

学校代码：10251

学 号：Y45180575

華東理工大學

工 程 硕 士 学 位 论 文

论文题目： 纤维素 L-乳酸
合成 L-丙交酯的研究

工程领域： 生物工程

研究方向： 生物炼制

论文作者： 贾佳

学校导师： 张建 副教授

企业导师： 钱世凯 副高级工程师

定稿日期： 2021 年 05 月 28 日

分类号: _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学

工程硕士学位论文

纤维素 L-乳酸合成 L-丙交酯的研究

贾佳

指导教师姓名: 鲍杰 教授 生物工程学院
张建 副教授 生物工程学院
钱世凯 副高级工程师 吉林燃料乙醇有限责任公司

申请学位级别: 硕士 工程领域: 生物工程

论文定稿日期: 2021. 5. 28 论文答辩日期: 2021. 6. 5

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: (姓名、职称)

评 阅 人: (姓名、职称)

作者声明

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

论文作者签名：

年 月 日

纤维素 L-乳酸合成 L-丙交酯的研究

摘要

木质纤维素干法生物炼制技术经过长期的研究,已经基本克服了预处理、脱毒、糖化与发酵等工艺过程的主要技术障碍,实现了高浓度、高手性度、低残糖的纤维素 L-乳酸发酵生产。但是,基于干法生物炼制技术生产的 L-乳酸,其纯化工艺开发及合成的工作尚未见报道。

本文对木质纤维素原料生产的 L-乳酸合成 L-丙交酯的过程进行了研究。本文首先对通过干法生物炼制技术获得的纤维素 L-乳酸采用了常规、易操作的分离纯化工艺(离心、脱色、结晶、洗晶、酸解、精制),获得了回收率为 69.30%、纯度为 98.19% (w/w) 的纤维素 L-乳酸;其中, L-乳酸的脱色率为 98.37%,较为彻底地脱除了生物脱毒后残余的木质素降解产生的酚类物质。接着,使用精制的纤维素 L-乳酸成功合成了光学纯度为 98.95%、手性纯度为 93.08% 的 L-丙交酯。最后,本文对木质纤维素来源的 L-丙交酯进行了结构分析(NMR、FT-IR)、熔点测定、相对分子质量测定、元素含量检测。与 L-丙交酯标准品比较发现,木质纤维素来源的 L-丙交酯的表征结果与标准品完全一致。本文采用常规、易操作的纯化方法,获得了聚合级纤维素 L-乳酸;实现了基于干法生物炼制技术生产的 L-乳酸合成聚乳酸前体 L-丙交酯的目标,为从木质纤维素生物质合成非粮来源的生物基聚合物提供了极为重要的基础研究依据。

为了进一步简化纤维素 L-乳酸的纯化步骤,本文在低 pH 环境下对 L-乳酸工程菌 *Pediococcus acidilactici* ZY271 进行了长周期适应性进化研究。在不中和发酵产生的 L-乳酸的情况下,对 *P. acidilactici* ZY271 进行长周期的连续转接培养,以增强其在低 pH 环境下的适应能力。结果发现,随着 pH 下降,适应性进化菌株较其亲本菌株的细胞活力有明显提高,且 L-乳酸生产能力也有一定提高。在 pH 4.0 条件(接近 L-乳酸 pKa 值)下,适应性进化菌株的细胞活力提高到亲本菌株的 4.21 倍, L-乳酸产量提高了 34.67%。

关键词: 木质纤维素; L-乳酸; L-丙交酯; 低 pH; 适应性进化

Study on the synthesis of L-lactide from cellulosic L-lactic acid

Abstract

After long-term research, the dry biorefinery technology of lignocellulose has basically overcome the technical obstacles in the process of pretreatment, detoxification, saccharification and fermentation, and realized the production of cellulosic L-lactic acid fermentation with high concentration, high chirality and low residual sugar. However, the development and synthesis of L-lactic acid based on dry biorefinery technology has not been reported yet.

In this study, the process of L-lactide synthesis from L-lactic acid produced from lignocellulose feedstock was studied. Firstly, in this thesis, the cellulosic L-lactic acid obtained by dry biorefining technology was separated and purified by conventional and easy-to-operate separation and purification operations (centrifugation, decolorization, crystallization, crystal washing, acidification, desalination). The cellulosic L-lactic acid with a recovery of 69.30% and a purity of 98.19% (w/w) was obtained. Among them, the decolorization rate of L-lactic acid is 98.37%, which completely removed the residual phenolic substances produced by lignin degradation after biological detoxification. Then, L-lactide with an optical purity of 98.95% and a chiral purity of 93.08% was successfully synthesized by using the refined cellulosic L-lactic acid. Finally, the structure analysis (NMR, FT-IR), melting point determination, relative molecular weight determination and element content determination of L-lactide from lignocellulose were carried out. Compared with the standard L-lactide product, it is found that the characterization results of L-lactide derived from lignocellulose were completely consistent with the standard product. In this thesis, a conventional and easy-to-operate purification method was used to obtain polymer-grade cellulosic L-lactic acid; the goal of synthesizing poly(lactic acid) precursor L-lactide from L-lactic acid based on dry biorefinery technology was achieved, which provides a very important basic research basis for the synthesis of non-grain-based polymers from lignocellulose biomass.

In order to further simplify the purification steps of cellulose L-lactic acid, the long-period adaptive evolution of L-lactic acid engineering bacteria *Pediococcus acidilactici* ZY271 was studied in low pH environment. Without neutralizing the L-lactic acid produced by fermentation, *P. acidilactici* ZY271 was continuously transferred for a long period in order to increase its adaptability in the environment of low-pH. The results showed that with the decrease of pH, the cell viability of adaptive evolutionary strains was significantly higher than that of their parents, and the production of L-lactic acid was also increased to a certain extent. Under the condition of pH 4.0 (close to the pKa value of L-lactic acid), the cell viability of the adaptive

evolutionary strain was 4.21 times higher than that of the parent strain, and the yield of L-lactic acid increased by 34.67%.

Keywords: Lignocellulose; L-lactic acid; L-lactide; Low-pH; Adaptive evolution

目录

第 1 章 文献综述.....	1
1.1 木质纤维素生物炼制.....	1
1.1.1 预处理.....	1
1.1.2 脱毒.....	1
1.1.3 糖化与发酵.....	3
1.2 乳酸概述.....	3
1.2.1 乳酸的结构与性质.....	3
1.2.2 乳酸发酵菌株.....	4
1.2.3 酸胁迫对乳酸发酵的影响.....	5
1.2.4 乳酸的应用.....	5
1.3 乳酸的分离纯化.....	6
1.3.1 沉淀法.....	6
1.3.2 溶剂萃取法.....	7
1.3.3 吸附与离子交换法.....	8
1.3.4 膜分离法.....	8
1.3.5 酯化法.....	10
1.3.6 分子蒸馏法.....	11
1.4 丙交酯概述.....	12
1.4.1 丙交酯的结构与性质.....	12
1.4.2 丙交酯的合成.....	13
1.4.3 丙交酯的纯化.....	14
1.4.4 丙交酯的应用.....	15
1.5 本文的立题依据及主要研究内容.....	15
第 2 章 纤维素 L-乳酸的分离纯化及 L-丙交酯的合成.....	17
2.1 引言.....	17
2.2 材料与方法.....	17
2.2.1 菌株、培养基及培养方法.....	17
2.2.2 木质纤维素原料、酶与试剂.....	18
2.2.3 干法生物炼制技术生产纤维素 L-乳酸.....	18
2.2.4 纤维素 L-乳酸的分离纯化.....	19
2.2.5 纤维素 L-乳酸分离纯化中主要杂质的检测方法.....	20

2.2.6 L-丙交酯的合成	21
2.2.7 L-丙交酯的分析表征	21
2.3 结果与讨论	22
2.3.1 纤维素 L-乳酸的生产	22
2.3.2 纤维素 L-乳酸脱色条件的选择	23
2.3.3 纤维素 L-乳酸的分离纯化	25
2.3.4 L-丙交酯的合成及分析表征	29
2.4 本章小结	34
第 3 章 <i>P. acidilactici</i> ZY271 在低 pH 环境中的适应性进化	35
3.1 引言	35
3.2 材料与方法	35
3.2.1 菌株、培养基及培养方法	35
3.2.2 适应性进化方法	36
3.2.3 分析方法	36
3.3 结果与讨论	37
3.3.1 <i>P. acidilactici</i> ZY271 的适应性进化	37
3.3.2 适应性进化前后 <i>P. acidilactici</i> ZY271 在低 pH 环境下的发酵性能评价	38
3.4 本章小结	40
第 4 章 结论与展望	41
4.1 结论	41
4.2 展望	41
参考文献	43
硕士期间取得成果	55
致谢	56

符号、单位、术语等的说明

本文在撰写过程中涉及到的缩略词。

PLA	Poly(lactic acid)	聚乳酸
HMF	Hydroxymethyl furfural	5-羟甲基糠醛
BSA	Bovine Serum Albumin	牛血清白蛋白
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	核磁共振仪
FT-IR	Fourier Transform infrared spectroscopy	傅里叶红外光谱仪
DSC	Differential Scanning Calorimeter	差示扫描量热仪
SSCF	Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation	同步糖化共发酵

第 1 章 文献综述

随着全球人口增长和社会经济的快速发展,不可再生的化石能源日益匮乏。同时,伴随着环境问题日益凸显,可再生的生物质资源和以聚乳酸(PLA)为代表的生物可降解材料越来越受到人们的关注^[1,2]。

1.1 木质纤维素生物炼制

木质纤维素生物质一般由占干重 30-50%的纤维素、20-40%的半纤维素和 15-25%的木质素组成^[3,4](图 1.1)。木质纤维素生物炼制是指通过预处理、生物脱毒、糖化与发酵等工序,把兼具丰富性、经济性和可再生性特点的木质纤维素转化成燃料乙醇、D-/L-乳酸、柠檬酸等高附加值化学品^[5]。

1.1.1 预处理

预处理可以改变生物质颗粒的大小、结构和化学组成^[6]。因此,为了破坏木质纤维素的结构、便于获得可发酵性单糖,对其进行预处理是至关重要的^[7]。高效的预处理技术应具有至少以下 5 个特点^[2]:(1) 生物质颗粒较小;(2) 限制发酵微生物生长的抑制物含量低;(3) 低能耗;(4) 催化剂的成本低;(5) 操作和设备成本低。

预处理方式主要包括:生物预处理法、物理法(球磨法等)、化学法(强酸、强碱)和混合预处理法^[6]。其中,使用最广泛的预处理方式是酸预处理和碱预处理^[8],而酸预处理是获得高糖含量的木质纤维素原料的预处理方式^[9]。

本课题组 Zhang 等^[10]研发的干式稀酸预处理方式适用于各种木质纤维素原料,同时该预处理方式低能耗、极低废水排放。但是在预处理的过程中,半纤维素降解产生的木糖和葡萄糖会进一步降解生成 5-羟甲基糠醛(HMF)和糠醛等抑制物;同时木质素会降解生成酚类物质,在微生物发酵生产生物基产品时会形成色素。

1.1.2 脱毒

预处理的过程往往会导致呋喃衍生物(HMF、糠醛)、弱酸类(甲酸、乙酸)、酚类化合物(香草醛、丁香醛)三大类抑制物副产物的产生,这些抑制物主要来源于木质纤维素生物质在预处理的过程中过度降解^[11,12](图 1.2)。抑制物的存在会给后续的糖化过程及发酵菌株的正常生长带来不利影响^[13]。

目前,常见的脱毒方式有物理法(膜过滤^[14]、活性炭吸附^[15,16]等)、化学法(中和法^[17]、离子交换法^[18]、生物法^[19](微生物降解等)。相比于复杂而昂贵的物理和化学解毒方法,利用微生物处理半纤维素水解物或抑制物的毒性是一种有效且环境友好型的方法^[12]。

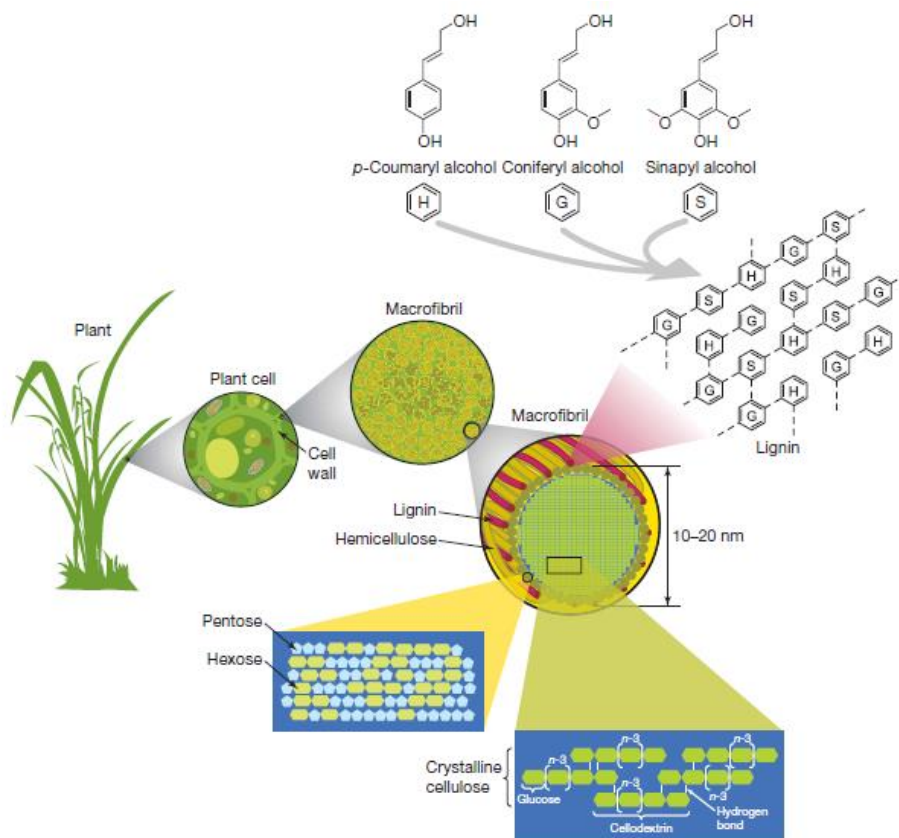


图 1.1 木质纤维素的组成与结构^[20]

Fig. 1.1 Diagram of structure lignocellulose biomass^[20]

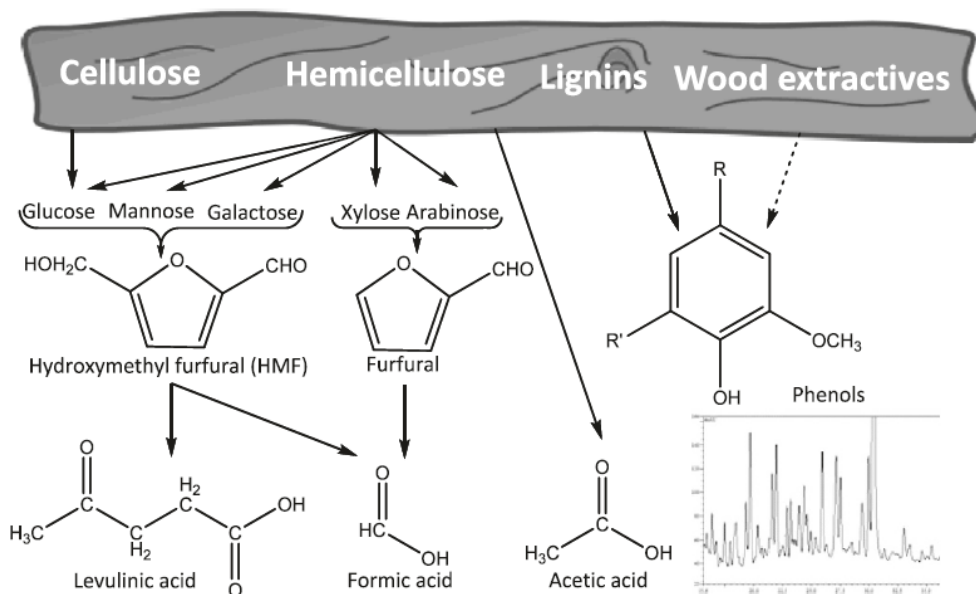


图 1.2 木质纤维素在预处理过程中抑制物来源^[21]

Fig. 1.2 Sources of inhibitors in lignocellulose biomass pretreatment^[21]

本课题组筛选出了两株生物脱毒菌株，树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1^[22]和宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89^[23]，能够高效地将木质纤维素物质原料中的主要抑制物降解成水和二氧化碳并最大限度地保留可发酵性单糖，且无需添加营养物质。

1.1.3 糖化与发酵

在利用经过预处理和脱毒后的木质纤维素原料生产生物基产品前，需要将其水解糖化。目前，通常采用酶催化法将纤维素、半纤维素转化成可发酵性糖^[24]。需要注意的是，木质素的存在和脱毒不完全会对酶解和糖化效果带来不利影响^[25, 26]。

在木质纤维素被糖化后，通常采用两种方法获得发酵方式生产生物基产品：分步糖化与发酵（SHF）和同步糖化与发酵（SSF）^[27, 28]，两者的优、缺点本课题组的邱忠洋^[5]作了详细的阐述。就乳酸发酵而言，利用本实验自制的、带有螺带式搅拌桨的生物反应器进行同步糖化共发酵，这种先预糖化后边糖化边发酵的工艺，在降低设备成本的同时也避免初始的高糖浓度对纤维素酶和发酵菌株带来的不利影响^[29]。

1.2 乳酸概述

乳酸（ $C_3H_6O_3$ ，lactic acid）在人类食品的发酵和保存方面历史悠久^[30]。它于 1780 年首次在酸牛奶中被发现，1878 年分离出纯种乳酸菌，并于 1881 首次实现工业化生产^[31-33]。乳酸可以通过化学法和微生物发酵法获得^[32]。但是，考虑到微生物发酵法在乳酸的纯度、成本等方面的优势，世界上大多数的商业乳酸都是通过微生物发酵来制备的^[31]。

近年来，随着国家相关政策的出台以及人们环境保护意识的提高，以 PLA 为典型的可降解材料成为了焦点。因此，合成 PLA 的乳酸单体需求量明显增加。而乳酸的价格与其生产用的原料的价格有密切的关系^[34]，据报道，发酵生产乳酸的原材料成本通常占总成本的 34%以上^[35]。因此，乳酸发酵的效率和经济性仍然是一个问题，并且底物的改善起着至关重要的作用。研究者们已经进行了各种尝试，期望从廉价的底物中有效地生产乳酸，例如米糠^[36]，纸污泥^[37]和绿色微藻^[38]。

值得一提的是，随着乳酸需求量的日益增长，木质纤维素原料被认为是有吸引力的乳酸发酵碳源^[39]。这是因为较玉米等粮食类作物而言，以木质纤维素原料为碳源进行乳酸生产不仅有利于降低乳酸的生产成本，而且有利于缓解甚至避免“与民争粮”的局面。

1.2.1 乳酸的结构与性质

乳酸是最简单的、使用最广泛的羟基羧酸，它有两种光学异构体：L(+)-乳酸和 D(-)-乳酸（图 1.3）。它是一种无色到黄色的液体（15 °C，1 atm），具有吸湿性、无气味，其基本性质如表 1.1 所示。



图 1.3 手性乳酸结构式

Fig. 1.3 The Structural formula of chiral lactic acid

表 1.1 乳酸的基本性质^[40]Table 1.1 Properties of lactic acid^[40]

性质	数值
密度 (20 °C, g/L)	1.249
熔点 (°C)	52.8 (D 型) ; 53.0 (L 型) ; 16.8 (D,L 型)
沸点 (°C)	103 (D 型, 15 mm Hg) ; 125 (L 型, 760 mm Hg) 82.0 (D,L 型, 0.5 mm Hg) ; 122.0 (D,L, 15 mm Hg)
解离常数 (pKa, 25 °C)	3.83 (D 型) ; 3.79 (L 型) ; 3.86 (D,L 型)
溶解性	易溶于乙醇、水、甘油; 不溶于氯仿

1.2.2 乳酸发酵菌株

乳酸生产菌株主要有细菌、丝状真菌、酵母、微藻和蓝藻等，乳酸的产量和生产率取决于 pH 值、温度、营养物质以及使用的菌株。在所有的乳酸发酵菌株中，隶属于细菌的乳酸菌 (Lactic acid bacteria, LAB) 因其耐酸性强、产量大、产率高而被称为乳酸工业规模的生产者^[41]。但是，乳酸菌发酵温度一般较低，这就导致了染菌的风险。而在本课题组的前期工作中，Zhao 等^[42]成功筛选出了一株耐高温 (48 °C) 的乳酸菌 *Pediococcus acidilactici* DQ2; 为了提高乳酸的旋光纯度，Yi 等^[43]分别敲除 *P. acidilactici* DQ2 中的 L-/D-乳酸脱氢酶 (*ldhL/D*)，得到了可以生产旋光纯度为 99.89% 的 L-乳酸发酵菌株 *P. acidilactici* TY112 和旋光纯度 99.32% 的 D-乳酸发酵菌株 *P. acidilactici* ZP26; 为了进一步利用木质纤维素原料中的木糖，减少残糖的含量，Qiu 等^[44,45]在 *P. acidilactici* TY112 和 *P. acidilactici* ZP26 中构建了木糖代谢途径，分别得到了 L-乳酸高产菌株 *P. acidilactici* ZY271 和 D-乳酸高产菌株 *P. acidilactici* ZY15。

与细菌相比，酵母可以耐受更低的 pH 值，从而降低了在乳酸发酵过程中对 pH 中和剂的需求并降低了下游乳酸分离纯化的成本。然而，利用野生型酵母生产乳酸的最大缺点是主要产品乳酸的产量较低; 为了解决这一问题，研究人员通过敲除丙酮酸脱羧酶和/或丙酮酸脱氢酶，使得乙醇的合成路径被乳酸部分或全部取代，从而获得酵母

工程菌株^[46]。不同的研究小组一直在尝试从工程酵母属中生产乳酸，包括酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、乳酸克鲁维酵母 *Kluyveromyces lactis*、德尔布有孢圆酵母 *Torulaspora delbrueckii*^[39, 47]、树干毕赤酵母 *Pichia stipites*^[48]、百里酵母 *Zygosaccharomyces bailii*^[49]和假丝酵母 *Candida spp.*^[50]。

隶属于丝状真菌的米根霉 *Rhizopus oryzae*、根霉菌 *Rhizopus arrhizus* 都能利用不同的碳源生产乳酸。与乳酸菌相比，根霉菌株能够直接利用淀粉，无需糖化^[51]，并且对营养物质的要求低^[41]。另外，根霉菌的丝状或球状的生长状态有利于其与发酵液的分离，降低下游分离成本^[52]。但是，根霉菌在生产乳酸的同时会生成副产品。

藻类和蓝细菌属于光合作用微生物，它们几乎可以在任何地方生长，对营养要求极低，并且可以生产各种化学物质，如乙醇、乳酸以及生物燃料 H_2 等^[41]。

1.2.3 酸胁迫对乳酸发酵的影响

在乳酸生产菌株将碳水化合物转化为乳酸的过程中，也导致了乳酸菌株生长环境的变化，构成了所谓的“酸胁迫”环境；这对工程菌株的代谢产生了负面影响，进而不利于乳酸的生成。因此，为了保证菌株的正常生长与乳酸生产，通常使用两种方案：

(1) 使用 pH 中和剂：向生物反应器中加入 $Ca(OH)_2$ 、 $NaOH$ 、 $CaCO_3$ 、氨水等碱性物质，将发酵 pH 维持在菌株生长和乳酸生产的最适 pH。但是，加入的 pH 中和剂会导致 90% 以上的乳酸都是以乳酸盐的形式存在，这给后续的乳酸提纯增加了成本^[47]。

(2) 菌株改造：如果，乳酸发酵在 pH 等于或低于乳酸的 pK_a (3.86) 下进行会极大地降低乳酸分离成本，并避免带来环境问题^[41]。因此，研究人员尝试通过诱变育种^[53]、驯化^[54, 55]等传统的育种手段获得因基因组随机突变或随机重组而提高了酸耐受能力的菌株；抑或是通过基因工程、代谢工程等技术手段强化表达乳酸菌株对酸胁迫的响应机制，通过过表达或异源表达耐酸机制的关键基因，使菌株的耐酸能力显著提高。Park 等^[56]筛选出了一株含有耐酸相关的转录调节因子 *PARI* 的酵母菌株，*Pichia kudriavzevii* NG7，在 pH 3.6、pH 4.7 的条件下乳酸产量分别高达 135 g/L、154 g/L。Hou 等^[57]发现与 *S. cerevisiae* 相比，*Candida glycerinogenes* 表现出更突出的耐酸能力，而这与诱导型启动子 *PCggmt1* 密切相关。Sugiyama 等^[58]通过过表达 *ESBP6* 基因发现改造菌株的酸耐受能力和乳酸产量显著提高。Sheehan 等^[59]通过异源表达 *betL* 基因发现菌株在低 pH 环境中表现出较强耐受能力。

1.2.4 乳酸的应用

乳酸通过了美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) GRAS (Generally recognized as safe) 认证，其在食品、医药和化工行业中有着广泛的应用。因其具有酸化、防腐、调味等作用，而被广泛地应用于食品行业中。在医药行业中，缺钙治疗、抗粉刺治疗以及透析中都有乳酸的存在^[60]。在化妆品行业，乳酸作为保湿剂添加到药膏、唇膏、乳液等各类护肤品中^[61]。在化工行业中，可用于有机溶剂的生产、作为

除锈剂、清洗剂等^[60, 62, 63]。此外,不同的行业在特定任务中小范围使用乳酸,例如在粘合剂配方和平版印刷中用作 pH 调节剂、终止剂^[60]。近年来,乳酸作为 PLA 的单体,广泛地应用于包装材料、器皿等日常生活中^[64]。但是, D(-)-乳酸有时会危害人体的新陈代谢,并可能导致酸中毒和脱钙^[32, 65]。

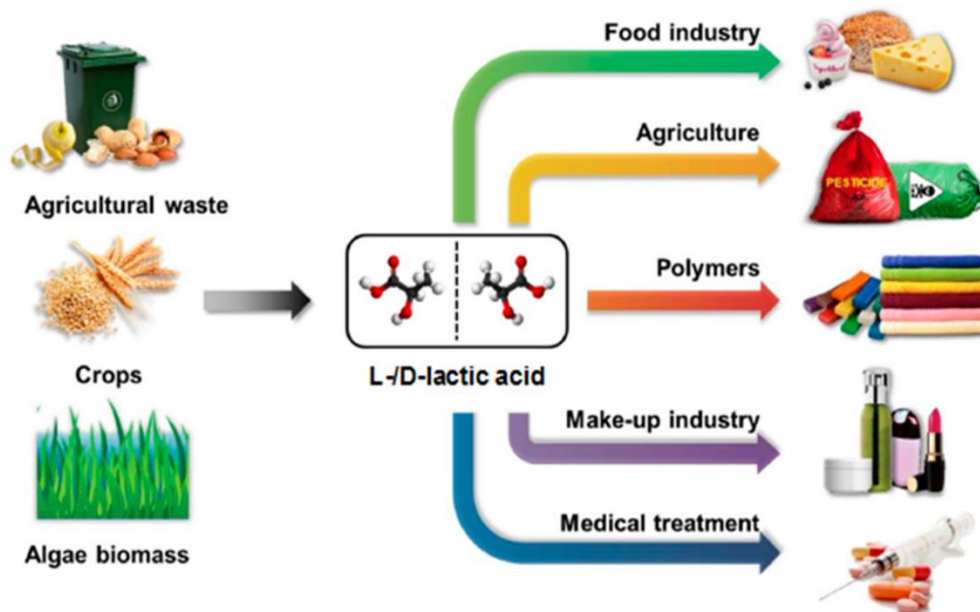


图 1.4 乳酸的工业应用^[66]

Fig. 1.4 Industrial applications of lactic acid^[66]

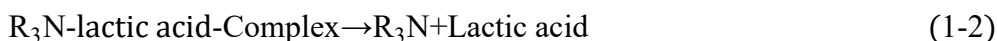
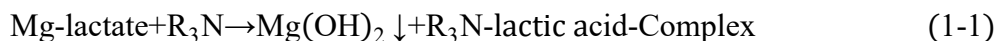
1.3 乳酸的分离纯化

全球乳酸的 90%以上都是通过微生物发酵合成的^[67, 68]。然而,由于发酵液中有各种杂质(色素、蛋白质、副产物等)、乳酸蒸汽压低且有自聚合倾向,因此乳酸的纯化是一项技术挑战^[69],事实上,乳酸的分离纯化的成本占总成本的 50-60%^[70]。目前,乳酸分离方法有沉淀法、溶剂萃取法、吸附与离子交换法、膜分离法、精馏法等。

1.3.1 沉淀法

沉淀法是通过添加硫酸至发酵液中分离并回收以乳酸盐形式存在的乳酸的一种简单、有效的方法。在微生物发酵结束后,向发酵液中加入碱液以中和更多的乳酸,然后将发酵液置于一定条件下使乳酸钙结晶析出;乳酸钙加热融化后进行酸解处理。有研究表明:硫酸酸解乳酸钙时,当乳酸钙与硫酸的摩尔比为 1:1、 $\text{pH} \geq \text{pKa}$ 时,硫酸钙可以更有效地沉淀和去除,从而更有效地分离和回收乳酸^[71]。通过过滤除去硫酸钙和其他不溶性残留物后,对发酵液进行脱色处理,得到粗的乳酸溶液。最后,通过离子交换、酯化等方法对粗乳酸进一步提纯,得到成品乳酸。

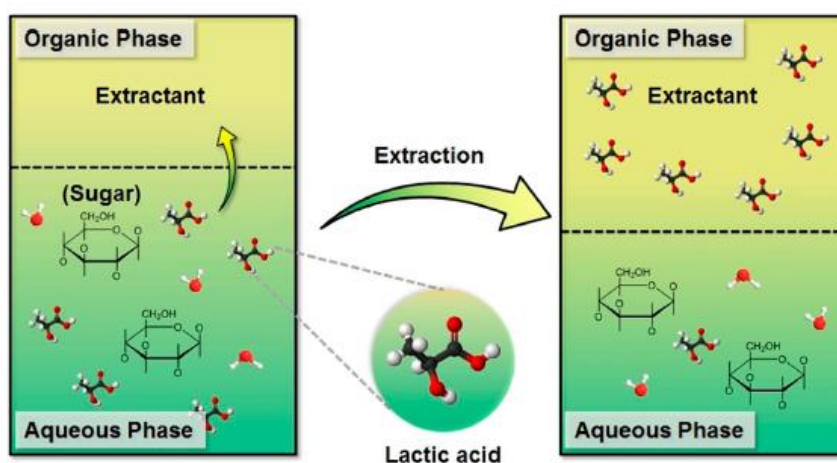
有研究人员提出使用氢氧化镁作为乳酸发酵的 pH 中和剂, 形成乳酸镁, 乳酸镁与三甲胺反应生成三甲胺-乳酸络合物 (公式(1-1)), 该络合物进一步热分解以使乳酸和三甲胺分离 (公式(1-2)), 同时, 三甲胺与氢氧化镁都可以循环利用^[72, 73]。因此, 镁沉淀技术在乳酸的分离过程中具有广阔的前景, 这将有助于解决硫酸酸解而引起的与环境有关的问题^[74]。



1.3.2 溶剂萃取法

溶剂萃取法是基于溶质在两液相中的溶解度或分配系数的不同, 将一种或多种溶质转移到引入溶剂形成的不混溶的第二液相中, 从而从液体混合物中除去一种或多种溶质的过程^[75]。萃取剂选择的关键参数包括选择性, 化学稳定性, 腐蚀性, 毒性和粘度。Krzyżaniak 等^[76]研究了稀释剂的作用, 发现稀释剂的极性较低会导致乳酸-萃取物复合物的稳定性和分布降低。这一发现被应用于通过庚烷稀释萃取相回收乳酸的工艺中, 用稀释的萃取相反萃取, 单级反萃取乳酸得率高达 80%。因此, 当萃取剂的粘度太高时, 可以添加稀释剂来提高其分离能力^[66, 75]。Kertes 等^[77]以及 Vaidya 等^[78]将萃取剂分为三类: (1) 传统的含氧烃, 如辛醇; (2) 磷酸结合的含氧溶剂, 如磷酸三丁酯; (3) 高分子量脂肪族胺, 如十二烷基胺。这些年来, 人们对以发酵为基础的分选产物进行了大量的研究, 但液-液萃取并没有普遍应用于工业过程中, 这是因为低毒性和高萃取性的萃取剂对于有效的工艺是必不可少的, 然而传统的含氧烃、磷酸结合的含氧溶剂并不能够高效的提取乳酸, 只有高分子量脂肪族胺是最有效的萃取剂^[78, 79]。

近年来, 盐析萃取法和乳状液膜萃取法分离乳酸的方法进入了大家的视野。在盐析萃取工艺中, 通过添加硫酸盐和磷酸盐 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 K_2HPO_4 等) 来提高萃取剂与水相间乳酸的分配系数^[80, 81], 萃取剂通常是甲醇、乙醇和丙酮^[82]。乳状液膜是一种按液膜分离两相的方法。乳状液膜的一面为待分离的混合物, 另一面为背面萃取剂, 乳酸首先被提取到膜中, 然后通过反萃取剂从膜中反向提取^[83], 利用磁力搅拌器或均质器可以很容易地制备乳状液膜^[65]。Kumar 等^[83]以正丁醇为萃取剂、通过硫酸铵提高分配系数, 在最佳条件下乳酸的回收率和纯度分别达到了 86%和 93%。四川大学胡常伟课题组^[84]对利用玉米秸秆水解液发酵得到的乳酸进行了纯化研究, 发现采用一次盐析萃取和连续反应萃取的方法可以有效地提高乳酸回收率, 并去除了全部的残糖和大部分盐 (82.8%)。

图1.5 溶剂萃取法分离乳酸^[66]Fig. 1.5 Solvent extraction method to separate lactic acid^[66]

1.3.3 吸附与离子交换法

吸附被定义为物质在边界的积累,在这种积累过程中,流体相(吸附)和固定相(吸附剂)的原子或分子之间发生相互作用^[85, 86]。固体吸附剂要具有选择性高、耐磨性高、热稳定性好、孔径小、与微生物的生物相容性好、成本低、再生能力好、抗酸能力强(相对于水和基质)等性质,最常用的吸附剂有多孔碳、二氧化硅、纳米材料、合成树脂、金属基吸附剂、生物吸附剂、工业副产品粘土等^[82]。需要注意的是, pH 对吸附效果的影响是十分明显的^[85]。

离子交换法是一种不需要大量中和剂和消耗大量硫酸的优越替代技术^[47],是从发酵液中分离乳酸的另一种广泛应用的方法。使用离子交换树脂(如 Amberlite IRA-420, IRA-400 和 DOWEX-50W)提纯乳酸主要涉及以下三个阶段:乳酸离子的吸附,洗脱以及乳酸盐转化为乳酸^[82]。但是,通常只有在低盐浓度的情况下使用离子交换法。Zaini 等^[88]利用阴、阳离子交换树脂对以 DDGS (Dried Distillers Grains with Solubles) 为底物生产的 D-乳酸(乳酸钠, 25.9 g/L)进行提纯,乳酸回收率和纯度分别达到了 80.4%和 91.8%。

近年来,人们研究了各种离子交换树脂(如 Amberlite IRA-420、IRA-400 和 IRA-92)对乳酸的回收和纯化;其中, Amberlite IRA-92 与其他树脂相比,其回收率高,产品纯度高,生产能力强。也有报道说,随着流速和样品体积的减小,得率和纯度会提高,而乳酸的产率会降低^[87, 88]。Johnson^[89]合成并测试了纳米树脂(10 nm),其具有较大的比表面积和完全开放的树脂基体,具有高吸附容量、快速平衡的等特点,有望应用于更多的分离工业中。

1.3.4 膜分离法

膜分离是以能量差为推动力,利用膜的选择性,限制了某一或某些组分从一相到另一相的转移,从而实现分离的纯化方法。常见的膜有微滤膜、超滤膜、纳滤膜、反渗透

膜以及电渗透析膜^[66, 75]。

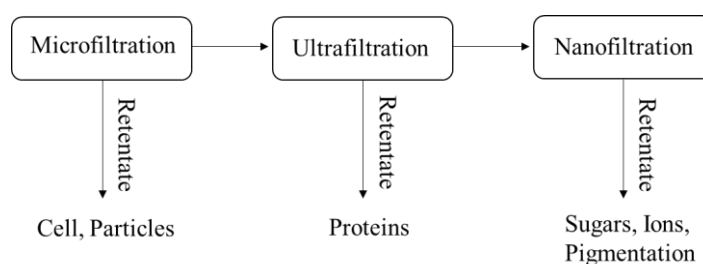


图 1.6 微滤、超滤、纳滤的用途

Fig. 1.6 Applications of microfiltration, ultrafiltration and nanofiltration

微滤膜的孔径通常为 0.1-0.2 μm ，而超滤膜平均孔径为 3-100 nm^[66]。微滤和超滤膜主要用于分离微生物细胞和大分子蛋白质，以进行后续回收利用，确保高细胞浓度和高生产率^[90, 91]。而在提纯乳酸方面，Oonkhanond 等人^[92]利用纳滤膜对以蔗渣为底物生产的乳酸进行纯化，发现使用具有低通量膜的纳滤，可以更有效地从发酵液中分离出乳酸，且葡萄糖的截留率约为 93.28%，最终乳酸纯度达到了 80% (v/v) 以上。北京化工大学的王博轩^[93]也利用膜工艺法对以玉米秸秆为底物发酵生产的 L-乳酸发酵液进行纯化，最终获得的纤维素 L-乳酸纯度达到 85%。Alexandri 等^[94]也认为纳滤对糖、蛋白质和金属离子的截留率高，可使乳酸的纯度提高 10% 以上，即使是在复杂的发酵液中，过滤也可以作为乳酸的主要分离步骤。Pal^[95]开发了一种配备了微滤和纳滤膜混合反应器系统，在工艺整合后，乳酸的浓度高达 250 g/L、生产率为 12.4 g/L/h、乳酸纯度达到 95%。

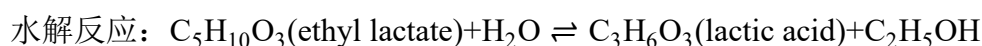
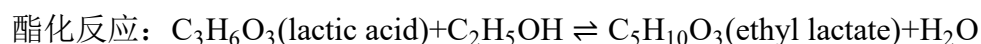
电渗析分离技术 (Electrodialysis, ED) 是以电化学的基本理论为基础的，它利用电势使原料相的离子通过离子交换膜 (Ion exchange membranes, IEMs)。在 ED 纯化工艺中主要利用三个处理流^[96]：(1) 稀释流 (去除离子)；(2) 浓缩流 (吸收稀释流损失的离子)；(3) 电解质溶液 (传导电流并保护电极)。常见的 ED 有单极膜电渗析 (Electrodialysis with monopolar membranes, EDMM) 和双极膜电渗析 (Electrodialysis with bipolar membranes, EDBM)^[66, 97]；不同于 EDMM，EDBM 的 H^+ 是通过电解水获得的。由于 ED 可以在不影响发酵液 pH 值的情况下从发酵液中连续提取乳酸，因此被认为是最有前途的分离技术之一^[98]；而 EDBM 能够有效地将乳酸盐转化为乳酸和金属氢氧化物，是一种理想的乳酸分离方法^[66]。Li 等^[99]采用三室 EDBM 从发酵液中分离 L-乳酸，在最佳条件下乳酸钠的转化率达到 81.22%。Wang 等^[100]在采用发酵法生产乳酸的同时，原位结合 EDBM，在最佳条件下，可以回收 86.05% 的乳酸。多孔膜电渗析 (Electrodialysis with porous membrane, EDPM) 是近年来发展起来的一种膜分离技术，它将一个或多个多孔滤膜堆积在一个电渗析池中；结合了 ED、多孔滤膜和电泳的优良性能，是一种很有前途的生物活性成分分离、纯化、浓缩技术；有许多研究试图优化 EDPM 工艺的性质

能,但它仍然存在一些局限性,如单台分离设备生产率低,膜污染,以及在高分子量组分分离方面的应用较少^[101]。

1.3.5 酯化法

(1) 酯化水解 (Esterification hydrolysis)

酯化水解法又称反应精馏法,其基本原理是:在酸催化剂作用下,乳酸可以与低级醇生产乳酸酯,然后水解得到精制的乳酸^[102]。有甲醇、乙醇、异丙醇、丁醇等应用于乳酸的酯化,但醇的碳原子数越大,其对应的乳酸沸点就越高(如乳酸乙酯沸点为 154 °C,乳酸丁酯沸点为 188 °C),导致分离能耗越大^[103]。此外,此方法还可以有效地分离乳酸发酵液中含有少量其他的有机酸,如乙酸等,而这些有机酸常规方法难以分离^[97]。相比于传统工艺,此方法具有低成本、低催化剂、低副产物、高转化率、高选择性等优势;是一种具有高收率和高纯度的乳酸分离技术^[104]。采用酯化水解法进行乳酸纯化主要包括在酸催化剂催化下的酯化和水解两个可逆反应,其方程式如下(以乙醇为例)^[105, 106]:



Kim 等人^[107]从乳酸酯化反应的瞬时速率出发,分析了间歇反应精馏的动态行为。他们观察到,在操作过程中,通过改变甲醇循环流和加料方式来控制沸腾速率和停留时间,反应速率增加。通过对间歇式和半间歇式工艺的比较发现,连续加甲醇(酯化过程中)可以提高乳酸的回收率。Komesu 等^[105]研究了乳酸-乙醇反应系统,水解得到的乳酸浓度约为 347.68 g/L,是初始乳酸浓度的 2.93 倍。Sun 等^[108]将发酵生产的乳酸铵,在催化剂的存在下,与丁醇反应 6 h 生成乳酸丁酯(酯化率为 87.7%),经水解获得纯度为 90% 的乳酸。

(2) 酯化-渗透蒸发耦合 (Esterification – pervaporation)

乳酸的酯化反应为可逆反应,因此在反应过程中产生的水会抑制反应平衡的正向移动,限制酯的产率。为了解决这个问题,有研究人员提出通过渗透蒸发技术与酯化反应的耦合,可以及时将酯化反应体系中的水分。通过膜去除,打破酯化反应平衡,使反应不断向乳酸酯生成方向移动,提高平衡转化率^[102]。Mai 等^[109]将渗透蒸发脱水工艺应用于乙醇与乳酸的酯化反应,以提高酯化收率,高达 95% 的水被分离出来,乳酸转化率为 0.93。Khunnonkwao 等^[110]通过蒸汽渗透辅助酯化反应 (Steam osmosis-assisted esterification) 将发酵液中的乳酸和乙醇彻底转化为乳酸乙酯,乙醇/乳酸乙酯混合物经高效分馏系统分离,水解后得到高纯度的 L-乳酸,回收率大于 95%。

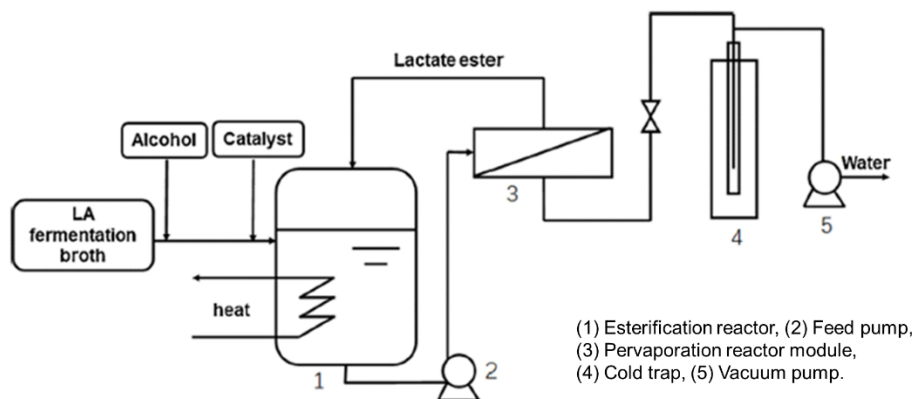


图 1.7 酯化-渗透蒸发耦合工艺示意图^[102]

Fig. 1.7 Esterification - pervaporation process diagram^[102]

1.3.6 分子蒸馏法

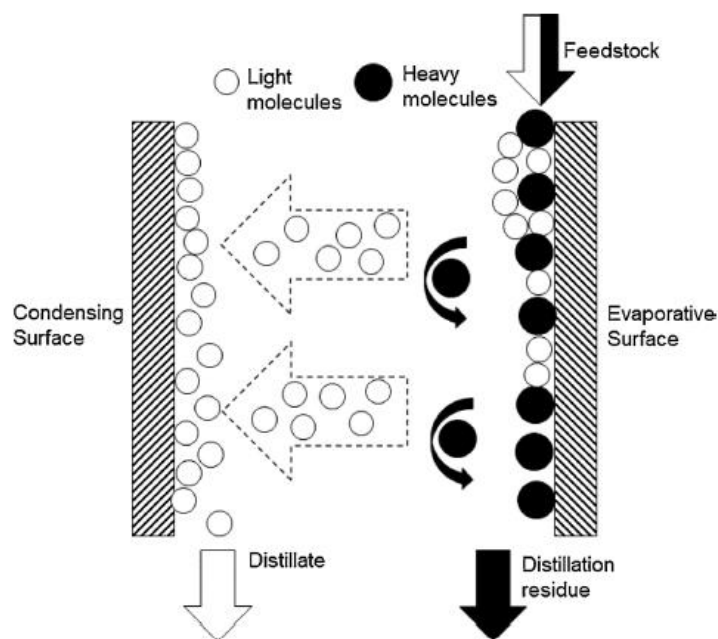


图 1.8 分子蒸馏工艺示意图^[102]

Fig. 1.8 . Schematic Diagram for molecular distillation^[102]

分子精馏法 (Molecular distillation) 也叫短程蒸馏, 是一种新兴分离技术。与传统蒸馏不同, 分子精馏是在高真空度和较低温度下进行的, 其蒸发器与冷凝器之间的距离一般为 0.01-0.2 m^[66, 111]。因为分子精馏的操作温度远低于乳酸的沸点, 避免了温度高、加热时间长使乳酸形成二聚体等副产物, 因此所得的乳酸具有较高的纯度和耐热性^[66, 112]。Yu 等^[113]发现在最佳条件下, 仅需一次分子精馏乳酸纯度和得率可分别达 92.39%和

74.09%；进行多道精馏工艺乳酸纯度可达到 95.6%。Chen 等^[114]将溶剂萃取步骤引入分子精馏过程,探讨萃取步骤对短程精馏性能的影响。新工艺的 LA 纯度和收率分别为 91.6% 和 61.73%，比现有工艺提高了约 20.43%。通过多次精馏，可使产率提高到 74.63%。

文献报道了许多乳酸分离纯化技术，但仍存在一些缺陷，限制了这些技术在工业化水平上的应用。表 1.2 中总结了几种乳酸分离纯化方法的优、缺点。

表 1.2 乳酸分离纯化方法的优、缺点^[66, 75, 82]

Table 1.2 Advantages and disadvantages of separation processes for lactic acid recovery^[66, 75, 82]

纯化方法	优点	缺点
沉淀法	操作简单；技术成熟	硫酸使用量大；乳酸纯度低
溶剂萃取法	无石膏产生；操作简单且可连续操作	萃取剂的毒性；传统的萃取剂的分布系数不利萃取；产品的纯度不高
吸附与离子交换法	成本低；环境污染小；容易再生	吸附能力有限；树脂再生需要大量的化学试剂
膜分离法	低能耗；无化学溶剂，环境友好型；产品纯度高；	膜成本高；膜污染；两极分化；生产规模难以放大
酯化法	低成本；产品纯度高	能耗成本高；受反应平衡限制
分子蒸馏法	产品纯度高	设备成本高；能耗成本高

1.4 丙交酯概述

1.4.1 丙交酯的结构与性质

丙交酯 ($C_6H_8O_4$, lactide) 是乳酸的环二聚体，是合成 PLA 的重要前体。乳酸本身含有一个手性中心，从而产生三种构型的丙交酯：L-丙交酯（工业上最常用）、D-丙交酯和内消旋丙交酯（图 1.9）^[115, 116]。通常，L-丙交酯和 D-丙交酯是一对对应异构体，具有相同理化性质，如熔点和溶解度^[117]。内消旋丙交酯 (meso-lactide) 是具有两个相反的旋光活性碳原子的纯化合物，其熔点较低 (52 °C)。而 D,L-丙交酯是一种外消旋丙交酯 (rac-lactide)，由等质量的 L-丙交酯和 D-丙交酯混合而成，其熔点较高 (25 °C)，且没有旋光性^[115, 117]。

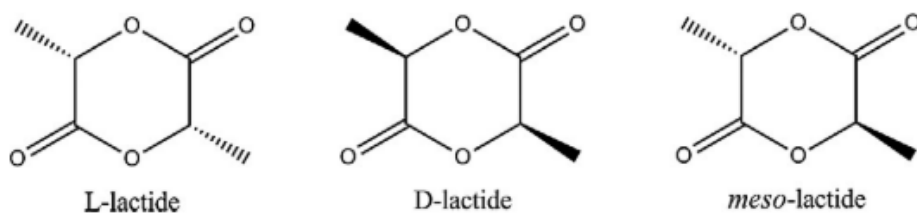


图 1.9 丙交酯的立体异构体：L-丙交酯、D-丙交酯和内消旋丙交酯

Fig. 1.9 Stereoisomers of lactide: L-lactide, D-lactide, and meso-lactide

1.4.2 丙交酯的合成

工业 PLA 的生产有三种不同的方法（图 1.10）：（1）直接缩聚；（2）在共沸溶液中缩聚；（3）通过丙交酯聚合^[118, 119]。

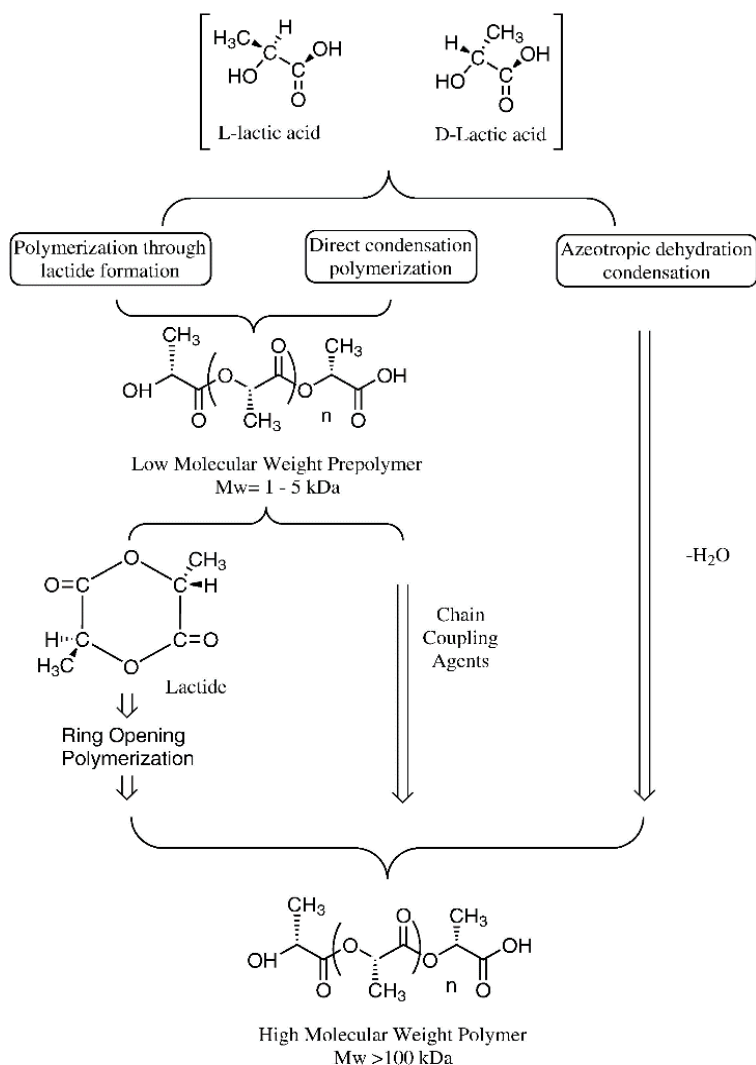


图 1.10 高分子量 PLA 的生产工艺^[119]

Fig. 1.10 The manufacturing processes to produce high molecular weight PLA^[119]

在这三种方法中,丙交酯开环聚合是最可行的合成方法,可以得到光学和晶体纯度可控的高分子量 PLA^[120]。因此,几乎所有工业生产的 PLAs 都是通过使用丙交酯作为中间体开环聚合的方法生产的,该方法于 2001 年由 NatureWorks 首次实现商业化^[121]。

乳酸低聚物(预聚体)的分子量是合成丙交酯的重要因素之一。预聚体越短,其粘度越低,导致解聚过程的传热更快,丙交酯从预聚体的转移也更快。一方面,低压和高温对于第一阶段的高效脱水是必要的,对于第二阶段的快速反应和丙交酯的回收也是必要的;这也限制了预聚体在易引起外消旋的条件下的时间,避免过高的温度引起消旋作用(racemization),导致内消旋丙交酯的产生^[116]。两步反应可以连续进行,也可以间断进行。

由于传统的两步法合成丙交酯(先缩聚成乳酸低聚物,后解聚生成丙交酯)是在高温下进行的,因此需要消耗大量的能量。同时,由于消旋作用,导致合成的丙交酯光学纯度较低^[122, 123]。为了克服这个问题,众多研究小组已经开发出了不同类型的催化剂,这些催化剂能够一步合成具有高光学纯度的丙交酯^[122, 124]。Heo 等^[125]提出了采用气相一步法合成丙交酯的概念工艺设计,并与传统的两步法(缩聚、解聚)合成丙交酯工艺进行了比较。发现与两步法相比,一步法在经济性和可持续性方面具有更大的优势。同时,一步法工艺对操作变量的变化比传统工艺更敏感。Ghadamyari 等^[126]以碳酸铯(Cs_2CO_3)为催化剂,在没有外消旋的情况下一步合成高选择性和高产率(99%)的 L-丙交酯。Park 等^[127]通过在填充床反应器中使用廉价的 $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ 催化剂,开发了一种经济有效的一步合成丙交酯的方法,获得了 90%的乳酸转化率和 99%的丙交酯立体选择性。

1.4.3 丙交酯的纯化

在丙交酯合成的过程中,由于一些挥发性物质,如乳酸及其二聚体与丙交酯同时被蒸馏出来,这非常不利于 PLA 的合成,因此对丙交酯的纯化是非常必要的,通常丙交酯中容许乳酸和水含量应分别不超过 10^{-6} mol/g 和 100 ppm^[128, 129]。

在众多的提纯丙交酯的方法中,重结晶法是最常用的纯化方法。利用丙交酯的溶解性将其溶解在溶剂中,然后放置在低温条件下冷却结晶。多次重复操作后,将晶体真空干燥即可获得高纯度的丙交酯。Zhou^[129]采用水浴和二次重结晶法提纯 L-丙交酯,获得了纯度为 100%、收率为 40.6% (比单一重结晶法提高了 12.1%) 的 L-丙交酯。

用简单的真空蒸馏法可以去除脂肪醇和烷基乳酸盐。然而,这种方法不可能去除二聚体和内消旋丙交酯。气助蒸发法是将含有杂质的丙交酯装入汽提装置中,在一定的温度和压力下,使丙交酯呈熔融状态,并与汽提装置中的惰性物质充分接触,然后从汽提装置中排除气体,并从气流中回收高纯度的丙交酯^[128]。Konoplev 等^[128]采用分步熔融法提纯丙交酯,最终乳酸的含量不高于 10^{-6} mol/kg、水分含量不高于 100 ppm、光学纯度不低于 97.5%、得率为 50%。Wang^[130]探索了用高沸点醇固定挥发性杂质制备高纯度丙交酯的新方法,丙交酯纯度和收率最高分别可以达到 99%和 93%。

水解法是一种去除内消旋丙交酯、获得高旋光纯度的 L-/D-丙交酯的提纯方法^[131]。

1.4.4 丙交酯的应用

由于化石燃料的持续短缺和石油基塑料造成的“白色污染”，寻求石油化工基聚合物的替代品越来越受到重视。而 PLA 由于具有良好的机械强度、生物可降解性（100% 可降解）和生物相容性越来越受到人们的关注^[115, 131]。丙交酯不仅可以用于可降解的高分子材料 PLA 的合成，还可以用于医用生物材料聚乙丙交酯（PGLA）的合成以及用于控制体内药物的释放的 PEG-PLA 共聚物的合成^[132, 133]。

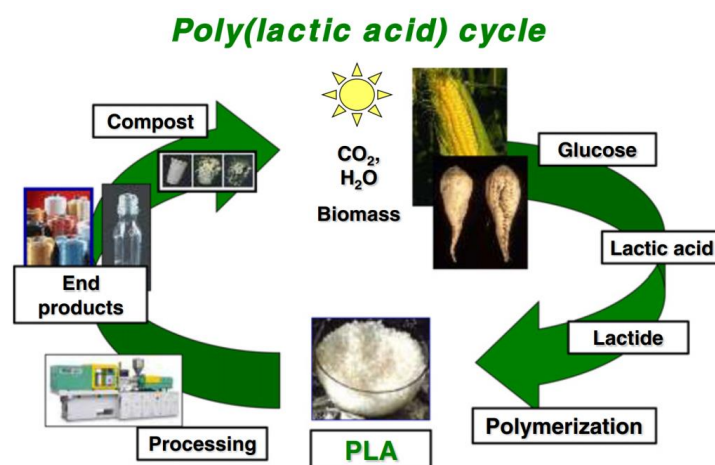


图 1.11 PLA 的生命循环示意图^[134]

Fig. 1.11 The Life cycle of PLA^[134]

1.5 本文的立题依据及主要研究内容

近年来，随着人们生态环境保护意识的提高以及国家相关政策的出台，以 PLA 为代表的生物可降解材料越来越受到人们的关注，利用农业废弃物等可再生的生物质资源生产生物基产品契合当下绿色低碳的发展理念和时代要求。

兼具丰富性、经济性和可再生性的木质纤维素作为一种有吸引力的乳酸生产原料^[39]，其在进行干酸预处理后产生了大量的可发酵性单糖。全糖的高效、完全转化是利用微生物生产乳酸的重点问题之一；同时，预处理产生的抑制物（糠醛、HMF 等）会严重影响发酵菌株的生长和乳酸生产，残留抑制物使得聚合级 L-乳酸纯化十分困难。在之前的工作中，我们成功筛选出了能够终极降解抑制物的脱毒菌株：*A. resinae* ZN1^[22]、*P. variotii* FN89^[23]，以及能够实现全糖代谢利用的 L-乳酸生产菌株 *P.acidilactici* ZY271^[5]。这使得纤维素 L-乳酸分离纯化的难度大大降低，使获得聚合级的 L-乳酸成为可能。因此，本研究采用了极低废水排放、低能耗的干酸预处理方法，保留了大量的可发酵单糖^[10]；以 *P. variotii* FN89 为生物降解菌株终极降解预处理后小麦秸秆中影响菌体生长和发酵的抑制物^[23]；并通过具有高效全糖代谢能力的 *P.acidilactici* ZY271 生产纤维素 L-乳酸^[45]，最后

通过一系列常规、易操作的纯化手段获得精制的纤维素 L-乳酸，并成功合成了 L-丙交酯。具体工作开展如下：

(1) 利用纤维素 L-乳酸高产菌株 *P.acidilactici* ZY271，以小麦秸秆为碳源进行 SSCF 生产纤维素 L-乳酸，通过离心、脱色、结晶、洗晶、酸解、精制等步骤对基于干法生物炼制技术生产的 L-乳酸进行分离纯化，最终获得了精制的纤维素 L-乳酸。

(2) 利用纯化后的纤维素 L-乳酸合成聚乳酸前体 L-丙交酯，并对木质纤维素来源的 L-丙交酯通过 NMR、FT-IR 等方法进行分析表征，同时与 L-丙交酯标准品进行对比。

(3) 考虑到纤维素 L-乳酸纯化工艺中浓硫酸酸解时会产生大量的石膏废弃物，因此我们尝试对 L-乳酸生产菌株 *P.acidilactici* ZY271 进行低 pH 环境下的适应性进化，增强其酸耐受性，以期在乳酸发酵过程中能够减少 pH 中和剂的使用，从而降低后期纯化工序的成本。

第 2 章 纤维素 L-乳酸的分离纯化及 L-丙交酯的合成

2.1 引言

使用具有碳抵消、碳中和性质的可持续性聚合材料，有助于保护自然资源和全球环境，因此以生物质为原料的可再生高分子材料的开发，已引起学者们的普遍关注；同时，众多学者认为生物基聚合物这一新型聚合材料可以替代由化石资源合成的常规聚合材料^[119, 136, 137]。

PLA 作为一种典型的高分子材料，由于具有 100%的可降解性、较高的机械强度、良好的热塑性以及无毒等特点，被视为最有潜力替代石油衍生聚合物的环境友好型材料，已广泛用于包装材料、生物医用材料等领域^[137, 138]。合成高分子量的 PLA 主要通过两步法实现：首先将手性乳酸缩聚成低聚物，再解聚获得丙交酯；然后以丙交酯作为聚合单体合成高分子量的 PLA。其中，丙交酯是合成 PLA 的关键步骤。然而，目前丙交酯主要是利用淀粉类原料发酵生产的手性乳酸合成，随着生物可降解材料的需求量逐渐增大，其生产成本和未来发展空间具有潜在的障碍。

木质纤维素具有丰富性、经济性和可再生性等特点，是一种重要的手性乳酸生产原料。但以木质纤维素为原料生产的纤维素 L-乳酸合成 L-丙交酯主要存在以下阻碍：（1）木质纤维素原料预处理后产生的抑制物会严重影响发酵菌株的生长和乳酸生产，残留抑制物使得聚合级 L-乳酸纯化十分困难；（2）纤维素 L-乳酸发酵菌株对于木质纤维素中占总单糖的 40%的非葡萄糖单糖（木糖等）利用率低下，不仅导致纤维素乳酸产量和得率较低，而且残留的单糖严重影响后期聚合级乳酸的分离与纯化。以上两个关键障碍使得以木质纤维素生物质为底物合成的纤维素 L-乳酸难以作为 L-丙交酯合成的原料。

经过对木质纤维素干法生物炼制技术的长期研究，已经基本克服了预处理、脱毒、糖化与发酵等工艺过程的主要技术障碍。在本研究中，我们采用了具备极低废水排放、低能耗特点的干酸预处理方法，保留了大量可发酵单糖^[10]；采取的固态生物脱毒方法对木质纤维素原料中影响乳酸发酵的抑制物进行了终极降解^[22, 23]；通过工程改造获得的 L-乳酸发酵菌株 *P. acidilactici* ZY271 实现了全糖高效、同步转化，其以木质纤维素为碳源进行 SSCF 可以实现全糖的同步、高效转化^[45]，使得高浓度的纤维素 L-乳酸发酵液纯化至聚合级纯度的难度大大降低，实现了利用干法炼制生物技术生产的纤维素 L-乳酸合成 L-丙交酯的目标。

2.2 材料与方法

2.2.1 菌株、培养基及培养方法

本章所使用的 L-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZY271 保藏在中国普通微生物菌种保藏中心（CGMCC），注册编号为 13611。用于生物脱毒的菌株 *P. variotii* FN89 也保藏在

CGMCC, 注册编号为 17665。

本章实验中所涉及的培养基如下:

(1) 简化 MRS 培养基: 20 g/L 葡萄糖, 10 g/L 蛋白胨, 10 g/L 酵母提取物, 5 g/L 无水乙酸钠, 2 g/L 磷酸氢二钾, 0.58 g/L 七水合硫酸镁, 2 g/L 柠檬酸氢二铵, 0.25 g/L 一水合硫酸锰。

(2) PDA 培养基: 称量削皮、切片后的马铃薯 200 g 至 1 L 沸水中煮 30 min, 8 层纱布过滤后将上清液定容至 1 L; 最后加入 20 g 葡萄糖、15 g 琼脂粉。

P. acidilactici ZY271 利用 MRS 培养基, 在 42 °C、150 rpm 条件下进行活化和种子培养。*P. variotii* FN89 利用 PDA 培养基在 37 °C 下培养。

2.2.2 木质纤维素原料、酶与试剂

本实验是以于 2019 年收割于河南南阳的小麦秸秆为原料。将小麦秸秆水洗、晾干、粉碎后备用。

纤维素酶 Cellic CTec 2.0 购自诺维信(中国)生物技术有限公司, 通过 NREL 的方法, 测得滤纸酶活为 203.2 FPU/mL; 酶活为 103,900 WU/mL 的糖化酶 GA-L-NEW 购自杰能科(中国)。

阳离子交换树脂 Amberlite IRA-120 (氢型, 一种含有磺酸基团的苯乙烯系凝胶型树脂) 购自 Sigma-Aldrich (美国); 活性炭(200 目) 购自 General-Greagent (中国上海); L-丙交酯标准品(纯度为 98%) 购自麦克林(中国上海); 辛酸亚锡($\text{Sn}(\text{Oct})_2$, 纯度 95%) 来自阿达玛斯(中国上海)。

2.2.3 干法生物炼制技术生产纤维素 L-乳酸

(1) 预处理

按照 Zhang 等^[10]的研究方法对麦秆进行干式稀酸预处理。首先, 将粉碎后的麦秆与稀硫酸按照 2:1 的固液比依次加入到预处理反应器中, 在 50 rpm 的转速下搅拌 3 min 使其充分混合。然后, 向反应器中通入蒸汽, 使反应温度在 5 min 内升至 175 °C, 并维持 5 min。最后, 排出反应器中的蒸汽, 卸出物料。

(2) 生物脱毒

首先, 通过 20% $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 将预处理后的小麦秸秆 pH 调至 5.5, 然后将在 PDA 培养基中培养好的 *P. variotii* FN89 按 10% (w/w) 的接种量接入到物料中, 并搅拌均匀; 最后, 将混匀后的物料加入到带有螺带浆的生物脱毒反应器中, 在通气量 1 vvm、37 °C 条件下进行抑制物的脱除, 每 12 h 搅拌 1 min, 并利用 HPLC 监测, 直至糠醛和 HMF 完全脱除。

(3) 种子液的培养

将保存在 60% (w/w) 甘油中的 2 mL *P. acidilactici* ZY271 菌液接入到 20 mL 的简化 MRS 培养基中, 在 42 °C、150 rpm 的条件下培养 12 h; 然后将其全部转接到 200 mL

新鲜的简化 MRS 培养基中, 在同样的条件下培养 5 h。在上述的 *P. acidilactici* ZY271 的培养过程中需要向培养基中加入 1% (v/v) 糖化酶以防止菌体絮凝^[139]。

(4) 糖化与发酵

木质纤维素原料的糖化和 L-乳酸的生产是在 5 L 装有螺带式搅拌桨的生物反应器 (上海保兴) 中进行的^[140]。首先, 将进行过固态生物脱毒的麦秆分批地加入装有一定量水的发酵罐中预糖化 6 h, 糖化温度为 50 °C, 搅拌转速为 150 rpm, 纤维素酶 Cellic CTec 2.0 的添加量为 10 FPU/g DM。之后, 向发酵罐中加入一定质量的营养物质^[141]以及培养好的种子液。在 42 °C、150 rpm 的条件下进行 SSCF, 在发酵的过程中利用 25% Ca(OH)₂ (w/w) 将发酵 pH 维持在 5.5。

2.2.4 纤维素 L-乳酸的分离纯化

(1) 固液分离

在经过 96 h 的 SSCF 后, 我们得到的 L-乳酸是以乳酸钙的形式存在的。首先, 通过超高速离心机 (J-26, Beckman, USA) 在 10,000 rpm 的转速下离心 10 min, 将 L-乳酸钙发酵醪中的生物质残渣和大部分菌体去除。之后, 将得到的 L-乳酸钙发酵液利用高压灭菌锅灭菌 (115 °C, 20 min), 常温条件下保存, 备用。

(2) 脱色

在固液分离后, 我们进行了脱色条件的探究。首先, 我们将离心后得到的 L-乳酸钙发酵液利用紫外分光光度计 (Biomate-3S, Thermo Scientific, USA) 进行全波长扫描 (190-900 nm) 确定 L-乳酸钙发酵液的最大吸收峰的波长, 以此波长下的吸光值为 L-乳酸钙发酵液的色度, 并根据公式(2-1)进行脱色率计算^[94]。

$$\text{脱色率} = \left(1 - \frac{A_F}{A_0}\right) \times 100\% \quad (2-1)$$

式中, A_F 代表脱色后的 L-乳酸钙发酵液的吸光度值, A_0 表示脱色前 L-乳酸钙发酵液的吸光度值。

在确定了纤维素 L-乳酸发酵液的最大吸收峰波长后, 我们进行了脱色条件的探究。向 100 mL 的摇瓶中移入 30 mL 的 L-乳酸钙发酵液, 并添加一定质量的活性炭, 然后置于水浴摇床中, 在一定的温度下进行一段时间间隔的脱色处理。脱色后, 通过布氏漏斗进行抽滤, 将脱色后的 L-乳酸钙与活性炭分离后, 将稀释了一定的倍数的发酵液在最大吸收波长下测定吸光度值, 并依据公式(2-1)计算脱色率。

在确定了最佳脱色条件后, 我们在最佳条件下对发酵液进行了脱色处理。为了最大限度地回收纤维素 L-乳酸, 在通过布氏漏斗抽滤将活性炭与 L-乳酸钙发酵液分离时, 我们用 0.5 倍发酵液体积的超纯水淋洗活性炭, 将残留在活性炭上的纤维素 L-乳酸尽可能多的淋洗下来。

(3) 结晶、洗晶、复溶

我们将脱色后的 L-乳酸钙发酵液转移到旋蒸瓶中, 在低压、70 °C 的条件下将其浓

度浓缩至约 150 g/L 后，置于 4 °C 冰柜中结晶。

倾去烧杯中残留的结晶母液（母液备用，与脱色后、未结晶的 L-乳酸钙发酵液混合后，再进行一次结晶。），并将 L-乳酸钙晶体粉碎成小颗粒状。然后，向装有颗粒状 L-乳酸钙晶体的烧杯中加入适量的无水乙醇，减压抽滤；并通过无水乙醇淋洗被截留在布氏漏斗中的 L-乳酸钙，以最大限度地去除附着在其表面的杂质。最后，将得到的 L-乳酸钙固体在通风处晾干，以最大可能的去除残留的有机溶剂。

向洗晶后的 L-乳酸钙固体中加入少量的水，然后进行沸水浴，直至乳酸钙固体完全溶解。

（4）酸解

向加热溶解后得到乳酸钙溶液中缓慢地加入 50% 的浓硫酸，并不断地搅拌进行酸解，直至无明显的硫酸钙析出。静置 1-2 h 后，可发现烧杯底部有大量的白色沉淀，我们通过减压抽滤将上清分离出来，得到粗制的纤维素 L-乳酸。

（5）精制

为了去除纤维素 L-乳酸中含有 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Na^+ 等金属离子，我们利用 Amberlite IRA-120（氢型）树脂对其进行盐离子的脱除。树脂在使用之前，先将装载到层析柱中，并用 4 倍柱体积的超纯水以 2 mL/min 的流速冲洗，除去其本身含有的一些杂质。然后，将得到的粗纤维素 L-乳酸以 2 mL/min 的流速匀速地加入到装有 Amberlite IRA-120 的层析柱中，并收集含有乳酸的流出液，得到聚合级的纤维素 L-乳酸。

（6）纤维素 L-乳酸的回收率及纯度计算

在对基于干法生物炼制技术生产的纤维素 L-乳酸进行纯化的过程中，我们考察了乳酸在纯化过程中的回收率及其最终纯度，其计算公式分别如公式(2-2)、(2-3)所示。

$$\text{L-乳酸回收率} = \left(\frac{C_1 \times V_1}{C_0 \times V_0} \right) \times 100\% \quad (2-2)$$

式中， C_0 、 V_0 分别代表初始的纤维素 L-乳酸的浓度和体积； C_1 、 V_1 分别表示进行某一步骤的纯化后，纤维素 L-乳酸的浓度和体积。

$$\text{L-乳酸纯度} = \left(\frac{C_L \times V}{(C_S + C_P + C_T + C_A + C_M + C_L) \times V} \right) \times 100\% \quad (2-3)$$

式中， C_S 、 C_P 、 C_T 、 C_A 、 C_M 、 C_L 分别代表提纯后的 L-乳酸发酵液中糖类（葡萄糖+木糖）、蛋白质、总酚、乙酸、金属离子、L-乳酸的浓度； V 表示提纯后的 L-乳酸发酵液的体积。（水不计入杂质。）

2.2.5 纤维素 L-乳酸分离纯化中主要杂质的检测方法

（1）L-乳酸、乙酸及单糖的检测

L-乳酸、乙酸、葡萄糖、木糖是通过 HPLC（岛津，日本）测定^[142]。

（2）总酚的测定方法

根据 Gu 等^[143]采用的福林酚试剂法测定总酚的含量，并进行了优化：将 500 μL 的样品和 1 mL 的 15% (v/v) 福林酚试剂加入 10 mL 试管中并充分混匀，然后加入 4 mL

的 0.7 M Na_2CO_3 。将装有样品的试管在室温下反应 2 h，然后在 765 nm 下测定吸光度值。每个样品均重复检测两次，根据没食子酸的校准曲线确定酚类化合物的浓度。

(3) 蛋白质含量的测定方法

在分离纯化的过程中，按照李充壁^[144]所述的考马斯亮蓝法测定纤维素 L-乳酸发酵液中蛋白质的含量。每个样品均重复检测两次，根据 BSA 的校准曲线确定蛋白质的浓度。

(4) 金属离子的测定方法

在分离纯化的各个步骤中，纤维素 L-乳酸中金属离子(Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^+ 、 Pb^+)的含量是根据韩昞身^[145]的方法，通过等离子体发射光谱仪(Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometer, 167nm-785nm/725, Agilent, USA)检测的。

2.2.6 L-丙交酯的合成^[131, 146]

首先，通过旋转蒸发器对纯化后的纤维素 L-乳酸进行浓缩，直至其呈微黄色。接着，将浓缩后的纤维素 L-乳酸转移到 250 mL 的反应釜（三口圆底烧瓶）中（安装在接有磁力搅拌装置的油浴锅中，并接有分水器、冷凝管和接收瓶），并减压至 0.005 MPa，在 80 °C 的条件下进行脱水处理，持续 0.5-1.0 h。

然后，将反应釜的压力恢复至常压，并向反应体系中加入纤维素 L-乳酸质量 3% 的催化剂（辛酸亚锡），打开磁力搅拌系统，将辛酸亚锡与纤维素 L-乳酸充分混合；缓慢升温至 150 °C，并持续 1-2 h，使反应体系中水分完全蒸发，此时反应体系呈深褐色（乳酸酯化，生成乳酸预聚物）。

上述步骤结束后，更换接收瓶、将压力减至 0.098 MPa，并迅速升温至 240-260 °C，直至无明显馏出物为止，蒸出的淡黄色液体经冷却后结晶（L-丙交酯），利用超纯水冲洗接收瓶以及冷凝管，通过布氏漏斗抽滤得到粗 L-丙交酯。

将粗 L-丙交酯转移到装有少量无水乙醇的烧杯中，40 °C 水浴锅中边搅拌边加热直到基本溶解，放置在 4 °C 冰箱中一段时间后，L-丙交酯重新结晶析出，按上述步骤重复两次后，得到白色针状的晶体；然后将其放置在真空冷冻干燥机（CoolSafe Pro 55-9, LaboGene, Danmark）中干燥 12 h 后，得到精制的 L-丙交酯。

2.2.7 L-丙交酯的分析表征

(1) 熔点测定

根据西北工业大学祖恩峰^[131]所述的方法，通过差示扫描量热仪（DSC8500, Perkinelmer, USA）分别测定本研究合成的木质纤维素来源的 L-丙交酯和 L-丙交酯标品的熔点。

(2) 红外吸收光谱（FT-IR）测定

以 KBr 压片法用傅里叶变换红外光谱仪（6700, Nicolet, USA）对木质纤维素来源的 L-丙交酯和 L-丙交酯标品在 399cm^{-1} - 3999cm^{-1} 下测定其各官能团，对其结构进行表

征。

(3) 核磁共振氢谱 ($^1\text{H NMR}$) 表征

通过核磁共振仪 (Ascend 600, Bruker, Germany) 继续表征本研究合成的 L-丙交酯和 L-丙交酯标品的结构 (以氘代氯仿为溶剂, 共振频率 600 Hz, 扫描次数 64 次)。

(4) 相对分子质量 (Mr) 的测定

利用 ESI-高分辨飞行时间质谱仪 (XEVO G2 TOF, Waters, USA) 对木质纤维素来源的 L-丙交酯及其标品的分子量进行测定。

(5) 元素含量分析

分别称取一定质量的本研究合成的 L-丙交酯及其标品, 利用元素分析仪 (Vario EL cube, ELEMENTAR, Germany) 分别对其 C、H 元素含量进行测定。

(6) 光学纯度 (旋光纯度) 分析

根据刘敏^[147]的方法对木质纤维素来源的 L-丙交酯的比旋光度 (autopol 1, Rudolph, USA) 进行测定。

$$X = \frac{[\alpha]_{\text{测}}}{[\alpha]_{\text{D}}^{20}} \times 100\% \quad (2-4)$$

式中, X 代表 L-丙交酯的光学纯度; $[\alpha]_{\text{测}}$ 代表测得的纤维素来源的 L-丙交酯的比旋光度; $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ 是文献^[148]报道的 L-丙交酯标准品的比旋光度, 为 -285° 。

(7) 手性纯度分析

木质纤维素来源的 L-丙交酯的手性纯度是通过手性气相色谱 (以氮气为载体, 流速为 1.4 mL/min; 检测器为 FID 检测器, 色谱柱型号为 DB-1301 (Agilent, USA), 柱温为 300°C) 测定的。

2.3 结果与讨论

2.3.1 纤维素 L-乳酸的生产

在对粉碎后的麦秆进行干酸预处理后, 物料中的主要抑制物含量分别为: 5.0 mg/g DM 糠醛、2.5 mg/g DM HMF、21.0 mg/g DM 乙酸、4.2 mg/g DM 酚类 (香草醛+丁香醛+4-羟基苯甲醛)。在利用 *P. variotii* FN89 进行脱毒后, 影响微生物生长和生产的糠醛和 HMF 完全脱除 (未检出); 残留了部分的酚类物质 (香草醛+丁香醛+4-羟基苯甲醛), 为 3.2 mg/g DM (见表 2.1)。

在经过 96 h 的 SSCF (25%固含量) 后, 我们获得了 101.4 g/L 的 L-乳酸钙, 并产生了 1.9 g/L 的乙酸盐副产物, 残留了 2.9 g/L 的葡萄糖和 3.1 g/L 的木糖。

表 2.1 生物脱毒前、后小麦秸秆中主要抑制物的含量变化

Table 2.1 Changes of main inhibitors in wheat straw before and after biodetoxification

	Furfural (mg/g DM)	HMF (mg/g DM)	Acetate (mg/g DM)	Phenolics (mg/g DM)
Before detoxification (After pretreatment)	5.0	2.5	21.0	4.2
After detoxification	0 (not detected)	0 (not detected)	0 (not detected)	3.2

2.3.2 纤维素 L-乳酸脱色条件的选择

由于木质纤维素原料中酚类物质的存在,导致以木质纤维素为碳源生产的 L-乳酸钙发酵液呈黑褐色。因此,在提纯纤维素 L-乳酸的工艺中,脱色是重要的一步。

首先,我们利用紫外分光光度计对稀释了一定倍数的纤维素 L-乳酸发酵液(发酵醪离心后)进行全波长扫描(190-900 nm,图 2.1),确定了纤维素 L-乳酸发酵液在 296 nm 波长下吸光度最大。

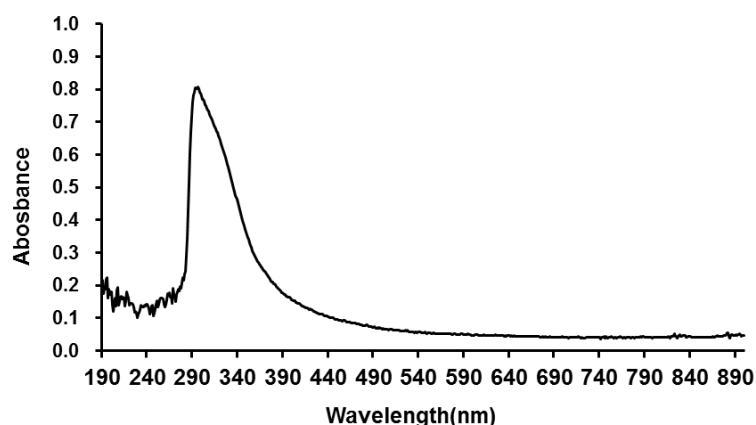


图 2.1 纤维素 L-乳酸发酵液的全波长扫描

Fig. 2.1 Full-wavelength scanning of cellulosic L-lactic acid

接着,我们对纤维素 L-乳酸发酵液脱色时的活性炭添加量(0、3、5、7、10、12% (m/v))、脱色温度(60、70、80 °C)、脱色时长(0.5、1.0、1.5 h)对脱色效果的影响进行了探究。图 2.2 显示了不同脱色条件下纤维素 L-乳酸发酵液的脱色效果,具体的脱色率见表 2.2。从表 2.2(序号 1-6)中我们可以看出:随着活性炭用量的增加,纤维素 L-乳酸发酵液的脱色率也明显提高;在添加 10%、12% (m/v) 的活性炭时,纤维素 L-乳酸发酵液的脱色率分别达到了 98.37%、98.59%。但是,考虑到多添加 2% (m/v) 的活性炭并没有明显地提高脱色率,因此,我们选择了 10% (m/v) 活性炭添加量作为后续实验的基础。从表 2.2(序号 5、7-8)中我们可以看出,脱色时长为 0.5 h 时,脱色率

为 97.39%；而脱色时长为 1.5 h 时，脱色率为 98.19%，都低于 1.0 h 的脱色率。这是因为脱色时长过短，发酵液中的色素还未充分被活性炭吸附；而当达到吸附平衡时，继续延长脱色时间，并不会吸附更多的色素，还可能会破坏吸附平衡，色素被解吸，这就对脱色率产生负面影响。根据表 2.2 序号（6、9-10）我们可以看出：纤维素 L-乳酸发酵液在 60、70、80 °C 的温度下，脱色率分别为 98.37%、97.43%、97.78%，这可能是因为随着温度的升高，纤维素 L-乳酸发酵液中含有少量的还原糖与残留的少量的氮源发生了美拉德反应，增加了色素的产生。

综上所述，我们确定了纤维素 L-乳酸发酵液脱色的最佳条件为：向 L-乳酸发酵液中加入 10% (m/v) 活性炭，在 60 °C 的恒温水浴摇床中（150 rpm）脱色 1.0 h。

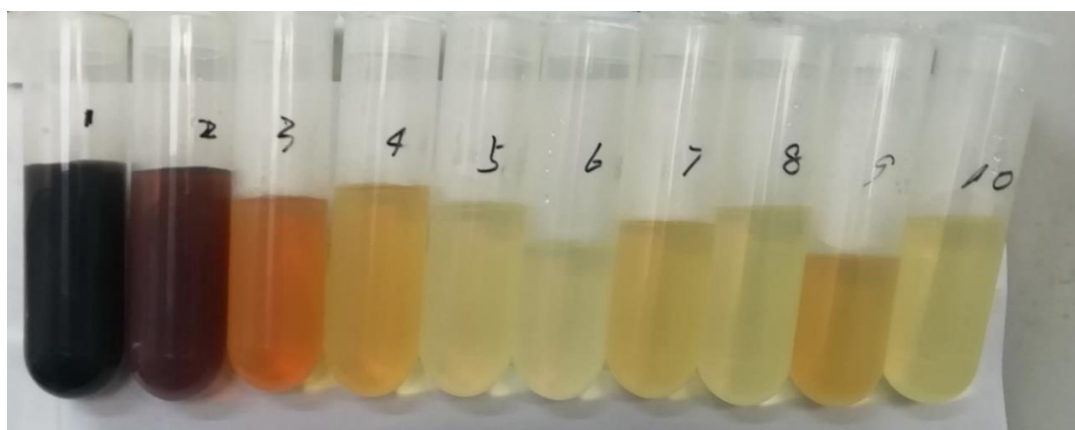


图 2.2 不同脱色条件下纤维素 L-乳酸发酵液的脱色效果

Fig. 2.2 The decolorization effect of cellulosic L-lactic acid under different conditions

表 2.2 不同脱色条件下纤维素 L-乳酸发酵液的脱色率

Table 2.2 The decolorization rate of cellulosic L-lactic acid under different conditions

Entry	Active carbon (%)	Time (h)	Temperature (°C)	Decolorization rate (%)
1	0	0	25	0
2	3	1.0	60	81.66±2.92
3	5	1.0	60	95.03±2.48
4	7	1.0	60	96.72±0.02
5	10	1.0	60	98.37±0.00
6	12	1.0	60	98.59±0.05
7	10	0.5	60	97.39±0.06
8	10	1.5	60	98.19±0.08
9	10	1.0	70	97.43±0.04
10	10	1.0	80	97.78±0.07

2.3.3 纤维素 L-乳酸的分离纯化

首先,我们通过高速离心将 SSCF 得到的 L-乳酸钙发酵醪去除木质纤维素生物质残渣,获得了乳酸钙发酵液(图 2.3(a));然后,向发酵液中加入 10% (m/v) 的活性炭粉末,在 60 °C、150 rpm 的条件下脱色 1.0 h,通过布氏漏斗进行固液分离后,利用 0.5 倍发酵液体积的超纯水淋洗活性炭,最大可能地减少纤维素 L-乳酸的损失(图 2.3(b))。在通过旋转蒸发仪对 L-乳酸钙发酵液浓缩后,置于 4 °C 冰箱中过夜结晶。将 L-乳酸钙晶体粉碎后,利用无水乙醇去除乳酸钙晶体表面的杂质(图 2.3(c))。接着,将 L-乳酸钙加热溶解后,边搅拌边加入 50% 硫酸,直至硫酸钙残渣不再析出,减压抽滤,得到粗纤维素 L-乳酸(图 2.3(d))。最后,利用阳离子交换树脂 Amberlite IRA-120 将木质纤维素原料中的钙、镁、钠、铁、铜、铅等金属离子去除得到了精制的纤维素 L-乳酸(图 2.3(e))。

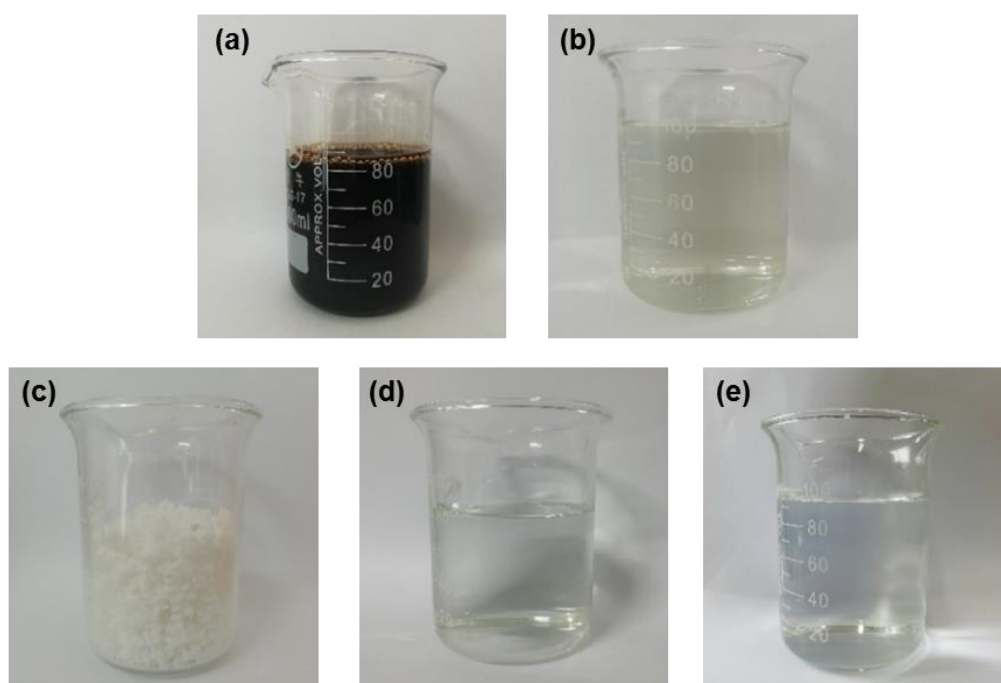


图 2.3 纤维素 L-乳酸发酵液的分离与纯化

Fig. 2.3 Separation, purification of cellulosic L-lactic acid

- (a) L-calcium lactate fermentation broth after centrifugation, (b) Fermented broth after decolorization, (c) L-calcium lactate after crystallization, (d) Crude cellulosic L-lactic acid after acidification with sulfuric acid, (e) Cellulosic L-lactic acid refined by cation exchange resin

在对纤维素 L-乳酸发酵液分离、纯化的各个步骤中,我们根据纤维素 L-乳酸发酵液的浓度和体积进行了乳酸回收率的计算(图 2.4)。从图中我们可以看出:在利用活性炭对纤维素 L-乳酸进行脱色时,L-乳酸的损失率为 3.53%。在对纤维素 L-乳酸发酵液浓缩结晶后,我们将结晶残液加入到新的、脱色过的纤维素 L-乳酸中进行回收利用,实现

二次结晶；收集两次结晶得到的乳酸钙晶体，利用无水乙醇去除晶体表面附着的杂质后，加热溶解，并计算出乳酸的回收率为 74.58%。而在后续的酸解和精制的步骤中，并没有造成纤维素 L-乳酸的大量流失，最终我们得到的纤维素 L-乳酸的回收率为 69.30%。

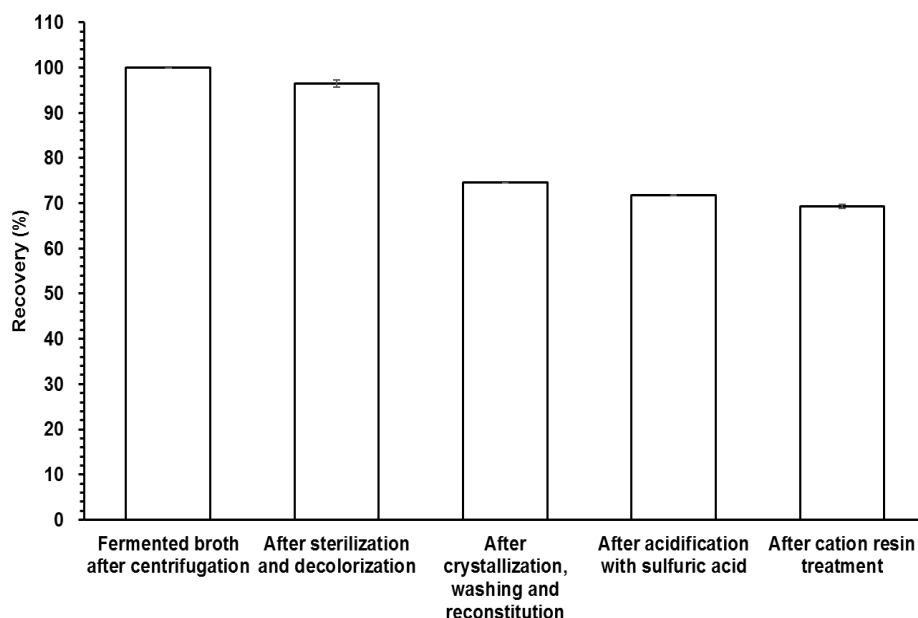
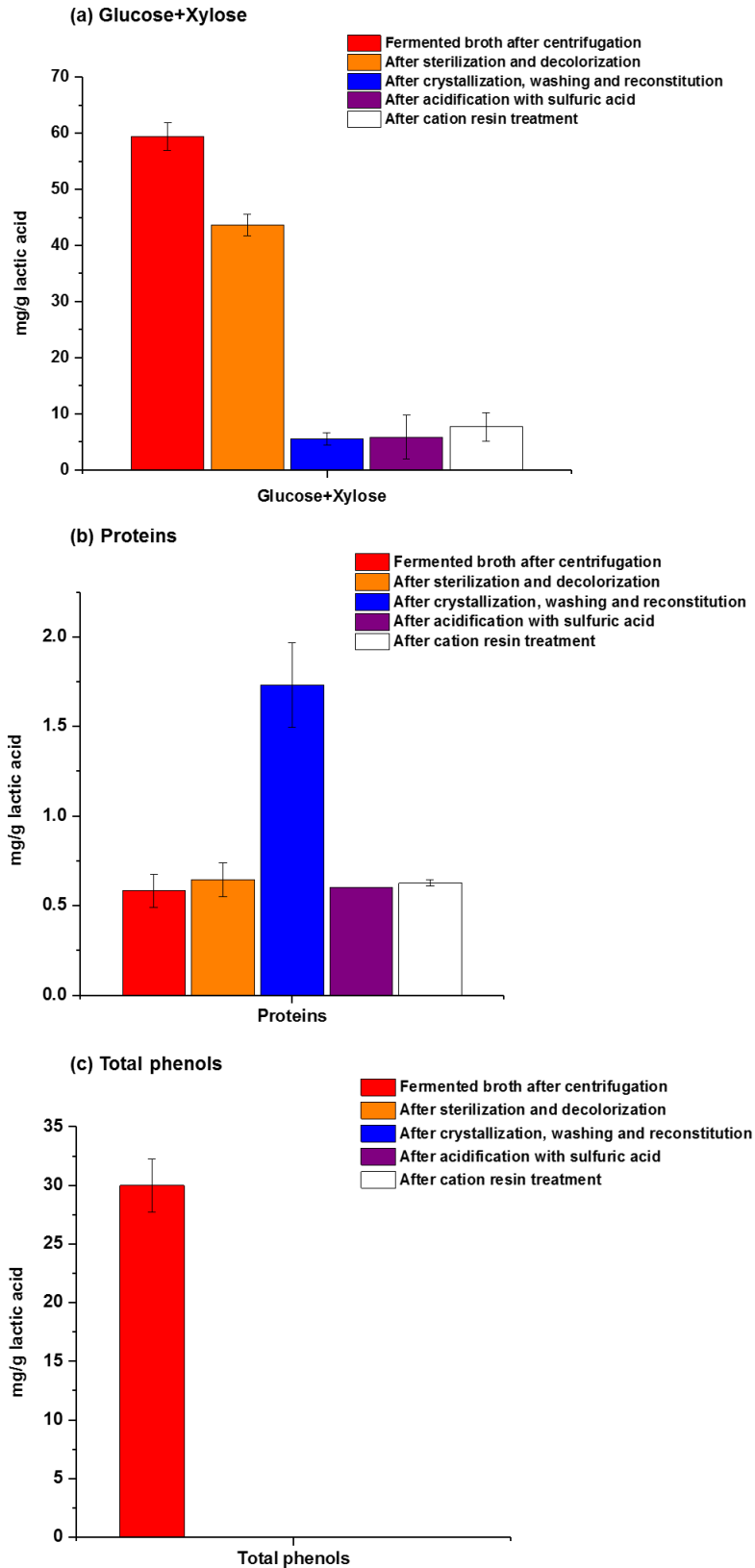


图 2.4 纤维素 L-乳酸分离纯化过程中的回收率

Fig. 2.4 Recovery rate during the separation and purification of cellulosic L-lactic acid

在提纯纤维素 L-乳酸同时，我们对每一工序处理后的 L-乳酸中糖类、蛋白质、总酚、乙酸、金属离子等杂质含量进行了测定。从图 2.5(a)中我们可以看出，在初始的 L-乳酸中含有较多的残糖，达到了 59.36 mg/g lactic acid，在经过脱色处理后残糖含量有了一定的下降，这是因为有部分残糖被吸附在了活性炭中；而在后续的结晶、洗晶、复溶这一步骤中，由于乳酸钙在低温条件下大量结晶析出，使得大部分残糖都被留在了结晶残液中；因此，在这一步骤后残糖的含量仅为 5.49 mg/g lactic acid。在后续的步骤酸解和精制的步骤中没有针对残糖脱除的工艺，因此残糖并没有明显的变化。与糖类不同的是，蛋白质在进行脱色处理后，纤维素 L-乳酸中的含量并没有明显的变化；从图 2.5(b)中我们发现，在结晶、洗晶、复溶这一步骤中蛋白质含量明显高于前面的两个步骤，为 1.73 mg/g lactic acid，这是因为虽然离心、灭菌和脱色将大部分菌体分离出来，但是仍然还有少量的菌体蛋白残留在纤维素 L-乳酸中，在浓缩、结晶时，残留的菌体蛋白黏着在乳酸钙晶体表面，而此时仍然有部分纤维素 L-乳酸未能结晶析出，也就导致了在这一步骤处理后每克纤维素 L-乳酸中含有较高的蛋白含量。而在利用浓硫酸对纤维素 L-乳酸进行酸解时，极低 pH 的环境导致菌体蛋白变性，部分絮凝的菌体蛋白在滤去硫酸钙残渣时被一同除去，也就导致了蛋白质含量的减少。在最后的离子交换时，蛋白质含量亦

没有明显的变化，这是因为我们使用的阳离子交换树脂没有去除蛋白的功能，最终蛋白质的含量为 0.63 mg/g lactic acid。



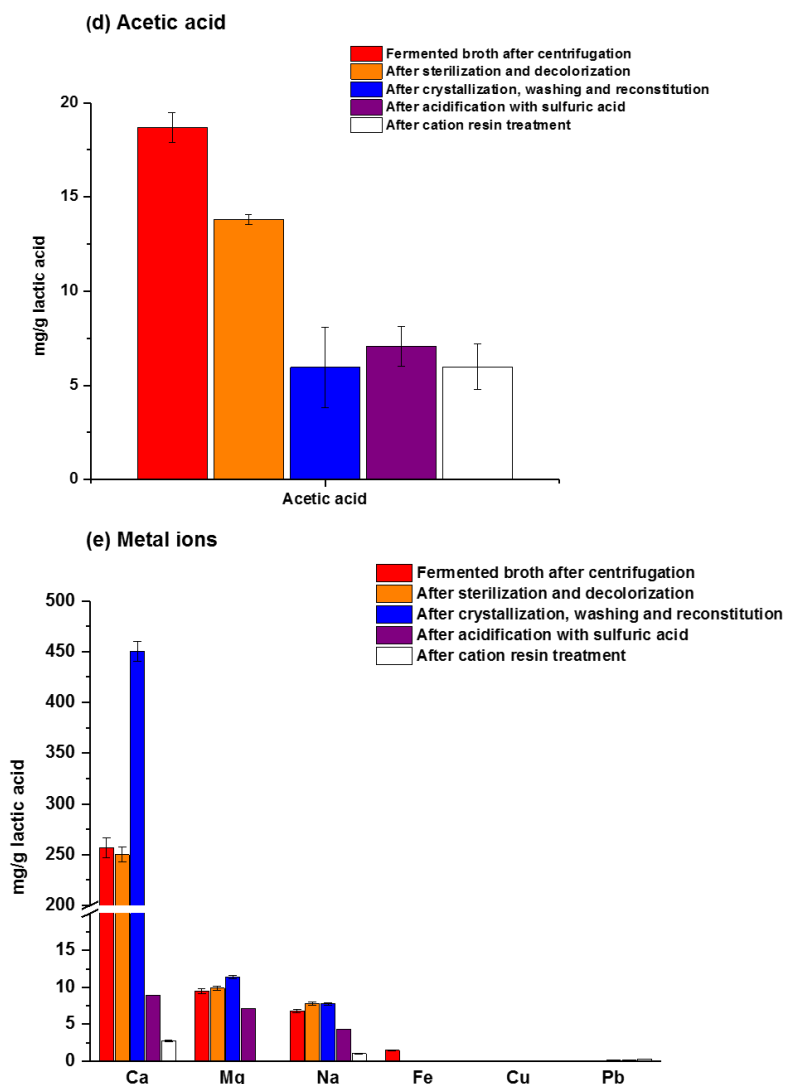


图 2.5 纤维素 L-乳酸在不同纯化阶段中的杂质含量

Fig. 2.5 Impurities content in cellulosic L-lactic acid at different stages

而总酚（图 2.5(c)）只在初始发酵液中检测出，为 29.98 mg/g lactic acid，在进行脱色处理后便未再检出。这是因为，酚类化合物主要存在于发酵液的色素中，伴随着纤维素 L-乳酸的脱色而被脱除。从图 2.5(d)中我们可以看出，脱色后 L-乳酸发酵液中乙酸的相对含量具有一定的下降，这是因为乳酸的极性大于乙酸的极性，活性炭对乙酸的吸附能力大于乳酸，导致更多的乙酸被吸附；在结晶、洗晶、复溶后乙酸的相对含量再次下降，这是因为在 L-乳酸钙结晶时，有部分乙酸留在结晶残液中；而在后续的酸解和精制工序中，乙酸的相对含量不再有明显的变化，最终乙酸的相对含量为 5.99 mg/g lactic acid。从图 2.5(e)中我们可以看出 Ca^{2+} 在脱色后纤维素 L-乳酸中的含量基本没有变化，而在浓缩结晶、洗晶、复溶处理后 Ca^{2+} 的含量高达 450.62 mg/g lactic acid，这是因为随着发酵液的浓缩、结晶，以乳酸钙形式存在的纤维素 L-乳酸浓度大幅度提高，也就导致了每克

纤维素 L-乳酸中 Ca^{2+} 含量的提高；而在浓硫酸酸解后 L-乳酸钙与浓硫酸发生置换反应生成了硫酸钙沉淀，过滤后得到的粗 L-乳酸中 Ca^{2+} 也就明显降低，为 8.97 mg/g lactic acid；在经过阳离子交换树脂处理后仅为 2.77 mg/g lactic acid。与 Ca^{2+} 一样，其他的金属离子与 Ca^{2+} 呈现出相同的变化趋势，但是它们的含量相对于 Ca^{2+} 较低，因此，在对 L-乳酸钙进行浓硫酸酸解前的工序中，它们的含量并没有明显的变化；但是，在浓硫酸酸解时，除 Ca^{2+} 外的其他金属离子的相对含量也有所下降，这可能是因为酸解时，伴随着浓硫酸放热，纤维素 L-乳酸发生了酯化反应，导致纤维素 L-乳酸的含量降低，也就导致了金属离子的相对含量降低。最终，在利用阳离子交换树脂进行金属离子去除后，金属离子的含量都有不同程度的降低，钙、镁、钠、铁、铜、铅的金属离子含量分别为 2.77、0.03、1.02、0.03、0.03、0.28 mg/g lactic acid。

在经过上述的针对纤维素 L-乳酸的分离与纯化工序后，我们得到了精制的纤维素 L-乳酸（图 2.3(e)），依据 2.2.4 中所述的公式(2-3)计算得出，精制后的纤维素 L-乳酸纯度高达 98.19% (w/w)。

2.3.4 L-丙交酯的合成及分析表征

将得到的纤维素 L-乳酸进行浓缩、脱水处理后，在高温、低压条件下进行缩聚、解聚反应获得粗 L-丙交酯（图 2.6(a)）；以无水乙醇为溶剂对得到的 L-丙交酯进行三次重结晶后，冷冻干燥 12 h 得到精制的 L-丙交酯（图 2.6(b)）。

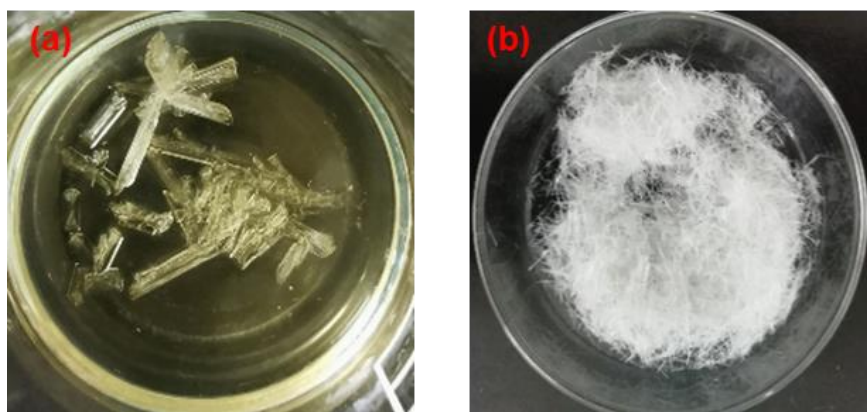


图 2.6 纤维素 L-乳酸合成 L-丙交酯

Fig. 2.6 Synthesis of L-lactide from cellulosic L-lactic acid

(a) Crude L-lactide synthesized from cellulosic L-lactic acid by two-step method,

(b) L-lactide purified by recrystallization

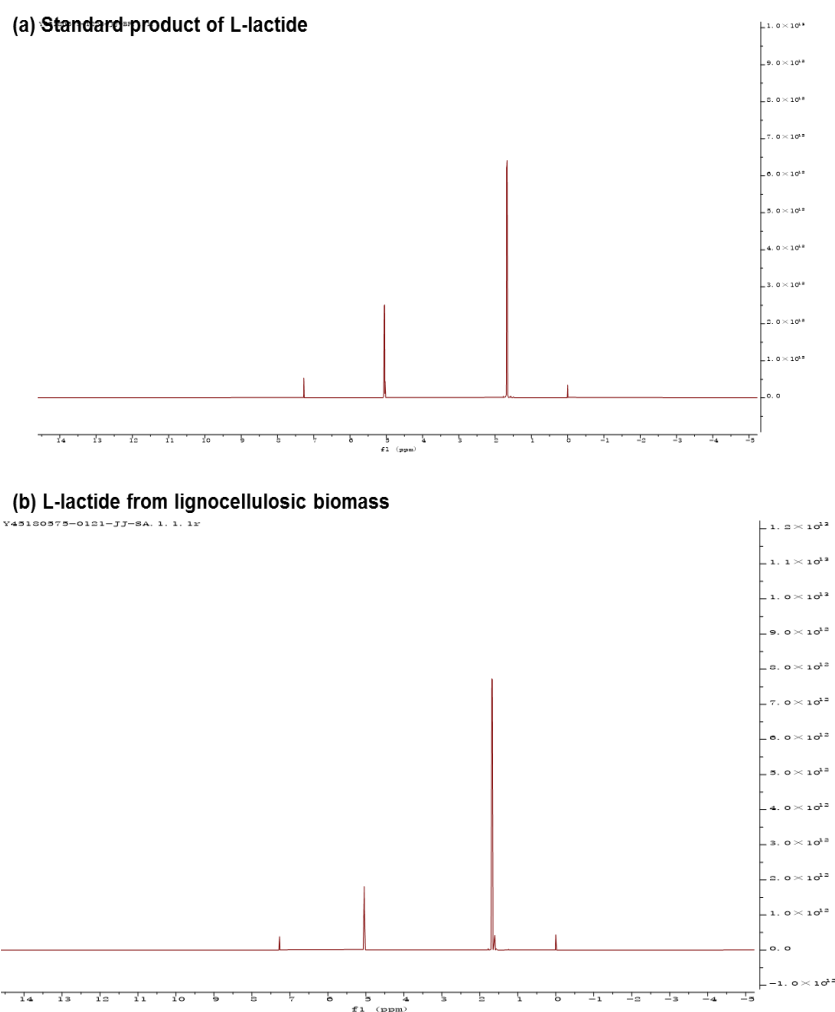


图 2.7 核磁共振氢谱图

Fig. 2.7 The spectrum of ^1H NMR

图 2.7 是通过 NMR 对 L-丙交酯进行结构分析表征的结果。图 2.7(a)是 L-丙交酯标准品的 ^1H NMR 谱图，从图中可以看出，L-丙交酯存在两个吸收峰，峰面积比约为 1:3； $\delta=1.67-1.68$ 处为二重峰，强度比约为 1:1； $\delta=5.03-5.07$ 处为四重峰，强度比约为 1:3:3:1； $\delta=7.27$ 处为 CDCl_3 溶剂单峰。图 2.7(b)为木质纤维素来源的 L-丙交酯的 ^1H NMR 谱图，从图中我们可以看出，利用纤维素 L-乳酸合成的 L-丙交酯存在两个吸收峰，峰面积比约为 1:2.9， $\delta=1.67-1.68$ 处为二重峰，强度比约为 1:1； $\delta=5.03-5.06$ 处为四重峰，强度比约为 1:3:3:1； $\delta=7.27$ 处为 CDCl_3 溶剂单峰； $\delta=1.60$ 处为水峰，是由于丙交酯干燥不充分导致的。总之，利用纤维素 L-乳酸合成的 L-丙交酯基本符合 L-丙交酯的 NMR 谱图特征。

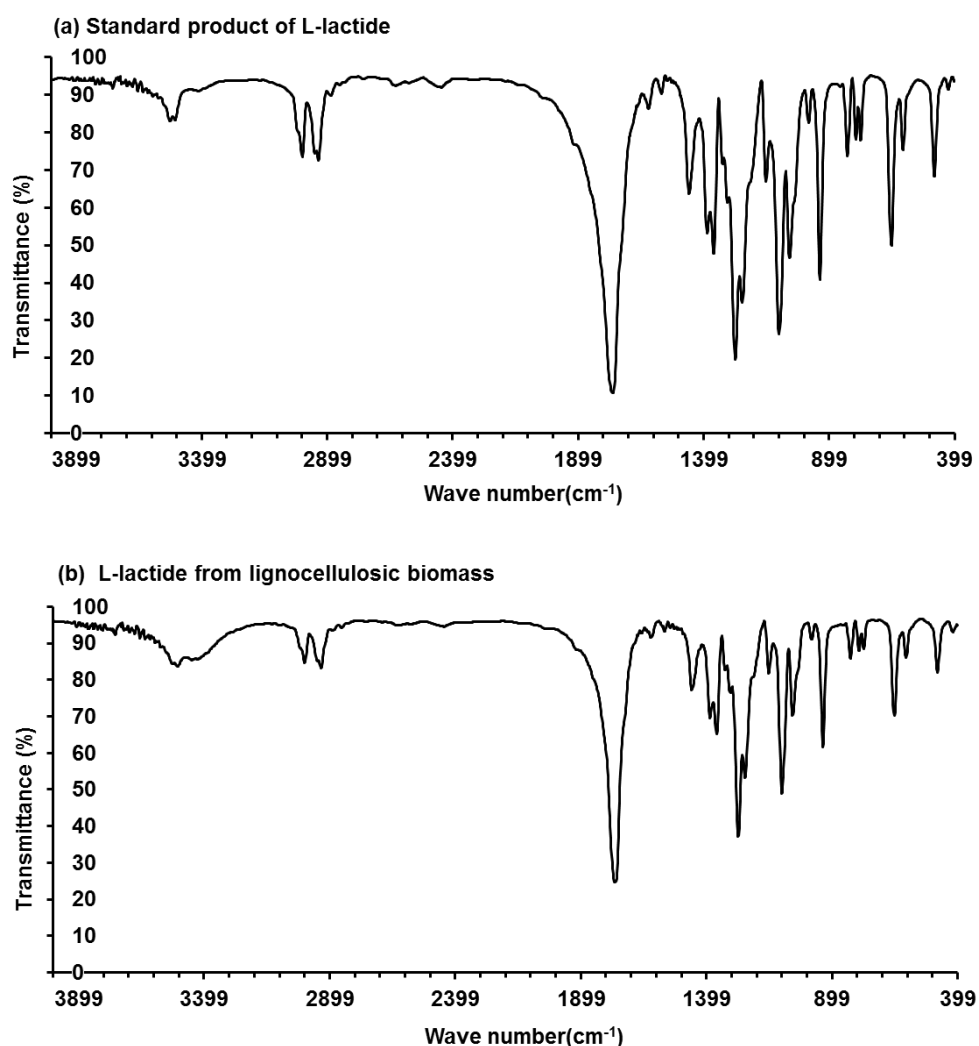


图 2.8 傅里叶变换红外光谱图

Fig. 2.8 The spectrum of FT-IR

图 2.8 是利用 KBr 压片法通过 FT-IR 测定 L-丙交酯的红外光谱图，以表征 L-丙交酯的结构。图 2.8(a)是 L-丙交酯标准品，图 2.8(b)是本研究中合成的 L-丙交酯。在纤维素 L-乳酸合成的 L-丙交酯光谱图中， 1764 cm^{-1} 为酯 C=O 伸缩振动峰； 1272 cm^{-1} 为 C-O-C 酯反对称伸缩振动峰； 1099 cm^{-1} 为 C-O-C 酯对称伸缩振动峰； 2999 cm^{-1} 为 -CH₃ 的伸缩振动峰； 1457 cm^{-1} 为 -CH₃ 的弯曲振动峰； 2933 cm^{-1} 为 -CH 的伸缩振动峰； 1385 cm^{-1} 为 -CH 的弯曲振动峰； 935 cm^{-1} 、 651 cm^{-1} 为环骨架振动峰，证明环状结构的存 在。本研究合成的 L-丙交酯的吸收光谱（图 2.8(b)）各特征峰均能与 L-丙交酯标准品对应（图 2.8(a)），且符合 L-丙交酯的结构特征。

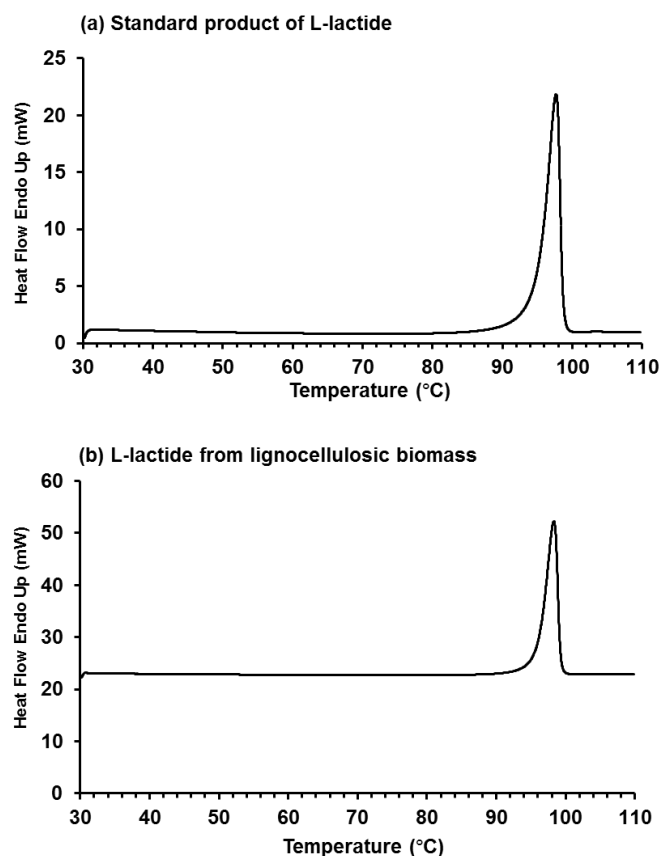


图 2.9 DSC 曲线

Fig. 2.9 DSC curve

通过 DSC 对 L-丙交酯的熔点进行了测定 (图 2.9)。从 DSC 曲线来看, L-丙交酯标准品的峰值温度为 97.67 °C, 本研究合成的 L-丙交酯的峰值温度为 98.30 °C。通过计算, 本研究合成的 L-丙交酯熔点为 96.02 °C, 与 L-丙交酯标准品基本一致 (96.40 °C); 且同文献报道的 95-96 °C^[140]一致。

图 2.10 是利用 ESI-高分辨飞行时间质谱仪分别对购买的 L-丙交酯标准品(图 2.10(a)) 和利用纤维素 L-乳酸合成的 L-丙交酯 (图 2.10(b)) 进行相对分子质量测定的结果。图 2.10(a)中结果表明, L-丙交酯的标准品在以甲醇为溶剂进行加钠处理的情况下, 相对分子质量测定结果为 $199.0581=[M+CH_3OH+Na]$, 即 L-丙交酯标准品的分子量为 144.0261。而木质纤维素来源的 L-丙交酯在相同的条件下出现测得的相对分子质量为 144.0267, 这表明本研究合成的 L-丙交酯的分子量与 L-丙交酯的实际分子量是完全一致的。

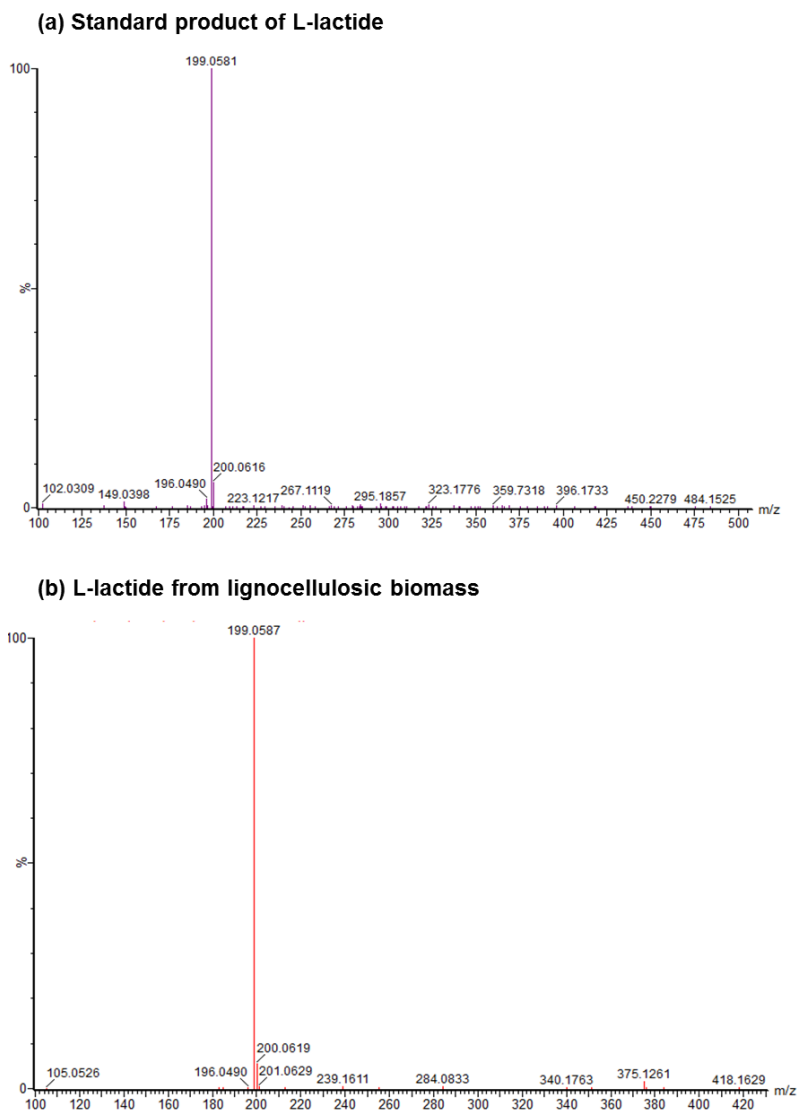


图 2.10 相对分子质量测定

Fig. 2.10 Relative molecular mass

此外，我们对 L-丙交酯进行了元素分析，称取一定质量的木质纤维素来源的 L-丙交酯，利用元素分析仪对其 C、H 元素含量进行测定。结果显示：由于干燥不彻底，木质纤维素来源的 L-丙交酯中含有 $49.71 \pm 0.16\%$ 的 C 元素、 $5.67 \pm 0.33\%$ 的 H 元素，基本符合理论值（C: 50.00%，H: 5.60%）。

最后，我们测定了本研究合成的 L-丙交酯的旋光度为 -282° ，根据 2.2.7 中所述公式(2-4)，计算出其光学纯度为 98.95%；同时，根据 GC 的测定结果，本研究合成的 L-丙交酯手性纯度为 93.08%。

上述结果表明，利用干法生物炼制技术生产的纤维素 L-乳酸经常规、易操作的提纯工艺后即可用于合成 L-丙交酯，且其结构和性质（熔点、相对分子质量、元素构成）均

符合已知的 L-丙交酯的特征。此研究实现了利用干法生物炼制技术生产的 L-乳酸合成 L-丙交酯的目标。

2.4 本章小结

经过长期的对木质纤维素干法生物炼制技术的研究，目前已经基本克服了预处理、脱毒、糖化与发酵等工艺过程的技术障碍。在本部分，我们采用了极低废水排放、低能耗、高可发酵单糖的干酸预处理方法对小麦秸秆进行了预处理^[10]，并利用 *P. variotii* FN89 对预处理产生的高浓度抑制物进行终极生物降解（降解为 CO₂ 和 H₂O）^[23]。利用可以全糖同步转化的 L-乳酸发酵菌株 *P. acidilactici* ZY271，以木质纤维素（麦秆）为碳源进行 SSCF 获得了高浓度、低残糖、高手性度的纤维素 L-乳酸^[45]，使得利用干法生物炼制技术生产的 L-乳酸合成 L-丙交酯成为可能。本章的主要结论如下：

（1）由于木质纤维素原料在进行干酸预处理后木质素降解产生了酚类物质，这类物质在微生物发酵过程中会形成的大量色素，增加了纤维素 L-乳酸的脱色成本。通过对脱色条件的探究，我们确定了纤维素 L-乳酸脱色的最佳条件为：添加 10%（m/v）的活性炭，在 60 °C 的水浴摇床中（150 rpm）脱色 1.0 h。在此条件下的脱色率为 98.37%，并完全去除了酚类物质。

（2）在经过常规的、易操作的提纯工序（离心、脱色、结晶、洗晶、复溶、酸解、精制）后，获得了回收率为 69.30%、纯度为 98.19%（w/w）的纤维素 L-乳酸。

（3）纯化后的纤维素 L-乳酸在通过脱水浓缩、缩聚、解聚、提纯工序后，获得了 98.95% 光学纯度和 93.08% 手性纯度的木质纤维素来源的 L-丙交酯。通过 NMR、FT-IR、DSC、ESI 飞行质谱仪、元素分析仪对木质纤维素来源的 L-丙交酯进行分析表征。与 L-丙交酯标准品比较，我们发现木质纤维素来源的 L-丙交酯的分子结构、熔点、相对分子质量等与 L-丙交酯标准品基本一致，完全可以作为 PLA 的前体，具有极大的工业化生产价值。

第 3 章 *P. acidilactici* ZY271 在低 pH 环境中的适应性进化

3.1 引言

在微生物发酵过程中,当培养基 pH 低于乳酸的 pKa (3.86) 时,积累的游离乳酸可扩散到细胞中;而细胞内环境的 pH 值高于乳酸的 pKa,因此游离的乳酸分解成一个乳酸阴离子和一个氢质子,这些离子在细胞内的积累会损害细胞活力^[56, 149]。为防止损伤菌株,降低其乳酸生产能力,通常在生物乳酸发酵过程中,利用中和剂(如氢氧化钙、碳酸钙等)形成乳酸盐,以避免此不利现象的发生^[150]。然而,为了从乳酸盐中回收乳酸,需要使用等摩尔强酸将其置换,最终产生了大量的石膏。这种中和、酸解的工艺在增加生产成本的同时也给环境保护带来了负面影响。因此,为了避免或减少在发酵过程中使用中和剂,对菌株进行适应性驯化,使其能抵抗酸性环境,在低 pH 值下生产乳酸,将有助于降低乳酸的生产成本。

与酵母不同,由于酸敏感性和基因工程障碍,利用乳酸菌在低 pH 条件下生产具有商业价值的乳酸还没有报道^[56]。在本实验室之前的工作中,通过代谢工程改造获得了具有木糖代谢路径的 *P. acidilactici* ZY271,以高固含量的木质纤维素生物质为底物,最终可以生产出 130.8 g/L 的纤维素 L-乳酸^[45]。经过一段时间的全糖驯化后,以麦秆为碳源进行 SSCF 可以生产出浓度高达 136.6 g/L 纤维素 L-乳酸^[139]。但是,如此高浓度的、低成本的纤维素 L-乳酸是以乳酸钙的形式存在的。因此对 *P. acidilactici* ZY271 进行低 pH 环境的适应性进化是十分重要的。

本部分主要研究了 *P. acidilactici* ZY271 在低 pH 环境下的产酸和生长能力。首先将 *P. acidilactici* ZY271 在 MRS 培养基中进行不加中和剂的摇瓶发酵,并根据其产酸能力和 OD₆₀₀ 值适时调整培养方案。在经过长期的驯化后,我们将适应性进化前、后的 *P. acidilactici* ZY271 在 1 L 生物反应器中进行低 pH (pH ≤ 5.5) 环境下的发酵性能评价,并通过菌落形成单位 (CFU) 比较适应性进化前、后的菌株活力。最终,我们发现在低 pH 环境中,适应性驯化后 *P. acidilactici* ZY271 的细胞活力 (CFU) 和 L-乳酸生产能力较亲本菌株都有明显的提高。

3.2 材料与方法

3.2.1 菌株、培养基及培养方法

本章所使用的乳酸片球菌 *P. acidilactici* ZY271 保藏在 CGMCC,注册编号为 13611。

(1) 简化 MRS 培养基 I: 同 2.2.1 (1)。

(2) 简化 MRS 培养基 II: 在 (1) 的基础上,将无水乙酸钠调整为 1 g/L,其余不变。

(3) MRS 固体培养基: 在 (1) 的基础上,加入 20 g/L 的琼脂粉,其余不变;灭菌

后制备固体培养基。

3.2.2 适应性进化方法

乳酸片球菌 *P. acidilactici* ZY271 在低 pH 环境下的适应性驯化共分为四个阶段：

第I阶段：

在 100 mL 的摇瓶中加入 20 mL 简化 MRS 培养基I，灭菌处理后（115 °C，20 min），将上一代的发酵液摇匀后吸取 2 mL 接入其中（第一代的种子液是保存在-80 °C超低温冰箱中的未经驯化的 *P. acidilactici* ZY271 菌液）。然后在 42 °C、150 rpm 的培养箱中发酵培养 24 h。据此重复。

第II阶段：

第II阶段的培养方法是在第I阶段的基础上，将培养时间延长至 48 h，其他不变。据此重复。

第III阶段：

在第III阶段，将 *P. acidilactici* ZY271 分别在低 pH 培养基（4.0）和正常 pH 培养基（pH 6.5-7.0）中培养 48 h、24 h。具体做法是：向第I、II阶段使用的简化 MRS 培养基I 中移入少量的 100 g/L 的外源 L-乳酸，将 *P. acidilactici* ZY271 生长环境的 pH 调节至 4.0 左右，然后在 42 °C、150 rpm 的培养箱中发酵培养 48 h；接着，将在低 pH 环境中发酵培养 48 h 的 *P. acidilactici* ZY271 吸取 2 mL 到未作任何改变的简化 MRS 培养基I中，继续培养 24 h。据此交替培养。

第IV阶段：

在第IV阶段中，将简化 MRS 培养基I中的乙酸盐（无水乙酸钠）的使用量下调至 1 g/L，也就是简化 MRS 培养基II。和之前三个阶段一样，将上一代的发酵液作为种子液，在 20 mL 的体系中、42 °C、150 rpm 的环境下持续培养 72 h。

3.2.3 分析方法

在 3.2.2 所述的适应性进化方法中，每一代驯化培养结束后，均需要从发酵液中取出 2 mL。其中 1 mL 在 12,000 rpm 下高速离心 5 min，将上清和底部菌体分开后，待测；另 1 mL 用于测定活细胞数。

（1）L-乳酸和葡萄糖

将上清液稀释合适的倍数，通过 HPLC（同 2.2.6）测定 L-乳酸和葡萄糖浓度。

（2）菌体生长量

向高速离心后的菌体沉淀中，加入 1 mL 超纯水，充分振荡混匀后，在 600 nm 波长下测吸光值，以此来表征菌体生长量。

（3）活细胞生长量

将 1 mL 的摇瓶发酵液，稀释 10^8 倍后，涂布在 MRS 固体培养基中，在 42 °C 的培养箱中培养 48 h，计算细胞活力（CFU），以此来表征活细胞生长量。

(4) 发酵终点 pH

将摇瓶中剩下的发酵液混匀后，通过 pH 计测定发酵结束后 *P. acidilactici* ZY271 最终生长环境的 pH。

3.3 结果与讨论

3.3.1 *P. acidilactici* ZY271 的适应性进化

通常，在利用微生物发酵法生产乳酸的过程中，需要在发酵过程中加入“中和剂”将发酵 pH 维持在菌体生长的最适 pH，这就导致生产的乳酸是以乳酸盐的形式存在的；想要获得乳酸单体，一般还需要加入浓硫酸置换。同时，乳酸分离纯化的成本占乳酸生产总成本的 50-60%^[70]。因此，提高乳酸生产菌株对酸环境的耐受性，可以极大地降低乳酸后期分离纯化的成本，并且可以减少硫酸盐等废渣的产生。

首先，我们将 *P. acidilactici* ZY271 在 20 mL 体系的摇瓶中进行发酵培养，在此过程中，我们不添加任何的 pH 中和剂去调节培养基的 pH。在发酵终点，我们通过 pH 计测定其生长的最终 pH。在第 I 阶段，我们可以看出菌体的生长量 OD₆₀₀ 逐渐降低，发酵终点的 pH 没有明显的变化，但是 L-乳酸的产量略有提高。同时，我们注意到在发酵结束后，仍含有约 10 g/L 的葡萄糖。因此，我们在相同的培养条件下，将培养时间延长到了 48 h，也就是图 3.1 中的第 II 阶段。从图中我们可以看出：培养时间延长后，L-乳酸的产量较第 I 阶段有所提高，而残糖含量较第 I 阶段也有所下降。但是，发酵终点的 pH 与第 I 阶段相比，没有明显的差距。为了进一步加强 *P. acidilactici* ZY271 在低 pH 下产酸能力，我们将 *P. acidilactici* ZY271 先在加有 L-乳酸、pH 约为 4 的 MRS 培养基中培养 48 h，接着在正常 pH 的 MRS 培养基中培养 24 h，以此重复，也就是第 III 阶段。从图 3.1 中我们可以看出，在加有外源 L-乳酸的 MRS 培养基中培养 48 h 后，*P. acidilactici* ZY271 的 OD₆₀₀ 只有 1 左右，这表明大部分菌体并不能适应低 pH 环境，且 L-乳酸的产量和残糖含量并无任何积极的改变。随后，我们又将在第 III 阶段驯化一段时间的 *P. acidilactici* ZY271 长期在正常的简化 MRS 培养基 II 中进行驯化，并将发酵培养时间延长至 72 h，也就是图 3.1 中的第 IV 阶段。从图中我们可以看出，*P. acidilactici* ZY271 在进行 72 h 的发酵培养后，发酵终点的 pH 较前三个阶段略有下降；同时，L-乳酸的产量也略有提升。在经过 107 代的长期转接驯化后，*P. acidilactici* ZY271 的产酸量和发酵终点的 pH 趋于稳定，发酵终点 pH 在 3.5-3.6，产 16-17g/L 的 L-乳酸。

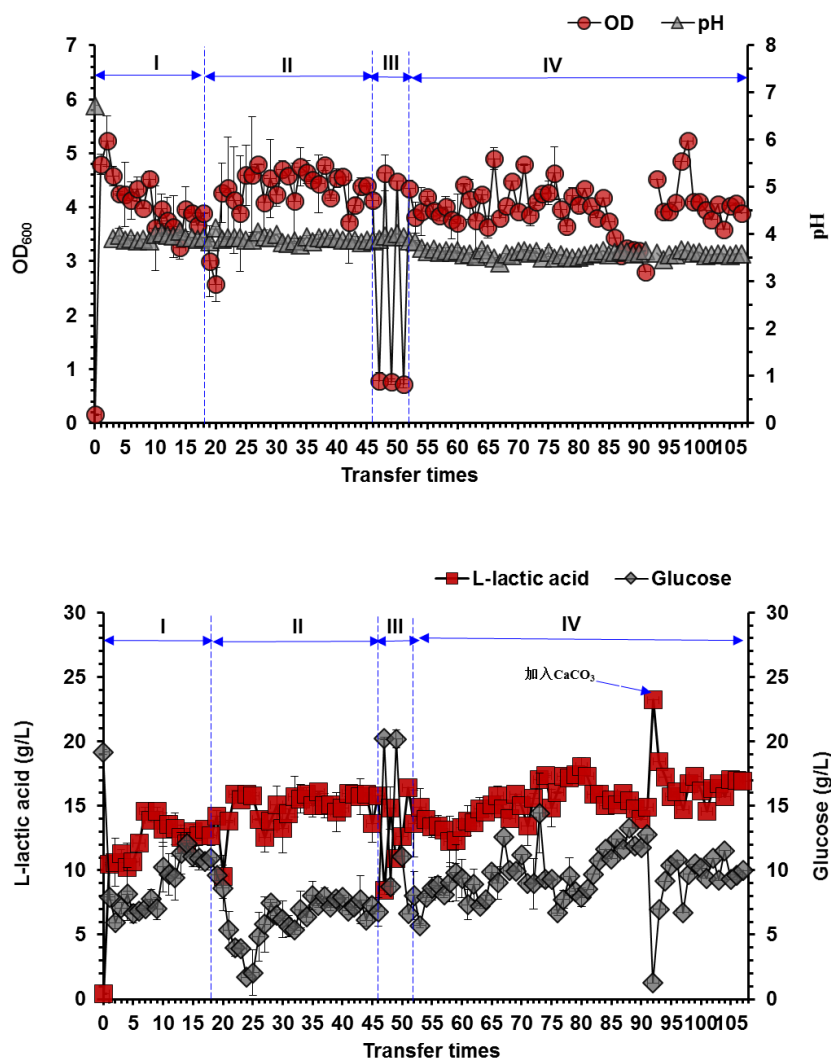


图 3.1 *P. acidilactici* ZY271 的适应性驯化

Fig. 3.1 Adaptive evolution of *P. acidilactici* ZY271

Stage I: MRS 培养基I, 发酵条件: 20 mL 体系, 10%的接种量, 24 h 转接一次;

Stage II: MRS 培养基I, 发酵条件: 20 mL 体系, 10%的接种量, 48 h 转接一次;

Stage III: MRS 培养基I, 发酵条件: 20 mL 体系, 10%接种量, 在加有外源 L-乳酸的 MRS 培养基 (pH 约为 4) 中培养 48 h 后转接到新鲜的培养基中培养 24 h (pH 在 6.5-7.0), 据此交替重复培养;

Stage IV: MRS 培养基II, 发酵条件: 20 mL 体系, 10%的接种量, 72 h 转接一次。

3.3.2 适应性进化前后 *P. acidilactici* ZY271 在低 pH 环境下的发酵性能评价

在对 *P. acidilactici* ZY271 进行长期的适应性驯化后, 我们将适应性进化前、后的两株菌株在不同 pH 下进行了发酵性能评价。

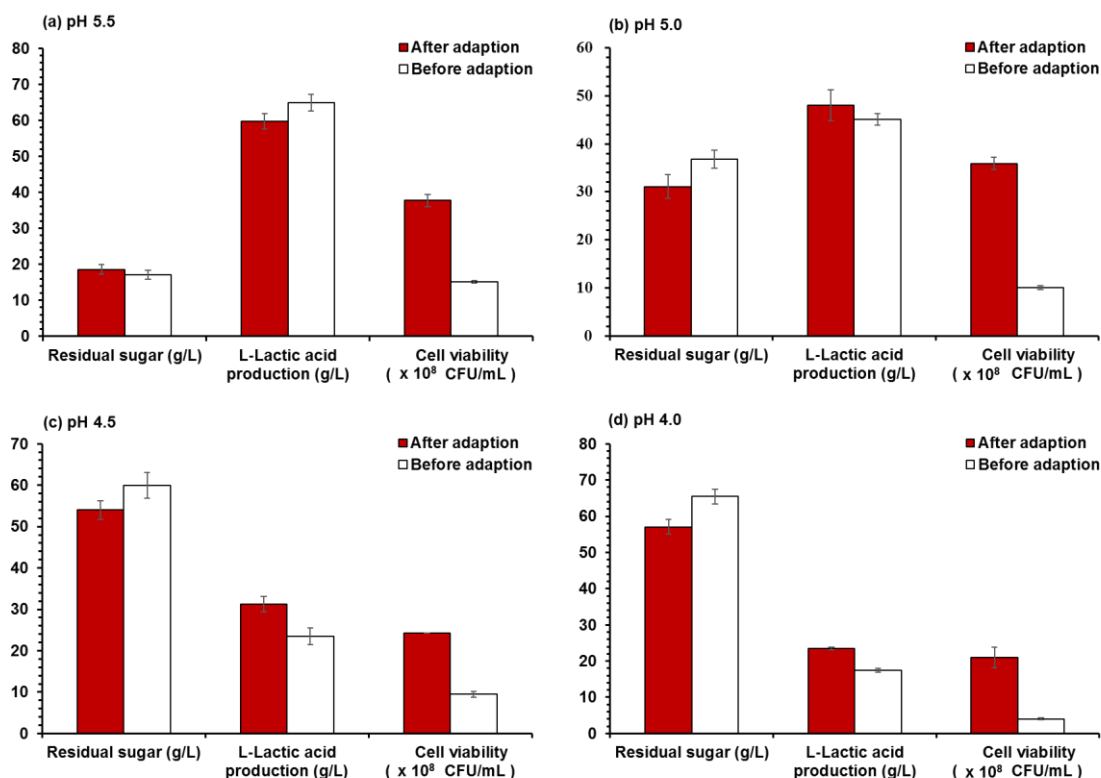


图 3.2 *P. acidilactici* ZY271 适应性进化前、后发酵性能评价

Fig. 3.2 Evaluation of fermentation performance of *P. acidilactici* ZY271 strain before and after adaptive evolution

发酵条件：简化 MRS 培养基（葡萄糖为 90 g/L，其余不变），10%接种量，42 °C，400 rpm，在 1 L 生物反应器中发酵 72 h，在发酵过程中利用 5 M NaOH 将 pH 分别维持在 5.5、5.0、4.5、4.0。

我们分别在 pH 5.5、5.0、4.5、4.0 的条件下进行了发酵性能的比较。图 3.2(a)是在 pH 5.5 的条件下进行的发酵性能评价结果，从图中我们可以看出，适应性进化后的菌株产生了 59.77 g/L 的 L-乳酸，而亲本菌株产生了 64.92 g/L 的 L-乳酸，这可能是因为进行适应性驯化的菌株长期在单糖和低 pH 的环境中，导致其糖代谢能力下降；但是，适应性驯化后的菌株显示出比亲本菌株更好的细胞生存力。接着，我们将 pH 降低至 5.0，我们发现适应性驯化后的菌株产生了 48.07 g/L 的 L-乳酸，比亲本菌株高 6.5%，同时，适应性驯化后的菌株在低 pH 值下比亲本菌株表现出更好的细胞活力。然后，我们又把 pH 下降了 0.5，从图 3.2(c)中我们可以看出，适应性驯化后的菌株产生的 L-乳酸为 31.20 g/L，比亲本菌株高 32.77%，与 pH 5.5 和 pH 5.0 一样，在 pH 4.5 条件下，适应性驯化后菌株的 CFU 高于未驯化菌株。最后，我们将驯化前、后的菌株在 pH 4.0 的条件下进行了发酵性能的评价，从图 3.2(d)中我们不难发现，适应性驯化后的菌株产生了 23.50 g/L 的 L-乳酸，比亲本菌株高 34.67%；同样，在 pH 4.0 条件下，适应性进化后菌株的细胞活力明显高出亲本菌株。

分析图 3.2 我们发现, 进行适应性进化后的菌株较亲本菌株而言: 在正常发酵 pH (pH 5.5) 的条件下, 驯化后菌株的 L-乳酸生产能力略弱于亲本菌株; 但是, 随着发酵 pH 的下降, 驯化后菌株的 L-乳酸生产能力开始明显优于亲本菌株, 在 pH 4.0 的条件下, 驯化后菌株生产的 L-乳酸比亲本菌株高出 34.67%。同时, 值得一提的是, 适应性驯化后的菌株在低 pH (pH ≤ 5.5) 下的细胞活力都明显优于未驯化菌株, 在 pH 4.0 时, 适应性驯化后的菌株 CFU 比未驯化的亲本菌株高出 4.21 倍。这表明在进行长期适应性驯化的过程中 *P. acidilactici* ZY271 在酸胁迫的环境中产生了一定的应激反应, 具有了一定的耐酸能力。但是, 具体的调节机制仍需要进一步研究。

3.4 本章小结

本章实验主要是通过对 *P. acidilactici* ZY271 在低 pH 条件下进行长期的适应性进化, 增加 *P. acidilactici* ZY271 对酸环境的适应性。本章主要研究结论如下:

(1) 经过长期适应性进化获得的驯化菌株, 在 20 mL 体系的摇瓶驯化发酵中, 其发酵终点 pH 在 3.5-3.6, 产 16-17g/L 的 L-乳酸。

(2) *P. acidilactici* ZY271 正常的发酵环境中 (pH 5.5), 适应性进化后菌株的 L-乳酸生产能力略低于亲本菌株, 随着发酵 pH 的下降, 适应性驯化前、后的两株菌株的 L-乳酸生产能力和糖耗能力都有明显的下降。但是, 值得注意的是, 随着发酵 pH 的下降, 驯化菌株较亲本菌株展现出了较好的 L-乳酸生产能力, 特别是在 pH 4.0 的条件下, 驯化后菌株生产的 L-乳酸比亲本菌株高出 34.67%。

(3) 在对适应性进化前、后菌株进行发酵性能评价中我们发现: 在不同 pH 的发酵条件下, 适应性进化后菌株的细胞活力明显都高于未驯化菌株 (pH 4.0 时高出 4.21 倍), 这说明长期的适应性进化实验增加了 *P. acidilactici* ZY271 的在低 pH 环境中的响应能力。但是, 具体的调节机制仍需要进一步探究。

第 4 章 结论与展望

4.1 结论

本文对利用干法生物炼制技术生产的 L-乳酸合成 L-丙交酯的过程进行了探究，开发出了一条针对纤维素 L-乳酸的常规、易操作的提纯工艺路线，使得基于干法生物炼制技术生产的高附加值产品（L-乳酸）实现了应用，为木质纤维素来源的 L-丙交酯工业化生产提供了参考。以下是本研究的主要结论和创新之处：

(1) 通过对脱色条件的探究，我们确定了纤维素 L-乳酸发酵液脱色的最佳条件为：10% (m/v) 活性炭、60 °C、1.0 h，在此条件下的脱色率为 98.37%，且较为彻底地脱除了生物脱毒后残余的木质素降解产生的酚类物质。

(2) 经过简单、易操作的分离纯化工序后（离心、脱色、结晶、洗晶、复溶、酸解、精制，获得了回收率为 69.30%、纯度为 98.19% (w/w) 的纤维素 L-乳酸，并成功合成了光学纯度为 98.95%、手性纯度为 93.08% 的 L-丙交酯。

(3) 为了验证木质纤维素来源的 L-丙交酯的可靠性，我们将以纤维素 L-乳酸合成的 L-丙交酯与 L-丙交酯标准品都进行了分析表征（¹H NMR、FT-IR、DSC、元素分析等），发现木质纤维素生物来源的 L-丙交酯的结构特征与物理性质（熔点、分子量）与标准品一致，完全符合 L-丙交酯的相关性质，具有极大的工业化价值和市场潜力。

(4) 在对 *P. acidilactici* ZY271 进行了低 pH 环境下的长期适应性驯化后，适应性进化后菌株较亲本菌株在低 pH 环境下展现出了较好的 L-乳酸生产能力和细胞活力，特别是在 pH 4.0 的条件下，适应性进化后菌株生产的 L-乳酸比亲本菌株高出 34.67%，细胞活力（CFU）高出亲本菌株 4.21 倍。

4.2 展望

本研究主要通过离心、脱色、结晶、洗晶、复溶、酸解、精制工序，对采用干法生物炼制技术生产的纤维素 L-乳酸进行常规的分离纯化操作后，分离出了聚合级的纤维素 L-乳酸，并成功地合成了 L-丙交酯。对现有的利用干法生物炼制技术生产的高附加值产品进行了纯化和应用方面的尝试，实现了从木质纤维素生物质（麦秆）到 L-丙交酯的工艺开发，具有极大的工业化价值。同时，我们通过对发酵菌株 *P. acidilactici* ZY271 的长期适应性驯化，增强了其对酸胁迫环境的适应能力。但是，本研究中仍然存在着需要改进和深入研究的问题：

(1) 在对纤维素 L-乳酸发酵液脱色工序中，我们增加了大量的活性炭（10% (m/v)），这就增加了脱色工序的成本。接下来的工作可以尝试多次少量的脱色工艺，即在结晶前进行一次脱色，酸解后再进行一次脱色，以减少活性炭的用量。

(2) 本研究中木质纤维素生物质主要是指小麦秸秆，为了增加此工艺的可行性、提

高其适用性，后续可以利用不同来源的木质纤维素生物质（如玉米秸秆、稻草等）为底物进行纤维素 L-乳酸的发酵生产，并利用本研究中所述工艺进行验证。

（3）本文 2.2.4 中所述的 L-乳酸纯度计算公式(2-3)，只考虑了纤维素 L-乳酸中的主要杂质。但，如阴离子含量并未纳入考察范围。

（4）本研究中采用了两步法合成 L-丙交酯，此方法能耗高。后续可以尝试通过一步法合成 L-丙交酯来降低能耗成本并有利于提高 L-丙交酯的纯度。此外，本研究未能尝试将合成的 L-丙交酯进一步合成高分子量的 PLLA。

（5）将本研究中的发酵菌株为 *P. acidilactici* ZY271（L-乳酸）替换为实验室另一株工程菌株 *P. acidilactici* ZY15（D-乳酸），尝试利用本研究中所述工艺合成 D-丙交酯，及高分子量 PDLA。

（6）将 *P. acidilactici* ZY271 适应性进化前、后菌株进行全基因组重测序，找出驯化后菌株中发生突变的基因，并尝试通过过表达其中某个或某些基因来增强菌株的耐酸性；抑或尝试导入相关的外源基因来增强其在酸胁迫下的耐受能力。

参考文献

- [1] Zhang Y P. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2008, 35(5): 367-375.
- [2] De Bhowmick G, Sarmah A K, Sen R. Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 247: 1144-1154.
- [3] Cherubini F. The biorefinery concept: Using biomass instead of oil for producing energy and chemicals[J]. *Energy Conversion and Management*, 2010, 51(7): 1412-1421.
- [4] Zayed H, Sahu J N, Suely A, et al. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2017, 71: 475-501.
- [5] 邱忠洋. 高产木质纤维素手性乳酸的乳酸片球菌全糖代谢路径构建与抗逆性强化改造[D]. 华东理工大学, 2018.
- [6] Ponnusamy V K, Nguyen D D, Dharmaraja J, et al. A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 271: 462-472.
- [7] Gu H, An R, Bao J. Pretreatment refining leads to constant particle size distribution of lignocellulose biomass in enzymatic hydrolysis[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 352: 198-205.
- [8] Singh J, Suhag M, Dhaka A. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2015, 117: 624-631.
- [9] Lee J, Li P, Lee J, et al. Ethanol production from *Saccharina japonica* using an optimized extremely low acid pretreatment followed by simultaneous saccharification and fermentation[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 127: 119-125.
- [10] Zhang J, Wang X, Chu D, et al. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(6): 4480-4488.
- [11] Almeida J R M, Modig T, Petersson A, et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2007, 82(4): 340-349.
- [12] Kumar V, Yadav S K, Kumar J, et al. A critical review on current strategies and trends

- employed for removal of inhibitors and toxic materials generated during biomass pretreatment[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 299.
- [13] Jonsson L J, Martin C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 199: 103-112.
- [14] Pan L, He M, Wu B, et al. Simultaneous concentration and detoxification of lignocellulosic hydrolysates by novel membrane filtration system for bioethanol production[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2019, 227: 1185-1194.
- [15] Kumar S, Ahluwalia V, Kundu P, et al. Improved levulinic acid production from agri-residue biomass in biphasic solvent system through synergistic catalytic effect of acid and products[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 251: 143-150.
- [16] Onaran G, Gurel L, Argun H. Detoxification of waste hand paper towel hydrolysate by activated carbon adsorption[J]. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 2020, 17(2): 799-808.
- [17] Seong H A, Lee J S, Yoon S Y, et al. Fermentation characteristics of acid hydrolysates by different neutralizing agents[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2016, 41(37): 16365-16372.
- [18] Hatano K-i, Aoyagi N, Miyakawa T, et al. Evaluation of nonionic adsorbent resins for removal of inhibitory compounds from corncob hydrolysate for ethanol fermentation[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 149: 541-545.
- [19] De La Torre M, Martin-Sampedro R, Fillat U, et al. Comparison of the efficiency of bacterial and fungal laccases in delignification and detoxification of steam-pretreated lignocellulosic biomass for bioethanol production[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2017, 44(11): 1561-1573.
- [20] Rubin E M. Genomics of cellulosic biofuels[J]. *Nature*, 2008, 454(7206): 841-845.
- [21] Jonsson L J, Alriksson B, Nilvebrant N O. Bioconversion of lignocellulose inhibitors and detoxification[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6: 10.
- [22] Zhang J, Zhu Z N, Wang X F, et al. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resiniae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2010, 3: 15.
- [23] 鲍杰, 张斌, 法亚尔·艾哈迈德, 等. 一种极低 pH 条件下降解木质纤维素来源抑制物的菌株及应用[P]. 中国: CN110713939B, 2021-01-22.
- [24] Jorgensen H, Kristensen J B, Felby C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities[J]. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-*

- Biofpr, 2007, 1(2): 119-134.
- [25] Mansfield S D, Mooney C, Saddler J N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis[J]. *Biotechnology Progress*, 1999, 15(5): 804-816.
- [26] Zhai R, Hu J, Saddler J N. What are the major components in steam pretreated lignocellulosic biomass that inhibit the efficacy of cellulase enzyme mixtures[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2016, 4(6): 3429-3436.
- [27] Ask M, Olofsson K, Di Felice T, et al. Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated *Arundo donax* revealed by a comparison between SHF and SSF[J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(10): 1452-1459.
- [28] Cotana F, Cavalaglio G, Gelosia M, et al. A comparison between SHF and SSSF processes from cardoon for ethanol production[J]. *Industrial Crops and Products*, 2015, 69: 424-432.
- [29] Tomas-Pejo E, Oliva J M, Ballesteros M, et al. Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 100(6): 1122-1131.
- [30] Davidson B E, Llanos R M, Cancilla M R, et al. Current research on the genetics of lactic acid production in lactic acid bacteria[J]. *International Dairy Journal*, 1995, 5(8): 763-784.
- [31] Ghaffar T, Irshad M, Anwar Z, et al. Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification[J]. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 2019, 7(2): 222-229.
- [32] Wee Y J, Kim J N, Ryu H W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications[J]. *Food Technology and Biotechnology*, 2006, 44(2): 163-172.
- [33] 王博彦, 金其荣. 发酵有机酸生产与应用手册[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2000.
- [34] Mary J. Bidy C S, and Christopher Kinchin. Chemicals from biomass: A market assessment of bioproducts with near-term potential. National Renewable Energy Laboratory(NREL), Golden CO 80401. 2016.
- [35] Akerberg C, Zacchi G. An economic evaluation of the fermentative production of lactic acid from wheat flour[J]. *Bioresource Technology*, 2000, 75(2): 119-126.
- [36] Watanabe M, Makino M, Kaku N, et al. Fermentative L(+)-lactic acid production from non-sterilized rice washing drainage containing rice bran by a newly isolated lactic acid bacteria without any additions of nutrients[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2013, 115(4): 449-452.
- [37] Budhavaram N K, Fan Z. Production of lactic acid from paper sludge using acid-tolerant, thermophilic *Bacillus coagulans* strains[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(23): 5966-

5972.

- [38] Nguyen C M, Kim J-S, Hwang H J, et al. Production of L-lactic acid from a green microalga, *Hydrodictyon reticulum*, by *Lactobacillus paracasei* LA104 isolated from the traditional Korean food, makgeolli[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 110: 552-559.
- [39] Abdel-Rahman M A, Tashiro Y, Sonomoto K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits[J]. *Journal of Biotechnology*, 2011, 156(4): 286-301.
- [40] Komesu A, de Oliveira J A R, Martins L H D, et al. Lactic acid production to purification: A review[J]. *Bioresources*, 2017, 12(2): 4364-4383.
- [41] Abedi E, Hashemi S M B. Lactic acid production - producing microorganisms and substrates sources-state of art[J]. *Heliyon*, 2020, 6(10).
- [42] Zhao K, Qiao Q, Chu D, et al. Simultaneous saccharification and high titer lactic acid fermentation of corn stover using a newly isolated lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* DQ2[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 135: 481-489.
- [43] Yi X, Zhang P, Sun J, et al. Engineering wild-type robust *Pediococcus acidilactici* strain for high titer L- and D-lactic acid production from corn stover feedstock[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 217: 112-121.
- [44] Qiu Z, Gao Q, Bao J. Constructing xylose-assimilating pathways in *Pediococcus acidilactici* for high titer D-lactic acid fermentation from corn stover feedstock[J]. *Bioresource Technology*, 2017, 245: 1369-1376.
- [45] Qiu Z, Gao Q, Bao J. Engineering *Pediococcus acidilactici* with xylose assimilation pathway for high titer cellulosic L-lactic acid fermentation[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 249: 9-15.
- [46] Bianchi M M, Brambilla L, Protani F, et al. Efficient homolactic fermentation by *Kluyveromyces lactis* strains defective in pyruvate utilization and transformed with the heterologous *LDH* Gene[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(12): 5621-5625.
- [47] Datta R, Henry M. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies - A review[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2006, 81(7): 1119-1129.
- [48] Ilmén M, Koivuranta K, Ruohonen L, et al. Efficient production of L-lactic acid from xylose by *Pichia stipitis*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(1): 117-123.
- [49] Branduardi P, Valli M, Brambilla L, et al. The yeast : A new host for heterologous protein production, secretion and for metabolic engineering applications[J]. *FEMS Yeast Research*,

- 2004, 4(4-5): 493-504.
- [50] Osawa F, Fujii T, Nishida T, et al. Efficient production of L-lactic acid by crabtree-negative yeast *Candida boidinii*[J]. *Yeast*, 2009, 26(9): 485-496.
- [51] Jin B, Huang L P, Lant P. *Rhizopus arrhizus* - a producer for simultaneous saccharification and fermentation of starch waste materials to L(+)-lactic acid[J]. *Biotechnology Letters*, 2003, 25(23): 1983-1987.
- [52] Zhang Z Y, Jin B, Kelly J M. Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus fungi*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2007, 35(3): 251-263.
- [53] Xu T-T, Bai Z-Z, Wang L-J, et al. Breeding of D(-)-lactic acid high producing strain by low-energy ion implantation and preliminary analysis of related metabolism[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2008, 160(2): 314-321.
- [54] Ju S Y, Kim J H, Lee P C. Long-term adaptive evolution of *Leuconostoc mesenteroides* for enhancement of lactic acid tolerance and production[J]. *Biotechnology Biofuels*, 2016, 9: 240.
- [55] Zhang J, Wu C, Du G, et al. Enhanced acid tolerance in *Lactobacillus casei* by adaptive evolution and compared stress response during acid stress[J]. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2012, 17(2): 283-289.
- [56] Park H J, Bae J H, Ko H J, et al. Low-pH production of D-lactic acid using newly isolated acid tolerant yeast *Pichia kudriavzevii* NG7[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(9): 2232-2242.
- [57] Hou Q, He Q, Liu G, et al. Identification and application of novel low pH inducible promoters for lactic acid production in the tolerant yeast *Candida glycerinogenes*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2019, 128(1): 8-12.
- [58] Sugiyama M, Akase S-p, Nakanishi R, et al. Overexpression of *ESBP6* improves lactic acid resistance and production in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2016, 122(4): 415-420.
- [59] Sheehan V M, Sleator R D, Hill C, et al. Improving gastric transit, gastrointestinal persistence and therapeutic efficacy of the probiotic strain *Bifidobacterium breve* UCC2003[J]. *Microbiology*, 2007, 153(10): 3563-3571.
- [60] Dusselier M, Van Wouwe P, Dewaele A, et al. Lactic acid as a platform chemical in the biobased economy: the role of chemocatalysis[J]. *Energy & Environmental Science*, 2013, 6(5).
- [61] Castillo Martinez F A, Balciunas E M, Salgado J M, et al. Lactic acid properties, applications and production: A review[J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2013,

30(1): 70-83.

- [62] Lee J W, Kim H U, Choi S, et al. Microbial production of building block chemicals and polymers[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22(6): 758-767.
- [63] Narayanan N, Roychoudhury P K, Srivastava A. L(+)-lactic acid fermentation and its product polymerization[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2004, 7(2): 162-167.
- [64] Yang S, Madbouly S A, Schrader J A, et al. Characterization and biodegradation behavior of bio-based poly(lactic acid) and soy protein blends for sustainable horticultural applications[J]. *Green Chemistry*, 2015, 17(1): 380-393.
- [65] Datta R, Tsai S-P, Bonsignore P, et al. Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1995, 16(2-3): 221-231.
- [66] Meng K, Zhang G, Ding C, et al. Recent advances on purification of lactic acid[J]. *The Chemical Record*, 2020, 20(11): 1236-1256.
- [67] Lasprilla A J R, Martinez G A R, Lunelli B H, et al. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - A review[J]. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(1): 321-328.
- [68] Wang Y, Tashiro Y, Sonomoto K. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2015, 119(1): 10-18.
- [69] Jantasee S, Kienberger M, Mungma N, et al. Potential and assessment of lactic acid production and isolation-A review[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2017, 92(12): 2885-2893.
- [70] Alves de Oliveira R, Komesu A, Vaz Rossell C E, et al. Concentrating second-generation lactic acid from sugarcane bagasse via hybrid short path evaporation: Operational challenges[J]. *Separation and Purification Technology*, 2019, 209: 26-31.
- [71] Min D-J, Choi K H, Chang Y K, et al. Effect of operating parameters on precipitation for recovery of lactic acid from calcium lactate fermentation broth[J]. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2011, 28(10): 1969-1974.
- [72] Daful A G, Haigh K, Vaskan P, et al. Environmental impact assessment of lignocellulosic lactic acid production: Integrated with existing sugar mills[J]. *Food and Bioproducts Processing*, 2016, 99: 58-70.
- [73] Zhang Y, Hu Y, Wang L, et al. Systematic review of lithium extraction from salt-lake brines via precipitation approaches[J]. *Minerals Engineering*, 2019, 139.
- [74] Kumar R, Basak B, Jeon B-H. Sustainable production and purification of succinic acid: A review of membrane-integrated green approach[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2020,

277.

- [75] Komesu A, Maciel M R W, Maciel R. Separation and purification technologies for lactic acid - A brief review[J]. *Bioresources*, 2017, 12(3): 6885-6901.
- [76] Krzyżaniak A, Leeman M, Vossebeld F, et al. Novel extractants for the recovery of fermentation derived lactic acid[J]. *Separation and Purification Technology*, 2013, 111: 82-89.
- [77] Kertes A S, King C J. Extraction Chemistry of Fermentation Product Carboxylic Acids[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 103(3): 432-445.
- [78] Vaidya A N, Pandey R A, Mudliar S, et al. Production and recovery of lactic acid for polylactide-An Overview[J]. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2005, 35(5): 429-467.
- [79] Kurzrock T, Weuster-Botz D. Recovery of succinic acid from fermentation broth[J]. *Biotechnology Letters*, 2009, 32(3): 331-339.
- [80] Aydogan Ö, Bayraktar E, Mehmetoglu Ü. Determination of effective diffusion coefficient of acetophenone in κ -carrageenan and asymmetric bioreduction in packed bed reactor[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2011, 72(1-2): 46-52.
- [81] Dai J-Y, Sun Y-Q, Xiu Z-L. Separation of bio-based chemicals from fermentation broths by salting-out extraction[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2014, 14(2): 108-117.
- [82] Kumar A, Thakur A, Panesar P S. Lactic acid and its separation and purification techniques: A review[J]. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 2019, 18(4): 823-853.
- [83] Kumar A, Thakur A, Panesar P S. Lactic acid extraction using environmentally benign green emulsion ionic liquid membrane[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2018, 181: 574-583.
- [84] Lan K, Xu S, Li J, et al. Recovery of lactic acid from corn stover hemicellulose-derived liquor[J]. *ACS Omega*, 2019, 4(6): 10571-10579.
- [85] Garba Z N, Zhou W, Lawan I, et al. An overview of chlorophenols as contaminants and their removal from wastewater by adsorption: A review[J]. *Journal of Environmental Management*, 2019, 241: 59-75.
- [86] Kammerer J, Carle R, Kammerer D R. Adsorption and ion exchange: Basic principles and their application in food processing[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(1): 22-42.
- [87] Tong W-Y, Fu X-Y, Lee S-M, et al. Purification of L(+)-lactic acid from fermentation broth with paper sludge as a cellulosic feedstock using weak anion exchanger Amberlite IRA-

- 92[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, 18(2): 89-96.
- [88] Zaini N A M, Chatzifragkou A, Tverezovskiy V, et al. Purification and polymerisation of microbial D-lactic acid from DDGS hydrolysates fermentation[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2019, 150.
- [89] Johnson B R, Eldred T B, Nguyen A T, et al. High-capacity and rapid removal of refractory NOM using nanoscale anion exchange resin[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(28): 18540-18549.
- [90] Pateraki C, Ladakis D, Stragier L, et al. Pretreatment of spent sulphite liquor via ultrafiltration and nanofiltration for bio-based succinic acid production[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 233: 95-105.
- [91] Tomczak W, Gryta M. Cross-flow microfiltration of glycerol fermentation broths with *citrobacter freundii*[J]. *Membranes*, 2020, 10(4).
- [92] Oonkhanond B, Jonglertjunya W, Srimarut N, et al. Lactic acid production from sugarcane bagasse by an integrated system of lignocellulose fractionation, saccharification, fermentation, and ex-situ nanofiltration[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2017, 5(3): 2533-2541.
- [93] Alexandri M, Schneider R, Venus J. Membrane technologies for lactic acid separation from fermentation broths derived from renewable resources[J]. *Membranes*, 2018, 8(4).
- [94] 王博轩. 发酵液中 L-乳酸的分离与纯化[D]. 北京化工大学, 2019.
- [95] Pal P, Dey P. Process intensification in lactic acid production by three stage membrane integrated hybrid reactor system[J]. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 2013, 64: 1-9.
- [96] Talebi S, Garthe M, Roghmans F, et al. Lactic acid and salt separation using membrane technology[J]. *Membranes*, 2021, 11(2).
- [97] Hoffmann E, Ye J, Hahn H H. Recent advances in application of electrodialysis with bipolar membranes for organic acid recovery from fermentation broth[J]. *Current Organic Chemistry*, 2016, 20(26): 2753-2761.
- [98] Joglekar H G, Rahman I, Babu S, et al. Comparative assessment of downstream processing options for lactic acid[J]. *Separation and Purification Technology*, 2006, 52(1): 1-17.
- [99] Li J, Chen Z, Wang P, et al. Separation of L-lactic acid from fermentation broth by bipolar membrane electrodialysis[J]. *Shengwu Jiagong Guocheng*, 2009, 7(6): 45-50.
- [100] Wang X, Wang Y, Zhang X, et al. In situ combination of fermentation and electrodialysis with bipolar membranes for the production of lactic acid: Operational compatibility and uniformity[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 125: 165-171.

- [101] Sun L, Chen Q, Lu H, et al. Electrodialysis with porous membrane for bioproduct separation: Technology, features, and progress[J]. *Food Research International*, 2020, 137.
- [102] Li C, Gao M, Zhu W, et al. Recent advances in the separation and purification of lactic acid from fermentation broth [J]. *Process Biochemistry*, 2021, 104: 142-151.
- [103] Su C-Y, Yu C-C, Chien I L, et al. Plant-wide economic comparison of lactic acid recovery processes by reactive distillation with different alcohols[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2013, 52(32): 11070-11083.
- [104] Kumar R, Mahajani S M, Nanavati H, et al. Recovery of lactic acid by batch reactive distillation[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2006, 81(7): 1141-1150.
- [105] Komesu A, Martinez P F M, Lunelli B H, et al. Lactic acid purification by reactive distillation system using design of experiments[J]. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 2015, 95: 26-30.
- [106] Li C, Duan C, Fang J, et al. Process intensification and energy saving of reactive distillation for production of ester compounds[J]. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 2019, 27(6): 1307-1323.
- [107] Kim Y J, Hong W H, Wozny G. Effect of recycle and feeding method on batch reactive recovery system of lactic acid[J]. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2002, 19(5): 808-814.
- [108] Sun X, Wang Q, Zhao W, et al. Extraction and purification of lactic acid from fermentation broth by esterification and hydrolysis method[J]. *Separation and Purification Technology*, 2006, 49(1): 43-48.
- [109] Mai T K, Rodtong S, Baimark Y, et al. Membrane-based purification of optically pure D-lactic acid from fermentation broth to poly(D-lactide) polymer[J]. *Journal of Membrane Science*, 2018, 551: 180-190.
- [110] Khunnonkwao P, Boontawan P, Haltrich D, et al. Purification of L(+)-lactic acid from pre-treated fermentation broth using vapor permeation-assisted esterification[J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(12): 1948-1956.
- [111] 刘模. 米根霉发酵液中乳酸酯化水解精制工艺、机理研究[D]. 合肥工业大学, 2011.
- [112] Xu S, Lan K, Li J, et al. Separation of lactic acid from synthetic solutions and the mixture directly derived from corn stover by aqueous two phase extraction[J]. *Separation and Purification Technology*, 2018, 204: 281-289.
- [113] Yu J, Zeng A, Yuan X, et al. Optimizing and scale-up strategy of molecular distillation for the purification of lactic acid from fermentation broth[J]. *Separation Science and Technology*, 2015, 50(16): 2518-2524.

- [114] Chen L, Zeng A, Dong H, et al. A novel process for recovery and refining of l-lactic acid from fermentation broth[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 112: 280-284.
- [115] Chen Z, Xie C, Xu Z, et al. Determination and correlation of solubility data and dissolution thermodynamic data of L-lactide in different pure solvents[J]. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2012, 58(1): 143-150.
- [116] Van Wouwe P, Dusselier M, Vanleeuw E, et al. Lactide synthesis and chirality control for polylactic acid production[J]. *ChemSusChem*, 2016, 9(9): 907-921.
- [117] Tang Z, Chen X, Yang Y, et al. Stereoselective polymerization of rac-lactide with a bulky aluminum/schiff base complex[J]. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 2004, 42(23): 5974-5982.
- [118] Jamshidian M, Tehrany E A, Imran M, et al. Poly-lactic acid: Production, applications, nanocomposites, and release studies[J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2010, 9(5): 552-571.
- [119] Castro-Aguirre E, Iñiguez-Franco F, Samsudin H, et al. Poly(lactic acid)-mass production, processing, industrial applications, and end of life[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, 107: 333-366.
- [120] Masutani K, Kimura Y. Biobased polymers[M]. *Encyclopedia of polymeric nanomaterials*. 2015: 1-7.
- [121] Chen G-X, Kim H-S, Kim E-S, et al. Synthesis of high-molecular-weight poly(L-lactic acid) through the direct condensation polymerization of L-lactic acid in bulk state[J]. *European Polymer Journal*, 2006, 42(2): 468-472.
- [122] Dusselier M, Van Wouwe P, Dewaele A, et al. Shape-selective zeolite catalysis for bioplastics production[J]. *Science*, 2015, 349(6243): 78-80.
- [123] Noda M, Okuyama H. Thermal catalytic depolymerization of poly(L-lactic acid) oligomer into L,L-lactide : Effects of Al, Ti, Zn and Zr compounds as catalysts[J]. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1999, 47(4): 467-471.
- [124] Upare P P, Yoon J W, Hwang D W, et al. Design of a heterogeneous catalytic process for the continuous and direct synthesis of lactide from lactic acid[J]. *Green Chemistry*, 2016, 18(22): 5978-5983.
- [125] Heo S, Park H W, Lee J H, et al. Design and evaluation of sustainable lactide production process with an one-step gas phase synthesis route[J]. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*, 2019, 7(6): 6178-6184.
- [126] Ghadamyari M, Chaemchuen S, Zhou K, et al. One-step synthesis of stereo-pure L,L-lactide from L-lactic acid[J]. *Catalysis Communications*, 2018, 114: 33-36.

- [127] Park H W, Chang Y K. Economically efficient synthesis of lactide using a solid catalyst[J]. *Organic Process Research & Development*, 2017, 21(12): 1980-1984.
- [128] Konoplev I A, Kozlovskii R A, Shvets V F, et al. Preparation of L-lactide of polymerization purity with removal of impurities by fractional melting[J]. *Russian Journal of Applied Chemistry*, 2017, 90(3): 415-422.
- [129] Zhou Z H, Liu X P, Liu L H. Synthesis of ultra-high weight average molecular mass of poly-L-lactide[J]. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 2008, 57(5): 532-542.
- [130] Wang G, Tang S, Cao F, et al. Preparation of high purity lactide using a high-boiling-point alcohol immobilization method[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2018, 57(22): 7711-7716.
- [131] 祖恩峰. L-丙交酯的合成、表征及共聚[D]. 西北工业大学, 2006.
- [132] Tsai C-Y, Du H-C, Chang J-C, et al. Ring-opening polymerization of cyclic esters initiated by zirconium, titanium and yttrium complexes[J]. *RSC Advances*, 2014, 4(28).
- [133] Zeng Z. Recent advances in PEG-PLA block copolymer nanoparticles[J]. *International Journal of Nanomedicine*, 2010.
- [134] Murariu M, Dubois P. PLA composites: From production to properties[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, 107: 17-46.
- [135] Kimura Y. Molecular, structural, and material design of bio-based polymers[J]. *Polymer Journal*, 2009, 41(10): 797-807.
- [136] Sarasua J R, Rodriguez N L, Arraiza A L, et al. Stereoselective crystallization and specific interactions in polylactides[J]. *Macromolecules*, 2005, 38(20): 8362-8371.
- [137] Iannace S, Maffezzoli A, Leo G, et al. Influence of crystal and amorphous phase morphology on hydrolytic degradation of PLLA subjected to different processing conditions[J]. *Polymer*, 2001, 42(8): 3799-3807.
- [138] Sodergard A, Stolt M. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition[J]. *Progress in Polymer Science*, 2002, 27(6): 1123-1163.
- [139] Liu G, Sun J, Zhang J, et al. High titer L-lactic acid production from corn stover with minimum wastewater generation and techno-economic evaluation based on Aspen plus modeling[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 198: 803-810.
- [140] Zhang J, Chu D, Huang J, et al. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009: 718-728.
- [141] 方纯. 乳酸片球菌的全糖代谢能力探究及抗逆性强化改造[D]. 华东理工大学,

2020.

- [142] 李莉. 木质纤维素生物质中 B 族维生素的微生物提取及其发酵应用[D]. 华东理工大学, 2019.
- [143] Gu H, Zhang J, Bao J. Inhibitor analysis and adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* for simultaneous saccharification and ethanol fermentation from industrial waste corncob residues[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 157: 6-13.
- [144] 李充璧. 实用生物化学实验[M]. 广东: 广东高等教育出版社, 2012.
- [145] 韩晌身. 木质纤维素生物质的水溶性组分生物炼制应用与纳米纤维素制备[D]. 华东理工大学, 2019.
- [146] 娄玲, 尹静波, 高战团, 等. L-丙交酯和聚 L-乳酸的制备与性能[J]. *高分子材料科学与工程*, 2003, (02): 72-75.
- [147] 刘敏. 光学纯 L-丙交酯的合成工艺与纯化研究[D]. 哈尔滨理工大学, 2008.
- [148] 姚芳莲, 王浩, 王新英, 等. 基于传统催化剂作用下 L-丙交酯的合成分析[J]. *天津大学学报*, 2004, (01): 6-9.
- [149] Baek S-H, Kwon E Y, Kim Y H, et al. Metabolic engineering and adaptive evolution for efficient production of D-lactic acid in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 100(6): 2737-2748.
- [150] Ishida N, Suzuki T, Tokuhiko K, et al. D-lactic acid production by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, 101(2): 172-177.

硕士期间取得成果

已申请专利:

鲍杰, 贾佳, 何妮玲, 邱忠洋。一种使用木质纤维素生物质为原料生产的手性 L-乳酸合成 L-丙交酯的方法。专利申请号: 202011536358.8。

待发表论文:

Niling He[#], **Jia Jia**[#], Chun Fang, Zhongyang Qiu, Jie Bao*. Accurate coordination on converting all lignocellulose derived sugars into chiral lactic acid and the consequent L-lactide synthesis.

致谢

三年的硕士研究生学习即将结束，在论文撰写即将完成之际，我要向我的老师们、同学们和家人们表示感谢。

首先，感谢鲍杰老师在科研工作中对我的帮助和指导。鲍老师有着渊博的知识、创新的精神、严谨的科研态度，是一位勤勤恳恳搞科研的学术研究者。本论文中的课题是在鲍老师的指导下完成的，每当实验进展不顺利、遇到困到时，鲍老师总是给予我鼓励，并给我一些建议。在鲍老师的谆谆教导下，慢慢的我的独立思考问题和解决问题的能力均有所提高，在此，再次真诚地感谢鲍老师对我的鼓励和鞭策。

其次，感谢张建老师在科研和生活中对我帮助和支持，祝愿张老师工作顺利。感谢李莉师姐对我实验技能和操作方面的指导，把我带进了科研世界的大门，她是一位严谨的科研工作者，亦是一位真诚的伙伴。感谢方纯师姐、何妮玲博士在科研上对我的指导，在他们耐心的帮助下我的实验进展的更加顺利，祝她们事业蒸蒸日上。感谢金慈、颜钊、郑理想、韩涛、张斌、刘祺、王雅等师兄、师姐们和孙鲁欢同学、华珂君同学、陈明星师弟、徐迎迎师妹、李静师妹以及其他生物炼制课题组大家庭的成员对我的帮助和包容；感谢李胜明、展宝睿、张翼、赵晨休、钟驭涛、谢智勇等小伙伴对我的帮助和陪伴。

最后，我要感谢我的家人们。感谢我的父母，他们用青春和汗水换来了我的安稳生活；二十年来，在他们的支持、帮助和关心下我才能够心无旁骛地完成我的学业，感恩他们多年来的无私付出，祝愿他们身体健康、平安顺遂。一路走来，感恩我的姥姥、姥爷、姑父王云、姑姑贾竹青、舅舅孙宝玉、女友韩丽洁等家人们对我的关心和帮助。

贾佳

2021 年 4 月 30 日于上海