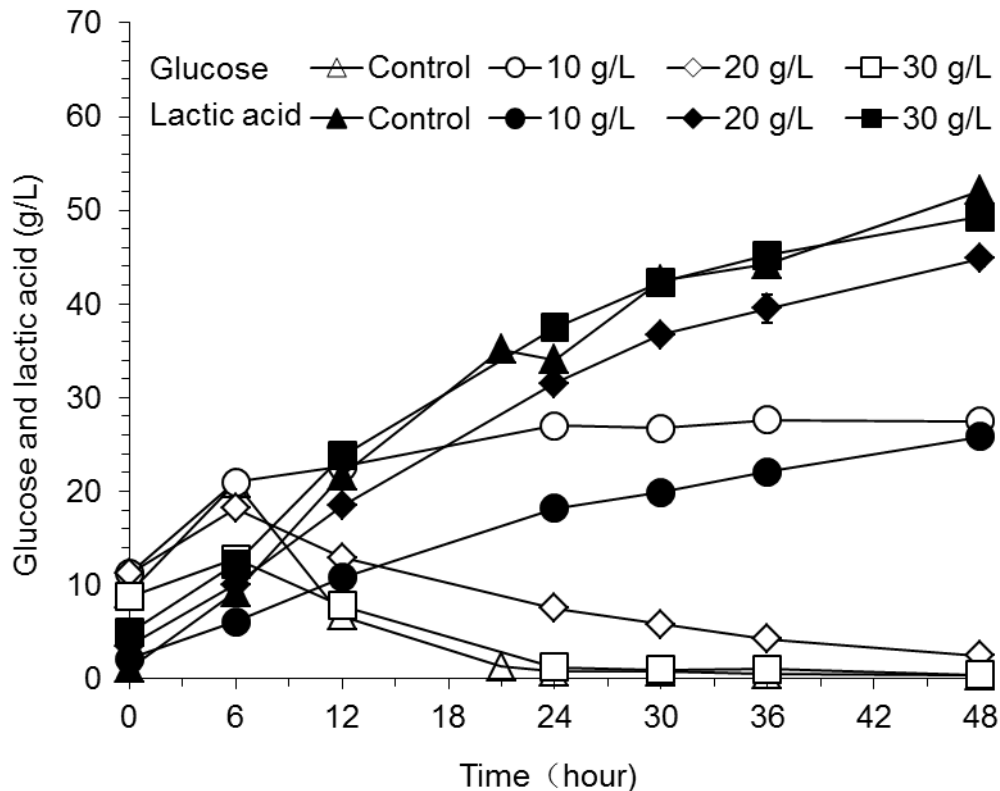


图3.1 玉米浆对玉米芯工业残渣同步糖化与发酵生产乳酸的影响

Figure 3.1 Effect of corn steep liquor on the SSF of corncob residues for lactic acid production
SSF 条件: 15% 固含量, 酶用量为 15.0 FPU/g DM, 接种量为 10%, 不进行预糖化, 在 45 °C 条件下进行 48 小时。pH 用 5M NaOH 调节到 5.5。对照组使用的培养基为 M-MRS, 实验研究 10、20、30g/L 玉米浆代替 M-MRS 培养基中 10g/L YE 和 10g/L 蛋白胨的可行性。

SSF conditions: 15% (w/w) solid concentration, 15.0 FPU/g DM, 10% (v/v) inoculation ratio, and SSF at 45 °C for 48 hours without prehydrolysis. The pH value was maintained at 5.5 with 5 M NaOH. The nutrients supplemented in the SSF broth in the control SSF was same as the M-MRS medium without glucose, while 10g/l, 20g/l and 30g/l of corn steep liquor were tested for substitution of the 10 g/L yeast extract and 10 g/L peptone in the M-MRS medium, respectively.

在乳酸发酵生产中, 各种廉价的氮源作为酵母粉的替代物已获得了广泛的研究, 麦麸、花生粕、玉米浆等都可用于乳酸发酵的氮源。玉米浆是一种营养丰富且广泛应用于工业发酵的组分, 因此, 我们尝试用玉米浆代替 M-MRS 培养基中的酵母粉和蛋白胨, 并考察了不同玉米浆浓度对乳酸发酵性能的影响 (结果见图 3.1)。分析图 3.1 可知, 当玉米浆浓度为 10g/L 时, 发酵 48h 仍有超过 27.5g/L 的残糖剩余, 而且乳酸生产速率也远远低于使用 M-MRS 培养基的实验。而当玉米浆浓度为 20g/L 时, 葡萄糖的消耗速率和乳酸的生产速率略低于使用 M-MRS 培养基的实验, 而且发酵结束时的乳酸浓度 44.88g/L 也略低于对照。当进一步增加玉米浆浓度为 30g/L 时, 葡萄糖的消耗速率和乳酸生成速率与对照组相当, 发酵结束时发酵液中乳酸浓度为 49.31g/L, 因此可以用 30g/L

玉米浆代替 10g/L 蛋白胨和 10g/LYE 进行乳酸发酵。

我们进一步分析了使用不同的营养组分对乳酸发酵成本的影响（见表 3.3）。分析表 3.3 可知，由于酵母膏和蛋白胨的价格高出玉米浆很多倍，而目前化学品级乳酸单体的售价大约为 1200 \$/ton，因此，如果使用酵母膏和蛋白胨为营养进行乳酸单体的生产，那么营养的成本远远超过乳酸单体的售价。而使用 30 g/L 的玉米浆代替酵母膏和蛋白胨，营养成本只占到乳酸单体售价的 10.17%。可以说使用价格低廉的玉米浆作为营养生产化学品级的乳酸是合理的，而且具有产业化的前景。

表 3.3 乳酸发酵的营养成本

Table 3.3 The nutrition cost for lactic acid production

Nutrition	Lactic acid (g/L)	Nutrition requirement (kg/kg lactic acid)	Nutrition cost (\$/ton lactic acid)	Ratio of nutrition cost to lactic acid selling price (%)
Control	52.36	0.38 ^a	6080	506.67
10 g/L CSL	25.85	0.39	78	6.50
20 g/L CSL	44.88	0.45	90	7.50
30 g/L CSL	49.31	0.61	122	10.17

酵母粉、蛋白胨以及玉米浆的价格分别为 10 \$/Kg, 22 \$/Kg and 0.2\$/Kg^[72]。美元和人民币的汇率是 6.3。SSF 的条件如图 3.1 所示。A 表示对照组中生产 1 千克乳酸需要 0.19 千克酵母粉及 0.19 千克蛋白胨。

The selling price of yeast extract, peptone and corn steep liquor were 10 \$/Kg, 22 \$/Kg and 0.2\$/Kg. (Zheng Li et al., 2010) The exchanging rate from dollar (\$) to Chinese Yuan was 6.30. The SSF conditions were listed in the Fig.3.1.a represents that the yeast extract and peptone required for 1 kg lactic acid production in the control SSF were 0.19 kg and 0.19 kg, respectively.

3.3 乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* DQ2 及其工程菌 *Pediococcus acidilactici* TY112 和 *Pediococcus acidilactici* ZP26 的发酵性能对比

3.3.1 工程菌 *Pediococcus acidilactici* TY112 和 *Pediococcus acidilactici* ZP26 的来源

上述实验中对 DQ2 利用玉米芯工业残渣的 SSF 工艺进行了优化,并研究了玉米浆代替酵母粉和蛋白胨的可行性。但是 DQ2 用于乳酸发酵存在一个缺陷-所产的乳酸构型为 D、L 混合型，其中 L-乳酸的含量为 63.4%，D-乳酸的含量为 36.6%。D、L 混合乳酸的应用受到许多限制，人体内只含有代谢 L-乳酸的酶，不能代谢吸收 D-乳酸，过量摄入会导致酸中毒，因此食品、医药领域使用的是 L-乳酸，另一方面，近年来受到越来越多关注的生物降解材料-聚乳酸的合成只能使用高光学纯度的乳酸，D、L 乳酸聚合而成的聚乳酸是无法满足工业应用需求的不定形聚合物。D、L 混合酸中两种构型乳酸的分离十分困难，现知的方法之一是使用手性柱，但是手性柱的价格昂贵，并不适用于工业规模的应用。因此，本实验室通过工程手段对原始菌株 DQ2 进行了基因改造，敲除 DQ2 的 *ldhD* 获得 TY112 菌株，可以生产纯度高达 99.88% 的 L-乳酸，敲除 DQ2 的 *ldhL* 获得

ZP26 菌株，可以生产纯度高达 99.2% 的 D-乳酸。

3.3.2 乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* DQ2 及其工程菌在合成培养基中的生长和发酵

因为分别敲除 *ldhD*、*ldhL*，TY112 中 D-乳酸的生成受到了阻断，ZP26 中 L-乳酸的生成受到了阻断。为了研究 *ldhL*、*ldhD* 的敲除对菌体生长的影响，测定了相同条件下三株菌株在种子培养基中的生长曲线。实验结果如图 3.2 所示，TY112 和 DQ2 前期的生长速率相当，后期 TY112 的 OD 值稍低于原始菌株 DQ2，DQ2 的最大 OD 值为 5.61，TY112 的最大 OD 值为 5.09。表明 D-乳酸为该菌体细胞壁肽聚糖前体的成分，D-乳酸的消除影响了细胞壁的合成从而稍稍减弱了菌体的生长。ZP26 与 TY112、DQ2 比较，最大 OD 值与 DQ2 相当。

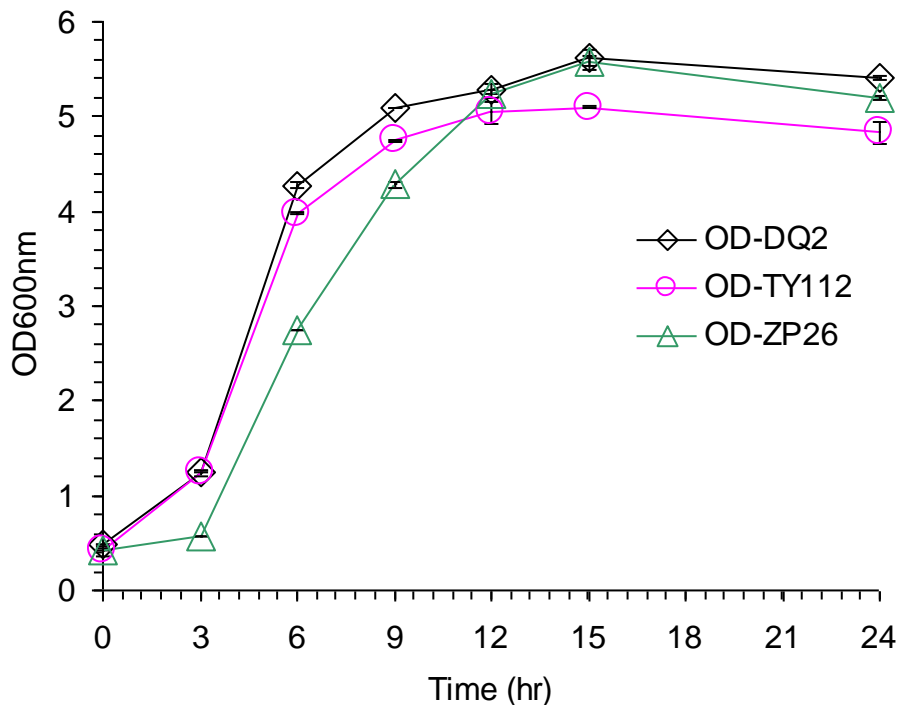


图 3.2 乳酸片球菌生长曲线

Figure 3.2 The growth curve of *Pediococcus acidilactici*

乳酸是初级代谢产物，是与菌体的生长相关连的，因此比较了 DQ2、TY112 和 ZP26 三株菌在合成培养基中的葡萄糖消耗以及乳酸生成。

结果如图 3.3 所示，DQ2、TY112 在初糖浓度为 50g/L 的合成培养基中的葡萄糖消耗及乳酸生成速率大致相当，发酵 48h 可以完全消耗 43g/L 葡萄糖，产生 36g/L 左右乳酸。ZP26 的葡萄糖消耗速率与 DQ2 和 TY112 的大致相当，乳酸生成速率稍慢于 DQ2 和 TY112，分析原因可能是部分 D-乳酸用于合成细胞壁，导致乳酸产量稍有降低。表明 D、L-乳酸脱氢酶基因的敲除并未对菌体在合成培养基中的乳酸发酵产生显著影响。Kyla-Nikkila 等^[73]使用基因置换技术重组获得两株 D-乳酸脱氢酶基因缺失的 *Lactobacillus helveticus* CNRZ32，一株敲除 *ldhD* 的启动子区，命名为 GRL86，一株用

同种菌 L-乳酸脱氢酶结构基因(*ldhL*)的额外拷贝替换 *ldhD* 的结构基因, 命名为 GRL89。GRL89 的 *ldhL* 结构基因的第二拷贝在 *ldhD* 启动子的作用下表达。虽然 L-乳酸脱氢酶的最大酶活分别提高了 53%、93%, 两株 D-乳酸脱氢酶基因缺失菌株 L-乳酸产量与原始菌株的相同。Ferain 等^[74]在大肠杆菌中通过碱基互补克隆获得来自植物乳酸杆菌 DG301 的 L-乳酸脱氢酶基因, 再通过多拷贝质粒转入到植物乳杆菌中, 使得 L-乳酸脱氢酶的酶活提高到原来的 13 倍, 然而 L-乳酸和 D-乳酸的产量未发生变化; 通过两步同源重组法敲除染色体上的 L-乳酸脱氢酶基因, 使得菌体的 L-乳酸脱氢酶酶活缺失, 只能产生 D-乳酸, 但是也未能提高 D-乳酸的产量。分析原因可能是在合成培养基中, 乳酸代谢的限制性步骤并不是丙酮酸转化为乳酸这一步, 因此乳酸脱氢酶酶活的变化并不会影响乳酸的产量。

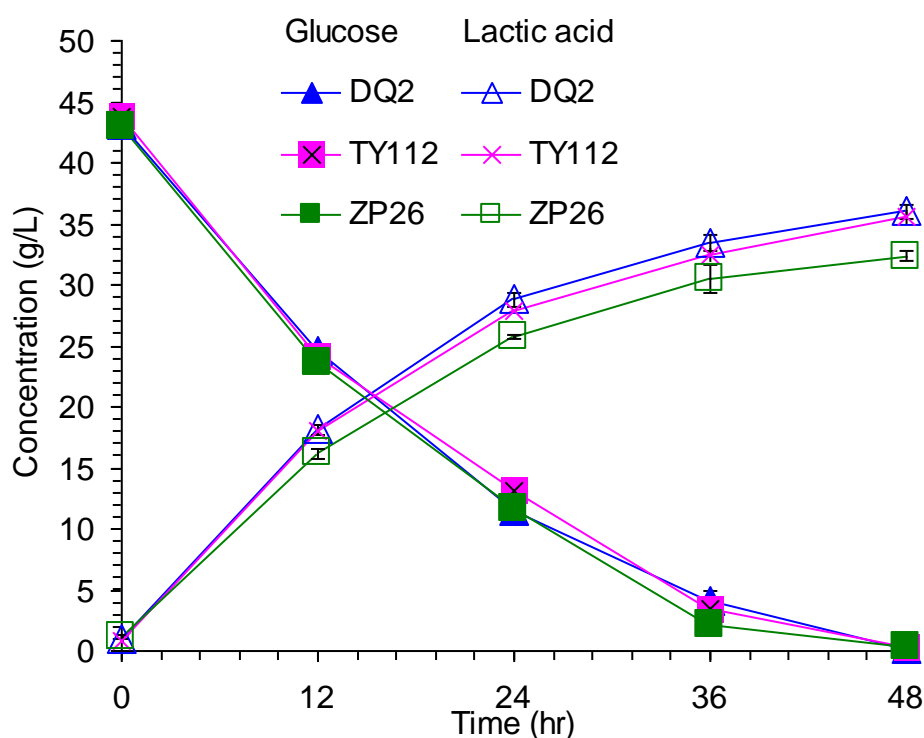


图3.3 M-MRS 培养基中乳酸发酵对比

Fig.3.3 The comparison of lactic acid production in M-MRS medium

3.3.3 乳酸片球菌在玉米芯工业残渣酶解液中的发酵性能

完成 DQ2、TY112 和 ZP26 在合成培养基中乳酸发酵对比实验后, 接着研究三株菌在玉米芯工业残渣水解液中的乳酸发酵性能, 即采用分步糖化与发酵模式对比研究三株菌的乳酸发酵。玉米芯工业残渣水解液是一个比合成培养基更复杂的体系, 除了主要的葡萄糖, 少量木糖、纤维二糖等糖类以外, 还含有来自于玉米芯工业残渣的色素、抑制物等。温度是乳酸菌生长及乳酸发酵的重要条件, 另一方面, 为了获得更高浓度的乳酸, 一般需增加发酵体系中玉米芯工业残渣的固含量, 因此接下来的实验主要从温度及固含量两个方面研究 DQ2、TY112 和 ZP26 在玉米芯工业残渣酶解液中的发酵性能。

3.3.3.1 温度的影响

表 3.4 温度对 DQ2、TY112 及 ZP26 乳酸发酵的影响

Table 3.4 Effect of temperature on the lactic acid production of DQ2, TY112 and ZP26

Temperature	DQ2		TY112		ZP26	
	LA yield (% of theoretical)	Productivity (g/L/hour)	LA yield (% of theoretical)	Productivity (g/L/hour)	LA yield (% of theoretical)	Productivity (g/L/hour)
37	87.48±0.15	0.65±0.01	74.10±1.21	0.65±0.01	87.27±0.04	0.53
40	84.70±0.15	0.96	86.04±0.19	1.00±0.01	86.35±0.41	0.65±0.01
42	85.92±1.56	1.13±0.02	87.04±1.13	1.20	75.83±2.31	0.95±0.01
45	79.19±1.25	0.96±0.02	80.37±0.15	0.91±0.03	77.83±1.31	0.97±0.02
48	ND	ND	ND	ND	80.17±1.75	0.94±0.01
50	22.39±0.54	0.31	25.50±0.03	0.35	34.01±1.58	0.50±0.01

温度对菌体的生长及乳酸发酵影响较大，因此以 5% 固含量的玉米芯残渣水解液为原料，研究了不同温度条件下 TY112、DQ2 和 ZP26 的乳酸发酵。结果如表 3.4 所示，纵向比较，DQ2 在 37、40、42℃ 三个温度下的乳酸得率相差不大，为 85% 左右，高于 42℃ 时，随着温度的升高，得率反而下降，50℃ 时的乳酸得率仅为 22.39%。产率是先上升后下降，42℃ 的产率最大，为 1.13g/l/h；TY112 的乳酸产率及得率都是先上升后下降，42℃ 时达到最大值，分别为 1.20g/l/h、87.04%。ZP26 在 37、40℃ 两个温度条件下，乳酸得率及产率无明显差别；42、45、48℃ 三个温度下乳酸得率及产率无明显差别。三者的乳酸发酵在 50℃ 时都明显受到了抑制。横向比较，ZP26 的产率在 37、40、42℃ 三个温度下稍低于 DQ2 及 TY112。DQ2 及 TY112 两者在各个温度条件下的乳酸产率及得率大致相当。原始菌株 DQ2 所产乳酸构成为 63.4% 的 L-乳酸和 36.6% 的 D-乳酸，由此可以推断出 L-乳酸脱氢酶的酶活要高于 D-乳酸脱氢酶。因此 ZP26 与 DQ2 和 TY112 在各个温度条件下乳酸发酵性能的差异可以根据 D-乳酸脱氢酶酶活与 L-乳酸脱氢酶酶活的差异来解释。在玉米芯工业残渣水解液的环境中，可能受到其中抑制物等的影响，丙酮酸转化为乳酸这一步骤成为限制性步骤，因此乳酸脱氢酶的酶活对于乳酸产率及得率至关重要。低温条件下，ZP26 的乳酸产率稍低于 DQ2 及 TY112，可能是由于 D-乳酸脱氢酶酶活低于 L-乳酸脱氢酶酶活。

3.3.3.2 固含量的影响

接着研究了 TY112、DQ2 和 ZP26 在不同固含量玉米芯残渣水解液中的乳酸发酵，比较了相同固含量下，TY112、DQ2 和 ZP26 的乳酸发酵性能以及不同固含量水解液对 TY112、DQ2 和 ZP26 的乳酸发酵性能的影响。主要研究了 5%、10%、15% 三个固含量。

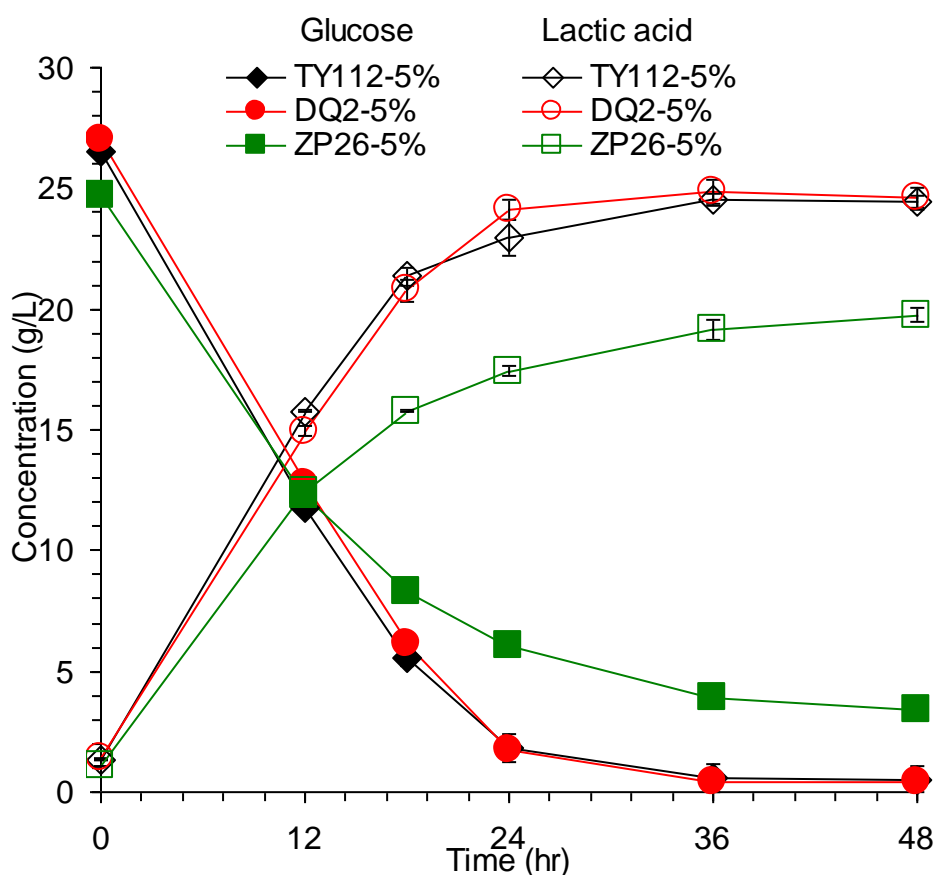


图 3.4 5%玉米芯残渣水解液的乳酸发酵

Fig.3.4 The lactic acid production in 5% corn cob residues hydrolysate

图 3.4 显示的是三株菌在 5%固含量玉米芯残渣水解液中的乳酸发酵，该实验是在 100mL 摇瓶中进行的，加入 CaCO_3 调节 pH。从图中可以看出，ZP26 的乳酸生产稍弱于 TY112 和 DQ2，TY112、DQ2 发酵 48h 可以消耗完葡萄糖，产生 24g/L 左右的乳酸，而 ZP26 发酵 48h 还有 3g/L 左右残糖剩余，获得的乳酸浓度为 19.76g/L，乳酸产量比 TY112 和 DQ2 低了 18%。图 3.5、3.6 显示的是三株菌在 10% 及 15% 固含量玉米芯残渣水解液中的乳酸发酵，这两个实验是在 3L 发酵罐中进行的，可以及时调节 pH。从图 3.5 中可以看出，10% 固含量下，TY112 的葡萄糖消耗速率及乳酸产率与 DQ2 差别不大，DQ2 发酵 48h 获得 42.3g/L 乳酸，TY112 发酵 48h 获得 40.2g/L 乳酸。同 5% 固含量一样，ZP26 的乳酸发酵要差于前两者，发酵 48h 只产生了 31.15g/L，乳酸产量比 TY112 和 DQ2 低了 25%。图 3.6 的结果表明，15% 固含量下，三株菌的葡萄糖消耗速率及乳酸生成速率无明显差别。

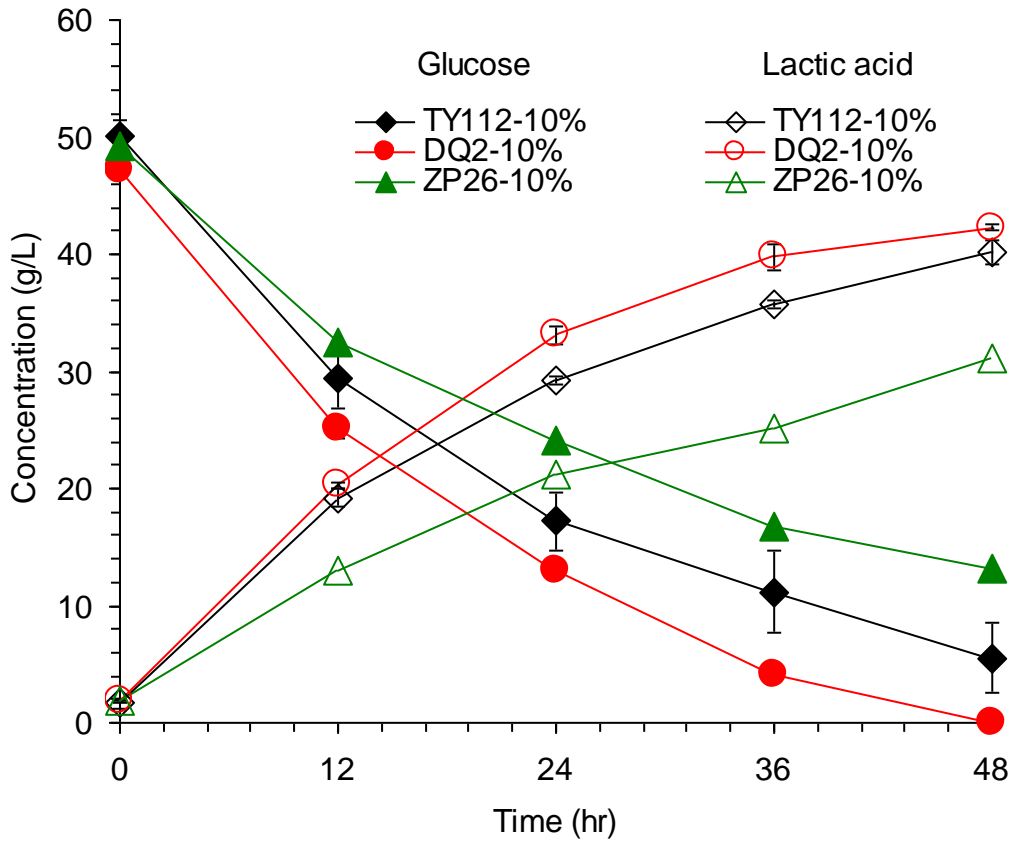


图 3.5 10%玉米芯残渣水解液的乳酸发酵
Fig.3.5 The lactic acid production in 10% corncob residues hydrolysate

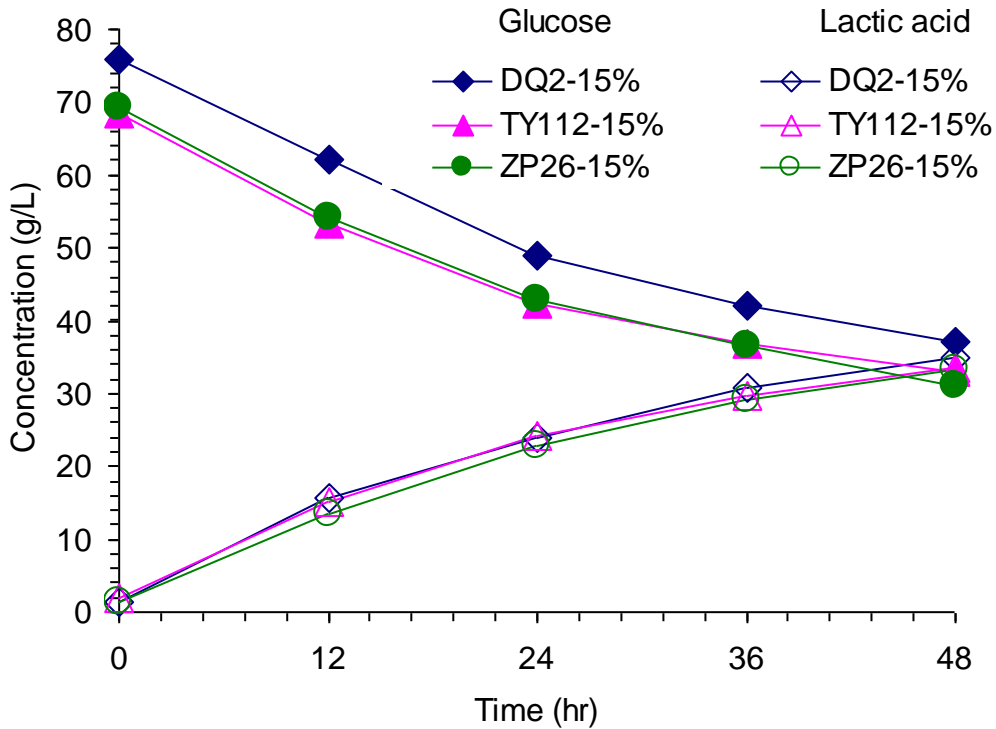


图 3.6 15%玉米芯残渣水解液的乳酸发酵
Fig.3.6 The lactic acid production in 15% corncob residues hydrolysate

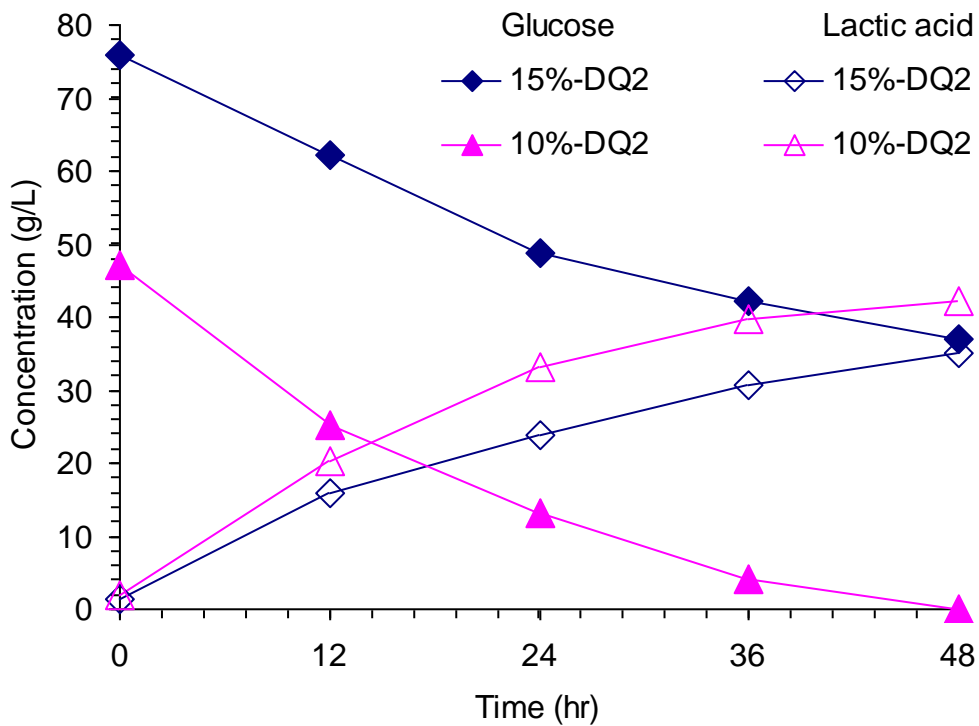


图 3.7 10%及 15%玉米芯残渣水解液中 DQ2 的乳酸发酵

Fig.3.7 The lactic acid production of DQ2 in 10% and 15% corncob residues hydrolysate

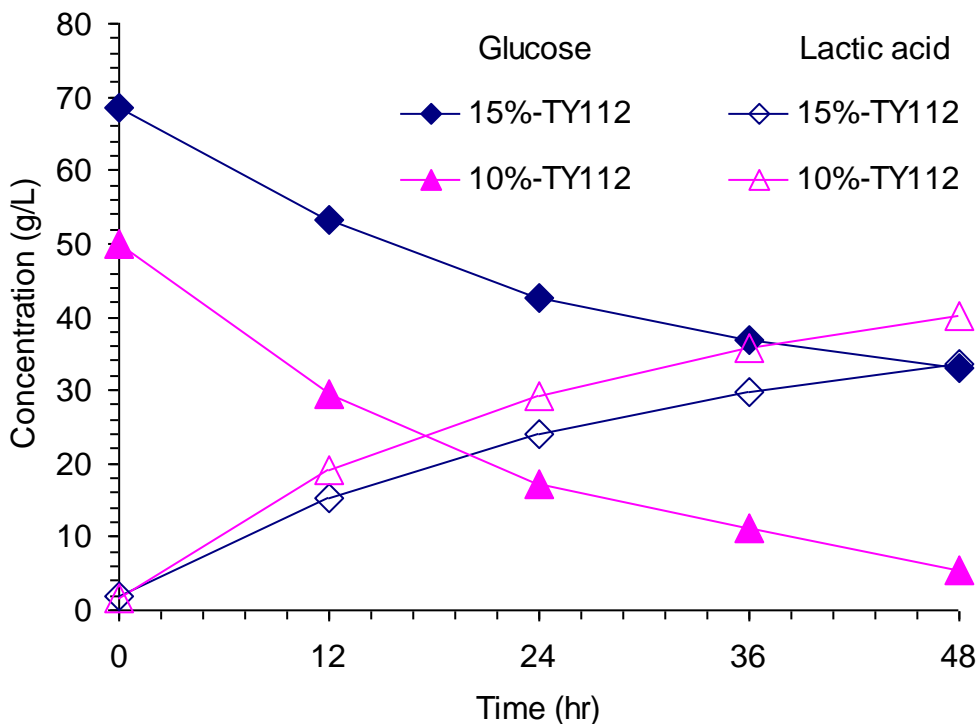


图 3.8 10%及 15%玉米芯残渣水解液中 TY112 的乳酸发酵

Fig.3.8 The lactic acid production of TY112 in 10% and 15% corncob residues hydrolysate

上述比较了相同固含量下，TY112、DQ2 和 ZP26 的乳酸发酵性能。接着图 3.7、3.8、3.9 总结了不同固含量水解液对 TY112、DQ2 和 ZP26 的乳酸发酵性能的影响。图 3.7

的结果表明,随着水解液固含量的增加,DQ2 的乳酸生成速率反而降低了,10%固含量下的乳酸产量比 15%固含量下的高了 21%。水解液固含量对 TY112 发酵生产乳酸的影响与对 DQ2 的影响相似,随着水解液固含量的增加,DQ2 的乳酸生成速率反而降低了,10%固含量下的乳酸产量比 15%固含量下的高了 19.7%。与前两者不同的是,水解液固含量对 ZP26 发酵生产乳酸的影响不大,15%固含量水解液中的乳酸生成速率与 10%固含量的相当。在制取木糖/木糖醇/糠醛等过程中,玉米芯需进行长时间的高温酸水解,而在该过程中,玉米芯中的木质素产生了大量酚类抑制物,酚类抑制物的疏水性导致它不能被水洗除去,从而在玉米芯残渣原料中富集。因此,分析原因可能是 ZP26 对玉米芯工业残渣水解液中的酚类抑制物耐受性较差,10%固含量时菌体的生长及乳酸发酵已受到严重抑制,从而 ZP26 在 10%、15%两个固含量的水解液中的乳酸发酵无明显差别。而 DQ2、TY112 对酚类抑制物的耐受性较好,菌体在两个固含量下受到酚类抑制物的抑制程度不同,从而导致乳酸产量的不同。

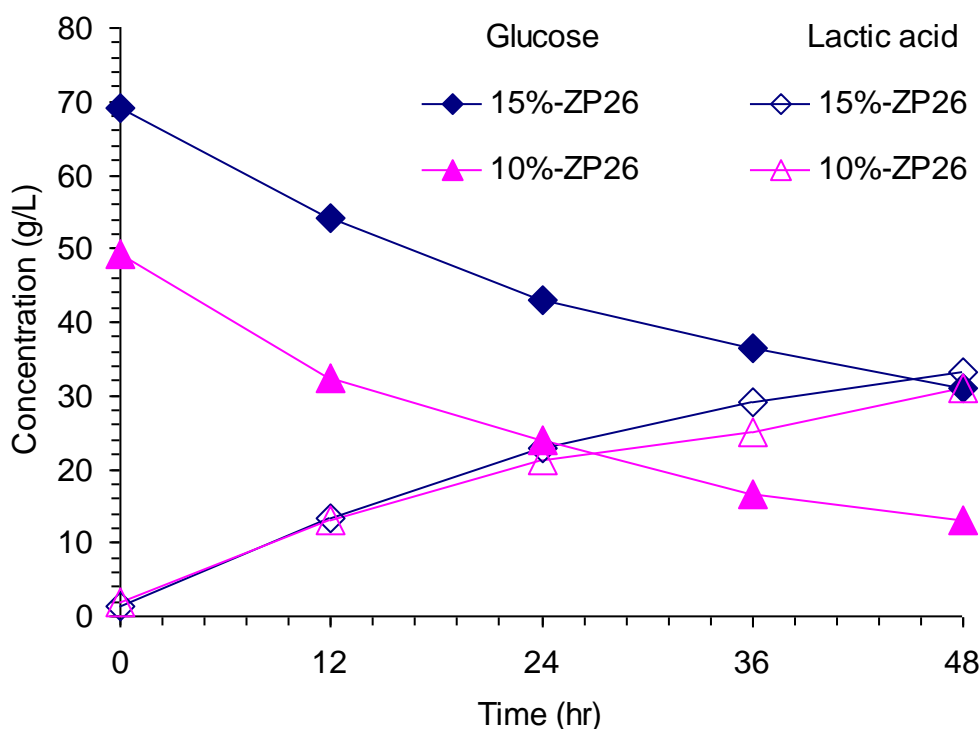


图 3.9 10%及 15%玉米芯残渣水解液中 ZP26 的乳酸发酵

Fig.3.9 The lactic acid production of ZP26 in 10% and 15% corncob residues hydrolysate

3.4 乳酸片球菌同步糖化与发酵玉米芯工业残渣的性能

SSF 技术适用于乳酸菌利用木质纤维素等生物质原料进行的乳酸生产。乳酸菌可以同步利用纤维素酶水解产生的糖类,使反应器中的糖浓度保持在较低水平,从而显著降低反馈抑制。

3.4.1 温度条件优化

玉米芯工业残渣水解液中温度影响的实验结果表明, TY112 和 DQ2 在该体系中的最适生长温度为 42°C, ZP26 的乳酸生成速率在 42、45、48°C 三个温度条件下无明显差

别, 50°C 时, 三株菌的生长及乳酸发酵都受到严重抑制, 但是 SSF 体系使用的纤维素酶的最适温度为 50°C。两者的差异将会影响 SSF 的效率。因此, 我们需对 SSF 的温度进行进一步的优化。

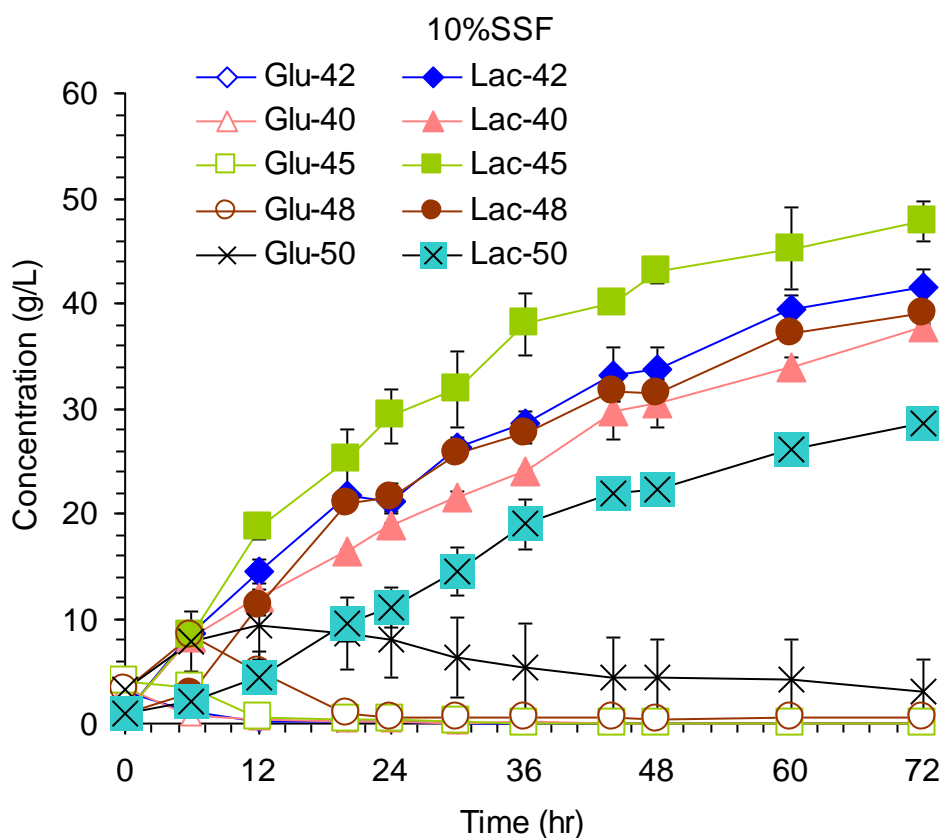


图 3.10 温度对 DQ2 利用玉米芯工业残渣 SSF 生产乳酸的影响

Fig.3.10 Effect of temperature on the lactic acid production of DQ2 during SSF of corncob residues

在40、42、45、48、50°C 5个温度条件下, DQ2利用10%固含量玉米芯残渣为原料进行了SSF, 结果如图3.10所示, 40到45°C时, 最终乳酸浓度随着温度的升高而上升, 45°C时达到最大值为43.11, 进一步升高温度, 获得的乳酸反而减少了。实验结果表明DQ2在SSF体系中的最优温度为45°C。低于45°C时, 糖化速率限制了总的乳酸生成速率; 高于45°C时, 菌体的生长较差, 则是菌体利用糖类产酸的速率影响了总的乳酸生成速率。

表3.4的数据表明玉米芯工业残渣水解液中, 温度对DQ2及TY112的影响极为相似, TY112在水解液中的最适生长温度为42°C, 上述实验中DQ2SSF产酸的最适温度为45°C, 为了简化实验流程, 仅在42、45°C两个温度条件下, 对TY112的SSF进行了对比, 结果如图3.11所示。结果表明, 42、45°C两个温度条件下, TY112SSF产酸速率相当。因为45°C更能平衡玉米芯残渣的酶解与乳酸发酵, 因此选择45°C作为后续SSF的条件。

从表3.4可以看出, ZP26在42、45、48°C三个温度条件下的乳酸产率相当, 48°C更有利于纤维素酶催化分解纤维素。因此, 对于ZP26, 主要对比研究了在48、45°C两个温度条件下的SSF, 结果如图3.12所示, 10%固含量下, 48°C时乳酸产率稍快于45°C。进一

步对比了15%固含量下的SSF，结果如图3.12所示。图3.13的结果表明，虽然48°C时，糖化过程优于45°C，整个过程中，葡萄糖的浓度都高于45°C的，但是ZP26并不能利用，乳酸产量没有提高。因而选择48°C作为ZP26SSF产酸的温度是不必要的，容易导致资源的浪费。因此仍选择45°C作为ZP26SSF产酸的温度，用于后续研究。

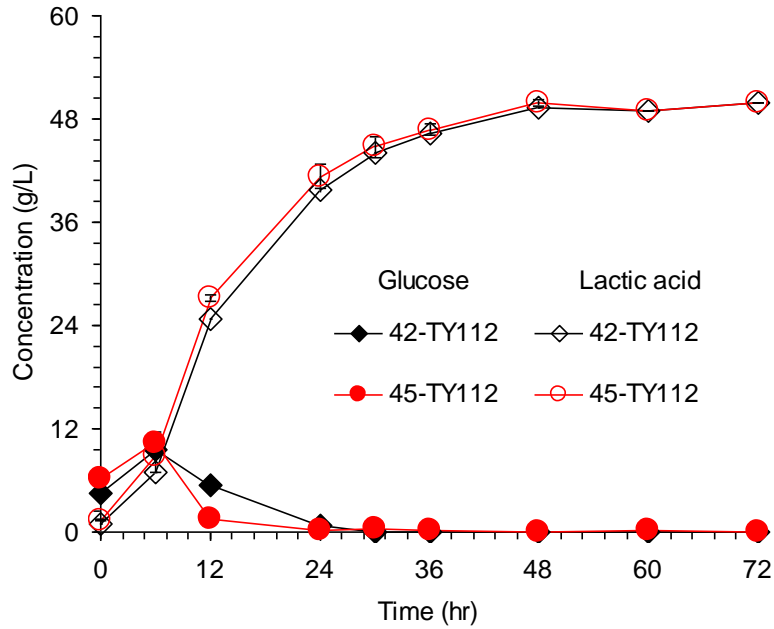


图 3.11 温度对 TY112 利用玉米芯工业残渣 SSF 生产乳酸的影响

Fig.3.11 Effect of temperature on the lactic acid production of TY112 during SSF of corncob residues

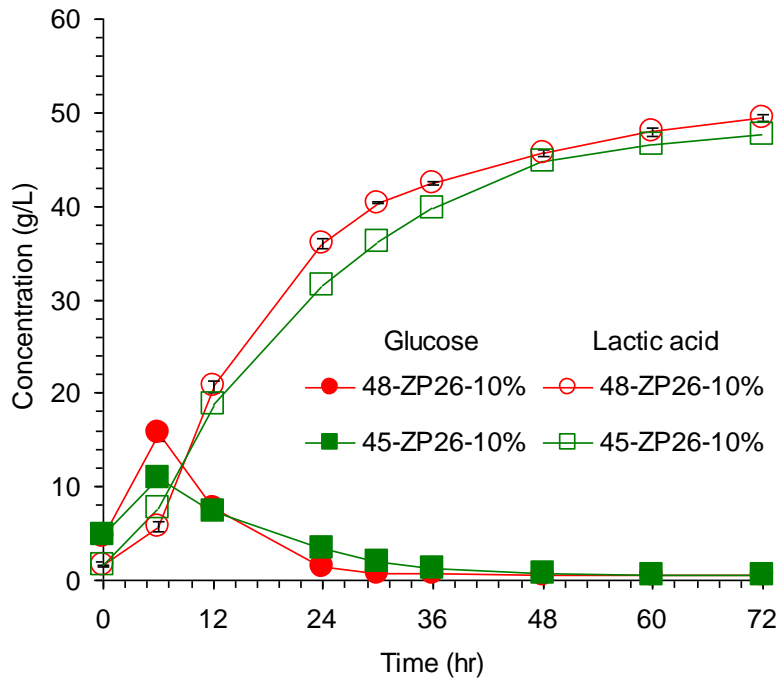


图 3.12 温度对 ZP26 利用玉米芯工业残渣 SSF 生产乳酸的影响-10%

Fig.3.12 Effect of temperature on the lactic acid production of TY112 during SSF of corncob residues-10%

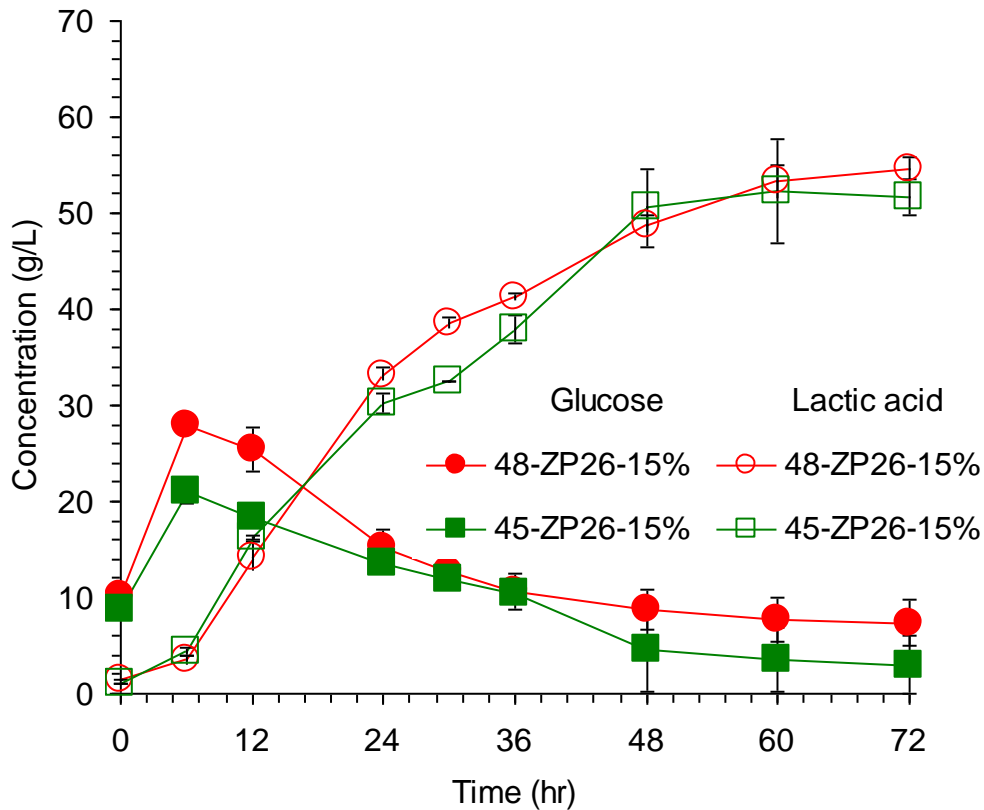


图 3.13 温度对 ZP26 利用玉米芯工业残渣 SSF 生产乳酸的影响-15%

Fig.3.13 Effect of temperature on the lactic acid production of TY112 during SSF of corncob residues-15%

3.4.2 不同固含量的影响

确定了DQ2、TY112及ZP26三株菌SSF的温度条件后，接着研究了不同固含量对DQ2、TY112及ZP26三株菌SSF的影响，进行了5%、10%、15%三个条件下的实验。实验结果如图3.14、3.15、3.16所示。图3.14的结果表明，DQ2、TY112、ZP26三株菌在5%固含量下的乳酸发酵无明显差异，5%固含量下，DQ2的最终乳酸浓度为25.51g/L，TY112的最终乳酸浓度为26.14g/L，ZP26的最终乳酸浓度为27.47g/L，最终乳酸浓度的细微差异可能是SSF体系的细微差异导致的。图3.15的实验结果表明，DQ2和TY112在10%固含量下的乳酸发酵无显著差异，ZP26的乳酸发酵稍弱于前两者，10%固含量下，DQ2的最终乳酸浓度为49.81g/L，TY112的最终乳酸浓度为49.81g/L，ZP26的最终乳酸浓度为47.62g/L，该实验结果与图3.5的实验结果相符。10%固含量下，ZP26的乳酸产量比DQ2及TY112的低了4%。同10%固含量的SSF结果相一致，图3.16的实验结果表明，DQ2和TY112在15%固含量下的乳酸发酵无显著差异，ZP26的乳酸发酵稍弱于前两者，15%固含量下，DQ2的最终乳酸浓度为57.63g/L，TY112的最终乳酸浓度为57.63g/L，ZP26的最终乳酸浓度为51.69g/L，该实验结果与图3.6的实验结果相符。15%固含量下，ZP26的乳酸产量比DQ2及TY112的低了10.3%。

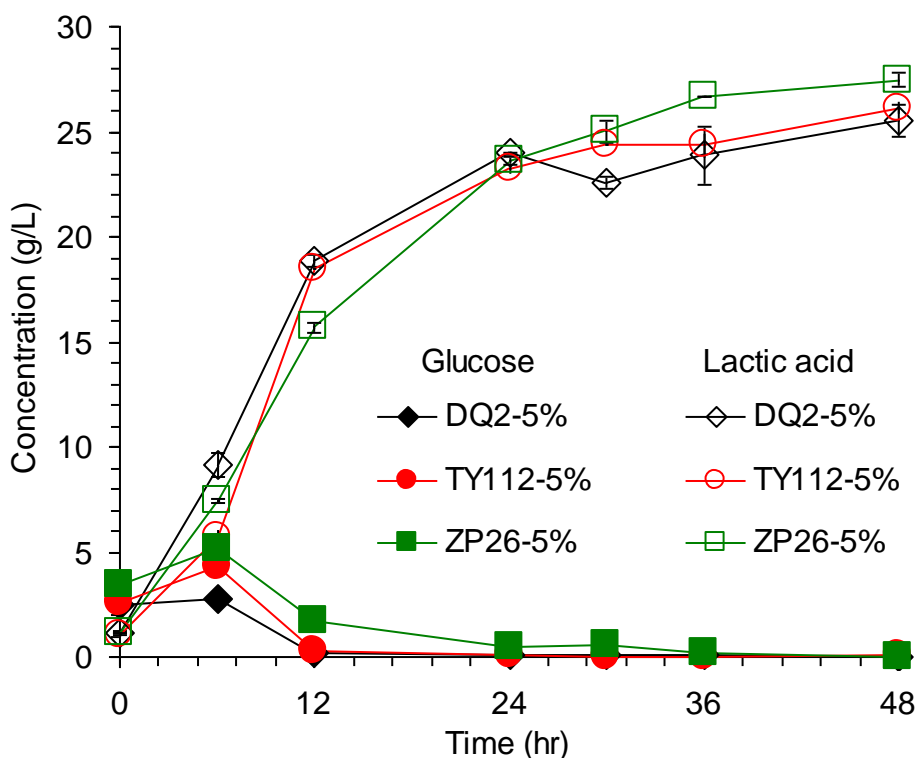


图3.14 5%固含量下SSF

Fig.3.14 SSF of corncob residues at the solid loading of 5%

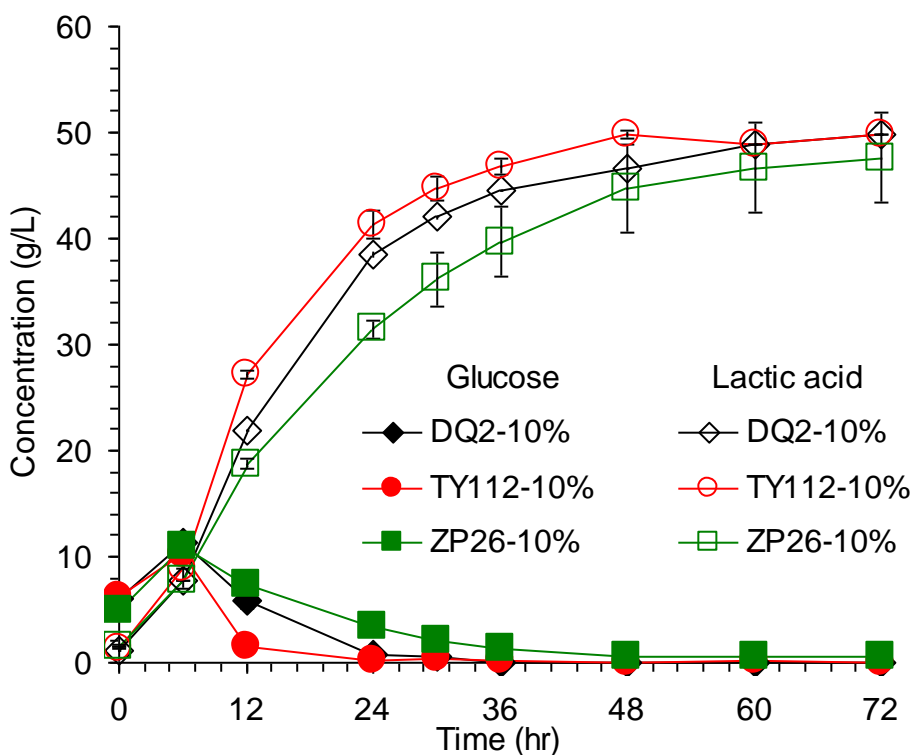


图3.15 10%固含量下SSF

Fig.3.15 SSF of corncob residues at the solid loading of 10%

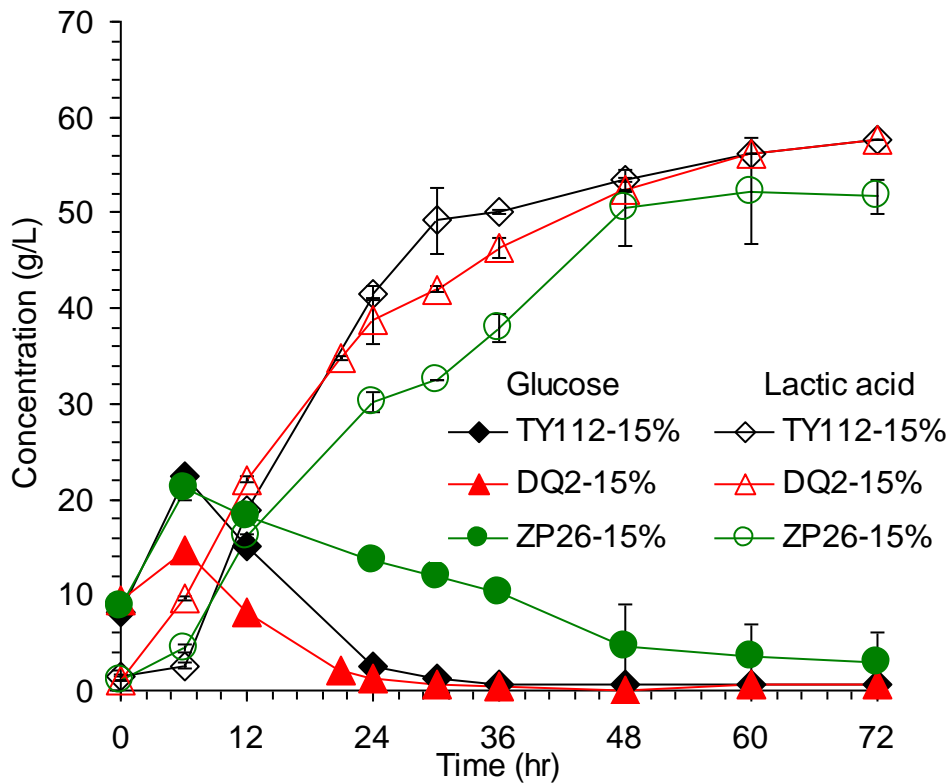


图3.16 15%固含量下SSF

Fig.3.16 SSF of corncob residues at the solid loading of 15%

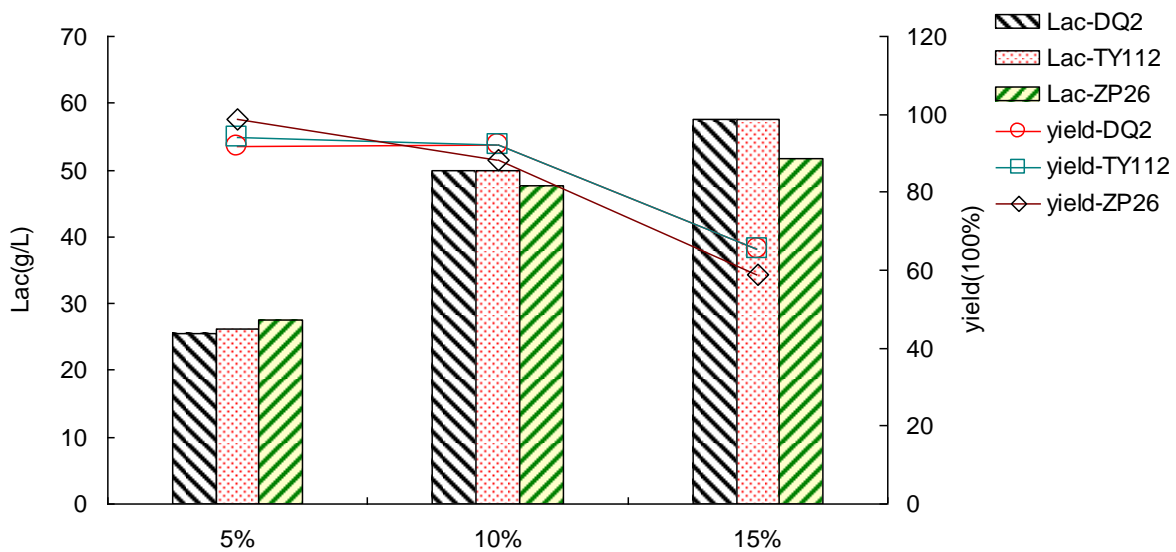


图3.17 不同固含量下乳酸产量及得率

Fig.3.17 The lactic acid production and yield at different solid loading

根据图3.14、3.15、3.16的实验结果计算不同固含量的乳酸得率，结果如图3.17所示。

DQ2、TY112 和 ZP26 的发酵在 5%固含量下差别不大，10%、15%固含量下，ZP26 的乳酸发酵较弱于 TY112 和 DQ2，而后两者的乳酸发酵差别不大。5%固含量下，DQ2 的最终乳酸浓度为 25.51g/L，得率为 91.84%，TY112 的最终乳酸浓度为 26.14g/L，得率为 94.11%，ZP26 的最终乳酸浓度为 27.47g/L，得率为 98.88%。10%固含量下，DQ2 的最终乳酸浓度为 49.81g/L，得率为 92.16%，TY112 的最终乳酸浓度为 49.81g/L，得率为

92.16%，ZP26 的最终乳酸浓度为 47.62g/L，得率为 88.1%。15%固含量下，DQ2 的最终乳酸浓度为 57.63g/L，得率为 65.42%，TY112 的最终乳酸浓度为 57.63g/L，得率为 65.42%，ZP26 的最终乳酸浓度为 51.69g/L，得率为 58.68%。测定 TY112 及 ZP29 所产乳酸构型，TY112 获得乳酸中 99.71%为 L-乳酸，ZP26 获得乳酸中 99.48%为 D-乳酸。

对比发现 5%、10%固含量下，三株菌的乳酸得率都较高，但是固含量增加到 15%时，得率大幅度下降，分析原因可能是乳酸片球菌在 15%高固含量下发酵性能较差及高固含量下糖化得率降低两个因素导致的。分析 15%固含量下 SSF 得率大幅度降低的原因可能是由于高固含量下物料与纤维素酶的混合情况较差，且玉米芯残渣中所含的木质素会吸附纤维素酶，进而影响酶解，从而导致得率的大幅度下降。另一方面，从图中也可以看出，虽然 15%前期产生了更多的可发酵糖，但乳酸的生成速率反而比低固含量更低，分析原因可能是玉米芯残渣中所含的酚类抑制物抑制了菌体的生长。在制取木糖/木糖醇/糠醛等过程中，玉米芯需进行长时间的高温酸水解，而在该过程中，玉米芯中的木质素产生了大量酚类抑制物，酚类抑制物的疏水性导致它不能被水洗除去，从而在玉米芯残渣原料中富集，测定玉米芯残渣中酚类抑制物含量为 19.81mg/gDM，15%水解液中酚类抑制物含量为 0.85g/L。Zhao 等^[26]以酚类化合物中的一种-香兰素为对象，研究了 DQ2 对香兰素的耐受性，实验结果表明，0.3g/L 以上的香兰素即对 DQ2 的乳酸发酵产生严重的抑制。

3.5 SHF 与 SSF 差异原因探索

对比分析DQ2、TY112及ZP26的分步糖化发酵（SHF）及同步糖化发酵（SSF），即 3.4与3.5的实验结果，发现采用SSF模式的乳酸发酵优于SHF，以TY112为例，固含量为 10%时，采用SHF模式，发酵48h可以获得40.2g/L乳酸，采用SSF模式，发酵48h可以获得49.86g/L乳酸，两者差异明显。SHF体系与SSF体系的差异主要是，SHF使用的水解液是通过离心过滤后得到的，分离了固体颗粒与纤维素酶，还有可能是SSF过程中抑制物的含量是逐渐增加的，因此接下来的实验主要从固含量、SSF过程中酚类抑制物含量及纤维素酶三个方面进行验证。

实验组在10%固含量水解液中加入脱除木质素的玉米芯工业残渣，使得整个体系的固含量为10%，对照组则仅是10%固含量水解液。三角形是实验组，菱形是对照组。接种TY112，在42°C、150rpm的条件下进行发酵，同时加入碳酸钙调节pH。实验结果如图 3.18所示，固体颗粒的加入并未对TY112的乳酸发酵产生任何作用，反而导致菌体在12小时后基本不产酸了，分析原因可能是脱除木质素玉米芯工业残渣的加入提高了水解液中酚类抑制物的含量。

排除了固体颗粒的影响后，测定了10%固含量SSF过程中的总酚含量，实验结果如图3.19所示。方型代表的是10%固含量水解液中加入M-MRS组分测定的总酚含量，排除了酵母粉和蛋白胨等有色成分的干扰。从图3.19可以看出SSF过程中总酚含量的变化没有规律性，且前期的总酚含量并未比水解液中的低很多，因此可以排除抑制物的影响。

接着研究了纤维素酶的影响，比较了加入纤维素酶、加入灭活后的纤维素酶以及糖

化48小时后不灭菌直接加入营养盐及菌体进行发酵三组实验的乳酸发酵性能。

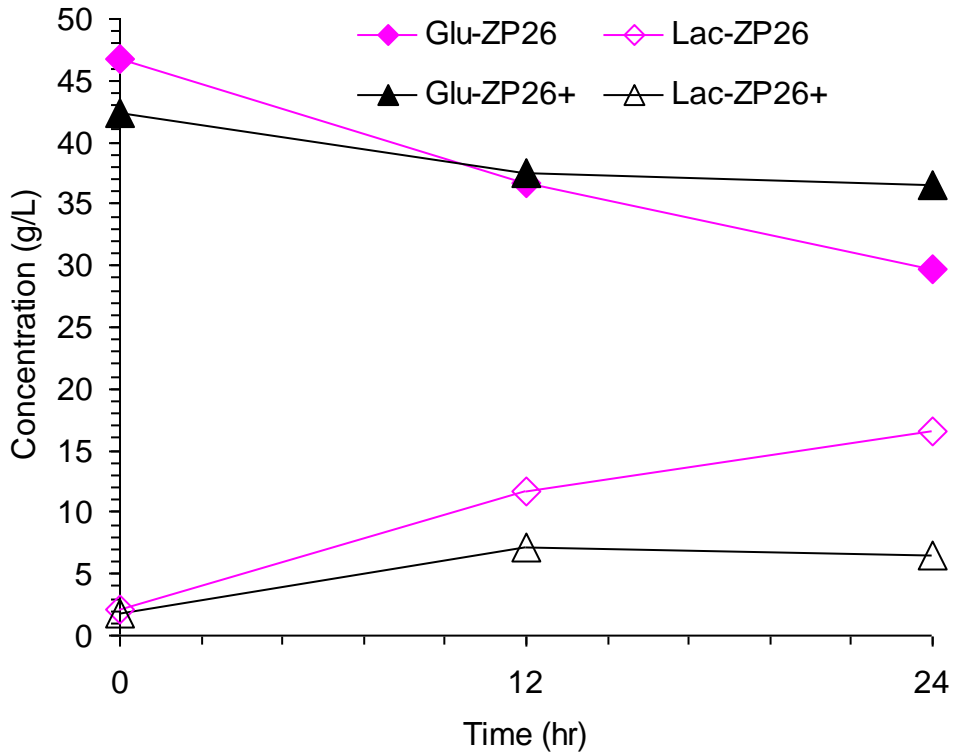


图3.18 固体颗粒的影响
Fig.3.18 The effect of solid particles

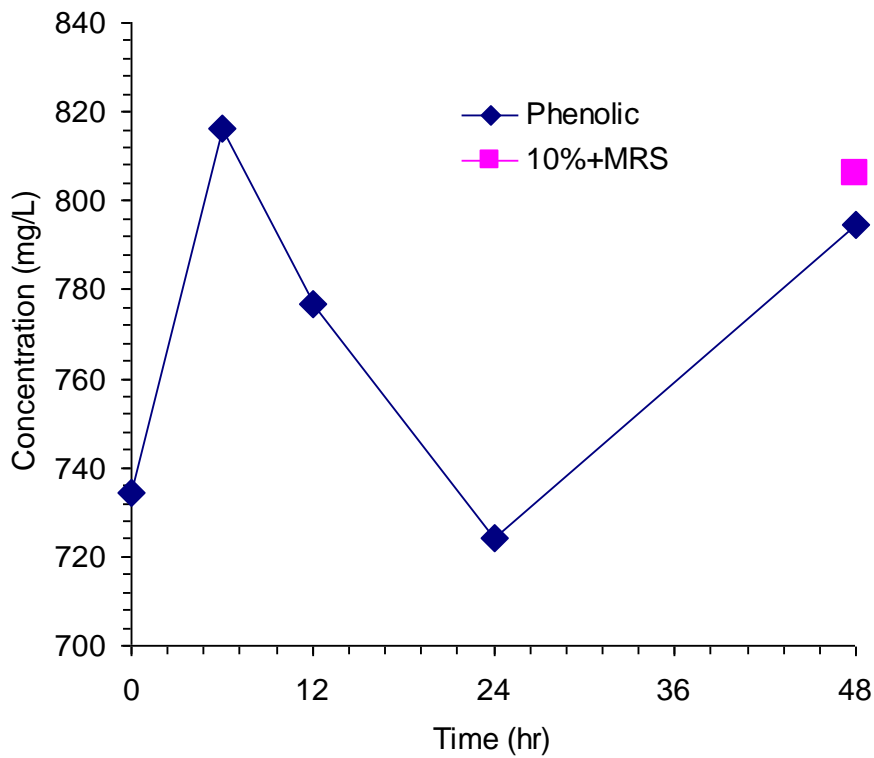


图3.19 10%固含量SSF过程中的总酚含量
Fig.3.19 The effect of solid particles

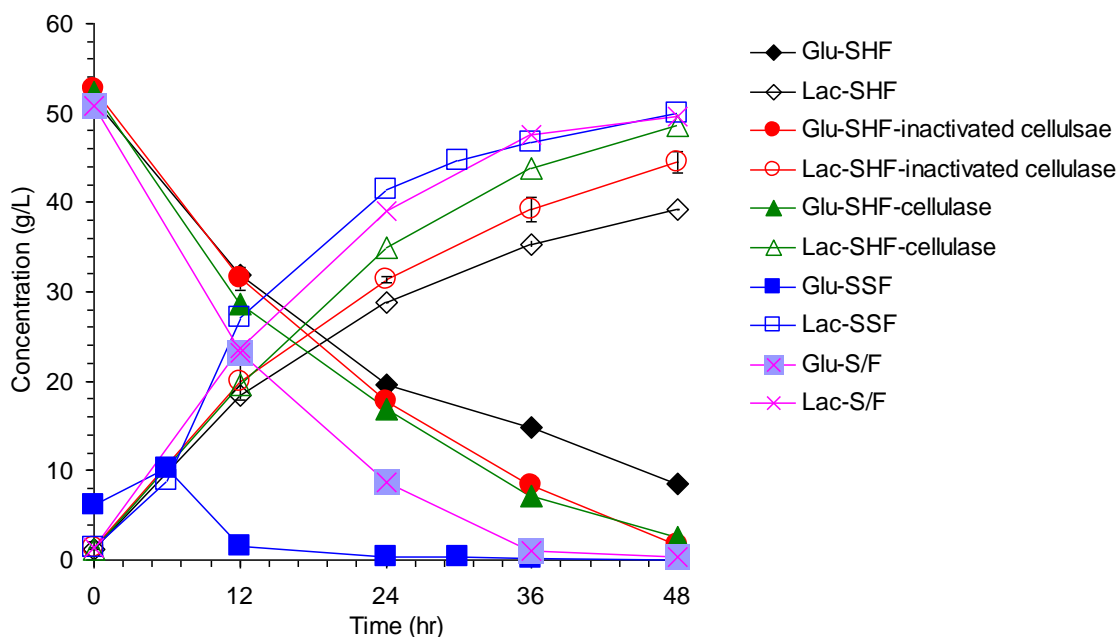


图3.20 纤维素酶的影响

Fig.3.20 The effect of cellulase

实验结果如图3.20所示，圆形代表的是加入灭活的纤维素酶，三角形代表的是加入纤维素酶，从图中可以看出无论加入的纤维素酶是否有活力都对乳酸的生成产生了促进作用，而且有活力的纤维素酶的促进作用更明显。但是两者的乳酸发酵还是弱于SSF体系，分析原因可能是水解液中的糖与营养盐中的氮源在灭菌过程中发生了美拉德反应，产生的有害物质影响了菌体的生长及乳酸发酵，因此又进行了糖化48小时后不灭菌直接加入营养盐及菌体进行发酵的实验。实验结果表明糖化后直接乳酸发酵的乳酸产率与SSF的乳酸产率大致相当，因此可以推断是美拉德反应的影响。根据以上实验可以得出结论，SHF与SSF体系的差异，一方面是纤维素酶的影响，一方面是美拉德反应的影响，至于纤维素酶的促进作用，分析原因可能是纤维素酶作为营养物质促进了菌体的生长及乳酸发酵。

为了研究纤维素酶促进机理，及其他酶能否对乳酸发酵产生促进作用，在 M-MRS 培养基中加入了相同蛋白含量的淀粉糖化酶、液化酶、纤维二糖酶，测定培养 12h 后 DQ2 的 OD 值。实验结果如表 3.5 所示。实验结果表明，糖化酶和纤维二糖酶对乳酸菌的生长都有促进作用，纤维二糖酶的促进作用更明显，液化酶的加入对菌体生长无影响。分析原因可能是纤维二糖酶见光易分解，产生的多肽、氨基酸等更易被 DQ2 利用，因此有效促进了菌体的生长。乳酸片球菌的生长需要多种营养，包括氨基酸、多肽、碱基、维生素、矿物质、脂肪酸和碳水化合物，异亮氨酸、蛋氨酸和赖氨酸的添加直接影响乳酸产率，限制苯丙氨酸、酪氨酸、亮氨酸、缬氨酸浓度的增加对细胞的生长和乳酸产酸的影响最大^[71]。

表 3.5 不同酶（相同蛋白量）对 DQ2 生长的影响
Table 3.5 the effect of different enzymes on the growth of DQ2

OD	control	糖化酶+0.06ml	液化酶+0.438ml	纤维二糖酶+0.17ml
12h	6.39	8.50	5.70	10.22

上述实验也从侧面反映了乳酸片球菌在玉米芯工业残渣体系中未能实现高产率乳酸生产的原因：缺乏营养物质。玉米芯中的蛋白质等营养物质在提取木糖的长时间蒸煮过程中被严重破坏，因此玉米芯工业残渣中几乎不含营养物质，发酵过程中不能为乳酸片球菌的生长提供充足的营养，导致其产率较低。

3.6 凝结芽孢杆菌 B179 的乳酸发酵

乳酸片球菌不适用于以玉米芯工业残渣为原料的乳酸发酵，因此从上海工微所购买了一株产高纯度 L-乳酸的菌株-凝结芽孢杆菌 B179，与其他乳酸菌相比较，凝结芽孢杆菌具有以下优点：对营养的要求不高，可以节约发酵成本；产生孢子的特性简化了菌种的保藏与发酵培养基的接种；可以在 50~55°C 的高温下生长，适用于木质纤维素原料的同步糖化发酵^[75]。

3.6.1 生长曲线

先测定了凝结芽孢杆菌 B179 在含有 20g/L 葡萄糖，10g/L 酵母粉，10g/L 蛋白胨以及 0.25g/L 无水 MgSO₄ 的合成培养基中的生长曲线。冻存管直接接种，培养条件是 50°C，150rpm。结果如图 3.20 所示，前期凝结芽孢杆菌 B179 大约有 5h 的延滞期，5h 后进入对数生长期，快速生长，大约在 12h 进入稳定期，OD 值最大可以达到 3 左右。

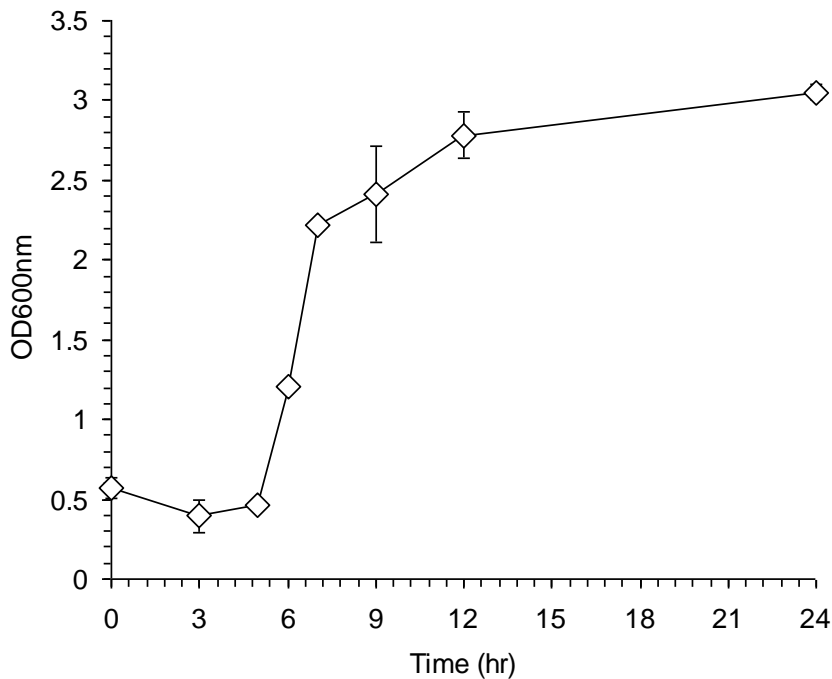


图 3.21 B179 生长曲线

Figure 3.21 The growth curve of B179

3.6.2 不同初糖浓度的影响

接着研究了 B179 对葡萄糖的耐受度, 合成培养基中的初糖浓度分别为 40、100g/L。条件是 50°C, 150rpm, 加入碳酸钙调节 pH。结果如图 3.21 所示, 50°C 下, 初糖浓度为 100g/L 与 40g/L 的乳酸发酵无太大差别, 100g/L 的初糖浓度也未抑制菌体的生长, 发酵 12h 可获得 20g/L 左右的乳酸, 乳酸得率都是 0.87 左右。凝结芽孢杆菌一般可以耐受 100g/L 的葡萄糖浓度, Ou 等使用的 *B. coagulans* 36D1 可以在 LB 培养基中发酵大约 72h, 利用 111.5g/L 葡萄糖产生 103.6g/L 乳酸。

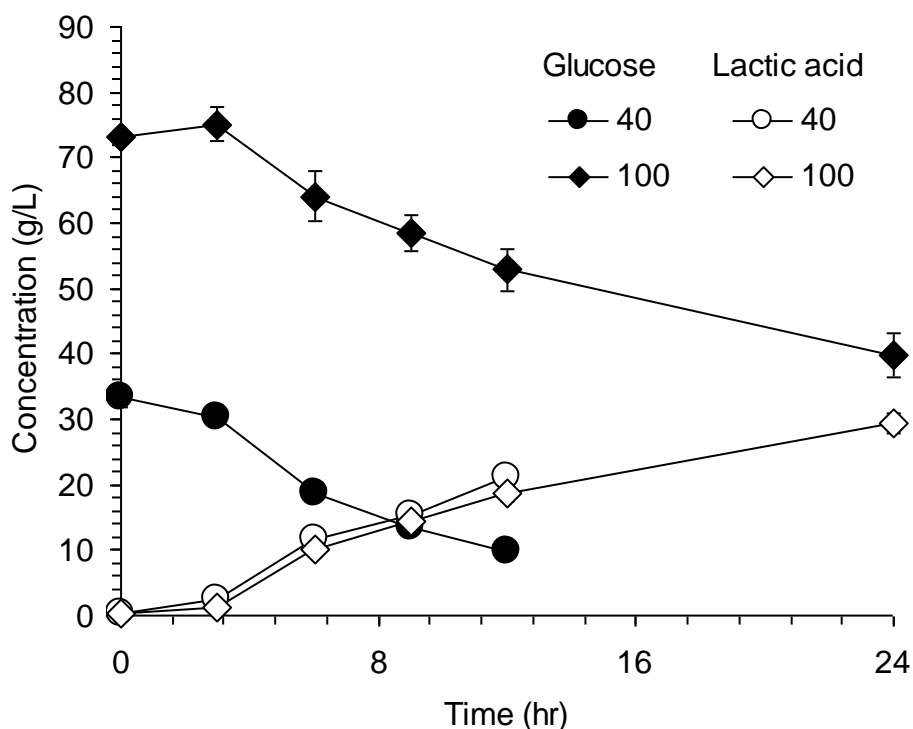


图 3.22 不同初糖浓度的影响

Figure 3.22 The effect of different initial glucose concentration

3.6.3 玉米芯工业残渣水解液中的生长曲线

接着研究 B179 在玉米芯工业残渣水解液中的生长情况。使用的是 15% 固含量的玉米芯残渣水解液, 加入 10g/L 酵母粉, 10g/L 蛋白胨以及 0.25g/L 无水 MgSO₄, 条件为 50°C, 150rpm。菌体先在合成培养基中活化 10h, 后接入水解液培养基中。实验结果如图 3.22 所示, B179 在玉米芯水解液中, 从 0h 就开始生长, 8h 时进入稳定期, OD 值最大可以达到 2.5 左右, 比合成培养基中的稍低。

3.6.4 pH 的影响

pH 对于乳酸菌的生长及产酸至关重要, 因此接着研究了 pH 对 B179 的影响。结果如图 3.23 所示。

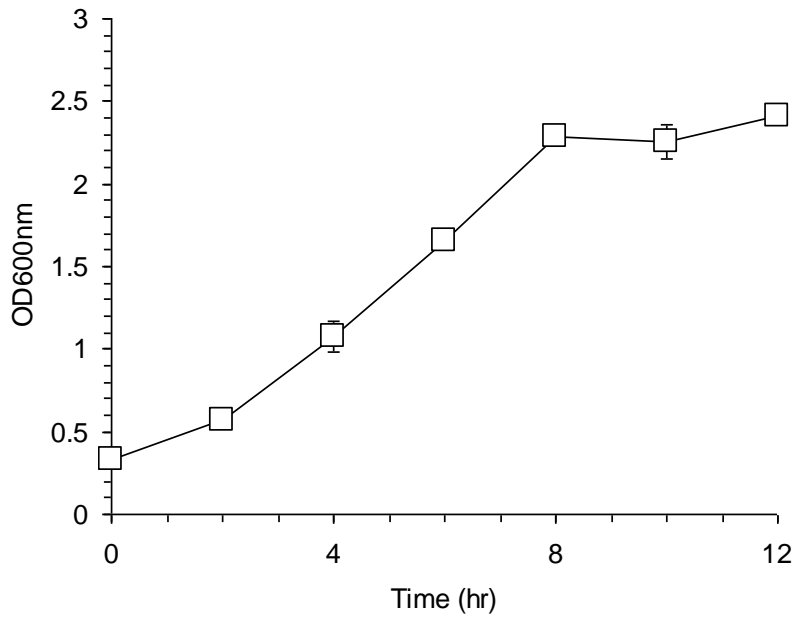


图 3.23 玉米芯残渣水解液中生长曲线

Figure 3.23 The growth curve in the corncob residues hydrolysate

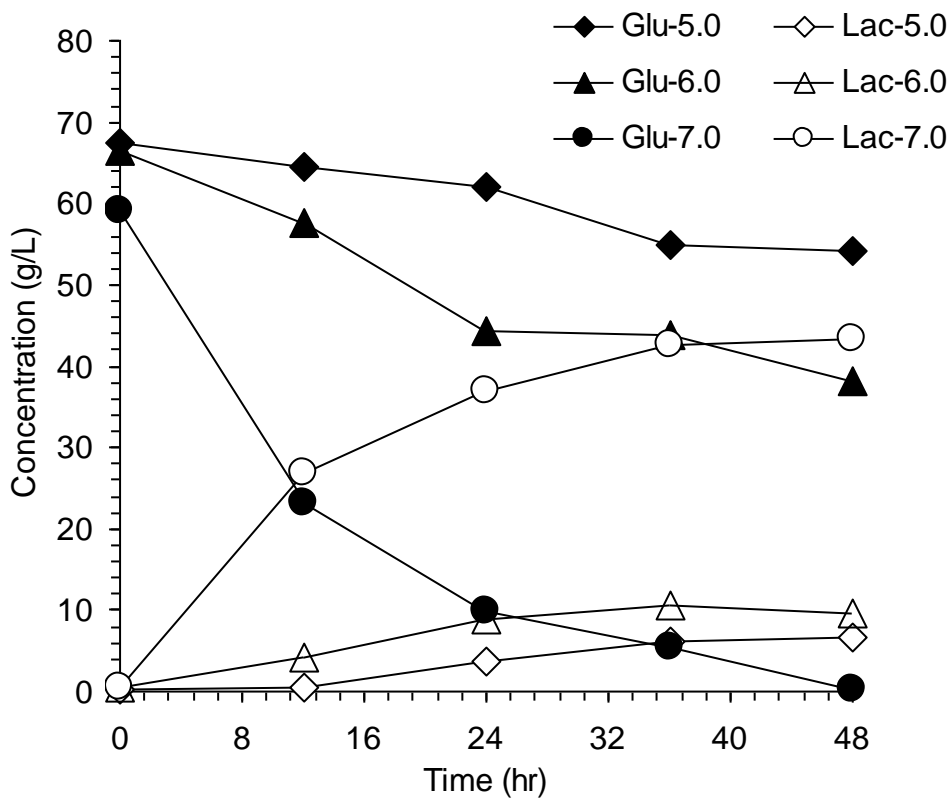


图 3.24 pH 对 B179 乳酸发酵的影响

Figure 3.24 The growth curve in the corncob residues hydrolysate

实验结果如图 3.23 所示, pH 为 7.0 时, 菌体生长及乳酸发酵情况最好, pH7.0 时, 发酵 48h, 葡萄糖已消耗完全, 产生了 43.2g/L 乳酸, 而 pH 为 5.0, 6.0 时, 发酵 48h 还有大量残糖剩余, 只有少量乳酸生成。但是, 以玉米芯残渣为原料的乳酸发酵实验中使用的纤维素酶为酸性纤维素酶, 它的最适 pH 为 4.8, 在 pH 4.0 至 5.0 范围内亦能保持较高的活性, 而在 pH7.0 时会失去活性。因此同步糖化发酵不能在 pH 为 7.0 的条件下进行, 而在 pH 较低的条件下进行发酵, B179 的产酸速率十分的低, 因此接下来的对 B179 进行了长期驯化, 使用的是 pH 为 5.5 的玉米芯残渣水解液培养基。

3.6.5 B179 的长期驯化实验

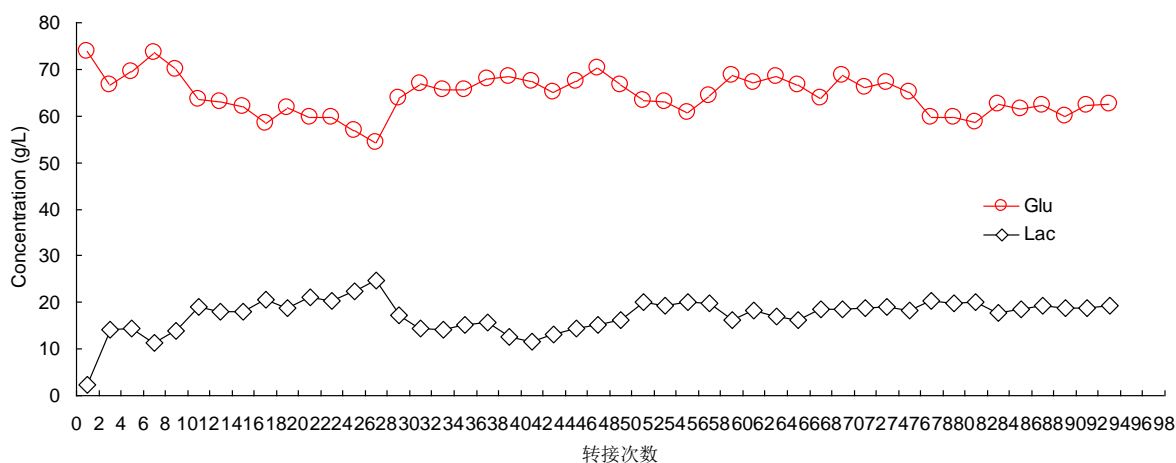


图 3.25 B179 长期驯化

Figure 3.25 Long-time domestication of B179

使用的是 10% 固含量脱木质素玉米芯残渣水解液, 初始 pH 调节为 5.5, 加入 0.6gCaCO₃/g Glucose 调节 pH, 每隔 12h 转接一次, 接种量为 10%, 温度为 50 °C。转接了 93 次获得的驯化菌株, 再进行 15% 玉米芯残渣水解液发酵的验证实验。实验结果如图 3.24 所示。可以利用 15% 固含量玉米芯残渣水解液发酵生产乳酸, 而原始菌株不能利用, 表明驯化实验是成功的。驯化获得的菌株可以用于后续的实验当中。

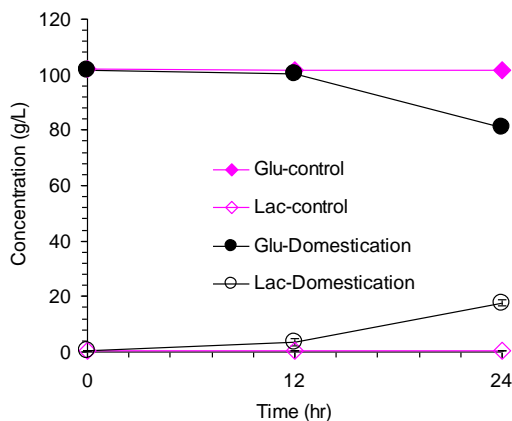


图 3.26 15% 固含量玉米芯残渣水解液的发酵

Figure 3.26 The lactic acid production of 15% solid loading corncob residues

第 4 章 结论和展望

(1) 玉米芯残渣是资源丰富的富含纤维素的木质纤维素原料，是木糖相关工业的废渣。因其富含纤维素，可以用做乳酸发酵的原料，具有原料丰富，价格低廉，不需要进行高强度的预处理等优点。

(2) 高纯度乳酸用途广泛，特别是可用于合成生物降解材料聚乳酸，因而受到越来越多关注。

(3) 本文先研究了酶用量及固含量玉米芯残渣的酶解性能的影响，葡萄糖浓度随着酶用量及固含量的增加而增加，得率也是随着酶用量的增加而增加，然而随着固含量的增加而降低，最后酶用量确定为 15FPU/gDM。

(4) 在 10% 固含量下，对 *Pediococcus acidilactici* DQ2 的 SSF 生产乳酸工艺条件进行了优化，确定最优条件为温度 45°C、pH5.5，不进行预糖化，并尝试用廉价的玉米浆代替营养盐组分中昂贵的酵母粉。在最优条件下，10% 固含量 SSF 可以获得 43.11g/L 乳酸，产率为 0.90g/l/h，得率为 73.4%。30g/L 玉米浆可以代替 10g/L 酵母粉和 10g/L 蛋白胨，有效降低了 98% 的成本。所产乳酸构成为 63.4% 的 L-乳酸和 36.6% 的 D-乳酸。

(5) 为了提高片球乳酸菌所产乳酸的纯度，对 *Pediococcus acidilactici* DQ2 进行了基因改造，分别敲除 *ldhD*、*ldhL*，获得产高光学纯度 L-乳酸的 *Pediococcus acidilactici* TY112 以及产高光学纯度 D-乳酸的 *Pediococcus acidilactici* ZP26。

(6) 分别比较了三株菌在合成培养基、玉米芯残渣水解液、玉米芯残渣 SSF 体系中的乳酸发酵性能，实验结果表明，三株菌在初糖浓度为 50g/L 的合成培养基中的葡萄糖消耗及乳酸生成速率大致相当，发酵 48h 可以完全消耗 43g/L 葡萄糖，产生 36g/L 左右乳酸；接着以 5% 玉米芯残渣水解液为原料，在 37、40、42、45、48、50°C 6 个温度条件下进行了三株菌的乳酸发酵，DQ2 及 TY112 在 6 个温度条件下的乳酸产率及得率差异不大，最优温度为 42 °C，该条件下低温条件下两株菌的乳酸得率为 86% 左右，产率为 1.2g/l/h 左右。ZP26 的最大乳酸产率为 0.97g/l/h，稍低于 DQ2 和 TY112；进一步增加水解液固含量到 10、15%，10% 固含量下，ZP26 的乳酸产量比 DQ2 和 TY112 低了 25%，15% 固含量下，三株菌的乳酸产量一致。SSF 体系中，ZP26 与 TY112 及 DQ2 乳酸产量的差异缩小了，15% 固含量 SSF，ZP26 的乳酸产量比 TY112 及 DQ2 低了 4%。

(7) 对比分析，乳酸片球菌更适用同步糖化与发酵模式。以 10% 固含量为例，采用 SHF 模式时，TY112 发酵 48h 可以获得 40.2g/L 乳酸且有残糖剩余，采用 SSF 模式 TY112 可以获得 49.8g/L 乳酸，进行验证实验，结果表明纤维素酶对乳酸发酵起到了一定促进作用，分析原因可能是起到了营养物质的作用。

(8) 利用玉米芯工业残渣发酵生产乳酸，高固含量下乳酸产率及得率不高，分析原因可能是缺少营养物质，后续工作可尝试调加更多廉价氮源，如酵母水解物等，或选择营养求较低的乳酸生产菌株用于发酵。

(9) 最后研究了另一株生产高纯度 L-乳酸的菌株-凝结芽孢杆菌 B179，利用玉米芯残

渣发酵乳酸的性能，发现该菌株只有在 pH7.0 的条件下才能实现高产率的乳酸生产，不适用 SSF，因此在 pH5.5 的玉米芯残渣水解液中对其进行长期驯化，驯化 93 次后获得的驯化菌株可以利用高固含量的玉米芯残渣水解液，可用于后续实验中。

(10) 本文的研究结果表明，*ldhL*、*ldhD* 的敲除并未降低乳酸片球菌利用玉米芯残渣发酵乳酸的能力，表明工程菌株具有应用于工业规模纤维素乳酸生产的潜力。

参考文献

- [1] Tashiro Y, Kaneko W, Sun Y, Shibata K, Inokuma K, Zendo T, Sonomoto K. Continuous d-lactic acid production by a novel thermotolerant *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* QU 41[J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011, 89: 1741–1750.
- [2] Adnan AFM, Tan IKP. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential[J]. *Bioresour. Technol.* 2007, 98: 1380–1385.
- [3] Nair LS, Laurencin CT. Biodegradable polymers as biomaterials[J]. *Prog. Polym. Sci.* 2007, 32:762–798.
- [4] Yadav AK, Chaudhari AB, Kothari RM. Bioconversion of renewable resources into lactic acid: an industrial view[J]. *Crit Rev Biotechnol.* 2011, 31:1-19.
- [5] Okano K, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H, Kondo A. Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits[J]. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010, 85:413–23.
- [6] Lin Y, Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects[J]. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006, 69: 627–642.
- [7] Balat M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review[J]. *Energy Convers. Manage.* 2011, 52:858–875.
- [8] Abdel-Rahman MA, Tashiro Y. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits[J]. *Journal of Biotechnology.* 2011, 156:286-301
- [9] Balat M. Gasification of biomass to produce gaseous products[J]. *Energy Source.* 2009, 31:516–526.
- [10] Holtzapple MT. Chapters cellulose, hemicellulose, and lignin. In: Macrae, R., Robinson, R.K., Sadler, M.J. (Eds.). *Encyclopedia of Food Science, Food technology, and Nutrition.* 1993, Academic Press, London.
- [11] Saha BC. Alpha-l-arabinofuranosidases—biochemistry, molecular biology and application in biotechnology[J]. *Biotechnol. Adv.* 2000, 18: 403–423.
- [12] Taherzadeh MJ, Karimi K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review[J]. *Int. J. Mol. Sci.* 2008, 9: 1621–1651.
- [13] Schmidt AS, Thomsen AB. Optimization of wet oxidation pretreatment of wheat straw[J]. *Bioresour. Technol.* 1998, 64:139–151.
- [14] Hendriks AT, Zeeman G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass[J]. *Bioresour. Technol.* 2009, 100: 10–18.
- [15] Kodali B, Pogaku R. Pretreatment studies of rice bran for the effective production of cellulose[J]. *Electron J. Environ. Agric. Food Chem.* 2006, 5: 1253–1264.
- [16] 齐祥, 苏肇秦, 唐勇, 蒋建新. 木质纤维素发酵转化乳酸研究进展[J]. *现代农业科技.* 2010, 5:11-13
- [17] Shen XL, Xia LM. Lactic acid production from cellulosic material by synergetic hydrolysis and fermentation[J]. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2006, 133: 251–262.
- [18] 朱锦明. 纤维素原料高温催化降解产乙酰丙酸的研究. *宁夏农林科技.* 2012, 53 (05) :

108-109

- [19] 史秀丽, 徐海娜. 平菇栽培平菇试验. 食用菌. 2005, 27 (3) : 25
- [20] 李秋园, 胡彩静, 刘建军, 夏黎明. 利用木糖渣生产酒精的研究. 食品与发酵工业. 2003, 29(5):74-76
- [21] 杜辉. 用木塘渣联产乳酸和聚氨基葡萄糖的条件优化[D]. 2010. 山东建筑大学
- [22] 王丽红. 木糖渣生物转化产乳酸的初步研究. 唐山师范学院学报. 2010, 32 (5) :4-7
- [23] 孙甜甜. 木糖渣酶水解及 L-乳酸发酵的研究[D]. 2011. 郑州大学
- [24] Tang Y, Zhao Dq, Cristhian C and Jiang Jx. Simultaneous saccharification and cofermentation of lignocellulosic residues from commercial furfural production and corn kernels using different nutrient media[J]. Biotechnology for Biofuels. 2011, 4:22.
- [25] Cui F, Li Y, Wan C. Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*[J]. Bioresour. Technol. 2011, 102: 1831–1836.
- [26] Zhao K, Chu DQ, Gu HQ, Dao TH, Zhang J, Bao J. Simultaneous saccharification and high titer lactic acid fermentation of corn stover using a newly isolated lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* DQ2[J]. Bioresource Technology. 2013, 135: 481
- [27] Zhang Y, Pan Z, Zhang R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production[J]. Int. J. Agric. Biol. Eng. 2009, 2:51–68.
- [28] Wooley R, Ruth M, Glassner D, Sheehan J. Process design and costing of bioethanol technology: a tool for determining the status and direction of research and development[J]. Biotechnol. Prog. 1999, 15: 794–803.
- [29] Budhavaram NK, Fan Z. Production of lactic acid from paper sludge using acid-tolerant, thermophilic *Bacillus coagulans* strains[J]. Bioresour Technol. 2009, 100:5966–72.
- [30] Litchfield JH. Lactic acid, microbially produced. In: Schaechter Mosel O, editor. Encyclopedia of microbiology. Oxford: Academic Press; 2009. p. 362–72.
- [31] Singh SK, Ahmed SU, Pandey A. Metabolic engineering approaches for lactic acid production[J]. Process Biochem. 2006, 41:991-1000.
- [32] Kyla-Nikkila K, Hujanen M, Leisola M, Palva A. Metabolic engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for production of pure L-(+)-lactic acid[J]. Appl Environ Microbiol. 2000, 66:3835–41.
- [33] Zhou S, Shanmugam KT, Ingram LO. Functional replacement of the *Escherichia coli* D(-)-Lactate dehydrogenase gene (*ldhA*) with the L-(+)-Lactate dehydrogenase gene (*ldhL*) from *Pediococcus acidilactici*[J]. Appl Environ Microbiol. 2003, 69:2237–44.
- [34] Zhou S, Causey TB, Hasona A, Shanmugam KT, Ingram LO. Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110[J]. Appl Environ Microbiol. 2003, 69:399–407.
- [35] Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes[J]. Biotechnology Advances. 2013 (31): 877–902
- [36] Hofvendahl K, Hahn-Hägerdal B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources[J]. Enzyme Microb Technol. 2000, 26:87-107.

- [37] Wang Q, Zhao X, Chamu J, Shanmugam KT. Isolation, characterization and evolution of a new thermophilic *Bacillus licheniformis* for lactic acid production in mineral salts medium[J]. *Bioresour Technol* 2011,102:8152–8.
- [38] Meng Y, Xue Y, Yu B, Gao C, Ma Y. Efficient production of L-lactic acid with high optical purity by alkaliphilic *Bacillus* sp. WL-S20[J]. *Bioresour Technol*. 2012,116:334–9.
- [39] Maas RH, Bakker RR, Jansen ML, Visser D, de Jong E, Eggink G, Weusthuis RA. Lactic acid production from lime-treated wheat straw by *Bacillus coagulans*: neutralization of acid by fed-batch addition of alkaline substrate[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008,78:751–8.
- [40] Ou MS, Ingram LO, Shanmugam KT. L-(+)-Lactic acid production from non-food carbohydrates by thermotolerant *Bacillus coagulans*[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2011,38:599–605.
- [41] Patel MA, Ou MS, Harbrucker R, Aldrich HC, Buszko ML, Ingram LO, ShanmugamKT. Isolation and characterization of acid-tolerant, thermophilic bacteria for effective fermentation of biomass-derived sugars to lactic acid[J]. *Appl Environ Microbiol*. 2006,72:3228–323.
- [42] Qin J, Zhao B, Wang X, Wang L, Yu B, Ma Y, Ma C, Tang H, Sun J, Xu P. Non-sterilized fermentative production of polymer-grade L-lactic acid by a newly isolated thermophilic strain *Bacillus* sp. 2-6[J]. *PLoS One*. 2009,4:e4359.
- [43] Ouyang J, Cai C, Chen H. Efficient Non-sterilized Fermentation of Biomass-Derived Xylose to Lactic Acid by a Thermotolerant *Bacillus coagulans* NL01[J]. *Appl Biochem Biotechnol* (2012) 168:2387–2397
- [44] Zhou S, Causey TB, Hasona A, Shanmugam KT, Ingram LO. Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110[J]. *Appl Environ Microbiol*. 2003,69:399–407.
- [45] Zhou S, Shanmugam KT, Ingram LO. Functional replacement of the *Escherichia coli* D-(–)-Lactate dehydrogenase gene (*ldhA*) with the L-(+)-Lactate dehydrogenase gene (*ldhL*) from *Pediococcus acidilactici*[J]. *Appl Environ Microbiol*. 2003,69:2237–44.
- [46] Yukawa H, Omumasaba CA, Nonaka H, Kos P, Okai N, Suzuki N, Suda M, Tsuge Y, Watanabe J, Ikeda Y, Vertès AA, Inui M. Comparative analysis of the *Corynebacterium glutamicum* group and complete genome sequence of strain R [J]. *Microbiology*. 2007, 153:1042–58.
- [47] Kawaguchi H, Vertès AA, Okino S, Inui M, Yukawa H. Engineering of a xylose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Appl Environ Microbiol*. 2006, 72:3418–28.
- [48] Kawaguchi H, Sasaki M, Vertès AA, Inui M, Yukawa H. Engineering of an L-arabinose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008,77:1053–62.
- [49] Jia X, Liu P, Li S, Li S, Wen J. D-Lactic acid production by a genetically engineered strain *Corynebacterium glutamicum*[J]. *World J Microbiol Biotechnol*. 2011,27:2117–24.
- [50] Bai DM, Li SZ, Liu ZL, Cui ZF. Enhanced L-(+)-lactic acid production by an adapted strain of *Rhizopus oryzae* using corn cob hydrolysate[J]. *Appl Biochem Biotechnol*.

2008,144:79–85.

[51] Wu X, Jiang S, Liu M, Pan L, Zheng Z, Luo S. Production of L-lactic acid by *Rhizopus oryzae* using semicontinuous fermentation in bioreactor[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2011,38:565–71.

[52] Bulut S, Elibol M, Ozer D. Effect of different carbon sources on L-(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*[J]. *Biochem Eng J*.2004,21:33–7.

[53] Zhang ZY, Jin B, Kelly JM. Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus fungi*[J]. *Biochem Eng J*. 2007,35:251–63.

[54] Maneeboon T, Vanichsriratana W, Pomchaitaward C, Kitpreechavanich V. Optimization of lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* in 3-L airlift bioreactor using response surface methodology[J]. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010,161:137–46.

[55] Liu T, Miura S, Yaguchi M, Arimura T, Park EY, Okabe M. Scale-up of L-Lactic acid production by mutant strain *Rhizopus sp.* Mk-96-1196 from 0.003 m³ to 5 m³ in airlift Bioreactors[J]. *J Biosci Bioeng*. 2006,101:9-12.

[56] Bai DM, Jia MZ, Zhao XM, Ban R, Shen F, Li XG, Xu SM. L-(+)-lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* R1021 in a stirred tank fermentor[J]. *Chem Eng Sci*. 2003, 58:785–91.

[57] Kumar R, Singh S, Singh OV. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives[J]. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 2008, 35: 377–391.

[58] Chang VS, Holtzapple M. Fundamentals factors affecting biomass reactivity[J]. *Appl. Biochem. Biotechnol*. 2000, 84–86, 5–37.

[59] Bojesson J, Engqvist M, Sipos B, Tjerneld F. Effect of poly (ethylene glycol) on enzymatic hydrolysis and adsorption of cellulase enzymes to pretreated lignocellulose[J]. *Enzyme Microb. Technol*. 2007, 41: 186–195.

[60] 岳军, 姚兰, 赵建, 李雪芝, 曲音波. 木糖渣的有机溶剂预处理及酶解性能. *化工学报*.2011, 62 (11) : 3256-3262

[61] Mussatto SI, Roberto IC. Alternatives for detoxification of diluted acid lignocellulosic hydrolysates for use in fermentative process: a review[J]. *Bioresour.Technol*. 2004, 93: 1–10.

[62] Walton SL, Bischoff KM, Heiningen APRV, Walsum GPV. Production of lactic acid from hemicellulose extracts by *Bacillus coagulans* MXL-9[J].*J Ind Microbiol Biotechnol*.2010 37:823–830.

[63] Adsul MG, Khire JM, Bastawade KB, Gokhale DV. Lactic acid production from cellobiose and celotriose by *Lactobacillus delbrueckii* mutant Uc-3[J]. *Appl. Environ. Microbiol*. 2007, 73:5055–5057.

[64] Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Zendo T, Hanada K, Shibata K, Sonomoto K. Efficient homofermentative L-(+)-lactic acid production from xylose by a novel lactic acid bacterium, *Enterococcus mundtii* QU 25[J]. *Appl Environ Microbiol*. 2011,77:1892–5.

[65] Okano K, Yoshida S, Yamda R, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H, Kondo A. Improved production of homo-D-lactic acid via xylose fermentation by introduction of xylose assimilation genes and redirection of the phosphoketolase pathway to pentose phosphate

pathway in L-lactate dehydrogenase gene-deficient *Lactobacillus plantarum*[J]. *Appl Environ Microbiol.* 2009,75:7858–61.

[66] Min-Tian G, Koide M, Gotou R, Takanashi H, Hirata M, Hano T. Development of a continuous fermentation system for production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus*[J]. *Process Biochem.* 2005, 40: 1033–1036.

[67] LAP-006, Measurement of cellulase activities, NREL, 1996.8.12

[68] Measurement of cellulase activities, *Pure&Appl, Chem.*, 1987, 59: 257-268

[69] Guo W, Jia W, Li Y, Chen S. Performances of *Lactobacillus brevis* for producing lactic acid from hydrolysate of lignocellulosics[J]. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010, 161: 124–136.

[70] Sasaki C, Okumura R, Asakawa A, Asada C, Nakamura Y. Effects of washing with water on enzymatic saccharification and D-lactic acid production from steam-exploded sugarcane bagasse[J]. *J Mater Cycles Waste Manag.* 2012, 14: 234–240.

[71] Sriphochanart W, Skolpap W, Scharer JM, Moo-Young M and Douglas PL. Effect of amino acid requirements on the growth and lactic acid production of *Pediococcus acidilactici* culture[J]. *African Journal of Microbiology Research.* 2011, 5: 3815-3822.

[72] Li Z, Han L, Ji YZ, Wang XN, Tan TW. Fermentative production of L-lactic acid from hydrolysate of wheat bran by *Lactobacillus rhamnosus*[J]. *Biochemical Engineering Journal.* 2010, 49: 138–142.

[73] Kyla-Nikkila K, Hujanen M, Leisola M, Palva A. Metabolic Engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for Production of Pure L-(+)-Lactic Acid[J]. *Appl Environ Microbiol.* 2000, 66: 3835–41.

[74] Ferain T, J N Hobbs, Jr J Richardson, N Bernard, D Garmyn, P Hols, N E Allen, and J Delcour. Knockout of the two *ldh* genes has a major impact on peptidoglycan precursor synthesis in *Lactobacillus plantarum*[J]. *J. Bacteriol.* 1996, 178: 5431–5437.

[75] 田康明, 石贵阳, 王正祥. 凝结芽孢杆菌CICIM B1821发酵生产L-乳酸的研究. *食品工业科技* 2011 (10): 245-276

致谢

本论文是在鲍杰教授的悉心指导下完成的。鲍老师在学术上博学多识，思维缜密，与您的每一次交谈我总能获得很多的启迪，这种启迪潜移默化间培养了我研究生期间分析问题以及解决问题的能力。在研究思路及研究方法和试验方案的制定上您给予了关键性的指导，在论文的撰写中，您进行了仔细地审阅和修改，在这三年的学习生活中，您也给予了我无私的关心和帮助，使我能够顺利完成学业。您严谨的治学态度、忘我的工作热情、渊博的专业知识和丰富的实践经验都将使我受益终生。在此向鲍老师表示我衷心的感谢，祝愿您在以后的生活中每天开心，在工作中取得更高的成就。

感谢胡凤仙老师、张建老师在实验中对我的指导和教育以及在生活中对我的关心和帮助。感谢张建老师在研究思路及研究方法上给予的指导及在论文修改上付出的劳动。