

学校代码：10251  
学 号：030120963

# 華東理工大學

## 硕士学位论文

论文题目 木质纤维素原料生物转化生产手性乳酸

单体的生物炼制技术研究

学科专业

生物化工

研究方向

生物质能源

论文作者

孙娇娥

指导教师

鲍杰 教授

定稿日期： 2015 年 06 月 02 日



分类号: Q814 密级: \_\_\_\_\_

U D C: \_\_\_\_\_

# 华东理工大学

## 学位论文

木质纤维素原料生物转化生产手性乳酸

单体的生物炼制技术研究

孙娇娥

指导教师姓名: 鲍杰 教授

华东理工大学生物工程学院

申请学位级别: 硕士 专业名称: 生物化工

论文定稿日期: 2015. 06. 02 论文答辩日期: 2015. 06. 02

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: \_\_\_\_\_

答辩委员会主席: 钟建江 教授

评 阅 人: 于洪巍 教授

夏小霞 研究员



# 华东理工大学研究生学位论文提交要求

根据校学位评定委员会要求，研究生学位论文全文（含纸质版和电子版）必须提交档案馆保存。

研究生学位论文全文电子版由档案馆按\_\_\_\_\_（选择以下一项）方式，转交或不转交图书馆，并提供公开阅览服务。

- ①  可以公开
- ②  3年后公开
- ③  10年后公开
- ④  不公开

注：选择②、③或④的需经学校国家技术转移中心备案，以为学校技术转移提供服务。

学位论文作者签名：

年 月 日

指导教师签名：

年 月 日

国家技术转移中心负责人签名：

（公章）

年 月 日



## 作者声明

我郑重声明：本人恪守学术道德，崇尚严谨学风。所提交的学位论文，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



## 木质纤维素原料生物转化生产手性乳酸单体的生物炼制技术研究

### 摘要

利用农作物秸秆原料代替粮食,通过生物炼制技术生产用于制造聚乳酸材料的手性乳酸单体,对于节粮代粮,提高自然资源利用率,保护环境清洁,以及降低乳酸生产成本都具有十分重要的意义。本文首先对基因敲除改造菌株 *Pediococcus acidilactici* TY112 进行表征,证实该菌株能够发酵生产光学纯度高达 99.9% 以上的 L-乳酸,而且具有耐高温,耐预处理木质纤维素体系抑制物等特性。然后,利用脱木质素玉米芯残渣和玉米秸秆对 *P. acidilactici* TY112 分别进行短期和长期的驯化培养,发现该基因工程菌在上述两种培养体系中的代谢能力稳定。最后,玉米秸秆经干式稀酸预处理、生物脱毒和磨浆处理之后,在 5 L 螺带搅拌桨生物反应器中进行高固体含量玉米秸秆乳酸发酵。在 15 FPU/g DM 纤维素酶用量下,30% (w/w) 固含量玉米秸秆进行同步糖化与 L-乳酸发酵实验,L-乳酸的浓度、得率、产率和光学纯度分别为 104.4 g/L、71.5%、1.45 g/L/h、99.9%,达到了目前木质纤维素原料发酵 L-乳酸技术的最高指标,为未来产业化应用打下良好的基础。同时,本文还对产 D-乳酸的基因工程菌 *P. acidilactici* ZP26 利用 25% (w/w) 固含量玉米秸秆进行同步糖化与 D-乳酸发酵的实验,结果表明,D-乳酸的浓度、得率、产率和光学纯度分别为 75.2 g/L、66.0%、1.04 g/L/h、99.3%。

**关键词:** *Pediococcus acidilactici* TY112; 玉米秸秆; SSF; 手性乳酸

## Studies on the Biorefinery Processing Technology for Production of Chiral Lactic Acid Using Lignocellulosic Feedstock

### Abstract

Biotechnological production of chiral lactic acid to produce biodegradable plastics polylactide (PLA) utilizing excess crop straw materials as substrate instead of starch has gained considerable attention. This technology provides an alternative to saving foodstuff, raising natural resource utilization, reducing environmental pollution, and reducing material cost etc. Firstly, the characterization of the engineered strain *Pediococcus acidilactici* TY112 was investigated. It was confirmed that the strain could produce at least 99.9% optical purity L-lactic acid, and meanwhile, had high thermo-tolerance, high resistance to the lignocellulose derived inhibitors. Secondly, the short-term and long-term adaptation of *P. acidilactici* TY112 using corncob residues and corn stover were conducted, respectively. It was found that the lactate production of the engineered strain were considerably stable in the two culture systems. Finally, the SSF for high titer L-lactate and D-lactate production at high solids loading from corn stover by *P. acidilactici* TY112 and *P. acidilactici* ZP26 were conducted, respectively. The 5 L bioreactor with a novel helical impeller was used to the SSF operation of the pretreated, biodetoxified and milled corn stover. The L-lactic acid titer, yield, productivity and optical purity reached 104.4 g/L, 71.5%, 1.45 g/L/h, and 99.9%, respectively, under a typical SSF operation at 30% (w/w) solids loading and 15 FPU/g DM cellulase. The result was the highest of cellulosic lactic acid production at present, which provided a great potential for the future commercial application. The D-lactic acid titer, yield, productivity and optical purity reached 75.2 g/L, 66.0%, 1.04 g/L/h, and 99.3%, respectively, at 25% (w/w) solids loading.

**Keywords:** *Pediococcus acidilactici* TY112; corn stover; SSF; chiral lactic acid

## 目录

第 1 章 文献综述.....	1
1.1 乳酸概况.....	1
1.1.1 乳酸的结构和性质.....	1
1.1.2 乳酸的用途.....	1
1.2 乳酸生产技术.....	3
1.2.1 乳酸生产方法.....	3
1.2.2 乳酸发酵菌株.....	4
1.2.3 乳酸生产原料.....	8
1.3 乳酸菌高密度培养.....	9
1.3.1 高密度培养的定义.....	10
1.3.2 影响高密度培养的因素.....	10
1.3.3 高密度培养的优势.....	11
1.4 乳酸菌细胞絮凝.....	11
1.4.1 微生物絮凝剂.....	12
1.4.2 絮凝剂活性成分及其检测方法.....	12
1.4.3 絮凝机理.....	13
1.5 木质纤维素原料生物炼制生产乳酸.....	13
1.5.1 预处理.....	14
1.5.2 脱毒.....	15
1.5.3 水解.....	16
1.5.4 乳酸发酵.....	17
1.6 存在的问题.....	18
1.7 本论文主要研究内容.....	19
第 2 章 材料与amp;方法.....	21
2.1 前言.....	21
2.2 菌种与培养基.....	21
2.2.1 菌种.....	21
2.2.2 培养基.....	21
2.3 试剂与仪器.....	22

2.4	原料与酶制剂.....	24
2.5	基因工程菌的表征.....	24
2.5.1	培养温度和培养方式对菌体生长的影响.....	24
2.5.2	乳酸菌生长曲线.....	24
2.5.3	抑制物对菌体生长和发酵的影响.....	24
2.5.4	不同初始葡萄糖浓度对发酵的影响.....	25
2.6	<i>P. acidilactici</i> TY112 驯化培养.....	25
2.6.1	短期驯化培养.....	25
2.6.2	长期驯化培养.....	25
2.7	脱木质素玉米芯残渣同步糖化与乳酸发酵.....	25
2.8	营养对乳酸片球菌发酵的影响.....	25
2.8.1	YE 浓度对玉米芯残渣水解液乳酸发酵体系的影响.....	25
2.8.2	YE 浓度对脱木质素玉米芯残渣水解液乳酸发酵体系的影响.....	26
2.9	玉米秸秆同步糖化与乳酸发酵.....	26
2.9.1	预处理.....	26
2.9.2	脱毒.....	26
2.9.3	磨浆.....	26
2.9.4	同步糖化与发酵操作(simultaneous saccharification and fermentation, SSF) .....	26
2.9.5	脱毒时间对抑制物含量和发酵的影响.....	27
2.9.6	糖化酶对菌体生长的影响.....	27
2.9.7	提高种子液菌体生物量和活性对发酵的影响.....	27
2.10	分析方法.....	28
第3章 实验结果与讨论.....		29
3.1	基因工程菌的表征.....	29
3.1.1	培养温度和培养方式对菌体生长的影响.....	29
3.1.2	乳酸菌生长曲线.....	31
3.1.3	抑制物对菌体生长和发酵的影响.....	32
3.1.4	不同初始葡萄糖浓度对发酵的影响.....	35
3.2	<i>P. acidilactici</i> TY112 驯化培养.....	36
3.2.1	短期驯化培养.....	36
3.2.2	长期驯化培养.....	37
3.3	脱木质素玉米芯残渣同步糖化与乳酸发酵.....	39
3.4	营养对乳酸片球菌发酵的影响.....	40

---

3.4.1 YE 浓度对玉米芯残渣水解液乳酸发酵体系的影响.....	40
3.4.2 YE 浓度对脱木质素玉米芯残渣水解液乳酸发酵体系的影响.....	42
3.5 玉米秸秆同步糖化与乳酸发酵.....	46
3.5.1 脱毒时间对抑制物含量和乳酸发酵的影响.....	47
3.5.2 糖化酶对菌体生长的影响.....	49
3.5.3 提高种子液菌体生物量和活性对发酵的影响.....	51
第 4 章 结论与展望.....	59
4.1 结论.....	59
4.2 展望.....	60
参考文献.....	61
致谢.....	67



## 第 1 章 文献综述

### 1.1 乳酸概况

#### 1.1.1 乳酸的结构和性质

乳酸 (lactic acid, LA), 学名为  $\alpha$ -羟基丙酸 (2-hydroxy-propanoic acid,  $\text{CH}_3\text{-CH(OH)-COOH}$ ), 是一种结构简单的羟基酸, 相对分子质量为 90.08, pKa 值为 3.78<sup>[1]</sup>。由于乳酸分子式中含有一个羟基(-OH)和一个羧基(-COOH)两个官能团, 因此其化学性质比较活泼, 不但可以发生氧化还原反应, 而且乳酸单体还可以在特定条件下进行脱水缩合反应生成高分子聚酯材料聚乳酸复合物<sup>[2]</sup>。此外, 由于乳酸分子结构式中含有一个不对称中心碳原子 (手性碳原子), 因此使得它具有光学异构现象, 即旋光性。以 L-或 D-甘油醛作为参照物, 根据 Fischer 命名法将乳酸分为 L-乳酸和 D-乳酸, 其中 L-乳酸表现为右旋性, D-乳酸表现为左旋性, DL-乳酸表现为外消旋性。研究还发现, 乳酸广泛存在于人体、动物体、植物以及微生物中<sup>[3]</sup>, 但是由于人体和动物体只含有 L-乳酸脱氢酶基因(L-ldh)只能合成 L-乳酸脱氢酶, 不能合成 D-乳酸脱氢酶, 因此机体只能正常代谢 L-乳酸为氨基酸和二羧基产物, 而无法正常代谢或只能少量代谢 D-乳酸, 当 D-乳酸摄入量过多甚至会导致机体内部代谢发生紊乱。L-(+)-乳酸和 D-(-)-乳酸的分子结构式分别如图 1.1 所示。

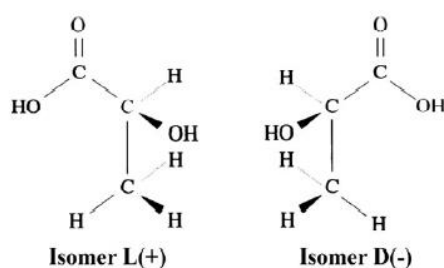


图 1.1 L-(+)-乳酸和 D-(-)-乳酸结构式

Fig. 1.1 Structure of L(+) and D(-) isomers of the lactic acid

#### 1.1.2 乳酸的用途

乳酸(LA)是一种天然存在的有机酸, 更是全世界公认的三大有机酸之一, 被美国 FDA (Food and Drug Administration) 监管机构看作是一种非常安全 (Generally Regarded As Safe, GRAS) 的食品添加剂。一直以来, 乳酸就被作为一种多用途的生物化工产品而广泛应用于食品、医药、皮革、纺织、化工等众多领域, 如图 1.2<sup>[4]</sup>所示。根据乳酸溶液中乳酸含量的多少可将其分为工业级、食品级和药典级等三种类型, 其中工业级乳酸溶液中乳酸含量为 50%-90%, 通常为 60%, 食品级乳酸溶液中乳酸含量一般在 80% 以上, 药典级乳酸溶液中乳酸含量较高, 需要达到 85%-90%。近年来, 随着科技和工业的快速发展, 乳酸的应用领域更是不断拓展, 其中以光学纯的 L-乳酸单体或者 D-乳酸单体为

原料聚合生成的高分子聚酯材料聚乳酸复合物(PLA)由于具有良好的生物可降解性，可用于加工制造生物可降解塑料是目前最前沿也是最具有研究价值和发展潜力的用途之一。

	<b>Food industry</b>		
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- acidulants</li> <li>- preservatives</li> <li>- flavours</li> <li>- pH regulators</li> <li>- improving microbial quality</li> <li>- mineral fortification</li> </ul>		
<b>Cosmetic industry</b>	<div style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; width: 100px; height: 100px; margin: 0 auto; display: flex; align-items: center; justify-content: center;"> <div style="text-align: center;"> <p><b>Lactic acid</b></p> <p><b>(CH<sub>3</sub>CHOHCOOH)</b></p> </div> </div>	<b>Chemical industry</b>	<b>Chemical feedstock</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- moisturizers</li> <li>- skin-lightening agents</li> <li>- skin-rejuvenating agents</li> <li>- pH regulators</li> <li>- anti-acne agents</li> <li>- humectants</li> <li>- anti-tartar agents</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>- descaling agents</li> <li>- pH regulators</li> <li>- neutralizers</li> <li>- chiral intermediates</li> <li>- green solvents</li> <li>- cleaning agents</li> <li>- slow acid release agents</li> <li>- metal complexing agents</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- propylene oxide</li> <li>- acetaldehyde</li> <li>- acrylic acid</li> <li>- propanoic acid</li> <li>- 2,3-pentanedione</li> <li>- ethyl lactate</li> <li>- dilactide</li> <li>- poly(lactic acid)</li> </ul>
	<b>Pharmaceutical industry</b>		
	<ul style="list-style-type: none"> <li>- parenteral/I. V. solution</li> <li>- dialysis solution</li> <li>- mineral preparations</li> <li>- tablettings</li> <li>- prostheses</li> <li>- surgical sutures</li> <li>- controlled drug delivery systems</li> </ul>		

图 1.2 乳酸的用途

Fig. 1.2 Commercial uses and applications of lactic acid

由光学纯 L-乳酸单体或 D-乳酸单体( $\geq 99\%$ )聚合生成的高分子聚酯材料称为聚乳酸(PLA)，其化学分子式为 $(C_3H_4O_2)_n$ ，是一种具有生物可降解性、生物相容性、高透明度以及高机械强度等优良特性的生物质塑料<sup>[5,6]</sup>。聚乳酸复合物根据乳酸聚合单体的不同分为聚 L-乳酸(PLLA)和聚 D-乳酸(PDLA)，其中 PLLA 的熔点为 175-178 °C。PLLA 和 PDLA 还可以在一定条件下进一步聚合成熔点更高的立体复合物聚 DL-乳酸(PDLLA)，其熔点可以高达 230 °C<sup>[7]</sup>。一方面，聚乳酸复合物作为一种生物可降解塑料，能够用于加工制造各种传统石化基塑料所能加工成的各种一次性消费品，如家用塑料制品、快餐盒、超市塑料袋、地用薄膜等，从而缓解或消除“白色污染”环境问题，解决全球“温室气体效应”生态问题。另一方面，聚乳酸复合物作为一种生物相容性高分子材料不会引起人体免疫排斥反应，可以被用作性能及其良好的医用高分子材料，如聚乳酸制成的丝线可以代替一般丝线用作外科手术缝合的手术线，该手术线随着时间的延长伤口的愈合能够在人体内自发降解，降解生成的小分子乳酸可以作为营养物质被人体直接吸收利用，这样就避免了后期手术线拆除的麻烦。

有文献报道称，乳酸需求量将以 5-8% 的年平均增长率进行增加<sup>[8]</sup>，而且 2017 年其需求量有望高达 367300 吨。面对大宗化学品乳酸显示出来的应用领域之广，市场潜力

之大, 商业前景之巨大, 尤其是生物质塑料方面的独特性能, 当前已经引起了相当多的研究单位和生产机构的极大关注。其中以美国和荷兰的研究发展较为迅速。目前全球比较知名的乳酸生产厂家主要包括已被美国 ADM 公司(Archer Daniels Midland Company)和嘉吉公司(Cargill Incorporated)独资的 NatureWorks LLC 公司、荷兰普瑞公司(Purac)、比利时 Galactic S.A.公司以及中国常州的 CCA 生化有限公司和河南金丹乳酸生产厂<sup>[9]</sup>。早在 2002 年, NatureWorks LLC 公司在美国内布拉斯加州的布莱尔建立了全球第一家年产 1.4 万吨的聚乳酸工厂。2007 年 12 月, NatureWorks LLC 公司被美国 Cargill 公司和日本 Teijin 公司联合收购, 并且只负责生产聚乳酸产品。这些聚乳酸产品分为两类: 用作塑料或包装袋的聚乳酸树脂和用作特殊纺织纤维材料的聚乳酸纤维。NatureWorks LLC 公司生产的聚乳酸占全球聚乳酸市场份额 95% 以上, 是聚乳酸生产制造领域的领头羊。其它聚乳酸生产厂家还包括荷兰的 Hycail 公司、比利时的 Futero 公司和 Galactic 公司、美国的 Cereplast 公司、德国的 Uhde Inventa-Fischer 公司以及中国的 Hisun 化工厂和 Snamprogetti 公司。最近美国的 A.E.S.公司和陶氏化学公司也纷纷加入了聚乳酸研究生产中。

## 1.2 乳酸生产技术

### 1.2.1 乳酸生产方法

目前, 乳酸的大规模工业化生产方法主要包括两种: 化学合成法和微生物发酵法, 如图 1.3<sup>[4]</sup>所示。

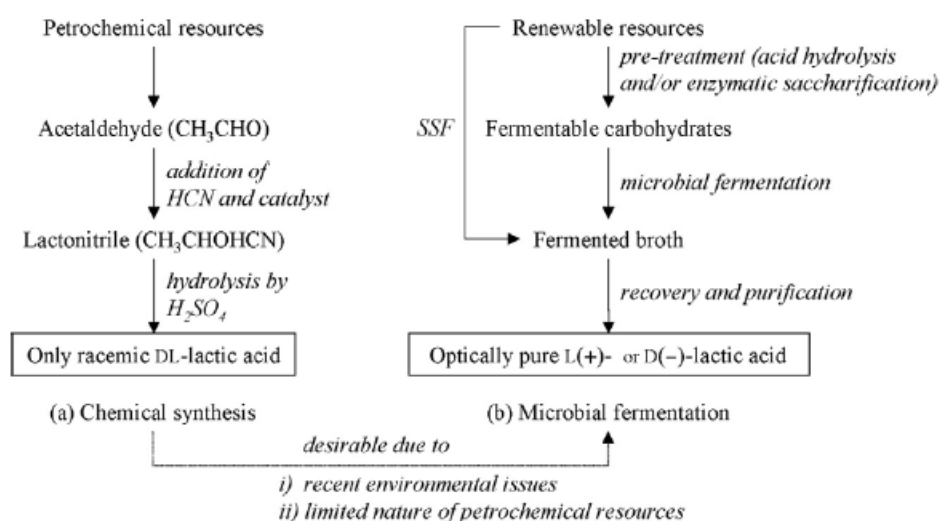


图 1.3 乳酸的生产方法

Fig. 1.3 Overview of the two manufacturing methods of lactic acid

在众多化学合成法中, 乳腈法生产乳酸是最有发展前景的生产途径。但是化学合成法制备得到的乳酸是混合型乳酸 (即 DL-外消旋乳酸), 不能被用于生产制造生物可降解塑料聚乳酸, 而且生产过程使用乙醛和剧毒物质氢氰酸, 因此很多国家, 尤其是发达国家, 都不提倡使用化学合成法生产的乳酸<sup>[10]</sup>。

与化学合成法相比,微生物发酵法生产乳酸具有原料可再生且价格低廉,反应温度低条件温和,能耗低,以及发酵所得产物乳酸一般是光学纯乳酸,因此微生物发酵法是乳酸最主要的生产方式<sup>[11]</sup>。

近年来,随着全球石油和煤炭能源危机的逐渐凸显以及生态自然环境的严重恶化,国内外研究人员纷纷将目光转向资源可持续发展型、环境友好型经济的发展,希望通过“绿色”无污染的微生物发酵方式进行商业化生产所有化学品。在这众多化学品中,乳酸一直以来就被大量广泛用于食品、医药、纺织、皮革以及化工等领域,而且现在研究发现乳酸还可以发生缩合反应生成生物质塑料,这种塑料能够当做一般的石化基塑料进行使用,但由于该塑料具有生物降解能力,不会像石化基塑料那样产生“白色污染”环境问题,因此通过“绿色”无污染的微生物发酵方式进行大宗化学品乳酸的生产具有非常重要的意义。统计数据显示,目前全球近 90%左右的乳酸都是采用微生物发酵方式进行大规模工业化生产得到的,剩下 10%左右的乳酸则是采用化学合成法生产的。甚至有文献报道称,除日本外,目前世界上的 L-乳酸全部采用微生物发酵方式进行生产制备<sup>[12]</sup>。

### 1.2.2 乳酸发酵菌株

乳酸发酵菌株的选择关系到产物乳酸的光学纯度以及产酸能力,因此寻找获得良好的发酵菌株是取得高水平乳酸发酵的先决条件。虽然自然界中能够发酵生产乳酸的微生物种类繁多,如细菌、真菌、酵母、藻类和蓝藻等,但只有乳酸细菌和根霉菌(霉菌)两大类微生物的产酸能力较强,有工业应用潜力。

通常情况下,在利用乳酸细菌进行乳酸发酵过程中普遍存在以下几点不足<sup>[13,14,15]</sup>: (1) 细菌体内如果同时存在 D-乳酸脱氢酶基因(D-*ldh*)和 L-乳酸脱氢酶基因(L-*ldh*),则产物乳酸为 D、L-乳酸消旋体; (2) 副产物较多,乳酸得率较低; (3) 对营养要求苛刻; (4) 易被噬菌体感染导致细胞凋亡。针对上述问题,通常采取以下几种措施进行应对: (1) 利用基因工程技术对发酵菌株体内存在的 D-乳酸脱氢酶基因(D-*ldh*)和 L-乳酸脱氢酶基因(L-*ldh*)进行选择性的敲除改造,使其生产光学纯乳酸<sup>[16]</sup>; (2) 利用基因工程技术对发酵菌株体内存在的甲酸、乙酸和乙醇编码基因进行敲除改造,减少副产物的生成,提高乳酸得率<sup>[17]</sup>; (3) 使用对营养要求较低的大肠杆菌作为发酵菌株<sup>[18]</sup>; (4) 采取措施阻断噬菌体的生命周期<sup>[19]</sup>。能进行乳酸发酵的细菌主要包括以下四种<sup>[20]</sup>: 乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)、芽孢杆菌(*Bacillus*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)和谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)。

#### 1.2.2.1 乳酸菌

乳酸菌(lactic acid bacteria, LAB)是革兰氏阳性菌,广泛存在于植物体、肉制品以及奶制品等富养环境中,其最适生长温度和 pH 分别一般在 37-43 °C、5.0-7.0 之间。依据糖类代谢途径以及生成产物的不同,可将乳酸菌发酵产酸分为以下三种类型:同型乳酸发酵(Homofermentation)、异型乳酸发酵(Heterofermentation)和混合型乳酸发酵(Mixed acid fermentation),其具体物质代谢情况如图 1.4 所示。

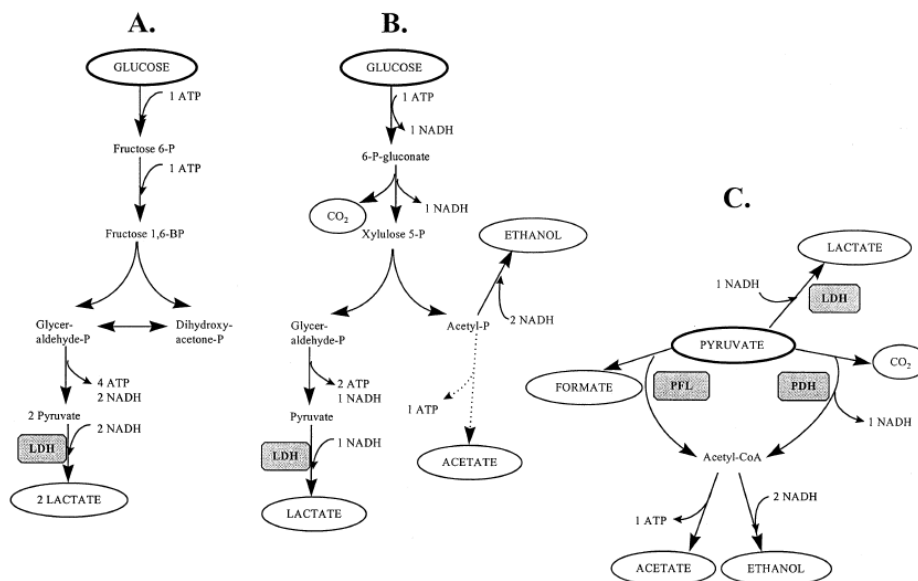


图 1.4 乳酸菌发酵产酸代谢路径

(A)同型乳酸发酵, (B)异型乳酸发酵, (C)混合型乳酸发酵

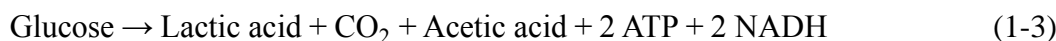
Fig. 1.4 Metabolic pathways for lactic acid production by LAB

(A) Homofermentation, (B)Heterofermentation, (C)Mixed acid fermentation

乳酸菌发酵葡萄糖时，如果 1 分子葡萄糖首先通过糖酵解途径 (Embden-Meyerhof-Parnas Pathway, EMP)生成 2 分子丙酮酸中间体，然后丙酮酸在乳酸脱氢酶的作用下最终生成 2 分子乳酸和 2 分子 ATP，葡萄糖经此代谢途径得到的产物中只有乳酸，因此称为同型乳酸发酵，如图 1.4 (A)所示<sup>[21,22]</sup>。乳酸菌利用葡萄糖进行同型乳酸发酵时，乳酸得率理论值为 100%，但是由于微生物发酵代谢比较复杂，所以实际乳酸发酵生产中只要得率达到 80%以上就可以判定为同型乳酸发酵。众多乳酸菌中乳杆菌(*Lactobacillus*)、乳球菌(*Lactococcus*)、肠球菌(*Enterococcus*)和片球菌(*Pediococcus*)等是最主要的同型乳酸发酵生产菌株<sup>[23]</sup>。



有些乳酸菌体内缺乏 EMP 途径中一些重要的酶类（如醛缩酶和异构酶等），在发酵葡萄糖时，1 分子葡萄糖首先通过戊糖磷酸途径(Hexose-Monophosphate Pathway, HMP)生成 5-磷酸核酮糖，然后在差向异构酶的作用下生成 5-磷酸木酮糖，并最终在磷酸解酮酶等酶的作用下生成 1 分子乳酸，葡萄糖经此代谢途径除了生成产物乳酸以外，还同时生成了乙醇、CO<sub>2</sub> 或乙酸等副产物，因此称为异型乳酸发酵，如图 1.4 (B)所示<sup>[24,25]</sup>。乳酸菌利用葡萄糖进行异型乳酸发酵时，乳酸得率理论值只有 50%。



混合型乳酸发酵是指同型乳酸发酵菌株在代谢葡萄糖时，由于发生葡萄糖限制<sup>[26]</sup>、发酵温度或 pH 不适<sup>[27]</sup>等情况，葡萄糖经 EMP 途径降解生成的丙酮酸在后续代谢中除

了生成乳酸以外，还同时生成了乙醇、乙酸、甲酸等副产物，如图 1.4 (C)所示。

乳酸片球菌<sup>[28]</sup>(*Pediococcus acidilactici*)是同型乳酸发酵菌株片球菌(*Pediococcus*)的一种代表菌株，属于革兰氏阳性菌，对抗生素万古霉素具有自然抗药性，不运动，无芽孢，兼性厌氧，细胞呈圆球状，在 MRS 琼脂培养基可以形成白色光滑菌落，而且菌落较小。原始乳酸片球菌体内染色体上同时存在 L-乳酸脱氢酶基因(L-*ldh*)和 D-乳酸脱氢酶基因(D-*ldh*)，以葡萄糖为底物进行发酵时，产物为 DL-乳酸混合物，不产生 CO<sub>2</sub> 气体，而且菌体不能合成过氧化氢酶和氧化酶。

大多数乳酸菌不但在长期的工业化乳酸生产中都不曾对车间工作人员以及消费者的身体健康造成过危害，是一种安全性较高的产酸菌株，而且对产酸发酵体系具有较强的耐酸能力，产物抑制现象不明显，同时乳酸菌易于进行基因改造从而得到产光学纯乳酸单体的工程菌株<sup>[29]</sup>。另一方面，大多数乳酸菌自身不能合成氨基酸、维生素 B、核苷酸和多肽等菌体生长需要的生长因子，对外界培养环境中营养要求较高，这些营养成分的添加不但会增加乳酸的生产成本，同时对下游乳酸分离纯化工段也会增加很大的难度。此外，乳酸菌最适生长和发酵产酸温度普遍低于真菌纤维素酶的最适酶解温度，这不但增加了发酵过程中染菌的几率，而且对实现高水平木质纤维素同步糖化与乳酸发酵也是一个非常大的障碍。

Abdel-Rahman 等<sup>[30]</sup>筛选得到的乳酸菌 *Enterococcus mundtii* QU 25 需要在 MRS 培养基、43 °C 条件下才能良好利用葡萄糖进行乳酸发酵。

#### 1.2.2.2 芽孢杆菌

芽孢杆菌(*Bacillus*)乳酸发酵菌株主要包括凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)、嗜热脂肪芽孢杆菌(*Bacillus stearothermophilus*)、地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和芽孢杆菌属(*Bacillus sp.*)等。

与乳酸菌(LAB)相比，芽孢杆菌进行乳酸发酵时有以下几点优势：(1) 芽孢杆菌可以在含少量廉价氮源的无机盐培养基中进行良好生长和发酵产酸，这不但可以大幅度降低乳酸生产原料成本，而且能够显著减小下游乳酸分离纯化难度<sup>[31]</sup>；(2) 嗜碱芽孢杆菌能够在高 pH 环境中生长和产酸，有助于降低发酵过程中染菌的几率<sup>[32]</sup>；(3) 芽孢杆菌比较耐热( $\geq 50^{\circ}\text{C}$ )，这不但有助于降低发酵过程中染菌的几率，而且可以采用开放式发酵操作进行产酸<sup>[33]</sup>，更为重要的是，此温度与真菌纤维素酶的最适酶解温度相同，能够大大提高木质纤维素同步糖化与发酵过程中糖化效率和产酸水平<sup>[34]</sup>；(4) 芽孢杆菌能够同时高效代谢戊糖和己糖进行发酵产酸，木质纤维素生物质中同时存在的丰富的纤维素组分和半纤维素组分经水解分别获得葡萄糖等己糖和木糖等戊糖，这对于提高原料利用率具有非常重要的意义<sup>[35]</sup>。

Zhang 等<sup>[36]</sup>筛选得到的 *Bacillus coagulans* IPE22 不但能够在 52 °C 条件下良好生长，而且能够同时高效代谢葡萄糖、木糖和纤维二糖等碳源进行乳酸发酵。

#### 1.2.2.3 大肠杆菌

大肠杆菌(*Escherichia coli*)由于能够同时高效代谢己糖和戊糖，对培养基营养要求低，

而且易于进行基因操纵等原因,而被广泛用作代谢工程改造菌株。原始大肠杆菌菌株进行发酵时所得产物是乙醇以及一些有机酸(如乳酸、乙酸、琥珀酸和甲酸等)的混合物,利用代谢工程手段对大肠杆菌进行改造可以使其高水平发酵生产乳酸。

Wang 等<sup>[37]</sup>得到的代谢工程菌 *Escherichia coli* W 能够在无机盐培养基中良好利用 100 g/L 蔗糖进行乳酸发酵,产物 D-乳酸的浓度、产率、得率和光学纯度分别为 85 g/L、1.0 g/L/h、0.85 g/g、98.3%。

#### 1.2.2.4 谷氨酸棒杆菌

谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)是一类生长较快、不产生孢子、不运动且需氧发酵的革兰氏阳性菌株。该菌株进行适当改造以后能够利用各种各样的糖类,如阿拉伯糖、葡萄糖、木糖、纤维二糖等,作为碳源进行发酵生产有机酸(乳酸、琥珀酸和乙酸等)。

Jia 等<sup>[38]</sup>得到的基因改造工程菌 *Corynebacterium glutamicum* Res167 能够在无机盐培养基中良好利用葡萄糖进行乳酸发酵,发酵 16 h,产物 D-乳酸的浓度和光学纯度分别为 17.92 g/L、99.9%。

#### 1.2.2.5 根霉

根霉(*Rhizopus*)中的米根霉(*Rhizopus oryzae*)是目前研究最为深入的乳酸发酵霉菌。与其它乳酸发酵菌株相比,米根霉存在以下几点优势:(1)米根霉体内不含有 D-乳酸脱氢酶基因(D-*ldh*),只含有 L-乳酸脱氢酶基因(L-*ldh*),因此发酵产物乳酸是光学纯 L-乳酸<sup>[39]</sup>;(2)米根霉菌体自身具有淀粉水解能力,因此在发酵过程中无需额外添加淀粉酶进行糖化处理,能够直接利用淀粉类物质进行糖化和发酵产酸<sup>[40]</sup>;(3)营养需求简单,能够降低乳酸生产的原料成本<sup>[41]</sup>;(4)菌体在发酵醪液中呈丝状或小球状,易于从发酵醪液中分离出来,降低了下游乳酸分离纯化的难度<sup>[42]</sup>;(5)发酵过程中产生的真菌菌体可以作为一种有附加值的副产品。

Guo 等<sup>[43]</sup>筛选得到的乳酸发酵菌株 *Rhizopus oryzae* GY18 能够分别高效代谢葡萄糖、木糖和蔗糖进行乳酸发酵,获得产物 L-乳酸的浓度分别为 115、54.2、97.5 g/L。

总体来说,进行乳酸发酵生产时,乳酸细菌比根霉菌具有一定的优势。利用根霉,如米根霉,进行发酵时不但需要良好的通风通气<sup>[44]</sup>,能耗投入较高;而且发酵过程中会生成乙醇、丙酮酸、富马酸等副产物<sup>[15]</sup>,乳酸得率较低(理论得率只有 75%);根霉在发酵过程中通常呈丝状,但是小球状才是最良好的产酸形态;更为重要的是,米根霉菌体最适生长和发酵产酸温度为 28-35 °C,与真菌纤维素酶的最适酶解温度(50 °C)相差太大,无法良好应用于木质纤维素同步糖化与乳酸发酵体系。利用乳酸细菌进行发酵时为厌氧发酵,不需通风通气,能耗较低,同时乳酸得率高达 90%以上(理论得率为 100%)。目前欧美以及荷兰普瑞公司、卡吉尔公司、ADM 公司均采用乳酸细菌作为发酵菌株进行工业化乳酸生产。可以说,利用发酵性能优异的乳酸细菌进行发酵是未来乳酸生产的主要趋势<sup>[45]</sup>。

### 1.2.3 乳酸生产原料

原料成本是影响乳酸生产成本的重要因素之一。传统乳酸生产大都是以各种农作物淀粉（如玉米、小麦、大米、大麦、土豆、高粱等）、葡萄糖以及蔗糖等作为发酵原料<sup>[46]</sup>：美国杜邦公司、中国河南金丹乳酸科技有限公司都是使用淀粉类粮食作物玉米作为发酵原料。此种原料进行乳酸发酵不需要进行预处理操作，而且产物乳酸的纯度较高，下游分离纯化难度较低。研究还发现，单一纯净的糖类作为底物时，发酵获得的产物乳酸纯度最高，下游产品的分离纯化难度最小。但是从经济学角度来看，此方法相当不具有可行性，因为单一纯净的糖类价格远远高于大宗化学品乳酸的价格。

随着全球粮食资源的紧张，各个国家都开始大力提倡“节粮代粮”政策，尤其是对于乳酸这样的低附加值大宗化学品，利用宝贵的粮食作物进行生产更显得“浪费”。因此，为了乳酸行业的健康发展，目前的当务之急是尽快寻找新的发酵性能良好的低成本原料替代品。利用来源广泛且价格及其低廉的各种工农业残留及废弃物生物质资源作为发酵原料，通过良好的生物炼制工艺进行乳酸生产已经受到了越来越多研究人员的极大关注。

#### 1.2.3.1 木质纤维素

“生物质资源是地球上再生资源的核心组成部分，是人类赖以生存和发展的基础资源，是维系人类经济社会可持续发展最根本的保障。我国是全球生物质资源最丰富的国家之一，21 世纪我国实现由生物质资源大国向生物质资源及生物基经济强国转变将成为必然趋势。”<sup>[47]</sup>

生物质资源主要包括木质纤维素生物质和淀粉类生物质，有统计数据显示，地球上一年生成的生物质质量就高达 100-500 亿吨，而且其中木质纤维素生物质约占 50% 左右。与淀粉类生物质相比，木质纤维素生物质由于主要成分是纤维素，而纤维素结构异常致密，导致其降解需要进行高强度的预处理以及纤维素酶多酶催化反应。例如，玉米秸秆和玉米芯等木质纤维素生物质进行生物转化生产乳酸之前，需要进行必要的预处理和纤维素酶糖化处理。

木质纤维素生物质主要包括专门栽培的能源作物（如柳枝稷、杂种白杨、芒草等），农业残留及废弃物（如玉米秸秆、小麦秸秆、油菜秆、稻秆、玉米芯、油棕榈空果壳等），工业残留及废弃物（如玉米芯工业残渣、糠醛渣、姜黄渣、甘蔗渣等），林业残留及废弃物（如伐木产生的修剪枝叶、废弃木头木屑）以及生活垃圾（如厨房垃圾、废纸等）等。

玉米芯残渣是指工厂利用农业残留玉米芯为原料进行生产木糖（醇）等产品过程中产生的工业废弃物，由于其中的大部分半纤维素组分已被利用，所以纤维素含量丰富，此外还含有木质素组分。由于原料中的木质素不但很难被微生物降解利用，而且对糖化过程中使用的纤维素酶进行无效吸附，使得纤维素酶解效率较低，因此通常采取的一种做法是对原料进行脱木质素处理，这样不但可以从根本上解决木质素对纤维素酶的无效吸附问题，而且还能提高原料中纤维素的含量。其中，利用碱洗处理方法得到的木质纤

纤维素原料脱木质素玉米芯残渣不但木质素含量较低, 纤维素含量较高, 而且酚类抑制物含量也较低, 是一种利用潜力巨大的乳酸发酵原料。Shen 等<sup>[48]</sup>以 *Lactobacillus delbrueckii* ZU-S2 为发酵菌株, 以 200 g/L 玉米芯残渣为底物, 进行 SSF 80 h, 产物乳酸的浓度、得率和产率分别为 107.5 g/L、88.3%、1.344 g/L/h。

与小麦秸秆、稻秆、棉秆以及玉米芯残渣等木质纤维素生物质相比, 玉米秸秆由于资源异常丰富, 纤维素含量较高, 富含钾、镁、锰、钙等金属元素, 而且还含有生物素等微生物生长需要的生长因子一直以来是生物炼制采用的主要原料之一。Zhao 等<sup>[49]</sup>以 *Pediococcus acidilactici* DQ2 为发酵菌株, 以 27% (w/w) 固含量玉米秸秆为底物, 进行 SSF 80 h, 产物乳酸的浓度、得率和产率分别为 101.9 g/L、77.2%、1.06 g/L/h。

### 1.2.3.2 乳清

全球的乳制品工厂在乳制品, 尤其是奶酪加工过程中都会产生相当大量的副产品乳清, 通常以工业废水形式进行排污处理, 对环境造成了很大程度的污染。检测发现, 乳清中不但含有碳水化合物乳糖, 而且还含有维持微生物生长所需要的氮源蛋白质、生长因子维生素、脂肪、无机盐以及其它营养成分<sup>[50]</sup>。尽管工业废弃物乳清中含有丰富的蛋白质氮源, 但由于乳酸菌体内没有蛋白水解酶基因无法利用乳清中存在的蛋白质, 因此在利用乳清进行乳酸发酵生产时还需要向发酵体系中添加氨基酸和维生素等营养物质。针对这一现象, 为了不浪费乳清中存在的蛋白质, 提高原料利用价值, 很多研究人员尝试将乳清中的蛋白质分离出来, 然后再利用脱蛋白乳清进行乳酸生产<sup>[51]</sup>。

近几年, 人们对酸奶的需求量和消费量呈现大幅增加的趋势, 酸奶加工厂也随之大量涌现, 工厂加工过程中产生的副产品乳清以及过期酸奶的数量十分巨大。与奶酪工业乳清相比, 由于酸奶加工过程中需要向牛奶中额外添加葡萄糖和蔗糖等糖类以提高产品的甜度, 因此酸奶工业乳清中含有更大量的碳水化合物, 理论上进行乳酸发酵时其产酸能力更高。

2004 年, Buyukkileci AO 等<sup>[52]</sup>利用奶酪工业乳清作为发酵原料, 以 *Lactobacillus casei* NRRL B-441 为发酵菌株, 发酵结束时产物乳酸的浓度、得率和产率分别为 96.0 g/L、0.93 g/g、2.2 g/L/h。

### 1.2.3.3 糖蜜

在工业制糖过程中会产生一种粘稠的液体副产品糖蜜, 检测发现, 该副产品中含有大量的碳水化合物蔗糖等糖类、丰富的矿物质以及少量的氮源蛋白质等营养物质。目前, 很多研究人员已经对糖蜜进行乳酸发酵的产酸性能进行了相关研究, 而且荷兰普瑞公司已经将糖蜜作为发酵原料应用到了大规模工业化乳酸生产中。

## 1.3 乳酸菌高密度培养

随着微生物商业化发酵生产化学品应用的大量增加, 发酵工业的目标纷纷转向了在最小的投入成本条件下获得最大的输出产值和商业利润, 最大程度地提高发酵产品的市场竞争力。针对发酵过程中每一个特定工段都采取相应的高效发酵手段和措施, 是实现

这一目标的解决方案。其中，发酵菌株高密度培养技术(High-cell-density cultivation, HCDC)就是为了满足微生物高效发酵工段而逐步发展起来的一项重要技术，该技术不但能够降低发酵品的生产成本，同时还可以获得高浓度的发酵菌体和发酵产物，使发酵醪液中产物浓度具有较高的商业分离提纯价值，降低下游产品精制工段的难度和成本。

高密度培养技术最早用于酵母细胞的培养过程中，当时主要用于提高菌体生物量进而提高产物乙醇的发酵水平和生产高质量的浓缩型单细胞蛋白。随着近年来基因工程技术的快速发展，目前微生物高密度培养技术最多被用于大肠杆菌(*E. coli*)等基因改造工程菌生产胰岛素、人生长激素和干扰素等多肽类药物过程中。

### 1.3.1 高密度培养的定义

高密度培养(High-cell-density cultivation, HCDC)准确来说只是一个相对概念，并没有确切的定义，是指利用一定的培养方法和设备装置来提高发酵液单位体积单位时间内发酵菌体生物量和产物比生产率的发酵技术。广义水平来讲，只要细胞密度比较高，接近其细胞密度最高理论值的培养都可以称为高密度培养。有些文献将高密度培养定义为，利用一定的培养方法和设备装置使发酵培养基中的菌体密度超过常规培养 10 倍以上的生长状态。

细胞培养水平的高低用单位干细胞重量/升来表征，单位符号是 DCW/L。一般来说，高密度细胞培养时其细胞密度的下限值为 20-30 g DCW/L，上限值为 150-200 g DCW/L。但在实际培养过程中，由于菌种和发酵产物的差异性其高密度培养的细胞密度也是很有可能不在上述范围以内<sup>[53]</sup>。

### 1.3.2 影响高密度培养的因素

微生物菌体只有在适宜的培养条件下，再辅助利用一定的培养技术和设备装置才能达到所谓的高密度培养，因此高密度培养的首要任务就是对一系列发酵工艺参数进行优化处理，找到最佳培养条件，设计最佳培养途径。研究表明，影响微生物细胞生长繁殖的因素有很多，如菌种种子液活力、接种量、培养基成分和添加策略、温度、pH、菌体絮凝以及代谢产物的抑制等<sup>[54]</sup>。

(1) 种子液活力：种子液中菌体生物量和活性直接影响发酵开始时单位体积内的菌体密度和活力，如果菌体密度和活力过低必然导致发酵延滞期较长，发酵周期较长，发酵速率较低。适当增加种子液传代培养次数或增加接种量是针对这一问题较好的解决方案。

(2) 培养基成分：培养基可以分为天然培养基、半合成培养基和合成培养基，其中半合成培养基由于只含有少量促进细胞生长和代谢产物生成的天然物质，其它营养成分都是化学成分已知且质量稳定的物质，而常被用作高密度培养过程中的发酵培养基。

(3) 培养基添加策略：微生物对培养体系中存在的碳源、氮源以及无机盐等营养成分的含量都有一个耐受值，如果高于这个耐受值，菌体生长就会受到胁迫，达不到所谓的高密度培养发酵水平。因此，将营养物质以分批补料的方式添加到发酵培养基中是解决这一问题的良好方案。

(4) 温度：温度不但对微生物体内核酸、蛋白质等生物活性物质的结构和功能有特别重要的影响，而且对菌体内酶的活性有显著影响，因此在适宜的培养温度下进行微生物生长和发酵是高密度发酵的一个重要控制参数。很多研究发现，大多数乳酸菌的最适生长和产酸温度为 37-43 ℃。

(5) pH：在发酵过程中，pH 的变化主要是由菌体发酵产酸或碱引起的，其中乳酸菌的发酵产物乳酸是一种酸性产品从而导致发酵液 pH 降低，需要额外添加中和剂以维持适宜的 pH 值。大多数研究表明，乳酸菌的最适生长和发酵产酸 pH 在 6.0 左右。

(6) 菌体絮凝：某些微生物（包括酵母菌、细菌和真菌等）在生长过程中细胞表面会分泌有粘多糖、蛋白质、糖蛋白等物质，这些分泌物会导致菌体之间发生互相粘连而造成菌体絮凝现象。菌体发生絮凝以后不但影响营养物质无法及时传递到絮凝团内部细胞，絮凝团内部的代谢产物和废物无法及时排出，导致菌体死亡，而且颗粒较大的絮凝团甚至会堵塞输送管道和管路，同时增加后续发酵罐和管道清洗劳动强度和水电用量。向培养体系中添加适量糖化酶、蛋白酶或糖苷酶以降解细胞表面的粘多糖、蛋白质或糖蛋白从而缓解菌体絮凝现象是针对这一问题较好的解决方案<sup>[55]</sup>。

(7) 产物抑制作用：乳酸菌发酵产生的产物乳酸对菌体生长有相当显著的反馈抑制现象，而且其它有害代谢产物的积累也会导致菌体生长停止甚至死亡。将代谢产物及时从发酵体系中分离出来是针对这一问题较好的解决方案，也是实现高密度发酵的重要手段之一。

### 1.3.3 高密度培养的优势

与常规发酵相比较，高密度培养由于提高了液体培养基中单位体积的发酵菌株菌体生物量，因此在发酵过程中存在很多明显优势：

(1) 提高发酵产物的比生产率。高密度培养使单位体积的菌体生物量和菌体活性提高了几倍甚至几十倍，从而使单位体积的发酵生产能力也同时提高到原来的几倍甚至几十倍。

(2) 减少培养容器的体积，减少设备投资。在同样的菌体生物量和发酵生产能力情况下，高密度培养大大减少了发酵液的体积，进而缩小生物反应器体积，同时使发酵操作更加简单，避免了因发酵液体积过大而导致的传质不良现象。

(3) 提高下游工段中产物的分离纯化效率，减少水电能耗。高密度培养实现的高密度菌体生物量，也会显著提高发酵醪液中的产物浓度，降低下游产品分离纯化难度，减少水电用量。

(4) 缩短发酵周期。在同样的发酵培养基条件下，高浓度的菌体必然导致营养成分消耗快和发酵生产产品快，从而使发酵周期得到大幅缩短。

## 1.4 乳酸菌细胞絮凝

微生物乳酸菌在生长过程中细胞表面会分泌粘多糖、蛋白质、糖蛋白、纤维素、脂类或核酸等大分子有机物<sup>[56]</sup>，其中某些活性物质，特别是多糖组分，会导致菌体之间发

生互相粘连而造成菌体絮凝现象。在发酵产品下游分离纯化过程中, 利用此絮凝现象可以实现简单高效地将菌体细胞从发酵醪液中分离出来的目的。但是如果该絮凝现象发生在菌体培养和发酵过程中, 则无疑会对细胞自身生长和发酵产酸造成相当严重的阻碍作用。因为菌体细胞形成大颗粒絮凝团时, 一方面会导致外界营养物质无法及时运送到絮凝团内部供细胞代谢利用, 另一方面絮凝团内部细胞分泌产生的乳酸和其它有害代谢垃圾无法及时排出导致絮凝团内部生长环境极其恶劣使细胞致死。

微生物细胞絮凝根据是否向细胞体系添加絮凝剂分为自身絮凝和絮凝剂絮凝两种现象。顾名思义, 絮凝剂絮凝就是通过向体系添加絮凝剂而使细胞发生絮凝沉淀; 细胞自身絮凝则是由菌体自身分泌絮凝剂而使细胞发生絮凝沉淀。

#### 1.4.1 微生物絮凝剂

微生物絮凝剂(microbial bioflocculant, MBF)是指某些微生物, 如酵母菌、细菌、霉菌和放线菌等, 在特定培养条件下, 当其生长达到一定阶段时产生的并具有絮凝功能的次级代谢产物。该絮凝剂不但能够使菌体细胞发生絮凝结团现象, 而且能够使生活用水、工业污水和废水中的不溶性固体、重金属离子和色素等环境污染组分形成絮凝沉淀分离出来, 而达到水净化处理的目的<sup>[57]</sup>。与化学絮凝剂相比, 微生物絮凝剂具有环境友好、可生物降解以及安全无毒等一系列优点。

微生物絮凝剂通常包括微生物细胞絮凝剂、微生物细胞壁提取物絮凝剂和微生物细胞代谢产物絮凝剂 3 类。但目前研究人员普遍关注的是微生物细胞代谢产物絮凝剂, 即菌体产生具有絮凝功能的代谢产物并分泌到胞外, 这些活性絮凝物质或者游离于培养液和发酵液中, 或者粘附在菌体细胞表面。

#### 1.4.2 絮凝剂活性成分及其检测方法

尽管目前利用合成培养基对某些微生物进行培养使其生产絮凝剂已经取得了很大进展, 但是对于絮凝剂的活性成分和絮凝机理却知之较少。然而只有清楚絮凝剂的活性成分和絮凝机理才能更好更高效地应用该絮凝技术。一般来说, 微生物絮凝剂的活性成分大多是粘多糖、蛋白质或糖蛋白等三种大分子物质, 因此通常有以下几种检测和验证方法<sup>[58]</sup>。

(1) 高温加热: 众所周知, 糖类比较耐热, 而蛋白质对高温非常敏感, 极易失活。因此对絮凝剂进行热处理, 如果其活性损失较大, 说明其活性成分为蛋白质, 反之为多糖。如活性成分为多糖的微生物絮凝剂 SF-1 经 120 °C 高温处理 30 min, 其絮凝能力只降低了 5%<sup>[59]</sup>; 而活性成分为蛋白质的微生物絮凝剂经 120 °C 高温处理 30 min, 其絮凝能力降低了 80%<sup>[55]</sup>。

(2) 酶解处理: 由于糖化酶、蛋白酶和糖苷酶自身都没有絮凝功能, 因此分别单独使用上述三种酶对絮凝剂进行酶解处理, 如果絮凝能力有相应显著降低, 说明该絮凝剂的活性成分分别为多糖、蛋白质和糖蛋白。

(3) 紫外可见光谱分析: 利用紫外光谱对絮凝剂成分进行分析, 根据图谱中出峰特点对其进行定性。如 3380  $\text{cm}^{-1}$  处出峰对应-OH<sup>[60]</sup>, 1650  $\text{cm}^{-1}$  处出峰对应-COO<sup>-[61]</sup>, 1080

$\text{cm}^{-1}$  处出峰对应 C-O<sup>[62]</sup>。

### 1.4.3 絮凝机理

对于微生物絮凝剂的絮凝机理目前已经先后提出了“吸附桥架机理”、“电性中和机理”、“卷扫作用”、“类外源絮凝聚素假说”、“菌体外纤维素纤丝学说”以及“离子键、氢键键桥学说”等，其中“吸附桥架机理”、“电性中和机理”和“卷扫作用”相对比较合理<sup>[63]</sup>。

(1) 吸附桥架机理：在絮凝剂微粒表面有空白空间的条件下，絮凝剂与菌体细胞或其它悬浮颗粒之间通过离子键、氢键和范德华力等作用相互结合在一起形成一种网状三维结构共聚物沉淀，絮凝剂在此过程中起“吸附桥架”作用。电镜显微镜镜检显示，细菌细胞之间的絮凝就是通过细胞表面的絮凝剂搭桥而彼此相连在一起的。

(2) 电性中和机理：向水处理絮凝体系添加金属离子或进行 pH 调节都会对絮凝能力有相当显著的促进或抑制作用，而且在某些细菌培养过程中使用 NaOH 作为中和剂进行 pH 调节时也会使培养体系发生严重的菌体絮凝现象。这些现象说明，电荷对絮凝现象有很大的影响。通常细胞表面和其它悬浮颗粒表面带负电荷，微生物絮凝剂带正电荷，当两者相互靠近时发生正负电荷相互中和现象，降低颗粒之间的排斥力，使颗粒相互碰撞而凝聚。

(3) 卷扫作用：卷扫絮凝现象是在上述两种絮凝现象下发生的，即已经形成絮凝沉淀的大颗粒絮凝物在沉降或运动过程中犹如很多张“过滤网”，会同时对体系中其它未絮凝的颗粒产生卷扫作用，从而使絮凝物颗粒更大，卷扫作用越显著。

微生物絮凝剂产生的絮凝现象使一个很复杂的过程，目前提出的这些假说都只能对某一种或几种现象进行解释，其真正的机理还有待进一步研究。

## 1.5 木质纤维素原料生物炼制生产乳酸

我国是一个农业大国，种植的农作物多种多样，随之产生的各种农业残留及废弃物数量更是惊人，据不完全统计，我国一年的农作物秸秆重量就高达 7 亿吨以上<sup>[64]</sup>，其中玉米秸秆占 37%、小麦秸秆占 15%。但是农作物秸秆等木质纤维素生物质的利用率却相当低，少量用于生火煮饭，大部分直接废弃田头，造成了自然界资源的极大浪费。如果能够利用这些木质纤维素生物质代替粮食作物作为原料进行各种化学品的批量生产，实现“变废为宝”，对促进社会可持续发展和提高人类生活水平都具有重要意义。

20 世纪 90 年代初期，世界各国政府和工业界纷纷开始重视利用自然界丰富的可再生生物质资源生产非粮食类化学品的研究<sup>[65]</sup>，并提出了“生物炼制”这一专业术语<sup>[66]</sup>。目前木质纤维素生物炼制技术已经被应用到生物燃料纤维素乙醇、生物柴油以及大宗化学品乳酸等研究领域。

纤维素、半纤维素和木质素三种组分是木质纤维素生物质的主要成分，并且占生物质干重的 90% 左右，这三种组分相互紧密连接在一起构成一种结构极其复杂而致密的三维结构<sup>[67]</sup>，但是由于基因遗传和环境的差异导致不同种类和类型的木质纤维素原料中纤

纤维素、半纤维素和木质素的结构和含量可能存在很大差异。玉米秸秆、小麦秸秆和稻秆等农作物秸秆中纤维素、半纤维素和木质素的含量分别约为 35%-50%、20%-30%、15%-25%。

纤维素约占木质纤维素生物质干重的 30-60%，是植物细胞中起支撑物质的组分，主要是葡萄糖以  $\beta$ -1,4-糖苷键连接起来组成的没有支链的直链聚合物，聚合度在 8000-12000 之间，并且以纤维二糖为重复单元<sup>[68]</sup>。纤维素有密度较大的结晶相和密度较小的非结晶相（也称无定型区）两种存在形式，其中结晶相结构相当致密，是影响纤维素降解的主要因素之一，在一定条件下经酶水解或酸水解可以降解生成葡萄糖等单糖。

半纤维素约占木质纤维素生物质干重的 20-40%，主要是木糖、阿拉伯糖等戊糖和葡萄糖、半乳糖、甘露糖等己糖的聚合物，分子链中有较多支链，聚合度在 100-300 之间，平均聚合度在 200 左右<sup>[69]</sup>。其中硬木以及农业残留等木质纤维素生物质中半纤维素的主要成分是木聚糖，软木中半纤维素的主要成分是甘露聚糖。生物质中的半纤维素可用碱液提取出来，而且易溶于稀酸溶液中发生降解生成木糖等单糖。

木质素主要是芳香族酚类化合物通过醚键和 C-C 键连接起来组成的高度不规则而又具有网状结构的三维芳香族高分子聚合物，不但很难被降解用作微生物生长和发酵的底物<sup>[66]</sup>，而且在纤维素和半纤维素周围形成保护屏障，一方面保持植物细胞壁的机械柔性，另一方面严重阻碍纤维素和半纤维素的快速彻底水解<sup>[70]</sup>。通常利用碱液将木质纤维素原料中的木质素组分洗除，或利用木质素结构修饰酶漆酶对木质素进行结构修饰或降解<sup>[71]</sup>，以降低木质素对原料体系水解的阻碍作用。

目前已经建立起来的木质纤维素生物炼制生产乳酸的工艺流程为：生物质原料的收集存储→清洗，干燥→粉碎→预处理→纤维素和（或）半纤维素水解，乳酸发酵→产物的分离提纯。尽管木质纤维素生物炼制生产乳酸已经取得了很大进展，但由于木质纤维素生物质的复杂性和特殊性，距离其商业化生产还有相当多的障碍亟需克服，如木质纤维素运输和贮藏花费高、前处理繁杂、预处理成本投入高、纤维素酶成本高、产物浓度低得率低以及下游分离纯化难度大等。目前研究工作者主要关注其中四个工段的研究方法和结果：(1) 原料预处理—破坏木质纤维素生物质固有的致密结构，使其中的纤维素和半纤维素更易于被水解成可发酵糖类；(2) 预处理物料脱毒—对预处理木质纤维素体系中存在的抑制物进行脱除；(3) 原料水解—将木质纤维素生物质中纤维素和半纤维素水解成可发酵糖类；(4) 乳酸发酵—利用生物转化工艺进行乳酸生产。

### 1.5.1 预处理

天然木质纤维素生物质由于其三种主要成分纤维素、半纤维素和木质素结构的复杂性和特殊性，如果不经过预处理操作直接进行生物降解时，降解速率非常缓慢，而且降解效率极低(不超过 20%)<sup>[72]</sup>，因此在接种微生物发酵之前对木质纤维素生物质进行一定程度的预处理是提高糖化得率和发酵水平必不可少的一个步骤。同时，预处理效果直接对木质纤维素原料后续纤维素酶酶解和微生物发酵有十分显著的影响：预处理强度不达标，会导致木质纤维素致密结构破坏不彻底，影响酶用量、酶解速率和糖化得率；预处

理强度过高,会导致物料体系发生较多副反应生成较多有毒物质,影响微生物发酵水平。良好的木质纤维素预处理技术一般需要满足以下几个条件<sup>[73]</sup>:(1) 预处理之后的物料要易于降解;(2) 预处理过程中碳水化合物糖类没有或只有少量降解;(3) 能够得到高浓度的糖化液;(4) 利用纤维素酶对预处理物料进行酶水解时能够得到糖类;(5) 预处理物料含水率较低,有利于实现后续高固体含量发酵;(6) 无抑制物产生或只产生极少量抑制物;(7) 能耗投入低;(8) 操作简单;(9) 不需要过度减小物料粒径;(10) 物料批次处理量高;(11) 无残留;(12) 预处理过程中使用的化学试剂价格便宜;(13) 具有环境友好性。

目前国内外针对不同种类的木质纤维素原料已经开发出了各种各样的预处理方法,如机械粉碎和研磨预处理、微波预处理、超声波预处理等物理方法,稀酸预处理、稀碱预处理、氧化剂预处理、有机溶剂萃取预处理等化学方法,蒸汽膨爆预处理、湿氧化法预处理、热水蒸汽预处理等物理化学综合方法,以及白腐霉真菌预处理、芽孢杆菌细菌预处理<sup>[74]</sup>等生物方法。其中稀酸预处理、蒸汽膨爆预处理、生石灰预处理、湿氧化法预处理、氨纤维膨爆预处理以及萃取预处理等预处理技术应用较为广泛。

尽管上述预处理方法各不相同,但其根本出发点和目的却是一样的,即破坏木质纤维素生物质中阻碍纤维素水解和发酵的结构,降低或消除木质素和半纤维素对纤维素的保护,降低纤维素的结晶度,增大纤维素的比表面积,减小物料粒径,增加原料的疏松性,提高水解效率和糖化得率,为后续微生物发酵提供足够的碳源。以上每一种预处理方法都有其优缺点,在实际应用时要综合考虑原料特性、预处理投入成本以及对环境造成的影响等多方面因素进行选择,必要时可以将几种预处理技术组合在一起进行使用,力争建立一个“共赢”的发展模式。

稀酸预处理<sup>[75]</sup>是指首先使用稀酸溶液(通常是 0.5-2.5%无机酸稀硫酸)对木质纤维素原料进行预浸处理,然后在高温(一般为 110-220 °C)高压条件下处理预浸过的木质纤维素并保留几十秒至几分钟。该预处理方法能够使大部分的半纤维素降解成木糖等小分子物质,而且可以显著破坏木质素的结构。该预处理技术已被放大应用到木质纤维素乙醇工业示范装置和示范工厂。

蒸汽膨爆预处理<sup>[76]</sup>是指在高温(一般为 160-260 °C)高压(一般为 0.69-4.83 MPa)条件下处理木质纤维素原料并保留几秒或几分钟,然后快速泄压达到剧烈爆破效果。该预处理方法能够使半纤维素和木质素得到部分降解和脱除,增加纤维素的比表面积。该预处理技术在造纸行业的应用最为广泛,并且现在已被中试放大应用到木质纤维素原料预处理工厂。

### 1.5.2 脱毒

对木质纤维素生物质进行预处理能够显著破坏其致密复杂结构,从而显著提高纤维素水解效果,但在这个过程中由于高温高压等剧烈条件以及其它一些因素的影响会不可避免地伴随发生很多副反应生成很多对后续水解和发酵都有强烈抑制作用的有毒物质,称为抑制物。这些抑制物可分为三大类:糖分解生成的呋喃类,如糠醛和 HMF 等;木

质素降解生成的酚类，如香草醛、丁香醛和 4-羟基苯甲醛等；半纤维素降解生成的有机酸类，如甲酸、乙酸和乙酰丙酸等<sup>[77]</sup>。由于糖化速率是木质纤维素同步糖化与发酵过程中的限速步骤，而且几乎所有的发酵菌株不具有降解抑制物的能力，并且对这些抑制物产生的协同抑制作用抗逆性普遍较弱，因此十分有必要对这些抑制物进行部分或全部脱除，即脱毒处理。针对物料体系中不同的抑制物，目前已经开发出三种脱毒方法：活性炭吸附脱毒、水洗脱毒、溶剂萃取脱毒等物理方法，过碱化调节等化学脱毒法以及真菌脱毒、细菌脱毒等生物方法。

其中利用微生物，如树脂枝孢霉菌、白腐菌等真菌，降解木质纤维素原料体系中抑制物的生物脱毒法由于脱毒条件温和，脱毒过程绿色环保，是目前颇受研究人员关注的一种脱毒方法。此外，通过代谢工程手段对发酵菌株进行改造使其具有较强的抗逆性能甚至具有降解抑制物的能力，或者利用木质纤维素水解液对发酵菌株进行驯化培养以提高其对发酵体系的适应能力进而提高发酵水平，也被视为一种生物脱毒方法<sup>[78]</sup>。

Zhang 等<sup>[77]</sup>和 Zhao 等<sup>[49]</sup>利用筛选得到的煤油霉菌树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 对干式稀酸预处理后的玉米秸秆体系进行常温静置脱毒处理以后，物料体系中呋喃类和羧酸类抑制物都得到了良好降解，然后利用脱毒物料分别进行乙醇和乳酸发酵都获得较为理想的发酵结果。

### 1.5.3 水解

木质纤维素生物质的糖化过程是指将预处理之后的水不溶性固体中的纤维素和半纤维素等多糖碳水化合物降解成葡萄糖和木糖等水溶性单糖的过程，该工段是生物炼制生产化学品的关键。木质纤维素由于其自然结构的特殊性需要在催化剂（如无机酸和酶等）存在的情况下才能够发生水解，现阶段根据水解反应过程使用催化剂的不同将其分为酸水解和酶水解两种方法。

#### 1.5.3.1 酸水解

木质纤维素的酸水解技术已经经历了很长时间的研究，根据酸溶液浓度的不同分为浓酸水解和稀酸水解。

浓酸水解的原理是纤维素组分在浓酸溶液中降解为低聚葡萄糖，然后加水将浓酸溶液稀释，低聚葡萄糖进一步分解为葡萄糖小分子物质，同时半纤维素组分也被降解为木糖等多种戊糖小分子物质。实验中使用的无机酸通常为硫酸、盐酸和磷酸，而且其浓度范围一般分别为 65%-72%、41%-42%、80%-85%。虽然浓酸水解在常温常压条件下操作，糖产率较高（葡萄糖产率理论值高达 90%左右），但酸用量大，对设备腐蚀比较严重，而且很难进行酸回收利用，这些问题限制了该技术的广泛应用。

稀酸水解的原理是纤维素和半纤维素组分在稀酸溶液中分别分解为葡萄糖和木糖等单糖。实验中使用的无机酸通常为硫酸和盐酸，浓度范围一般小于 10%。虽然稀酸水解酸用量相对较少，但需要在高温条件下操作，能耗投入大，而且生成糠醛、酚类等抑制物，糖产率较低（约为 50%-70%），同时仍然存在严重的设备腐蚀现象，这些问题也限制了该技术的大规模应用。

### 1.5.3.2 酶水解

由于木质纤维素浓酸水解技术和稀酸水解技术都存在很多缺陷,所以亟需寻找新的有效的水解方法。随着生物技术,特别是酶催化技术的发展,木质纤维素酶水解技术应运而生。与酸水解相比,酶水解操作条件温和,能耗低,副产物少,糖产率较高,从而提纯过程相对简单,并且能够和发酵操作相耦合(即SSF),应用潜力巨大,是目前发展前景最好的一种木质纤维素水解技术<sup>[79]</sup>。酶水解过程中使用的纤维素酶成本<sup>[80]</sup>和酶解速率是评价糖化效率的两个重要参数。随着工业进步发展,纤维素酶的生产成本在逐渐降低,高效无污染的酶水解技术目前已经发展成为木质纤维素水解的主要工艺。木质纤维素生物质中纤维素组分的降解和糖化需要在纤维素酶的催化作用下才能完成。纤维素酶是由曲霉属、青霉属和木霉属等好氧丝状真菌、放线菌以及细菌产生的一组可以降解纤维素并最终生成葡萄糖的多酶复合体系。其中应用最多的当属里氏木霉(*T. reesei*)产生的真菌纤维素酶。根据催化反应功能的不同,多酶复合体系分为以下三种酶:(i)  $\beta$ -1,4-葡聚糖内切酶(EG, EC 3.2.1.4):对纤维素长链内部的无定形区(非结晶相)进行随机切割,产生聚合度较小的纤维糊精寡糖分子;(ii)  $\beta$ -1,4-葡聚糖外切酶(CBH, EC 3.2.1.91),又称纤维二糖水解酶:从纤维素寡糖分子链末端进行切割,产生可溶性的纤维二糖和葡萄糖;(iii)  $\beta$ -葡萄糖苷酶(BGL, EC 3.2.1.21):水解上述反应产生的纤维寡糖和纤维二糖,生成葡萄糖。在对木质纤维素原料进行酶水解过程中,主要就是上述三种酶组分通过协同作用完成,即一种酶的产物是另一种酶的底物,但协同作用顺序略有差异。

### 1.5.4 乳酸发酵

利用木质纤维素生物质进行生物转化生产乳酸主要有两种发酵工艺:分步糖化与发酵(separate hydrolysis and fermentation, SHF)和同步糖化与发酵(simultaneous saccharification and fermentation, SSF)。

分步糖化与发酵(SHF)是指木质纤维素原料首先在一个反应器中进行纤维素酶酶解糖化处理,然后将糖化过程制备的水解液转移至另一个反应器中进行微生物发酵生产化学品。该工艺的主要优点是,糖化操作和发酵操作都在各自最佳工艺条件下进行,无需对工艺条件(特别是温度和pH)进行折中处理。主要缺点是,糖化过程中生成的中间产物纤维二糖和终产物葡萄糖的积累对纤维素酶都有严重的产物抑制作用,为了获得较理想的糖化得率,需要增加酶用量,降低木质纤维素原料固含量,而且两步操作也导致生物转化周期较长。

同步糖化与发酵(SSF)是指在同一个反应器中在同一工艺操作条件下同时进行木质纤维素原料纤维素酶酶解糖化和微生物发酵生产化学品。与SHF相比,SSF主要包括以下几点优势:(1)糖化操作和发酵操作同时在同一个反应器中进行,反应器利用率高;(2)生物转化周期短;(3)酶解糖化生成的产物葡萄糖能够被发酵菌株及时快速代谢,消除了水解产物葡萄糖对纤维素酶的抑制作用,糖化速率和糖化得率较高;(4)发酵速率较高;(5)酶用量低;(6)产物乳酸得率高。主要缺点是,如果发酵菌株的最适生长和发酵产酸条件与真菌纤维素酶最适酶解条件(特别是温度和pH)不一致,需要进行

折中处理, 这对糖化效率和发酵水平都会有一定程度的负面影响。

根据目前利用木质纤维素原料进行生物炼制生产乳酸取得的研究成果和研究进展, 可以发现, 相对于分步糖化与发酵(SHF)工艺而言, 同步糖化与发酵(SSF)工艺具有底物固含量高, 酶用量少, 体积小, 乳酸生产成本相对较低等优势, 因此木质纤维素同步糖化与乳酸发酵是未来乳酸生产的主要趋势。

Zhang 等<sup>[36]</sup>利用 *Bacillus coagulans* IPE22 在 20 FPU/g 纤维素酶用量条件下进行小麦秸秆同步糖化发酵 60 h, 得到 38.73 g/L 乳酸。

Zhao 等<sup>[49]</sup>以筛选得到的 *Pediococcus acidilactici* DQ2 为发酵菌株, 利用玉米秸秆进行同步糖化与乳酸发酵 80 h, 产物乳酸的浓度、产率和得率分别高达 101.9 g/L、1.06 g/L/h、77.2%。

Nguyen 等<sup>[81]</sup>分别利用 *Lactobacillus paracasei* LA104 和 *Lactobacillus coryniformis* ATCC 25600 作为发酵菌株, 以姜黄渣为原料, 进行同步糖化与发酵, 分别得到了 97.13 g/L L-乳酸和 91.61 g/L D-乳酸。

Ye 等<sup>[82]</sup>利用 *Bacillus coagulans* JI12 为发酵菌株, 在 25 FPU/g DM 酶用量条件下进行油棕榈空果壳同步糖化与发酵 24 h, 得到了 80.6 g/L L-乳酸。

## 1.6 存在的问题

尽管木质纤维素生物质生物炼制生产乳酸的工艺已经相对比较成熟, 但是与粮食类作物发酵生产乳酸价格相比, 其过高的生产成本严重阻碍了木质纤维素生物转化生产乳酸的产业化步伐<sup>[12]</sup>。研究显示, 虽然木质纤维素生物炼制生产乳酸的原料成本大大低于粮食类作物, 但由于其设备投资大, 加工过程复杂, 低原料成本被昂贵的纤维素酶成本和水电成本等所抵消, 所以木质纤维素生物炼制生产乳酸的成本目前还明显高于粮食类作物淀粉或糖制备的乳酸。综述当前实验室水平研究进展, 乳酸菌利用木质纤维素生物质进行同步糖化与乳酸发酵过程中存在的问题及其应对方案主要包括以下几点:

(1) 产物乳酸的发酵水平(浓度、产率、得率)较低。有文献报道称, 发酵结束时发酵醪液中乳酸的浓度大于 100 g/L 时才具有商业分离提纯价值<sup>[49]</sup>, 而目前木质纤维素原料采用分批发酵方式进行生物转化获得乳酸的浓度大多低于此临界值。提高木质纤维素原料固含量、实现高密度高活性细胞培养或增加接种量是针对这一问题较好的解决方案。Nguyen 等<sup>[81]</sup>分别利用 *Lactobacillus paracasei* LA104 和 *Lactobacillus coryniformis* ATCC 25600 进行姜黄渣同步糖化与发酵, 分别得到了 97.13 g/L L-乳酸和 91.61 g/L D-乳酸。Ye 等<sup>[82]</sup>利用 *Bacillus coagulans* JI12 在 25 FPU/g DM 酶用量条件下进行油棕榈空果壳同步糖化与发酵 24 h, 得到的 L-乳酸浓度只有 80.6 g/L。

(2) 产物乳酸的光学纯度较低。为了合成高性能的聚乳酸材料一般需要乳酸单体的光学纯度 $\geq 99\%$ <sup>[20]</sup>。而目前很多文献报道的产物乳酸的浓度虽然已经达到商业分离纯化水平( $\geq 100$  g/L), 但光学纯度却没有达到这个临界值, 因而不能被用于合成生物可降解塑料。如 Zhao 等<sup>[49]</sup>利用 *Pediococcus acidilactici* DQ2 进行玉米秸秆同步糖化与发酵最后

得到了 101.9 g/L 乳酸, 但产物是混合型 DL-消旋乳酸, 其中 L-乳酸光学纯度为 63.4%, D-乳酸光学纯度为 36.6%。对发酵菌株进行相关基因改造, 如对菌体内存在的 D-乳酸脱氢酶基因(D-*ldh*)或 L-乳酸脱氢酶基因(L-*ldh*)进行选择性的敲除使其只产 L-乳酸或 D-乳酸是针对这一问题较好的解决方案<sup>[16]</sup>。此外, 基因敲除虽然可以实现高光学纯度乳酸单体的生产, 但同时是否会对菌株自身生长和发酵产酸能力有负面影响也需要进行考察。

(3) 培养过程中乳酸菌发生严重的菌体絮凝现象, 严重影响高密度培养的实现。微生物絮凝现象在所有种群中都普遍存在, 对于乳酸菌发生的絮凝现象, 有文献提出的解释是, 乳酸菌在生长过程中菌体自身会分泌产生粘多糖、蛋白质或糖蛋白等物质, 这些物质分布在细胞表面使细胞之间产生粘连进而形成肉眼可见的多细胞菌体絮凝团<sup>[55]</sup>。尝试向培养体系中添加糖化酶或蛋白酶观察是否能够缓解该絮凝现象以确定细胞分泌物的具体成分, 进而实现高密度发酵生产乳酸。

## 1.7 本论文主要研究内容

利用来源丰富的各种工农林业残留及废弃物代替粮食类作物为原料, 通过生物炼制技术进行光学纯(光学纯度 $\geq 99\%$ )乳酸单体的生产, 对于节粮代粮, 提高资源利用率, 实现“变废为宝”, 保护环境清洁, 降低乳酸生产的原料成本, 促进生物质塑料聚乳酸(PLA)产业发展, 创造非常可观的经济和社会效益都具有十分重要的意义。本论文针对木质纤维素生物炼制生产 L-乳酸光学纯度低、浓度低、得率低等问题, 展开对木质纤维素生物转化生产乳酸过程的研究, 包括发酵菌株基因改造及表征、基因工程菌株驯化培养、脱木质素玉米芯残渣同步糖化与乳酸发酵、发酵菌株对营养的需求和高固含量玉米秸秆同步糖化与乳酸发酵工艺研究等五方面内容。此外, 在进行乳酸高水平发酵研究中还用到了节水节能且无废水产生的木质纤维素干式稀酸预处理技术、零能耗零水耗且常温静置条件下的生物脱毒技术以及良好处理高固体含量木质纤维素生物质的螺带式搅拌桨生物反应器等三个本实验室课题组研发的重要研究成果。

(1) 基因改造工程菌株的表征: 为了探究 D-乳酸脱氢酶基因(D-*ldh*)的敲除对基因工程菌 *Pediococcus acidilactici* TY112 菌体生长能力、发酵产酸能力以及抑制物耐受能力的影响, 实验分别从培养温度和培养方式对菌体生长的影响、菌体生长曲线、稀酸预处理木质纤维素体系抑制物对菌体生长和发酵产酸水平的影响、初始葡萄糖浓度对发酵产酸的影响等四个方面展开相关实验研究。

(2) 基因工程菌驯化培养: 为了考察 D-乳酸脱氢酶基因(D-*ldh*)的敲除是否影响了基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 代谢能力的稳定性, 实验分别利用脱木质素玉米芯残渣和玉米秸秆水解液对菌株进行短期驯化培养和长期驯化培养, 以期稳定或提高其代谢产酸水平。

(3) 玉米芯残渣生物转化生产乳酸: 为了考察基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 利用木质纤维素进行发酵产酸的能力, 实验利用富含纤维素组分, 且木质素含量和酚类抑制物含量较少的碱洗玉米芯残渣为原料进行同步糖化与乳酸发酵。

(4) 乳酸片球菌对营养的需求：乳酸菌由于对外界环境中的营养要求比较高，尤其需要价格昂贵的 YE 作为氮源为菌体生长和发酵提供氨基酸、维生素和核苷酸等生长因子，为了探究工程菌 *P. acidilactici* TY112 对 YE 的具体需求情况，实验考察了氮源营养物质 YE 浓度分别为 10、20、30、50 g/L 时发酵菌株乳酸片球菌利用玉米芯残渣水解液和脱木质素玉米芯残渣水解液作为碳源进行发酵的产酸水平。

(5) 高固含量玉米秸秆同步糖化与乳酸发酵工艺研究：为了确定合适的脱毒时间节点，实验分别考察了脱毒时间对干式稀酸预处理玉米秸秆体系中抑制物含量和乳酸发酵水平的影响；为了缓解乳酸菌 *P. acidilactici* TY112 培养过程中出现的菌体絮凝现象，实验考察了添加糖化酶对菌体生长和后续玉米秸秆同步糖化与乳酸发酵的影响。

## 第 2 章 材料与方法

### 2.1 前言

为了满足聚乳酸(PLA)商业化工业生产的要求,乳酸单体的光学纯度和浓度至少要分别达到 99%<sup>[20]</sup>、100 g/L<sup>[49]</sup>。前期研究过程中,本实验室从玉米秸秆乙醇发酵醪液中分离筛选得到一株耐高温、耐预处理木质纤维素体系抑制物、耐产物乳酸抑制的野生乳酸发酵菌株 *P. acidilactici* DQ2,该菌株能够利用农业残留玉米秸秆为原料发酵生产得到 101.9 g/L 混合型乳酸,其中 L-乳酸的光学纯度为 63.4%,D-乳酸的光学纯度为 36.6%<sup>[48]</sup>。针对发酵产物乳酸光学纯度不高这一问题,实验接着通过基因工程手段敲除了该菌体内染色体上的 D-乳酸脱氢酶基因(D-*ldh*),使得基因敲除改造菌株 *P. acidilactici* TY112 能够发酵生产光学纯度高达 99.9%的 L-乳酸。为了探究 D-乳酸脱氢酶基因的敲除对菌体自身生长和发酵产酸能力的影响,本研究又另外挑选了两株乳酸菌,*P. acidilactici* DSM 20284 和 *P. pentosaceus* ATCC 25745,进行对比分析。其中 *P. acidilactici* DSM 20284 作为一株研究开始较早较为深入的模式乳酸菌,其全基因组序列已经得到了详细的研究<sup>[82]</sup>;*P. pentosaceus* ATCC 25745 在系统树中与乳酸片球菌的位置非常近。

### 2.2 菌种与培养基

#### 2.2.1 菌种

野生乳酸菌 *Pediococcus acidilactici* DQ2 (CGMCC 7471)为本实验室从玉米秸秆同步糖化与乙醇发酵醪液中分离筛选得到,发酵产物为混合型乳酸,其中 L-乳酸的光学纯度为 63.4%,D-乳酸的光学纯度为 36.6%<sup>[49]</sup>。

*P. acidilactici* DSM 20284 购买于韩国典型菌种保藏中心(KCTC)。

*P. pentosaceus* ATCC 25745 购买于美国典型菌种保藏中心(ATCC)。

基因改造工程菌 *P. acidilactici* TY112 (CGMCC 8664)是通过基因工程手段敲除野生乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2 染色体上的 D-乳酸脱氢酶基因(D-*ldh*)获得的发酵菌株,可以发酵生产光学纯度高达 99.9%的 L-乳酸。

基因改造工程菌 *P. acidilactici* ZP26 (CGMCC 8665)是通过基因工程手段敲除野生乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2 染色体上的 L-乳酸脱氢酶基因(L-*ldh*)获得的发酵菌株,可以发酵生产光学纯度高达 99.3%的 D-乳酸。

树脂枝孢霉菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 (CGMCC 7452)为本实验室从预处理后秸秆中分离筛选得到的具有较强抑制物降解能力的生物脱毒菌种<sup>[77]</sup>。

#### 2.2.2 培养基

种子培养基(Modified-MRS, M-MRS) (g/L): 葡萄糖, 20; 蛋白胨, 10; 酵母提取物 (YE), 10; 无水乙酸钠, 5; 柠檬酸氢二铵, 2;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.58;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.25。

发酵培养基：使用其它碳水化合物碳源替代葡萄糖，其余氮源和无机盐组分与种子培养基相同。

以上培养基均在 115 °C 进行蒸汽灭菌处理 20 min。

### 2.3 试剂与仪器

实验研究过程中使用的试剂和仪器设备分别见表 2.1 和表 2.2。

表 2.1 实验试剂

Table 2.1 Experiment reagents

试剂名称	规格	生产厂家
葡萄糖	BR	秦皇岛骊骅淀粉股份有限公司
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
磷酸二氢钾	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
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
糠醛	AR	上海润捷化学试剂有限公司
5-羟甲基糠醛	AR	比利时 Acros
香草醛	AR	国药集团化学试剂有限公司
甲酸	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
乙酸	AR	上海润捷化学试剂有限公司
L-乳酸钠	AR	Sigma 公司
乙腈	HPLCG	上海星可生化有限公司
硫酸	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
四环素	AR	Sigma 公司
氢氧化钙	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
氢氧化钠	AR	上海振兴化工厂
福林酚	AR	生物工程
没食子酸	AR	阿拉丁
95%乙醇	AR	国药集团化学试剂有限公司
K-DLATE D/L-乳酸试剂盒	K-DLATE	Megazyme 公司

表 2.2 实验仪器

Table 2.2 Experiment equipments

仪器名称	型号	生产厂家
高效液相色谱仪	LC-20AD	日本岛津
高效液相色谱仪	LC-20AT	日本岛津
生物传感分析仪	SBA-90	山东省科学院生物研究所
分光光度计	DU-800	Beckman 公司
超高速离心机	J-26	美国 Beckman 公司
台式离心机	5418	德国 Eppendorf 公司
电热恒温鼓风干燥箱	DHG-9140A	上海一恒科学仪器有限公司
纤维素分析仪	ANKOM220	美国 ANKOM Technology 公司
预处理蒸汽发生器	HX-36D-2.5	上海华征特种锅炉制造有限公司
立式压力蒸汽灭菌锅	YXQ-LS-75SII	上海博迅实业有限公司医疗设备厂
洗衣机	XQS75-Y928	海尔公司
粉碎机	SF-300	上海科太粉碎设备厂
磨浆机	DSX-32S	江苏启东市东盛化工机械厂
预处理反应器	PCF20-1.6	烟台科立化工设备有限公司
冰箱	BC/BD-518A	海尔公司
冰柜	BC/BD-625GA	新飞公司
漩涡混合仪	MX-S	美国 SCIOLOGEX
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州苏洁净化设备有限公司
超纯水纯化系统	Milli-Q Synthesis	美国 Millipore 公司
pH 计	PHS-3C	雷磁
电子天平	BS223S	瑞士梅特勒托利多仪器有限公司
电子天平	BS223S	瑞士梅特勒托利多仪器有限公司
恒温水槽	ZC	宁波天恒
隔水式恒温培养箱	GHP-9160	上海一恒科学仪器有限公司
立式振荡培养箱	HZ-2111KB	华利达
超低温冰箱	Forma-86C	美国 Thermo scientific 公司
恒温水浴振荡器	HZ-9212S	江苏华利达实验设备厂
超声波清洗机	SB-5200D	宁波新芝生物科技
5 L 发酵罐配套蒸汽发生器	LDRO.026-0.7	上海华征特种锅炉制造有限公司
5 L 发酵罐	Biotech-5L-3	上海保兴生物设备工程有限公司
3 L 发酵罐	BIOTECH-3BG	上海保兴生物设备工程有限公司

## 2.4 原料与酶制剂

玉米秸秆(corn stover, CS)产自河南郸城, 2011 年秋收获, 经清洗、干燥和粉碎后密封保存于塑料袋中备用。

玉米芯残渣(corn cob residues, CCR)由山东康地恩生物技术有限公司(山东, 青岛)提供, 于-20 °C 冰箱中保存备用。

脱木质素玉米芯残渣(delignified corn cob residues, DCCR)由山东龙力生物科技有限公司(中国, 禹城)提供, 并且已经通过碱处理去除了物料中大部分木质素和部分酚类抑制物, 于-20 °C 冰箱中保存备用。

玉米粉(corn flour)产自天津, 由未脱胚乳的玉米粒直接进行机械碾磨成粉状, 于-20 °C 冰箱中保存备用。

纤维素酶制剂 Youtell 6# 购于上海尤特尔生化有限公司(中国, 上海), 采用美国可再生能源实验室(National renewable energy laboratory, NREL)测纤维素酶活的方法, 测定其滤纸酶活为 135 FPU/g, 纤维二糖酶活为 344 IU/g。

高温淀粉液化酶 HTAA (Lot number 7201455498)和糖化酶 GA-L NEW (Lot number 7201417190)均购于杰能科生物工程有限公司(中国, 无锡), 以可溶性淀粉为底物, 液化酶 HTAA 和糖化酶 GA-L NEW 的酶活分别为 22000 U/mL、100000 U/mL。

## 2.5 基因工程菌的表征

### 2.5.1 培养温度和培养方式对菌体生长的影响

利用初始葡萄糖浓度为 20 g/L 的 M-MRS 培养基, 在 20 mL/100 mL 摇瓶培养体系、pH 自然、10% (v/v) 接种量条件下, 考察三株乳酸菌, 模式乳酸菌 *P. acidilactici* DSM 20284、野生乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2 和基因工程菌 *P. acidilactici* TY112, 分别在不同培养温度(42、45、48、50 °C)和不同培养方式(150 rpm 摇瓶培养或静置培养)条件下的生长情况。

### 2.5.2 乳酸菌生长曲线

利用初始葡萄糖浓度为 20 g/L 的 M-MRS 培养基, 考察四株乳酸菌, 模式乳酸菌 *P. acidilactici* DSM 20284、*P. pentosaceus* ATCC 257454、野生乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2 和基因工程菌 *P. acidilactici* TY112, 在 20 mL/100 mL 摇瓶培养体系、42 °C、pH 自然、150 rpm、10% (v/v) 接种量条件下的生长情况。

### 2.5.3 抑制物对菌体生长和发酵的影响

向初始葡萄糖浓度为 20 g/L 的 M-MRS 培养基中分别单独添加不同浓度梯度的糠醛、HMF、香草醛、甲酸和乙酸等五种典型抑制物: 糠醛浓度分别设置为 0、2.0、4.0、6.0、8.0 g/L; HMF 浓度分别设置为 0、1.0、3.0、5.0、7.0 g/L; 香草醛浓度分别设置为 0、0.2、0.3、0.6、1.2 g/L; 甲酸浓度分别设置为 0、0.5、1.0、2.0、3.0 g/L; 乙酸浓度分别设置为 0、3.0、6.0、9.0、12.0 g/L。考察三株乳酸菌, 模式乳酸菌 *P. acidilactici* DSM 20284、野生乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2 和基因工程菌 *P. acidilactici* TY112, 在 50 mL/250 mL 摇

瓶培养体系、42℃、150rpm、10% (v/v)接种量条件下的菌体生长和发酵产酸情况。其中考察抑制物对菌体发酵产酸能力的影响实验时，向摇瓶培养体系中额外添加 0.6 g 碳酸钙/g 葡萄糖调节 pH；考察抑制物对菌体生长的影响实验时，不额外添加 pH 调节剂，即保持 pH 自然。

#### 2.5.4 不同初始葡萄糖浓度对发酵的影响

在初始葡萄糖浓度分别为 53、66、88 g/L 的 M-MRS 培养基，考察基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 在 1 L/3 L 发酵罐培养体系、42℃、pH 5.5、150rpm、10% (v/v)接种量条件下的发酵产酸情况。实验过程中使用 5 M NaOH 作为中和剂。

### 2.6 *P. acidilactici* TY112 驯化培养

#### 2.6.1 短期驯化培养

在 50 mL/250 mL 摇瓶培养体系、15 FPU/g DM 纤维素酶用量、42 °C、150 rpm、10% (v/v)接种量条件下，采用脱木质素玉米芯残渣同步糖化与发酵(SSF)方式对基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 进行短期驯化培养。菌株首先在 5% (w/w)固含量脱木质素玉米芯残渣同步糖化与发酵体系中进行培养，然后转接至 10% (w/w)固含量脱木质素玉米芯残渣同步糖化与发酵体系进行培养，最后再转接至 15% (w/w)固含量脱木质素玉米芯残渣同步糖化与发酵体系进行发酵产酸。实验过程中同时采取两种驯化培养转接时间间隔，菌株驯化培养 12 h 后转接或 24 h 后转接。实验过程中使用 0.6 g 碳酸钙/g 葡萄糖调节 pH。

#### 2.6.2 长期驯化培养

首先在 50 °C、pH 4.8、150 rpm、15 FPU/g DM 纤维素酶用量条件下制备 5% (w/w)和 10% (w/w)固含量未脱毒玉米秸秆水解液，并对水解液进行离心和过滤处理除去其中的不溶性固体。然后在 20 mL/100 mL 摇瓶培养体系、42 °C、150 rpm、10% (v/v)接种量条件下，利用玉米秸秆水解液对基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 进行长期驯化培养。实验分别利用未脱毒的 5%和 10%固含量玉米秸秆水解液进行菌株传代培养。实验过程中使用 0.6 g 碳酸钙/g 葡萄糖调节 pH。

### 2.7 脱木质素玉米芯残渣同步糖化与乳酸发酵

在 2 L/5 L 发酵罐体系、15 FPU/g DM 纤维素酶用量、50 °C、pH 4.8、150 rpm 条件下对脱木质素玉米芯残渣原料进行预糖化 6 h，然后将发酵体系的温度和 pH 调整为 45 °C、5.5，在 10% (v/v)接种量条件下，考察基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 分别利用 15% (w/w)和 20% (w/w)固含量脱木质素玉米芯残渣进行同步糖化发酵的产酸水平。实验过程中使用 5 M NaOH 作中和剂。

### 2.8 营养对乳酸片球菌发酵的影响

#### 2.8.1 YE 浓度对玉米芯残渣水解液乳酸发酵体系的影响

首先在 50 °C、pH 4.8、150 rpm、15 FPU/g DM 纤维素酶用量条件下制备 15% (w/w)

和 20% (w/w)固含量的玉米芯残渣水解液，并对水解液进行离心和过滤处理除去其中的不溶性固体。然后设置发酵培养基中 YE 浓度分别为 10、30 和 50 g/L，考察基因改造工程菌 *P. acidilactici* TY112 在 700 mL/3 L 发酵罐培养体系、42 °C、pH 5.5、150 rpm、10% (v/v)接种量条件下，利用上述水解液进行发酵的产酸情况。实验过程中使用 5 M NaOH 作为中和剂。

### 2.8.2 YE 浓度对脱木质素玉米芯残渣水解液乳酸发酵体系的影响

首先在 50 °C、pH 4.8、150 rpm、15 FPU/g DM 纤维素酶用量条件下制备 10% (w/w)和 15% (w/w)固含量的脱木质素玉米芯残渣水解液，并对水解液进行离心和过滤处理除去其中的不溶性固体。然后设置发酵培养基中 YE 浓度分别为 10、20、30 和 50 g/L，考察三株乳酸菌，野生乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2、基因改造工程菌 *P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26，在 30 mL/100 mL 摇瓶培养体系、42 °C、150 rpm、10% (v/v)接种量条件下，利用上述水解液进行发酵的产酸情况。实验过程中使用 0.6 g 碳酸钙/g 葡萄糖调节 pH。

## 2.9 玉米秸秆同步糖化与乳酸发酵

### 2.9.1 预处理

对发酵用玉米秸秆原料进行本实验室课题组 Zhang 等<sup>[84]</sup>研发的干式稀酸预处理。

### 2.9.2 脱毒

对干式稀酸预处理后的玉米秸秆进行本实验室课题组 Zhang 等<sup>[77]</sup>开发的常温静置生物脱毒处理。

### 2.9.3 磨浆

发酵菌株在利用玉米秸秆进行同步糖化与发酵（纤维素乙醇和乳酸）过程中，糖化速率是其中的限速步骤<sup>[49]</sup>，而对物料进行磨浆处理以进一步减小物料颗粒尺寸，进一步破坏物料内部结构能够显著提高糖化速率和效率。磨浆处理过程主要包括调节物料含水率和磨浆两个步骤：首先，脱毒后玉米秸秆使用去离子水将物料含水率由 50%左右调整至 68%左右；然后，利用磨浆机 DSX-32S（磨盘直径 180 mm，盘间距 0.2 mm）在 2950 rpm 转速条件下进行磨浆操作。磨浆处理后的物料放入塑料袋中置于-20 °C 冰箱冷冻保存备用。

### 2.9.4 同步糖化与发酵操作(simultaneous saccharification and fermentation, SSF)

经干式稀酸预处理、生物脱毒以及磨浆处理的玉米秸秆在本实验室课题组 Zhang 等<sup>[85]</sup>设计的 5 L 螺带式搅拌浆生物反应器（见图 2.1）中进行后续同步糖化与乳酸发酵。

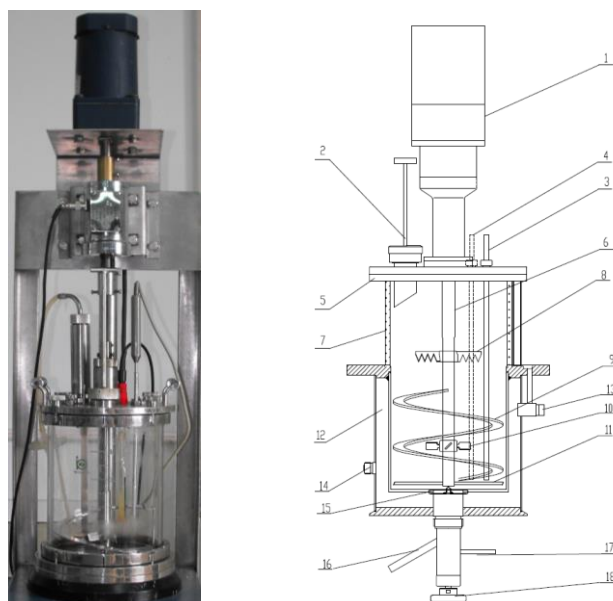


图 2.1 5 L 螺带式搅拌桨生物反应器

Fig. 2.1 5 L helical stirring bioreactor

左图为实际拍摄照片，右图为 CAD 结构图。该反应器包括：(1)电机，(2)物料进料口，(3)温度电极，(4) pH 电极，(5)反应器盖，(6)传动轴，(7)反应器壁，(8)消泡桨，(9)螺带桨，(10)翼型桨，(11)扫底桨，(12)水浴夹套，(13)夹套出水口，(14)夹套进水口，(15)气体分散器，(16)卸料口，(17)进气口，(18)底阀。

### 2.9.5 脱毒时间对抑制物含量和发酵的影响

干式稀酸预处理的玉米秸秆分别进行 1、3、5、7、10 天固态生物脱毒处理，首先在 2 L/5 L 发酵罐体系、25% (w/w)固含量、15 FPU/g DM 纤维素酶用量、50 °C、pH 4.8、150 rpm 条件下，考察脱毒时间对预糖化 6 h 获得浆液中各种抑制物含量和种类变化的影响；然后在 2 L/5 L 发酵罐体系、25% (w/w)固含量、15 FPU/g DM 纤维素酶用量、45 °C、pH 5.5、150 rpm、10% (v/v)接种量条件下，考察脱毒时间对基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 进行同步糖化与发酵产酸水平的影响。实验过程中使用 5 M NaOH 作中和剂。

### 2.9.6 糖化酶对菌体生长的影响

利用初始葡萄糖浓度为 20 g/L 的 M-MRS 培养基，同时采用 30 mL/100 mL 摇瓶培养体系和 1 L/3 L 发酵罐培养体系在 42 °C、150 rpm 条件下对两株基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26 进行培养，考察在培养开始阶段向培养体系中添加 1% (v/v)廉价的工业糖化酶对菌体生长的影响。

### 2.9.7 提高种子液菌体生物量和活性对发酵的影响

首先，在初始葡萄糖浓度为 70 g/L 的 M-MRS 培养基中，考察采用发酵罐培养体系控制 pH 5.5 并添加 1% (v/v)糖化酶培养方式制备得到的高密度高活性基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 种子液在 1 L/3 L 发酵罐体系、42 °C、pH 5.5、150rpm、10% (v/v)接种量条件下的发酵产酸情况。

然后, 考察采用发酵罐培养体系控制 pH 5.5 并添加 1% (v/v) 糖化酶培养方式制备得到的高密度高活性基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26 种子液在 2 L/5 L 发酵罐体系、45°C、pH 5.5、150rpm、10% (v/v) 接种量条件下对后续 25% (w/w) 固含量玉米秸秆同步糖化与乳酸发酵的影响。

最后, 采用发酵罐培养体系控制 pH 5.5 并添加 1% (v/v) 糖化酶培养方式制备得到的高密度高活性基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26 种子液在不同接种量(1%、3%、10%、20%, v/v)条件下对后续 30% (w/w) 固含量玉米秸秆同步糖化与乳酸发酵的影响。实验过程中使用 5 M NaOH 作为中和剂。

## 2.10 分析方法

菌体生物量使用分光光度计 DU-800 在 600 nm 处进行测定, 菌体活性通过活菌计数法进行表征。L-乳酸的浓度使用生物传感分析仪 SBA-90 进行测定, 葡萄糖、D-乳酸、混合型乳酸和抑制物的浓度利用高效液相色谱仪进行测定, 乳酸光学纯度利用 D/L-乳酸试剂盒进行测定。纤维素酶酶活根据美国可再生能源实验室(National Renewable Energy Laboratory, NREL)<sup>[86]</sup>和 Ghose<sup>[87]</sup>制定的相关实验方法进行测定。玉米秸秆中纤维素和半纤维素含量利用两步酸解法进行测定<sup>[88]</sup>, 玉米芯残渣中纤维素和半纤维素含量利用范式洗涤法进行测定<sup>[89]</sup>。木质纤维素原料中总酚含量利用福林酚法<sup>[90]</sup>进行测定。

$$\text{乳酸得率} = \frac{[\text{Lac}]_f \times V_f - [\text{Lac}]_0 \times V_0}{f \times W_{CS} \times 1.111 \times 1.0} \times 100\% \quad (2-1)$$

## 第 3 章 实验结果与讨论

### 3.1 基因工程菌的表征

利用自然界中丰富的各种能源作物、工农业残留及废弃物以及生活垃圾等木质纤维素物质为原料通过良好的生物炼制工艺进行生物转化生产燃料乙醇或有机酸等化学品是近年来非常热门的一个研究课题,其中木质纤维素同步糖化发酵技术由于具有工艺简单、反应器利用率高、劳动强度相对较低等优点而逐渐成为未来生物炼制过程中生物转化生产各种化学品的主要方式。但高效率高水平的同步糖化发酵工艺对发酵菌株有严格的要求:一方面要求发酵菌株的最适生长和发酵条件尽量与真菌纤维素酶的最适酶解条件一致,特别是温度和 pH 这两个工艺参数;另一方面要求发酵菌株对木质纤维素体系有较强的适应能力,特别是对体系中存在的有毒物质有较强的耐受能力;同时要求发酵菌株对木质纤维素同步糖化发酵过程中生成的糖类有较高的耐受能力和利用效率。本实验室从玉米秸秆同步糖化与乙醇发酵体系中分离筛选得到一株耐高温、耐木质纤维素体系抑制物,尤其是能够发酵玉米秸秆高产 101.9 g/L DL-乳酸的乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2。由于上述产物乳酸的光学纯度没有达到生物可降解塑料聚乳酸的合成生产要求,因此本研究接着利用基因工程技术对发酵菌株 *P. acidilactici* DQ2 进行 D-乳酸脱氢酶基因(D-*ldh*)敲除,从而得到了一株产高光学纯度 L-乳酸的基因改造工程菌 *P. acidilactici* TY112。为了探究 D-乳酸脱氢酶基因(D-*ldh*)的敲除对菌体产生的影响,本部分实验分别对基因改造工程菌的菌体生长以及抗逆能力进行了相关对比分析表征。

#### 3.1.1 培养温度和培养方式对菌体生长的影响

乳酸菌发酵菌株的最适生长和发酵产酸条件(一般为 37-43 °C, pH 5.0-7.0)与真菌纤维素酶的最适酶解条件(一般为 50 °C, pH≤5.0)不一致是阻碍木质纤维素物质同步糖化与高水平乳酸发酵过程的一大障碍,因此获得能够耐受较高温度和较低 pH 的乳酸发酵菌株,对于木质纤维素生物炼制生产乳酸具有非常重要的意义。与大多数乳酸菌相比,野生乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2 由于具有较高的温度耐受能力(48 °C),从而比较适合用于木质纤维素同步糖化与乳酸发酵体系。为了探究基因改造菌株 *P. acidilactici* TY112 是否和原始菌株 *P. acidilactici* DQ2 一样能够耐受高温环境,甚至是否能够耐受比原始菌株 *P. acidilactici* DQ2 更高的温度,从而更加适合用于木质纤维素同步糖化与乳酸发酵过程,实验对比分析了三株乳酸菌,模式乳酸菌 *P. acidilactici* DSM 20284、野生乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2 和基因工程菌 *P. acidilactici* TY112,分别在 42、45、48 和 50 °C 培养温度下的生长情况。

乳酸菌是一种典型的厌氧发酵细菌,但目前大多采用摇床振荡培养或搅拌培养的方式对其进行培养,这在理论上不但会弱化厌氧环境进而影响菌体生长和发酵产酸能力,而且还很大程度上增加了能耗输入。为了探究比较适合乳酸菌生长的培养方式,本研究比较了三株乳酸菌,模式乳酸菌 *P. acidilactici* DSM 20284、野生乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2

和基因工程菌 *P. acidilactici* TY112, 分别在摇瓶培养和静置培养方式下的生长情况。

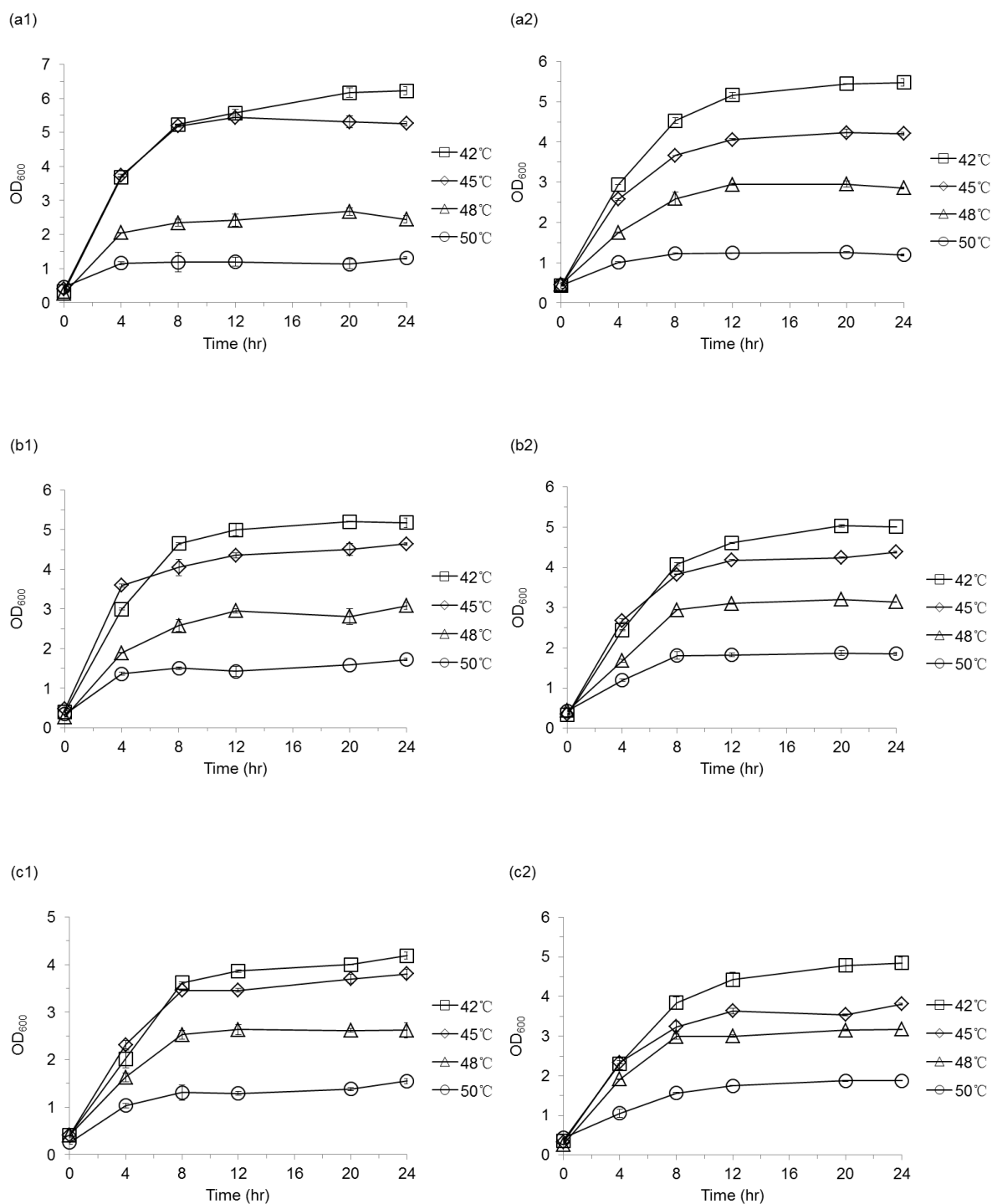


图 3.1 培养温度和培养方式对三株乳酸菌生长的影响

Fig. 3.1 Effect of temperature and cultivating way on the cell growth of three LAB strains. (a1) *P. acidilactici* DSM 20284-static culture, (a2) *P. acidilactici* DSM 20284-shaking culture, (b1) *P. acidilactici* DQ2-static culture, (b2) *P. acidilactici* DQ2-shaking culture, (c1) *P. acidilactici* TY112-static culture, (c2) *P. acidilactici* TY112-shaking culture.

图 3.1 表示上述三株乳酸菌分别在不同培养温度(42、45、48 和 50℃)以及不同培养方式(150 rpm 转速振荡培养或静置培养)条件下的生长曲线。可以看出,在实验所选的四个温度梯度中,即使在 50℃ 高温环境条件下,三株乳酸菌也都有一定程度的生存能力,但是在 42℃ 条件下的生长状况最良好,而且在此温度下,模式乳酸菌 *P. acidilactici* DSM 20284 进行静置培养时其最大菌体生物量( $OD_{600} \approx 6.225$ )高于振荡培养( $OD_{600} \approx 5.476$ ),表明此菌株较适在 42℃ 条件下进行静置培养;野生乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2 进行静置培养时其最大菌体生物量( $OD_{600} \approx 5.176$ )与振荡培养( $OD_{600} \approx 5.008$ )相当,表明此菌株较适在 42℃ 条件下进行静置培养;基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 进行振荡培养时其最大菌体生物量( $OD_{600} \approx 4.845$ )高于静置培养( $OD_{600} \approx 4.186$ ),表明此菌株较适在 42℃ 条件下进行振荡培养。

该实验结果表明, D-乳酸脱氢酶基因(*D-ldh*)的敲除几乎没有影响菌体对高温环境的耐受能力,基因敲除改造菌株 *P. acidilactici* TY112 具有较高的温度耐受能力,因此特别适合用于木质纤维素同步糖化与乳酸发酵过程体系中。

Ye 等<sup>[82]</sup>从自然环境中筛选得到的乳酸发酵菌株 *Bacillus coagulans* JI12 可以在 50℃ 条件下良好生长和发酵产酸,此温度与真菌纤维素酶的最适酶解温度一致,可以在较低的酶用量条件下获得较高的酶解效率,从而可以显著降低乳酸生产成本。

### 3.1.2 乳酸菌生长曲线

很多文献报道称,乳酸菌发酵生产乳酸的能力与其菌体生物量之间存在正相关关系,即所谓的生长关联型。为了探究 D-乳酸脱氢酶基因(*D-ldh*)的敲除对菌体生长造成的影响,实验比较了四株乳酸菌,模式乳酸菌 *P. acidilactici* DSM 20284、*P. pentosaceus* ATCC 257454、野生乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2 和基因工程菌 *P. acidilactici* TY112,在 42℃、150 rpm 条件下的生长情况。

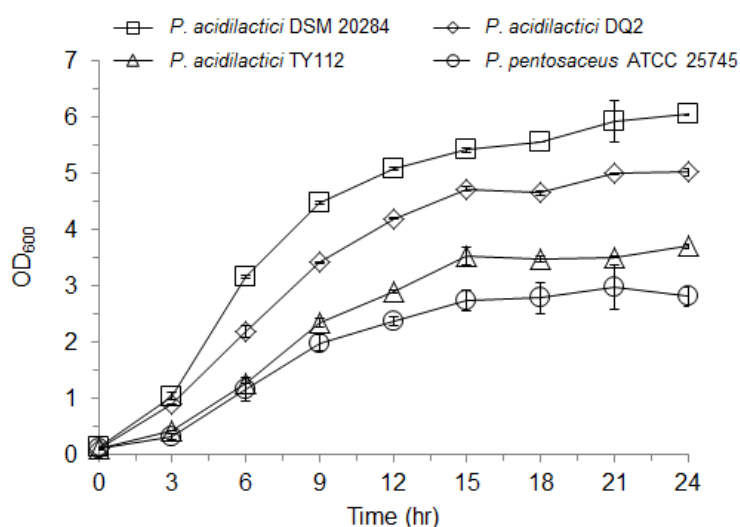


图 3.2 四株乳酸菌的生长曲线

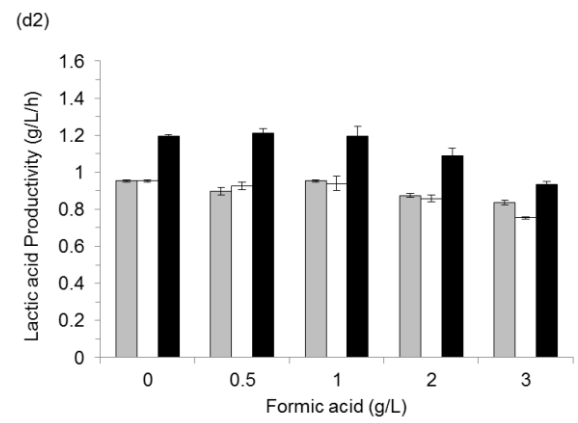
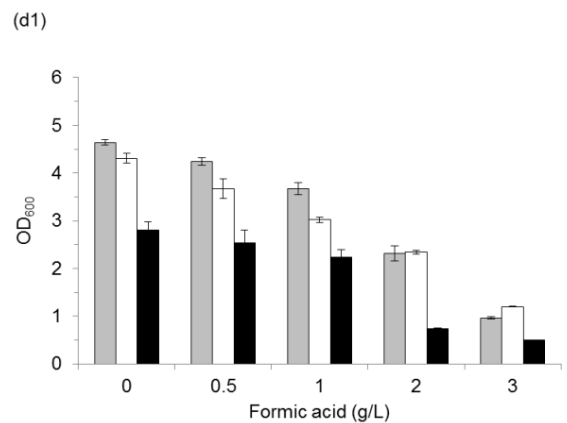
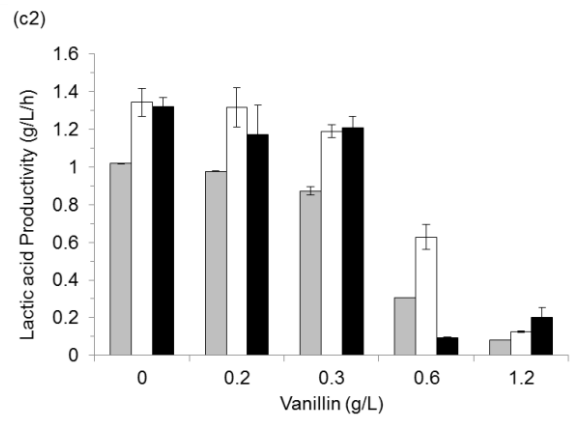
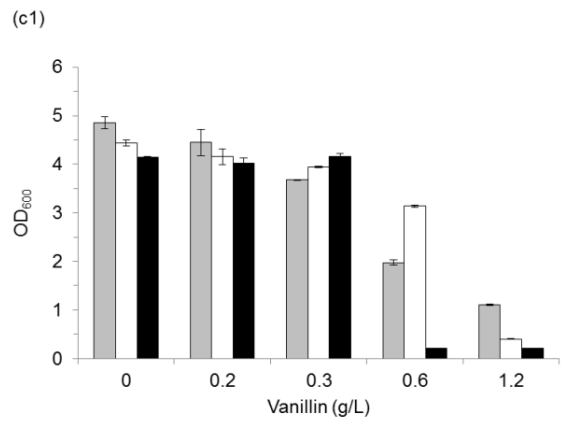
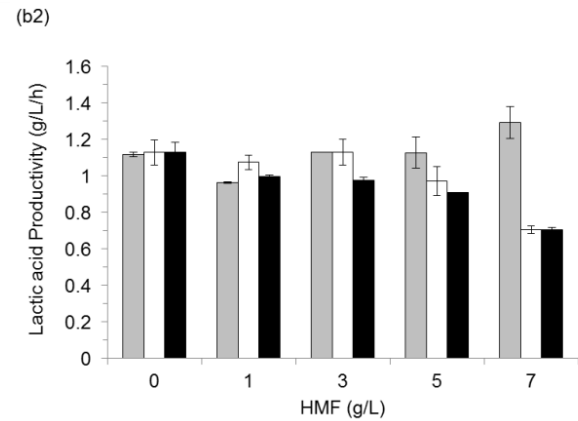
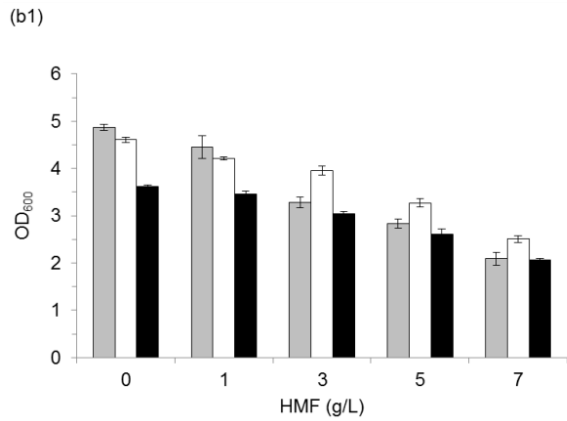
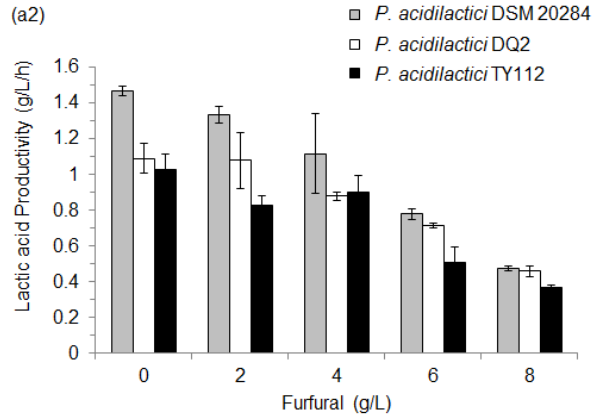
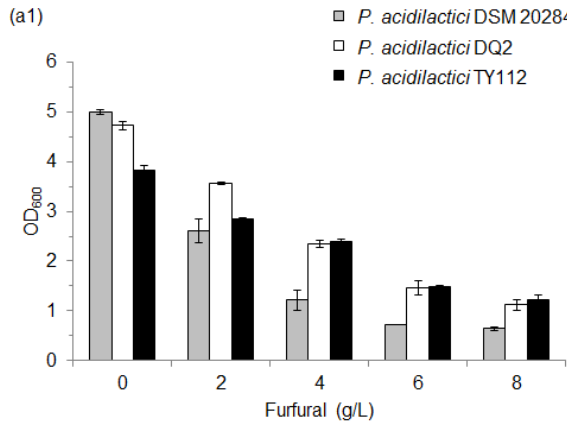
Fig. 3.2 Growth curve of four LAB strains

图 3.2 表示上述四株乳酸菌的生长曲线,可以看出,在 24 h 的培养过程中,模式乳酸菌 *P. acidilactici* DSM 20284 的生长能力最良好(生长速率最快,且最大菌体生物量  $OD_{600} \approx 6.062$ );野生乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2 的生长能力次之,其最大菌体生物量  $OD_{600} \approx 5.027$ ;基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 的生长能力比原始菌株 *P. acidilactici* DQ2 稍弱,其最大菌体生物量  $OD_{600} \approx 3.709$ ; *P. pentosaceus* ATCC 257454 的生长能力在所选的四株乳酸菌中是最弱的,其最大菌体生物量只能达到  $OD_{600} \approx 2.811$ 。

此实验结果表明,D-乳酸脱氢酶基因(D-*ldh*)的敲除对菌体生长造成了一定程度的负面影响,不但降低了菌体的生长速率,同时还降低了菌体生长达到稳定期时的最大菌体生物量。有文献报道称,D-乳酸参与合成乳酸菌细胞壁肽聚糖前体,那么细菌体内 D-乳酸的缺失势必会对细胞壁的合成造成不良影响,进而对菌体生长造成一定程度的伤害,此实验结果也与该观点一致。

### 3.1.3 抑制物对菌体生长和发酵的影响

木质纤维素生物质由于自身结构极其致密,很难直接进行高效率的酶水解,因此在生物转化之前对其进行适当的预处理操作一个必不可少的步骤。但是高强度的预处理,尤其是目前广泛应用的稀酸预处理,由于高温高压等因素的影响,在木质纤维素致密结构被破坏的同时也会发生很多副反应进而生成很多副产物,实验发现这些副产物大多对后续纤维素酶酶解以及微生物生长和发酵都有一定程度的抑制作用,所以统称这些有毒物质为抑制物。这些抑制物大致分为三类:呋喃类抑制物,如糠醛和 HMF 等;羧酸类抑制物,如甲酸、乙酸和乙酰丙酸等;酚类抑制物,如香草醛、4-羟基苯甲醛和丁香醛等。其中,由戊糖和己糖降解产生的糠醛和 HMF<sup>[91]</sup>,由半纤维素降解产生的甲酸和乙酸<sup>[92]</sup>,以及由木质素降解产生的香草醛<sup>[93]</sup>,是这三类抑制物中比较典型的五种代表物质。为了获得较高的酶解效率和发酵水平,对预处理之后的木质纤维素体系进行脱毒处理以降低或消除抑制物是目前生物炼制过程中通常采取的一种方法。但是由于脱毒方法的局限性,目前还没有达到将物料体系中所有抑制物全部脱除的水平,因此非常有必要筛选获得对预处理木质纤维素体系中存在的抑制物有较强耐受能力的发酵菌株。与大多数乳酸菌相比,野生乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2 由于具有较强的抑制物耐受能力(糠醛、HMF、甲酸、乙酸、乙酰丙酸和香草醛等),从而比较适合用于木质纤维素乳酸发酵体系。为了探究基因改造菌株 *P. acidilactici* TY112 是否和原始菌株 *P. acidilactici* DQ2 一样具有较强的抑制物耐受能力,甚至是否具有比原始菌株 *P. acidilactici* DQ2 更强的抑制物耐受能力,从而更加适合用于木质纤维素乳酸发酵过程,实验对比分析了糠醛、HMF、香草醛、甲酸和乙酸等抑制物在单独添加条件下对三株乳酸菌,模式乳酸菌 *P. acidilactici* DSM 20284、野生乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2 和基因工程菌 *P. acidilactici* TY112,生长和发酵产酸水平的影响。



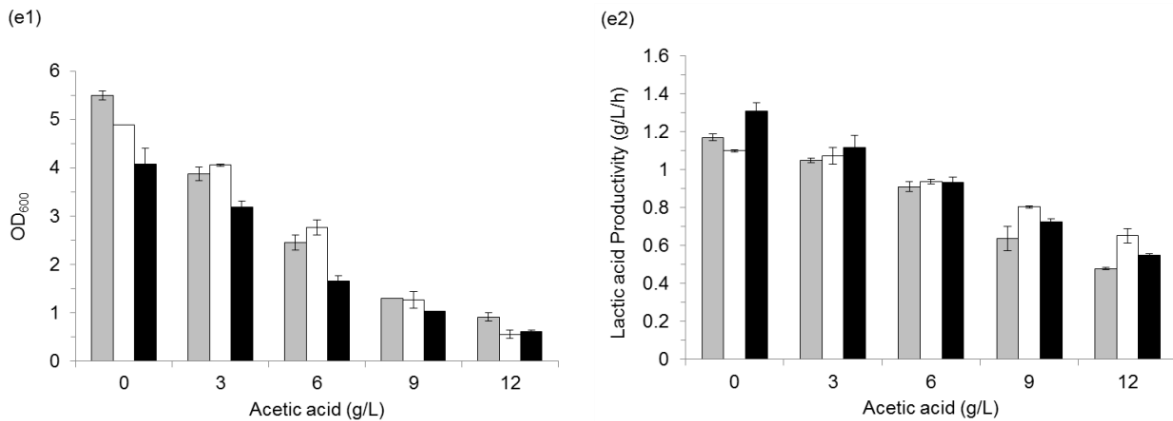


图 3.3 三株乳酸菌对五种常见抑制物的耐受能力

Fig. 3.3 Inhibitor tolerance of three LAB strains to the lignocellulose degradation compounds. (a1, a2) Effect of furfural, (b1, b2) Effect of HMF, (c1, c2) Effect of vanillin, (d1, d2) Effect of formic acid, (e1, e2) Effect of acetic acid.

图 3.3 表示干式稀酸预处理玉米秸秆中五种典型抑制物对三株乳酸菌生长（最大菌体生物量）和发酵产酸水平（乳酸最大生成速率）的影响。根据图 3.3 (a1, a2)和(b1, b2)可以看出，三株乳酸菌对糠醛和 HMF 两种呋喃类抑制物的耐受能力都比较强，当培养体系中糠醛的含量为 4 g/L 时，虽然三株乳酸菌的生长都受到了严重的抑制作用，但其发酵产酸能力却影响较小；当培养体系中 HMF 的含量高达 5 g/L 时，三株乳酸菌的生长只是表现出轻微的抑制现象，而且其发酵产酸能力几乎没有表现出负面影响。此外，三株乳酸菌对上述两种呋喃类抑制物的抗逆能力强弱实验结果相似，而且三株乳酸菌中模式乳酸菌 *P. acidilactici* DSM 20284 的抗逆能力最强，野生乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2 和基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 的抗逆能力大致相当。根据图 3.3 (c1, c2)可以发现，三株乳酸菌对酚类抑制物香草醛的耐受能力都比较弱，当培养体系中香草醛含量达到 0.6 g/L 时，菌体生长和发酵产酸能力同时都受到了非常严重的抑制现象，其中野生乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2 的抗逆能力最强，基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 次之，模式乳酸菌 *P. acidilactici* DSM 20284 对香草醛的反应最敏感。根据图 3.3 (d1, d2)和(e1, e2)可以看出，三株乳酸菌对甲酸和乙酸两种羧酸类抑制物也有很强的的耐受能力，当培养体系中甲酸的含量为 3 g/L 时，虽然三株乳酸菌的生长都表现出了相当严重的抑制现象，但其发酵产酸能力却几乎没有受到负面影响；当培养体系中乙酸的含量为 6 g/L 时，尽管三株乳酸菌的生长都表现出了明显的抑制现象，但其发酵产酸产酸能力却影响相对较小。此外，三株乳酸菌对上述两种羧酸类抑制物的抗逆能力强弱实验结果也十分相似，而且这三株乳酸菌的抗逆能力强弱大致相当。

该实验结果表明，D-乳酸脱氢酶基因(D-ldh)的敲除并没有明显影响菌体对预处理木质纤维素体系抑制物的抗逆能力，基因敲除改造菌株 *P. acidilactici* TY112 具有较强的耐受抑制物的能力，因此特别适合用于木质纤维素生物炼制生产乳酸过程体系中。

Zhang 等<sup>[36]</sup>筛选得到的乳酸发酵菌株 *Bacillus coagulans* IPE22 对糠醛、HMF、甲酸、乙酸以及香草醛等单一抑制物都具有较强的抗逆能力。

### 3.1.4 不同初始葡萄糖浓度对发酵的影响

利用木质纤维素生物质进行生物转化生产乳酸时可以采用分步糖化发酵(SHF)和同步糖化发酵(SSF)两种发酵方式。一般来说,分步糖化发酵方式由于发酵培养基中初始葡萄糖浓度较高,所以要求发酵菌株有较强的高浓度葡萄糖耐受能力;虽然同步糖化发酵过程中不存在初始葡萄糖浓度过高这一因素,但要求发酵菌株能够及时快速代谢酶解生成的葡萄糖,避免 SSF 过程中大量积累的葡萄糖对纤维素酶产生的产物抑制作用以及对发酵菌株产生的底物抑制作用。为了考察基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 是否具有好的葡萄糖代谢能力,从而适合用于高固含量木质纤维素乳酸发酵体系,实验设置 M-MRS 培养基中初始葡萄糖浓度分别为 53、66 和 88 g/L。

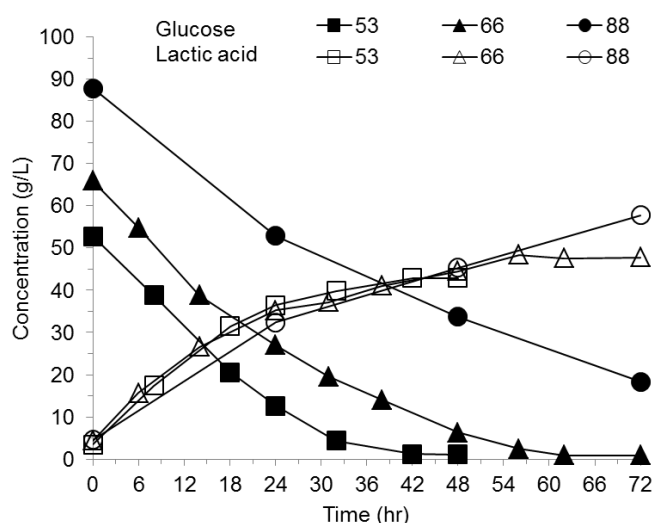


图 3.4 不同初始葡萄糖浓度对乳酸发酵的影响

Fig. 3.4 Lactic acid fermentation at different initial glucose concentrations

图 3.4 表示基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 在上述三个初始葡萄糖浓度梯度下的糖耗和乳酸生成曲线。可以看出,随着发酵培养基中初始葡萄糖浓度由 53 g/L 提高至 66 g/L,甚至提高至 88 g/L 时,糖耗速率和乳酸生成速率都没有发生明显的降低现象。当初始葡萄糖浓度为 53 和 66 g/L 时,分别进行发酵 32 h 和 56 h 以后,发酵培养基中不再有残糖剩余,但是当初始葡萄糖浓度增加至 88 g/L 时,直到发酵结束(72 h)还有大量的残糖(18.3 g/L)剩余。然而在玉米秸秆同步糖化与乳酸发酵过程中,糖化速率是限速步骤,而且生物转化过程中葡萄糖的浓度一般不会超过 70 g/L。

该实验结果表明,基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 不但具有较强的高浓度葡萄糖耐受能力,而且具有快速代谢葡萄糖的能力,因此特别适合用于木质纤维素同步糖化与乳酸发酵过程体系中。

Zhao 等<sup>[49]</sup>筛选得到的乳酸发酵菌株 *Pediococcus acidilactici* DQ2 在初始葡萄糖浓度高达 75 g/L 进行分批发酵时具有较高的产酸水平。

### 3.2 *P. acidilactici* TY112 驯化培养

发酵菌株大多没有对预处理木质纤维素体系抑制物进行降解脱毒的能力, 甚至对这些抑制物的抗逆能力比较弱, 因此为了获得理想的发酵水平, 需要对物料体系进行必要的脱毒处理。虽然很多文献报道称, 其使用的乳酸发酵菌株具有非常强的单一抑制物耐受能力<sup>[49]</sup>, 但在真实的预处理木质纤维素物料体系中所有生成的抑制物是同时存在的, 而且这些抑制物在对菌体生长和发酵产生抑制作用时存在协同抑制作用<sup>[94]</sup>, 所以很少有发酵菌株直接利用未经脱毒处理的物料进行发酵。随着近年来菌株驯化培养技术的发展以及取得的研究进展, 国内外研究人员纷纷将目光转向木质纤维素生物转化体系中发酵菌株的驯化培养(adaptive laboratory evolution, ALE)<sup>[95]</sup>, 以期提高发酵菌株对未脱毒或轻微脱毒处理的预处理木质纤维素体系恶劣环境的适应能力, 进而在一定程度上降低脱毒处理强度甚至省略掉脱毒工段, 缩短生物炼制周期, 减少劳动操作强度, 降低产品的生产成本。对于基因改造工程菌株来说, 对其进行驯化培养更是具有非常重要的意义, 一方面通过驯化培养有可能提高菌株对物料体系的适应能力, 更为重要的是通过驯化培养可以检验菌株的生长和发酵能力是否稳定, 若代谢能力不稳定通过长期驯化培养也能够实现稳定菌株的生长和发酵能力。为了考察 D-乳酸脱氢酶基因(D-*ldh*)的敲除对菌体代谢能力产生的影响, 本部分实验同时利用短期驯化培养技术和长期驯化培养技术对基因改造工程菌 *P. acidilactici* TY112 进行驯化培养, 以期稳定并提高其发酵产酸水平。

#### 3.2.1 短期驯化培养

相对于长期驯化, 对发酵菌株进行短期驯化培养能够在很大程度上缩短驯化时间, 减少人力物力投入。为了实现快速检验基因改造工程菌 *P. acidilactici* TY112 的生长代谢能力是否稳定, 同时考察短期驯化培养是否能够提高菌株的发酵产酸水平, 实验尝试利用富含纤维素组分(纤维素含量高达 81.63%)的工农业废弃物脱木质素玉米芯残渣对 *P. acidilactici* TY112 进行同步糖化与发酵(SSF)短期驯化培养以期稳定或提高菌株的发酵产酸能力, 从而使得该菌株更加适合用于脱木质素玉米芯残渣同步糖化与乳酸发酵体系。实验通过比较菌株在三种培养方式下的发酵产酸水平来对上述问题进行说明。作为对照实验, 将发酵菌株 *P. acidilactici* TY112 种子液直接接种至 15% (w/w)固含量脱木质素玉米芯残渣同步糖化与乳酸发酵体系进行发酵产酸; 作为实验组, 将发酵菌株 *P. acidilactici* TY112 种子液首先接种至较低固含量(5%, w/w)脱木质素玉米芯残渣体系培养 12 h, 然后将菌株转接至 10% (w/w)固含量脱木质素玉米芯残渣体系培养 12 h, 接着再将菌株转接至 15% (w/w)固含量脱木质素玉米芯残渣同步糖化与乳酸发酵体系进行发酵产酸; 考虑到菌体在木质纤维素体系中生长速率可能比较慢, 再设一实验组, 将发酵菌株 *P. acidilactici* TY112 种子液首先接种至较低固含量(5%, w/w)脱木质素玉米芯残渣体系培养 24 h, 然后将菌株转接至 10% (w/w)固含量脱木质素玉米芯残渣体系培养 24 h,

接着再将菌株转接至 15% (w/w)固含量脱木质素玉米芯残渣同步糖化与乳酸发酵体系进行发酵产酸。

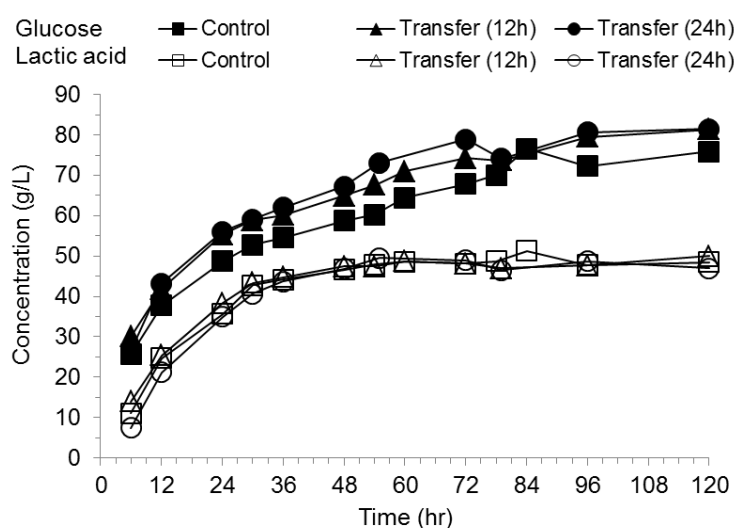


图 3.5 短期驯化培养对发酵的影响

Fig. 3.5 Short-term adaptation of *P. acidilactici* TY112

图 3.5 表示基因改造工程菌 *P. acidilactici* TY112 在上述三种培养方式下的糖耗曲线和乳酸生成曲线。可以发现，菌株在三种培养方式下的发酵曲线没有表现出明显的差异，特别是乳酸生成曲线几乎是完全重叠的。对照组、两个实验组进行 120 h SSF 生成乳酸的浓度分别为 48.45、49.95、46.95 g/L，由于发酵体系其它因素的影响导致发酵醪液中直至发酵结束都有大量残糖剩余，发酵结束时残糖浓度分别为 75.83、81.35、81.45 g/L。

该实验结果表明，利用脱木质素玉米芯残渣通过同步糖化与发酵短期驯化培养方式并没有提高基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 的发酵产酸能力。同时，该实验结果还说明，基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 具有非常稳定的代谢能力，满足发酵工业对发酵菌株产酸水平稳定的要求。

### 3.2.2 长期驯化培养

与短期驯化相比，对发酵菌株进行长期驯化培养更有可能提高菌株对恶劣生长环境的适应能力<sup>[96]</sup>。因此实验接着利用含有生物素生长因子和氮、钾、镁、锰等金属元素的农业残留玉米秸秆对基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 进行分步糖化与发酵(SHF)长期驯化培养以期稳定或提高菌株的发酵产酸能力，从而使得该菌株更加适合用于玉米秸秆生物炼制乳酸发酵体系。前期研究发现，该基因工程菌对未脱毒的稀酸预处理玉米秸秆水解液极其敏感，为了确保菌株传代培养驯化能够顺利进行，实验制备的未脱毒玉米秸秆水解液的固含量比较低（5%和 10%，w/w），水解液中各组分浓度如表 3.1 所示。开展长期驯化培养时，首先将 *P. acidilactici* TY112 种子液接种至 5% (w/w)固含量玉米秸秆水解液发酵体系，并以 12 h 作为培养时间间隔进行连续传代驯化培养，待其代谢稳定以后；

然后将上述培养液以 10% (v/v)接种量条件转接至 10% (w/w)固含量玉米秸秆水解液发酵体系，同样以 12 h 作为培养时间间隔进行连续传代驯化培养。

表 3.1 玉米秸秆水解液中各组分含量

Table 3.1 Composition of corn stover hydrolysate

Composition	Concentration (g/L)	
	5%	10%
Glucose	24.84	43.40
HMF	0.12	0.22
Furfural	0.25	0.31
Acetic acid	1.75	2.35
Levulinic acid	0.15	0.23
Vanillin	0.20	0.32
Syringaldehyde	0.17	0.30
4-Hydroxybenzaldehyde	0.02	0.06

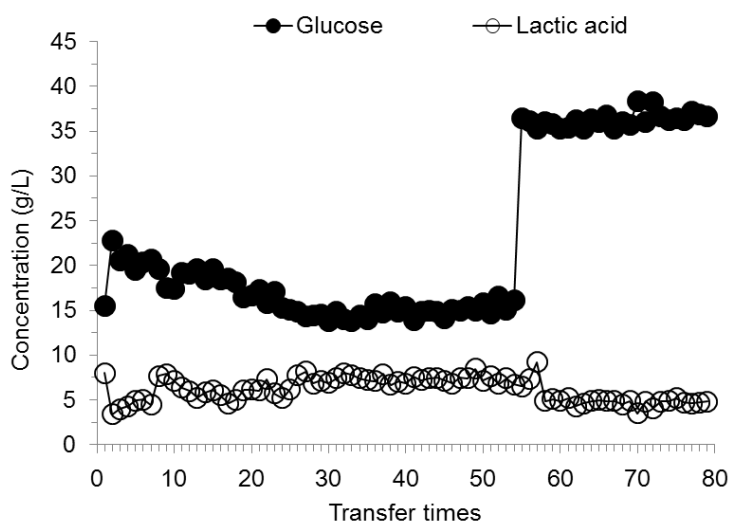


图 3.6 长期驯化培养对发酵的影响

Fig. 3.6 Long-term adaptation of *P. acidilactici* TY112

图 3.6 表示基因改造工程菌 *P. acidilactici* TY112 利用 5% 和 10% (w/w) 固含量未脱毒玉米秸秆水解液进行长期传代驯化培养过程中的糖耗曲线和乳酸生成曲线。可以发现，该菌株在上述两种水解液体系中的代谢能力并没有随着驯化时间的延长有所提高，而是一直都很稳定。其中，该菌株利用 5% 固含量玉米秸秆水解液进行了 54 次转接培养，利用 10% 固含量玉米秸秆水解液进行了 25 次转接培养，此次菌株长期驯化培养持续了 40

天共进行转接 79 次。

该实验结果表明，利用玉米秸秆通过分步糖化与发酵长期驯化培养方式并没有提高基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 的发酵产酸能力。同时，该实验结果还说明，基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 具有非常稳定的代谢能力，满足发酵工业对发酵菌株产酸水平稳定的要求。

Wang 等<sup>[97]</sup>通过基因改造手段和菌株驯化培养技术获得的乳酸发酵菌株 *Bacillus coagulans* QZ19 可以在 7.5 FPU/g 纤维素酶用量条件下发酵结晶纤维素生产高光学纯度的 D-乳酸。

### 3.3 脱木质素玉米芯残渣同步糖化与乳酸发酵

山东龙力生物科技公司提供的工农业废弃物玉米芯残渣中除了含有大量的纤维素组分，同时还含有大量的木质素。很多研究报道称，木质纤维素原料中的木质素不但很难被微生物降解利用，而且对糖化过程中使用的纤维素酶进行无效吸附，使得纤维素酶解效率较低<sup>[98]</sup>。虽然增加酶用量可以解决酶解效率低的问题，但由于纤维素酶价格较高，从经济角度来看，该方法是不可取的。另外一种方法是对原料进行脱木质素处理，这样不但可以从根本上解决木质素对纤维素酶的无效吸附问题，而且还能提高原料中纤维素的含量。因此，对上述木质纤维素原料玉米芯残渣进行碱处理以除去其中存在的大部分木质素，经检测后发现该加工处理方法得到的脱木质素玉米芯残渣中木质素含量能够降至 7.18%，使纤维素含量高达 81.63%，半纤维素含量为 4.63%。此外，对原料进行总酚含量分析发现，该种碱处理方法还能洗除体系中近 2/3 的总酚（玉米芯残渣中总酚含量为 21.25 mg/g DM，经碱洗以后得到的脱木质素玉米芯残渣中总酚含量只有 7.79 mg/g DM），这对于降低物料体系中酚类抑制物对纤维素酶和发酵菌株的抑制作用具有十分重要的意义。

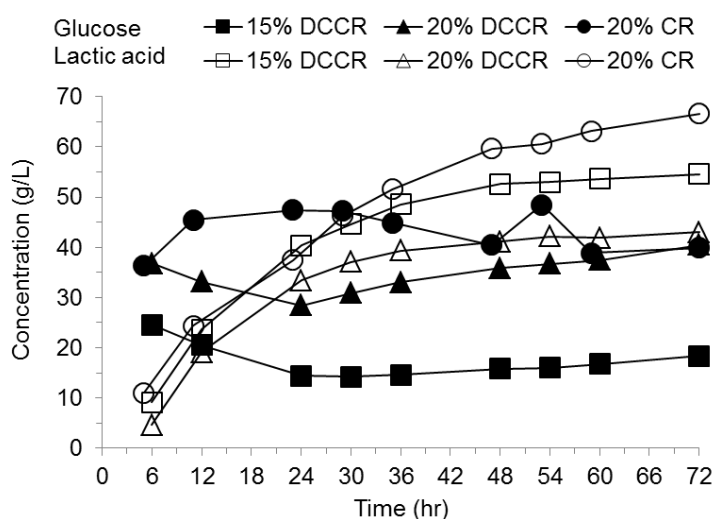


图 3.7 脱木质素玉米芯残渣同步糖化与乳酸发酵

Fig. 3.7 Comparison of lactic acid fermentation performance using DCCR and corn meal

利用碱洗处理方法得到的木质纤维素原料脱木质素玉米芯残渣不但木质素含量较低(7.18%), 纤维素含量较高(81.63%), 而且酚类抑制物含量较低(7.79 mg/g DM), 是一种利用潜力巨大的乳酸发酵原料。对基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 利用上述物料进行同步糖化与乳酸发酵的产酸能力进行了相关研究, 选择 20% (w/w)固含量玉米粉同步糖化与乳酸发酵作为对照实验, 用以评价 15%和 20% (w/w)固含量脱木质素玉米芯残渣同步糖化与乳酸发酵的产酸水平。

图 3.7 表示 *P. acidilactici* TY112 利用富含纤维素的木质纤维素生物质脱木质素玉米芯残渣和富含淀粉的玉米粉为原料进行同步糖化与乳酸发酵的糖耗曲线和乳酸生成曲线。可以看出, 虽然该木质纤维素原料纤维素含量很高, 但其它营养组分却相对比较贫瘠, 导致营养要求较高的发酵菌株 *P. acidilactici* TY112 不能良好利用发酵体系中酶解生成的葡萄糖进行生长和发酵产酸。发酵 72 h, 15% (w/w)固含量脱木质素玉米芯残渣同步糖化发酵体系中产物乳酸的浓度为 54.6 g/L, 剩余残糖 18.4 g/L; 20% (w/w)固含量脱木质素玉米芯工业残渣同步糖化发酵体系中产物乳酸的浓度只有 43.1 g/L, 剩余残糖 40.5 g/L。

该实验结果表明, 需要丰富外界营养供给的乳酸菌 *P. acidilactici* TY112 不能良好利用营养成分相对贫瘠的富含纤维素的脱木质素玉米芯残渣进行高水平乳酸发酵。

### 3.4 营养对乳酸片球菌发酵的影响

乳酸菌由于自身不能合成氨基酸、维生素 B、核苷酸和多肽等菌体生长需要的生长因子, 需要从外界环境中摄取, 因此对营养的要求比较高, 需要在植物、牛奶、人体或动物体内等富养环境中生存。针对这一现象, 科研人员研制出了营养及其丰富的 MRS 培养基(de Man-Rogosa-Sharpe, MRS)以满足乳酸菌进行良好生长和发酵产酸对营养的需求。由于此 MRS 培养基中营养太过丰富, 有些乳酸菌并不能完全代谢利用其中的每种物质, 所以针对不同的发酵菌株, 以 MRS 为基础, 对其进行营养物质优化实验以确定出相对经济而又适合菌株生长和乳酸发酵的 M-MRS (Modified MRS)培养基。在这些营养成分中, 酵母浸提物(YE)的价格比较昂贵, 很多文献都曾尝试利用比较廉价的玉米浆、花生饼粉、豆粕、脱脂牛奶等氮源代替 YE<sup>[99]</sup>, 但从发酵结果来看, YE 作氮源得到的发酵水平是最高的。

与营养成分相对较为丰富的玉米秸秆木质纤维素生物质相比, 工农业废弃物玉米芯残渣虽然含有大量的纤维素组分, 但其它营养成分比较贫瘠, 而发酵菌株乳酸片球菌对营养的需求较高, 因此本研究使用 YE 作为氮源。实验发现基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 在利用脱木质素玉米芯残渣进行同步糖化与乳酸发酵时, 发酵结束时发酵醪液中仍然存在大量的残糖未被利用从而导致发酵结果很不理想, 所以本部分实验尝试增加发酵体系中氮源 YE 的浓度是否能够提高发酵水平。

#### 3.4.1 YE 浓度对玉米芯残渣水解液乳酸发酵体系的影响

山东康地恩生物技术有限公司利用玉米芯为原料生产木糖醇过程中产生了大量的

废弃物玉米芯残渣, 检测发现该废弃物中含有丰富的纤维素组分(58.2%), 实验利用纤维素酶水解工艺制备得到了 15%和 20% (w/w)固含量玉米芯残渣水解液, 经检测发现上述水解液中碳源葡萄糖的浓度分别为 89.1、105 g/L, 计算得出糖化得率分别为 78.09%、64.95%。

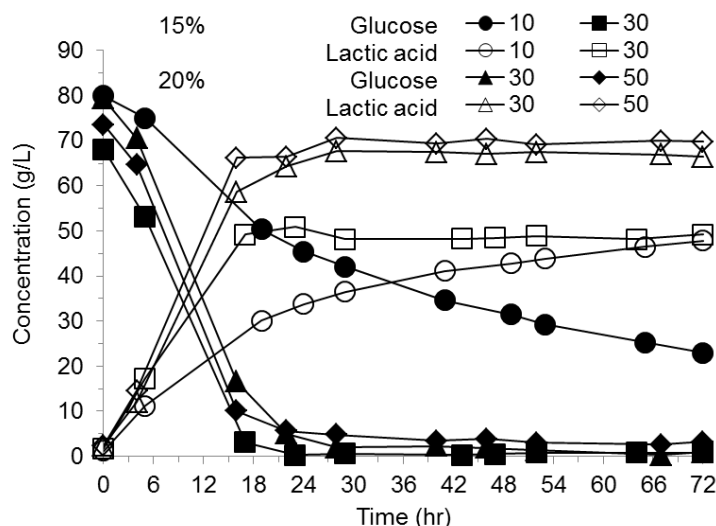


图 3.8 YE 浓度对玉米芯残渣水解液乳酸发酵体系的影响

Fig. 3.8 Lactic acid fermentation of CCR hydrolysate at different YE concentrations

表 3.2 YE 浓度对玉米芯残渣水解液乳酸发酵体系的影响

Table 3.2 Lactic acid fermentation of CCR hydrolysate at different YE concentrations

YE (g/L)	Initial glucose (g/L)	Lactic acid (g/L)	Productivity (g/L/h)	Yield (%)	Sugar conversion (%)
10	80.0	47.8	0.66	64.5	94.4
30	68.1	49.2	0.68	83.8	84.9
30	79.3	67.5	0.94	95.4	96.6
50	73.6	70.0	0.97	108.9	114.7

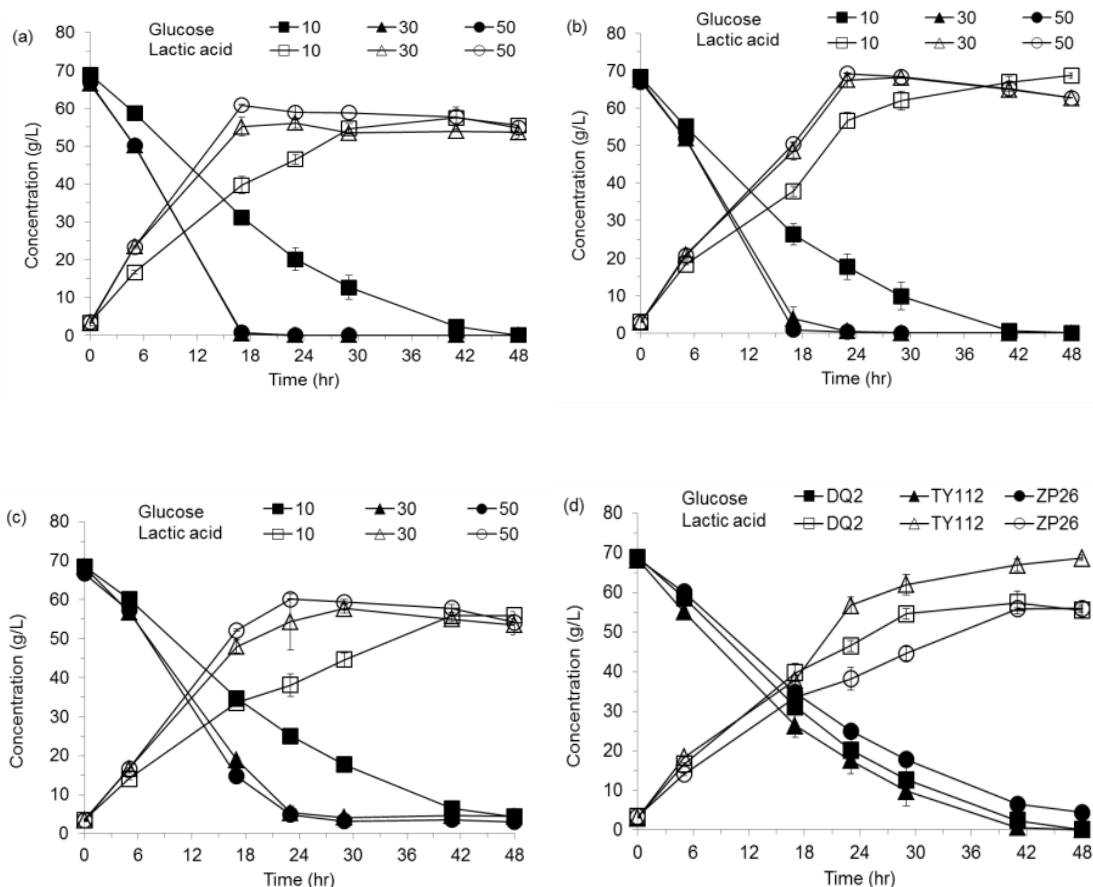
为了探究基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 对营养物质氮源 YE 的需求情况, 实验先后考察了 YE 浓度分别为 10、30 和 50 g/L 时, 基因改造菌株 *P. acidilactici* TY112 利用 15%和 20% (w/w)固含量玉米芯残渣水解液进行分步糖化发酵的产酸水平。图 3.8 表示玉米芯残渣水解液乳酸发酵体系中 YE 浓度由 10 g/L 提高至 30、50 g/L 时的糖耗曲线和乳酸生成曲线, 具体实验数据见表 3.2。根据上述图表可以看出, 当发酵体系中 YE 浓度为 10 g/L 时, 由于初始葡萄糖浓度较高(80 g/L), 发酵体系中营养物质供应不及时等因素的影响, 导致发酵速率较慢(0.66 g/L/h), 乳酸得率较低(64.5%), 发酵结束时有大量残糖剩余(23 g/L); 当发酵体系中 YE 浓度增加至 30 g/L 时, 糖耗速率、乳酸产率以及产

物得率都得到了显著提高, 而且发酵结束时没有残糖剩余; 当发酵体系中 YE 浓度进一步增加至 50 g/L 时, 发酵速率并没有继续大幅度升高(由 0.94 g/L/h 升高至 0.97 g/L/h), 但乳酸得率却仍然表现出大幅增加的趨勢(由 95.4% 增加至 108.9%)。

该实验结果表明, 需要丰富外界营养供给的乳酸菌 *P. acidilactici* TY112 利用营养成分相对贫瘠的玉米芯残渣水解液进行乳酸发酵时, 适当提高发酵体系中氮源 YE 的浓度至 30 g/L, 不但可以显著增加发酵速率, 而且能够大幅提高乳酸得率, 同时还解决了发酵结束时发酵醪液中有大量残糖剩余的不良现象。此外, 进一步提高发酵体系中氮源 YE 的浓度至 50 g/L, 能够使乳酸得率更高。

### 3.4.2 YE 浓度对脱木质素玉米芯残渣水解液乳酸发酵体系的影响

与工农业废弃物玉米芯残渣相比, 进行碱处理得到的脱木质素玉米芯残渣由于木质素含量和总酚抑制物含量都较低, 因而利用潜力更大。实验利用纤维素酶水解工艺制备得到了 10% 和 15% (w/w) 固含量脱木质素玉米芯残渣水解液, 经检测发现上述水解液中碳源葡萄糖的浓度分别为 81、119 g/L, 计算得出糖化得率分别为 80.14%、74.36%。为了探究三株乳酸菌, 野生乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2、基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26, 对营养物质氮源 YE 的需求情况, 实验先后考察了 YE 浓度分别为 10、30 和 50 g/L 时, 发酵菌株利用 10% 和 15% (w/w) 固含量脱木质素玉米芯残渣水解液进行分步糖化发酵的产酸水平。



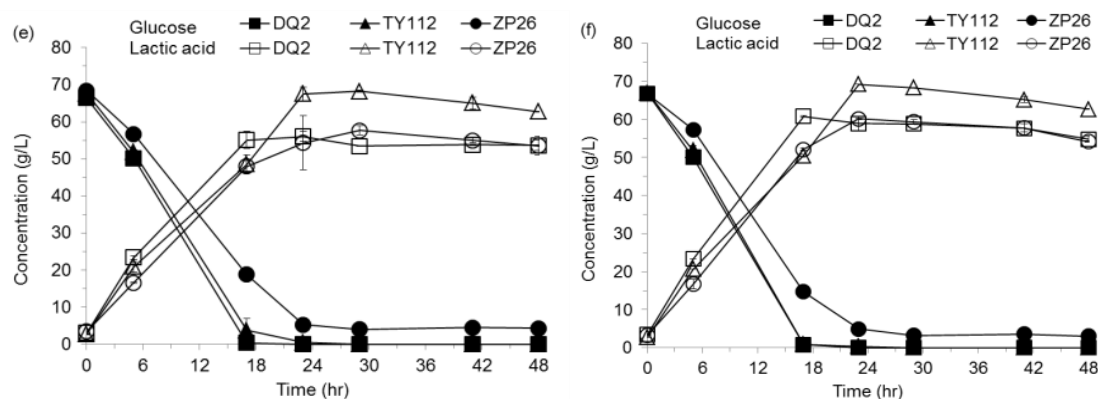


图 3.9 YE 浓度对脱木质素玉米芯残渣水解液乳酸发酵体系的影响

Fig. 3.9 Lactic acid fermentation of three LAB strains at different YE concentrations. (a) *P. acidilactici* DQ2, (b) *P. acidilactici* TY112, (c) *P. acidilactici* ZP26, (d) 10 g/L YE, (e) 30 g/L YE, (f) 50 g/L YE.

表 3.3 YE 浓度对脱木质素玉米芯残渣水解液乳酸发酵体系的影响

Table 3.3 Lactic acid fermentation of DCCR hydrolysate at different YE concentrations

LAB	YE (g/L)	Initial glucose (g/L)	Lactic acid (g/L)	Productivity (g/L/h)	Yield (%)	Sugar conversion (%)
<i>P. acidilactici</i> DQ2	10	68.9	57.4	1.20	78.5	78.5
	30	66.4	56.1	1.17	79.7	79.7
	50	66.8	60.8	1.27	85.8	85.8
<i>P. acidilactici</i> TY112	10	68.3	68.7	1.43	96.2	96.2
	30	67.6	68.2	1.42	96.8	96.8
	50	67.0	69.2	1.44	99.1	99.1
<i>P. acidilactici</i> ZP26	10	68.5	56.0	1.17	76.7	81.9
	30	68.4	57.7	1.20	79.3	84.7
	50	66.8	60.1	1.25	85.1	89.1

图 3.9 表示 10% (w/w)固含量脱木质素玉米芯残渣水解液乳酸发酵体系中 YE 浓度由 10 g/L 提高至 30、50 g/L 时的糖耗曲线和乳酸生成曲线，具体实验数据见表 3.3。从图 3.9 (a, b, c)可以发现，营养 YE 浓度对三株乳酸菌发酵产酸能力的影响十分一致，而且与 YE 浓度对 *P. acidilactici* TY112 利用玉米芯残渣水解液进行分步糖化与乳酸发酵的影响结果相似。当发酵体系中 YE 浓度为 10 g/L 时，由于初始葡萄糖浓度较高（69 g/L 左右），发酵体系中营养物质供应不及时等因素的影响，导致上述三株乳酸菌的发酵速率都较慢，但发酵结束时都没有残糖剩余现象；当发酵体系中 YE 浓度增加至 30 g/L 时，糖耗速率和乳酸产率都得到了显著提高；当发酵体系中 YE 浓度进一步增加至 50 g/L 时，发酵速率和乳酸得率只是有部分提高。从图 3.9 (d, e, f)可以发现，在 10、30 和 50 g/L 三个 YE 浓度梯度条件下，基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 的发酵产酸水平都是最高的，

原始乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2 次之，L-乳酸脱氢酶基因敲除菌株 *P. acidilactici* ZP26 的发酵能力相对较弱。

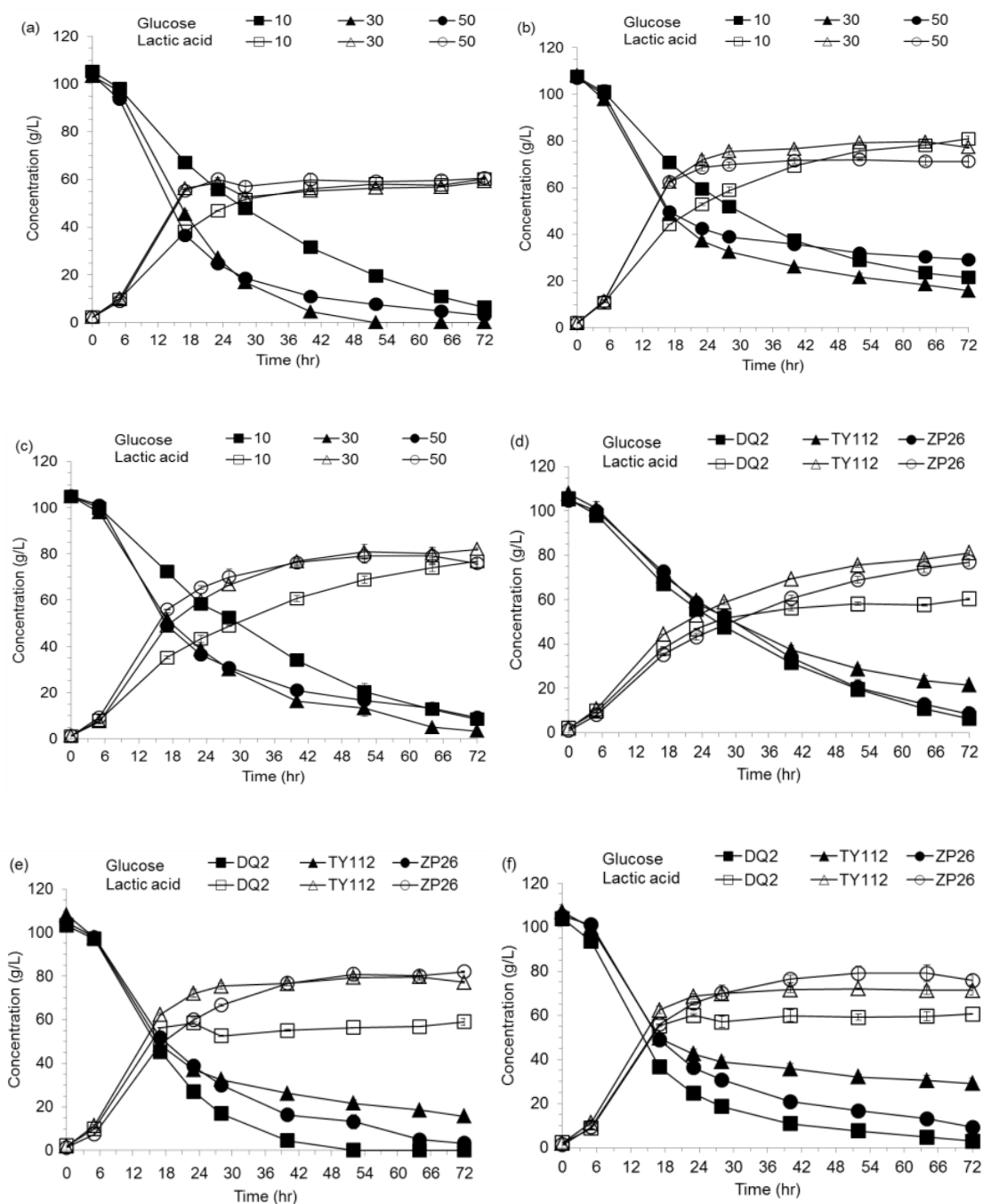


图 3.10 YE 浓度对脱木质素玉米芯残渣水解液乳酸发酵体系的影响

Fig. 3.10 Lactic acid fermentation of three LAB strains at different YE concentrations. (a) *P. acidilactici* DQ2, (b) *P. acidilactici* TY112, (c) *P. acidilactici* ZP26, (d) 10 g/L YE, (e) 30 g/L YE, (f) 50 g/L YE.

表 3.4 YE 浓度对脱木质素玉米芯残渣水解液乳酸发酵体系的影响

Table 3.4 Lactic acid fermentation of DCCR hydrolysate at different YE concentrations

LAB	YE (g/L)	Initial glucose (g/L)	Lactic acid (g/L)	Productivity (g/L/h)	Yield (%)	Sugar conversion (%)
<i>P. acidilactici</i> DQ2	10	105.3	60.2	0.84	55.2	58.8
	30	103.4	59.1	0.82	55.1	55.1
	50	103.9	60.6	0.84	56.3	57.9
<i>P. acidilactici</i> TY112	10	107.6	81.0	1.13	73.4	91.7
	30	108.1	79.8	1.11	72.1	84.4
	50	107.0	71.6	0.99	65.4	89.9
<i>P. acidilactici</i> ZP26	10	104.8	76.9	1.07	72.2	78.6
	30	104.8	82.0	1.14	76.9	79.4
	50	105.0	79.1	1.10	74.1	81.3

图 3.10 表示 15% (w/w)固含量脱木质素玉米芯残渣水解液乳酸发酵体系中 YE 浓度由 10 g/L 提高至 30、50 g/L 时的糖耗曲线和乳酸生成曲线，具体实验数据见表 3.4。从图 3.10 (a, b, c)可以发现，营养 YE 浓度对三株乳酸菌发酵产酸能力的影响也十分一致，但是与 YE 浓度对三株乳酸菌利用 10% (w/w)固含量脱木质素玉米芯残渣水解液进行分步糖化与乳酸发酵的影响结果略有差异。当发酵体系中 YE 浓度为 10 g/L 时，由于初始葡萄糖浓度较高 (105 g/L 左右)，发酵体系中营养物质供应不及时等因素的影响，导致上述三株乳酸菌的发酵速率都较慢，而且发酵结束时基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 发酵体系中有大量残糖剩余(21.5 g/L)，但原始乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2 和基因工程菌 *P. acidilactici* ZP26 发酵体系中并没有发生残糖剩余现象；当发酵体系中 YE 浓度增加至 30 g/L 时，三株乳酸菌的糖耗速率和乳酸产率虽然都得到了提高，但提高并不十分显著，乳酸得率也几乎没有增加；当发酵体系中 YE 浓度进一步增加至 50 g/L 时，三株乳酸菌的发酵速率和乳酸得率不但没有得到进一步提高，反而有降低的趋势。从图 3.10 (d, e, f)可以发现，在 10、30 和 50 g/L 三个 YE 浓度梯度条件下，基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 进行发酵产酸时其糖酸转化率是最高的，L-乳酸脱氢酶基因敲除菌株 *P. acidilactici* ZP26 次之，原始乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2 的糖酸转化率相对较低。

针对上述提高发酵体系中营养 YE 浓度反而降低了发酵产酸水平这一实验现象，推测原因是在高糖碳源、高营养氮源 YE 发酵体系中，由于乳酸生成速率较快，而实验使用的 pH 调节剂 CaCO<sub>3</sub> 固体粉末调节 pH 不及时从而导致发酵体系的 pH 急剧降低，进而对发酵菌株的菌体生长和发酵产酸能力都产生了比较严重的负面影响。因此，实验尝试在发酵罐水平使用 pH 中和剂 NaOH 将发酵过程中发酵体系的 pH 严格控制在 6.0，考察此时乳酸发酵水平是否能够得到改善提高。

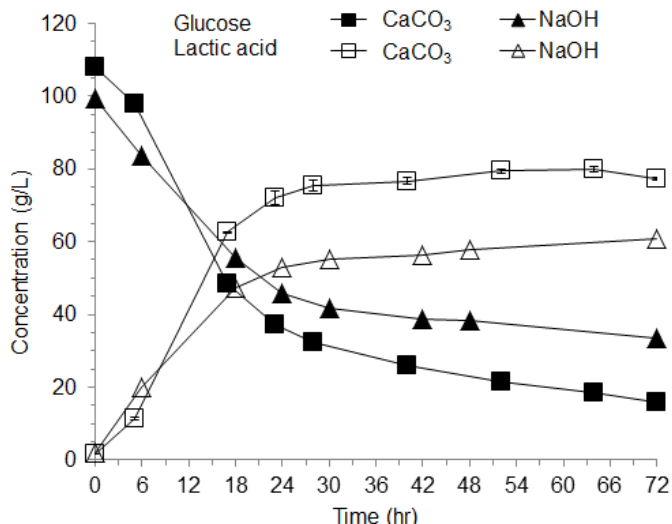


图 3.11 不同 pH 中和剂对乳酸发酵的影响

Fig. 3.11 Lactic acid fermentation of *P. acidilactici* TY112 using different pH neutralizer

图 3.11 表示基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 利用 15% (w/w) 固含量脱木质素玉米芯残渣水解液进行乳酸发酵过程中使用中和剂 NaOH 控制发酵体系 pH 6.0 时的发酵曲线。可以明显发现, 当发酵体系中氮源 YE 浓度为 30 g/L 时, 使用中和剂 NaOH 控制发酵体系 pH 6.0 不但没有像预想的那样提高产酸水平, 而且该发酵结果比使用 pH 调节剂 CaCO<sub>3</sub> 调节 pH 时更不理想。发酵 72 h 只生成 60.8 g/L 乳酸, 而且发酵醪液中有大量残糖剩余(33.6 g/L)。

该实验结果表明, 需要丰富外界营养供给的乳酸菌, *P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26, 利用营养成分相对贫瘠的工农业废弃物脱木质素玉米芯残渣水解液进行乳酸发酵过程中, 当发酵体系初始葡萄糖浓度适宜时(< 100 g/L), 适当提高发酵体系中氮源 YE 的浓度至 30 g/L (或 20 g/L 或更低), 可以显著增加糖耗速率和乳酸生成速率, 而进一步提高发酵体系中氮源 YE 的浓度至 50 g/L, 并没有进一步显著提高发酵速率, 只是使乳酸得率有些许增加; 当发酵体系初始葡萄糖浓度过高时(> 100 g/L), 提高发酵体系中氮源 YE 的浓度至 30 g/L, 也能够使发酵速率有所提高, 而进一步提高发酵体系中氮源 YE 的浓度至 50 g/L, 却降低了发酵产酸水平。

### 3.5 玉米秸秆同步糖化与乳酸发酵

我国是一个农业大国, 每年都会产生大量的各种农业残留及废弃物, 其中农作物秸秆中数玉米秸秆的量最为丰富。与小麦秸秆、稻秆、棉秆以及玉米芯工业残渣等木质纤维素生物质相比, 玉米秸秆由于资源异常丰富, 纤维素含量较高, 富含钾、镁、锰、钙等金属元素, 而且还含有生物素等微生物生长需要的生长因子一直以来是生物炼制采用的主要原料之一。对玉米秸秆生物炼制生产乳酸工艺进行探索和优化, 一方面使得该生物质能够在低成本投入、高糖化效率条件下转化生成可被微生物发酵利用的各种小分子碳源糖类, 另一方面使得发酵菌株能够高效利用这些碳源进行高水平发酵产酸。对于木

质纤维素生物炼制生产燃料乙醇和有机酸等化学品，本实验室经过长期研究已经先后开发研制出了节水节能的干式稀酸预处理技术、反应条件温和(28 °C)的零能耗零水耗静置固态生物脱毒技术以及能够良好处理高固含量木质纤维素糖化和发酵的螺旋式搅拌浆生物反应器等三个非常重要的研究成果。本部分实验就利用上述木质纤维素生物炼制技术对新获得的基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 进行高固含量玉米秸秆同步糖化与高水平乳酸发酵过程开展相关实验分析和条件优化，以期建立一条低投入、高产出的木质纤维素乳酸生产线。

### 3.5.1 脱毒时间对抑制物含量和乳酸发酵的影响

在玉米秸秆稀酸预处理过程中会发生很多副反应，生成很多对后续纤维素酶解和微生物生长发酵有严重抑制作用的有毒物质。为了获得良好的糖化效率和发酵水平，必须在糖化和发酵之前将这些抑制物进行部分或全部脱除。在众多木质纤维素脱毒方法中，生物脱毒法由于能耗低，操作简单，无废水产生等优点备受人们青睐。本实验室从蒸汽爆破预处理的玉米秸秆体系中筛选得到一株可以良好降解木质纤维素体系呋喃类、羧酸类以及酚类抑制物的煤油霉菌树脂枝孢霉 *A. resiniae* ZN1。该脱毒菌株虽然可以在室温以及静置培养条件下对木质纤维素体系进行零能耗零水耗固态生物脱毒，但脱毒速率较低是实际应用中的一大障碍。为了确定出一个适宜的脱毒时间节点，实验利用树脂枝孢霉 *A. resiniae* ZN1 对干式稀酸预处理玉米秸秆进行连续 10 天的生物脱毒处理，在 1、3、5、7、10 天等五个脱毒时间节点取样检测物料体系中抑制物的降解情况，并利用脱毒 1、3、5 和 7 天的物料进行同步糖化与乳酸发酵。

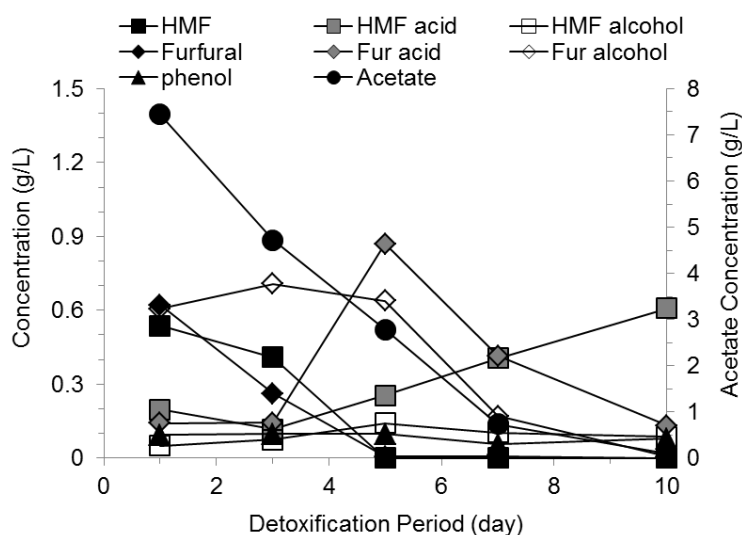


图 3.12 *A. resiniae* ZN1 对抑制物的降解能力

Fig. 3.12 Degradation of toxins on the pretreated CS by *A. resiniae* ZN1

图 3.12 表示利用脱毒菌株 *A. resiniae* ZN1 对预处理玉米秸秆进行生物脱毒过程中各抑制物的降解或生成变化曲线。可以看出，随着脱毒时间的延长，两种主要呋喃类抑制

物糠醛和 HMF 逐渐被降解，并且脱毒处理历时 5 天后体系中并没有检测到糠醛和 HMF。与此同时，分别伴随着糠醇、糠酸和 5-羟甲基糠醇、5-羟甲基糠酸的生成，其中糠醇、糠酸和 5-羟甲基糠醇随着脱毒时间的延长也会被逐渐降解，只有 5-羟甲基糠酸的量一直在积累没有被降解的趋势。羧酸类抑制物乙酸的完全降解需要 10 天时间，而酚类抑制物总量（总酚含量）在整个脱毒过程中几乎一直保持不变。

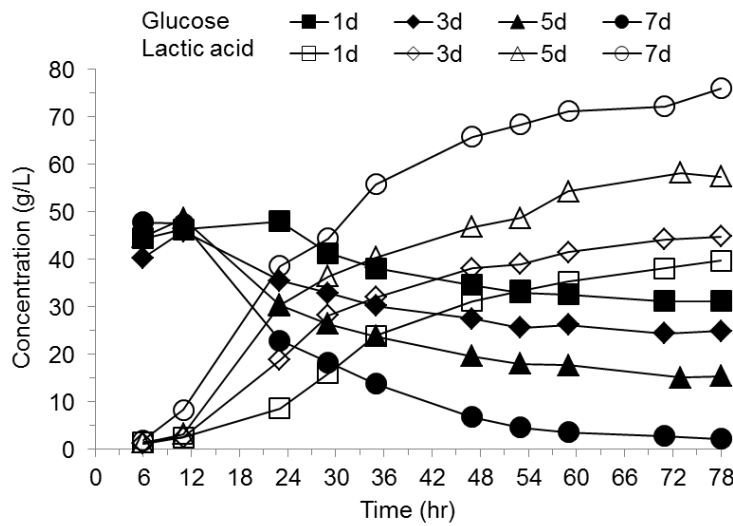


图 3.13 不同脱毒时间对乳酸发酵的影响

Fig. 3.13 SSF of the pretreated and biodetoxified CS at different detoxification time

表 3.5 不同脱毒时间对乳酸发酵的影响

Table 3.5 Lactic acid fermentation of pretreated and biodetoxified CS at different detoxification time

Detoxification Period (day)	Glucose at 6 h (g/L)	Lactic acid (g/L)	Productivity (g/L/h)	Yield (%)
1	50.0	39.7	0.55	32.3
3	46.7	44.8	0.62	36.7
5	48.2	58.2	0.81	49.4
7	52.1	76.0	1.06	67.0

图 3.13 表示基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 利用脱毒时间分别为 1、3、5 和 7 天的玉米秸秆进行同步糖化与乳酸发酵的发酵曲线，具体实验数据见表 3.5。可以看出，脱毒时间的长短对 25% (w/w) 固含量玉米秸秆预糖化 6 h 后水解液中的葡萄糖浓度几乎没有影响的，但随着脱毒时间的增加，发酵结束时乳酸的浓度、产率和得率却都呈现出大幅增加的 trend。脱毒时间由 1 天增加到 3 天、5 天、7 天时，乳酸的浓度由 39.7 提高到 44.8、58.2、76.0 g/L，乳酸产率由 0.55 提高到 0.62、0.81、1.06 g/L/h，乳酸得率由 32.3% 提高到 36.7%、49.4%、67.0%。此外，脱毒 1 天、3 天、5 天的玉米秸秆进行同步

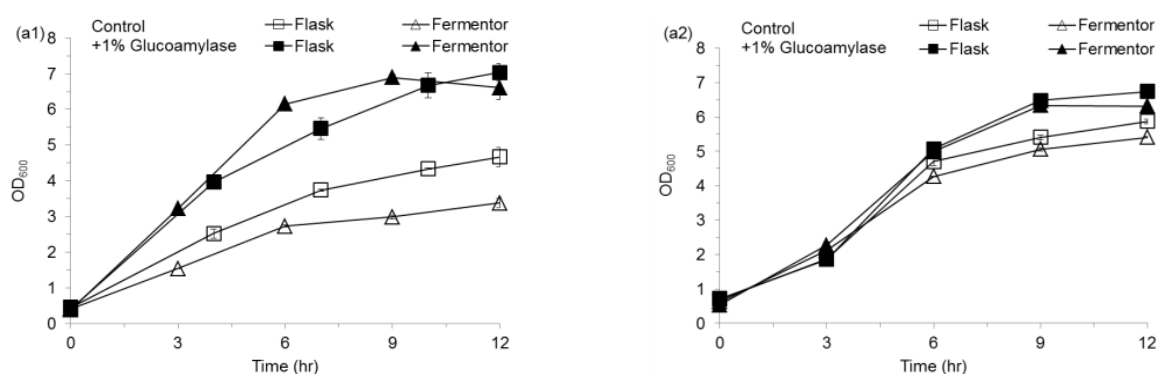
糖化与乳酸发酵过程中发酵醪液中都有大量残糖剩余（发酵结束时葡萄糖浓度分别为 31.2、24.9、15.5 g/L），脱毒 7 天的玉米秸秆进行同步糖化与乳酸发酵过程中却没有发生上述不良现象。

该实验结果表明，干式稀酸预处理玉米秸秆体系中含有大量抑制物，需要利用煤油霉菌 *A. resinae* ZN1 进行 7 天左右生物脱毒处理以后，才能被乳酸发酵菌株 *P. acidilactici* TY112 用作原料进行高水平发酵产酸。

### 3.5.2 糖化酶对菌体生长的影响

前期实验发现，原始乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2 在发酵罐培养体系利用合成培养基 (M-MRS) 进行生长和发酵产酸时发生了相当严重的菌体絮凝现象，而且随着培养基中初始葡萄糖浓度的升高菌体絮凝现象越发严重。菌体发生絮凝会导致营养物质无法良好到达絮凝菌体内部从而对菌体自身生长和发酵产酸都有很大的负面影响，而且颗粒较大的菌体絮凝物可能会堵塞管路进而影响种子液的运送，甚至也会对罐体和管道的清洗带来很大的困难，增加劳动强度和清洗用的水耗等，因此在最少的经济投入条件下找到解决上述菌体絮凝的方案显得特别必要和重要。针对上述菌体絮凝现象，当时推测原因是在菌体生长过程中菌体自身会产生多糖从而导致细胞之间互相粘连并最终形成细胞絮凝团。为了对该猜想进行验证，向菌体 *P. acidilactici* DQ2 培养体系中添加工业糖化酶，实验惊奇地发现菌体絮凝现象消失了，而且进一步分析检测发现，添加糖化酶还能够提高培养体系中菌体生物量和发酵产酸水平。

为了表征两株基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26 用于大规模工业化发酵产酸的潜力，实验尝试对工业发酵生产乳酸过程进行模拟。特别需要说明的一点是，对于发酵菌体种子液的培养，实验室研究阶段主要采用摇瓶体系进行种子液制备，而大规模工业化发酵生产大宗化学品乳酸时则需要在体积庞大的发酵罐中进行。实验发现，与原始乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2 菌体培养现象相似，两株基因改造工程菌 *P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26 在 3 L 发酵罐培养体系利用初始葡萄糖浓度为 20 g/L 的 M-MRS 培养基进行大体积发酵用种子液制备时发生了菌体絮凝现象。仿照之前的实验做法，考察在菌株 *P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26 培养过程中同时向小体积摇瓶培养体系和大体积发酵罐培养体系中添加少量(1%, v/v)廉价的工业糖化酶是否能够消除菌体絮凝现象，甚至提高菌体生物量和发酵产酸水平。



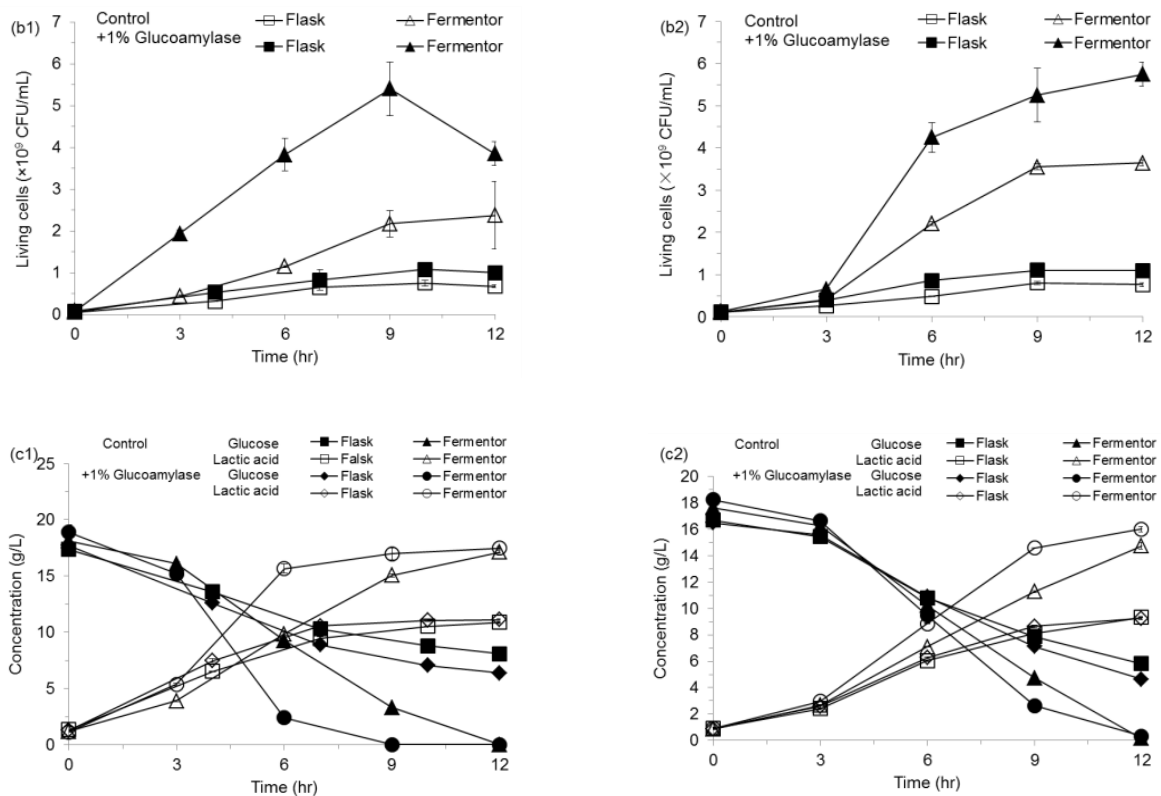


图 3.14 糖化酶对菌体生长和发酵的影响

Fig. 3.14 Effect of glucoamylase on the cell growth and lactic acid fermentation. (a1, b1, c1) *P. acidilactici* TY112, (a2, b2, c2) *P. acidilactici* ZP26

图 3.14 表示在添加 1% (v/v) 工业糖化酶用量条件下，两株基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26 分别在摇瓶培养体系和发酵罐培养体系中的菌体生物量、菌体活性和发酵产酸曲线。根据图 3.14 (a1, b1, c1) 可以看出，不论是在摇瓶培养体系（不控制 pH）还是在发酵罐培养体系（控制 pH 5.5），添加 1% (v/v) 糖化酶都能够大幅度提高 *P. acidilactici* TY112 的菌体生物量和菌体活性，并且同时加快了糖耗和产酸速率。与对照组实验相比，添加 1% (v/v) 糖化酶以后，菌株在摇瓶培养体系生长过程中的最大菌体生物量和活菌数分别从 4.67、 $0.75 \times 10^9$  CFU/mL 提高到了 7.04、 $1.08 \times 10^9$  CFU/mL；发酵罐培养体系中最大菌体生物量和活菌数分别从 3.38、 $2.38 \times 10^9$  CFU/mL 提高到了 6.89、 $5.40 \times 10^9$  CFU/mL。同时还可以发现在同样的糖化酶添加量(1%, v/v)条件下，两种培养体系得到的菌体生物量几乎没有差异( $7.04 \approx 6.89$ )，但是发酵罐培养体系的菌体活性却远远高于摇瓶培养体系( $5.40 \times 10^9 > 1.08 \times 10^9$  CFU/mL)。根据图 3.14 (a2, b2, c2) 可以看出，添加糖化酶对 *P. acidilactici* ZP26 菌体生长和发酵产酸水平的影响与 *P. acidilactici* TY112 几乎完全一致。与对照组实验相比，添加 1% (v/v) 糖化酶以后，菌株在摇瓶培养体系生长过程中的最大菌体生物量和活菌数分别从 5.87、 $0.80 \times 10^9$  CFU/mL 提高到了 6.74、 $1.11 \times 10^9$  CFU/mL；发酵罐培养体系中最大菌体生物量和活菌数分别从

5.41、 $3.65 \times 10^9$  CFU/mL 提高到了 6.33、 $5.75 \times 10^9$  CFU/mL。

该实验结果表明，两株基因工程菌在培养过程中自身会产生多糖导致菌体之间互相粘连进而发生菌体絮凝现象，在培养开始阶段向培养体系中添加少量廉价的工业糖化酶不但能够有效消除菌体絮凝现象，同时还能显著提高菌体生物量、菌体活性以及糖耗和产酸速率。需要说明的是，1% (v/v)糖化酶添加量只是一个粗略的实验值，其最佳添加量还有待实验进一步考察确定。

### 3.5.3 提高种子液菌体生物量和活性对发酵的影响

#### 3.5.3.1 添加糖化酶对种子液菌体生物量和活性的影响

根据糖化酶对 *P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26 分别在摇瓶培养体系和发酵罐培养体系中菌体生长的影响，实验分别采用不添加糖化酶的摇瓶培养体系和添加糖化酶的发酵罐培养体系对上述菌株进行发酵用种子液培养制备。

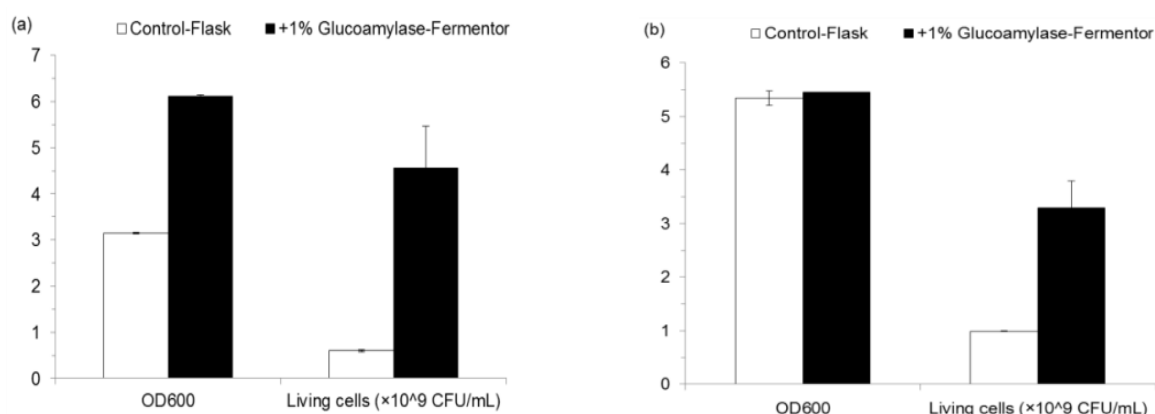


图 3.15 糖化酶对种子液菌体生物量和活性的影响

Fig. 3.15 Effect of glucoamylase on the cell growth of seeds culture. (a) *P. acidilactici* TY112, (b) *P. acidilactici* ZP26

图 3.15 表示发酵菌株 *P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26 分别在不添加糖化酶的摇瓶培养体系和添加糖化酶的发酵罐培养体系制备得到的种子液中的菌体生物量和菌体活性。可以看出，与常规摇瓶培养体系制备的种子液相比，在菌株种子液培养阶段采用发酵罐培养体系控制 pH 5.5 并添加 1% (v/v)糖化酶不但能够有效解决菌体絮凝现象，而且可以显著提高种子液菌体生物量和菌体活性。对于 *P. acidilactici* TY112，种子液中菌体生物量和活菌数分别从 3.15、 $0.60 \times 10^9$  CFU/mL 提高到了 6.11、 $4.55 \times 10^9$  CFU/mL；对于 *P. acidilactici* ZP26，种子液中菌体生物量和活菌数分别从 5.34、 $0.99 \times 10^9$  CFU/mL 提高到了 5.46、 $3.30 \times 10^9$  CFU/mL。因此实验接下来继续接着考察提高基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26 种子液菌体生物量和菌体活性是否能够显著提高其后续的发酸水平。

#### 3.5.3.2 提高种子液菌体生物量和活性对合成培养基发酵的影响

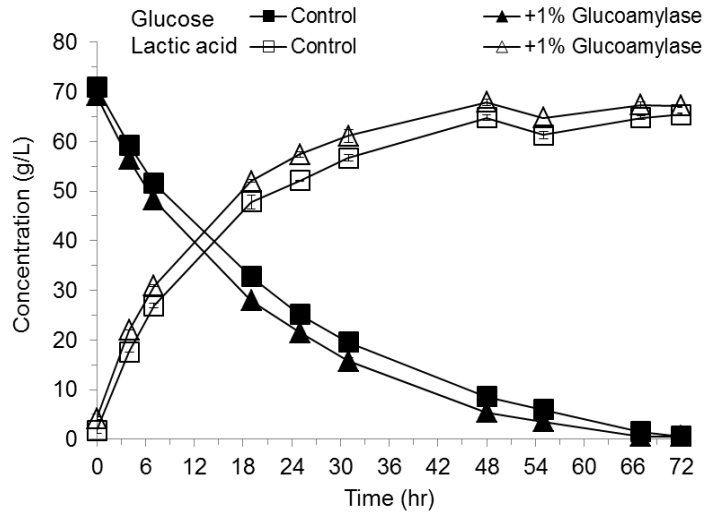


图 3.16 提高种子液菌体生物量和活性对合成培养基发酵的影响

Fig. 3.16 Lactic acid fermentation using high density and high activity seeds culture

表 3.6 提高种子液菌体生物量和活性对发酵的影响

Table 3.6 Effect of high density and high activity seeds culture on lactic acid fermentation

	Initial glucose (g/L)	Lactic acid (g/L)	Productivity (g/L/h)	Yield (%)
Control	70.9	65.4	0.91	102.9
+1% Glucoamylase	69.2	67.2	0.93	106.1

图 3.16 表示发酵菌株 *P. acidilactici* TY112 分别利用不添加糖化酶的摇瓶培养体系和添加 1% (v/v) 糖化酶的发酵罐培养体系制备得到的种子液用于后续初始葡萄糖浓度为 70 g/L 的合成培养基乳酸发酵的糖耗和产酸曲线，具体实验数据见表 3.6。可以看出，两种种子液培养方式制备得到的种子液用于后续合成培养基发酵时，糖耗曲线和乳酸生成曲线都没有显著差异。对照实验组，70.9 g/L 葡萄糖发酵 72 h 获得产物 L-乳酸的浓度、产率和得率分别为 65.4 g/L、0.91 g/L/h、102.9%；高密度高活性种子液发酵实验组，69.2 g/L 葡萄糖发酵 72 h 获得产物 L-乳酸的浓度、产率和得率分别为 67.2 g/L、0.93 g/L/h、106.1%。

该实验结果表明，提高基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 种子液菌体生物量和菌体活性并没有显著提高其后续合成培养基发酵产酸水平。

### 3.5.3.3 提高种子液菌体生物量和活性对 25% 固含量玉米秸秆 SSF 的影响

利用本实验室开发的干式稀酸预处理技术和生物脱毒技术对木质纤维素原料玉米秸秆进行预处理和脱毒处理，并根据实验室制定的两步酸解、酶解评价以及抑制物含量测定方法步骤对稀酸预处理后的玉米秸秆进行相关实验检测。测定结果显示，未脱毒玉米秸秆物料中纤维素含量为 37.57%，半纤维素含量为 2.68%，酶解得率为 93.83%，抑

制物糠醛、HMF、乙酸、香草醛、4-羟基苯甲醛和丁香醛的含量分别为 2.19、3.27、13.93、3.23、0.215、1.55 mg/g DM；经过 6 天生物脱毒处理的玉米秸秆物料中纤维素含量为 41.25%，半纤维素含量为 3.35%，酶解得率为 95.93%，抑制物香草醛、4-羟基苯甲醛、丁香醛的含量分别为 0.729、0.213、1.46 mg/g DM，并且物料中未检测到糠醛、HMF 和乙酸。

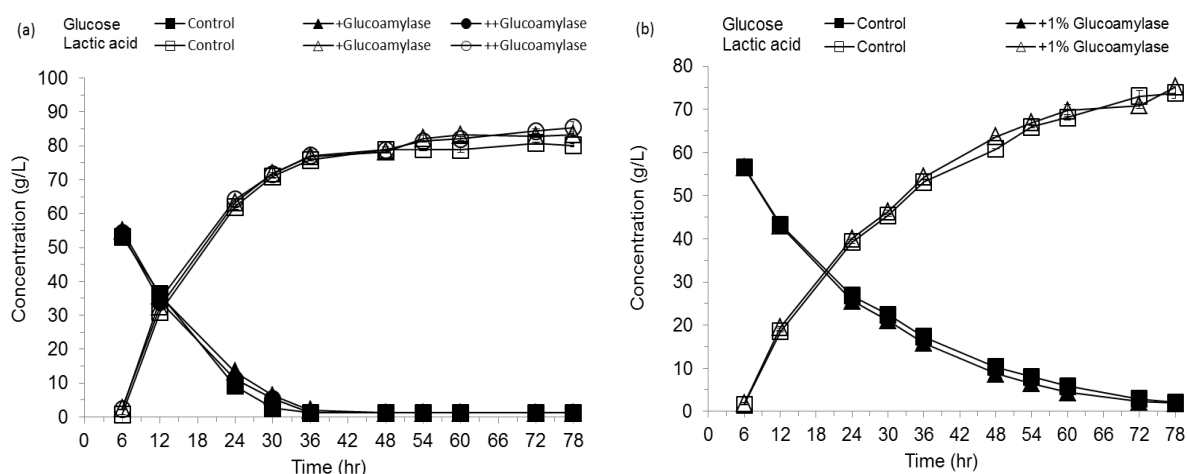


图 3.17 提高种子液菌体生物量和活性对 SSF 的影响

Fig. 3.17 SSF of the pretreated and biodetoxified CS using high density and high activity seeds culture. (a) *P. acidilactici* TY112, (b) *P. acidilactici* ZP26

表 3.7 提高种子液菌体生物量和活性对 SSF 的影响

Table 3.7 SSF of the pretreated and biodetoxified CS using high density and high activity seeds culture

LAB	Seeds culture	SSF	Lactic acid (g/L)	Yield (%)	Productivity (g/L/h)
<i>P. acidilactici</i> TY112	Flask(-)	-	80.8	69.9	1.12
	Fermentor(+)	-	83.3	75.4	1.16
	Fermentor(+)	+	85.4	78.3	1.19
<i>P. acidilactici</i> ZP26	Flask(-)	-	73.8	64.9	1.03
	Fermentor(+)	-	75.2	66.0	1.04

注：(+)表示添加 1% (v/v)糖化酶，(-)表示未添加糖化酶。

图 3.17 (a)表示发酵菌株 *P. acidilactici* TY112 分别利用不添加糖化酶的摇瓶培养体系和添加 1% (v/v)糖化酶的发罐培养体系制备得到的种子液用于后续 25% (w/w)固含量玉米秸秆同步糖化与乳酸发酵过程中的糖耗和产酸曲线，具体实验数据见表 3.7。可以看出，两种种子液培养方式制备得到的种子液用于后续玉米秸秆同步糖化与发酵时，

虽然糖耗曲线和乳酸生成曲线几乎没有差异,但发酵产酸过程中的耗碱量却有显著变化(对照实验组耗碱量为 460 mL,高密度高活性种子液发酵实验组耗碱量为 630 mL),表明高密度高活性种子液用于 SSF 时,其发酵产酸水平有大幅度提高。对照实验组,发酵 78 h 获得产物 L-乳酸的浓度、产率和得率分别为 80.8 g/L、1.12 g/L/h、69.9%;高密度高活性种子液发酵实验组,发酵 78 h 获得产物 L-乳酸的浓度、产率和得率分别为 83.3 g/L、1.16 g/L/h、75.4%。为了探究糖化酶对玉米秸秆 SSF 发酵体系的影响,实验进一步考察了在发酵菌株种子液培养阶段和 SSF 过程中同时添加 1% (v/v)糖化酶时的发酵产酸情况,结果如图 3.17 (a)和表 3.7 所示。可以看出,与高密度高活性种子液发酵实验组结果相比,在种子液培养阶段和 SSF 过程中同时添加 1% (v/v)糖化酶时并没有进一步提高发酵水平,发酵结束时 L-乳酸的浓度、产率和得率分别为 85.4 g/L、1.19 g/L/h、78.3%。

图 3.17 (b)表示发酵菌株 *P. acidilactici* ZP26 分别利用不添加糖化酶的摇瓶培养体系和添加 1% (v/v)糖化酶的发酵罐培养体系制备得到的种子液用于后续 25% (w/w)固含量玉米秸秆同步糖化与乳酸发酵过程中的糖耗和产酸曲线,具体实验数据见表 3.7。可以看出,两种种子液培养方式制备得到的种子液用于后续玉米秸秆同步糖化与发酵时,糖耗曲线和乳酸生成曲线几乎没有差异,而且发酵产酸过程中的耗碱量也是完全相同的(对照实验组和高密度高活性种子液发酵实验组的耗碱量都为 530 mL),表明高密度高活性种子液用于 SSF 时,其发酵产酸水平并没有得到显著提高。对照实验组,发酵 78 h 获得产物 D-乳酸的浓度、产率和得率分别为 73.8 g/L、1.03 g/L/h、64.9%;高密度高活性种子液发酵实验组,发酵 78 h 获得产物 D-乳酸的浓度、产率和得率分别为 75.2 g/L、1.04 g/L/h、66.0%。

该实验结果表明,提高基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 种子液菌体生物量和菌体活性能够大幅度提高后续 25% (w/w)固含量玉米秸秆同步糖化与乳酸发酵水平,但是在菌株种子液培养阶段和 SSF 过程中同时添加糖化酶时并不能进一步提高发酵产酸水平。提高基因工程菌 *P. acidilactici* ZP26 种子液菌体生物量和菌体活性并没有显著提高后续 25% (w/w)固含量玉米秸秆同步糖化与乳酸发酵水平。

#### 3.5.3.4 提高种子液菌体生物量和活性对 30%固含量玉米秸秆 SSF 的影响

前期实验发现,接种量(5%, 10%, 20%, v/v)对原始乳酸发酵菌株 *P. acidilactici* DQ2 利用 30% (w/w)固含量玉米秸秆进行同步糖化与乳酸发酵的产酸水平有非常显著的影响,而且随着接种量的增加,菌株发酵时延滞期明显缩短,葡萄糖代谢能力和乳酸生成能力都有很大程度的提高。根据上述实验现象,本部分实验考察了提高发酵菌株种子液菌体生物量和菌体活性并在不同接种量(1%, 3%, 10%, 20%, v/v)条件下,对两株基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26 利用 30% (w/w)固含量玉米秸秆进行 SSF 的影响。

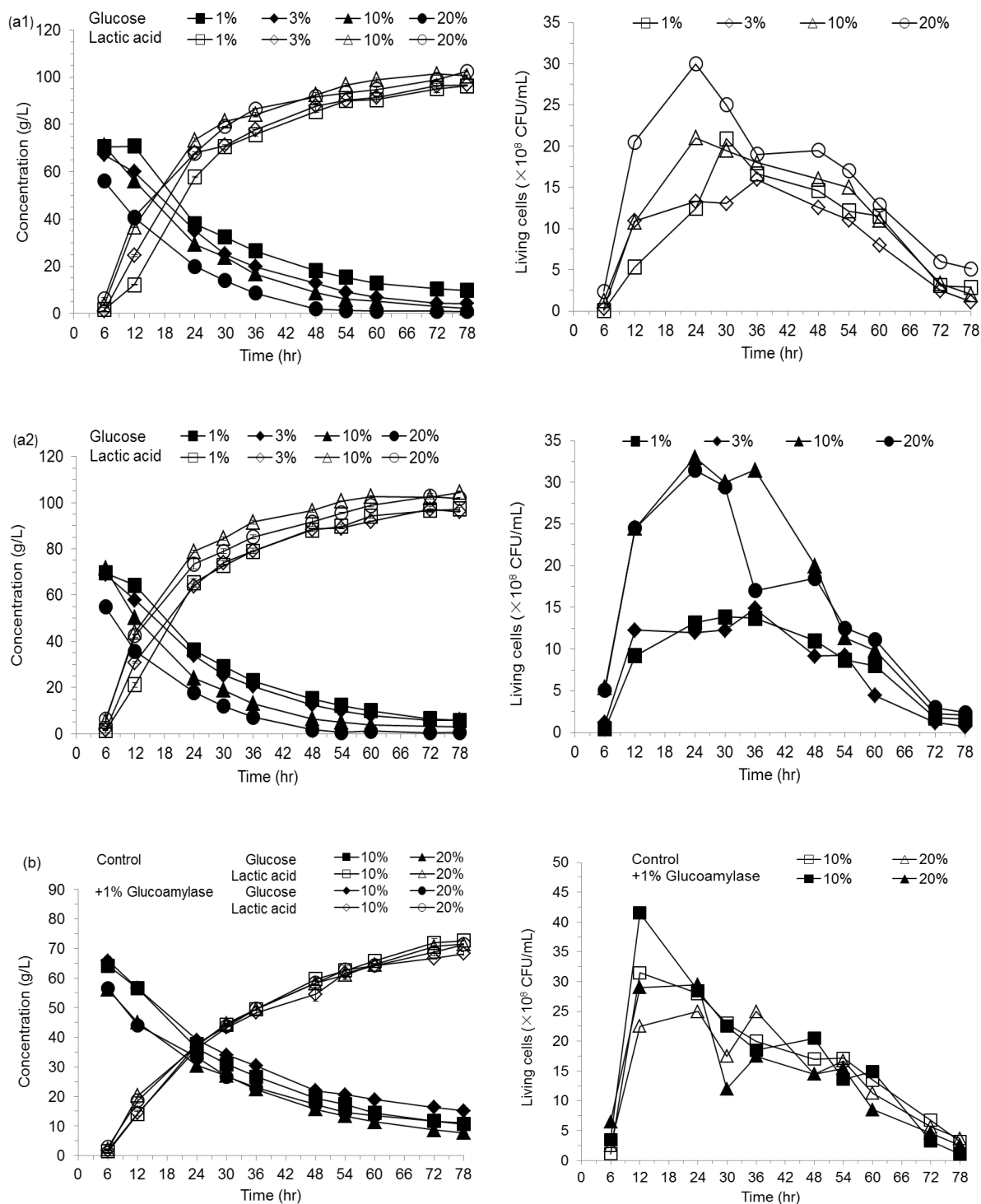


图 3.18 提高种子液菌体生物量和活性对 SSF 的影响

Fig. 3.18 SSF of the pretreated and biodetoxified CS using high density and high activity seeds culture.

(a1, a2) *P. aidilactici* TY112, (b) *P. aidilactici* ZP26

表 3.8 提高种子液菌体生物量和活性对 SSF 的影响

Table 3.8 SSF of the pretreated and biodetoxified CS using high density and high activity seeds culture

LAB	Inoculation ratio (%)	Seeds culture	Lactic acid (g/L)	Yield (%)	Productivity (g/L/h)
<i>P. acidilactici</i> TY112	1	Flask(-)	96.4	61.8	1.34
		Fermentor(+)	97.3	63.8	1.35
	3	Flask(-)	96.8	64.5	1.34
		Fermentor(+)	97.1	64.7	1.35
	10	Flask(-)	101.4	71.5	1.41
		Fermentor(-)	87.8	62.0	1.22
		Fermentor(+)	104.4	71.5	1.45
		Flask(-)	102.5	76.6	1.42
20	Fermentor(+)	102.7	77.2	1.43	
	10	Flask(-)	72.6	46.4	1.01
		Fermentor(+)	68.3	43.4	0.95
	20	Flask(-)	71.5	53.1	0.99
Fermentor(+)		71.4	52.4	0.99	

注: (+)表示添加 1% (v/v)糖化酶, (-)表示未添加糖化酶。

图 3.18 (a1, a2)表示发酵菌株 *P. acidilactici* TY112 分别利用未添加糖化酶的摇瓶培养体系和添加 1% (v/v)糖化酶的发酵罐培养体系制备得到的种子液在 1%、3%、10%和 20% (v/v)等不同接种量条件下用于后续 30% (w/w)固含量玉米秸秆同步糖化与乳酸发酵过程中的糖耗曲线、乳酸生成曲线和活菌数变化曲线, 具体实验数据见表 3.7。可以看出, 在上述四个不同接种量条件下, 两种种子液培养方式制备得到的种子液用于后续玉米秸秆同步糖化与发酵时, 虽然高密度高活性种子液发酵体系中活菌数比对照实验组多, 但是糖耗曲线和乳酸生成曲线却几乎没有差异, 而且发酵产酸过程中的耗碱量也相差甚微, 表明提高发酵菌株种子液菌体生物量和菌体活性并没有显著提高发酵产酸水平。对照实验组, 随着接种量从 1% (v/v)逐步增加到 20% (v/v), 发酵速率逐渐加快, 而且发酵结束时不再有残糖剩余现象。同时虽然产物乳酸的浓度没有显著增加, 但得率却表现出了大幅的提高, 由 61.8%提高到 76.6%。与对照实验组发酵现象相似, 随着接种量的增加, 高密度高活性种子液发酵实验组发酵结束时不再有残糖剩余现象, 虽然发酵结束时产物乳酸的浓度没有显著提高, 但得率却表现出了大幅的提高, 由 63.8%提高到 77.2%, 这对于提高原料利用率具有非常重要的意义。尤其需要说明的是, 利用此种培养方式制备的种子液菌体活性是非常高的, 即使在 1% (v/v)接种量条件下发酵结束时也几乎没有残糖剩余(5.7 g/L), 而且生成的乳酸浓度高达 97.3 g/L。

为了探究发酵用种子液培养体系对玉米秸秆 SSF 的影响,实验进一步考察了采用未添加糖化酶的发酵罐培养体系制备得到的种子液用于后续 30% (w/w)固含量玉米秸秆同步糖化与乳酸发酵过程中的糖耗曲线、乳酸生成曲线和活菌数变化曲线,实验数据见表 3.7。可以看出,在 10% (v/v)接种量条件下,采用未添加糖化酶的发酵罐培养体系制备的种子液用于 SSF 时,发酵 78 h 所得产物 L-乳酸的浓度、得率和产率分别为 87.8 g/L、62.0%、1.22 g/L/h;而采用添加 1% (v/v)糖化酶的发酵罐培养体系制备的种子液用于 SSF 时,发酵产物 L-乳酸的浓度、得率和产率则分别高达 104.4 g/L、71.5%、1.45 g/L/h。与对照组实验结果相比,乳酸的浓度不但提高到了具有商业经济分离提纯的水平,而且浓度和得率分别提高了 18.9%、15.3%。此实验结果表明,与未添加糖化酶的发酵罐培养体系制备的种子液相比,采用添加 1% (v/v)糖化酶的发酵罐培养体系制备的高密度高活性 *P. acidilactici* TY112 种子液用于后续玉米秸秆同步糖化与发酵时能够大幅度提高产酸水平。针对这一实验现象,推测原因是在同样的转速(150 rpm)设置条件下,摇瓶培养体系的振荡强度远远高于发酵罐培养体系的搅拌强度,从而导致未添加糖化酶的发酵罐培养体系中菌体絮凝现象十分严重,而摇瓶培养体系中菌株絮凝现象却很弱。而且实验过程中确实发现了这样的现象,摇瓶体系的菌体絮凝现象相当不明显,而发酵罐体系的絮凝现象异常明显,甚至有较大的絮凝团状物出现。

针对基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 发酵木质纤维素生物质玉米秸秆得到的高浓度、高产率、高得率 L-乳酸,实验接着对另外一株基因工程菌 *P. acidilactici* ZP26 的发酵性能进行了考察。图 3.18 (b)表示发酵菌株 *P. acidilactici* ZP26 分别利用未添加糖化酶的摇瓶培养体系和添加 1% (v/v)糖化酶的发酵罐培养体系制备得到的种子液在 10% (v/v)和 20% (v/v)接种量条件下用于后续 30% (w/w)固含量玉米秸秆同步糖化与乳酸发酵过程中的糖耗曲线、乳酸生成曲线和活菌数变化曲线,具体实验数据见表 3.7。可以看出,与 *P. acidilactici* TY112 发酵产酸现象相似,在上述两个不同接种量条件下,两种种子液培养方式制备得到的种子液用于后续玉米秸秆同步糖化与发酵时,虽然高密度高活性种子液发酵体系中活菌数比对照实验组多,但是糖耗曲线和乳酸生成曲线却几乎没有差异,而且发酵产酸过程中的耗碱量也相差甚微,表明提高发酵菌株种子液菌体生物量和菌体活性并没有提高后续发酵产酸水平。

此外,还可以发现,尽管基因工程菌 *P. acidilactici* ZP26 和 *P. acidilactici* TY112 都是原始乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2 分别进行 D-乳酸脱氢酶基因(D-*ldh*)和 L-乳酸脱氢酶基因(L-*ldh*)敲除获得的改造菌株,但这两株菌由于菌种特异性而表现出来的乳酸发酵能力有较大差别。在上述两个接种量条件下,高密度高活性种子液发酵实验组的产酸水平不但没有比对照实验组高,反而略低于对照实验组。在 10% (v/v)接种量条件下,对照实验组,发酵 78 h 所得产物 D-乳酸的浓度、得率和产率分别为 72.6 g/L、46.4%、1.01 g/L/h;高密度高活性种子液发酵实验组, D-乳酸的浓度、得率和产率却只有 68.3 g/L、43.4%、0.95 g/L/h。在 20% (v/v)接种量条件下,对照实验组,发酵结束时所得产物 D-乳酸的浓度和得率分别为 71.5 g/L、53.1%;高密度高活性种子液发酵实验组, D-乳酸的浓度和得

率却只有 70.4 g/L、52.4%。

该实验结果表明，对于两株基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26，与未添加糖化酶的摇瓶培养体系制备的种子液发酵产酸能力相比，采用发酵罐培养体系并添加 1% (v/v)糖化酶制备的高密度高活性种子液用于后续发酵时其产酸水平并没有得到显著提高；而与未添加糖化酶的发酵罐培养体系制备的种子液发酵产酸能力相比，采用发酵罐培养体系并添加 1% (v/v)糖化酶制备的高密度高活性种子液用于后续发酵时其产酸水平有大幅度提高。

## 第 4 章 结论与展望

### 4.1 结论

本研究针对木质纤维素生物质利用生物炼制工艺生产生物可降解塑料聚乳酸(PLA)的合成单体乳酸过程中存在的问题,如发酵菌株最适生长和发酵温度与真菌纤维素酶最适酶解温度相差较多不利于木质纤维素同步糖化与乳酸发酵最佳工艺的选择,乳酸单体光学纯度偏低不利于高性能聚乳酸材料的合成,发酵产酸水平(浓度、产率和得率)较低不具有商业化生产价值等,分别通过筛选获得耐高温乳酸发酵菌株、基因敲除工程手段、菌株驯化培养以及发酵工艺条件优化等方面进行相关实验分析,建立了一条低投入、高产出的高水平玉米秸秆 L-乳酸发酵生产线。

(1) 农业残留玉米秸秆中不但含有大量的纤维素,同时还含有生物素生长因子以及钾、镁、锰、钙等金属元素,是一种营养成分比较丰富的木质纤维素生物质。工农业废弃物玉米芯残渣中含有异常丰富的纤维素组分,可作为微生物生长和发酵的碳源。通过生物炼制工艺将上述木质纤维素进行生物转化生产乳酸,实现“变废为宝”,不但能够保护环境清洁,而且能够降低乳酸发酵生产的原料成本。

(2) 对耐高温的原始乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2 (CGMCC 7471)分别进行 D-乳酸脱氢酶基因(D-*ldh*)敲除分子改造和 L-乳酸脱氢酶基因(L-*ldh*)敲除分子改造,获得两株产物乳酸光学纯度分别高达 99.9%、99.3%的 L-乳酸发酵菌株 *P. acidilactici* TY112 (CGMCC 8664)和 D-乳酸发酵菌株 *P. acidilactici* ZP26 (CGMCC 8665)。

(3) 对比分析高温培养和木质纤维素体系抑制物对基因改造工程菌 *P. acidilactici* TY112 和原始乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2 生长和发酵产酸水平的影响,发现 D-乳酸脱氢酶基因(D-*ldh*)的敲除对菌体生长造成了一定程度的负面影响(降低了菌体生长速率和最大菌体生物量),但几乎没有降低其抑制物耐受能力和发酵产酸水平。

(4) 利用工农业废弃物玉米芯残渣和农业残留玉米秸秆分别通过同步糖化发酵(SSF)和分步糖化发酵(SHF)对基因改造工程菌 *P. acidilactici* TY112 进行短期驯化和长期驯化培养,发现该菌株代谢葡萄糖生成乳酸的发酵能力非常稳定。

(5) *P. acidilactici* TY112 对外界营养要求较高,不能良好利用富含纤维素组分但其它营养成分相对比较贫瘠的脱木质素玉米芯残渣为原料进行高水平同步糖化与乳酸发酵。

(6) 适当增加发酵体系中氮源 YE 的浓度至 30 g/L 能够显著提高乳酸片球菌 *P. acidilactici* DQ2、*P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26 利用营养成分相对比较贫瘠的工农业废弃物玉米芯残渣水解液进行发酵产酸的发酵速率,但是继续增加 YE 浓度至 50 g/L 时并没有进一步提高发酵速率,只是使乳酸得率有些许提高。

(7) 不论是摇瓶培养体系还是发酵罐培养体系,向基因工程菌 *P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26 菌体培养体系中添加少量(1%, v/v)廉价的工业糖化酶不但能够有效消除菌体絮凝现象,而且能够显著提高培养体系中菌体生物量和菌体活性,同时还能够加

快培养体系中糖耗和乳酸生成速率。

(8) 与未添加糖化酶的摇瓶培养体系制备的发酵菌株种子液相比, 采用添加 1% (v/v) 糖化酶的发酵罐培养体系制备的高密度高活性 *P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26 种子液用于后续发酵时其产酸水平并没有显著提高; 而与未添加糖化酶的发酵罐培养体系制备的发酵菌株种子液相比, 采用添加 1% (v/v) 糖化酶的发酵罐培养体系制备的高密度高活性种子液用于后续发酵时其产酸水平有较大幅度提高。

(9) 干式稀酸预处理玉米秸秆体系中含有糠醛、HMF 以及乙酸等大量抑制物, 利用树脂枝孢霉菌 *A. resiniae* ZN1 进行 7 天左右脱毒处理以后, 体系中糠醛、HMF 和乙酸可被全部脱除, 而且脱毒工段是 *P. acidilactici* TY112 发酵玉米秸秆进行高效生物转化生产乳酸的必要步骤。

(10) *P. acidilactici* TY112 利用 30% (w/w) 固含量玉米秸秆进行 SSF, 产物 L-乳酸的浓度、产率、得率和光学纯度分别高达 102.7 g/L、1.43 g/L/h、77.2%、99.9%; *P. acidilactici* ZP26 利用 25% (w/w) 固含量玉米秸秆进行 SSF, 产物 D-乳酸的浓度、产率、得率和光学纯度分别为 75.2 g/L、1.04 g/L/h、66.0%、99.3%。

## 4.2 展望

虽然本研究利用农业残留玉米秸秆通过生物炼制工艺得到了浓度超过 100 g/L 的乳酸, 但该生物转化过程中仍然存在很多需要进一步改善的地方, 从而使得木质纤维素生物炼制生产乳酸真正具有商业化发展潜力。

(1) 干式稀酸预处理技术虽然用水量较少, 不产生废水, 但玉米秸秆体系发生了很多副反应, 生成了很多不利于后续酶解糖化和发酵的有毒物质。因此开发新的预处理技术, 以期获得较佳的预处理效果, 同时生成较少的抑制物。

(2) 树脂枝孢霉菌 *A. resiniae* ZN1 脱毒速率太慢, 而且单独的脱毒工段导致生物炼制周期较长, 劳动强度较大。因此利用基因工程手段将脱毒菌株的相关脱毒基因整合到发酵菌株 *P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26 体内, 使发酵菌株同时具有发酵产酸和抑制物降解能力。

(3) 玉米秸秆中不但含有大量的纤维素组分, 同时还含有相当丰富的半纤维素组分, 但发酵菌株 *P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26 都只能良好代谢纤维素的水解糖类葡萄糖, 不能代谢半纤维素的水解糖类木糖等戊糖。因此利用基因工程手段将戊糖代谢相关基因整合到发酵菌株体内, 使其能够同时高效代谢己糖和戊糖等碳源, 提高原料利用率。

(4) 乳酸菌 *P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26 菌体自身不能合成氨基酸、维生素 B、核苷酸和多肽等生长因子需要从外界环境中摄取, 对营养的要求较高, 其中氮源 YE 的价格比较昂贵, 导致乳酸生产成本较高。因此亟需寻找廉价的氮源来代替昂贵的 YE 从而降低乳酸生产成本, 进而降低生物可降解塑料聚乳酸生产成本, 缩小与石化基塑料价格之间的差距。

## 参考文献

- [1] Adachi E, Torigoe M, Sugiyama M, Nikawa J, Shimizu K. Modification of metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* by the expression of lactate dehydrogenase and deletion of pyruvate decarboxylase genes for the lactic acid fermentation at low pH value. *J Ferment Bioeng.* 1998, 86: 284-289
- [2] Nampoothiri KM, Nair NR, John RP. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresour Technol.* 2010, 101: 8493-8501
- [3] 王博彦, 金其荣. 发酵有机酸生产与应用手册. 2002. 北京: 中国轻工业出版社
- [4] Wee YJ, Kim JN, Ryu HW. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technol. Biotechnol.* 2006, 44: 163-172
- [5] Hwang HJ, Lee SY, Kim SM, Lee SB. Fermentation of seaweed sugars by *Lactobacillus species* and the potential of seaweed as a biomass feedstock. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2011, 16: 1231-1239
- [6] Ryu HW, Kim YM, Wee YJ. Influence of operating parameters on concentration and purification of L-lactic acid using electro dialysis. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2012, 17: 1261-1269
- [7] 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* QU41. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011, 89: 1741-1750
- [8] Yadav AK, Chaudhari AB, Kothari RM. Bioconversion of renewable resources into lactic acid: an industrial view. *Crit Rev Biotechnol.* 2011, 31: 1-19
- [9] John RP, Nampoothiri KM, Pandey A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2007, 74: 524-34
- [10] 钱志良, 胡军, 雷肇祖. 乳酸的工业化生产、应用和市场. *工业微生物.* 2001, 31: 49-53
- [11] Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Lactic acid production from lignocellulose derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits. *J Biotechnol.* 2011, 156: 286-301
- [12] 徐昌洪, 方家骥. L-乳酸生物炼制技术的新进展. *精细与专用化学品.* 2007. 15: 10-14
- [13] Singh SK, Ahmed SU, Pandey A. Metabolic engineering approaches for lactic acid production. *Process Biochem.* 2006, 41: 991-1000
- [14] Budhavaram NK, Fan Z. Production of lactic acid from paper sludge using acid-tolerant, thermophilic *Bacillus coagulans* strains. *Bioresour Technol.* 2009, 100: 5966-72
- [15] Litchfield JH. Lactic acid, microbially produced. In: SchaechterMosel O, editor. *Encyclopedia of microbiology.* Oxford: Academic Press. 2009, p. 362-72
- [16] Kyla-Nikkila K, Hujanen M, Leisola M, Palva A. Metabolic engineering of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32 for production of pure L-(+)-lactic acid. *Appl Environ Microbiol.* 2000, 66: 3835-41
- [17] Zhou S, Shanmugam KT, Ingram LO. Functional replacement of the *Escherichia coli* D(-)-Lactate dehydrogenase gene (ldhD) with the L-(+)-Lactate dehydrogenase gene (ldhL)

- from *Pediococcus acidilactici*. Appl Environ Microbiol. 2003, 69: 2237-44
- [18] 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. Appl Environ Microbiol. 2003, 69: 399-407
- [19] Forde A, Fitzgerald GF. Bacteriophage defence systems in lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek. 1999, 76: 89-113
- [20] Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. Biotechnol Adv. 2013, 31: 877-902
- [21] Smith JS, Hillier AJ, Lees GJ. The nature of the stimulation of the growth of *Streptococcus lactis* by yeast extract. J Dairy Res. 1975, 42: 123-38
- [22] Thomas TD, Ellwood DC, Longyear MC. Change from homo to hetero lactic acid fermentation by *Streptococcus lactis* resulting from glucose limitation in anaerobic chemostat cultures. J Bacteriol. 1979, 138: 109-17
- [23] Reddy G, Altaf MD, Naveena BJ, Venkateshwar M, Kumar EV. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation-A review. Biotechnol Adv. 2008, 26: 22-34
- [24] Axelsson LT. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In Salminen S, von Wright A, editors. Lactic Acid Bacteria. New York: Marcel Dekker, Inc. 1993, 1-63
- [25] Garvie EI. Bacterial lactate dehydrogenases. Microbiol Rev. 1980, 44: 106-39
- [26] Fordyce AM, Crow VL, Thomas TD. Regulation of product formation during glucose or lactose limitation in nongrowing cells of *Streptococcus lactis*. Appl Environ Microbiol. 1984, 48: 332-7
- [27] Rojan P, John AB, Anisha AC, Nampoothiri KM. Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. Biotechnol Adv. 2009, 27: 145-152
- [28] Dworkin M. The genera *Pediococcus* and *Tetragenococcus*. In: Holzapfel WH, Franz CMAP, Ludwig W, editors. The Prokaryotes. 3rd Edition. Springer US Press, New York, USA. 2006, p. 229-266
- [29] Lapiere L, Germond JE, Ott A, Delley M, Mollet B. D-Lactate dehydrogenase gene (*ldhD*) inactivation and resulting metabolic effects in the *Lactobacillus johnsonii* strains La1 and N312. Appl Environ Microbiol. 1999, 65: 4002-7
- [30] Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Zendoa T, Sonomoto K. Improved lactic acid productivity by an open repeated batch fermentation system using *Enterococcus mundtii* QU 25. RSC Advances. 2013, 3: 8437-8445
- [31] 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. Bioresour Technol. 2011, 102: 8152-8
- [32] 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. Bioresour Technol. 2012, 116: 334-9
- [33] Zhao B, Wang L, Ma C, Yang C, Xu P, Ma Y. Repeated open fermentative production of optically pure L-lactic acid using a thermophilic *Bacillus sp.* strain. Bioresour Technol. 2010, 101: 6494-8
- [34] Ou MS, Ingram LO, Shanmugam KT. L-(+)-Lactic acid production from non-food carbohydrates by thermotolerant *Bacillus coagulans*. J Ind Microbiol Biotechnol. 2011, 38: 599-605
- [35] Patel MA, Ou MS, Harbrucker R, Aldrich HC, Buszko ML, Ingram LO, Shanmugam KT.

- Isolation and characterization of acid-tolerant, thermophilic bacteria for effective fermentation of biomass-derived sugars to lactic acid. *Appl Environ Microbiol.* 2006, 72: 3228-323
- [36] Zhang YM, Chen XR, Luo JQ, Qi BK, Wan YH. An efficient process for lactic acid production from wheat straw by a newly isolated *Bacillus coagulans* strain IPE22. *Bioresour Technol.* 2014, 158: 396-399
- [37] Wang Y, Tian T, Zhao J, Wang J, Yan T, Xu L, Liu Z, Garza E, Iverson A, Manow R, Finan C, Zhou S. Homofermentative production of D-lactic acid from sucrose by a metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett.* 2012, 34: 2069-75
- [38] Jia X, Liu P, Li S, Wen J. D-lactic acid production by a genetically engineered strain *Corynebacterium glutamicum*. *World J Microbiol Biotechnol.* 2011, 27: 2117-24
- [39] Skory CD. Isolation and expression of lactate dehydrogenase genes from *Rhizopus oryzae*. *Appl Environ Microb.* 2000, 66: 2343-2348
- [40] Jin B, Huang LP, Lant P. *Rhizopus arrhizus*-a producer for simultaneous saccharification and fermentation of starch waste materials to L-(+)-lactic acid. *Biotechnol Lett.* 2003, 25: 1983-7
- [41] Bulut S, Elibol M, Ozer D. Effect of different carbon sources on L-(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. *Biochem Eng J.* 2004, 21: 33-7
- [42] Zhang ZY, Jin B, Kelly JM. Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus* fungi. *Biochem Eng J.* 2007, 35: 251-63
- [43] Guo Y, Yan Q, Jiang ZQ, Teng C, Wang X. Efficient production of lactic acid from sucrose and corn cob hydrolysate by a newly isolated *Rhizopus oryzae* GY18. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2010, 37: 1137-43
- [44] 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 m<sup>3</sup> to 5 m<sup>3</sup> in airlift bioreactors. *J Biosci Bioeng.* 2006, 101: 9-12
- [45] 刘喆. 我国乳酸的生产技术及研发状况. *河南化工.* 2010, 27: 29-31
- [46] Karin H, Bäbel HH. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzy Microbiol Technol.* 2000, 26: 87-107
- [47] 中国科学院生物质资源领域战略研究组. 中国至 2050 年生物质资源科技发展路线图. 2010. 北京: 科学出版社
- [48] Shen XL, Xia LM. Lactic acid production from cellulosic material by synergetic hydrolysis and fermentation. *Appl Biochem Biotechnol.* 2006, 133: 251-262
- [49] Zhao K, Qiao QG, 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. *Bioresour Technol.* 2013, 135: 481-489
- [50] Panesar PS, Kennedy JF, Gandhi DN, Bunko K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chem.* 2007, 105: 1-14
- [51] Kim HO, Wee YJ, Kim JN, Yun JS, Ryu HW. Production of lactic acid from cheese whey by batch and repeated batch cultures of *Lactobacillus sp.* RKY2. *Appl Biochem Biotechnol.* 2006, 131: 694-704
- [52] Buyukkileci AO, Harsa S. Batch production of L-(+) lactic acid from whey by *Lactobacillus casei* NRRL B-441. *J Chem Technol Biotechnol.* 2004, 79: 1036-40
- [53] 刘振民. 乳酸菌高密度培养及浓缩型发酵剂研究. 2000. 哈尔滨: 东北农业大学
- [54] 李莹, 周剑忠, 董明盛. 乳酸菌高密度培养技术研究进展. *食品工业科技.* 2008
- [55] Guo JY, Yang CP, Zeng GM. Treatment of swine wastewater using chemically modified

- zeolite and bioflocculant from activated sludge. *Bioresour Technol.* 2013, 143: 289-297
- [56] 卫扬保. 微生物生理学. 北京: 高等教育出版社. 1989: 18-36
- [57] Li O, Lu C, Liu A, Zhu L, Wang PM, Qian CD, Jiang XH, Wu XC. Optimization and characterization of polysaccharide-based bioflocculant produced by *Paenibacillus elgii* B69 and its application in wastewater treatment. *Bioresour Technol.* 2013, 134: 87-93
- [58] Guo JY, Yu J, Xin X, Zou CW, Cheng QF, Yang HJ, Nengzi L. Characterization and flocculation mechanism of a bioflocculant from hydrolyzate of rice stover. *Bioresour Technol.* 2015, 177: 393-397
- [59] Gong WX, Wang SG, Sun XF, Liu XW, Yue QY, Gao BY. Bioflocculant production by culture of *Serratia ficaria* and its application in wastewater treatment. *Bioresour Technol.* 2008, 99: 4668-4674
- [60] Liu WJ, Wang K, Li BZ, Yuan HL, Yang JS. Production and characterization of an intracellular bioflocculant by *Chryseobacterium daeguense* W6 cultured in low nutrition medium. *Bioresour Technol.* 2010, 101: 1044-1048
- [61] Lian B, Chen Y, Zhao J, Teng HH, Zhu L, Yuan S. Microbial flocculation by *Bacillus mucilaginosus*: applications and mechanisms. *Bioresour Technol.* 2008, 99: 4825-4831
- [62] Ahmad H, Rajab A, Azni I, Norhafizah A. Production and characterization of a bioflocculant produced by *Aspergillus flavus*. *Bioresour Technol.* 2013, 127: 489-493
- [63] 樊艳春, 林波. 微生物絮凝剂絮凝机理研究进展. 南昌大学环境科学与工程学院. 2006
- [64] 王亚静, 毕于运, 高春雨. 中国秸秆资源可收集利用量及其适宜性评价. 中国农业科学. 2010, 43:1852-1859
- [65] Eggersdorfer M, Meyer J, Eckes P. Use of renewable resources for non-food materials. *FEMS Microbiol Rev.* 1992, 103: 355-364
- [66] Schilling LB. Chemicals from alternative feedstock in the United States. *FEMS Microbiol Rev.* 1995, 16:1001-1110
- [67] Balat M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy Convers. Manage.* 2011, 52: 858-875
- [68] Heiner AP, Sugiyama J, Teleman O. Crystalline cellulose I $\alpha$  and I $\beta$  studied by molecular dynamics simulation. *Carbohydrate Research.* 1995, 273: 207-223
- [69] Taherzadeh MJ, Karimi K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *Int. J. Mol. Sci.* 2008, 9: 1621-1651
- [70] Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol.* 2002, 83: 1-11
- [71] Moilanen U, Kellock M, Galkin S, Viikari L. The laccase-catalyzed modification of lignin for enzymatic hydrolysis. *Enzy Microbial Technol.* 2011, 49: 492-498
- [72] 张名佳, 苏荣欣, 齐崑等. 木质纤维素酶解糖化. 化学进展. 2009, 21: 1070-1074
- [73] Yang B, Wyman CE. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels Bioprod Bioref.* 2008, 2: 26-40
- [74] Chang YC, Choi D, Takamizawa K, Kikuchi S. Isolation of *Bacillus sp.* strains capable of decomposing alkali lignin and their application in combination with lactic acid bacteria for enhancing cellulase performance. *Bioresour Technol.* 2014, 152: 429-436
- [75] Duff SJB, Murray WD. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresour Technol.* 1996, 55: 1-33
- [76] Palonen H, Thomsen AB, Tenkanen M, Schmidt AS, Viikari L. Evaluation of wet

- oxidation pretreatment for enzymatic hydrolysis of soft wood. *Appl Biochem Biotechnol*. 2004, 117: 1-17
- [77] Zhang J, Zhu ZN, Wang XF, Wang N, Wang W, Bao J. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnol Biofuels*. 2010, 3: 26
- [78] Wang QZ, Ingram LO, Shanmugam KT. Evolution of D-lactate dehydrogenase activity from glycerol dehydrogenase and its utility for D-lactate production from lignocellulose. *PNAS*. 2011, 108: 18920-18925
- [79] Taniguchi M, Hoshina K, Tanabe S, Higuchi Y, Sakai K, Ohtsubo S, Hoshino K, Tanaka T. Production of L-lactic acid by simultaneous saccharification and fermentation using unsterilized defatted rice bran as a carbon source and nutrient component. *Food Sci Technol Res*. 2005, 11: 400-406
- [80] Klein-Marcuschamer D, Oleskowicz-Popiel P, Simmons BA, Blanch HW. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnol Bioeng*. 2012, 109: 1083-1087
- [81] Nguyen CM, Kim JS, Nguyen TN, Kim SK, Choi GJ, Choi YH, Jang KS, Kim JC. Production of L- and D-lactic acid from waste *Curcuma longa* biomass through simultaneous saccharification and cofermentation. *Bioresour Technol*. 2013, 146: 35-43
- [82] Ye LD, Bin Hudari MS, Zhou XD, Zhang DX, Li Z, Wu JC. Conversion of acid hydrolysate of oil palm empty fruit bunch to L-lactic acid by newly isolated *Bacillus coagulans* J112. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013, 97: 4831-4838
- [83] Tanasupawat S, Okada S, Kozaki M, Komogata K. Characterization of *Pediococcus pentosaceus* and *Pediococcus acidilactici* strains and replacement of the type strain of *P. acidilactici* with the proposed neotype DSM 20284. *Int J Syst Bacteriol*. 1993, 43: 860-863
- [84] Zhang J, Wang XS, Chu DQ, He YQ, Bao J. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresour Technol*. 2011, 102: 4480-4488
- [85] Zhang J, Chu DQ, Huang J, Yu ZC, Dai GC, Bao J. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. *Biotechnol Bioeng*. 2010, 105: 718-728
- [86] Adney B, Baker J. Measurement of cellulase activities. 1996. National Renewable Energy Laboratory
- [87] Ghose TK. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem*. 1987, 59: 257-268
- [88] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, Crocker D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. 2008. National Renewable Energy Laboratory
- [89] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. 2005. Determination of ash in biomass. 2005. National Renewable Energy Laboratory
- [90] Ainsworth EA, Gillespie KM. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*. 2007, 2: 875-877
- [91] Ran H, Zhang J, Gao QQ, Lin ZL, Bao J. Analysis of biodegradation performance of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resinae* ZN1. *Biotechnol Biofuels*. 2014, 7: 51
- [92] Klinke HB, Ahring BK, Schmidt AS. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresour Technol*. 2002, 82: 15-26

- [93] Mills TY, Sandoval NR, Gill RT. Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. *Biotechnol Biofuels*. 2009, 2: 26
- [94] Myers HM, Montgomery DC. Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. Wiley-Interscience, New York. 1991
- [95] Portnoy VA, Bezdán D, Zengler K. Adaptive laboratory evolution-harnessing the power of biology for metabolic engineering. *Current Opinion in Biotechnol*. 2011, 22: 590-594
- [96] Bai DM, Li SZ, Liu ZL, Cui ZF. Enhanced L-(+)-lactic acid production by an adapted strain of *Rhizopus oryzae* using corn cob hydrolysate. *Appl Biochem Biotechnol*. 2008, 144: 79-85
- [97] Wang Q, Ingram LO, Shanmugam KT. Evolution of D-lactate dehydrogenase activity from glycerol dehydrogenase and its utility for D-lactate production from lignocellulose. *PNAS*. 2011, 108: 18920-18925
- [98] Varnai A, Viikari L, Marjamaa K, Siika-aho M. Adsorption of monocomponent enzymes in enzyme mixture analyzed quantitatively during hydrolysis of lignocellulose substrates. *Bioresour Technol*. 2011, 102: 1220-1227
- [99] Kadam SR, Patil SS, Bastawde KB, Khire JM, Gokhale DV. Strain improvement of *Lactobacillus delbrueckii* NCIM 2365 for lactic acid production. *Process Biochem*. 2006, 41: 120-126

## 致谢

在华东理工大学忙碌而充实的三年硕士研究生求学生涯已经接近尾声，在此之际，非常感谢在这期间一直鼓励我指导我帮助我的所有老师、同学、朋友和家人。首先特别感谢我的导师鲍杰教授对我实验研究过程中实验方案和研究方法的制定上给予的悉心指导。鲍老师渊博的学识、严谨的治学和科研态度、忘我的工作作风以及对学术孜孜不倦的追求精神深深感染了我，激励我在科研工作中更加积极主动地发现问题并解决问题。在论文撰写过程中，您为论文的完善提出了很多关键性的修改建议和意见，使我能够顺利出色完成学业。在此，向鲍老师表示我最崇高的敬意和感谢！

感谢张老师一直以来对我实验思路和实验方法的指导，以及为论文审阅和修改所付出的大量时间和精力！

感谢涂毅、吴倩、何燕青、张宏森、易霞、雷成等对我实验操作的指导和帮助！

感谢我的家人对我生活和精神上的支持，他们的鼓励和支持是我能够完成学业的巨大动力！

再次感谢实验室所有老师和同学的帮助，谢谢你们！

# 卷 内 备 考 表

本卷情况说明

本卷共

页

立卷人 \_\_\_\_\_

检查人 \_\_\_\_\_

立卷时间 \_\_\_\_\_