

分类号: _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学

学位论文

高手性纤维素 L-乳酸的廉价发酵氮源制备与优化

吴雷 Y45190723

指导教师姓名: _____ 鲍杰 教授 华东理工大学

黄亦钧 高级工程师 青岛蔚蓝生物有限公司

申请学位级别: _____ 硕士 _____ 专业名称: _____ 生物工程 _____

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

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:

评 阅 人:

作者声明

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

论文作者签名：

年 月 日

高手性纤维素 L-乳酸的廉价发酵氮源制备与优化

摘要

手性度高于 99% 的手性乳酸是聚乳酸合成的单体材料。今后数年内全球聚乳酸对前体乳酸的需求量将达到数百至数千万吨，以粮食淀粉作为手性乳酸发酵碳源将会与粮食安全的准则产生严重冲突。因此，以廉价且来源广泛的木质纤维素生物质生产纤维素乳酸将是极具工业应用价值的生产路线。乳酸发酵对氮源营养物质需求较高，常用的工业廉价有机氮源组成成分复杂，并掺杂有混合 L/D-乳酸，对后续乳酸的手性纯度造成严重影响。目前尚缺少不含乳酸的廉价氮源的使用对纤维素乳酸发酵产品手性度影响的评价。

本论文旨在寻找高手性纤维素乳酸发酵的廉价氮源。论文的第一部分对常见有机氮源进行表征及纤维素 L-乳酸发酵评价，其中工业级酵母浸粉和蛋白胨含有约 0.2% (w/w) 的混合手性乳酸；以高光学纯 L-乳酸发酵工程菌 *Pediococcus acidilactici* ZY271 作为发酵菌株，以工业级酵母浸粉和蛋白胨为有机氮源的 L-乳酸发酵产量为 102.0 g/L，手性度为 99.6%，有机氮源成本为 \$2.62/kg 乳酸 (¥16.51/kg 乳酸)；玉米浆干粉含有约 20.0% (w/w) 的混合手性乳酸，以此为有机氮源的 L-乳酸发酵产量为 85.4 g/L，手性度仅为 95.3%，不具备手性乳酸氮源的价值。

本论文的第二部分针对第一部分中使用酵母浸粉和蛋白胨带来的高昂成本、使用玉米浆干粉带来的手性度下降等问题，提出以不含乳酸的棉籽蛋白作为廉价有机氮源来源。对棉籽蛋白进行表征证实其不含乳酸，并分别利用不同酸及蛋白酶对棉籽蛋白进行水解，其中以棉籽蛋白硫酸水解液为有机氮源发酵效果较好，最终 L-乳酸发酵产量达 94.0 g/L，手性度为 99.7%，有机氮源成本为 \$0.19/kg 乳酸 (¥1.20/kg 乳酸)，此外发酵结束后残余葡萄糖为 22.9 g/L。

本论文的第三部分针对第二部分中以棉籽蛋白硫酸水解液为有机氮源带来的发酵残糖问题，通过优化无机氮源的添加量及添加种类，基本实现发酵残糖的清零。对棉籽蛋白水解液+硫酸铵的氮源组合进行技术经济评价，L-乳酸的最低生产成本为 \$0.813/kg (¥5.122/kg)。

本论文的第四部分探索了更多高手性乳酸发酵的廉价有机氮源来源，包括未脱酚棉粕和豆粕。对二者进行表征证实其均不含乳酸，并通过硫酸水解的方式作为氮源添加，最终 L-乳酸发酵产量分别为 85.0 g/L、80.7 g/L，手性度分别为 99.3%、99.5%，有机氮源成本分别为 \$0.05/kg 乳酸 (¥0.32/kg 乳酸)、\$0.06/kg 乳酸 (¥0.38/kg 乳酸)。

综上所述，本论文针对常见的工业廉价氮源含有混合 L/D-乳酸，并导致最终乳酸产品手性度下降的问题，提出以不含乳酸的棉籽蛋白、未脱酚棉粕和豆粕分别作为乳酸发酵的廉价有机氮源来源，并进行了乳酸发酵效果及手性度的评价。结果表明，上述三种廉价植物蛋白水解液均能够实现高手性的 L-乳酸发酵，其中以棉籽蛋白水解液的发酵效

果最佳，在此基础上进一步优化无机氮源的添加，基本实现了对酵母浸粉和蛋白胨等昂贵氮源的替换，为高手性的纤维素 L-乳酸发酵提供了一种工业廉价氮源解决方案。

关键词：纤维素 L-乳酸；手性度；廉价氮源；棉籽蛋白；酸水解

Inexpensive fermentation nitrogen source preparation and optimization for for high chiral purity L-lactic acid fermentation from lignocellulose feedstock

Abstract

Chiral pure lactic acid with chiral purity higher than 99% is the monomer material for polylactic acid synthesis. The global demand for precursor lactic acid will reach hundreds to tens of millions of tons in the next few years, and the use of grain starch as carbon source for chiral lactic acid fermentation will seriously conflict with food security guidelines. Therefore, the production of cellulosic lactic acid from cheap and widely available lignocellulose biomass will be a production route with great industrial application value. Lactic acid fermentation has a high demand for nitrogen source nutrients, and the commonly used industrial cheap organic nitrogen sources have complex compositions and are doped with mixed L/D-lactic acid, which have a serious impact on the chiral purity of lactic acid products. The existing work also lacks the evaluation of the impact of the use of cheap nitrogen sources without lactic acid on the chiral purity of cellulosic lactic acid fermentation products.

This paper aims to find cheap nitrogen sources for the production of cellulosic lactic acid with high chiral purity. In the first part, common organic nitrogen sources were characterized and the fermentation evaluation of cellulosic L-lactic acid was carried out. Industrial-grade yeast extract and peptone contained approximately 0.2% (w/w) of mixed chiral lactic acid, and the highly optical pure L-lactic acid fermentation engineering bacteria *Pediococcus acidilactici* ZY271 was used as a fermentation strain. L-lactic acid fermentation concentration of 102.0 g/L, and chiral purity of 99.6% were obtained using industrial-grade yeast extract and peptone, while the cost of organic nitrogen source was \$2.62/kg lactic acid product (¥16.51/kg lactic acid product). Dried corn steep liquor powder contained approximately 20.0% (w/w) of mixed chiral lactic acid, and the yield of L-lactic acid fermentation was 85.4 g/L, and the chiral purity was only 95.3%, which did not have the application value of chiral lactic acid nitrogen source.

In the second part, cottonseed protein without lactic acid was used as an inexpensive source of organic nitrogen, and the characterization of cottonseed protein confirmed that it does not contain lactic acid. Different acids and proteases were used to hydrolyze cottonseed protein, and L-lactic acid fermentation concentration of 94.0 g/L, and chiral purity of 99.7% were obtained using cottonseed protein sulfuric acid hydrolysate, while the cost of organic nitrogen source was \$0.19/kg lactic acid product (¥1.20/kg lactic acid product). In addition, the glucose

remaining during fermentation was 22.9 g/L.

In the third part, by optimizing the addition amounts and types of inorganic nitrogen sources, the fermentation residual sugar brought by cottonseed protein sulfuric acid hydrolysate as the organic nitrogen source was consumed completely. Finally, the technical and economic evaluation of the nitrogen source combination of cottonseed protein hydrolysate and ammonium sulfate was carried out, and the minimum production cost of L-lactic acid was \$0.813/kg (¥5.122/kg).

In the fourth part, more inexpensive organic nitrogen sources were explored, including undephenolized cottonseed meal and soybean meal. Both were characterized to confirm they do not contain lactic acid. After hydrolyzing the above two plant meals by sulfuric acid, the L-lactic acid yield was 85.0 g/L and 80.7 g/L, and chiral purity was 99.3% and 99.5%, respectively. The cost of organic nitrogen source was \$0.05/kg lactic acid product (¥0.32/kg lactic acid product) and \$0.06/kg lactic acid product (¥0.38/kg lactic acid product), respectively.

In summary, for commonly used industrial inexpensive nitrogen sources contained mixed L/D-lactic acid, and led to a serious decrease on the chiral purity of the lactic acid products. The cottonseed protein, undephenolized cottonseed meal and soybean meal without lactic acid were used as cheap organic nitrogen sources for lactic acid fermentation, respectively, and the fermentation evaluation and chiral purity of lactic acid fermentation were both carried out. The results showed that the above three inexpensive plant protein hydrolysates could achieve chiral pure L-lactic acid fermentation at the same time, of which the fermentation effect of cottonseed protein hydrolysate was the best. Furthermore, the addition of inorganic nitrogen sources was optimized on the basis of cottonseed protein hydrolysate, which basically realized the replacement of expensive nitrogen sources such as yeast extract and peptone, and provided an industrial cheap nitrogen source solution for the production of cellulosic L-lactic acid with high chiral purity.

Key words: cellulosic L-lactic acid; chiral purity; inexpensive nitrogen source; cottonseed protein; acid hydrolysis

目录

第 1 章 绪论	1
1.1 前言	1
1.2 木质纤维素生物炼制	1
1.2.1 预处理	1
1.2.2 脱毒	2
1.2.3 糖化和发酵	2
1.2.4 产品分离和提纯	3
1.3 乳酸概述	3
1.3.1 乳酸的生产	4
1.3.2 乳酸的应用	4
1.3.3 工业乳酸聚合	5
1.4 有机氮源概述	5
1.4.1 常见有机氮源	5
1.4.2 豆粕	6
1.4.3 棉籽蛋白	6
1.4.4 其他农业废弃物	7
1.4.5 有机氮源对乳酸发酵手性度的影响	7
1.5 蛋白水解	9
1.5.1 化学水解	9
1.5.2 酶水解	10
1.6 无机氮源概述	10
1.7 本文的立题依据及主要研究内容	11
第 2 章 常见有机氮源表征及纤维素 L-乳酸发酵评价	12
2.1 引言	12
2.2 材料与方法	12
2.2.1 原料、酶和试剂	12
2.2.2 菌种和培养基	13
2.2.3 干酸预处理与固态脱毒	13
2.2.4 纤维素 L-乳酸发酵	14
2.2.5 分析方法	14
2.2.6 纤维素 L-乳酸得率计算	14

2.2.7 纤维素 L-乳酸转化率计算	15
2.3 结果与讨论	15
2.3.1 常见有机氮源表征	15
2.3.2 常见有机氮源纤维素 L-乳酸发酵及成本评价	16
2.4 本章小结	20
第 3 章 不同水解方式下棉籽蛋白作为高手性乳酸发酵廉价有机氮源	21
3.1 引言	21
3.2 材料与方法	21
3.2.1 原料、酶和试剂	21
3.2.2 菌种和培养基	21
3.2.3 纤维素 L-乳酸发酵	22
3.2.4 棉籽蛋白水解	22
3.2.5 分析方法	22
3.2.6 纤维素 L-乳酸得率计算	23
3.2.7 纤维素 L-乳酸转化率计算	23
3.3 结果与讨论	23
3.3.1 棉籽蛋白表征	23
3.3.2 棉籽蛋白酶水解与摇瓶纤维素 L-乳酸发酵	23
3.3.3 棉籽蛋白酸水解与摇瓶纤维素 L-乳酸发酵	25
3.3.4 棉籽蛋白不同水解方式下生物反应器纤维素 L-乳酸发酵及成本评价	26
3.4 本章小结	29
第 4 章 无机氮源优化及乳酸发酵技术经济评价	30
4.1 引言	30
4.2 材料和方法	30
4.2.1 原料、酶和试剂	30
4.2.2 菌种和培养基	30
4.2.3 纤维素 L-乳酸发酵	30
4.2.4 棉籽蛋白酸水解	30
4.2.5 分析方法	31
4.2.6 纤维素 L-乳酸得率计算	31
4.2.7 纤维素 L-乳酸转化率计算	31
4.3 结果与讨论	31
4.3.1 摇瓶无机氮源优化	31
4.3.2 生物反应器无机氮源优化验证	33
4.3.3 不同氮源组合下纤维素 L-乳酸发酵评价	35

4.3.4 不同氮源组合下纤维素 L-乳酸技术经济评价	36
4.4 本章小结	38
第 5 章 更多高手性乳酸发酵廉价有机氮源的探索	39
5.1 引言	39
5.2 材料和方法	39
5.2.1 原料、酶和试剂	39
5.2.2 菌种和培养基	40
5.2.3 纤维素 L-乳酸发酵	40
5.2.4 植物蛋白水解	41
5.2.5 分析方法	41
5.2.6 纤维素 L-乳酸得率计算	41
5.2.7 纤维素 L-乳酸转化率计算	41
5.3 结果与讨论	41
5.3.1 未脱酚棉粕和豆粕表征	41
5.3.2 以未脱酚棉粕水解液为有机氮源的生物脱毒验证及纤维素 L-乳酸发酵	42
5.3.3 以豆粕水解液为有机氮源纤维素 L-乳酸发酵	44
5.3.4 不同廉价有机氮源下纤维素 L-乳酸发酵及成本评价	46
5.4 本章小结	47
第 6 章 结论与展望	48
6.1 结论	48
6.2 创新点	48
6.3 展望	48
参考文献	50
附录 I 主要仪器设备	59
学术成果	60
致谢	61

第 1 章 绪论

1.1 前言

石油基不可降解塑料的广泛使用导致了当前塑料污染问题的严重性^[1]。我国在《产业结构调整指导目录（2019 年版）》中明确提出，支持包括聚乳酸在内的生物可降解塑料及其系列产品开发、生产与应用。以来源广泛、成本低廉的可再生木质纤维素原料生产的聚乳酸具有广阔的应用前景^[2]。

1.2 木质纤维素生物炼制

木质纤维素生物质是一种成本低廉且来源丰富的资源，可来自于各种木材、农林业废弃物等。其年产量可达 1700 亿吨左右，被认为是替代传统石油基化学品、材料和燃料的潜在候选材料^[3,4]。本质上，木质纤维素生物质是一种复合材料，主要由纤维素、半纤维素和木质素组成^[5,6]。木质纤维素各成分的占比主要取决于植物种类，通常木质纤维素含有 29-47%的纤维素、25-35%的半纤维素和 16-31%的木质素^[7-9]，其中长的纤维素微纤维被成束的半纤维素多糖包围并相互连接，而果胶和木质素填充了结构中剩余的空间^[10]。木质纤维素生物炼制是将各种来源的木质纤维素生物质转化为各种增值产品，如生物油、生物炭或其他生物基化学品^[2]。生物炼制加工顺序一般为预处理、脱毒、糖化和发酵、产品分离和提纯。

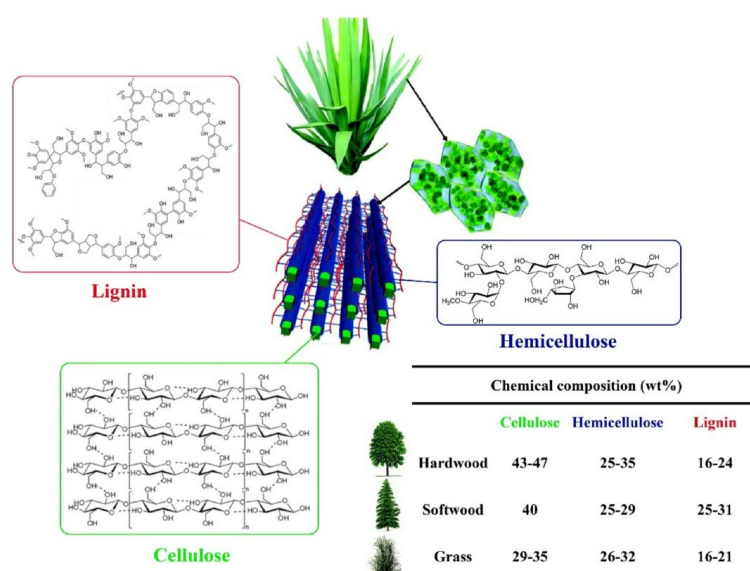


图 1.1 木质纤维素生物质结构和组成^[11,12]

Fig. 1.1 Main structure and components of lignocellulose biomass^[11,12]

1.2.1 预处理

生物炼制的前提是从木质纤维素中得到可发酵糖，由于木质纤维素材料具有的复杂

结构使得其中的纤维素组分无法被直接水解，而预处理方法则可以破坏木质纤维素结构^[13]，促进半纤维素和木质素的降解，使得纤维素结构充分暴露，为后期水解得到单糖奠定重要基础。

不同的预处理方法包括化学、物理和生物方法^[14,15]。这些方法在实际运用过程中，往往会带来很多问题，包括：（1）产生大量的废水；（2）需要极高的能耗；（3）伴随有毒物质的大量排放；（4）预处理过程中大量糖的损失，导致发酵得率下降。

本实验室于 2011 年发明的一种干酸预处理方式，同时结合了物理和化学方法，通过高温蒸汽与无机强酸的联合作用来有效降解木质纤维素的结构^[16]，与传统的预处理相比，具有以下优点：（1）全过程不产生任何废水；（2）预处理过程中所需的蒸汽量大大降低，意味着能耗的降低；（3）产生的有毒物质基本保留在预处理后物料中；（4）处理后的原料能够实现高固含量的糖化和发酵。

1.2.2 脱毒

在经历强烈的预处理环境后，木质纤维素结构被破坏的同时会不可避免地发生一些副反应^[17]。如半纤维素在降解产生木糖、乙酸等同时，部分木糖会进一步降解成 2-呋喃醛（糠醛）；纤维素在降解产生葡萄糖的同时，部分葡萄糖会进一步降解成 5-羟甲基-2-呋喃醛（5-Hydroxymethylfurfural, HMF）；木质素会降解产生酚醛类（香兰素、丁香醛等）。这些抑制物主要保留在预处理后物料中，而抑制物的存在会对微生物产生强烈的毒害作用，从而影响木质纤维素的转化率和微生物发酵的得率^[18-20]，因此必须要对抑制物进行脱除。

本实验室在预处理后的原料中经过筛选培养得到两种生物脱毒菌株，树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1^[21]和宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89^[22]，两种菌株都具有选择性脱毒的能力，在降解抑制物的同时，可以很好的保留可发酵单糖^[23]，其中 *P. variotii* FN89 具有更好的低 pH 环境和高温耐受性。

传统的脱毒过程是将脱毒菌株孢子与预处理完物料混合后，在保持一定温度、水分和通氧环境下进行固态静置脱毒，*A. resinae* ZN1 和 *P. variotii* FN89 两种菌株都可以做到。而 *P. variotii* FN89 由于其菌丝不容易断裂，在液态高搅拌转速中体系中生长良好，因此又可以对物料进行液态搅拌脱毒。两种脱毒方式都可以实现对弱酸、呋喃等主要抑制物的完全脱除，但相比之下液态脱毒时间更短、更容易控制脱毒终点、可发酵糖尤其是木糖损失也较少。

液态脱毒首先需要对预处理物料进行一定时间的糖化以降低体系粘稠度，方便后续液态脱毒所需的高搅拌转速，因此液态脱毒需要对传统的生物炼制加工顺序（预处理、固态脱毒、糖化和发酵）进行调整，调整后的生物炼制加工顺序为预处理、糖化、液态脱毒和发酵。

1.2.3 糖化和发酵

经过预处理和脱毒两步后的木质纤维素会保留大部分纤维素结构，而纤维素需要经过化学水解^[24]或酶水解^[25]将其进一步转化为可溶性单糖。化学水解一般在高温高压下进

行,在实际过程中容易造成糖的水解过度,从而生成糠醛等抑制物^[26]。而酶水解的条件相对温和,能够高效、快速地降解木质纤维素结构,并同时避免单糖的过度降解^[27]。

木质纤维素经糖化后通常采取生物发酵的方式实现产品的转化。生物发酵主要分为分步糖化和发酵^[28]、同步糖化与发酵^[29]及同步糖化与共发酵(Simultaneous saccharification and co-fermentation, SSCF)^[30]。本研究中纤维素乳酸发酵为 SSCF 模式,在 SSCF 过程中,预处理后木质纤维素的固体部分在酶的催化下逐渐水解成含有葡萄糖、木糖和不溶性木质素的液体浆液,与此同时,菌体可以不断地消耗各种糖来维持生长和代谢,极大地提高了发酵效率^[31]。

1.2.4 产品分离和提纯

产品分离和提纯作为生物炼制的最后一步,是通过一系列分离纯化方法从木质纤维素发酵醪液中得到最终目标产品。纤维素 L-乳酸的分离纯化步骤主要包括:固液分离、脱色、结晶、酸解和精制^[32](图 1.2)。第一步固液分离是通过离心的方法除去不溶性木质素残渣、微生物菌体及纤维素酶蛋白等;第二步脱色是通过活性碳的吸附进一步除去木质素衍生的色素物质;第三步结晶是将得到的乳酸钙溶液通过蒸发浓缩,过饱和溶液再结晶成固体沉淀物;第四步酸解是将 L-乳酸钙沉淀物再一次溶解后,用硫酸酸化为游离 L-乳酸,其中硫酸钙固体通过过滤方法除去;第五步精制是将得到的粗制的 L-乳酸溶液通过阳离子交换树脂柱去除金属离子,最终得到精制的 L-乳酸纯品。

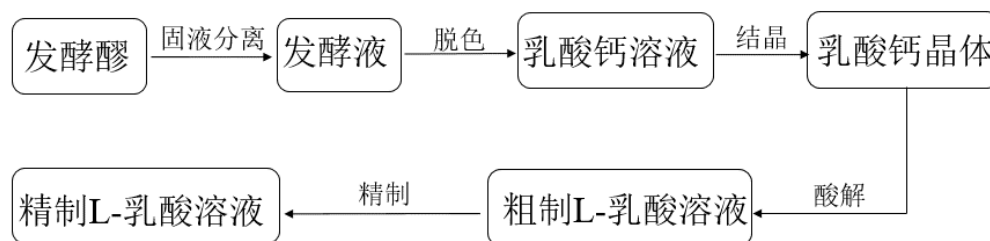
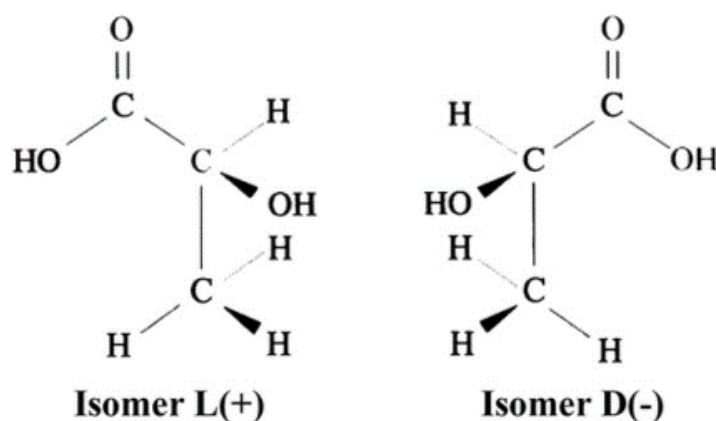


图 1.2 纤维素 L-乳酸分离和提纯

Fig. 1.2 Separation and purification of cellulosic L-lactic acid

1.3 乳酸概述

乳酸(2-羟基丙酸, $\text{CH}_3\text{-CH(OH)-COOH}$)是一种天然有机酸,在食品行业有着悠久的历史^[33-35]。乳酸是具有手性碳原子最简单的 2-羟基丙酸,以两种立体异构体存在:L-乳酸、D-乳酸(图 1.3)^[36],其中 L-乳酸和 D-乳酸互为旋光异构体,而 DL-乳酸为混合手性乳酸,是 L-乳酸和 D-乳酸的混合物。L-乳酸因其左旋的特征,可以被人体正常代谢而无副作用,而 D-乳酸往往对人体的正常代谢有害^[37]。纯品乳酸是一种无色的液体,具有吸湿性,工业品的颜色为无色至浅黄色。

图 1.3 L-/D-乳酸结构式^[36]Fig. 1.3 Structural formula of L-/D-lactic acid^[36]

1.3.1 乳酸的生产

乳酸可通过微生物发酵以及化学合成两种途径进行生产。化学合成法包括乳腈法、丙酸法等^[38,39]，化学合成的方法总是导致产生混合手性的乳酸，这是该方法的一个主要缺点^[40]。相反，微生物乳酸发酵在利用可再生的生物质资源、低能耗以及通过选择合适的菌株生产高手性度乳酸方面具有巨大优势^[41]。目前，全球几乎所有乳酸都是通过发酵路线生产的。

用于乳酸发酵的微生物菌种主要有乳球菌、肠球菌、链球菌和一些乳酸杆菌等^[42]。乳酸发酵的模式主要分为分批发酵、补料分批发酵及连续发酵，其中分批发酵和补料分批发酵是最常用的两种模式^[43]，而连续发酵模式因其经济性主要应用于工业乳酸发酵^[44]。Kuo 等^[43]以葡萄糖为原料，利用副干酪乳杆菌在补料分批发酵模式下生产 L-乳酸，乳酸产量达 215.3 g/L，发酵速率为 1.79 g/L/h。Villadsen 等^[45]以脱脂米糠为原料，利用鼠李糖乳杆菌在补料分批发酵模式下生产 L-乳酸，乳酸产量达 210 g/L，发酵速率为 2.56 g/L/h。Hama 等^[46]以玉米秸秆水解液为原料，利用植物乳杆菌在分批发酵模式下生产 D-乳酸，乳酸产量达 102.3 g/L，发酵速率为 0.731 g/L/h。Lee 等^[47]以葡萄糖为原料，利用粪肠球菌在连续发酵模式下生产 L-乳酸，在稀释率为 0.04/h 条件下 L-乳酸的产量和发酵速率分别为 90 g/L 和 3.72 g/L/h。

根据发酵的所用原料不同，又分为第一代和第二代乳酸^[48]。第一代乳酸生产来自以淀粉和糖等粮食作物为基础的原料，但随着乳酸的大规模应用，所需的粮食原料也将大大增加，这会进一步加剧粮食价格上涨等问题^[49]。考虑到与第一代原料相关的问题，非食用第二代原料已成为替代选择，包括木质纤维素生物质、有机废物和食物废物^[50,51]。目前，来自农业、农工业和林业的木质纤维生物质因其丰富、廉价和可再生性，在乳酸发酵原料上具有巨大的应用潜力^[52]。

1.3.2 乳酸的应用

乳酸及其盐类等衍生物目前已广泛应用于食品、医药等传统应用领域。乳酸在传统

领域的主要应用如下：在干酪生产过程中，乳酸释放导致的 pH 值降低会触发酪蛋白胶束的聚集^[53]；在谷物生产领域中，由于存在微生物对原料进行乳酸发酵（例如玉米湿法加工），乳酸会自发形成，导致香气和味道的变化，并导致 pH 值降低，从而阻止病原菌的生长^[54]；在化妆品工业中，乳酸用于制造卫生和美容产品，因为它对皮肤具有保湿、抗菌的作用，包括乳酸衍生物（如乳酸酯）因其吸湿性和乳化性也被广泛使用于口腔卫生产品^[55]。

乳酸的聚合物聚乳酸，具有良好的物料性能和生物可降解性，在合适的环境下最终可降解为水和二氧化碳^[56]。生物可降解材料的使用可以减少与生产相关的碳足迹，而聚乳酸比传统的石油基塑料材料具有更低的碳足迹^[57]，因此以聚乳酸为原料的商品包装具有潜在的巨大市场^[37]。在医学领域中，聚 L-乳酸因其生物相容性及良好的力学性能等被广泛应用于外科缝线、骨螺钉等^[58]；在纺织工业中，聚乳酸纤维被认为是可与传统的聚酯纤维、尼龙纤维相媲美的绿色纤维^[59]；在电子工业中，聚乳酸材料因其环保和可降解性可应用于电子产品材料中^[60]。

根据乳酸在不同领域的应用，对于乳酸手性纯度也有不同的要求，通常用于食品级乳酸的手性度在 50%-88%，而聚合级的乳酸的手性度要求 $\geq 99\%$ ^[61]。根据市场调研机构 IHS Markit 在 2020 年对于中国市场范围的统计，用于食品行业的乳酸约占整体市场的 70%，其次为聚乳酸行业，仅占整体市场的 10%左右。可见目前大部分乳酸产能都应用于传统的食品行业，而随着可降解材料聚乳酸的全面推广，聚合级的乳酸也将迎来巨大的市场需求。

1.3.3 工业乳酸聚合

聚乳酸有三种形式：聚 L-乳酸、聚 D-乳酸、聚 DL-乳酸。纯同分异构体 L-和 D-聚乳酸比消旋 DL 形式更有价值，每种同分异构体都有其特定的性能^[62]。

工业乳酸聚合对乳酸产品有较高要求，以生产聚 L-乳酸为例，一般要求 L-乳酸的浓度超过 100 g/L，L-乳酸的手性度超过 99%，葡萄糖到乳酸的得率要接近 100%（发酵无残糖），从而可以生产低成本的聚乳酸^[63]。

1.4 有机氮源概述

有机氮是指存在于蛋白质、氨基酸、核酸等含氮有机物中的氮，而用于微生物发酵的有机氮源一般是来自各类蛋白质，主要包含两大类：一类是常见的有机氮源，这类氮源是将含有高蛋白的原料经过精细化加工得到的一种速效、方便的氮源成品，可以直接进行添加，包括酵母浸粉、蛋白胨、玉米浆干粉等；剩下的是来自农业废弃物及农副产品为主的其他有机氮源，这类氮源一般需要进行水解后才能添加，包括豆粕、棉粕、棉籽蛋白等。

1.4.1 常见有机氮源

酵母浸粉是一种以面包酵母或啤酒酵母为原料，采用自溶或加酶水解工艺，经分离、浓缩、喷雾干燥而得到的粉状或膏状产品。酵母浸粉粗蛋白含量为 60-70%，总氮量在

10%以上,富含氨基酸、维生素、核苷酸、核苷等多种营养物质,是一种精细有机氮源。酵母浸粉作为乳酸发酵过程中最常用的有机氮源,占总工艺成本的 40%左右,因此它是影响乳酸生产经济性的主要原因^[64]。

蛋白胨是动植物或微生物蛋白原料在使用酸或酶水解后,再经一系列工艺制成的粉剂,外观呈淡黄色,具有肉香的特殊气息。蛋白胨粗蛋白含量为 65-75%,总氮量在 10%以上,主要为微生物生长提供氨基酸、生长因子等营养物质。蛋白胨也是微生物生长的重要营养来源,通常与酵母浸粉搭配作为复合有机氮源使用。He 等^[32]以酵母浸粉和蛋白胨作为有机氮源,利用乳酸片球菌在分批发酵模式下生产 L-乳酸,乳酸产量可达 129.4 g/L,发酵速率为 1.80 g/L/h,手性度为 99.6%。

玉米浆干粉是制备玉米淀粉的副产物,呈粘性,具有糊状的芬芳气味,颜色为黄棕色。玉米浆干粉主要成分是氨基酸和多肽类,含有丰富的维生素和生长因子^[65],粗蛋白含量为 40-50%,总氮量在 6%以上。玉米浆干粉在生产工艺中,需要对玉米淀粉进行浸泡,由于浸泡液中含有丰富的营养物质,极易染上各种乳酸菌^[54],这就导致生产的玉米浆干粉中存在大量混合手性乳酸,通常乳酸含量约 15-25%。玉米浆干粉主要用于家禽饲料、生物肥料和发酵培养基等,其用于微生物培养基非常普遍,还能促进青霉素等生物合成^[66]。Wang 等^[67]以玉米浆作为有机氮源,利用凝结芽孢杆菌和鼠李糖乳杆菌在分批发酵模式下生产 L-乳酸,乳酸产量可达 121 g/L,发酵速率为 2.18 g/L/h,手性度未提及。

1.4.2 豆粕

大豆粕,一般简称豆粕,是大豆提油之后制成的一种高蛋白农副产品。我国是世界上主要的豆粕生产国之一,豆粕是棉籽粕、花生粕等十多种动植物油粕产品中产量最大,应用最广泛的一种。豆粕的营养价值接近棉籽蛋白,粗蛋白含量为 40-55%,总氮量在 6%以上,富含碳水化合物及多种矿物质^[68]。豆粕作为一种高蛋白质来源,是制作家禽饲料的主要原料,约 80%以上的豆粕被用于饲料添加,此外还可以用于食品、化妆品和微生物发酵领域。Liang 等^[69]以豆粕水解液作为有机氮源,利用德氏乳杆菌在补料分批发酵模式下生产 D-乳酸,乳酸产量可达 112.3 g/L,发酵速率为 2.4 g/L/h,手性度为 99.6%。

此外,由于大豆本身也含有丰富的蛋白质和营养物质,也可以直接作为有机氮源。Tian 等^[70]以大豆水解液作为有机氮源,利用嗜热乳杆菌在分批发酵模式下生产 L-乳酸,乳酸产量可达 114.6 g/L,发酵速率为 2.61 g/L/h,手性度未提及。

1.4.3 棉籽蛋白

棉粕是棉籽脱去皮棉再经榨油后得到的副产品。我国是产棉大国,脱去皮棉后的棉籽主要用于棉籽油生产,而榨油剩下的棉粕也是一种重要的蛋白质资源。未脱酚棉粕的蛋白质含量因棉籽质量及加工方式的不同而存在一定差异^[71]。未脱酚棉粕粗纤维含量在 5-15%,粗脂肪含量在 3-10%,粗蛋白含量为 40-55%,总氮量在 6%以上,还含有多种维生素等营养物质^[72]。由于未脱酚棉粕含有的主要抗营养因子棉酚,是一种黄色多酚物质,其含有的活性醛基或羟基会与蛋白质进行结合,进而破坏其活性^[73]。未脱酚棉粕主

要应用是在农业中作为反刍动物的饲料蛋白源之一^[74]，很少用作微生物发酵的有机氮源。

棉籽蛋白是由棉籽经脱壳、去绒，在低温下一次性浸油、沥干，再经过脱棉酚处理后制成的一种高蛋白农副产品。棉籽蛋白与普通未脱酚棉粕相比，低温浸油的工艺对氨基酸的破坏较小，同时脱除了主要的抗营养因子棉酚^[75]，使得棉籽蛋白含有更高的粗蛋白与营养价值。棉籽蛋白粗蛋白含量为 50-60%，总氮量在 8%以上，富含多种氨基酸，尤其是谷氨酸和精氨酸^[76]，此外还含有丰富的矿物质、维生素和脂质。棉籽蛋白可用于食品添加、饲料及生物发酵领域^[77]。Bai 等^[78]以棉籽蛋白水解液作为有机氮源，利用芽孢乳杆菌在补料分批发酵模式下生产 D-乳酸，乳酸产量可达 107.2 g/L，发酵速率为 1.19 g/L/h，手性度为 99.2%。

相比于豆粕广泛地应用于动物饲料^[79]，未脱酚棉粕和棉籽蛋白的应用范围较小。随着棉花价格的持续下跌，开发棉粕的多种利用价值将为棉花生产商和加工商提供经济刺激^[80]。

1.4.4 其他农业废弃物

除了豆粕、棉粕外，其他的粕类如花生粕、菜籽粕等来自相应农作物榨油的废弃物也可以作为微生物发酵的有机氮源，但这些粕类往往因氨基酸组成不佳或粗蛋白含量较低导致应用也较少。Wang 等^[81]以花生粕水解液为有机氮源，利用芽孢乳杆菌在补料分批发酵模式下生产 D-乳酸，乳酸产量可达 207 g/L，发酵速率为 3.8 g/L/h，手性度为 99.3%。Brock 等^[82]以菜籽粕水解液为有机氮源，利用芽孢乳杆菌在补料分批发酵模式下生产 D-乳酸，乳酸产量可达 221 g/L，发酵速率为 1.55 g/L/h，手性度未提及。

此外，一些来自粮食作物的废弃物也可以作为微生物发酵的有机氮源。Lu 等^[83]以麦麸水解液为有机氮源，利用鼠李糖乳杆菌在分批发酵模式下生产 L-乳酸，乳酸产量可达 57.61 g/L，发酵速率为 1.60 g/L/h，手性度未提及。Wang 等^[84]以脱脂米糠水解液同时作为碳源和氮源，利用鼠李糖乳杆菌在补料分批发酵模式下生产 L-乳酸，乳酸产量可达 210 g/L，发酵速率为 2.56 g/L/h，手性度未提及。

1.4.5 有机氮源对乳酸发酵手性度的影响

在乳酸发酵过程中，有机氮源添加可能会对乳酸产品的手性纯度造成影响，尤其是来自农业废弃物或副产品的廉价有机氮源。由于乳酸菌在自然界中分布极为广泛^[85]，这类有机氮源含有丰富的蛋白质和营养物质，并且通常在开放的环境中进行加工处理，这就导致加工过程中极易染上各种乳酸菌，而这些乳酸菌很难保证为单一手性的乳酸生产菌株，所以来自农业废弃物或副产品的廉价有机氮源往往大量含有混合手性的乳酸。在很多关于利用廉价有机氮源生产乳酸的文献报道中，很少提及或不提及最终乳酸产品的手性度，往往也是因为廉价有机氮源的添加导致混合手性乳酸的引入，从而造成最终乳酸产品手性度的下降。表 1.4 总结了一些廉价有机氮源的使用对乳酸发酵手性度的影响。

表 1.4 廉价有机氮源的使用对乳酸发酵手性度的影响

Table 1.4 Effect of cheap organic nitrogen source on chiral purity of lactic acid fermentation

发酵菌株	发酵模式	碳源	廉价有机氮源	其他营养成分	乳酸产品及手性度	产量 (g/L)	发酵速率 (g/L/h)	文献来源
粪肠球菌	分批发酵	木材水解液	玉米浆	无	L-乳酸, 96.7%	48.6	1.4	[86]
凝结芽孢杆菌、 鼠李糖乳杆菌	分批发酵	甜高粱汁	玉米浆	无	L-乳酸, 未提及	121	2.18	[67]
嗜热乳杆菌	分批发酵	甜高粱汁	大豆水解液	无	L-乳酸, 未提及	114.6	2.61	[70]
嗜热乳杆菌	分批发酵	甜高粱汁	大豆水解液	维生素 C、 柠檬酸氢铵等	L-乳酸, 未提及	118.8	3.71	[87]
芽孢乳杆菌	补料分批发酵	葡萄糖	菜籽粕水解液	色氨酸、 维生素 B	D-乳酸, 未提及	221	1.55	[82]
鼠李糖乳杆菌	分批发酵	橡子淀粉 水解液	麦麸水解液	柿子汁	L-乳酸, 未提及	57.61	1.60	[83]
鼠李糖乳杆菌	补料分批发酵	脱脂米糠 水解液	脱脂米糠 水解液	维生素 B	L-乳酸, 未提及	210	2.56	[84]

1.5 蛋白水解

来自农业废弃物或农副产品等植物类蛋白虽然含有丰富的氮源，但这些氮源主要以大分子蛋白质形式存在^[88]，必须要经过水解将蛋白质进一步降解成肽和氨基酸才能供微生物生长利用。常见的水解方式包括化学水解和酶水解^[89]。

1.5.1 化学水解

化学水解在过去一直是蛋白水解的首选方法，主要因其成本低廉和操作简单，但化学水解通常是一个难以控制的过程，往往导致最终水解产物发生相应的化学变化以及功能特性的改变^[90]。化学水解通过高温和高压条件下，使用强烈的化学溶剂进行蛋白质水解，主要包括酸水解和碱水解。

酸水解通常是在高温条件下通过强酸作为催化剂水解蛋白质，最常见的酸包括硫酸和盐酸。酸水解蛋白的应用主要是作为加工肉类、饼干和汤混合物的调味剂，也可以用作微生物发酵的氮源^[90]。Thomas 等^[91]通过盐酸水解鱼蛋白用于食品加工，在 118 °C、6 mol/L 盐酸条件下水解 18 h 后得到鱼蛋白完全水解物。Brock 等^[82]通过硫酸水解菜籽粕用于乳酸发酵的氮源，在 121 °C、3 mol/L 硫酸条件下水解 20 min 得到菜籽粕水解液。虽然酸水解对蛋白的水解较为彻底，但同样有很多弊端，比如对设备的腐蚀很大、水解过程不容易控制以及过度水解会破坏营养物质等^[92]。

碱水解通常是在高温条件下通过强碱作为催化剂水解蛋白质，最常见的碱包括氢氧化钡和氢氧化钠。碱处理通常在食品工业中用于回收和溶解蛋白质。Tannenbaum 等^[93]通过氢氧化钠水解鱼蛋白，在 95 °C、pH 值为 12.5 的条件下水解 20 min 可将大部分蛋白质水解成氨基酸。在水解过程中，碱水解会发生氨基酸的外消旋化，产生的 D-氨基酸无法被人体所吸收，此外也会产生一些有毒物质如赖丙氨酸等（图 1.5）^[94]。与酸水解一样，碱水解对于设备的腐蚀性也很大。

蛋白质的酸水解比碱性条件下的水解更为常用，此外蛋白质在经历酸水解或碱水解后，体系 pH 值会发生很大的变化，水解之后一般都需要使用相应的中和剂来调节 pH^[90]。

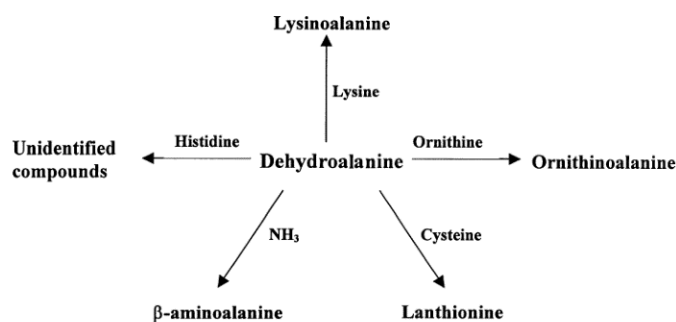


图 1.5 碱水解中可能产生的化学物质^[94]

Fig. 1.5 Chemicals that may result from alkaline hydrolysis^[94]

1.5.2 酶水解

酶水解是通过酶与底物的专一性结合来破坏蛋白质结构^[95]，使用的酶主要为蛋白酶。根据蛋白酶作用位点在肽链中的位置，可将蛋白酶划分为内切蛋白酶和外切蛋白酶两类^[96]。内切蛋白酶通常在特定的残基处水解蛋白质分子内的肽键以产生相对较大的肽，外切蛋白酶通过水解末端肽键，系统地从 N 端或 C 端开始水解。酶水解通常使用内切蛋白酶，但有时内切蛋白酶与外切蛋白酶结合才能实现更完全的降解^[97]。酶水解蛋白主要应用于食品饲料等领域，也可以用于微生物发酵的氮源。黄等^[98]通过两种蛋白酶水解棉籽蛋白用于饲料添加，在 50-60 °C 下、pH 值为 6-8 的条件下分别使用中性蛋白酶和风味蛋白酶水解共 4.5 h 后得到棉籽多肽。Liang 等^[69]通过多种酶水解豆粕用于乳酸发酵的氮源，同时使用核酸内切酶、内切蛋白酶和风味蛋白酶这三种酶的组合，在 55 °C、pH 值为 7.5-8.0 的条件下水解 6 h 后得到豆粕水解液。

酶水解有很多优点，如反应温和、产品纯度高，不会像化学水解容易过度降解蛋白质而发生一些外消旋反应。但酶水解是一种不彻底的水解，其主要的水解产物是肽，而不是更小分子的氨基酸^[99]。此外酶水解也有很多缺点，比如大量使用酶带来的成本问题、在反应结束时需要通过调节 pH 或热处理使酶失活，同样增加了加工成本^[100]。

表 1.6 分别总结了化学水解和酶水解的优缺点。

表 1.6 化学水解和酶水解的对比

Table 1.6 Comparison of chemical hydrolysis and enzymatic hydrolysis

水解方式	优点	缺点
化学水解	水解彻底、简单价廉	氨基酸损失较大、设备腐蚀严重
酶水解	条件温和、易于控制	水解不彻底、成本较贵

1.6 无机氮源概述

无机氮的分子结构简单，主要包括氨氮和硝氮。氨氮包括氨态氮 (NH_3) 和铵盐态氮 (NH_4^+)，硝氮包括硝酸盐氮 (NO_3) 和亚硝酸盐氮 (NO_2)。用于乳酸发酵的无机氮源主要为铵盐，如柠檬酸铵、柠檬酸氢二铵、碳酸氢铵等，这类氮源可迅速被微生物吸收利用，通常和有机氮源搭配使用。Unban 等^[101]以玉米浆为有机氮源、柠檬酸铵为无机氮源，利用屎肠球菌在分批发酵模式下生产 L-乳酸，乳酸产量可达 93.07 g/L，发酵速率为 1.94 g/L/h。Qiu 等^[102]以酵母浸粉和蛋白胨为有机氮源、柠檬酸氢二铵为无机氮源，利用乳酸片球菌在分批发酵模式下生产 D-乳酸，乳酸产量可达 130.8 g/L，发酵速率为 1.82 g/L/h。Sikder 等^[103]以酵母浸粉和蛋白胨为有机氮源、碳酸氢铵为无机氮源，利用植物乳杆菌在连续发酵模式下生产乳酸，乳酸产量可达 119 g/L，发酵速率为 59 g/L/h。

1.7 本文的立题依据及主要研究内容

手性度高于 99% 的手性乳酸是聚乳酸合成的单体材料，随着聚乳酸在内的可降解材料全面推广，高手性的乳酸原料将迎来巨大的需求。与此同时，木质纤维素生物质因其廉价且来源广泛，在替代目前以淀粉粮食类为主要原料的乳酸发酵中具有巨大的优势。而另一方面，氮源也是影响乳酸经济生产的主要限制因素之一，且乳酸发酵对氮源营养物质需求较高。在以常见的工业廉价氮源生产纤维素 L-乳酸过程中，由于廉价氮源组成成分复杂，并掺杂有混合 L/D-乳酸，从而会对后续乳酸的手性纯度造成严重影响。目前的工作也缺少不含乳酸的廉价氮源的使用对纤维素乳酸发酵产品手性度影响的评价。

棉籽蛋白是一种廉价的植物蛋白，粗蛋白含量高且开发利用程度较低，经过实验鉴定不含乳酸存在，是实现高手性乳酸发酵潜在有机氮源来源。因此，本研究以不含乳酸的棉籽蛋白为基础，主要解决了棉籽蛋白作为有机氮源的水解方式及乳酸发酵过程产生的残糖等问题，最终乳酸发酵结果基本达到了以酵母浸粉和蛋白胨等昂贵有机氮源的发酵水平，为高手性的纤维素乳酸发酵提供了一种工业廉价氮源解决方案。具体的研究内容如下：

(1) 对常见有机氮源（酵母浸粉、蛋白胨、玉米浆干粉）进行表征，测定其粗蛋白含量及乳酸含量，并分别评价其乳酸发酵效果、手性度及乳酸生产的有机氮源成本。

(2) 对棉籽蛋白进行表征，测定其粗蛋白含量及乳酸含量。探究不同水解方式（酶水解、酸水解）对棉籽蛋白水解程度的影响，并分别评价不同水解方式下乳酸发酵效果、手性度及乳酸生产的有机氮源成本。

(3) 以棉籽蛋白酸水解液为有机氮源，探究无机氮源的添加量及添加种类对发酵残糖的影响，并分别评价不同氮源组合下乳酸发酵效果、手性度及乳酸生产的总原料成本。

(4) 对未脱酚棉粕和豆粕进行表征，测定其粗蛋白含量及乳酸含量。尝试利用生物脱毒菌株 *P. variotii* FN89 在液态脱毒下方式对未脱毒物料和未脱酚棉粕水解液进行共同脱毒处理，并分别评价未脱酚棉粕水解液和豆粕水解液作为有机氮源乳酸发酵效果、手性度及乳酸生产的有机氮源成本。

第 2 章 常见有机氮源表征及纤维素 L-乳酸发酵评价

2.1 引言

碳源和氮源底物是乳酸经济生产的主要限制性因素。非粮原料，如木质纤维素生物质，被认为是一种廉价、广泛、可再生的碳源，可用于微生物发酵生产乳酸，并且对人类食物链没有任何的影响。此外，乳酸生产的成本可以通过使用廉价的氮源进一步减少。由于乳酸的产量严格地依赖于菌株的生长情况，因此乳酸发酵培养基中必须添加特定的营养物质包括矿物质盐、B 族维生素、氨基酸、嘌呤和嘧啶，来确保菌体最佳的生长。文献表明，在各种复合有机氮源中，酵母浸粉和蛋白胨是乳酸生产的最适氮源组合，但这种有机氮源成本较高，其中酵母浸粉约占总生产成本的 38%^[64]。为了实现利用廉价的工业副产品来部分或完全取代酵母浸粉作为乳酸发酵的有机氮源，开展了很多工作。尽管许多农业废弃物或副产品，如玉米浆干粉、麦麸水解液、脱脂米糠水解液等^[67,83,104]，被证实了可在不同菌株中实现对昂贵氮源的替代。但替代氮源的使用可能会导致乳酸产量的降低或菌株生长期的增加。更为重要的是，农业废弃物或副产品的组成成分复杂，极有可能引入混合手性乳酸，对后续乳酸产品的光学纯度造成影响。而现有的工作缺少各类有机氮源的使用对乳酸手性度影响的评价。

在本实验室之前的研究中，发现并经过代谢工程改造得到了一株在木质纤维素体系中生长良好、可代谢利用多种单糖的高光学纯乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* ZY271。本章节以此为出发菌株，首先对酵母浸粉、蛋白胨和玉米浆干粉这三种常见有机氮源进行表征，测定其粗蛋白含量及乳酸含量，然后分别评价其乳酸发酵效果、手性度及乳酸生产的有机氮源成本。

2.2 材料与方法

2.2.1 原料、酶和试剂

小麦秸秆收获于 2021 年，产自河南南阳。根据 NREL 组分测定方法^[105,106]，测得小麦秸秆纤维素含量为 34.3%，半纤维素含量为 21.3%，灰分含量为 10.6%，木质素含量为 22.1%，其中各组分均按照干重计算。

纤维素酶 Cellic Ctec 2.0 购自北京诺维信，根据 Brandford 方法^[107]测得酶蛋白含量为 81.5 mg/mL，根据 NREL 方案^[108]测得滤纸酶活为 256.0 FPU/mL，根据 Ghose 方法^[109]测得纤维二糖酶活为 4653.3 CBU/mL。

糖化酶购自无锡杰能科，根据说明书，酶活为 103,900 U/mL。

试剂级酵母浸粉和蛋白胨购自 Oxoid (Hampshire, UK)，工业级酵母浸粉和蛋白胨购自安琪酵母有限公司 (湖北，中国)，玉米浆干粉分别购自安琪酵母 (湖北，中国) 以及西王集团 (山东，中国)。

其他试剂级产品如柠檬酸氢二铵、一水合硫酸锰等均购自国药集团。

所用试剂均由当地供应商提供报价，美元对人民币的汇率被设定为 6.3 元。

2.2.2 菌种和培养基

(1) 菌株

L-乳酸生产菌株为 *P. acidilactici* ZY271 (CGMCC 13611)，是 *P. acidilactici* TY112 (CGMCC 8664) 经代谢工程改造得到，可发酵利用多种单糖。

生物脱毒菌株为 *P. variotii* FN89 (CGMCC 17665)，是本实验室从预处理后物料筛选得到，可代谢降解多种抑制物。

(2) 培养基

P. acidilactici ZY271 种子培养基为简化 Man-Rogosa-Sharp (MRS) 培养基，包括：20 g/L 葡萄糖、10 g/L 蛋白胨 (试剂级)、10 g/L 酵母浸粉 (试剂级)、5 g/L 无水乙酸钠、2 g/L 柠檬酸氢二铵、2 g/L 磷酸氢二钾、0.58 g/L 七水硫酸镁、0.25 g/L 一水硫酸锰。

P. acidilactici ZY271 发酵培养基-1 为：10 g/L 蛋白胨、15 g/L 酵母浸粉、2 g/L 柠檬酸氢二铵、0.25 g/L 一水硫酸锰。

P. acidilactici ZY271 发酵培养基-2 为：20 g/L 玉米浆干粉、2 g/L 柠檬酸氢二铵、0.25 g/L 一水硫酸锰。

P. variotii FN89 短期保藏在 Potato-Dextrose-Agar (PDA) 培养基，包括：200 g/L 去皮土豆、20 g/L 葡萄糖、25 g/L 琼脂。

2.2.3 干酸预处理与固态脱毒

(1) 干酸预处理

根据 Zhang 等^[16]的研究对麦秆进行干酸预处理，反应初始固液比为 2:1 (w/w)，其中根据麦秆的干重为 1200 g，麦秆自身的水分+酸溶液共 600 g，酸溶液中硫酸用量为每 100 g 麦秆 (干基) 添加 3.88 g 浓硫酸 (98%质量分数)。麦秆含水量为 10% (w/w)，则需称取麦秆总重为 1333.33 g，配置酸溶液 466.67 g。然后在预处理反应器中按顺序分别加入麦秆、酸溶液，并通入高温蒸汽，175 °C、1.0 MPa 下反应 5 min，搅拌转速为 50 rpm。预处理后物料呈黑色，含水量为 50%左右，pH 为 2.0 左右。

(2) pH 中和与磨浆

考虑到后续在糖化时纤维素酶的最适 pH 约为 4.8，因此有必要预先对预处理物料进行 pH 中和，使用碳酸钙作为中和剂，将碳酸钙粉末与预处理物料充分混匀，中和后体系 pH 约为 5.0。将混匀后体系通过粉碎输送泵进一步降低物料尺寸。

(3) *P. variotii* FN89 种子培养

取出一只装有冷冻干燥保种的 *P. variotii* FN89 菌种，用 500 μ L 无菌水溶解冻干菌粉，然后倒入 PDA 平板，37 °C 培养 3-5 天，作为第一代 *P. variotii* FN89 菌种。在第一代平板基础上用平板划线法划至另一块 PDA 平板，37 °C 继续培养 3-5 天，作为第二代菌种。将第二代 PDA 平板上的 *P. variotii* FN89 孢子均匀涂抹在约 100 g 新鲜预处理后物料上，37 °C 培养 2-3 天，作为第三代菌种。

(4) 固态脱毒

将准备好的第三代 *P. variotii* FN89 种子按 10% (w/w) 接种量均匀撒在待脱毒物料上, 在生物脱毒反应器中进行固态脱毒, 温度 37 °C、通气量 1 vvm, 每隔 12 h 以 50 rpm 搅拌 5 min, 脱毒时间为 36-48 h。

固态脱毒 0 h 取样检测主要糖及抑制物含量为: 葡萄糖 27.5 mg/g DM, 木糖 87.6 mg/g DM, 乙酸 14.5 mg/g DM, 糠醛 1.6 mg/g DM, HMF 3.2 mg/g DM, 总酚 4.2 mg/g DM; 固态脱毒 48 h 取样检测主要糖及抑制物含量为: 葡萄糖 19.4 mg/g DM, 木糖 50.7 mg/g DM, 总酚 1.6 mg/g DM, 乙酸、糠醛及 HMF 均为 0 mg/g DM。脱完毒的物料放入 -20 °C 冰箱进行短期存储。

2.2.4 纤维素 L-乳酸发酵

(1) *P. acidilactici* ZY271 种子液培养

取一只 *P. acidilactici* ZY271 (约 2 mL) 甘油冻存管, 解冻后按 10% (v/v) 接种量接入 20 mL 简化 MRS 培养基中, 42 °C、150 rpm 活化 12 h。

将活化好的种子液继续按 10%(v/v)接种量转接至新的简化 MRS 培养基中, 42 °C、150 rpm 扩培 8 h。上述培养过程均额外添加 1% (v/v) 的糖化酶防止种子絮凝^[110]。

(2) 糖化和发酵

生物反应器 SSCF: 在 5 L 螺带搅拌式生物反应器^[111]中进行 SSCF。首先, 按照 25% (w/w) 固含量体系准备好所需的水和固态脱毒后物料。将反应器温度设置为 50 °C、转速为 150 rpm, 分别加入水、纤维素酶和脱毒后物料, 酶用量为 4 mg protein/DM, 预糖化时间为 8 h。预糖化后, 将养好的 *P. acidilactici* ZY271 种子液和发酵营养盐接入体系后开始 SSCF, 接种量 10%(v/v), 42 °C、150 rpm 条件下发酵 72 h, 全过程用 25% (w/w) 氢氧化钙调节 pH 为 5.5, 每隔 24 h 取样检测糖耗、乳酸。

2.2.5 分析方法

葡萄糖、木糖、乙酸、糠醛、5-羟甲基糠醛 (HMF) 及乳酸都是通过 HPLC (LC-20AD, Shimadzu, Kyoto, Japan) 检测的, 搭配有 RID-10A 型示差折光检测器 (Shimadzu, Kyoto, Japan) 和 HPX-87H 型色谱柱 (Bio-rad, USA)。粗蛋白含量通过全自动凯氏定氮仪 (PeiOu Analysis Instrument, ShangHai, China) 进行测定。乳酸的手性度通过 D-/L-乳酸试剂盒 (Megazyme International Ireland, Bray, Wicklow, Ireland) 进行检测。总酚通过总酚试剂盒 (Geruisi-bio, SuZhou, China) 进行测定。

2.2.6 纤维素 L-乳酸得率计算

纤维素 L-乳酸得率参考 Qiu 等^[112]方法, 定义为实际获得的 L-乳酸产量与理论 L-乳酸产量的比值, 理论 L-乳酸产量是根据 SSCF 中纤维素和木糖的化学计量学计算出来的, 具体计算公式如下:

$$\text{L-lactic acid Yield (\%)} = \frac{[LA] \times V - [LA]_0 \times V_0}{[\text{Biomass}] \times ([\text{Cellulose}] \times 1.111 + [\text{Xlyose}]) \times 1} \times 100\% \quad (2-1)$$

公式中的字母及数字释义如下:

Biomass: 初始发酵体系中干物料的质量, 单位 g;

Cellulose: 干物料中纤维素的含量, 单位 g/g;

Xylose: 干物料中木糖含量, 单位 g/g;

LA: 发酵终点乳酸浓度, 单位 g/L;

LA₀: 发酵起点乳酸浓度 (来自种子液), 单位 g/L;

V: 终点 SSCF 系统的体积, 单位 L;

V₀: 起点 SSCF 系统的体积, 单位 L;

1.111: 纤维素转化为当量葡萄糖的转化系数;

1: 葡萄糖和木糖转化为 L-乳酸的转化系数;

备注: 根据 SSCF 运行的水质量平衡计算液体体积。

2.2.7 纤维素 L-乳酸转化率计算

纤维素 L-乳酸转化率定义为实际获得的 L-乳酸产量与初始发酵体系中干物料的质量的比值, 具体计算公式如下:

$$\text{L-lactic acid Conversion (g/g DM)} = \frac{[LA] \times V - [LA_0] \times V_0}{[Biomass]} \quad (2-2)$$

公式中的字母及数字释义如下:

Biomass: 初始发酵体系中干物料的质量, 单位 g;

LA: 发酵终点乳酸浓度, 单位 g/L;

LA₀: 发酵起点乳酸浓度 (来自种子液), 单位 g/L;

V: 终点 SSCF 系统的体积, 单位 L;

V₀: 起点 SSCF 系统的体积, 单位 L;

备注: 根据 SSCF 运行的水质量平衡计算液体体积。

2.3 结果与讨论

2.3.1 常见有机氮源表征

氮源底物是乳酸经济生产的主要限制性因素之一^[113]。本研究选取了几种常见的乳酸发酵有机氮源, 分别对其粗蛋白含量及乳酸含量进行测定, 并列出了价格成本(表 2.1)。

表 2.1 所示, 试剂级酵母浸粉和蛋白胨的价格最为昂贵, 分别是\$34.92/kg 和\$80.00/kg; 其次是工业级酵母浸粉和蛋白胨, 分别是\$17.46/kg 和\$11.11/kg; 玉米浆干粉的价格最为廉价, 只有\$0.32-1.43/kg。

酵母浸粉和蛋白胨的粗蛋白含量较高, 除试剂级酵母浸粉占干物质的 65.8%外, 其余都在干物质的 70%之上, 玉米浆干粉的粗蛋白含量相比较低, 只有干物质的 45%左右。

酵母浸粉和蛋白胨的乳酸含量都极低甚至没有, 相比之下玉米浆干粉的乳酸含量占据干物质的 20%左右, 其中一半以上均为 D-乳酸。

这些结果表明, 酵母浸粉和蛋白胨作为有机氮源蛋白含量丰富, 且本身不含或含极少量乳酸, 但无论是试剂级或工业级, 价格都较为昂贵。同时, 玉米浆干粉蛋白含量较低, 虽然其价格非常低廉, 但本身含有大量的混合手性乳酸, 使其作为高手性 L-乳酸发

酵的氮源存有潜在风险。

值得注意的是，由于玉米浆干粉在生产过程中需要对玉米淀粉进行浸泡，由于玉米淀粉中含有丰富的营养物质以及浸泡过程的开放环境，使得浸泡浆液极易染上各种乳酸菌^[53]，这些乳酸菌很难保证为单一手性的乳酸生产菌株，这就导致最后生产的玉米浆干粉中存在大量混合手性乳酸。

表 2.1 常见有机氮源表征

Table 2.1 Characterizations of common organic nitrogen sources

Nitrogen	Price (\$/kg)	Protein (% DM)	Lactic acid (mg/g DM)	L-lactic acid (mg/g DM)	D-lactic acid (mg/g DM)
Yeast extract-1	34.92	65.8 ± 0.1	3.3 ± 0.2	1.8 ± 0.1	1.5 ± 0.2
Yeast extract-2	17.46	76.9 ± 0.9	2.1 ± 0.1	0.9 ± 0.0	1.2 ± 0.1
Peptone-1	80.00	76.0 ± 1.4	2.0 ± 0.2	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.2
Peptone-2	11.11	72.8 ± 1.2	ND	ND	ND
Dried Corn Steep Liquor Powder-1	1.43	45.1 ± 0.5	215.8 ± 3.4	85.6 ± 1.6	130.2 ± 1.8
Dried Corn Steep Liquor Powder-2	0.32	46.7 ± 0.6	196.3 ± 2.9	85.1 ± 1.0	111.2 ± 1.9

Yeast extract-1 代表为试剂级酵母浸粉 (Oxoid)，Yeast extract-2 代表为工业级酵母浸粉 (安琪酵母)，Peptone-1 代表试剂级蛋白胨 (Oxoid)，Peptone-2 代表工业级蛋白胨 (安琪酵母)，Dried Corn Steep Liquor Powder-1 代表安琪玉米浆干粉，Dried Corn Steep Liquor Powder-2 代表西王玉米浆干粉；ND 代表试剂盒未检测到。

2.3.2 常见有机氮源纤维素 L-乳酸发酵及成本评价

本部分针对表 2.1 所列举的常见有机氮源，对这几种有机氮源进行了纤维素 L-乳酸发酵、手性度及成本评价，图 2.2 为纤维素 L-乳酸发酵曲线图，表 2.3 为具体的发酵指标及成本评价。

图 2.2 所示，初始葡萄糖和木糖浓度分别约为 60 g/L 和 20 g/L，初始 L-乳酸浓度约为 0.5 g/L。以 15 g/L 试剂级酵母浸粉+10 g/L 试剂级蛋白胨为有机氮源，发酵 72 h 乳酸产量为 105.0 g/L，L-乳酸手性度为 99.5%，发酵结束时葡萄糖和木糖均消耗完毕；以 15 g/L 工业级酵母浸粉+10 g/L 工业级蛋白胨为有机氮源，发酵 72 h 乳酸产量为 102.0 g/L，L-乳酸手性度为 99.6%，发酵结束时葡萄糖和木糖均消耗完毕；以 20 g/L 玉米浆干粉-1 为有机氮源，发酵 72 h 乳酸产量为 87.2 g/L，L-乳酸手性度为 94.9%，发酵结束时剩余葡萄糖 15.5 g/L，木糖消耗完毕；以 20 g/L 玉米浆干粉-2 为有机氮源，发酵 72 h 乳酸产量为 85.4 g/L，L-乳酸手性度为 95.3%，发酵结束时剩余葡萄糖 17.7 g/L，木糖消耗完毕。

可以看出，以试剂级或工业级的酵母浸粉和蛋白胨为有机氮源的乳酸发酵水平几乎

没有差异，发酵产量均在 100 g/L 以上，且 L-乳酸手性度均 $\geq 99\%$ ，发酵结束均没有残糖出现。以两种玉米浆干粉为有机氮源的乳酸发酵效果略差，乳酸产量均在 90 g/L 以下，比工业级酵母浸粉和蛋白胨的乳酸发酵产量低了约 15%，且发酵结束时剩余了大量葡萄糖。其次，以两种玉米浆干粉作为有机氮源的 L-乳酸发酵手性度只有 95%左右，说明玉米浆干粉的添加引入了大量 D-乳酸，造成了最终乳酸产品手性度的下降，这也验证了 2.3.1 中以玉米浆干粉为有机氮源可能引入混合手性乳酸的猜测。

早期的文献也报道过玉米浆干粉含有大量的 D-乳酸存在，Wee 等^[86]以木材水解液和玉米浆干粉分别为碳源和氮源，L-乳酸发酵的手性度为 96.7%。Sun 等^[114]以甘蔗糖蜜和玉米浆干粉分别作为碳源和氮源，L-乳酸发酵的手性度为 95.6%。可见以玉米浆干粉生产的乳酸手性度均较低，无法满足乳酸聚合要求，但可以应用于对手性度要求较低的食品等行业。

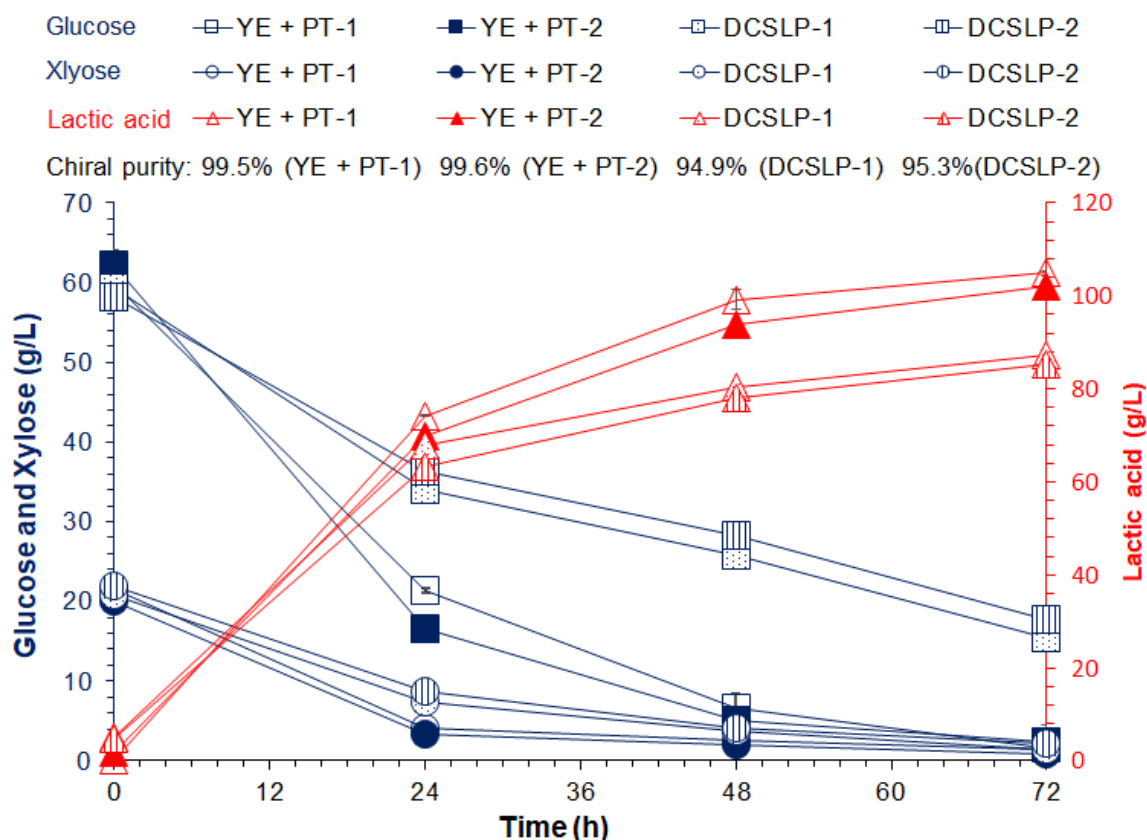


图 2.2 常见有机氮源生物反应器纤维素 L-乳酸发酵

Table 2.2 Bioreactor cellulosic L-lactic acid fermentation using common organic nitrogen sources
 YE + PT-1 代表试剂级酵母浸粉+蛋白胨 (Oxoid)，YE + PT-2 代表工业级酵母浸粉+蛋白胨 (安琪)，
 DCSLP-1 代表安琪玉米浆干粉，DCSLP-2 代表西王玉米浆干粉；
 5 L 生物反应器 SSCF，25% (w/w) 固含量，10% (v/v) 接种量，发酵条件为 42 °C 和 150 rpm，发
 酵时间为 72 h，无机盐添加为 2 g/L 柠檬酸氢二铵+0.25 g/L 一水硫酸锰。

表 2.3 所示, 首先对常见有机氮源的乳酸发酵过程进行了得率和转化率的计算。以 15 g/L 试剂级酵母浸粉+10 g/L 试剂级蛋白胨为有机氮源, 乳酸发酵得率和转化率分别为 86.0%、0.33 g/g DM; 以 15 g/L 工业级酵母浸粉+10 g/L 工业级蛋白胨为有机氮源, 乳酸发酵得率和转化率分别为 83.6%、0.32 g/g DM; 以 20 g/L 玉米浆干粉-1 为有机氮源, 乳酸发酵得率和转化率分别为 68.8%、0.26 g/g DM; 以 20 g/L 玉米浆干粉-2 为有机氮源, 乳酸发酵得率和转化率分别为 67.4%、0.25 g/g DM。

结果表明, 以试剂级或工业级的酵母浸粉和蛋白胨为有机氮源, 乳酸发酵得率较高, 均在 80%以上, 说明乳酸片球菌 *P. acidilactici* ZY271 在利用酵母浸粉和蛋白胨的环境下由糖转化为乳酸的效率较高。以试剂级或工业级的酵母浸粉和蛋白胨为有机氮源, 乳酸转化率均在 0.30 g/g DM 以上, 说明每 1 g 干物质的预处理小麦秸秆物料有 30%以上转化为乳酸。反之, 以两种玉米浆干粉为有机氮源的乳酸发酵得率和转化率均较低, 其中乳酸发酵得率均在 70%以下, 说明乳酸片球菌 *P. acidilactici* ZY271 在利用玉米浆干粉的环境下由糖转化为乳酸的效率较低。

表 2.3 所示, 其次是纤维素 L-乳酸发酵的有机氮源成本评价。以试剂级酵母浸粉和蛋白胨生产乳酸的有机氮源成本是\$9.34/kg; 以工业级酵母浸粉和蛋白胨生产乳酸的有机氮源成本是\$2.62/kg; 以玉米浆干粉-1 生产乳酸的有机氮源成本是\$0.25/kg; 以玉米浆干粉-2 生产乳酸的有机氮源成本是\$0.06/kg。结果表明, 无论是试剂级或者工业级的酵母浸粉和蛋白胨, 其生产 1 kg 乳酸所需的有机氮源成本至少是玉米浆干粉的 10 倍以上, 显然价格过于昂贵。

表 2.3 常见有机氮源纤维素 L-乳酸发酵及成本评价

Table 2.3 Fermentation and cost evaluation of cellulosic L-lactic acid using common organic nitrogen sources

Nitrogen	Dosage (g/L)	Nitrogen cost (\$/kg lactic acid product)	Lactic acid (g/L)	Chiral purity (% L-form)	Yield (%)	Conversion (g/g DM)
Yeast extract + Peptone-1	15 + 10	9.34	105.0 ± 0.5	99.5 ± 0.1	86.0 ± 0.4	0.33 ± 0.00
Yeast extract + Peptone-2	15 + 10	2.62	102.0 ± 0.8	99.6 ± 0.1	83.6 ± 0.7	0.32 ± 0.00
Dried Corn Steep Liquor Powder-1	20	0.25	87.2 ± 1.2	94.9 ± 0.3	68.8 ± 1.0	0.26 ± 0.00
Dried Corn Steep Liquor Powder-2	20	0.06	85.4 ± 1.0	95.3 ± 0.4	67.4 ± 0.8	0.25 ± 0.00

Yeast extract + Peptone-1 代表试剂级酵母浸粉+蛋白胨 (Oxoid), Yeast extract + Peptone-2 代表工业级酵母浸粉+蛋白胨 (安琪), Dried Corn Steep Liquor Powder-1 代表安琪玉米浆干粉, Dried Corn Steep Liquor Powder-2 代表西王玉米浆干粉;

5 L 生物反应器 SSCF, 25% (w/w) 固含量, 10% (v/v) 接种量, 发酵条件为 42 °C 和 150 rpm, 发酵时间为 72 h, 无机盐添加为 2 g/L 柠檬酸氢二铵+0.25 g/L 一水硫酸锰。

2.4 本章小结

有机氮源在乳酸发酵中起重要作用，本章节以乳酸片球菌 *P. acidilactici* ZY271 作为出发菌株，选取了几种常见有机氮源（酵母浸粉、蛋白胨及玉米浆干粉），对其分别进行表征和纤维素 L-乳酸发酵评价，主要的研究结论如下：

（1）以试剂级或工业级的酵母浸粉和蛋白胨为有机氮源，其粗蛋白含量高，本身不含或含极少量的乳酸（可忽略不计）。试剂级或工业级的酵母浸粉和蛋白胨 L-乳酸发酵水平几乎没有差异，发酵产量、手性度等各项指标均很高，但成本过于昂贵，其中以工业级酵母浸粉和蛋白胨生产 L-乳酸的有机氮源成本最低为\$2.62/kg。

（2）以玉米浆干粉为有机氮源，其粗蛋白含量较低，本身含有大量混合手性乳酸。虽然乳酸生产的有机氮源成本非常低廉（最低\$0.06/kg），但 L-乳酸发酵手性度较低（95%左右），无法满足聚合级乳酸的生产要求。

第 3 章 不同水解方式下棉籽蛋白作为高手性乳酸发酵廉价有机氮源

3.1 引言

棉籽蛋白作为一种廉价优质的蛋白质资源，其粗蛋白含量往往超过 50%，高于大豆蛋白含量，此外还含有丰富的矿物质、维生素和脂质。相比于豆粕广泛地应用于动物饲料^[79]，棉籽蛋白的应用范围较小。长期以来，国内棉籽原料局限于压榨制油，综合加工程度低，产业发展严重受限，2014 年我国用于生产蛋白粉的棉籽仅在 370 万吨左右^[115]，占比约 1/3，而大部分棉籽蛋白又用于家禽饲料的添加，工业开发利用程度较低。随着棉花价格的持续下跌，开发棉籽原料的多种利用价值将为棉花生产商和加工商提供经济刺激^[80]。

棉籽蛋白中的氮源成分主要以大分子蛋白质形式存在，而酵母浸粉和玉米浆干粉中氮源成分主要以较易吸收的蛋白质降解产物形式存在。因此，棉籽蛋白无法被作为速效氮源供微生物直接利用，必须进一步降解成为小分子的肽和氨基酸。

蛋白的水解主要分为酶水解和酸水解，两者都有各自的优缺点。酶水解反应条件温和、易于控制，但水解往往不彻底；酸水解较为彻底、成本低，但水解条件过于剧烈往往造成营养成分的损失，且对设备腐蚀性太强。

本章节的主要内容为：（1）以棉籽蛋白廉价有机氮源来源，首先对其进行表征，测定其粗蛋白含量和乳酸含量；（2）在摇瓶实验中分别探究酸水解和酶水解对棉籽蛋白水解程度及纤维素 L-乳酸发酵的影响；（3）在生物反应器上进行不同水解方式下纤维素 L-乳酸发酵的验证，并针对棉籽蛋白不同水解方式下分别作乳酸发酵效果、手性度及成本评价。

3.2 材料与方法

3.2.1 原料、酶和试剂

所用小麦秸秆、纤维素酶及糖化酶见 2.2.1。

棉籽蛋白（脱酚）购自青岛科瑞培养基（山东，中国）。

中性蛋白酶分别购自北京诺维信、宁夏夏盛和青岛蔚蓝，根据说明书，酶活分别为 0.8 AU/g、50,000 U/g、100,000 U/g；碱性蛋白酶分别购自宁夏夏盛和青岛蔚蓝，根据说明书，酶活均为 200,000 U/g；木瓜蛋白酶和胰蛋白酶均购自宁夏夏盛，根据说明书，酶活分别为 100,000 U/g、40,000 U/g。

其他试剂级产品如硫酸、盐酸、草酸等均购自国药集团。

所用酶及试剂均由当地供应商提供报价，美元对人民币的汇率被设定为 6.3 元。

3.2.2 菌种和培养基

L-乳酸发酵菌株为 *P. acidilactici* ZY271，生物脱毒菌株为 *P. variotii* FN89，其来源

及培养基均见 2.2.2。

3.2.3 纤维素 L-乳酸发酵

(1) *P. acidilactici* ZY271 种子液培养见 2.2.4。

(2) 糖化与发酵

生物反应器 SSCF: 方法步骤见 2.2.4。

摇瓶 SSCF: 在 250 mL 摇瓶中进行 SSCF。首先, 按照 25% (w/w) 固含量体系分别加入水、固态脱毒后物料和碳酸钙, 碳酸钙用量为每 100 g 可发酵糖添加 60 g 碳酸钙, 用以调节后续乳酸发酵的 pH, 然后加入纤维素酶, 酶用量为 4 mg protein/DM, 在水浴恒温振荡器中以 50 °C、150 rpm 预糖化 8 h。预糖化结束后, 接入 *P. acidilactici* ZY271 种子液和发酵营养盐, 接种量 10% (v/v), 在气浴恒温摇床中以 42 °C、150 rpm 发酵 72 h, 每隔 24 h 取样检测糖耗、乳酸及细胞活力。其中细胞活力通过平板菌落计数计算 CFU (Colony-Forming Units, 菌落形成单位)。

3.2.4 棉籽蛋白水解

(1) 酶水解

将棉籽蛋白与水按照 1:4 (w/w) 的固液比均匀混合, 添加一定比例的蛋白酶, 酶用量为棉籽蛋白质量的 3% (g 酶/g 棉籽蛋白)。在 50 °C、150 rpm 条件下水解 24 h, 水解结束后 100 °C 水浴灭酶 10 min, 并取样离心检测谷氨酸浓度。棉籽蛋白在发酵时与乳酸菌种子液同时添加, 添加量为 20 g/L, 即每 1 L 发酵体系添加 100 g 棉籽蛋白酶水解液, 按照 1:4 (w/w) 的固液比, 即 1 L 发酵体系含有 20 g 棉籽蛋白。

所用蛋白酶种类分别为中性蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶和胰蛋白酶, 其中碱性蛋白酶在添加前用 5 mol/L 的氢氧化钠溶液调节水解体系 pH 至 10.0 左右, 其余蛋白酶不需要预先调节 pH。

(2) 酸水解

分别配置 3.75% (w/w)、6.25% (w/w)、8.75% (w/w) 酸溶液, 将棉籽蛋白与酸溶液按照 1:4 (w/w) 的固液比均匀混合, 在 90 °C、150 rpm 条件下水解 24 h。水解结束后添加一定量的碳酸钙粉末进行 pH 中和, 直至没有气泡产生, 并取样离心检测谷氨酸浓度。棉籽蛋白在发酵时与乳酸菌种子液同时添加, 添加量为 20 g/L, 即每 1 L 发酵体系添加 100 g 棉籽蛋白酸水解液, 按照 1:4 (w/w) 的固液比, 即 1 L 发酵体系含有 20 g 棉籽蛋白。

所用酸种类分别为硫酸、盐酸和草酸, 其中硫酸质量分数按 98% 计算, 盐酸质量分数按 37% 计算, 草酸为草酸二水合物, 质量分数按 71% 计算。

3.2.5 分析方法

葡萄糖、木糖、乳酸、粗蛋白、D-/L-乳酸手性度测定方法见 2.2.5。谷氨酸通过 SBA-90D 生物传感分析仪 (Biology Institute, Shangdong Academy of Sciences, Shangdong, China) 进行测定, 用氢氧化钠溶液作为稀释母液。本章中试剂级的酵母浸粉+蛋白胨谷氨酸含量测定按照 1:4 (w/w) 的固液比, 即 100 mL 去离子水中添加 15 g 酵母浸粉+10 g 蛋白

豚, 30 °C、150 rpm 调节下浸提 30 min, 再离心取上清测定。

3.2.6 纤维素 L-乳酸得率计算

纤维素 L-乳酸得率计算方法及公式见 2.2.6。

3.2.7 纤维素 L-乳酸转化率计算

纤维素 L-乳酸转化率计算方法及公式见 2.2.7。

3.3 结果与讨论

3.3.1 棉籽蛋白表征

为了验证棉籽蛋白作为高手性乳酸发酵有机氮源来源的可行性, 分别测定其粗蛋白和乳酸含量, 并列出了成本价格 (表 3.3)。

表 3.3 棉籽蛋白表征

Table 3.3 Characterizations of cottonseed protein

Nitrogen	Price (\$/kg)	Protein (% DM)	Lactic acid (mg/g DM)	L-lactic acid (mg/g DM)	D-lactic acid (mg/g DM)
Cottonseed protein	1.27	54.5 ± 1.1	ND	ND	ND

ND 代表试剂盒未检测到。

表 3.3 所示, 棉籽蛋白的价格为\$1.27/kg, 粗蛋白含量为干物质的 54.5%, 且本身不含有任何乳酸。这表明棉籽蛋白价格低廉, 粗蛋白含量较高, 且没有引入混合手性乳酸的风险, 是可用于高手性乳酸发酵的优质氮源来源。

3.3.2 棉籽蛋白酶水解与摇瓶纤维素 L-乳酸发酵

为了探究不同种类的蛋白酶对棉籽蛋白水解程度及后续乳酸发酵的影响, 本部分分别选取了三种中性蛋白酶、两种碱性蛋白酶、一种木瓜蛋白酶和一种胰蛋白酶, 棉籽蛋白在酶水解后进行添加, 以试剂级的酵母浸粉+蛋白豚作为目标对照, 在摇瓶中进行纤维素 L-乳酸发酵 (图 3.4)。

图 3.4 (a) 所示, 以试剂级的酵母浸粉+蛋白豚为有机氮源, 摇瓶发酵 72 h 乳酸产量为 69.5 g/L; 以棉籽蛋白为有机氮源来源, 分别利用中性蛋白酶、碱性蛋白酶、木瓜蛋白酶及胰蛋白酶在水解 24 h 后进行添加, 其 L-乳酸发酵 72 h 结果如下: 中性蛋白酶-1 为 18.0 g/L, 中性蛋白酶-2 为 19.5 g/L, 中性蛋白酶-3 为 21 g/L, 碱性蛋白酶-1 为 49.5 g/L, 碱性蛋白酶-2 为 52.5 g/L, 木瓜蛋白酶为 16.5 g/L, 胰蛋白酶为 38 g/L。可以看出, 碱性蛋白酶-2 水解条件下乳酸发酵产量较高 (52.5 g/L), 但和试剂级的酵母浸粉+蛋白豚乳酸发酵产量 (69.5 g/L) 相比仍有较大差距。

由于本实验所用菌株 *P. acidilactici* ZY271 在前 24 h 发酵速率较快, 乳酸菌生长较好, 因此选择发酵第 24 h 的细胞活力代表菌株生长情况。图 3.4 (b) 所示, 细胞活力的结果几乎和乳酸发酵效果同步, 除试剂级的酵母浸粉+蛋白豚外, 以两种碱性蛋白酶水

解下的棉籽蛋白为有机氮源乳酸菌的生长情况较好, 发酵第 24 h 的细胞活力分别为: 碱性蛋白酶-1 为 25×10^7 CFU/mL, 碱性蛋白酶-2 为 28×10^7 CFU/mL。

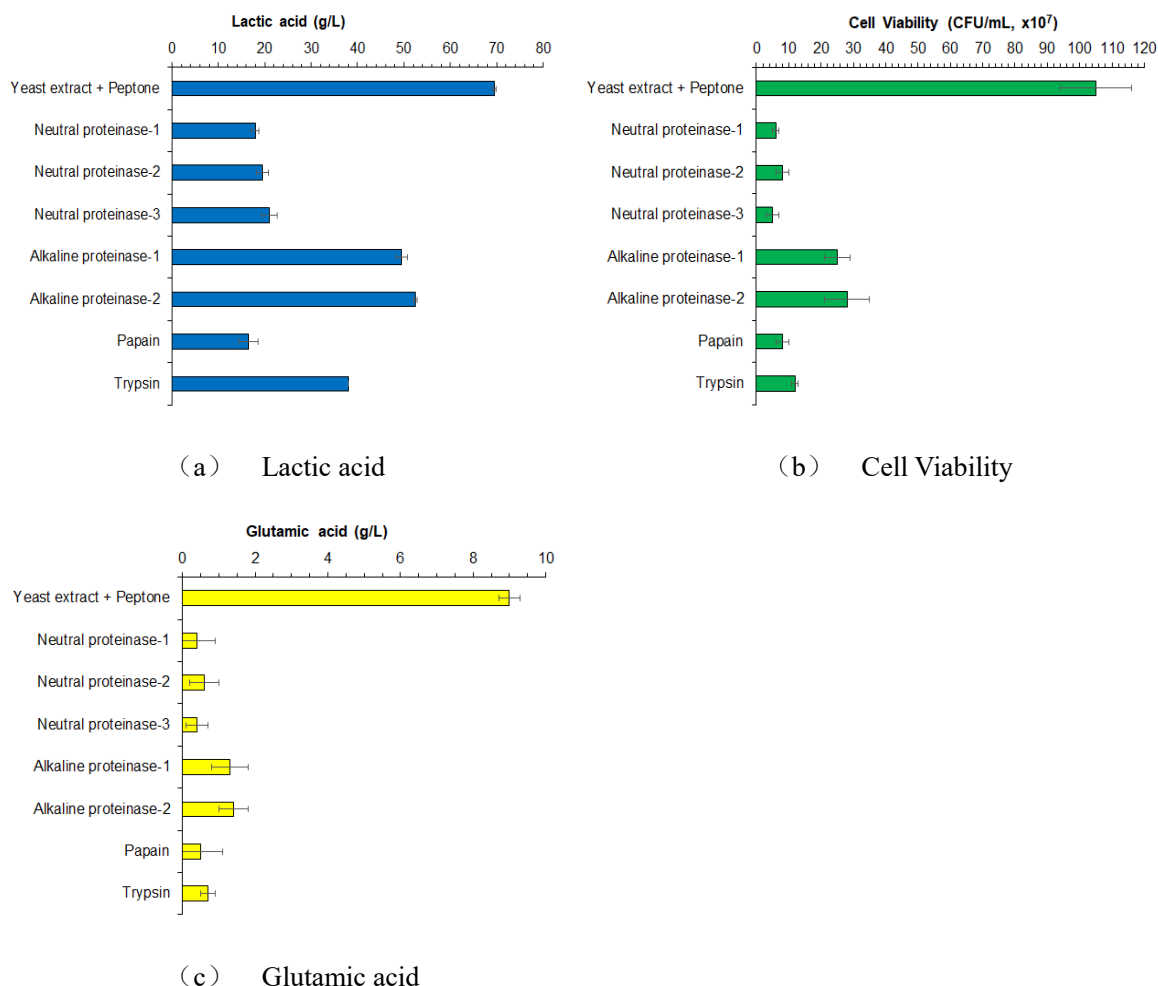


图 3.4 棉籽蛋白酶水解下摇瓶纤维素 L-乳酸发酵

Fig. 3.4 Flask cellulosic L-lactic acid fermentation of cottonseed protein under enzyme hydrolysis
 Yeast extract + Peptone 为试剂级, 用量为 15 g/L+10 g/L; Neutral proteinase-1 为诺维信中性蛋白酶, Neutral proteinase-2 为夏盛中性蛋白酶, Neutral proteinase-3 为蔚蓝中性蛋白酶; Alkaline proteinase-1 为夏盛碱性蛋白酶, Alkaline proteinase-2 为蔚蓝碱性蛋白酶; Papain 为夏盛木瓜蛋白酶, Trypsin 为夏盛胰蛋白酶; 蛋白酶的用量均为棉籽蛋白质量的 3% (g 酶/g 棉籽蛋白), 棉籽蛋白添加量均为 20 g/L; Cell Viability 测定时间为摇瓶发酵 24 h。
 250 mL 摇瓶 SSCF, 25% (w/w) 固含量, 10% (v/v) 接种量, 发酵条件为 42 °C 和 150 rpm, 发酵时间为 72 h, 无机盐添加为 2 g/L 柠檬酸氢二铵+0.25 g/L 一水硫酸锰。

由于棉籽蛋白中谷氨酸为第一大氨基酸, 约占棉籽蛋白总质量 10%^[116], 因此本研究考虑以水解后游离谷氨酸的浓度作为水解程度的重要指标, 谷氨酸含量越高, 说明水解程度越好。图 3.4 (c) 所示, 棉籽蛋白按照 1:4 (w/w) 的固液比在不同蛋白酶水解后,

谷氨酸浓度分别如下：中性蛋白酶-1 为 0.4 g/L，中性蛋白酶-2 为 0.6 g/L，中性蛋白酶-3 为 0.4 g/L，碱性蛋白酶-1 为 1.3 g/L，碱性蛋白酶-2 为 1.4 g/L，木瓜蛋白酶为 0.5 g/L，胰蛋白酶为 0.7 g/L。可以看出，碱性蛋白酶的水解效果最佳，其次是胰蛋白酶，中性蛋白酶和木瓜蛋白酶的水解效果最差。棉籽蛋白水解后的不同谷氨酸含量也对应了图 3.4 (a) 中的乳酸发酵情况，谷氨酸含量越高，乳酸产量也越高，即谷氨酸的含量与乳酸产量成正相关。

以上结果表明，在相同酶用量的情况下，棉籽蛋白在碱性蛋白酶水解下其水解程度较高，乳酸发酵效果也高于其他种类蛋白酶，其中碱性蛋白酶-2 水解下的乳酸发酵效果最好，但距离有机氮源替换目标酵母浸粉+蛋白胨仍有较大差距。

3.3.3 棉籽蛋白酸水解与摇瓶纤维素 L-乳酸发酵

为了探究不同种类的酸对棉籽蛋白水解程度及后续乳酸发酵的影响，本部分分别选取了两种无机强酸（硫酸、盐酸）和一种有机强酸（草酸），每种酸分别设置三个浓度梯度，棉籽蛋白在酸水解后进行添加，试剂级的酵母浸粉+蛋白胨作为目标对照，在摇瓶中进行纤维素 L-乳酸发酵（图 3.5）。

图 3.5 (a) 所示，以试剂级的酵母浸粉+蛋白胨为有机氮源，摇瓶发酵 72 h 乳酸产量为 69.5 g/L；以棉籽蛋白为有机氮源来源，分别利用草酸、盐酸和硫酸在水解 24 h 后进行添加，其 L-乳酸发酵 72 h 结果如下：3.75% (w/w) 草酸为 14.5 g/L，6.25% (w/w) 草酸为 17.5 g/L，8.75% (w/w) 草酸为 21 g/L；3.75% (w/w) 盐酸为 46.0 g/L，6.25% (w/w) 盐酸为 54.5 g/L，8.75% (w/w) 盐酸为 57.5 g/L；3.75% (w/w) 硫酸为 17.0 g/L，6.25% (w/w) 硫酸为 42.5 g/L，8.75% (w/w) 硫酸为 53.0 g/L。可以看出，以 8.75% (w/w) 盐酸水解条件下乳酸发酵产量最高（57.5 g/L），较试剂级的酵母浸粉+蛋白胨乳酸发酵产量（69.5 g/L）相比低 17% 左右。

图 3.5 (b) 所示，细胞活力的结果几乎和乳酸发酵效果同步，除试剂级的酵母浸粉+蛋白胨外，以盐酸水解下的棉籽蛋白为有机氮源乳酸菌的生长情况较好，其中 8.75% (w/w) 盐酸水解下乳酸发酵第 24 h 的细胞活力为 78×10^7 CFU/mL，比较接近同一时间点以试剂级的酵母浸粉+蛋白胨为有机氮源下的乳酸菌生长水平（ 105×10^7 CFU/mL）。

图 3.5 (c) 所示，棉籽蛋白按照 1:4 (w/w) 的固液比在不同蛋白酸水解后，游离谷氨酸含量分别如下：3.75% (w/w) 草酸为 1.7 g/L，6.25% (w/w) 草酸为 1.4 g/L，8.75% (w/w) 草酸为 1.3 g/L；3.75% (w/w) 盐酸为 2.4 g/L，6.25% (w/w) 盐酸为 8.1 g/L，8.75% (w/w) 盐酸为 9.1 g/L；3.75% (w/w) 硫酸为 0.8 g/L，6.25% (w/w) 硫酸为 2.0 g/L，8.75% (w/w) 硫酸为 3.2 g/L。可以看出，盐酸的水解程度最强，其次分别是硫酸和草酸。结合图 3.5 (a)，可以看出，在相同酸水解下的酸浓度越高，谷氨酸释放越多，乳酸产量也越高，即谷氨酸的含量与乳酸产量成正相关。

以上结果表明，棉籽蛋白在盐酸水解下其水解程度较高，乳酸发酵效果也高于硫酸和草酸，其中 8.75% (w/w) 盐酸水解后乳酸发酵产量已接近试剂级的酵母浸粉+蛋白胨水平。

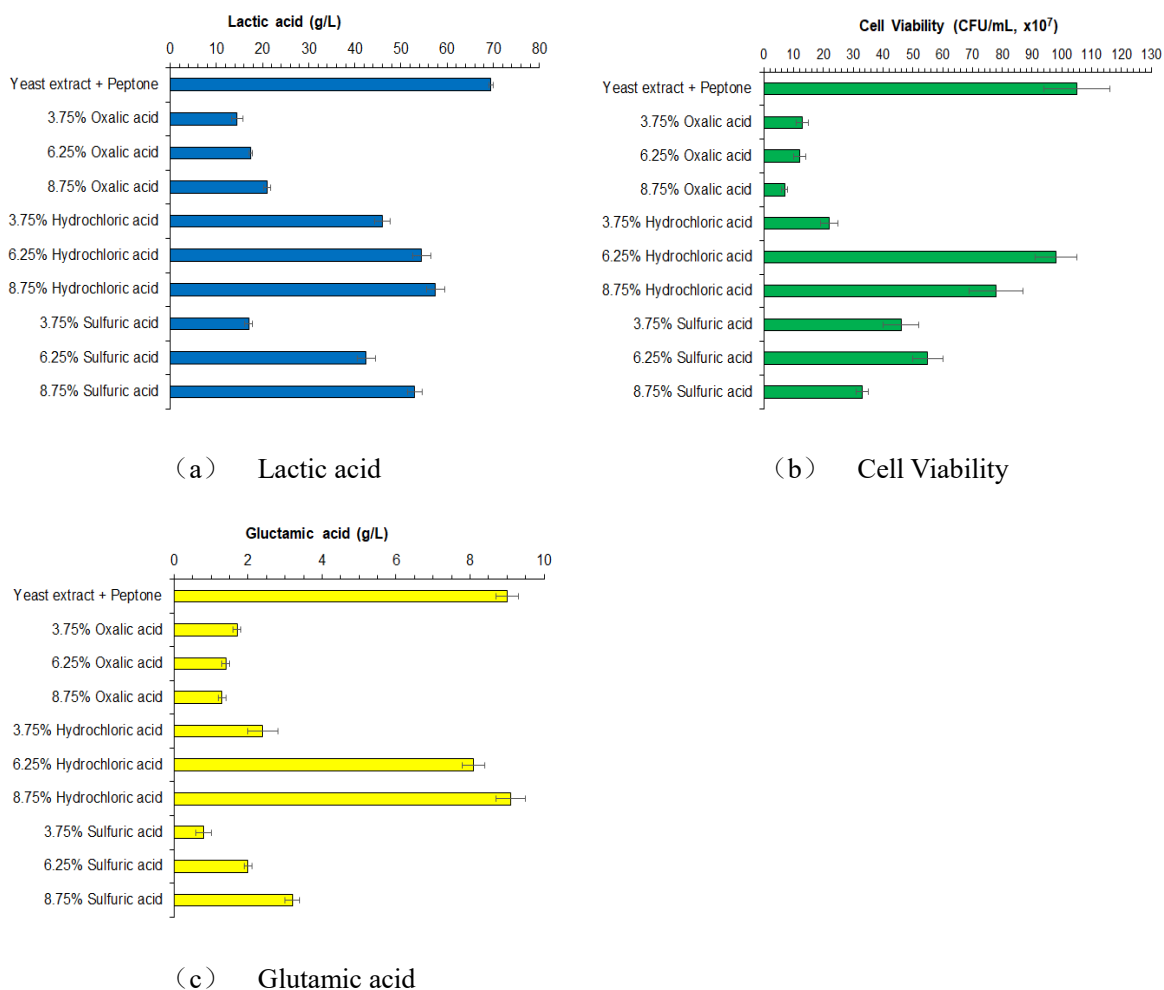


图 3.5 棉籽蛋白酸水解下摇瓶纤维素 L-乳酸发酵

Fig. 3.5 Flask cellulosic L-lactic acid fermentation of cottonseed protein under acid hydrolysis. Yeast extract + Peptone 为试剂级，用量为 15 g/L+10 g/L；酸水解所用酸浓度分别为：3.75% (w/w)、6.25% (w/w)、8.75% (w/w)，棉籽蛋白添加量均为 20 g/L；Cell Viability 测定时间为摇瓶发酵 24 h。250 mL 摇瓶 SSCF，25% (w/w) 固含量，10% (v/v) 接种量，发酵条件为 42 °C 和 150 rpm，发酵时间为 72 h，无机盐添加为 2 g/L 柠檬酸氢二铵+0.25 g/L 一水硫酸锰。

值得注意的是，张等^[116]利用 6 mol/L 的盐酸水解棉籽蛋白，其中谷氨酸总量约为干物质的 10%，按照 1:5 (w/w) 的固液比，105 °C 下完全水解棉籽蛋白 20 h 后得到约 23.9 g/L 的谷氨酸。本实验中若以占棉籽干物质 10% 的谷氨酸计，按照 1:4 (w/w) 的固液比，则完全水解后理论应得到 25.0 g/L 的谷氨酸，而 8.75% (w/w) 盐酸水解后仅得到 9.1 g/L 的谷氨酸，实际水解程度不到一半，对于棉籽蛋白的利用程度依旧较低。这里并没有继续提高酸浓度或是水解温度，主要是考虑工业应用带来的腐蚀以及能耗增加等问题。

3.3.4 棉籽蛋白不同水解方式下生物反应器纤维素 L-乳酸发酵及成本评价

根据 3.3.2 和 3.3.3 摇瓶实验的结论，棉籽蛋白分别在盐酸、碱性蛋白酶和硫酸水解下乳酸发酵产量较高。考虑到无机酸酸性太强会对工业水解反应器造成严重腐蚀，因此

本节中选取 6.25% (w/w) 酸浓度进行水解, 在 5 L 生物反应器上进行纤维素 L-乳酸 SSCF 对比 (图 3.7)。表 3.8 为不同水解方式下 L-乳酸发酵及成本评价。

图 3.6 所示, (a)、(b)、(c) 图分别为棉籽蛋白在碱性蛋白酶、硫酸和盐酸水解 24 h 的颜色。酶水解后为黄色, 接近于棉籽蛋白本身的颜色, 硫酸水解后为棕红色, 盐酸水解后为棕黑色。由于酶水解方式较为温和, 而酸水解均在高温下进行, 高温及长时间的水解使棉籽蛋白中的少量游离棉酚释放出来, 继而与氨基酸发生美拉德反应^[117], 这是一种非酶褐变反应, 随着水解程度的增加, 反应越剧烈, 水解颜色也就越深。因此从棉籽蛋白的不同水解颜色也可以看出, 盐酸的水解程度最强, 其次分别是硫酸和碱性蛋白酶。

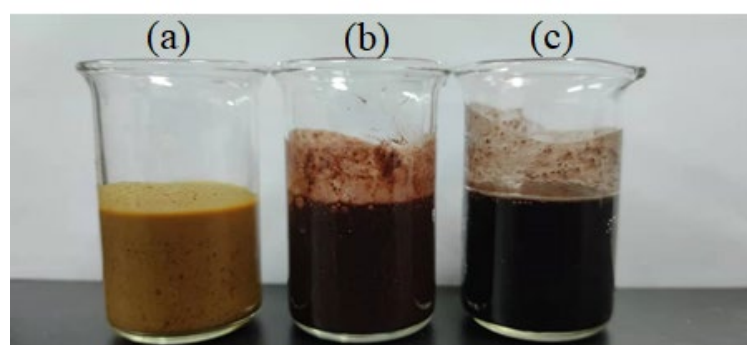


图 3.6 棉籽蛋白不同水解方式下颜色对比

Fig. 3.6 Color contrast of cottonseed protein under different hydrolysis methods

(a) 图为 3% (g 酶/g 棉籽蛋白) 蔚蓝碱性蛋白酶水解情况, 水解条件: 50 °C、24 h、150 rpm; (b) 图为 6.25% (w/w) 硫酸溶液水解情况, 水解条件: 90 °C、24 h、150 rpm; (c) 图代表 6.25% (w/w) 盐酸溶液水解情况, 水解条件: 90 °C、24 h、150 rpm。

图 3.7 所示, 初始葡萄糖和木糖浓度分别约为 60 g/L 和 20 g/L, 初始 L-乳酸浓度约为 0.6 g/L。在发酵 72 h 后, 三组水解方式下木糖均消耗完毕, 但 L-乳酸产量和剩余葡萄糖浓度有较大差异, 其中: 盐酸水解方式下葡萄糖剩余 4.8 g/L, L-乳酸产量为 93.4 g/L; 硫酸水解方式下葡萄糖剩余 22.9 g/L, L-乳酸产量为 94.0 g/L; 碱性蛋白酶水解方式下葡萄糖剩余 38.7 g/L, L-乳酸产量为 67.0 g/L。发酵 48 h, L-乳酸发酵速率分别如下: 盐酸水解方式下为 1.89 g/L/h, 硫酸水解方式下为 1.67 g/L/h, 碱性蛋白酶水解方式下为 1.19 g/L/h。

以上结果表明, 棉籽蛋白碱性蛋白酶水解方式下最终 L-乳酸产量最低, 剩余葡萄糖浓度也最大, 酶水解方式下不利于 L-乳酸发酵。硫酸和盐酸水解方式下最终 L-乳酸产量非常接近, 但 48 h 内盐酸水解方式下乳酸发酵速率较高, 最终剩余葡萄糖浓度也较低, 表明盐酸水解方式下乳酸菌生长更好。对比表 2.2 中常见有机氮源的 L-乳酸发酵评价, 硫酸和盐酸水解下的最终 L-乳酸产量 (94.0 g/L、93.4 g/L) 已接近试剂级酵母浸粉+蛋白胨的发酵产量 (105.0 g/L), 表明以棉籽蛋白水解液替换酵母浸粉+蛋白胨是可行

的且效果不错。

三组水解方式下 L-乳酸发酵手性度均 $\geq 99.0\%$ ，表明以棉籽蛋白为有机氮源来源完全可以满足乳酸发酵高手性度的要求。

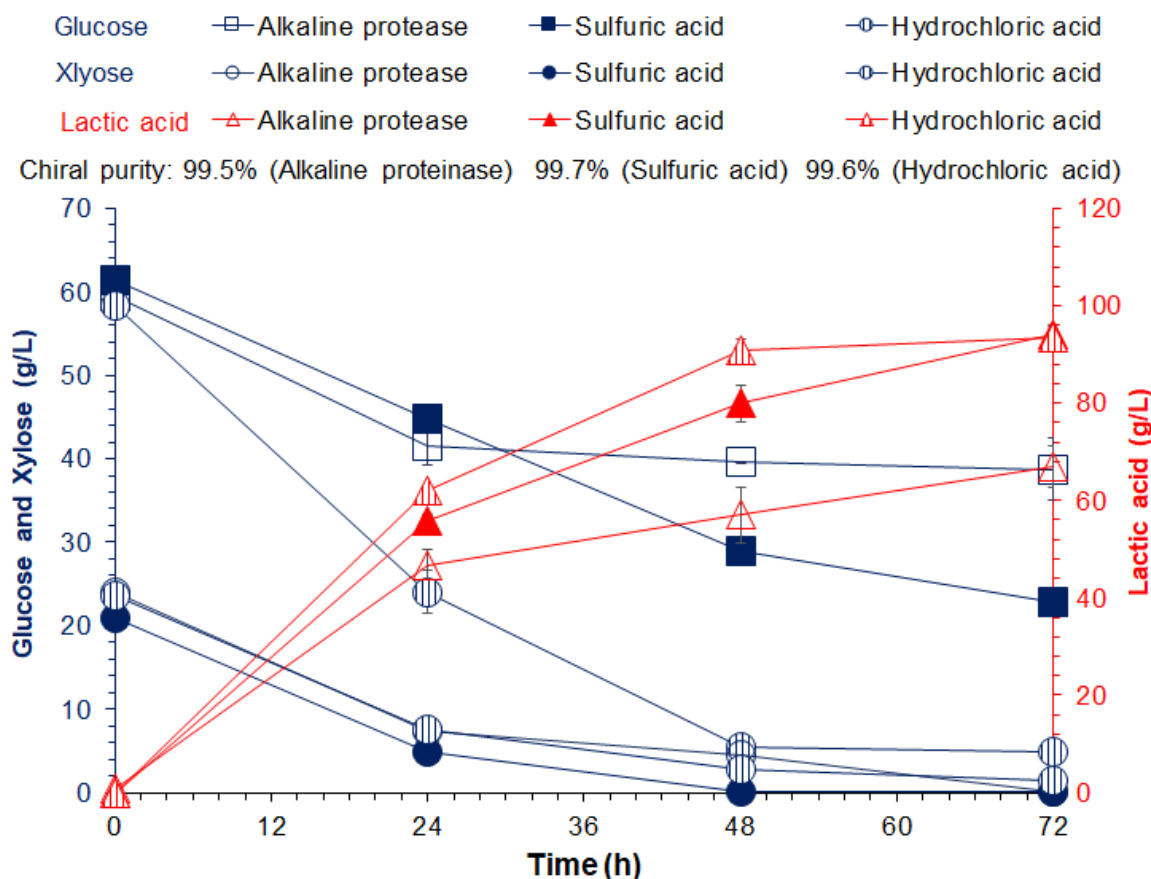


图 3.7 棉籽蛋白不同水解方式下生物反应器纤维素 L-乳酸发酵

Fig. 3.7 Bioreactor cellulosic L-lactic acid fermentation of cottonseed protein under different hydrolysis methods

碱性蛋白酶（蔚蓝）用量为 3%（g 酶/g 棉籽蛋白），硫酸溶液和盐酸溶液浓度为 6.25%（w/w）；5 L 生物反应器 SSCF，25%（w/w）固含量，10%（v/v）接种量，发酵条件为 42 °C 和 150 rpm，发酵时间为 72 h；无机盐添加为 2 g/L 柠檬酸氢二铵+0.25 g/L 一水硫酸锰，棉籽蛋白添加量为 20 g/L。

在实际工业乳酸生产中，如果以盐酸作为棉籽蛋白的酸水解方式，考虑到盐酸的酸性要远高于硫酸，在水解过程中会对水解反应器造成严重的腐蚀，不利于工业化应用。因此本研究在综合考虑后，最终选择 6.25%（w/w）硫酸作为酸水解的方式，但以 6.25%（w/w）硫酸水解方式下 L-乳酸发酵最终剩余大量葡萄糖（22.9 g/L），而残糖的存在会给 L-乳酸的聚合带来极大的困难，所以下一章的研究内容主要为如何在硫酸水解方式下，进一步降低发酵残糖。

表 3.8 所示，以棉籽蛋白作为有机氮源来源，碱性蛋白酶水解方式下乳酸生产的有

机氮源成本为\$0.28/kg，乳酸发酵的得率和转化率分别为 54.5%、0.21 g/g DM；硫酸水解方式下乳酸生产的有机氮源成本为\$0.19/kg，乳酸发酵的得率和转化率分别为 79.9%、0.30 g/g DM；盐酸水解方式下乳酸生产的有机氮源成本为\$0.19/kg，乳酸发酵的得率和转化率分别为 79.4%、0.30 g/g DM。可以看出，碱性蛋白酶水解方式下乳酸发酵的得率和转化率均较低，而硫酸和盐酸水解方式下乳酸发酵的得率和转化率近乎一致。以硫酸和盐酸水解下的棉籽蛋白为有机氮源的成本均为\$0.19/kg，相比工业级酵母浸粉+蛋白胨的乳酸生产有机氮源成本（\$2.62/kg）至少便宜了 90%，且满足高手性乳酸发酵的要求，可见其应用前景广阔。

表 3.8 不同水解方式下纤维素 L-乳酸发酵及成本评价

Table 3.8 Fermentation and cost evaluation of cellulosic L-lactic acid under different hydrolysis methods

	Alkaline protease	Sulfuric acid	Hydrochloric acid
Nitrogen cost (\$/kg lactic acid product)	0.28	0.19	0.19
Lactic acid (g/L)	67.0 ± 4.3	94.0 ± 1.7	93.4 ± 2.7
Chiral purity (% L-form)	99.5 ± 0.0	99.7 ± 0.0	99.6 ± 0.0
Yield (%)	54.5 ± 0.5	79.9 ± 0.5	79.4 ± 0.8
Conversion (g/g DM)	0.21 ± 0.01	0.30 ± 0.00	0.30 ± 0.00

碱性蛋白酶（蔚蓝）用量为 3%（g 酶/g 棉籽蛋白），硫酸溶液和盐酸溶液浓度为 6.25%（w/w）；棉籽蛋白添加量为 20 g/L。

3.4 本章小结

本章节选取了棉籽蛋白作为高手性乳酸发酵的有机氮源来源，并探究了不同水解方式对棉籽蛋白水解程度及乳酸发酵的影响，主要结论如下：

（1）对棉籽蛋白进行表征，结果表明棉籽蛋白粗蛋白含量较高且不含乳酸存在。

（2）在摇瓶实验中探究了酶水解和酸水解对棉籽蛋白水解程度及 L-乳酸发酵的影响，得出在酶水解中碱性蛋白酶的水解及乳酸发酵效果较好，酸水解中硫酸和盐酸的水解及乳酸发酵效果较好。

（3）分别选取了碱性蛋白酶、盐酸和硫酸这三种水解方式，在生物反应器上进行乳酸发酵放大验证。结果表明碱性蛋白酶水解方式下 L-乳酸发酵及棉籽蛋白水解程度均较差，盐酸和硫酸水解方式下的 L-乳酸发酵最终产量几乎一致，其中盐酸对棉籽蛋白的水解程度更强，L-乳酸发酵残糖也较少。但考虑到盐酸的腐蚀性太强，且盐酸中的氯元素在后期乳酸纯化过程中很难被去除，最终选择以硫酸水解的方式。

第 4 章 无机氮源优化及乳酸发酵技术经济评价

4.1 引言

氮源一般可以分为有机氮源和无机氮源，主要用来构成菌体细胞物质（氨基酸、蛋白质等）及含氮代谢物。在微生物生长中，有机氮源因含有丰富的蛋白质、多肽和游离氨基酸，在菌体生长中起主要作用，而无机氮源作为氮源的重要补充，微生物对它们的吸收利用比有机氮源快，无机氮源的缺乏往往会导致菌体生长及对糖的代谢缓慢。

在第 3 章的工作中，以棉籽蛋白硫酸水解液为有机氮源的 L-乳酸发酵产量基本达到了酵母浸粉和蛋白胨的水平，但发酵过程产生的大量残糖将为后期的乳酸聚合工作带来极大的困难^[32]，而这些残糖也很难通过常规的分离纯化步骤进行去除^[118]。在本研究所使用的 *P. acidilactici* ZY271 乳酸发酵培养基中，以酵母浸粉和蛋白胨为有机氮源的前提下，仅需添加少量的无机氮源即可满足 *P. acidilactici* ZY271 的生长代谢。而在以棉籽蛋白水解液为有机氮源下，由于棉籽蛋白本身所含的营养物质不如酵母浸粉和蛋白胨丰富，原来添加的少量无机氮源可能无法满足 *P. acidilactici* ZY271 的生长代谢，而增加有机氮源（棉籽蛋白）的添加量会带来更大的成本，因此本研究考虑通过补加廉价的无机氮源来促进 *P. acidilactici* ZY271 的生长代谢，从而达到降低残糖的目的。

本章的主要研究内容为以棉籽蛋白硫酸水解液为有机氮源，探究无机氮源的添加量及添加种类对乳酸发酵残糖的影响，并对不同氮源组合下纤维素 L-乳酸发酵过程作初步的技术经济评价。

4.2 材料和方法

4.2.1 原料、酶和试剂

所用小麦秸秆、纤维素酶及糖化酶见 2.2.1。

棉籽蛋白（脱酚）购自青岛科瑞培养基（山东，中国）。

硫酸、柠檬酸氢二铵、硫酸铵、柠檬酸三钠等购自国药集团。

所用原料及试剂均由当地供应商提供报价，美元对人民币的汇率被设定为 6.3 元。

4.2.2 菌种和培养基

L-乳酸发酵菌株为 *P. acidilactici* ZY271，生物脱毒菌株为 *P. variotii* FN89，其来源及培养基均见 2.2.2。

4.2.3 纤维素 L-乳酸发酵

P. acidilactici ZY271 种子液培养与生物反应器 SSCF 见 2.2.4，摇瓶 SSCF 见 3.2.4。

4.2.4 棉籽蛋白酸水解

棉籽蛋白酸水解方法见 3.2.5，采用硫酸进行水解，硫酸溶液浓度为 6.25% (w/w)。

4.2.5 分析方法

葡萄糖、木糖、乳酸、粗蛋白、D-/L-乳酸手性度测定方法见 2.2.5。

4.2.6 纤维素 L-乳酸得率计算

纤维素 L-乳酸得率计算方法及公式见 2.2.6。

4.2.7 纤维素 L-乳酸转化率计算

纤维素 L-乳酸转化率计算方法及公式见 2.2.7。

4.3 结果与讨论

4.3.1 摇瓶无机氮源优化

本研究所使用的简化 MRS 培养基是以柠檬酸氢二铵作为无机氮源进行添加，以此为基础，本章节主要选取了三种无机氮源及组合：柠檬酸氢二铵、硫酸铵、柠檬酸三钠+硫酸铵。添加硫酸铵是因为其工业应用较广且非常廉价（表 4.1），而文献中曾报道柠檬酸盐在乳酸代谢中起着重要的作用^[119]，因此柠檬酸三钠+硫酸铵的组合是为了验证柠檬酸盐的添加是否有助于乳酸发酵。

表 4.1 无机氮源及盐价格

Table 4.1 Price of inorganic nitrogen sources and salts

Nitrogen and salt	Price (\$/ton)
Diammonium hydrogen citrate	3166.11
Ammonium sulfate	87.07
Trisodium citrate	1111.11

Diammonium hydrogen citrate 为柠檬酸氢二铵，Ammonium sulfate 为硫酸铵，Trisodium citrate 为柠檬酸三钠。

以棉籽蛋白硫酸水解液为有机氮源，首先在摇瓶中进行不同无机氮源及组合添加下的纤维素 L-乳酸 SSCF（图 4.2）。

图 4.2 所示，(a-1) 图中随着柠檬酸氢二铵的添加量从 2 g/L 到 10 g/L，摇瓶发酵 L-乳酸最终产量分别为：42.3 g/L、45.0 g/L、45.0 g/L、46.7 g/L、49.3 g/L，添加 10 g/L 柠檬酸氢二铵后 L-乳酸最高产量为 49.3 g/L；(b-1) 图中随着硫酸铵的添加量从 2 g/L 到 10 g/L，摇瓶发酵 L-乳酸最终产量分别为：39.0 g/L、43.8 g/L、45.0 g/L、45.5 g/L、46.5 g/L，添加 10 g/L 硫酸铵后 L-乳酸最高产量为 46.5 g/L；(c-1) 图中随着柠檬酸三钠+硫酸铵的组合添加量从 5 g/L+2 g/L 到 5 g/L+10 g/L，摇瓶发酵 L-乳酸最终产量分别为：42.5 g/L、48 g/L、49.5 g/L、49.0 g/L、48.5 g/L，添加 5 g/L 柠檬酸三钠+6 g/L 硫酸铵后 L-乳酸最高产量为 49.5 g/L。



图 4.2 不同无机氮及组合下摇瓶纤维素 L-乳酸发酵

Fig. 4.2 Flask cellulosic L-lactic acid fermentation under different inorganic nitrogen sources and combinations

(a) 图代表单独添加柠檬酸氢二铵，添加量为 2 g/L、4 g/L、6 g/L、8 g/L、10 g/L；(b) 图代表单独添加硫酸铵，添加量为 2 g/L、4 g/L、6 g/L、8 g/L、10 g/L；(c) 图代表添加柠檬酸三钠+硫酸铵组合，添加量为 5 g/L+2 g/L、5 g/L+4 g/L、5 g/L+6 g/L、5 g/L+8 g/L、5 g/L+10 g/L；

250 mL 摇瓶 SSCF，25% (w/w) 固含量，10% (v/v) 接种量，发酵条件为 42 °C 和 150 rpm，发酵时间为 72 h；有机氮源添加为 20 g/L 棉籽蛋白，6.25% (w/w) 硫酸条件下水解；额外无机盐添加：0.25 g/L 一水硫酸锰。

(a-2) 图中随着柠檬酸氢二铵的添加量从 2 g/L 到 10 g/L, 摇瓶发酵剩余葡萄糖浓度分别为: 62.3 g/L、58.0 g/L、58.3 g/L、56.8 g/L、53.5 g/L, 剩余木糖浓度分别为: 18.0 g/L、15.5 g/L、15.5 g/L、16.5 g/L、14.5 g/L, 添加 10 g/L 柠檬酸氢二铵后剩余最低葡萄糖+木糖浓度为 68.0 g/L; (b-2) 图中随着硫酸铵的添加量从 2 g/L 到 10 g/L, 摇瓶发酵剩余葡萄糖浓度分别为: 62.8 g/L、58.8 g/L、58.0 g/L、57.3 g/L、55.8 g/L, 剩余木糖浓度分别为: 18.5 g/L、17.3 g/L、16.5 g/L、17.0 g/L、15.5 g/L, 添加 10 g/L 硫酸铵后剩余最低葡萄糖+木糖浓度为 71.3 g/L; (c-2) 图中随着柠檬酸三钠+硫酸铵的组合添加量从 5 g/L+2 g/L 到 5 g/L+10 g/L, 摇瓶发酵剩余葡萄糖浓度分别为: 61.0 g/L、54.3 g/L、51.5 g/L、54.0 g/L、55.0 g/L, 剩余木糖浓度分别为: 18.0 g/L、16.5 g/L、15.0 g/L、15.5 g/L、16.0 g/L, 添加 5 g/L 柠檬酸三钠+6 g/L 硫酸铵后剩余最低葡萄糖+木糖浓度为 66.5 g/L。

不同无机氮源及组合的最高乳酸产量分别如下: 5 g/L 柠檬酸三钠+6 g/L 硫酸铵最高 L-乳酸浓度为 49.5 g/L, 10 g/L 柠檬酸氢二铵最高 L-乳酸浓度为 49.3 g/L, 10 g/L 硫酸铵最高 L-乳酸浓度为 46.5 g/L, 可以看出, 最高 L-乳酸的产量并无明显差异。

不同无机氮源及组合的剩余最低残糖分别如下: 5 g/L 柠檬酸三钠+6 g/L 硫酸铵剩余最低葡萄糖+木糖浓度为 66.5 g/L, 10 g/L 柠檬酸氢二铵剩余最低葡萄糖+木糖浓度为 68.0 g/L, 10 g/L 硫酸铵剩余最低葡萄糖+木糖浓度为 71.3 g/L。

此外, 对于具体的无机氮源及组合, 增加无机氮源的添加量对于 L-乳酸产量影响不大, 但相比之下对糖的消耗更大。以添加柠檬酸氢二铵为例, 添加量从 2 g/L 增加到 10 g/L, 乳酸产量仅增加了 7 g/L, 相比之下葡萄糖消耗了约 9 g/L、木糖消耗了 3.5 g/L, 而 1 g 葡萄糖或木糖转化为乳酸的理论得率均为 100%, 消耗的糖转化为乳酸的实际得率仅为 56%, 这表明乳酸菌利用更多的糖进行细胞生长, 而并未进行产物合成。

摇瓶发酵剩余的总糖较生物反应器要多, 这可能是由于二者在 pH 和温度调控上存在差距。生物反应器是自动流加氢氧化钙进行 pH 调控且罐体保温效果较好, 而摇瓶发酵是预先加入一定量的碳酸钙进行 pH 调控, 且摇床内温度分布可能不均, 从而导致摇瓶 L-乳酸发酵效果整体较差。

4.3.2 生物反应器无机氮源优化验证

为了进一步验证 4.3.1 中摇瓶发酵的结论, 本研究分别选取了三组表现最佳的无机氮源及组合: 10 g/L 柠檬酸氢二铵、10 g/L 硫酸铵、5 g/L 柠檬酸三钠+6 g/L 硫酸铵, 在 5 L 生物反应器上进行纤维素 L-乳酸 SSCF 验证 (图 4.3), 对照组无机氮源为 2 g/L 柠檬酸氢二铵。

图 4.3 所示, 初始葡萄糖约为 60 g/L, 初始木糖约为 20 g/L, 初始 L-乳酸约为 0.5 g/L, 发酵 72 h 后 L-乳酸手性度均 $\geq 99\%$ 。在发酵 72 h 后, 四组无机盐添加条件下木糖均消耗完毕, L-乳酸产量均为 95 g/L 左右, 剩余葡萄糖浓度如下: 添加 2 g/L 柠檬酸氢二铵为 22.9 g/L, 添加 10 g/L 柠檬酸氢二铵为 2.5 g/L, 添加 10 g/L 硫酸铵为 3.5 g/L, 添加 5 g/L 柠檬酸三钠+6 g/L 硫酸铵为 3.6 g/L。

可以看出, 不同无机氮源及组合添加下 L-乳酸的产量几乎一致, 表明无机氮源的添

加并不能提升最终 L-乳酸发酵产量。仅添加 2 g/L 的柠檬酸氢二铵乳酸发酵剩余大量葡萄糖 (22.9 g/L)，而增加无机氮盐的含量 (10 g/L 柠檬酸氢二铵、10 g/L 硫酸铵、5 g/L 柠檬酸三钠+6 g/L 硫酸铵) 乳酸发酵最终剩余 2-4 g/L 葡萄糖，表明增加无机氮盐的添加量有利于残糖的降低，但改变无机氮盐的添加种类没有带来显著差异，再结合表 4.1 中无机氮源及盐价格，10 g/L 硫酸铵有着最低添加价格 (\$0.00087/L)，因此最终选择 10 g/L 硫酸铵作为无机氮源进行添加。

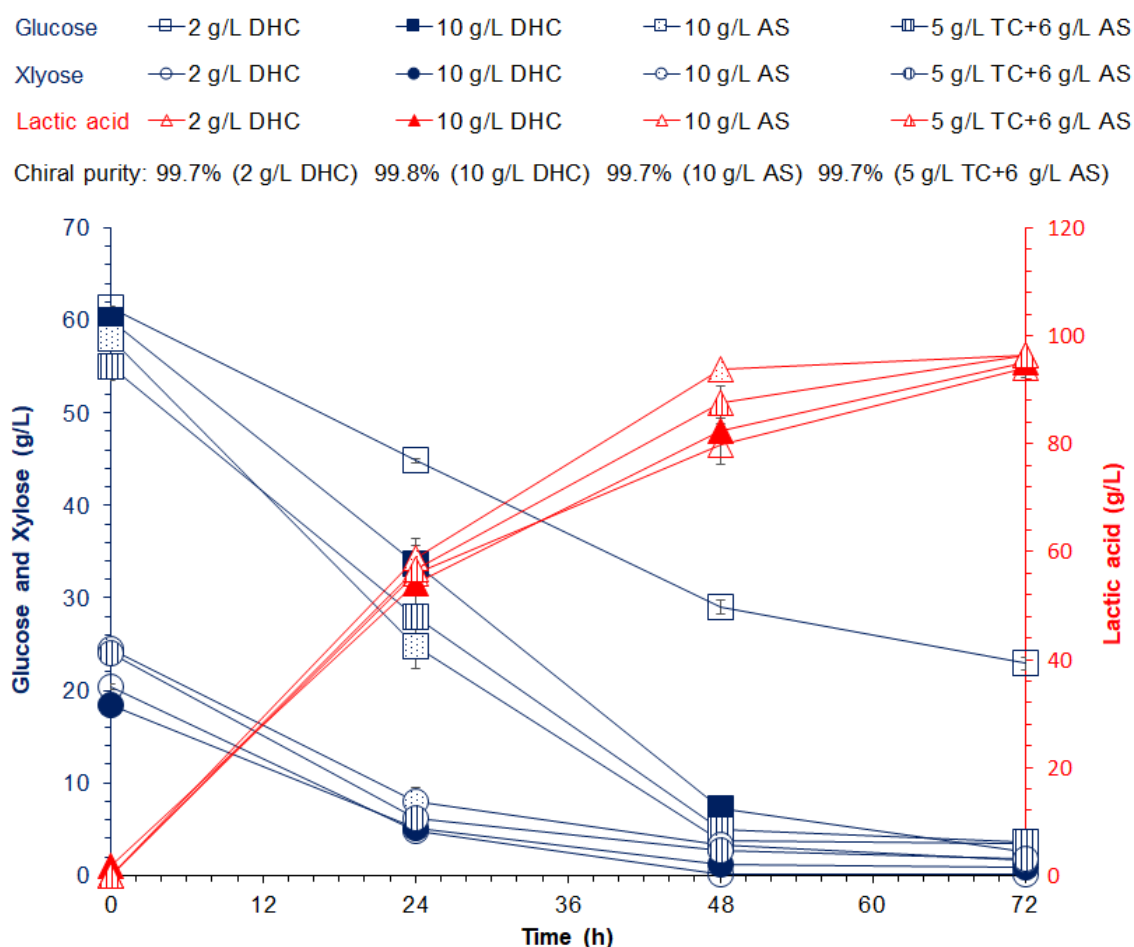


图 4.3 不同无机氮源及组合下生物反应器纤维素 L-乳酸发酵

Fig. 4.3 Bioreactor cellulosic L-lactic acid fermentation under different inorganic nitrogen sources and combinations

DHC 代表柠檬酸氢二铵 (Diammonium hydrogen citrate), AS 代表硫酸铵 (Ammonium sulfate), TC 代表柠檬酸三钠 (Trisodium citrate)。

5 L 生物反应器 SSCF, 25% (w/w) 固含量, 10% (v/v) 接种量, 发酵条件为 42 °C 和 150 rpm, 发酵时间为 72 h; 有机氮源添加为 20 g/L 棉籽蛋白, 6.25% (w/w) 硫酸条件下水解; 额外无机盐添加: 0.25 g/L 一水硫酸锰。

4.3.3 不同氮源组合下纤维素 L-乳酸发酵评价

为了进一步评价本研究中完成的各项氮源优化对纤维素 L-乳酸发酵的影响,以本实验室的 Liu^[110]在之前使用玉米浆干粉为廉价有机氮源完成的纤维素 L-乳酸发酵为基础案例,表 4.4 为 Liu^[110]与本研究在不同氮源组合下的纤维素乳酸生产参数对比。

表 4.4 不同氮源组合下纤维素 L-乳酸发酵评价

Table 4.4 Evaluation of fermentation performance of cellulosic L-lactic acid in different combinations of nitrogen sources

	Case 1	Case 2	Case 3
Strain	<i>P. acidilactici</i> TY112	<i>P. acidilactici</i> ZY271	<i>P. acidilactici</i> ZY271
Xylose utilization	No	Yes	Yes
Raw feedstock	Corn stover	Wheat straw	Wheat straw
Total solids loading	30% (w/w)	25% (w/w)	25% (w/w)
Nitrogen sources			
Organic nitrogen sources	20 g/L Dried corn Steep liquor powder	15 g/L Yeast extract + 10 g/L Peptone	20 g/L Cottonseed protein hydrolysate
Inorganic nitrogen sources	2 g/L Diammonium phosphate	2 g/L Diammonium hydrogen citrate	10 g/L Ammonium sulfate
SSCF period (h)	72	72	72
Titer (g/L)	104.5	102.0	96.5
Conversion (g/g DM)	0.27	0.32	0.31
Yield (%)	71.5	83.6	82.0
Productivity (g/L/h)	1.45	1.42	1.32
Chiral purity (% L-form)	95.3	99.5	99.7
References	[110]	This study	This study

Case 2 中 Yeast extract + Peptone 均为工业级; Case 3 中棉籽蛋白为 6.25% (w/w) 硫酸水解。

表 4.4 所示,首先案例 2 与案例 3 对比,案例 3 中棉籽蛋白水解液+硫酸铵的氮源组合发酵 72 h 的 L-乳酸产量为 96.5 g/L, L-乳酸转化率为 0.31 g/g DM, L-乳酸得率为 82.0%, L-乳酸手性度为 99.7%; 案例 2 中工业级的酵母浸粉和蛋白胨+柠檬酸氢二铵的氮源组合发酵 72 h 的 L-乳酸产量为 102.0 g/L, L-乳酸转化率为 0.32 g/g DM, L-乳酸得率为 83.6%, L-乳酸手性度为 99.5%。结果表明,廉价氮源的组合已基本达到了和昂贵氮源组合相同的发酵水平,并且实现了 L-乳酸的高手性度。

案例 1 和案例 3 对比,虽然案例 1 中 L-乳酸产量为 104.5 g/L,高于案例 3 中 96.5 g/L 的乳酸产量,但由于案例 1 中使用了更高的固含量,这意味着利用了更多的木质纤

纤维素原料。案例 1 中 L-乳酸转化率为 0.27 g/g DM, L-乳酸得率为 71.5%, 均低于案例 3 的水平, 并且案例 1 中所用发酵菌株不能利用木糖, 这也导致了木质纤维素原料中的可发酵糖无法被充分利用。其次由于案例 1 使用的有机氮源为玉米浆干粉, 导致其 L-乳酸手性度只有 95.3%, 低于案例 3 的 L-乳酸手性度 (99.7%), 这表明案例 1 无法实现高手性 L-乳酸发酵, 生产的乳酸也就不具备工业聚合的价值。

4.3.4 不同氮源组合下纤维素 L-乳酸技术经济评价

本技术经济评价继续以本实验室 Liu^[110]的工作为基础案例, 表 4.5 计算了纤维素乳酸发酵过程中所需的主要工业用水, 表 4.6 计算了生产 1 kg 纤维素 L-乳酸所需的最低成本。

表 4.5 所示, 纤维素乳酸生产过程中所需的主要工业用水包括: 预处理所需配置的酸溶液、预处理过程中消耗的蒸汽、植物蛋白水解所需配置的酸溶液及乳酸发酵过程中所需的各类水等。案例 1 中生产 1 kg 乳酸所需的总工业用水为 6.71 kg; 案例 2 中生产 1 kg 乳酸所需的总工业用水为 7.29 kg; 案例 3 中生产 1 kg 乳酸所需的总工业用水为 8.10 kg。

表 4.5 纤维素 L-乳酸生产的主要工业用水

Table 4.5 Main plant water usage for cellulosic L-lactic acid production

	Case-1 Usage (kg/kg lactic acid product)	Case-2 Usage (kg/kg lactic acid product)	Case-3 Usage (kg/kg lactic acid product)
Pretreatment	2.53	2.13	2.21
Sulfuric acid solution	1.30	1.09	1.13
Steam	1.23	1.04	1.08
Protein hydrolysis	/	/	0.59
Lactic acid SSCF	4.18	5.16	5.30
Seed solution	0.65	0.73	0.75
Alkali solution	0.72	0.47	0.46
Other water	2.81	3.96	4.09
Total usage	6.71	7.29	8.10

Case 1 对应 Liu^[110]的研究, 氮源组合为玉米浆干粉+磷酸氢二铵; Case 2 对应本文的研究, 氮源组合为工业级的酵母浸粉和蛋白胨+柠檬酸氢二铵; Case 3 对应本文的研究, 氮源组合为棉籽蛋白水解液+硫酸铵; 预处理酸用量为 3.8% (w/w), 假定预处理及生物脱毒后的物料含水量均为 45.5%; Seed solution 为乳酸菌种子液, 接种量为 10% (v/v), Alkali solution 为调节乳酸发酵 pH 所用的碱溶液, Other water 为调节 SSCF 固含量所用的水。

可以看出, 案例 2、3 比案例 1 用水量多, 主要是由于案例 2、3 发酵的固含量较低,

因此发酵过程需要更多的水来降低固含量。案例 3 较案例 2 中多余的用水量主要集中在植物蛋白水解所需配置的酸溶液，事实上，案例 3 中每 1 L 的发酵体系需要添加 80 mL 的棉籽蛋白水解液，差不多接近了乳酸菌种子液的用量（100 mL）。

表 4.6 不同氮源组合下纤维素 L-乳酸生产的最低成本

Table 4.6 Minimum cost of cellulosic L-lactic acid production in different combinations of nitrogen sources

	Case 1	Case 2	Case 3
Minimum lactic acid cost	\$0.584/kg lactic acid product	\$3.241/kg lactic acid product	\$0.813/kg lactic acid product
Feedstock	\$0.237/kg lactic acid product	\$0.276/kg lactic acid product	\$0.286/kg lactic acid product
Enzyme	\$0.130/kg lactic acid product	\$0.101/kg lactic acid product	\$0.104/kg lactic acid product
Organic nitrogen	\$0.009/kg lactic acid product	\$2.624/kg lactic acid product	\$0.193/kg lactic acid product
Inorganic nitrogen	\$0.016/kg lactic acid product	\$0.045/kg lactic acid product	\$0.007/kg lactic acid product
Sulfuric acid	/	/	\$0.005/kg lactic acid product
CaCO ₃	/	/	\$0.004/kg lactic acid product
None-enzyme conversion	\$0.192/kg lactic acid product	\$0.195/kg lactic acid product	\$0.214/kg lactic acid product
References	[110]	This study	This study

Case 1 对应 Liu^[110]的研究，氮源组合为玉米浆干粉+磷酸氢二铵；Case 2 对应本文的研究，氮源组合为工业级的酵母浸粉和蛋白胨+柠檬酸氢二铵；Case 3 对应本文的研究，氮源组合为棉籽蛋白水解液+硫酸铵；纤维素酶价格参考 Liu^[110]在 Aspen Plus 平台基于 NREL 所计算的自产纤维素酶价格，约为\$4.34/kg protein，非酶转化成本参考 Liu^[110]在 Aspen Plus 平台基于 NREL 计算所得，其中酸水解的转化费用相对高一些，其余原料价格均由当地供应商提供报价。

表 4.6 所示，纤维素乳酸的主要生产成本包括：秸秆原料、纤维素酶、氮源以及非酶转化成本。由于商业纤维素酶的成本非常昂贵，价格为\$20-25/kg protein，未来的纤维素乳酸工业化生产必须要实现纤维素酶的在位生产，因此这里的纤维素酶成本参考 Liu^[110]在 Aspen Plus 平台基于 NREL 所计算的自产纤维素酶价格，约为\$4.34/kg protein。案例 1、2、3 乳酸的最低总生产成本分别为\$0.584/kg、\$3.241/kg、\$0.813/kg，其中有

机氮源的生产成本分别为\$0.009/kg、\$2.624/kg、\$0.193/kg。

可以看出，三组案例的总生产成本差异主要集中在有机氮源成本上。案例 1、3 中使用的均为廉价氮源，因此成本非常低廉，由于玉米浆干粉有着更低的价格，因此案例 1 的乳酸总生产成本更为廉价；案例 2 中使用的为酵母浸粉+蛋白胨的昂贵氮源，占据总生产成本的 80%以上，不具备工业应用的价值。

根据 Wee 等^[60]报道，未来用于工业聚乳酸生产的前体乳酸最低总生产成本应当低于\$0.8/kg，才能实现聚乳酸的低成本和大规模应用，而以棉籽蛋白水解液+硫酸铵的氮源组合生产纤维素乳酸的最低总生产成本为\$0.813/kg，因此还需要进一步地降低生产成本。

4.4 本章小结

本章节的主要研究内容为通过优化无机氮源的添加量及添加种类，解决了以棉籽蛋白硫酸水解液为有机氮源乳酸发酵过程中的残糖问题，为后期聚乳酸的合成提供了合格原料，并对不同氮源组合下的乳酸发酵做技术经济评价。本章的主要结论如下：

(1) 在摇瓶和生物反应器中分别验证了不同无机氮源及组合的添加对发酵残糖的影响，并综合考虑无机氮源的添加成本，最终选择廉价且发酵残糖较低的硫酸铵作为无机氮源。

(2) 对本研究中不同氮源组合下的乳酸发酵做具体的发酵指标评价。其中以工业级的酵母浸粉和蛋白胨+柠檬酸氢二铵的氮源组合发酵 72 h 的 L-乳酸产量为 102.0 g/L，L-乳酸转化率为 0.32 g/g DM，L-乳酸得率为 83.6%，L-乳酸手性度为 99.5%；以棉籽蛋白水解液+硫酸铵的氮源组合发酵 72 h 的 L-乳酸产量为 96.5 g/L，L-乳酸转化率为 0.31 g/g DM，L-乳酸得率为 82.0%，L-乳酸手性度为 99.7%。棉籽蛋白水解液+硫酸铵的廉价氮源组合基本实现了对酵母浸粉和蛋白胨的替换。

(3) 对本研究中不同氮源组合下的乳酸发酵进行初步的技术经济评价，其中以工业级的酵母浸粉和蛋白胨+柠檬酸氢二铵的氮源组合生产高手性 L-乳酸的最低成本为 \$3.241/kg，以棉籽蛋白水解液+硫酸铵的氮源组合生产高手性 L-乳酸的最低成本为 \$0.813/kg。棉籽蛋白水解液+硫酸铵的廉价氮源组合极大地降低了乳酸发酵成本。

第 5 章 更多高手性乳酸发酵廉价有机氮源的探索

5.1 引言

作为高手性乳酸发酵的有机氮源应当尽可能的廉价,才能实现聚乳酸的低成本生产。在第 3 章和第 4 章中已经基本实现了以棉籽蛋白水解液为有机氮源对酵母浸粉和蛋白胨的替换,但由于棉籽蛋白是由未脱酚棉粕经脱酚加工得到,其作为氮源成本较酵母浸粉和蛋白胨已经非常低廉,但相比于未脱酚棉粕,其价格依旧是未脱酚棉粕的 4-5 倍。

未脱酚棉粕粗蛋白含量可达 40%以上,2019 年全球棉粕产量为 15.59 百万吨^[120]。未脱酚棉粕的主要用途为家禽饲料,由于其含有游离棉酚对蛋白质具有毒性,因此在饲料中的配比受到限制,也基本不用作微生物发酵的有机氮源来源。

与未脱酚棉粕相比,豆粕作为另一种产量更大、应用更广泛的廉价植物蛋白,其价格与未脱酚棉粕相当,约为\$0.32/kg。2019 年全球豆粕产量为 2.43 亿吨^[121],大豆的粗蛋白含量为 30-50%,由于豆粕本身不含酚类物质,因此水解后可作为微生物发酵的有机氮源直接添加。

生物脱毒菌株 *P. variotii* FN89 除了对弱酸类、呋喃醛类抑制物有较强的降解能力外,对酚类抑制物也有一定的降解能力^[22]。除此之外,*P. variotii* FN89 由于其菌丝不易断裂,在液态搅拌体系中生长良好,因此又可以对预处理物料中的抑制物进行液态脱毒。

为了实现未脱酚棉粕在乳酸发酵有机氮源上的应用,本章节尝试利用生物脱毒菌株 *P. variotii* FN89 对未脱酚棉粕水解液进行脱酚处理。与前三章内容所采用的固态脱毒方式不一样,本章节采用新的脱毒方式,即液态脱毒,探究 *P. variotii* FN89 在对未脱毒物料进行液态脱毒的同时,是否能同时脱除未脱酚棉粕水解液的棉酚。因此,本章节的主要内容为:(1)对未脱酚棉粕、豆粕进行表征,测定其粗蛋白和乳酸含量,并通过酸水解的方式进行添加,探究其作为高手性乳酸发酵有机氮源的可行性;(2)尝试利用 *P. variotii* FN89 对未脱酚棉粕水解液和未脱毒物料同时进行液态脱毒,并在液态脱毒完成后再进行纤维素 L-乳酸发酵;(3)在完成对未脱毒物料液态脱毒后,添加豆粕水解液作为有机氮源进行纤维素 L-乳酸发酵;(4)在液态脱毒方式下,初步评价未脱酚棉粕水解液和豆粕水解液作为有机氮源的纤维素 L-乳酸发酵效果、手性度及成本。

5.2 材料和方法

5.2.1 原料、酶和试剂

所用小麦秸秆、纤维素酶及糖化酶见 2.2.1。

豆粕购自中粮集团(上海,中国),未脱酚棉粕购自佳惠饲料(河北,中国)。

硫酸、柠檬酸氢二铵等购自国药集团。

所用原料及试剂均由当地供应商提供报价,美元对人民币的汇率被设定为 6.3 元。

5.2.2 菌种和培养基

L-乳酸发酵菌株为 *P. acidilactici* ZY271, 其来源及培养基均见 2.2.2; 生物脱毒菌株为 *P. variotii* FN89, 其来源及短期保藏培养基均见 2.2.2。

P. variotii FN89 液态脱毒种子培养基为 Synthetic-Medium (SM) 培养基, 包括: 2 g/L 磷酸二氢钾、0.5 g/L 氯化钙、1 g/L 硫酸铵、1 g/L 酵母浸粉 (试剂级)、1 g/L 七水合硫酸镁、20 g/L 葡萄糖。

5.2.3 纤维素 L-乳酸发酵

(1) 摇瓶 SSCF

摇瓶 SSCF 使用的原料来自固态脱毒方式, 方法步骤见 3.2.3。

(2) 生物反应器 SSCF

生物反应器 SSCF 使用的原料来自液态脱毒方式, 由于液态脱毒首先需要对预处理物料进行一定时间的糖化以降低体系粘稠度, 方便后续液态脱毒过程所需的高搅拌转速, 因此调整后的生物炼制加工顺序为预处理、糖化、液态脱毒和发酵, 具体方法如下:

①预处理: 干酸预处理方法见 2.2.3。

②糖化: 在 5 L 螺带搅拌式生物反应器^[11]中进行糖化。首先, 按照 25% (w/w) 固含量体系准备好所需的水和预处理后未脱毒物料。将反应器温度设置为 50 °C、转速为 150 rpm, 分别加入水、纤维素酶和物料, 酶用量为 4 mg protein/DM, 预糖化时间为 8 h。

③*P. variotii* FN89 种子液培养: 取出一只装有冷冻干燥保种的 *P. variotii* FN89 菌种, 用 500 μ L 无菌水溶解冻干菌粉, 然后倒入 PDA 平板, 37 °C 培养 3-5 天, 作为第一代 *P. variotii* FN89 菌种。在第一代平板基础上用平板划线法划至另一块 PDA 平板, 37 °C 继续培养 3-5 天, 作为第二代菌种。将第二代 *P. variotii* FN89 平板上的孢子用 10 mL 的 0.05% (w/w) 的吐温 80 溶液充分洗脱, 将孢子液按 10% (v/v) 接种量接入新鲜 SM 培养基中, 37 °C、300 rpm 培养 20 h 后为第三代菌种。

④液态脱毒: 将步骤②中得到的糖化液转移至带有六直叶 Rushton 搅拌桨的 3 L 生物反应器中, 随后按 10% (v/v) 接种量接入第三代 *P. variotii* FN89 种子液, 开始脱毒过程。反应器温度设置为 37 °C、转速为 750 rpm、通气量为 1 vvm, 脱毒时间为 12-24 h, 整个过程 pH 不做调整和控制, 脱毒结束后 pH 将升高 1-2 个点, 当 pH 升至峰值后代表脱毒结束。脱毒结束后立即将反应器温度设置为 50 °C、转速为 150 rpm, 并关闭通气, 由于 *P. variotii* FN89 在 50 °C 下无法存活, 此过程的目的在于杀灭 *P. variotii* FN89, 使其无法在脱毒结束后开始利用大量可发酵糖进行生长代谢。

⑤*P. acidilactici* ZY271 种子液培养: *P. acidilactici* ZY271 种子培养方法见 2.2.4。

⑥纤维素 L-乳酸发酵: 将 *P. acidilactici* ZY271 种子液按 10% (v/v) 接种量接入脱毒后的体系中, 将反应器温度设置为 42 °C、转速为 150 rpm, 发酵时间 72 h, 全过程用 25% (w/w) 氢氧化钙调节 pH 为 5.5, 每隔 24 h 取样检测糖耗、乳酸。

5.2.4 植物蛋白水解

未脱酚棉粕、豆粕和棉籽蛋白均采用硫酸水解，方法见 3.2.4，考虑到豆粕的吸水性较强，酸溶液太少不利于震荡均匀，因此固液比统一调整为 1:5 (w/w)，硫酸溶液浓度为 6.25% (w/w)。

未脱酚棉粕、豆粕和棉籽蛋白在发酵时与乳酸菌种子液同时添加，添加量均为 20 g/L，即每 1 L 发酵体系添加 120 g 植物蛋白水解液，按照 1:5 (w/w) 的固液比，即 1 L 发酵体系含有 20 g 植物蛋白。

5.2.5 分析方法

葡萄糖、木糖、乙酸、糠醛、HMF、总酚、乳酸、粗蛋白及 D-/L-乳酸手性度测定方法见 2.2.5。

5.2.6 纤维素 L-乳酸得率计算

纤维素 L-乳酸得率计算方法及公式见 2.2.6。

5.2.7 纤维素 L-乳酸转化率计算

纤维素 L-乳酸转化率计算方法及公式见 2.2.7。

5.3 结果与讨论

5.3.1 未脱酚棉粕和豆粕表征

为了验证未脱酚棉粕、豆粕作为高手性乳酸发酵有机氮源来源的可行性，首先对这两种廉价植物蛋白进行表征 (表 5.1)，并通过酸水解方式作为有机氮源进行添加，图 5.2 摇瓶纤维素 L-乳酸发酵，对照组有机氮源为棉籽蛋白水解液。

表 5.1 未脱酚棉粕和豆粕表征

Table 5.1 Characterizations of undephenolized cottonseed meal and soybean meal

Nitrogen	Price (\$/kg)	Protein (% DM)	Lactic acid (mg/g DM)	L-lactic acid (mg/g DM)	D-lactic acid (mg/g DM)
Undephenolized cottonseed meal	0.32	47.3 ± 0.7	ND	ND	ND
Soybean meal	0.32	45.6 ± 0.9	ND	ND	ND

ND 代表试剂盒未检测到。

表 5.1 所示，未脱酚棉粕、豆粕的价格均为 \$0.32/kg，相比棉籽蛋白 \$1.27/kg 的价格，未脱酚棉粕、豆粕价格是棉籽蛋白价格的 25% 左右，表明这两种植物蛋白首先在价格是非常便宜的。未脱酚棉粕、豆粕的粗蛋白含量分别为干物质的 47.3% 和 45.6%，粗蛋白含量均在 40% 以上，且未脱酚棉粕、豆粕均未检测出乳酸存在，表明这两种植物蛋白作为高手性乳酸发酵有机氮源来源是完全可行的。

图 5.2 所示，以棉籽蛋白水解液、未脱酚棉粕水解液和豆粕水解液为有机氮源摇瓶

乳酸发酵 72 h 的产量分别为 44.0 g/L、35.5 g/L 和 30.5 g/L。可以看出，对照组棉籽蛋白的发酵效果最好，其次分别是未脱酚棉粕和豆粕，其中未脱酚棉粕中酚类抑制物并没有对乳酸发酵产生强烈的抑制作用，接下来还需在生物反应器上进行验证。

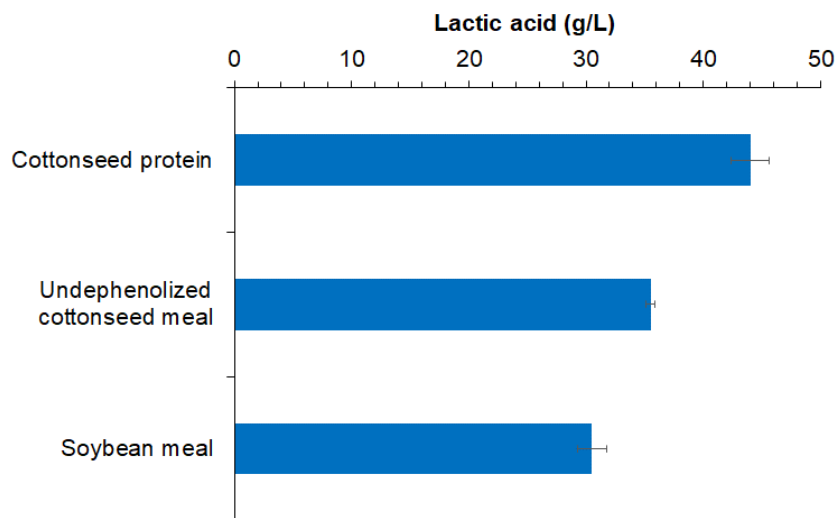


图 5.2 更多廉价有机氮源摇瓶纤维素 L-乳酸发酵

Fig.5.2 Flask cellulosic L-lactic acid fermentation of more cheap organic nitrogen sources

250 mL 摇瓶 SSCF, 25% (w/w) 固含量, 10% (v/v) 接种量, 发酵条件为 42 °C 和 150 rpm, 发酵时间为 72 h;

有机氮源添加量均为 20 g/L, 无机盐添加为 2 g/L 柠檬酸氢二铵+0.25 g/L 一水硫酸锰。

5.3.2 以未脱酚棉粕水解液为有机氮源的生物脱毒验证及纤维素 L-乳酸发酵

为了验证生物脱毒菌株 *P. variotii* FN89 是否对酚类抑制物进行有效脱除，同时为了节省时间和提高效率。本研究在利用 *P. variotii* FN89 对预处理后物料进行液态脱毒的同时，加入未脱酚棉粕水解液，探究 *P. variotii* FN89 在对木质纤维素中主要抑制物进行脱毒的同时，能否对未脱酚棉粕水解液中的酚类进行脱除，达到同步降解的效果。

表 5.3 所示，利用生物脱毒菌株 *P. variotii* FN89 对未脱毒物料糖化液+未脱酚棉粕水解液共同脱毒，其中乙酸、5-羟甲基糠醛和糠醛这三类抑制物全部来自于未脱毒物料糖化液，总酚大部分来自于未脱毒物料糖化液，少量来自于未脱酚棉粕水解液。脱毒 0 h 抑制物含量为：乙酸 10.04 mg/g DM、5-羟甲基糠醛 0.84 mg/g DM、糠醛 0.84 mg/g DM、总酚 3.63 mg/g DM；脱毒 12 h 后抑制物含量为：乙酸、5-羟甲基糠醛和糠醛均未检测出，总酚 3.89 mg/g DM。

可以看出，在 12 h 的脱毒时间内，*P. variotii* FN89 实现了对乙酸、5-羟甲基糠醛和糠醛的完全脱除，但对于酚类抑制物的降解能力较弱，总酚含量没有下降反而上升了一点，这可能是由于未脱毒物料含有的酚类进一步释放所致。

表 5.3 未脱毒物料糖化液+未脱酚棉粕水解液共同液态脱毒

Table 5.3 Joint liquid detoxification of undetoxicated saccharification liquid and undephenolized cottonseed meal hydrolysate

	Detoxification-0 h	Detoxification-12 h
Acetate (mg/g DM)	10.04 ± 0.63	ND
HMF (mg/g DM)	0.84 ± 0.04	ND
Furfural (mg/g DM)	0.84 ± 0.09	ND
Total Phenol (mg/g DM)	3.63 ± 0.22	3.89 ± 0.33
Undetoxicated wheat straw (mg/g DM)	3.32 ± 0.15	
Undephenolized cottonseed meal (mg/g DM)	0.31 ± 0.07	

ND 代表为检测出；

脱毒 0 h 葡萄糖含量为 120.61 ± 1.93 mg/g DM，脱毒 12 h 葡萄糖含量为 133.45 ± 2.57 mg/g DM；

脱毒 0 h 木糖含量为 85.73 ± 2.2 mg/g DM，脱毒 12 h 木糖含量为 84.19 ± 1.59 mg/g DM。

值得注意的是，这里没有选择进一步延长脱毒时间，液态脱毒时间的延长会对酚类抑制物有缓慢的降解，但随着乙酸等主要抑制物的脱除，*P. variotii* FN89 会开始利用大量的可发酵糖进行生长代谢，这会造成可发酵糖尤其是木糖的大量损失，对于后期还要进行乳酸发酵而言显然是不可行的。

既然生物脱毒菌株 *P. variotii* FN89 在共同液态脱毒的有效时间内不能实现对酚类抑制物的降解，本研究进一步考虑在完成只对未脱毒物料液态脱毒后，直接添加未脱酚棉粕水解液进行纤维素 L-乳酸发酵（图 5.4），探究未脱酚棉粕中的酚类是否会影响乳酸发酵。

图 5.4 所示，分别代表未脱毒物料+未脱酚棉粕水解液共同完成液态脱毒后再进行 L-乳酸发酵，以及在完成只对未脱毒物料液态脱毒后，再添加未脱酚棉粕水解液进行 L-乳酸发酵。两组实验条件下发酵初始葡萄糖均为 60 g/L 左右，初始木糖均为 40 g/L 左右，初始 L-乳酸均为 0.5 g/L 左右。脱毒时添加未脱酚棉粕水解液发酵 72 h 结果如下：剩余葡萄糖 32.6 g/L，剩余木糖 5.7 g/L，L-乳酸产量 71.4 g/L，L-乳酸手性度 99.4%；脱毒后添加未脱酚棉粕水解液发酵 72 h 结果如下：剩余葡萄糖 22.2 g/L，剩余木糖 4.8 g/L，L-乳酸产量 85.0 g/L，L-乳酸手性度 99.3%。

可以看出，在完成只对未脱毒物料液态脱毒后，直接添加未脱酚棉粕水解液进行纤维素 L-乳酸发酵效果更好，而未脱毒物料+未脱酚棉粕水解液共同完成液态脱毒后再进行 L-乳酸发酵的 L-乳酸产量更低，剩余残糖也更多，这可能是由于 *P. variotii* FN89 在共同脱毒期间内消耗了部分未脱酚棉粕水解液的有机氮源成分，从而导致后期乳酸发酵时可利用的有机氮源成分减少。

进一步地，两组实验条件下乳酸发酵均正常进行，可见棉酚的存在并没有对乳酸发

醇产生抑制作用。实际上来自未脱酚棉粕水解液的酚类在加入发酵体系后便稀释了很多倍，相比于来自未脱毒物料中的酚类几乎可忽略不计（表 5.3）。Qiu 等^[122]在研究酚类抑制物对同类乳酸片球菌的耐受性时，也证实了乳酸片球菌对酚类抑制物具有一定的代谢降解能力，所以即使生物脱毒菌株 *P. variotii* FN89 在有效脱毒时间内没有实现对酚类抑制物的脱除，乳酸发酵也能正常进行。

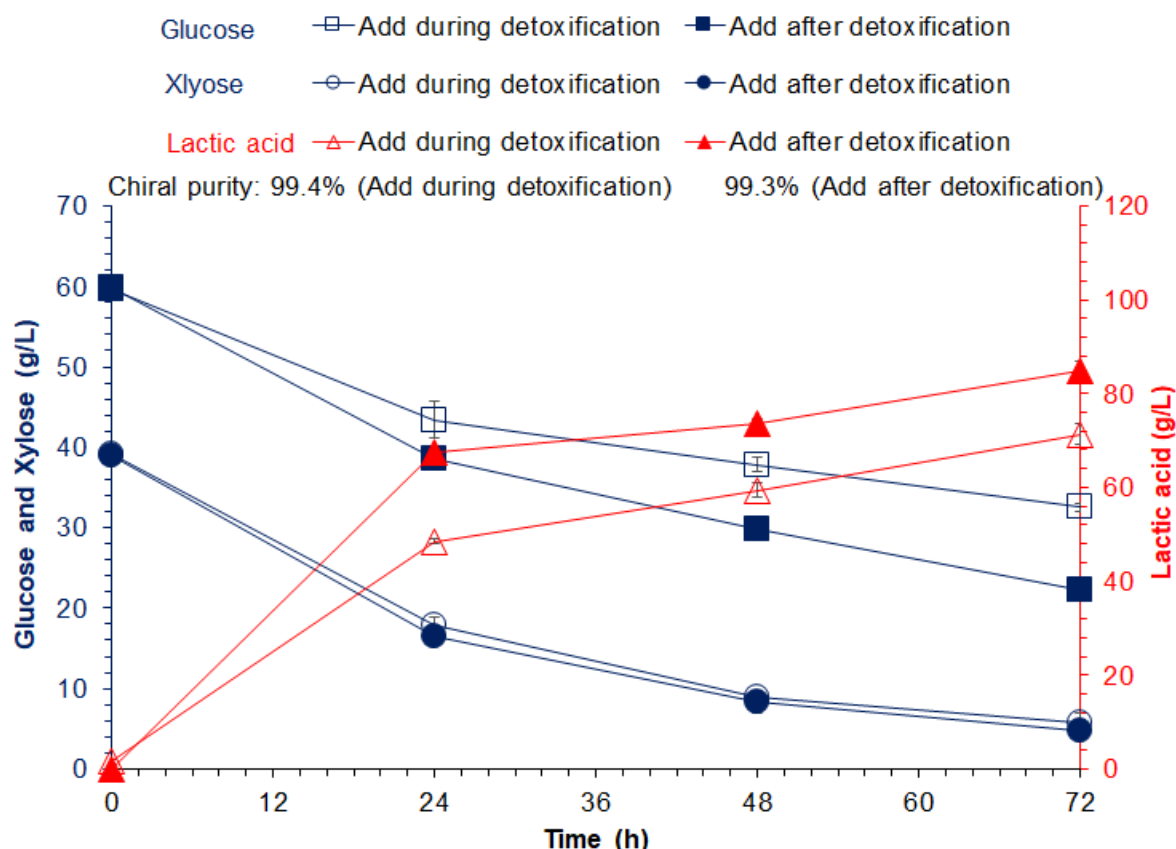


图 5.4 以未脱酚棉粕水解液为有机氮源生物反应器纤维素 L-乳酸发酵

Fig. 5.4 Bioreactor cellulosic L-lactic acid fermentation using undephenolized cottonseed meal hydrolysate as organic nitrogen source

Add during detoxification 指未脱毒物料+未脱酚棉粕水解液共同进行液态脱毒，Add after detoxification 指在完成只对未脱毒物料液态脱毒后，再添加未脱酚棉粕水解液；未脱酚棉粕添加量均为 20 g/L，无机盐添加为 2 g/L 柠檬酸氢二铵+0.25 g/L 一水硫酸锰；

3 L 生物反应器，25% (w/w) 固含量，10% (v/v) 接种量，发酵条件为 42 °C 和 150 rpm，发酵时间为 72 h。

5.3.3 以豆粕水解液为有机氮源纤维素 L-乳酸发酵

为了进一步探究豆粕水解液作为有机氮源的纤维素 L-乳酸发酵效果，本研究以棉籽蛋白水解液为对照，并继续在液态脱毒方式下进行纤维素 L-乳酸发酵，豆粕水解液和棉

籽蛋白水解液均在完成对未脱毒物料液态脱毒后添加（表 5.5、图 5.6）。

表 5.5 未脱毒物料糖化液液态脱毒

Table 5.5 Liquid detoxification of undetoxicated saccharification liquid

	Detoxification-0 h	Detoxification-13 h
Acetate (mg/g DM)	10.37 ± 0.58	ND
HMF (mg/g DM)	0.88 ± 0.06	ND
Furfural (mg/g DM)	0.78 ± 0.08	ND
Total Phenol (mg/g DM)	3.27 ± 0.25	3.33 ± 0.28

ND 代表未检测出；

脱毒 0 h 葡萄糖含量为 116.65 ± 2.30 mg/g DM，脱毒 13 h 葡萄糖含量为 135.83 ± 2.71 mg/g DM；

脱毒 0 h 木糖含量为 89.25 ± 2.26 mg/g DM，脱毒 13 h 木糖含量为 89.06 ± 1.84 mg/g DM。

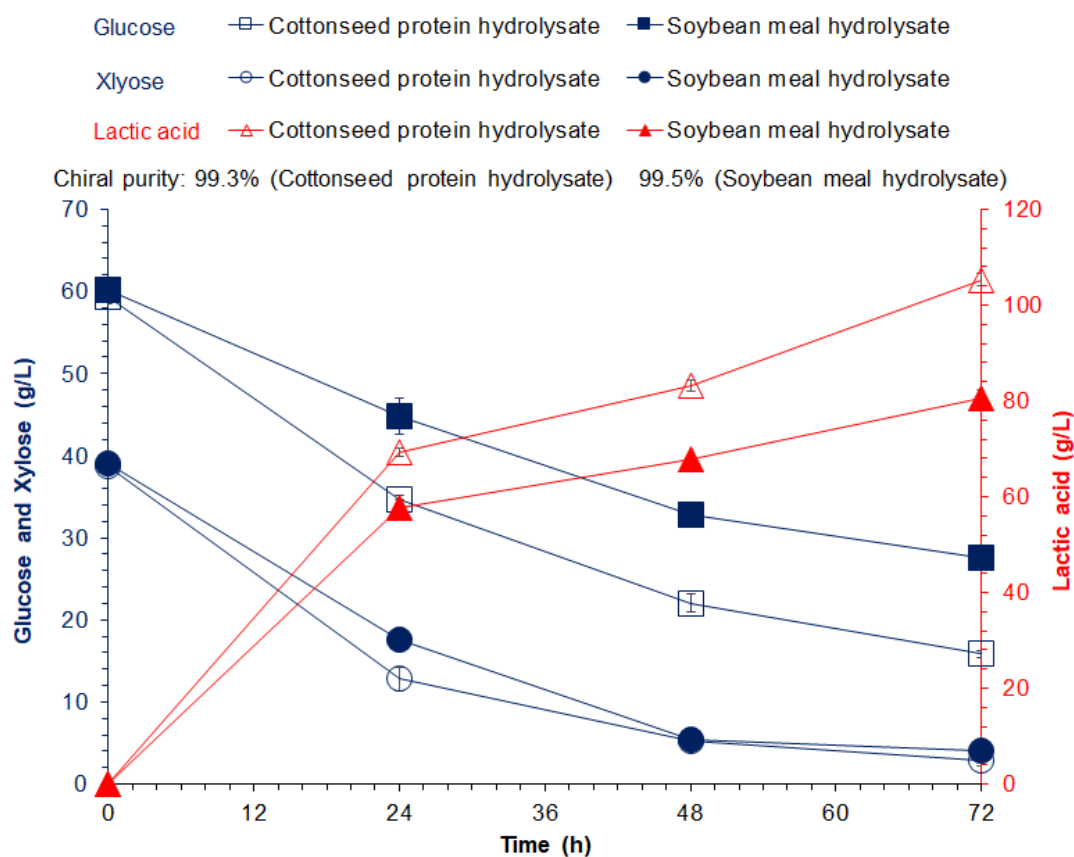


图 5.6 以豆粕水解液为有机氮源生物反应器纤维素 L-乳酸发酵

Fig. 5.6 Bioreactor cellulosic L-lactic acid fermentation using soybean meal hydrolysate as organic nitrogen source

3 L 生物反应器，25% (w/w) 固含量，10% (v/v) 接种量，发酵条件为 42 °C 和 150 rpm，发酵时间为 72 h；棉籽蛋白、豆粕添加量均为 20 g/L，无机盐添加为 2 g/L 柠檬酸氢二铵+0.25 g/L 一水硫酸锰。

表 5.5 所示, 液态脱毒 0 h 抑制物含量为: 乙酸 10.37 mg/g DM, 5-羟甲基糠醛 0.88 mg/g DM, 糠醛 0.78 mg/g DM, 总酚 3.27 mg/g DM; 液态脱毒 13 h 后抑制物含量为: 乙酸、5-羟甲基糠醛和糠醛均未检测出, 总酚 3.33 mg/g DM。可以看出, 未脱毒物料在液态脱毒条件下, 13 h 就完成了对主要抑制物的脱除, 酚类抑制物依旧没有变化。

图 5.6 所示, 初始葡萄糖约为 60 g/L, 初始木糖约为 40 g/L, 初始 L-乳酸约为 0.3g/L。以棉籽蛋白水解液为有机氮源发酵 72 h 后, 剩余葡萄糖 15.9 g/L, 剩余木糖 2.9 g/L, L-乳酸产量 105.3 g/L, L-乳酸手性度 99.3%; 以豆粕水解液为有机氮源发酵 72 h, 剩余葡萄糖 27.6 g/L, 剩余木糖 4.1 g/L, L-乳酸产量 80.7 g/L, L-乳酸手性度 99.5%。

可以看出, 在相同水解条件下, 豆粕水解液作为有机氮源的 L-乳酸产量比棉籽蛋白水解液低出 23.3%, 并且出现了大量发酵残糖, 这表明豆粕水解液的乳酸发酵效果较差。

5.3.4 不同廉价有机氮源下纤维素 L-乳酸发酵及成本评价

本部分针对 5.3.2 和 5.3.3 中分别利用棉籽蛋白水解液、未脱酚棉粕水解液和豆粕水解液为有机氮源, 在液态脱毒方式下分别评价其乳酸发酵效果及乳酸生产的有机氮源成本。

表 5.7 所示, 在三种廉价有机氮源中, L-乳酸发酵的手性度均 $\geq 99\%$, 表明这三种廉价有机氮源均可以实现高手性乳酸发酵。其中棉籽蛋白水解液的 L-乳酸发酵得率和转化率分别为 82.7%、0.35 g/g DM; 未脱酚棉粕水解液的 L-乳酸发酵得率和转化率分别为 64.4%、0.27 g/g DM; 豆粕水解液的 L-乳酸发酵得率和转化率分别为 61.2%、0.26 g/g DM。可见以未脱酚棉粕及豆粕水解液作为有机氮源的乳酸发酵得率和转化率均较低, 针对此问题后续可适当提高未脱酚棉粕和豆粕的添加量, 并进一步优化无机氮源的添加来提高乳酸发酵产量并降低残糖, 以提高乳酸发酵得率和转化率。

表 5.7 不同廉价有机氮源下纤维素 L-乳酸发酵及成本评价

Table 5.7 Fermentation and cost evaluation of cellulosic L-lactic acid using different cheap organic nitrogen sources

	Cottonseed protein	Undephenolized cottonseed meal	Soybean meal
Nitrogen cost (\$/kg lactic acid product)	0.17	0.05	0.06
Lactic acid (g/L)	105.3 ± 1.3	85.0 ± 2.0	80.7 ± 1.6
Chiral purity (% L-form)	99.3 ± 0.1	99.3 ± 0.0	99.5 ± 0.0
Yield (%)	82.7 ± 1.0	64.4 ± 1.5	61.2 ± 1.2
Conversion (g/g DM)	0.35 ± 0.00	0.27 ± 0.01	0.26 ± 0.01

有机氮源添加量均为 20 g/L。

虽然以未脱酚棉粕水解液和豆粕水解液为有机氮源的 L-乳酸发酵效果较棉籽蛋白

水解液略差，但以棉籽蛋白水解液为有机氮源 L-乳酸的生产成本是\$0.17/kg，而以未脱酚棉粕水解液和豆粕水解液为有机氮源 L-乳酸的生产成本分别是\$0.05/kg 和\$0.06/kg，成本是棉籽蛋白水解液的 1/3 左右，显然更具工业应用价值。

5.4 本章小结

本章节在前文研究得到的棉籽蛋白酸水解的方法上，进一步探索了更多高手性乳酸发酵廉价有机氮源来源，包括未脱酚棉粕和豆粕。本章节的主要结论如下：

(1) 对未脱酚棉粕和豆粕进行表征，证实了其不含乳酸，且粗蛋白含量均在 40% 以上，可以作为高手性乳酸发酵的有机氮源来源。

(2) 尝试利用生物脱毒菌株 *P. variotii* FN89 对未脱毒物料糖化液和未脱酚棉粕水解液共同进行脱毒处理，但在有效的脱毒时间内未能实现对酚类抑制物的降解。利用未脱酚棉粕水解液进行乳酸发酵，证实了未脱酚棉粕水解液即使存在酚类抑制物，但作为乳酸发酵有机氮源是完全可行的。以未脱酚棉粕水解液为有机氮源，在完成对未脱毒物料液态脱毒后进行添加，L-乳酸发酵产量和手性度分别为 85.0 g/L、99.3%。

(3) 在液态脱毒方式下，以豆粕水解液为有机氮源进行乳酸发酵，L-乳酸发酵产量和手性度分别为 80.7 g/L、99.5%；对照组以棉籽蛋白水解液为有机氮源进行乳酸发酵，L-乳酸发酵产量和手性度分别为 105.3 g/L、99.3%，豆粕水解液的发酵效果较棉籽蛋白水解液差。

(4) 对棉籽蛋白水解液、未脱酚棉粕水解液和豆粕水解液为有机氮源进行乳酸发酵及成本评价，三种廉价有机氮源均可以实现高手性 L-乳酸发酵。其中棉籽蛋白水解液的发酵效果最佳，其次是分别是未脱酚棉粕水解液和豆粕水解液，且二者的乳酸发酵效果相差不大。以三种廉价有机氮源生产 L-乳酸的有机氮源成本分别为：棉籽蛋白水解液为\$0.17/kg，未脱酚棉粕水解液为\$0.05/kg，豆粕水解液为\$0.06/kg，未脱酚棉粕水解液和豆粕水解液在发酵成本上更具竞争力。

第 6 章 结论与展望

6.1 结论

聚乳酸是一种重要的生物基可降解材料，而高手性乳酸是合成聚乳酸的前体，目前以粮食作物为原料生产乳酸不仅成本高，也加剧了粮食和土地资源紧张的问题。以木质纤维素为原料生产乳酸，尽管来源广泛且成本低廉，但以酵母浸粉和蛋白胨为主的昂贵有机氮源占乳酸生产成本的 1/3 以上，而玉米浆干粉等廉价有机氮源的使用会引入大量混合手性乳酸，造成乳酸产品手性度的下降。

针对这些问题，本论文以高光学纯 L-乳酸发酵工程菌 *P. acidilactici* ZY271 作为出发菌株，以不含乳酸的棉籽蛋白作为廉价蛋白来源，并通过酸水解的方式作为有机氮源添加，在此基础上进一步优化无机氮源的添加量及添加种类，最终使乳酸发酵水平基本达到了以酵母浸粉和蛋白胨等昂贵有机氮源的发酵水平。

本论文的主要结论如下：

(1) 对常见有机氮源进行表征及纤维素 L-乳酸发酵评价，证实了以酵母浸粉和蛋白胨为有机氮源发酵效果好但成本过于昂贵，以玉米浆干粉为有机氮源成本低廉但会引入大量混合手性乳酸，造成乳酸产品手性度严重下降。

(2) 以棉籽蛋白酸水解液为乳酸发酵的有机氮源，能够实现乳酸的高手性度生产，且乳酸发酵产量基本达到了酵母浸粉和蛋白胨等昂贵有机氮源的水平。

(3) 通过棉籽蛋白酸水解液+硫酸铵的氮源组合，基本实现乳酸发酵残糖的清零，为高手性的 L-乳酸发酵提供了一种工业廉价氮源解决方案。

(4) 证实了未脱酚棉粕水解液含有的酚类抑制物对于纤维素 L-乳酸发酵没有影响。以未脱酚棉粕水解液和豆粕水解液分别作为乳酸发酵有机氮源，均能够实现乳酸的高手性度生产，发酵效果均较棉籽蛋白水解液略差，但在氮源成本上更有优势。

6.2 创新点

(1) 提出了以棉籽蛋白水解液作为有机氮源、硫酸铵作为无机氮源的廉价氮源组合，实现了纤维素 L-乳酸的低残糖、低成本及高手性度生产。

6.3 展望

本论文针对常见的工业廉价氮源含有混合 L/D-乳酸，并导致最终乳酸产品手性度下降的问题，主要提出了以不含乳酸的棉籽蛋白这一廉价植物蛋白为基础，利用硫酸水解后作为有机氮源，并通过补加无机氮源硫酸铵的方式，实现了对纤维素 L-乳酸低成本、低残糖及高手性度的生产。但是本研究也存在一些值得继续研究的问题：

(1) 在氮源种类上的研究比较深入，但对氮源的用量的研究较浅，这一部分尚需要进行深入研究，进一步降低氮源的成本。

(2) 酸水解的方式需要在高温环境下长时间进行, 这增加了额外的能耗, 并且对水解反应器易造成腐蚀, 不能响应目前低碳环保的生产策略。未来可以继续探索酶水解的方式, 通过优化酶用量、固液比及采用多酶联合水解等方式, 来达到和酸水解同样的水解效果。

(3) 在以未脱酚棉粕水解液和豆粕水解液为有机氮源进行发酵时, 又出现了大量残糖的问题, 后续可以考虑进一步优化有机氮源和无机氮源的添加量来降低发酵残糖。

(4) 乳酸发酵需要丰富的营养物质, 除有机、无机氮源外, 维生素等营养因子也能够促进乳酸发酵。据文献报道^[123]维生素 B₃、B₅ 可以显著促进纤维素 L-乳酸发酵, 因此可以尝试在乳酸发酵中添加少量维生素 B₃、B₅, 以替代/降低部分氮源的使用。

参考文献

- [1] Amadu AA, Qiu S, Ge SJ, Addico GND, Ameka GK, Yu ZW, Xia WH, Abbew AW, Shao DD, Champagne P, Wang SF. A review of biopolymer (poly-beta-hydroxybutyrate) synthesis in microbes cultivated on wastewater. *Science of the Total Environment*. 2021, 756.
- [2] De Bhowmick G, Sarmah AK, Sen R. Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. *Bioresource Technology*. 2018, 247: 1144-1154.
- [3] Amidon TE, Liu S. Water-based woody biorefinery. *Biotechnology Advances*. 2009, 27(5): 542-550.
- [4] Xu YH, Li MF. Hydrothermal liquefaction of lignocellulose for value-added products: mechanism, parameter and production application. *Bioresource Technology*. 2021, 342.
- [5] Upton BM, Kasko AM. Strategies for the conversion of lignin to high-value polymeric materials: review and perspective. *Chemical Reviews*. 2016, 116(4): 2275-2306.
- [6] Zhang ZR, Song JL, Han BX. Catalytic transformation of lignocellulose into chemicals and fuel products in ionic liquids. *Chemical Reviews*. 2017, 117(10): 6834-6880.
- [7] Corma A, Iborra S, Velty A. Chemical routes for the transformation of biomass into chemicals. *Chemical Reviews*. 2007, 107(6): 2411-2502.
- [8] Gallezot P. Conversion of biomass to selected chemical products. *Chemical Society Reviews*. 2012, 41(4): 1538-1558.
- [9] Moon RJ, Martini A, Nairn J, Simonsen J, Youngblood J. Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites. *Chemical Society Reviews*. 2011, 40(7): 3941-3994.
- [10] Felby C. Biomass recalcitrance-deconstructing the plant cell wall for bioenergy. *Chemsuschem*. 2009, 2(6): 593-593.
- [11] Galkin MV, Samec JSM. Lignin valorization through catalytic lignocellulose fractionation: a fundamental platform for the future biorefinery. *Chemsuschem*. 2016, 9(13): 1544-1558.
- [12] Zakzeski J, Bruijninx PCA, Jongerius AL, Weckhuysen BM. The catalytic valorization of lignin for the production of renewable chemicals. *Chemical Reviews*. 2010, 110(6): 3552-3599.
- [13] Yang B, Wyman CE. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2008, 2(1): 26-40.
- [14] Wyman CE, Dale BE, Elander RT, Holtzapple M, Ladisch MR, Lee YY. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*. 2005, 96(18): 1959-1966.
- [15] Zhu JY, Pan XJ. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: technology and energy consumption evaluation. *Bioresource Technology*. 2010, 101(13): 4992-

5002.

[16] Zhang J, Wang XS, Chu DQ, He YQ, Bao J. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2011, 102(6): 4480-4488.

[17] Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. 2000, 74(1): 25-33.

[18] Kuhad RC, Singh A, Eriksson KE. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. Springer Berlin Heidelberg. 1997, 57: 45-125.

[19] Klinke HB, Ahring BK, Schmidt AS, Thomsen AB. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresource Technology*. 2002, 82(1): 15-26.

[20] Jing XY, Zhang XX, Bao J. Inhibition performance of lignocellulose degradation products on industrial cellulase enzymes during cellulose hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009, 159(3): 696-707.

[21] 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. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3: 26.

[22] Zhang B, Khushik FA, Zhan BR, Bao J. Transformation of lignocellulose to starch-like carbohydrates by organic acid-catalyzed pretreatment and biological detoxification. *Biotechnology and Bioengineering*. 2021.

[23] Wang X, Gao QQ, Bao J. Transcriptional analysis of *Amorphotheca resinae* ZN1 on biological degradation of furfural and 5-hydroxymethylfurfural derived from lignocellulose pretreatment. *Biotechnology for Biofuels*. 2015, 8(1): 1-13.

[24] Rinaldi R, Schuth F. Acid hydrolysis of cellulose as the entry point into biorefinery schemes (vol 2, pg 1096, 2009). *Chemsuschem*. 2010, 3(3): 296-296.

[25] Ladisch MR, Lin KW, Voloch M, Tsao GT. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme and Microbial Technology*. 1983, 5(2): 82-102.

[26] Ulbricht RJ, Northup SJ, Thomas JA. A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Toxicological Sciences*. 1984, 4(5): 843-853.

[27] Walker ALP, Wilson BDB. Enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview. *Bioresource Technology*. 1991, 36(1): 3-14.

[28] Wingren A, Galbe M, Zacchi G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnology Progress*. 2003, 19(4): 1109-1117.

[29] Ask M, Olofsson K, Felice TD, Ruohonen L, Olsson L. Challenges in enzymatic hydrolysis

- and fermentation of pretreated arundo donax revealed by a comparison between SHF and SSF. *Process Biochemistry*. 2012, 47(10): 1452–1459.
- [30] Parisutham V, Kim TH, Lee SK. Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: from pretreatment to biofuel production. *Bioresource Technology*. 2014, 161: 431-440.
- [31] Alfani F, Gallifuoco A, Saporosi A, Spera A, Cantarella M. Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2000, 25(4): 184-192.
- [32] He NL, Jia J, Qiu ZY, Fang C, Liden G, Liu XC, Bao J. Cyclic L-lactide synthesis from lignocellulose biomass by biorefining with complete inhibitor removal and highly simultaneous sugars assimilation. *Biotechnology and Bioengineering*. 2022.
- [33] Oshiro M, Shinto H, Tashiro Y, Miwa N, Sekiguchi T, Okamoto M, Ishizaki A, Sonomoto K. Kinetic modeling and sensitivity analysis of xylose metabolism in *Lactococcus lactis* IO-1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2009, 108(5): 376-384.
- [34] Singhvi M, Joshi D, Adsul M, Varma A, Gokhale D. D-(-)-lactic acid production from cellobiose and cellulose by *Lactobacillus lactis* mutant RM2-24. *Green Chemistry*. 2010, 12(6): 1106-1109.
- [35] Tashiro Y, Kaneko W, Sun YQ, Shibata K, Inokuma K, Zendo T, Sonomoto K. Continuous D-lactic acid production by a novel thermotolerant *Lactobacillus delbrueckii subsp lactis* QU 41. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 89(6): 1741-1750.
- [36] Castillo Martinez FA, Balciunas EM, Salgado JM, Domínguez González JM, Converti A, Oliveira RPDS. Lactic acid properties, applications and production: a review. *Trends in Food Science and Technology*. 2013, 30(1): 70-83.
- [37] Adnan AFM, Tan IKP. Isolation of lactic acid bacteria from malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. *Bioresource Technology*. 2007, 98(7): 1380-1385.
- [38] Dey P, Pal P. Direct production of L (+) lactic acid in a continuous and fully membrane-integrated hybrid reactor system under non-neutralizing conditions. *Journal of Membrane Science*. 2012, 389: 355-362.
- [39] Jin B, Yin PH, Ma YH, Zhao L. Production of lactic acid and fungal biomass by *Rhizopus fungi* from food processing waste streams. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2005, 32(11-12): 678-686.
- [40] Hofvendahl K, Hahn-Hagerdal B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000, 26(2-4): 87-107.
- [41] Ilmen M, Koivuranta K, Ruohonen L, Suominen P, Penttila M. Efficient production of L-lactic acid from xylose by *Pichia stipitis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, 73(1): 117-123.

- [42] Taskila S, Ojamo H. The current status and future expectations in industrial production of lactic acid by lactic acid bacteria. *Lactic Acid Bacteria R&D for Food, Health and Livestock Purposes*. 2013.
- [43] Kuo YC, Yuan SF, Wang CA, Huang YJ, Guo GL, Hwang WS. Production of optically pure L-lactic acid from lignocellulosic hydrolysate by using a newly isolated and D-lactate dehydrogenase gene-deficient *Lactobacillus paracasei* strain. *Bioresource Technology*. 2015, 198: 651-657.
- [44] Lopez-Gomez JP, Alexandri M, Schneider R, Venus J. A review on the current developments in continuous lactic acid fermentations and case studies utilising inexpensive raw materials. *Process Biochemistry*. 2019, 79: 1-10.
- [45] Villadsen J. Innovative technology to meet the demands of the white biotechnology revolution of chemical production. *Chemical Engineering Science*. 2007, 62(24): 6957-6968.
- [46] Hama S, Mizuno S, Kihara M, Tanaka T, Ogino C, Noda H, Kondo A. Production of D-lactic acid from hardwood pulp by mechanical milling followed by simultaneous saccharification and fermentation using metabolically engineered *Lactobacillus plantarum*. *Bioresource Technology*. 2015, 187: 167-172.
- [47] Lee RK, Ryu HW, Oh H, Kim M, Wee YJ. Cell-recycle continuous fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1 for economical production of lactic acid by reduction of yeast extract supplementation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014, 24(5): 661-666.
- [48] Regiane A, Schneider R, Rossell CV, Filho RM, Venus J. Polymer grade L-lactic acid production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate using *Bacillus coagulans*. *Bioresource Technology Reports*. 2019, 6: 26-31.
- [49] Tan IS, Lam MK, Foo HCY, Lim S, Lee KT. Advances of macroalgae biomass for the third generation of bioethanol production. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2020, 28(2): 502-517.
- [50] To-Hung T, Wong JWC. A critical review: emerging bioeconomy and waste-to-energy technologies for sustainable municipal solid waste management. *Waste Disposal and Sustainable Energy*. 2019, 1(3): 151-167.
- [51] Tsui TH, Wu H, Song B, Liu SS, Bhardwaj A, Wong JWC. Food waste leachate treatment using an upflow anaerobic sludge bed (UASB): effect of conductive material dosage under low and high organic loads. *Bioresource Technology*. 2020, 304.
- [52] Wyman CE. Biomass ethanol: technical progress, opportunities, and commercial challenges. *Annual Review of Energy and the Environment*. 1999, 24: 189-226.
- [53] Salminen S, Ouwehand AC, Wright AV, Daly C. Future aspects of research and product development of lactic acid bacteria. 2004.
- [54] Lee KS, Lee DS. A kinetic model for lactic acid production in kimchi, a Korean fermented

- vegetable dish. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1993, 75(5): 392-394.
- [55] Gao C, Ma CQ, Xu P. Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. *Biotechnology Advances*. 2011, 29(6): 930-939.
- [56] Gorrasi G, Pantani R. Effect of PLA grades and morphologies on hydrolytic degradation at composting temperature: assessment of structural modification and kinetic parameters. *Polymer Degradation and Stability*. 2013, 98(5): 1006-1014.
- [57] Ingrao C, Tricase C, Cholewa-Wojcik A, Kawecka A, Rana R, Siracusa V. Polylactic acid trays for fresh-food packaging: a carbon footprint assessment. *Science of the Total Environment*. 2015, 537: 385-398.
- [58] Wu YL, Wang H, Qiu YK, Loh XJ. PLA-based thermogel for the sustained delivery of chemotherapeutics in a mouse model of hepatocellular carcinoma. *Rsc Advances*. 2016, 6(50): 44506-44513.
- [59] Avinc O, Khoddami A. Overview of poly(lactic acid) (PLA) fibre. *Fibre Chemistry*. 2009, 41(6): 391-401.
- [60] Mallick S, Ahmad Z, Touati F, Bhadra J, Shakoor RA, Al-Thani NJ. PLA-TiO₂ nanocomposites: thermal, morphological, structural, and humidity sensing properties. *Ceramics International*. 2018, 44(14): 16507-16513.
- [61] Wee YJ, Kim J, Ryu HW. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technology and Biotechnology*. 2006(44): 163-172.
- [62] John RP, Nampoothiri KM, Pandey A. Simultaneous saccharification and fermentation of cassava bagasse for L-(+)-lactic acid production using *Lactobacilli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2006, 134(3): 263-272.
- [63] Litchfield JH. Lactic acid, microbially produced. *Encyclopedia of Microbiology*, 2009:362-372.
- [64] Nancib A, Nancib N, Meziane-Cherif D, Boubendir A, Fick M, Boudrant J. Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei subsp rhamnosus*. *Bioresource Technology*. 2005, 96(1): 63-67.
- [65] Cardinal EV, Hedrick LR. Microbiological assay of corn steep liquor for amino acid content. *The Journal of Biological Chemistry*. 1948, 172(2): 609-612.
- [66] Bowden JP, Peterson WH. The role of corn steep liquor in the production of penicillin. *Archives of Biochemistry*. 1946, 9: 387-399.
- [67] Wang Y, Chen CJ, Cai D, Wang Z, Qin PY, Tan TW. The optimization of L-lactic acid production from sweet sorghum juice by mixed fermentation of *Bacillus coagulans* and *Lactobacillus rhamnosus* under unsterile conditions. *Bioresource Technology*. 2016, 218: 1098-1105.
- [68] 杨小佳, 王金水, 管军军, 杨国浩. 豆粕的营养价值及影响因素. *粮食与饲料工业*.

2013(3): 3.

[69] Liang SX, Jiang W, Song YB, Zhou SF. Improvement and metabolomics-based analysis of D-lactic acid production from agro-industrial wastes by *Lactobacillus delbrueckii* submitted to adaptive laboratory evolution. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2020, 68(29): 7660-7669.

[70] Tian XJ, Jiang AL, Mao YQ, Wu B, He MX, Hu W, Chen JH, Li WJ. Efficient L-lactic acid production from purified sweet sorghum juice coupled with soybean hydrolysate as nitrogen source by *Lactobacillus thermophilus* A69 strain. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2019, 94(6): 1752-1759.

[71] 刘少娟, 陈家顺, 姚康, 印遇龙. 棉粕的营养组成及其在畜禽生产中的应用. *畜牧与饲料科学*. 2016, 37(9): 5.

[72] 李志青, 刘尚航, 李浩, 刘湘, 刘念, 张旭, 马晓康. 棉粕和脱酚棉籽蛋白在单胃动物生产中的应用研究进展. *中国畜牧杂志*. 2021: 1-8.

[73] 周培校, 赵飞, 潘晓亮, 吴高风. 棉粕和棉籽壳饲用的研究进展. *畜禽业*. 2009(8): 4.

[74] 冯莉. 棉粕源酵母发酵饲料的研究. 石河子大学. 2011.

[75] 李艳玲, 李松彪, 王毓蓬. 棉籽蛋白的开发利用. *中国棉花加工*. 2005(3): 2.

[76] 胡跃高. 我国饲料资源现状与农业发展. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*. 1994(02): 50-55.

[77] 赵小龙, 刘大川. 棉籽蛋白资源开发研究进展. *中国油脂*. 2014, 39(1): 4.

[78] Bai ZZ, Gao Z, Sun JF, Wu B, He BF. D-lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus* YBS1-5 with simultaneous utilization of cottonseed meal and corncob residue. *Bioresource Technology*. 2016, 207: 346-352.

[79] Dalgaard R, Schmidt J, Halberg N, Christensen P, Thrane M, Pengue WA. LCA of soybean meal. *International Journal of Life Cycle Assessment*. 2008, 13(3): 240-254.

[80] Selling GW, Hojilla-Evangelista MP, Hay WT, Utt KD, Grose GD. Preparation and properties of solution cast films from pilot-scale cottonseed protein isolate. *Industrial Crops and Products*. 2022, 178.

[81] Wang LM, Zhao B, Li FS, Xu K, Ma CQ, Tao F, Li QG, Xu P. Highly efficient production of D-lactate by *Sporolactobacillus sp.* CASD with simultaneous enzymatic hydrolysis of peanut meal. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 89(4): 1009-1017.

[82] Brock S, Kuenz A, Prusse U. Impact of hydrolysis methods on the utilization of agricultural residues as nutrient source for D-lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus*. *Fermentation-Basel*. 2019, 5(1).

[83] Lu Z, He F, Shi Y, Lu M, Yu L. Fermentative production of L(+)-lactic acid using hydrolyzed acorn starch, persimmon juice and wheat bran hydrolysate as nutrients. *Bioresource Technology*. 2010, 101(10): 3642-3648.

- [84] Wang Y, Yang ZX, Qin PY, Tan TW. Fermentative L-(+)-lactic acid production from defatted rice bran. *Rsc Advances*. 2014, 4(17): 8907-8913.
- [85] Duar RM, Lin XXB, Zheng JS, Martino ME, Grenier T, Perez-Munoz ME, Leulier F, Ganzle M, Walter J. Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *Fems Microbiology Reviews*. 2017, 41: S27-S48.
- [86] Wee YJ, Yun JS, Kim D, Ryu HW. Batch and repeated batch production of L-(+)-lactic acid by *Enterococcus faecalis* RKY1 using wood hydrolyzate and corn steep liquor. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2006, 33(6): 431-435.
- [87] Tian XJ, Hu W, Chen JH, Zhang W, Li WJ. The supplement of vitamin C facilitates L-lactic acid biosynthesis in *Lactobacillus thermophilus* A69 from sweet sorghum juice coupled with soybean hydrolysate as feedstocks. *Industrial Crops and Products*. 2020, 146.
- [88] Zheng WM. Proteins: from sequence to structure. *Chinese Physics B*. 2014, 23(7).
- [89] Lieske B, Konrad G. Protein hydrolysis: the key to meat flavorings systems. *Food Reviews International*. 1994, 10(3): 287-312.
- [90] Kristinsson HG, Rasco BA. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2000, 40(1): 43-81.
- [91] Thomas D, Loffler F. Improved protein functionalities by enzymatic treatment. *Food Market*. 1994, 2.
- [92] Orlova TA, Nelichik NN, Fleider KA. Edible protein concentrate from fish raw material. *Rybnoe Khozyaistvo*. 1979, 10: 59.
- [93] Tannenbaum SR, Ahern M, Bates RP. Solubilization of fish protein concentrate: an alkaline process. *Food Technology*. 1970, 24(5): 607.
- [94] Sikorski ZE, Naczek M. Modification of technological properties of fish protein concentrates. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 1981, 14(3): 201-230.
- [95] Svendsen IB. Chemical modifications of the subtilisins with special reference to the binding of large substrates: a review. *Carlsberg Research Communications*. 1976, 41(5): 237-291.
- [96] Lahl WJ, Braun SD. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. *Food*. 1994, 48(10): 236-239.
- [97] Williams AP. Enzymic hydrolysis of food proteins. *Food Chemistry*. 1987, 26(1): 81-82.
- [98] 黄薇, 林虬, 宋永康, 姚清华. 双酶分步水解制备棉籽多肽工艺条件优化. *饲料工业*. 2013(7): 5.
- [99] 刘静, 陈均志. 微波双酶协同水解大豆分离蛋白制备小分子肽的研究. *食品研究与开发*. 2006, 27(8): 5.
- [100] Deeslie WD, Cheryan M. Functional properties of soy protein hydrolysates from a continuous ultrafiltration reactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1988, 36(1): 17-

22.

[101] Unban K, Khanongnuch R, Kanpiengjai A, Shetty K, Khanongnuch C. Utilizing gelatinized starchy waste from rice noodle factory as substrate for L(+)-lactic acid production by amylolytic lactic acid *Bacterium Enterococcus faecium* K-1. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2020, 192(2): 353-366.

[102] Qiu ZY, Gao QQ, Bao J. Engineering *Pediococcus acidilactici* with xylose assimilation pathway for high titer cellulosic L-lactic acid fermentation. *Bioresour Technol*. 2018, 249: 9-15.

[103] Sikder J, Roy M, Dey P, Pal P. Techno-economic analysis of a membrane-integrated bioreactor system for production of lactic acid from sugarcane juice. *Biochemical Engineering Journal*. 2012, 63: 81-87.

[104] Alexandri M, Neu AK, Schneider R, Lopez-Gomez JP, Venus J. Evaluation of various *Bacillus coagulans* isolates for the production of high purity L-lactic acid using defatted rice bran hydrolysates. *International Journal of Food Science and Technology*. 2019, 54(4): 1321-1329.

[105] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. NREL/TP-510-42623, NREL: Golden, CO. 2008.

[106] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Crocker D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. NREL/TP-510-42618, NREL: Golden, CO. 2012.

[107] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, 72(1-2): 248-254.

[108] Adney B, Baker J. Measurement of cellulase activities. 1996.

[109] Ghose TK. Measurement cellulase of activities. *Pure and Applied Chemistry*. 1987.

[110] Liu G, Sun J, Zhang J, Tu Y, Bao J. High titer L-lactic acid production from corn stover with minimum wastewater generation and techno-economic evaluation based on aspen plus modeling. *Bioresour Technol*. 2015, 198: 803-810.

[111] 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. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010, 105(4): 718-728.

[112] Qiu ZY, Gao QQ, Bao J. Constructing xylose-assimilating pathways in *Pediococcus acidilactici* for high titer D-lactic acid fermentation from corn stover feedstock. *Bioresour Technol*. 2017, 245(Pt B): 1369-1376.

[113] Altaf M, Venkateshwar M, Srijana M, Reddy G. An economic approach for L-(+) lactic

acid fermentation by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using inexpensive carbon and nitrogen sources. *Journal of Applied Microbiology*. 2007, 103(2): 372-380.

[114] Sun YQ, Xu ZZ, Zheng YF, Zhou JJ, Xiu ZL. Efficient production of lactic acid from sugarcane molasses by a newly microbial consortium CEE-DL15. *Process Biochemistry*. 2019, 81: 132-138.

[115] 中国产业信息网. 《2015-2022 年中国棉籽油市场专项调研及投资战略咨询报告》. 2015. www.chyxx.com.

[116] 张广志, 李纪顺, 杨合同, 王加宁, 扈进冬. 棉籽蛋白和玉米浆水解氨基酸组成的测定. *江苏农业学报*. 2008: 24(06):975-976.

[117] 杨霞. 高效棉酚降解菌株的筛选鉴定及其差异蛋白质组学研究. 浙江大学. 2010.

[118] Joglekar HG, Rahman I, Babu S, Kulkarni BD, Joshi A. Comparative assessment of downstream processing options for lactic acid. *Separation and Purification Technology*. 2006, 52(1): 1-17.

[119] Drider D, Bekal S, Prevost H. Genetic organization and expression of citrate permease in lactic acid bacteria. *Genetics and Molecular Research*. 2004, 3(2): 273-281.

[120] 中国产业信息网. 《2021-2027 年中国棉粕行业市场全景分析及发展趋势研究报告》. 2021. www.chyxx.com.

[121] 中国产业信息网. 《2021-2027 年中国豆粕行业市场供需规模及投资战略咨询报告》. 2021. www.chyxx.com.

[122] Qiu ZY, Fang C, Gao QQ, Bao J. A short-chain dehydrogenase plays a key role in cellulosic D-lactic acid fermentability of *Pediococcus acidilactici*. *Bioresour Technol*. 2020: 297.

[123] Han XS, Li L, Wei CX, Zhang J, Bao J. Facilitation of L-lactic acid fermentation by lignocellulose biomass rich in vitamin B compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2019, 67(25): 7082-7086.

附录 I 主要仪器设备

名称	型号	生产厂家
预处理反应器	PCF20-1.6	烟台科立化工
粉碎输送泵	DSX-32S	启东市东盛化工机械厂
生物脱毒反应器	BIOTECH-15L	上海保兴生物
糖化反应器	BIOTECH-5L	上海保兴生物
发酵反应器	BIOTECH-3L	上海保兴生物
pH 电极	G301K	苏州汉星
水浴恒温摇床	HZ-9212S	太仓华利达
电子天平	BS223S	瑞士梅特勒-托利多
生物传感分析仪	SBA-90	山东省科学院生物研究所
台式粉碎机	HR2094	广东飞利浦
高效液相色谱	LC-20AD	日本岛津

学术成果

已发表论文:

1. Bin Zhang¹, **Lei Wu**¹, Ya Wang, Jing Li, Baorui Zhan, Jie Bao. Re-examination of dilute acid hydrolysis of lignocellulose for production of cellulosic ethanol after de-bottlenecking the inhibitor barrier. *Journal of Biotechnology*.

待发表论文:

1. Bin Zhang¹, **Lei Wu**¹, Xiucui Liu², Jie Bao*. Alternative complex nutrients source for high chiral purity L-lactic acid fermentation from lignocellulose feedstock.

拟申请专利:

1. 一种生产高手性度纤维素 L-乳酸的廉价有机氮源制备方法。发明人: (1) 鲍杰 (2) 吴雷 (3) 张斌

致谢

当我写下这段文字的时候，意味着对学生时代的告别，即将步入社会。三年前，我从一个普通二本院校考入华理，幸运地遇见了鲍杰老师，成为生物炼制实验室的一分子。在这里，我由一个科研小白逐步成长为可以独立查阅文献、完成实验的科研人员，对生物行业也有了更深的认识，这一切首先要感谢鲍老师。鲍老师对学术的严谨和对工作的一丝不苟的态度深深地影响了我。

2020 年新冠疫情的大爆发影响了几乎所有人的正常生活，也使我真正用于做实验的时间只有一年多，期间遇到了很多实验上的失败，也记得在假期独自留下来做实验的日子，很多个早起晚归的日日夜夜，最后也算是幸运地完成了课题。这期间，要非常感谢我的师兄张斌，在科研上给了我很多指导和意见，让我受益匪浅，一直很佩服师兄有着深厚的学术功底，科研之外也是一个乐观有趣的人。

三年前，我也幸运地在复试期间认识了我的女朋友曹玮，虽然各自的科研都非常忙碌，但每当自己的生活和实验遇到挫折的时候，对我的鼓励和安慰总能让我走出阴霾。

最后，还要感谢同为本科校友的李景，炎热的夏天一起做预处理的日子让人怀念；感谢舍友王柯、王泽宇、徐瞳，让我收获了很多友谊；感谢韩涛师兄、王雅师姐、何妮玲师姐、刘祺师姐，实验室一起生活工作的时间总是那么愉快短暂；感谢同为一届的陈明星、徐迎迎、李静，三年来朝夕相处的日子互相学习进步；感谢杨虎成师弟、任大宇师弟、郭晓梦师妹、李治斌师弟，在科研上都给予了我许多帮助。

始于一场初秋，终于一场盛夏，愿我们历尽千帆，归来仍是少年。

吴雷

2022 年 4 月 于上海