

分类号: _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学

学位论文

利用木质纤维素原料连续同步糖化与共发酵
生产 L-乳酸的研究

李景 Y45190702

指导教师姓名: 鲍杰 教授 生物工程学院

黄亦钧 高级工程师 山东蔚蓝生物科技有限公司

申请学位级别: 工学硕士 专业名称: 生物工程

论文定稿日期: 2022.05.07 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

利用木质纤维素原料连续同步糖化与共发酵生产 L-乳酸的研究

摘要

与批次发酵相比,连续发酵可以通过减少生物反应器清空、清洁、消毒和重新填充的频率来实现更高的生产效率。乳酸等大宗发酵产品的生产在连续模式下更具有经济可行性。

为了获得更高的产品浓度和生产效率,纤维素乳酸的生产通常需要在高固含量下进行,其中最常用的生产工艺为批次的同步糖化与共发酵(SSCF)。然而 SSCF 最显著的缺点是纤维素酶的最适糖化温度与大多数微生物的发酵温度不匹配,这就导致了大部分 SSCF 的水解和发酵不得不在两个温度下进行,从而使得以木质纤维素原料为底物的连续 SSCF 工艺难以开展。

本论文对基于干法生物炼制平台的连续 SSCF 生产高手性纯度纤维素 L-乳酸进行了探究和优化。所用的木质纤维素原料为经干酸预处理和生物脱毒的小麦秸秆;所用 L-乳酸发酵菌株为具有戊糖同化途径和抑菌活性的工程嗜热乳酸片球菌 ZY271,该菌在 48 °C、pH 4.8-5.5 条件下能同步代谢全谱木质纤维素来源糖。其发酵温度与纤维素酶的最适温度(50 °C)接近;发酵 pH 与纤维素酶的最适 pH(5.5)基本一致。

首先,为了建立有效地连续 SSCF 过程,本研究在不外置糖化罐的前提下,统一了糖化和发酵温度。在单级反应器中,以不同温度(42-50 °C)和稀释度(0.008-0.025 h⁻¹)条件进行了乳酸连续 SSCF。在 30% (w/w) 固体含量、45 °C 的恒温、0.008 h⁻¹ 稀释度下,稳定状态下的乳酸平均产量、得率和产率分别达到 104.8 ± 3.5 g/L、0.24 ± 0.01 g/g DM 和 0.87 ± 0.03 g/L/h。进一步提高发酵稀释度至 0.025 h⁻¹,乳酸产率升高至 2.21 ± 0.11 g/L/h,但产量和得率分别下降了 15.7% 和 1.25%,这表明高稀释度条件使得物料水解程度下降,从而造成乳酸产量和得率下降。

针对在单个生物反应器中由于物料保留时间较短导致的连续 SSCF 中糖化与发酵不完全的问题,进一步对多个单级反应器进行串联,延长物料的保留时间。经过对发酵固体固含量(20-30%, w/w)和稀释度(0.008-0.012 h⁻¹)的优化,确定多级连续发酵的最优条件为 25% (w/w) 固体含量和 0.008 h⁻¹ 稀释度。稳定状态下乳酸产量、得率和产率分别能达到 107.5 ± 1.1 g/L、0.29 ± 0.01 g/g DM、0.89 ± 0.01 g/L/h,此时乳酸手性度为 99.3%,发酵过程中未出现染菌现象。与单级生物反应器中的连续 SSCF 相比,更低的固含量获得了更高乳酸产量。这表明多级连续 SSCF 的策略有效提高了底物的糖化水平并获得了更好的发酵结果。

最后,本论文以最适模式下的多级连续 SSCF 发酵结果为基础进行了生产纤维素

乳酸的生物炼制全过程的物料衡算，在不考虑残糖的情况下由脱毒物料中的糖转变为乳酸的得率为 74.3%，去除残糖的影响下乳酸的得率为 77.3%。本研究所建立的高效连续 SSCF 生产工艺统一了糖化和发酵温度，乳酸的手性纯度、产量、产率都有着良好的发酵表现，为真正工业场景下纤维素乳酸的连续生产提供了技术手段。

关键词：木质纤维素乳酸；连续 SSCF；恒温；多级生物反应器的连续发酵

Continuous Simultaneous Saccharification and Co-Fermentation of Lactic Acid with Lignocellulose as Substrate

Abstract

Compared to batch fermentation, continuous fermentation can obtain a higher volumetric productivity by reducing the switching time of process vessels for emptying, cleaning, sterilizing. The fermentation of bulk fermentation products such as lactic acid is more economically feasible under continuous mode.

In order to achieve higher product concentration and efficiency, the production of cellulosic lactic acid usually needs to be carried out under high solid content, and the most commonly used production process is batch simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF). However, the most significant disadvantage of SSCF is the mismatch between the optimal temperatures of cellulase enzymes and microbial cells. As a result, most of the hydrolysis and fermentation of SSCF have to be carried out at two different temperatures, which makes it difficult to carry out the continuous SSCF process based on lignocellulosic raw materials.

In this paper, the continuous SSCF for high chiral purity cellulosic L-lactic acid production based on the dry bio-refinery processing platform was investigated and optimized. The lignocellulosic raw material was wheat straw pretreated with dry acid and bio-detoxified. An engineered thermophilic L-lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* ZY271 with pentose assimilation pathway and antibacterial activity was applied for continuous SSCF. This strain could efficiently metabolize total sugar from lignocellulose at 48 °C and pH 4.8-5.5, in which fermentation temperature was close to the optimal temperature of cellulase (50 °C), and the fermentation pH was consistent with the optimal pH of cellulase (5.5).

Firstly, in order to establish an effective continuous SSCF process, saccharification and fermentation temperatures were unified in this research without an external saccharification tank. Continuous SSCF of lactic acid was carried out in a single-stage reactor under different conditions of temperature (42-50 °C) and dilution (0.008-0.025 h⁻¹). The average L-lactic acid titer, yield, and productivity at the steady state reached to 104.8 ± 3.5 g/L, 0.24 ± 0.01 g/g DM and 0.87 ± 0.03 g/L/h, respectively, at 30% (w/w) solid content, 45 °C constant temperature and 0.008 h⁻¹ dilution. When the dilution rate was further increased to 0.025h⁻¹, the yield of lactic acid increased to 2.21 ± 0.11g /L/h, however the titer and yield decreased by 15.7% and 1.25 %. This indicate that the worse hydrolysis of materials under the condition of high dilution generated the decreased titer and yield of lactic acid.

In view of the problem of incomplete saccharification and fermentation in continuous SSCF due to the short retention time of materials in a single bioreactor, the series of multi-stage reactors were used to prolong the retention time of materials. After the optimization of fermentation solid content (20-30%, w/w) and dilution (0.008-0.012 h⁻¹), the optimal conditions were determined as 25% solid content (w/w), fermentation temperature at 45 °C and dilution of 0.008 h⁻¹ in three-cascade bioreactors with the L- lactic acid titer, yield, and productivity reached to 107.5 ± 1.1 g/L, 0.29 ± 0.01 g/g DM, and 0.89 ± 0.01 g/L/h, and the chiral degree of lactic acid was 99.3%, there was no bacterial contamination in the fermentation process. Compared with continuous SSCF in a single-stage bioreactor, a higher lactate yield was obtained with lower solid content. This indicates that the strategy of multi-stage continuous SSCF can effectively improve the saccharification of substrate and obtain better fermentation results.

Finally, the material balance of the whole process of bio-refining was calculated in this paper, based on the results of multi-stage continuous SSCF fermentation in the optimal mode. Without considering the residual sugar, the yield of lactic acid from the detoxification material was 74.3%, and the yield of lactic acid under the influence of removing residual sugar was 77.3%. The efficient continuous SSCF production process established in this study unified the saccharification and fermentation temperatures, and the lactic acid chiral purity, titer and productivity had a good fermentation performance, providing technical means for the continuous production of cellulosic lactic acid under real industrial scenarios.

Keywords: lignocellulosic lactic acid; Continuous SSCF; Constant temperature; Continuous fermentation in multiple bioreactors

目录

第 1 章 文献综述.....	1
1.1 前言.....	1
1.2 乳酸.....	1
1.2.1 乳酸的简介.....	1
1.2.2 乳酸的生产.....	1
1.2.3 乳酸的生产菌株.....	2
1.3 木质纤维素生物质.....	2
1.4 生物炼制.....	4
1.4.1 预处理.....	4
1.4.2 生物脱毒.....	5
1.4.3 发酵.....	5
1.5 连续发酵.....	5
1.5.1 连续发酵方式.....	6
1.5.2 开放式连续发酵.....	6
1.5.3 高产率连续发酵.....	6
1.6 纤维素乳酸的连续发酵.....	7
1.7 本课题的研究内容与意义.....	9
第 2 章 在单级生物反应器中的乳酸连续发酵.....	10
2.1 引言.....	10
2.2 材料与方法.....	10
2.2.1 原料、酶与试剂.....	10
2.2.2 菌种及培养基.....	10
2.2.3 干酸预处理.....	11
2.2.4 在位固态生物脱毒.....	11
2.2.5 以合成培养基为底物的乳酸连续发酵.....	12
2.2.6 以合成培养基为底物的乳酸分批补料发酵.....	12
2.2.7 在恒温条件下以小麦秸秆为底物的乳酸连续发酵.....	12
2.2.8 在不同稀释度下以小麦秸秆为底物的乳酸连续发酵.....	13
2.2.9 分析方法.....	13
2.2.10 发酵的稀释度、停留时间, 以及乳酸的得率、产率的计算.....	13
2.3 结果与分析.....	14

2.3.1 小麦秸秆干酸预处理及固态生物脱毒.....	14
2.3.2 以合成培养基为底物的连续实验.....	15
2.3.3 以合成培养基为底物的分批补料实验.....	16
2.3.4 在恒温条件下以小麦秸秆为底物的乳酸连续实验.....	17
2.3.5 在不同稀释度下以小麦秸秆为底物的乳酸连续实验.....	20
2.4 本章小结.....	22
第 3 章 在多级生物反应器中的乳酸连续发酵.....	23
3.1 引言.....	23
3.2 材料与方法.....	23
3.2.1 原料、酶与试剂.....	23
3.2.2 菌种及培养基.....	23
3.2.3 干酸预处理.....	23
3.2.4 在位固态生物脱毒.....	23
3.2.5 在 3 联 500-mL 摇瓶中的乳酸连续同步糖化共发酵.....	23
3.2.6 在 3 联 5-L 生物反应器中的乳酸连续同步糖化共发酵.....	24
3.3 结果与讨论.....	26
3.3.1 小麦秸秆干酸预处理及固态生物脱毒.....	26
3.3.2 在 3 联 500-mL 摇瓶中的乳酸连续同步糖化共发酵.....	27
3.3.3 在 3 联 5-L 生物反应器中的乳酸连续同步糖化共发酵.....	29
3.3.4 以小麦秸秆为底物的乳酸连续同步糖化共发酵的全过程物料平衡.....	34
3.4 本章小节.....	36
第 4 章 结论与展望.....	37
4.1 结论.....	37
4.2 展望.....	37
参考文献.....	39
附录 I 主要实验试剂.....	48
附录 II 主要仪器设备.....	49
致谢.....	50

第 1 章 文献综述

1.1 前言

在现代社会中,人类所使用的必需化学品和燃料大多来自于化石资源^[1-3]。一方面,化石资源的使用对环境造成了很多不可逆的破坏;另一方面,全球化石燃料储备是否足以满足我们的长期能源需求值得怀疑^[4]。木质纤维素生物质是世界上的仅有的可再生、可循环利用的资源。与化石燃料相比,以木质纤维素生物质为原料生产燃料和重要化学品可有效控制碳排放^[5]。

1.2 乳酸

1.2.1 乳酸的简介

乳酸(或 2-羟基丙酸)的化学式为 $\text{CH}_3\text{-CHOHCOOH}$,是一种天然具有生物相容性的有机羧酸,在食品、化妆品、药品等领域有着非常广泛的应用^[6,7]。乳酸结构的构中有一个手性碳,因此存在两种异构形式:L(+)乳酸和 D(-)乳酸^[8]。由于分子中羟基(-OH)和羧基(-COOH)官能团的存在,乳酸也会发生许多不同的反应^[9]。在工业上,每个独立异构体都有特定的工业作用,因此纯异构体往往比外消旋混合物更有价值^[7]。同时,由于人体内具有 L-乳酸脱氢酶可以将 L-乳酸完全分解,在食品和医药领域更青睐于 L-乳酸的使用^[10]。根据市场数据、性质、合成途径的技术复杂性以及生产工艺开发的进展,美国能源部将乳酸列为十大最重要的生物基化学品之一^[11]。

乳酸最大的工业应用之一就是生产聚乳酸(PLA)。这是一种被誉为“绿色纤维”的可再生、可生物降解塑料^[12]。2020 年全球生物塑料的市场约占整个塑料市场的 25-30%,而且比重还在继续增加^[13]。在医学领域,PLA 对于外科缝线、假体、骨科固定装置和药物输送系统的生产也起到了非常重要的作用^[14]。不仅如此,由于具有的可降解性、生物相容性、无毒性以及良好的加工性和热塑性等特点^[15-17],PLA 也已经受到世界越来越多的关注。然而无论是乳酸还是聚乳酸都因为过高的生产成本,使其每年的生产量与需求量仍有很大一部分的差距。2016 年,全球乳酸市场的需求量为 122 万吨,按照每年 16.2%的增长量,2025 年全球乳酸的需求量将达到 196 万吨^[18],然而对于目前仅有 49 万吨的乳酸全球年产量^[19],乳酸工业生产的经济性和生产效率等方面还有很多地方需要进一步的改进。

1.2.2 乳酸的生产

目前,乳酸可以通过化学合成和微生物发酵的形式获得,微生物发酵的方式又包括需氧发酵和厌氧发酵。传统的化学合成乳酸方法主要以石油资源为原料,通过水解乳酸腈来获得乳酸^[20]。其中一个主要缺点就是合成的乳酸通常是光学非活性外消旋混合物(等量的 L 和 D 异构体)^[21];而微生物通过同型乳酸发酵可以进行高纯度乳酸生产^[22]。

用木薯淀粉和其他粮食作物发酵生产高纯度乳酸已经有了相关的研究和应用^[23,24]。然而在面对粮食与燃料之间的争议,想通过粮食作物来进行百万吨级的乳酸发酵生产是不现实的。木质纤维素作为第二代的能源物质(2G),用来生产纤维素乳酸不仅很好解决了这个问题,同时在使用上也贯彻了低成本、可持续生物炼制的理念^[24]。

1.2.3 乳酸的生产菌株

目前,全球生产的乳酸几乎都是通过发酵的路线生成。细菌、真菌、酵母、蓝藻和藻类等多种微生物都可以生产乳酸^[25]。其中属于革兰氏阳性菌的乳酸菌(LAB)可以在 pH 为 3.5-10 和温度为 5-45°C 的条件下生长^[25],同时,与其他产乳酸微生物相比,由于具有高产率、容易获取和易改造等优点,LAB 发酵生产乳酸已经有了广泛的研究^[26]。

在本实验室对乳酸菌的研究进程中,Zhao 等^[27]通过对野生乳酸菌的筛选成功得到一株耐 48°C 高温的乳酸片球菌 DQ2 (*pediococcus acidilactici* DQ2); Yi 等^[28]通过分子改造的手段,敲除乳酸片球菌 DQ2 中的 L-/D-乳酸脱氢酶(ldgL/D)后得到了一株能生产高纯度 L-乳酸(99.89%)的乳酸片球菌 TY112 (*pediococcus acidilactici* TY112); Abdul Sattar Qureshi 等^[29]发现改造后得乳酸片球菌 TY112 可以分泌抗菌肽来控制发酵过程中的微生物污染; Qiu 等^[30,31]在之前研究的基础上,进一步对乳酸片球菌 TY112 的木糖代谢途径进行构建,得到乳酸片球菌 ZY271 (*pediococcus acidilactici* ZY271),以干酸预处理和生物脱毒后的玉米秸秆作为原料,可以得到 130 g/L 的乳酸浓度,同时得到的乳酸手性纯度也在 99% 以上。He 等^[32]进一步发现乳酸片球菌 ZY271 可以同步代谢全谱木质纤维素来源糖生产纤维素 L-乳酸,并在此基础上成功合成 L-丙交酯,这为利用木质纤维素生物质生产聚乳酸奠定了技术基础。

1.3 木质纤维素生物质

木质纤维素生物质主要包括甘蔗渣、玉米秸秆、谷物秸秆、森林木本残渣(如桦树、云杉、桉树)等农业残留物,以及乳清、糖蜜、啤酒厂废谷物、食物垃圾和城市固体废物等工业残留物^[33]。据调查统计,全球木质纤维素生物质年产量约为 2000 亿吨^[34],在工业上对木质纤维素生物质的应用主要为造纸、建筑和防治等方面,但用量不足其总量的 2%^[35]。我国对秸秆的资源化利用率连 1% 都不到^[36,37]。在处理方面也都仅仅是一些简单的机械处理,很多地方,还是保留着就地焚烧的错误处理方式,这不仅仅是对资源的一种浪费,还会对大气造成严重的危害,同时诱发雾霾等一系列对人有害的污染源。

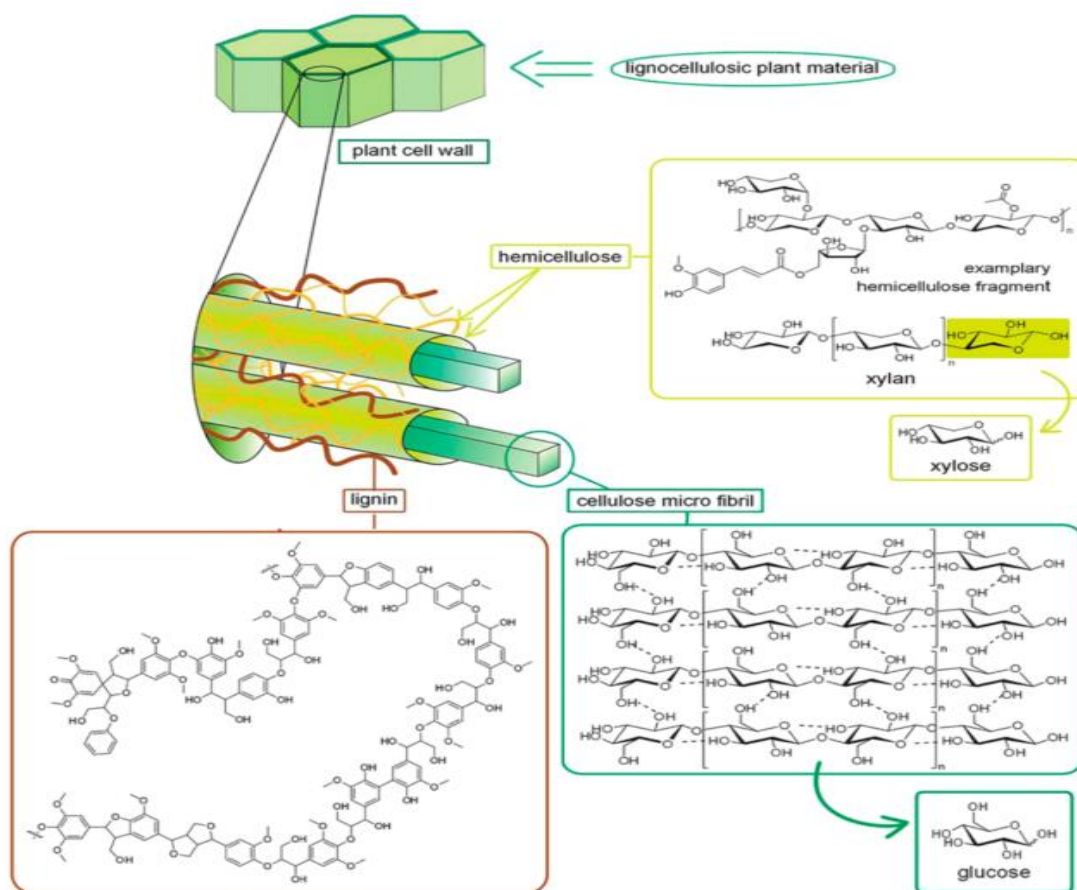


图 1.1 木质纤维素生物质的组成^[2]

Fig. 1.1 Composition of lignocellulosic biomass

木质纤维素是一种由多种物质组成的复合材料，主要包括纤维素、半纤维素和木质素三个部分，其中纤维素是一种由 d-吡喃糖环和 β -1,4-糖苷键连接而成的葡萄糖聚合物^[13]，占木质纤维素生物质的 30-50%；半纤维素占生物质的 20-35%，其主要成分为木糖的杂聚合物，与纤维素不同的是，半纤维素的组成主要取决于细胞组织和植物的种类以及糖苷键的类型；木质素是一种交联的芳香族杂聚合物，占生物质的 15-30%^[38,39]。除此之外，乙酰基、矿物质和酚取代基等物质占了木质纤维素的剩下小部分^[5]。不同的植物种类与不同的植物部分在木质纤维素的组成上或许有一定的差异^[40]。木质纤维素的空间构型如图 1.1 所示，纤维素作为基本的骨架，半纤维素缠绕其左右，被木质素包裹成为一个空间矩阵结构^[41-43]。

一般来说，木质纤维素可以通过合成气平台和糖平台来转化成各种化学品、燃料和材料。合成气平台是基于热化学的过程，主要关注气化^[44]。对于糖平台，简单来说，就是先将木质纤维素转化成单糖，然后利用这些单糖进行化学或生物转化生成 C₂-C₆ 化合物，最后再进一步去生产一些衍生物^[45]。这其中乙醇是 C₂ 化合物中最重要的部分，不仅可以替代化石燃料或燃料添加剂，还可以生产如乙烯、丙烯等高附加值产品。

如今，生物乙醇的生产已经达到商业应用的标准^[46]。甘油、乳酸、丙烯酸等都是可通过木质纤维素生成的 C₃ 化合物。C₄ 化合物主要有琥珀酸、苹果酸、天冬氨酸等。C₅ 化合物主要有糠醛、乙酰丙酸和木糖醇。C₆ 化合物主要有山梨醇、5-羟甲基糠醛(HMF)、柠檬酸、葡萄糖酸和葡萄糖酸^[45]。

1.4 生物炼制

生物炼制平台的基本结构如图 1.2 所示，主要包括生物质预处理、脱毒、水解、发酵和产物回收这几个基本部分。

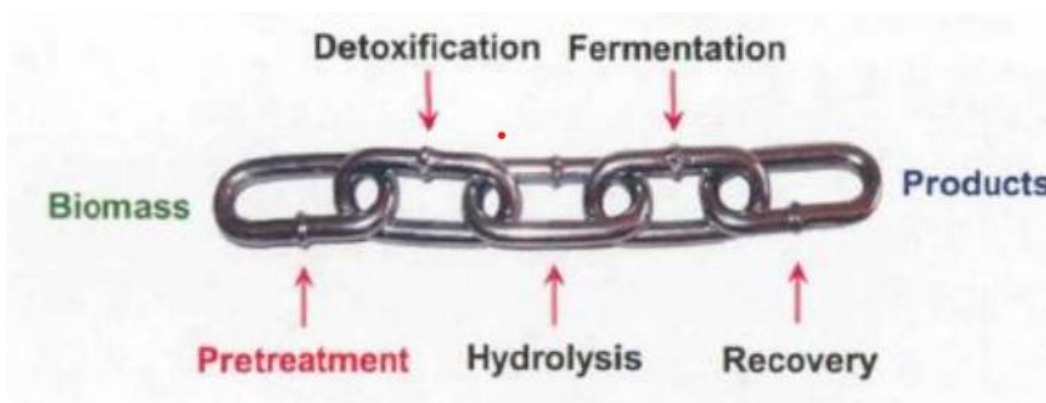


图 1.2 生物炼制平台基本结构

Fig.1.2 The basic structure of general biorefining platform

1.4.1 预处理

木质纤维素是碳水化合物聚合物和木质素的非均相复合物，由于木质纤维素中的木质素结构复杂，具有较强的顽固性及环境适应性，一般的处理方法无法有效破坏其致密的结构^[47]。预处理的目的是打破木质素的密封，破坏纤维素的结晶结构，增加纤维素酶可接触的面积，从而为发酵提供更多的发酵糖^[48]。

目前已经开发了稀酸、蒸汽爆破、氨纤维膨胀、碱处理和离子液体等多种预处理方法^[49-53]。然而几乎所有的这些预处理都有温度效应，即温度越高，预处理的强度与性能越有效^[48]。因此在选择合适的预处理过程时，能耗问题需要重点关注。此外，还需要考虑的有预处理效果、废水、产物回收率、对环境的影响等一些方面。

Zhang 等^[54]通过了解木质纤维素的组成和生物量的组成、权衡每种预处理方法的优缺点以及每种技术的适用性，在稀酸预处理的基础上，研究出了干酸预处理(DAP)的方法，利用极少量的水蒸汽，在反应器内施加较低的压强就能达到预处理的所需条件。不仅操作简便而且产物的回收率高。预处理后木质纤维素物料在低的 pH 值和相对较高的抑制剂含量创造了一个有利的抗菌污染环境，使预处理材料的长期储存成为

现实。

1.4.2 生物脱毒

为了使木质纤维素原料具有较高的生物转化率，必要且苛刻的预处理操作会产生各种小分子抑制物。由于多种且大量抑制物的存在，与商业可发酵糖或脱毒后水解物的发酵相比，未脱毒半纤维素水解物的发酵动力学更缓慢，产量和生产率也受到了限制^[55]。

常用的脱毒方法包括水洗、过浸石灰、氨中和、离子交换吸收、溶剂萃取和活性炭处理^[56-58]。然而这些物理化学的脱毒手段本质上对抑制物的转移，并不是对抑制物的去除。同时，在脱毒过程中会造成大量淡水资源的浪费和废水的产生，更多情况下，还会伴随大量木质纤维素颗粒和发酵糖的损失^[59]。

近年来，生物脱毒已应用于各种生物精炼过程，并已证明其独特的优势，如条件温和、完全去除抑制剂、低糖损失和废水产生量最小^[60-62]。从根本意义上实现有害抑制物的转化。Zhang^[63]首先分离出一种独特的生物解毒真菌 *Paecilomyces variotii* FN89，用于在极低 pH 值下降解抑制剂和有机酸催化剂，同时在脱毒过程中不需要添加任何营养盐，在脱毒后也完好保存了发酵糖。

1.4.3 发酵

分批发酵中的单独水解和发酵（SHF）以及同步糖化与共发酵（SSCF）是木质纤维素发酵中常见的发酵工艺。SHF 发酵工艺能让水解和发酵分别在各自的反应器内最适的条件下进行，但高浓度的可发酵糖浓度会对纤维素酶产生严重的底物抑制，使得最终产品浓度受到限制^[26,64]。与 SHF 相比，同步糖化与共发酵（SSCF）将糖化与发酵放在同一个反应器内进行，使糖化后的糖能够立即被发酵微生物利用，从而将生物反应器中的糖浓度保持在较低水平，因此会显著减少对纤维素酶的底物抑制^[26]。但 SSCF 最大的缺点就是大部分微生物的发酵温度和糖化温度（50℃）的不匹配，这也极大降低了 SSCF 进行的效率^[65]。

1.5 连续发酵

在工业上，使用各种微生物将原材料转化为工业产品一般通过分批或连续这两种发酵方式进行^[66]。

相比于批次发酵，连续发酵操作可以通过减少生物反应器清空、清洁、消毒和重新填充的频率来实现更高的生产效率^[68]。在一个连续发酵系统中，底物被送入反应容器，相应的发酵产物液流被排出，以保持反应器的体积恒定，由于发酵液不停的被稀释，底物和产物抑制作用一定程度上会被减弱^[69]。而且，正如 Villadsen^[70]所强调的那样，低价值产品（如乳酸或乙醇）的制造只有在连续模式下才能在经济上和工业上可行。

1.5.1 连续发酵方式

连续搅拌釜式反应器 (CSTR) 和推流式反应器 (PFR) 是两种基本的连续反应器。推流式反应器又称活塞流反应器, 在 PFR 中进行的连续发酵, 反应物随着搅拌浆的旋转从进料口进入反应器, 然后发酵成产物从出料口排出, 期间接种物必须不断的伴随反应物一起添加^[67]。在 PFR 中, 所有通过的材料在其长度上的浓度和温度分布相同, 且停留时间相同^[71]。而在 CSTR 中, 反应物与发酵菌株均匀的混合, 接种操作只需要一次, 物料持续的进行反应器后, 与反应器内的发酵液瞬间混合均匀。整个反应器内的组成成分和发酵条件都一致, 同时出料的成分与发酵罐中的成分一致。多个 CSTR 反应器的串联就意味着同一底物和发酵菌株在发酵罐中的停留时间进一步增加, 在保证正常进料和出料的速率下, 反应会更加完全, 但对于设计和操作上的难度会相对增加。

1.5.2 开放式连续发酵

染菌是微生物发酵过程中一个棘手的问题, 一定程度上会影响产品的浓度和质量, 更严重的甚至直接宣告发酵的失败。因此, 为了减少染菌的可能, 在微生物发酵之前, 必须使用高温高压蒸汽对整个生物反应器系统进行灭菌。对于连续发酵操作, 加料和补加营养物质等额外操作也要尽可能的保持无菌。首先灭菌本身就是一个能源密集型过程, 外加在操作过程中继续保持连续培养系统的无菌性也需要额外的劳动力、能源和设备, 这都会增加生产成本和工艺复杂性^[72]。因此, 开发不需要高能耗蒸汽灭菌的开放式发酵工艺非常重要。开放发酵还可以减少所需的资本投资, 使工业生物技术变得更具竞争力^[73]。

极端发酵条件是进行开放式发酵的一种方法。有研究人员^[74-76]利用耐热芽孢杆菌 (如凝结芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌等) 在大于 50 ℃ 条件下进行了开放式的乳酸发酵。虽然高温可以防止细菌的扩散, 但他们还发现高温还会加剧预处理后物料中抑制剂的毒性, 从而抑制发酵菌株的生长。因此最后所获得乳酸产量远远低于工业乳酸发酵的要求 (100 g/L)。Yue^[77]利用嗜盐菌 *H. campaniense* LS21 进行了开放式的连续发酵, 在 65 天内没有出现染菌的情况, 为海水的利用增添了经验, 但其中高盐对于发酵装置的腐蚀和下游产品的回收造成了消极的影响。

使用能够分泌抗菌肽的发酵菌株是进行开放式发酵的另外一种方法。Qureshi^[29]从乳酸片球菌 *P.acidilactici* TY112 中分离出该菌株分泌的肽, 并验证了其抗菌活性, 然后利用该菌株分别以合成培养基和木质纤维素为底物进行了开放式的乳酸发酵, 结果显示, 无论是在 SHF 模式还是 SSF 模式下, 均未发现染菌现象, 同时在乳酸产量和产率方面都有着良好的发酵表现。

1.5.3 高产率连续发酵

产率, 即单位时间内形成的产品量, 在连续发酵中是一个非常重要的性能标准^[69]。

产率通常与生产菌株本身的发酵能力、底物浓度、产物浓度、细胞浓度、稀释度等多个因素决定。而且通常情况下，连续发酵的产率要高于分批发酵^[67]。

稀释度的高低与发酵菌株的生长、产品的产率、发酵液的粘度、剩余糖等都拥有着非常密切的关系。在一定范围内，稀释度与产率呈正比关系。因此，在保证良好产品质量的前提下，寻找稀释度的临界值非常重要。在超过这个临界值时，一些如产品浓度下降、发酵液粘度增加等并发症会加剧。高细胞密度（HCD）发酵可以缓解因高稀释度所导致的并发症并提高生产率，在发酵过程中使用补料分批发酵、细胞固定化和细胞回收等方法都可以实现 HCD^[25]。

在连续发酵中通常可以尽量保持恒定的细胞生长速率来获得更长的发酵时间，此时底物中的糖和营养物质被最大限度地利用，从而省去了菌株的生产延滞期^[67]。此外，在连续发酵中串联多个条件相同的反应器，会增加底物停留时间，从而可能获得更高的产品浓度、转化率和体积生产率^[78]。

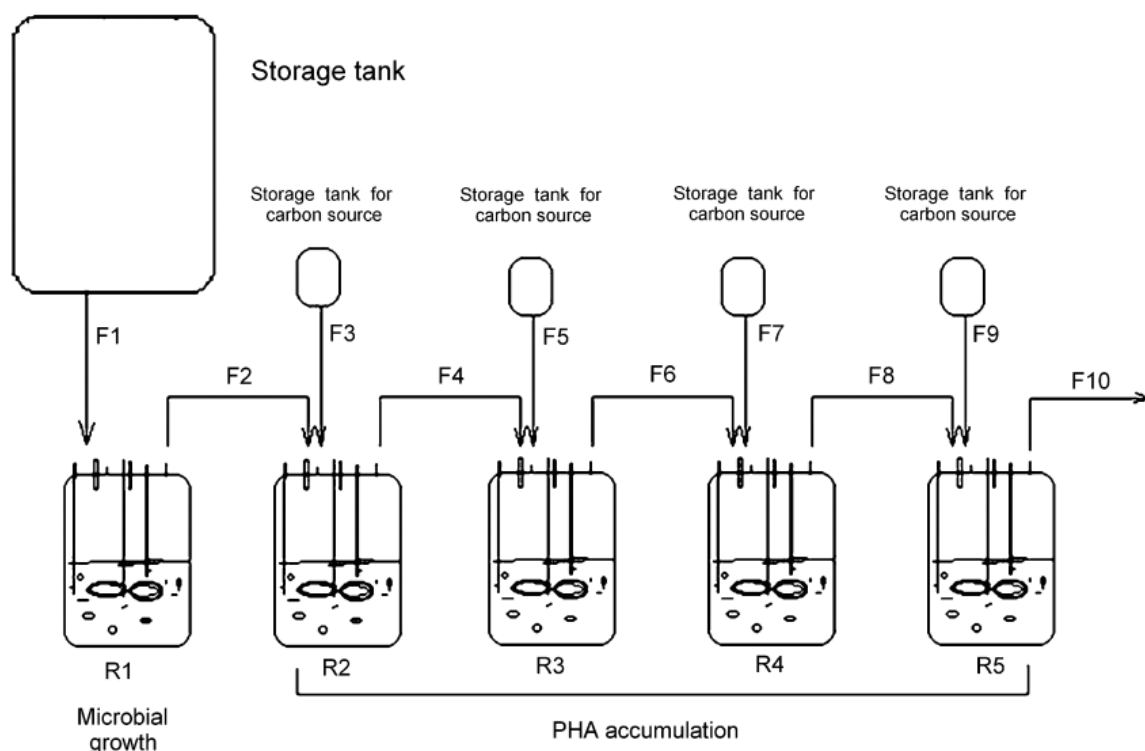


图 1.3 在五联生物反应器中聚羟基烷酸酯（PHAs）的连续发酵示意图^[79]

Figure. 1.3 Diagram of Poly (hydroxyalkanoates) (PHAs) continuous fermentation in five-cascade bioreactors

1.6 纤维素乳酸的连续发酵

在以木质纤维素为原料的乳酸发酵过程中，为了实现可发酵糖和乳酸浓度提升到

实际有意义的水平，总酶解和发酵体系的固含量需要达到 30% (w/w) 左右^[80,81]。然而随着固含量的逐渐变大，水不溶性固含量 (WIS) 也随之升高，发酵液的粘性和其中的杂质也随之提升。高固含量的发酵多采用同步糖化与共发酵 (SSCF) 的发酵方式^[82,83]。然而 SSCF 的缺点也是极为显著的，即纤维素酶和微生物的最佳条件不同，这就导致了无法在同一反应器、同一时间中对水解和发酵这两个过程进行优化^[82]。目前，对于以木质纤维素底物的连续发酵策略，基本上采用的是 SHF 或 PSSF (预糖化和同步糖化共发酵) 的策略，即木质纤维素底物先在外置的反应器中完全或预糖化至液浆，再用于连续发酵的补料^[84]。而对于直接以木质纤维素底物的连续 SSCF 经验和文献数据十分有限^[69]。与利用其他底物的连续发酵相比，在不外置糖化罐下，木质纤维素体系下的连续发酵操作会更加复杂和困难，这主要是因为：

(1) 高固体含量下需要良好的固液混合，固体基质的均匀性直接影响到发酵液的输送^[69]；

(2) 木质纤维素原料的糖化温度和乳酸发酵最适温度的不匹配造成连续发酵无法进行，糖化与发酵同时进行会增加连续发酵的运行时间。

(3) 取补料操作更加开放，对生产菌株抗菌能力要求更高；

(4) 目前纤维素酶的水解效率低，单级反应器的连续发酵在产率上与批次发酵相比还没有较好的体现。

纤维素乳酸发酵的特殊优势在于其发酵菌株的最适温度 (42-50 °C) 与纤维素酶的最适温度 (50 °C) 非常接近，且 pH 也在同一范围内 (4.8-5.5)。这一匹配可以使得在同一反应器中完成乳酸的生产和木质纤维素底物的高效水解，从而为以木质纤维素底物的连续 SSCF 提供了可能。除此之外，以木质纤维素为底物的连续 SSCF 取补料操作对生产菌株抗菌能力要求更高；同时，纤维素乳酸的连续发酵在高固体含量下需要良好的固液混合，反应器的设计需要同时兼顾固体底物糖化和乳酸的厌氧发酵需求。Ahring 等人^[29]用耐热的凝结芽孢杆菌使用蒸汽处理的玉米秸秆为底物在单一生物反应器中进行了连续乳酸发酵的初步尝试，但其固体含量较低 (15%, w/w)、乳酸产量仅为 35.2 g/L，而且连续发酵无法达成稳定操作。

本论文针对木质纤维素原料高固含量下连续 SSCF (cSSCF) 过程所面临的挑战，根据以往的经验积累和成果提出了以下的解决方案：

(1) 耐高温的乳酸片球菌 ZY271，发酵温度 42-48 °C，发酵 pH 5.5，可以很好的匹配酶水解温度和 pH。30% (w/w) 固体含量下的乳酸发酵，批次产量可达 130 g/L 以上^[30]。

(2) 乳酸片球菌 TY112 被证实了具备分泌一种抗菌肽来控制潜在的微生物污染的能力，由此工程改造后的乳酸片球菌 ZY271 可用于 L-乳酸的开放式发酵^[29]。

(3) 自主设计的新型螺带桨生物反应器可以保证低功耗和高固含量下木质纤维素颗粒和液体酶之间的有效混合，在实验室规模下进行分批发酵乙醇和乳酸都有着良

好的发酵结果^[85]。

1.7 本课题的研究内容与意义

纤维素乳酸的生产极大地降低了乳酸的成本，在保护环境方面也起到了一定的作用。目前，纤维素乳酸的生产大多通过批次发酵的方式进行，然而这种发酵工艺有着发酵时间长、产率低等诸多缺点。连续发酵操作可以通过减少生物反应器清空、清洁、消毒和重新填充的频率来实现更高的生产效率。同时随着发酵液不停的被稀释，产物的抑制会被缓解。从经济和工业两个方面考虑，利用连续发酵的方式生产纤维素乳酸是必要的。本研究以干酸预处理和生物脱毒后的小麦秸秆为原料，用乳酸片球菌 ZY271 作为出发菌株集中解决了乳酸连续 SSCF 中遇到的问题，实现了在多联生物反应器中乳酸的连续 SSCF。具体研究内容如下：

(1) 针对 SSCF 中最适糖化温度与发酵温度的不同，在不外置糖化罐的前提下，在单级发酵罐中统一了糖化和发酵的温度。紧接着在最适的恒温条件下，进一步提升发酵的稀释度，建立了建立有效地连续 SSCF 过程。

(2) 鉴于在单个生物反应器的连续 SSCF 中糖化与发酵不完全的问题，尝试采用多个生物反应器的串联减弱由于发酵液的更换对发酵菌株所造成的负面影响。同时为了获得一个更适合工厂应用的发酵模式，进一步调整了连续 SSCF 中的发酵条件和操作参数。

第 2 章 在单级生物反应器中的乳酸连续发酵

2.1 引言

从经济性和工业性两个方面考虑,纤维素乳酸的连续发酵是必要的。在纤维素乳酸发酵体系中,同步糖化与共发酵(SSCF)的发酵方式已经证明了其独特的优势。然而 SSCF 最显著的缺点是纤维素酶的最适糖化温度与大多数微生物的发酵温度不匹配,这就导致了大部分 SSCF 的水解和发酵不得不在两个温度下进行,从而使得以木质纤维素原料为底物的连续 SSCF 工艺难以开展。之前,本实验室已经通过木糖代谢途径构建和长期适应性进化得到同时具有开放发酵的能力的乳酸发酵菌株-乳酸片球菌 ZY271^[29,30],本论文以此为出发菌株并采用间断式的连续发酵工艺来达到生产纤维素乳酸的目的。

首先,本论文在合成培养基中对发酵菌株的发酵性能进行了测试。相比于木质纤维素原料,在发酵过程中不需要考虑原料糖化的问题,可直接在发酵菌株最适温度下进行连续发酵。本论文用连续发酵和分批补料发酵这两种发酵方式验证了实验菌株可以进行长时间、多批次、高浓度、稳定的开放式的乳酸发酵。

本论文所使用发酵菌株的特殊优势在于其发酵 pH 与纤维素酶的最适 pH 一致、发酵温度与纤维素酶的最适温度非常接近,因此在以经过干酸预处理和生物脱毒的小麦秸秆作为碳源时,尝试在发酵过程中始终保持恒温(42-50℃)。最后我们以良好的发酵结果为前提,进一步探究了连续发酵中更大的稀释度。

2.2 材料与方法

2.2.1 原料、酶与试剂

原始小麦秸秆于 2021 年 3 月份在河南南阳市收获。收集起来的小麦秸秆经过统一均匀的晾晒,然后经过直径为 10 mm 孔径的锤式破碎机研磨。

实验中所使用的商业纤维素酶 CTEC 2.0 购自北京诺维信(中国)。根据 NREL 协议 LAP-006^[86]测得的滤纸活性为 256.0 FPU/mL,根据 Ghose^[87]测得的纤维二糖酶活性为 4653.3 CBU/mL,根据 Bradford 方法^[88],测得蛋白质浓度为 81.5 mg protein/mL。糖化酶购自杰能科,根据生产说明书,其酶活为 103,900 U/mL。

实验中所使用的主要试剂:酵母膏和蛋白胨购自 Oxoid。葡萄糖、木糖、无水乙酸钠、柠檬酸氢二铵、磷酸氢二钾、七水硫酸镁和一水硫酸锰等其他试剂级化学品均购自国药化学试剂有限公司(上海)。

2.2.2 菌种及培养基

高效固态生物脱毒所用的菌株宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89 保藏于中国

微生物菌种保藏中心 (CGMCC), 注册编号为 17665。由本实验室 Zhang 等人^[63]在硫酸预处理后含有多种抑制物的玉米秸秆物料中筛选得来。宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89 对多种抑制物具有快速、完全去除的能力, 产生的物质也不会干扰后续的发酵及产物的分离。并且在脱毒过程中不需要添加任何的无机盐和水分。收集于马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 斜面上。PDA 培养基的制备方法是: 将 200 g 去皮和切片的土豆在 1 L dH₂O 中煮沸 30 分钟, 用纱布进行过滤, 在收集起来的滤液中添加 20 g 葡萄糖和 20 g 琼脂, 并在 121 °C 下灭菌 20 分钟, 然后在 4 °C 下储存^[89]。长满 PV 孢子的平板可在 -4 °C 下保存 7 天。

乳酸发酵所用的菌株乳酸片球菌 *P.acidilactici* ZY271 由自然筛选得到的菌株乳酸片球菌 DQ2 经木糖代谢途径构建和长期适应性进化得到, 不仅可以进行全糖代谢, 并且还具有良好的开放发酵的能力^[29,30]。所用的培养基为简化的 MRS 培养基, 成分包括: 20 g/L 一水葡萄糖、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 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。简化 MRS 平板的成分: 在简化 MRS 培养基中添加 20 g/L 的琼脂。乳酸发酵所需营养盐为 10 g/L 蛋白胨、15 g/L 酵母提取物、2 g/L 柠檬酸氢二铵和 0.25 g/L 一水硫酸锰; 上罐时所用的发酵合成培养基将 MRS 培养基中 20 g/L 一水葡萄糖替换为 80 g/L 一水葡萄糖和 20 g/L 木糖。

2.2.3 干酸预处理

提前 1 天测量粉碎研磨后小麦秸秆的含水量, 预处理中硫酸催化剂的用量根据干酸预处理中基准 pH 的方法^[90]测定为 4.5% DM。根据 Zhang 等^[91]报道的干酸预处理的方法, 按照 2:1 的固液比, 将 1200 g DM 的小麦秸秆与 600 g 酸溶液共同加入 20-L 预处理反应器中搅拌 3 min。预处理条件为: 175 °C、5 min、50 rpm。反应结束后, 干固颗粒形态的预处理物料从反应器底部排出。预处理后小麦秸秆的 pH 用 20% (w/w) 的 Ca(OH)₂ 中和至 4.8-5.5, 再使用磨浆机粉碎其中的长纤维, 用于后续的在位固态生物脱毒。

2.2.4 在位固态生物脱毒

取少量预处理后的小麦秸秆用自来水进行湿润, 将长满宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89 孢子的 PDA 平板均匀涂抹在预处理后的物料上并混合均匀作为一级脱毒种子, 然后在 37 °C 下培养 36-48 h, 待物料中长满孢子, 随后按 10% (w/w) 的接种量在相同的条件下进行扩培, 作为上罐脱毒种子。按照 Zhang 等人^[63]的方法, 在 15-L 脱毒罐中将扩培后的种子以 10% (w/w) 的接种量接种到预处理后小麦秸秆的固体中, 接种物和预处理原料的混合物占生物反应器体积的 2/3。加预处理后的物料和脱毒种子时需要伴随 50 rpm 速度下的搅拌混匀, 加料完毕后关闭搅拌。随后在 37 °C 下培养 36-48 h, 通气量为 1 vvm (每培养 1 L 体积每分钟的空气量), 脱毒期间每间隔

12 h 以 50 rpm 的速度搅拌 5 min。同时搅拌后取样检测抑制物及可发酵糖的浓度，直至所有的糠醛、5-羟甲基糠醛完全脱去，仅有少量乙酸剩余时，脱毒结束。

2.2.5 以合成培养基为底物的乳酸连续发酵

以合成培养基为底物的乳酸连续发酵在 3-L 发酵罐中进行。保藏在冻存管中的乳酸片球菌 ZY271 甘油种转接到 20 mL 简化 MRS 培养基中，在 42 ℃、150 rpm 条件下活化 12 h。随后取出 15 mL 按照 10% (v/v) 的接种量扩培，在相同条件下培养 8 h 后当作上罐种子。培养种子时，需要加入 1% (v/v) 的糖化酶来防止细胞絮凝^[92]。整个发酵过程中用 25% (w/w) 的氢氧化钙调节 pH 至 5.5 左右。随后按照 10% (v/v) 的接种量接入种子液。发酵条件为 42 ℃、450 rpm。发酵过程中每 12 h 取样检测可发酵糖和乳酸的浓度。待葡萄糖浓度消耗至 0 g/L 左右时，用 500 mL 新鲜的发酵合成培养基替换 500 mL 发酵液，按照此操作重复若干次，待每次补料后乳酸发酵浓度的最大值保持稳定或乳酸浓度出现连续下降时，发酵结束。

2.2.6 以合成培养基为底物的乳酸分批补料发酵

以合成培养基为底物的乳酸分批补料发酵在 3-L 发酵罐中进行。保藏在冻存管中的乳酸片球菌 ZY271 甘油种转接到 20 mL 简化 MRS 培养基中，在 42 ℃、150 rpm 条件下活化 12 h。随后取出 15 mL 按照 10% (v/v) 的接种量扩培，在相同条件下培养 8 h 后当作上罐种子。培养种子时，需要加入 1% (v/v) 的糖化酶来防止细胞絮凝^[92]。整个发酵过程中用 25% (w/w) 的氢氧化钙调节 pH 至 5.5 左右。随后按照 10% (v/v) 的接种量接入种子液。发酵条件为 42 ℃、450 rpm。发酵过程中每 12 h 取样检测可发酵糖和乳酸的浓度。待葡萄糖浓度消耗至 20 g/L 左右时，根据此时发酵罐中的葡萄糖与木糖的浓度计算，取出少量发酵，然后补充与取出发酵液相同体积的糖母液（葡萄糖浓度为 500 g/L、木糖浓度为 100 g/L），使替换发酵液后发酵罐内葡萄糖的浓度处在 40 g/L 左右，重复若干次。待乳酸浓度达到最大并保持稳定多次或乳酸浓度出现连续下降时，发酵结束。

2.2.7 在恒温条件下以小麦秸秆为底物的乳酸连续发酵

在恒温条件下以小麦秸秆为底物的乳酸连续发酵在 5-L 发酵罐中进行，保藏在冻存管中的乳酸片球菌 ZY271 甘油种转接到 20 mL 简化 MRS 培养基中，在 42 ℃、150 rpm 条件下活化 12 h。随后按照 10% (v/v) 的接种量扩培，在相同条件下培养 8 h 后当作上罐种子。培养种子时，需要加入 1% (v/v) 的糖化酶来防止细胞絮凝^[92]。脱毒物料在 42-50 ℃、30% (w/w) 固含量、5 mg protein/g DM 的酶用量下预糖化 8 h。用 25% (w/w) 的氢氧化钙控制整个发酵过程中的 pH 为 5.5。在不改变温度的条件下，加入营养盐并按照 10% (v/v) 的接种量接入种子液。接菌发酵后，发酵过程中每 12 h 取样检测可发酵糖和乳酸的浓度，同时通过涂板对此时的菌落形成单位 (CFU) 进行监测。在罐内葡萄糖浓度消耗至 20 g/L 左右时，按照 10% (w/w) 的比例从发酵罐中取

出发酵液，随后补充相同质量、相同固含量的料液，补料液包括：预处理生物脱毒后的小麦秸秆、无菌水、酶和营养盐，然后按照一定的时间间隔重复取补若干次，待乳酸浓度达到最大并保持稳定多次或乳酸浓度连续出现下降后，发酵结束。

2.2.8 在不同稀释度下以小麦秸秆为底物的乳酸连续发酵

在不同稀释度下以小麦秸秆为底物的乳酸连续发酵在 5-L 发酵罐中进行，保藏在冻存管中的乳酸片球菌 ZY271 甘油种转接到 20 mL 简化 MRS 培养基中，在 42 °C、150 rpm 条件下活化 12 h。随后按照 10% (v/v) 的接种量进行扩培，在相同条件下培养 8 h 后当作上罐种子。培养种子时，需要加 1% (v/v) 的糖化酶来防止细胞絮凝^[92]。脱毒物料在 45 °C、30% (w/w) 固含量、5 mg protein/g DM 的酶用量下预糖化 8 h。用 25% (w/w) 的氢氧化钙控制整个发酵过程中的 pH 为 5.5。加入营养盐并按照 10% (v/v) 接种。发酵过程中每 12 h 取样检测可发酵糖和乳酸的浓度，同时通过涂板对此时的菌落形成 (CFU) 单位进行监测。接菌发酵后，在罐内葡萄糖浓度消耗至 20 g/L 左右时，按照 10-30% (w/w) 比例从发酵罐中取出发酵液，随后补充相同质量、相同固含量的料液，补料液包括：预处理生物脱毒后的小麦秸秆、无菌水、酶和营养盐，然后按照一定的时间间隔重复取补若干次，待乳酸浓度达到最大并保持稳定多次或乳酸浓度出现连续下降后，发酵结束。

2.2.9 分析方法

葡萄糖、木糖、乳酸、乙酸、5-HMF 和糠醛都用 Hou 等^[93]描述的方法进行测定。

在每次取样时需要同时对菌落形成单位 (colony forming units, CFU) 进行监测，操作为将 100 微升的发酵液稀释 10⁸ 倍，然后均匀涂在简化 MRS 平板上，42 °C 培养 36-48 h，通过计数来检测发酵罐内的活菌数是否正常。

乳酸的手性纯度经 D/L-Lactic Acid (D-/L-Lactate) Assay Kit 试剂盒描述的方法进行检测。

2.2.10 发酵的稀释度、停留时间，以及乳酸的得率、产率的计算

$$\text{Dilution rate (1/h)} = \frac{D}{H} \quad (2-1)$$

公式中 H (h) 为取补时间间隔; D (% , w/w) 为取出发酵液与罐内发酵液的质量比; D (% , v/v) 为取出发酵液与罐内发酵液的体积比。

$$\text{Retention time (h)} = \frac{H}{D} \times n \quad (2-2)$$

公式中 n 为连续发酵反应器的个数

$$\text{Yield (g/g DM)} = \frac{c \times V}{DM_1} \quad (2-3)$$

公式中 c (g/L) 是出料罐出料的乳酸浓度; V (L) 是出料罐每次出料时发酵液去除固体后的液体体积，密度看成与水近似; DM₁ (g) 为取出发酵液所用脱毒物料的干重;

最终得率为发酵到达稳态后 3 次结果的平均值。

$$\text{productivity}(\text{g/L/h}) = \frac{c_2 - c_1}{H} \quad (2-4)$$

公式中 c_1 (g/L) 为 出料罐出料时的乳酸浓度, c_2 (g/L) 为 出料罐补料后的乳酸浓度; H (h) 为 取补时间间隔; 最终产率为发酵到达稳态后 3 次结果的平均值。

2.3 结果与分析

2.3.1 小麦秸秆干酸预处理及固态生物脱毒

我们根据 NREL 协议中的两步酸解法^[94,95]进行了组分测定。2021 年 3 月份原始小麦秸秆中含有: $34.31 \pm 0.14\%$ 纤维素、 $19.25 \pm 0.05\%$ 半纤维素、 $22.12 \pm 0.01\%$ 木质素和 $12.00 \pm 0.22\%$ 灰分(干基)。在经过 $175\text{ }^\circ\text{C}$ 、 5 min 、硫酸用量为 4% (w/w, DM) 的预处理后, 我们对物料进行再一次的组分测定, 预处理前后物料的组分变化, 如表 2.1 所示, 经过预处理后, 纤维素的含量变化不大, 但有 94.23% 的半纤维素被破坏并降解为单糖或是其他化合物, 预处理后的物料中可发酵糖约占 16.32% , 这其中包括木寡糖、葡萄糖和木糖。以预处理后物料的干基为基准, 主要抑制物乙酸、5-羟甲基糠醛(5-HMF)和糠醛的含量为 21.73 ± 0.24 、 6.04 ± 0.07 和 $2.85 \pm 0.13\text{ mg/g DM}$, 在对小麦秸秆进行干酸预处理后, 随即利用宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89 进行生物脱毒, 将预处理后物料中的 5-HMF 和糠醛完全去除, 仅保留少数乙酸时脱毒结束。由于本论文历时较长且物料耗费巨大, 前后所用小麦秸秆组分有所变化, 导致发酵过程中糖浓度有所变化。

表 2.1 小麦秸秆预处理前后糖及衍生物的含量

Table 2.1 Sugar and its derivative contents of wheat straw before and after pretreatment

	Components	Contents (% , w/w)
(a) Wheat straw	Cellulose	34.31 ± 0.14
	Hemicellulose	19.25 ± 0.05
	Lignin	22.12 ± 0.01
	Ash	12.00 ± 0.22
(b) Pretreated wheat straw	Cellulose	32.99 ± 0.29
	Hemicellulose	1.11 ± 0.06
	Glu-oligos	0 (not detected)
	Xylo-oligos	0.54 ± 0.03
	Glucose	4.27 ± 0.10
	Xylose	11.51 ± 0.02

Acetate	2.17 ± 0.02
5-HMF	0.60 ± 0.01
Furfural	0.29 ± 0.01

2.3.2 以合成培养基为底物的连续实验

在进行以合成培养基为底物的乳酸连续实验时，合成培养基中的成分简单明确，发酵的可控性强，与以木质纤维素的底物相比，不需要额外糖化的步骤，因此可以直接在乳酸片球菌最适温度（42℃）条件下进行发酵，同时实验发酵菌株乳酸片球菌 ZY271 已被证明可以用于开放式的发酵^[29]。为了探究发酵菌株能否利用小麦秸秆作为底物来进行长周期、多批次的乳酸连续发酵，本实验首先以合成培养基为底物在 3-L 生物反应器中进行了验证。

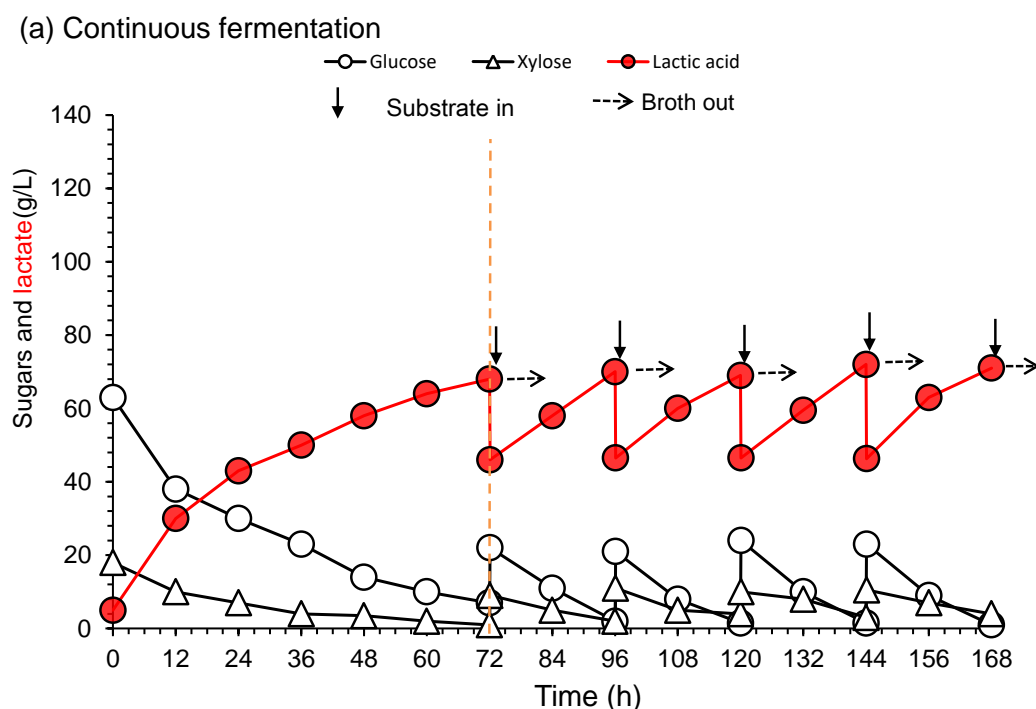


图 2.1 在 3-L 生物反应器中以合成培养基为底物的乳酸连续发酵

Fig. 2.1 Continuous fermentation of lactic acid with synthetic medium as substrate in 3-L bioreactor

发酵条件：42℃，450 rpm，D 为 30% (v/v)，H 为 24 h，稀释度为 0.0125 h⁻¹，保留时间为 80.0 h
 Fermentation conditions: 42℃, 450 rpm, D 30% (v/v), H 24h, dilution rate 0.0125 h⁻¹, retention time 80.0 h

乳酸片球菌 ZY271 经活化后转入 3-L 发酵罐中，发酵结果如图 2.1 所示，初始的葡萄糖浓度为 63.2 g/L，木糖浓度为 18.5 g/L。发酵 72 h，葡萄糖基本消耗殆尽，此时

的乳酸浓度为 67.7 g/L, 取 1/3 发酵体积的发酵液, 然后补充相同体积、与初始合成培养基成分相同的新鲜合成培养基, 24 h 后, 葡萄糖浓度再次消耗为零, 重复取补操作, 取补操作共进行了 4 次, 每次取补前后乳酸浓度的顶点为 67.7、71.7、69.8、73.4、71.5 g/L, 考虑到每次补料中葡萄糖与木糖的含量都有稍微差别, 每次取补前后乳酸浓度的顶点基本稳定, 因此可以看出在我们使用的乳酸发酵菌株-乳酸片球菌 ZY271 能够完成在合成培养基中的长时间、多批次、稳定的连续发酵。

值得注意的是发酵结果的曲线与重复分批发酵的结果相类似, 但与之不同的是, 重复分批发酵是将上一次发酵的菌种菌种进行分离回收用到下一批次的发酵中以此达到重复的目的, 而本实验采用稀释发酵液的方法, 故严格意义上更符合连续发酵的定义。

2.3.3 以合成培养基为底物的分批补料实验

除了使用低价值的底物外, 提高乳酸发酵的产量同样也是降低乳酸生产成本的另一种方式^[25]。分批补料发酵可以通过多次补充营养盐和底物来减少高浓度的底物抑制作用, 能够探究终产物抑制的临界值。因此我们利用分批补料的方式对发酵菌株-乳酸片球菌 ZY271 发酵乳酸所能达到的最高浓度进行了探索。由于本实验在 3-L 发酵罐中进行, 发酵罐容积有限, 因此采用抽取少量发酵液, 补充更高糖浓度的母液和营养盐来既达到不断补充底物, 又达到保持发酵体积不变的目的。

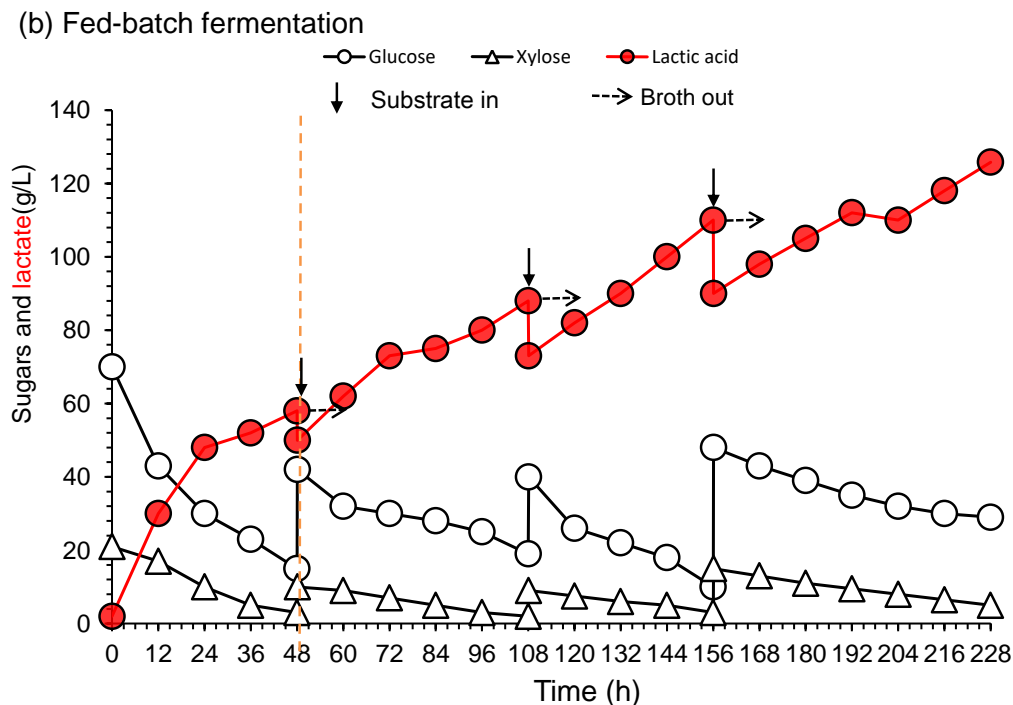


图 2.2 在 3-L 发酵罐中以合成培养基为底物的乳酸分批补料发酵

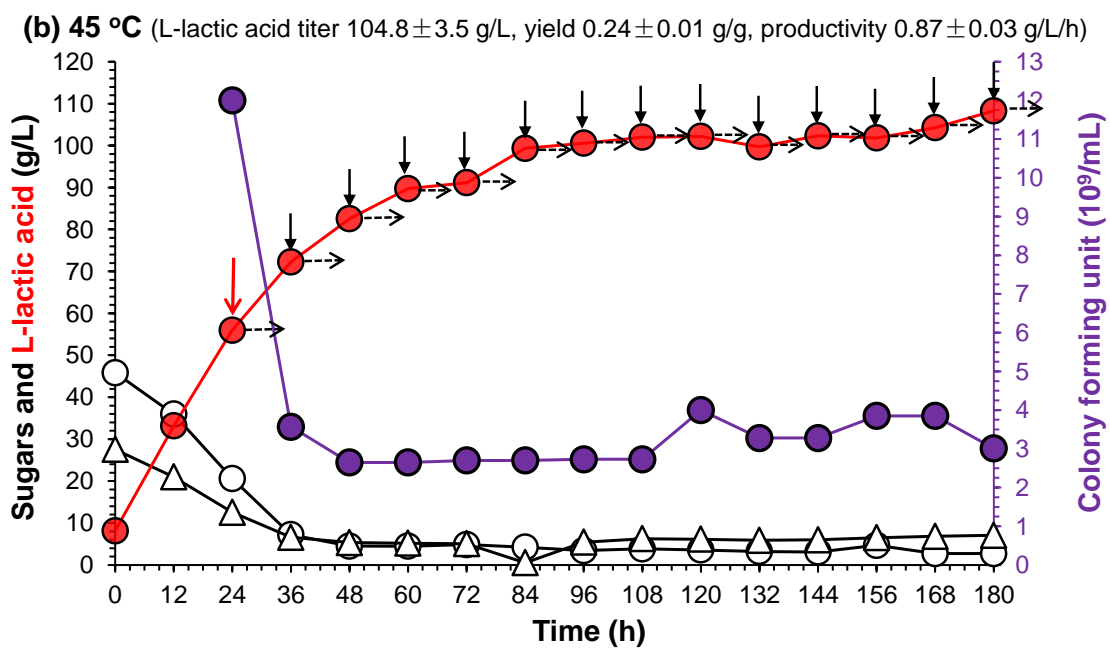
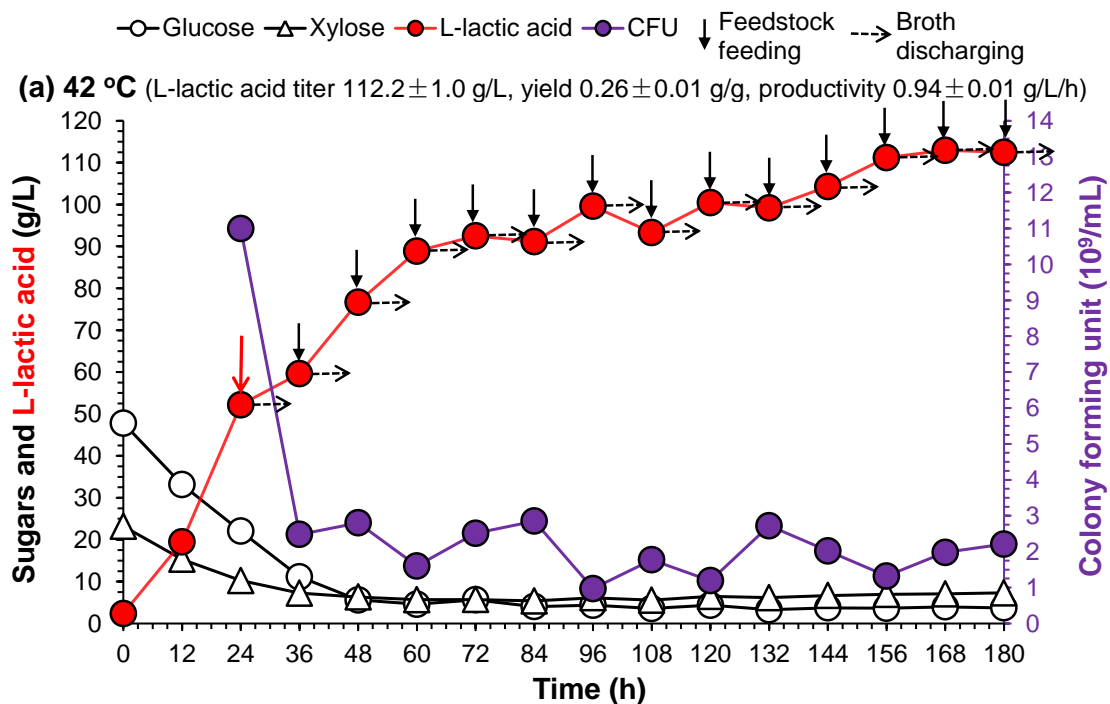
Fig. 2.2 Fed-batch fermentation of lactic acid with synthetic medium as substrate in 3-L bioreactor
发酵条件: 42 °C, 450 rpm

Fermentation conditions: 42 °C, 450 rpm

补料分批发酵的结果如图 2.2 所示,初始葡萄糖浓度为 70.3 g/L,木糖为 21.3 g/L,接菌后 48 h,发酵液中葡萄糖浓度首次消耗到低于 20 g/L,开始进行取补料操作,共进行了 3 次。最终发酵至 228 h,乳酸浓度为 125.8 g/L。在发酵中后期,发酵液变从淡黄色逐渐变成乳白色,我们认为是乳酸钙不溶现象,同时在第三次补料后,由于终产物的抑制,葡萄糖代谢速率显著降低,因此我们停止了实验。125.8 g/L 的乳酸浓度已经足够满足后续的工厂应用(100.0 g/L)。外加之前实验室 Qiu^[30, 31]之前的研究已经证实利用乳酸片球菌 ZY271 能够以木质纤维素为底物获得 130.0 g/L 的乳酸产量。因此可以看出在我们使用的乳酸发酵菌株-乳酸片球菌 ZY271 能够完成在合成培养基中的高浓度的乳酸发酵。但在发酵过程中应注意乳酸钙溶解度的问题,在实验室规模下,可以通过加热分离出的发酵液、对取出发酵液进行快速分离检测的方法来得到准确的乳酸浓度。

2.3.4 在恒温条件下以小麦秸秆为底物的乳酸连续实验

木质纤维素底物需要经过糖化才能将其中的聚糖水解成可发酵单糖。所用纤维素酶的最适糖化温度在 50 ℃ 左右。因此对于不外置糖化罐的木质纤维素底物的连续 SSCF 过程,需要保证发酵菌株能够耐受纤维素酶的水解温度,同时完成对木质纤维素固体底物的良好混合和糖化。目前报道的某些乳酸生产菌株是可以耐受较高的温度,其中最常见的是具有嗜热生长特性和戊糖发酵能力的凝结芽孢杆菌,可在 50 ℃ 条件下利用木质纤维素原料生产乳酸^[96,97]。但对于直接以木质纤维素原料的高固含量下生产纤维素乳酸的连续 SSCF 过程仍缺少探究。为了追求连续发酵的连续性,在补料操作中选择补充与初始发酵相同的成分(预处理生物脱毒后的小麦秸秆、纤维素酶、无菌水和营养盐),同时补料后的发酵仍然也属于同步糖化与共发酵。在此实验中,补料后的混杂的成分、长时间低浓度的可发酵糖浓度等对发酵菌株的长周期的发酵性能提出了更高的挑战。



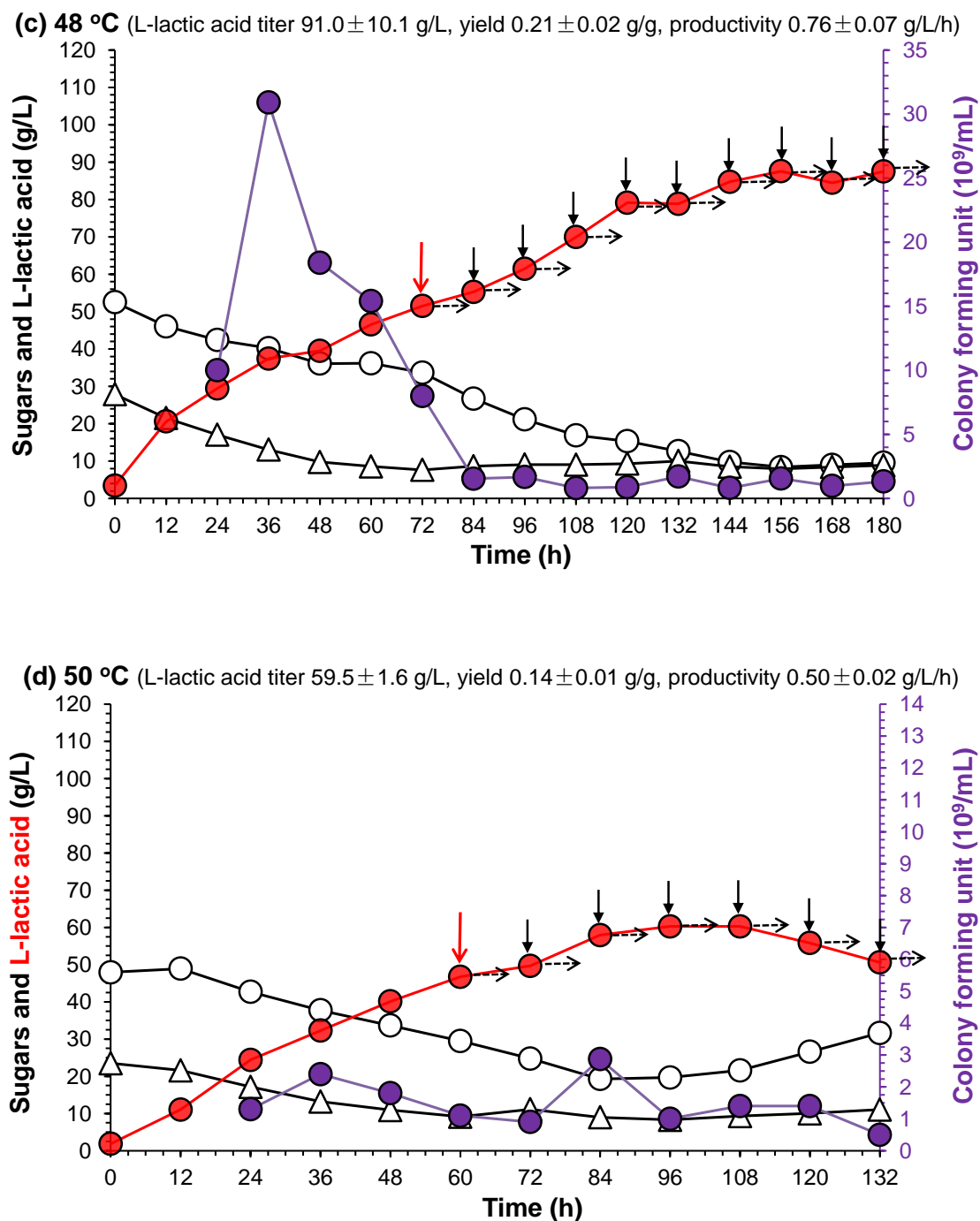


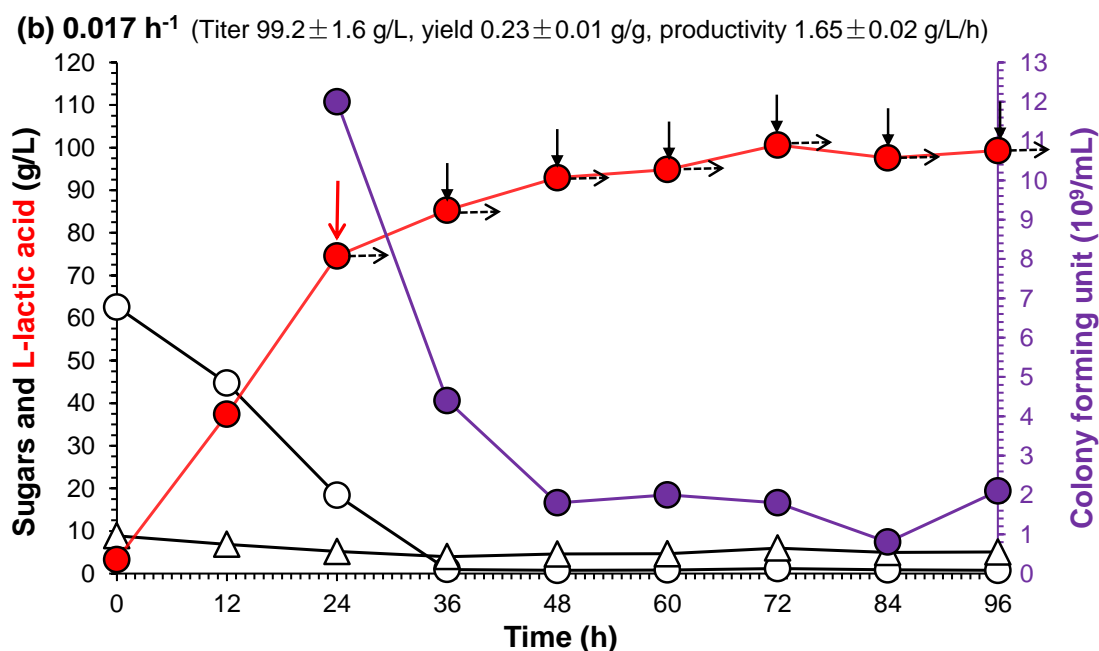
图 2.3 在 5-L 生物反应器中恒温条件下的乳酸连续同步糖化与共发酵

Fig. 2.3 Continuous SSCF of lactic acid in a single 5-L bioreactor at different constant temperatures.
 发酵条件: (a) 42 °C; (b) 45 °C; (c) 48 °C; (d) 50 °C。30% (w/w) 固含量, 150 rpm, H 为 12 h, D 为 10% (w/w), 稀释度为 0.0083 h^{-1} , 保留时间为 120.0 h
 Fermentation Conditions: (a) 42 °C; (b) 45 °C; (c) 48 °C; (d) 50 °C.30% (w/w) solids loading, 150 rpm, H 12 h, D 10% (w/w), dilution rate 0.0083 h^{-1} , retention time 120.0 h

本论文首先在单个 5-L 螺带桨生物反应器中对耐高温且具备开放发酵能力的乳酸片球菌 ZY271 以小麦秸秆为原料进行连续发酵的恒温条件进行了探索, 其结果如图 2.3 所示。对于在 42 °C 和 45 °C 下的连续 SSCF 过程, 稳定状态下, 其乳酸产量分别达到了 112.2 ± 1.0 g/L 和 104.8 ± 3.5 g/L, 此时得率分别为 0.26 ± 0.01 和 0.24 ± 0.01 g/g DM, 产率分别为 0.94 ± 0.01 和 0.87 ± 0.03 g/L/h (图 2.3 a、b), 结果较为相近。同时在 45 °C 下, 乳酸菌株的 CFU 在发酵后期仍能稳定维持在 10^9 以上, 这表明菌株仍有良好的活力。而在 50 °C 下, 连续发酵后期的乳酸产量和得率都出现了明显的下降, 葡萄糖和木糖浓度也逐渐上升, 乳酸浓度在发酵 96 h 生成最高, 但仅有 60.3 g/L (图 2.3 d), 这表明乳酸片球菌 ZY271 在 50 °C 下的恒温连续发酵已经不能持续稳定的进行, 50 °C 严重影响了发酵菌株的发酵性能。尽管在 48 °C 下, 仍能保持一个较高的乳酸产量 (91.0 ± 10.1 g/L) 和得率 (0.21 ± 0.02 g/g DM), 但其发酵过程中活菌数 (CFU) 下降明显, 从 10^9 下降至 10^8 , 同时耗糖和产乳酸的速率较 42 和 45 °C 也有了明显的下降 (2.3 c), 这已经不是一种良好的发酵表现。这表明 48 °C 较高的发酵温度对菌株的损伤仍然较大。考虑到乳酸的生产与菌株的生长有密切的关联, 同时考虑到较高的温度有利于木质纤维素物料的糖化, 因此选择 45 °C 为后续探究的温度。

2.3.5 在不同稀释度下以小麦秸秆为底物的乳酸连续实验

乳酸片球菌 ZY271 被证实了可以在 45 °C 的恒温条件下实现纤维素乳酸的连续发酵。但所用的稀释度仅为 0.008 h^{-1} 。在连续发酵生产中, 单位发酵体积的产率与稀释度有着密切关系^[69], 尽管可以预见的是较低的稀释度能保证较高的转化率, 但其消极影响也是显而易见的, 包括达到稳态所需时间更长、生产效率更低等。因此, 在保证浓度的前提下, 追求更高的产率是我们进一步的目标。



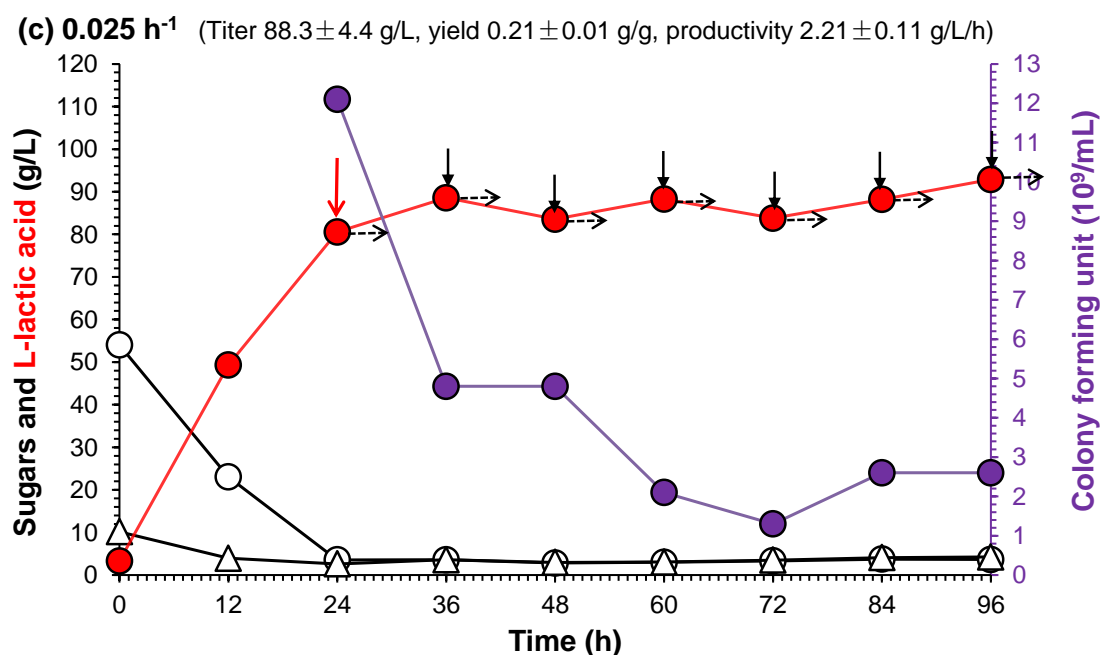


图 2.4 在 5-L 生物反应器中不同稀释度下的乳酸连续同步糖化与共发酵

Fig 2.4 Continuous SSCF of lactic acid with different dilution rates in a single 5-L bioreactor
 发酵条件: (a) D 为 20% (w/w), 稀释度为 0.017 h⁻¹, 保留时间为 60.0 h; (b) D 为 30% (w/w),
 稀释度为 0.025 h⁻¹, 保留时间为 40.0 h。30% (w/w) 固含量, 45 °C, 150 rpm, H 为 12 h
 Fermentation conditions: (a) D 20% (w/w), dilution rate 0.017 h⁻¹, retention time 60.0 h; (b) D 20%
 (w/w), dilution rate 0.025 h⁻¹, retention time 60.0. 30% (w/w) solids loading, 45 °C, 150 rpm, H 12 h

我们尝试在稀释度为 0.0083 h⁻¹ 的基础上通过改变取补料比例来提高纤维素乳酸连续 SSCF 的稀释度。每次的取补比例分别提高至 20% (w/w) 和 30% (w/w), 相对应的稀释度分别达到了 0.017 h⁻¹ 和 0.025 h⁻¹。结果如图 2.4 所示, 在所测试的不同稀释度条件下, 均未出现残糖积累的现象, 其 CFU 均能维持在 10⁹ 以上, 表明菌株生长状况良好。当稀释度为 0.017 h⁻¹ 时(图 2.4 b), 乳酸的得率和产率分别为 0.23 ± 0.01 g/g DM 和 1.65 ± 0.02 g/L/h。相比于稀释度为 0.008 h⁻¹ (图 2.3 b) 的连续发酵, 此时稳定状态下乳酸的产量和得率仅下降了 5.3% 和 4.2%, 但产率提高了 89.6%。随着稀释度进一步提高至 0.025 h⁻¹, 乳酸的得率和产率分别为 0.21 ± 0.01 g/g DM 和 2.21 ± 0.02 g/L/h。相比于稀释度为 0.008 h⁻¹ (图 2.3 b) 的连续发酵, 此时稳定状态下乳酸的产量和得率仅下降了 15.7% 和 12.5%, 但产率提高了 154.0%。提高稀释度造成乳酸的产量和得率不可避免的出现了一定的下降, 这一结果与 U. Kulozik^[98] 的研究相似, 但他将这一现象归结于细胞内代谢的改变。我们推测主要是由于物料在连续发酵过程中糖化不完全导致的。因为我们的补料操作采取直接补加物料的方式, 同时我们发现相同物料、相同发酵固含量, 连续发酵的稀释度越大, 发酵后期发酵液的粘稠度越粘稠。对于在

以小麦秸秆为底物的乳酸连续中追求更大的稀释度,随着稀释度的增大,生物反应器中发酵液的更换更频繁,同时单位时间内的出料也就越多。当稀释度为 0.025 h^{-1} 时,产率达到了最大,为 $2.21 \pm 0.11 \text{ g/L/h}$,虽然乳酸的产量最终平稳在 88.3 g/L 左右,考虑到乳酸的产量始终能够保持稳定,发酵过程中的活菌数也始终保持在一个良好的水平,同时多级生物反应器的连续发酵会减弱稀释对发酵菌株的发酵性能所造成的影响, 0.025 h^{-1} 的稀释度在后面的多级生物反应器的连续发酵将以之为初始条件并开始后面的探讨。

2.4 本章小结

纤维素乳酸的工业生产只有通过连续发酵的手段才可行。在发酵过程中将糖化和发酵温度统一,仍能较好完成对小麦秸秆向乳酸的生物转化。本章得出的主要结论如下:

(1) 以合成培养基作为底物时,在连续发酵中多次取补料后的乳酸浓度的终点基本保持稳定,同时在分批补料发酵中乳酸浓度可以达到 125.8 g/L ,这都验证了发酵菌株乳酸片球菌 ZY271 可以完成长时间、多批次、稳定的连续发酵。

(2) 在以小麦秸秆作为底物进行乳酸的连续发酵过程中,保持 $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温可以有效地完成糖化和发酵,最终乳酸浓度为 $104.8 \pm 3.5 \text{ g/L}$ 、得率为 $0.24 \pm 0.01 \text{ g/g DM}$ 、产率为 $0.87 \pm 0.03 \text{ g/L/h}$;

(3) 在 $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的恒温条件下,在一定范围内,通过增大乳酸连续发酵的稀释度可以提升乳酸产率,当稀释度增加到 0.025 h^{-1} 时,产率提升至 $2.21 \pm 0.11 \text{ g/L/h}$ 。

第 3 章 在多级生物反应器中的乳酸连续发酵

3.1 引言

与常规的分批发酵相比，单个生物反应器中的连续 SSCF 糖化效果明显不足。在实际工业化生产中，常采用多级发酵的策略来避免产物抑制、提高产品浓度^[69]。在木质纤维素体系中，随着反应器的增加，物料在反应器中的停留时间会逐渐增加，使得酶水解更加完全，液浆粘度降低^[68]，因此在以木质纤维素为原料的连续 SSCF 中出现的物料糖化不完全的现象会得到缓解。同时出料的发酵液中残糖含量更低，更有利于后期乳酸的分离提纯。

为了使以小麦秸秆为底物的连续 SSCF 能够彻底地进行，本章首先在多联 500-mL 摇瓶中对生物反应器的串联数进行了探索。

接着按照在单级生物反应中探索出的发酵条件进一步在 3 联 5-L 发酵罐中进行了乳酸的连续实验，然后通过调整发酵条件和操作参数，最终确定一个较为符合工厂应用的发酵模式，并对该模式下的乳酸连续发酵进行了全过程的物料衡算。

3.2 材料与方法

3.2.1 原料、酶与试剂

原始小麦秸秆于 2021 年 6 月份在河南南阳市收获。收集起来的小麦秸秆经过均匀的晾晒，然后经过直径为 10 mm 孔径的锤式破碎机研磨。

实验中所使用的其他酶及试剂详见 2.2.1

3.2.2 菌种及培养基

实验所用的高效固态生物脱毒菌株及其培养基详见 2.2.2；

实验所用的乳酸发酵菌株乳酸片球菌 *Pacidilactici* ZY271 及其培养基详见 2.2.2。

3.2.3 干酸预处理

实验中对 2021 年 6 月分小麦秸秆的干酸预处理详见 2.2.3。

3.2.4 在位固态生物脱毒

实验中对预处理后的小麦秸秆的在位固态生物脱毒详见 2.2.4。

3.2.5 在 3 联 500-mL 摇瓶中的乳酸连续同步糖化共发酵

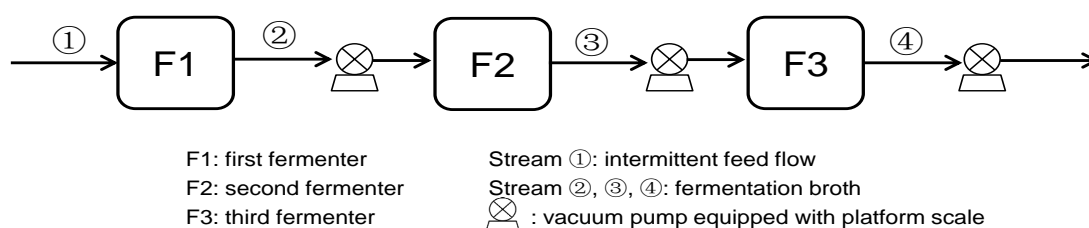


图 3.1 在 3 联摇瓶中的乳酸连续同步糖化与共发酵流程图

Fig. 3.1 Diagram of continuous SSCF of lactic acid in three-cascade shake flasks.

保藏在冻存管中的乳酸片球菌 ZY271 甘油种转接到 20 mL 简化 MRS 培养基中，在 42 °C、150 rpm 条件下活化 12 h。随后取出 1 mL 按照 10% (v/v) 的接种量进行扩培，在相同条件下培养 8 h 后当作上罐种子。培养种子时，需要加入 1% (v/v) 的糖化酶来防止细胞絮凝^[92]。脱毒物料在 42 °C、20% (w/w) 固含量、5 mg protein/g DM 的酶用量下在 F1 摇瓶中预糖化 8 h。用浓度为 0.6 g 碳酸钙/g 糖的碳酸钙调节整个发酵过程中 F1、F2、F3 摇瓶的 pH。随后在 F1 摇瓶中加入营养盐并按照 10% (v/v) 接种量接入种子液。发酵过程中每 12 h 取样检测可发酵糖和乳酸的浓度。总的实验流程如图 3.1 所示，接菌发酵后，在 F1 摇瓶内葡萄糖浓度消耗至 20 g/L 左右时，取出 20% (w/w) 的发酵液至 F2 摇瓶，随后补充与取出发酵液相同质量、相同固含量的料液和对应的碳酸钙，补料液包括：预处理生物脱毒后的小麦秸秆、无菌水、酶和营养盐；12 h 后，从 F2 摇瓶取出 20% (w/w) 的发酵液至 F3 摇瓶，从 F1 摇瓶取出 20% (w/w) 的发酵液至 F2 摇瓶，F1 摇瓶补充与取出发酵液相同质量、相同固含量的料液，同时 F1 摇瓶、F2 摇瓶、F3 摇瓶补充对应的碳酸钙；按照上述的取补顺序重复若干次，待 F3 摇瓶中的发酵液体积多于或等于 F1 摇瓶中的发酵体积，取出多余的发酵液。等到从 F3 取出的发酵液乳酸浓度达到最大并保持稳定多次或乳酸浓度出现连续下降后，发酵结束。

3.2.6 在 3 联 5-L 生物反应器中的乳酸连续同步糖化共发酵

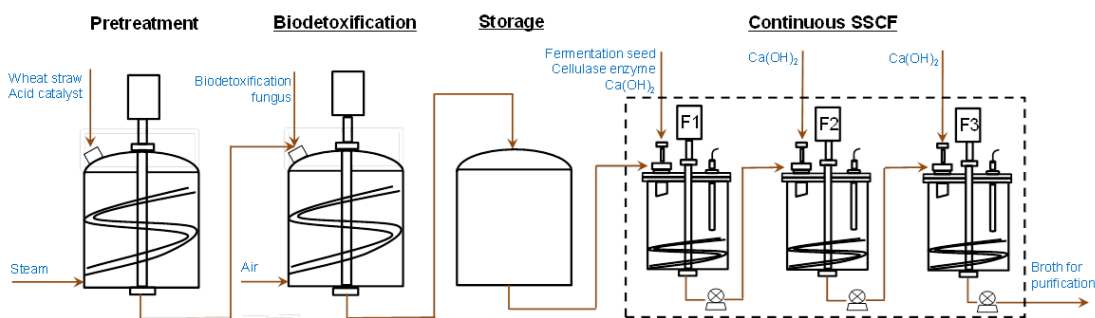


图 3.2 在 3 联生物反应器中纤维素乳酸连续发酵的生物炼制示意图

Figure. 3.2 Diagram of biomass preparation and three-cascade continuous SSCF for cellulosic lactic acid production.

注：在实验室规模下，为了缩减 F2 和 F3 反应器到达设定发酵质量 (2200.0 g) 的时间，增添了一个与 F1 反应器平行的补充罐 F1-1，同时补充罐并未显示在示意图中

Note: In bench-scale, in order to shorten the period for F2 and F3 to reach the set fermentation mass (2200.0 g), a parallel reactor (F1-1) of F1 was set up, which was not shown in the diagram

在多级纤维素乳酸的连续发酵过程中，优化连续过程的一种方法就是确定最适反应的配置，在以木质纤维素为底物的乳酸连续发酵过程中，由于木质纤维发酵液较为粘稠，一般的蠕动泵难以将发酵液有效的转移，考虑到本实验发酵菌株乳酸片球菌 ZY271 具有开放式发酵的能力，我们通过真空泵将发酵液吸出（注：所有与发酵液接触的设备都需要灭菌）。为了操作简便和更加适用今后的工厂应用，在补料过程中，脱毒后的小麦秸秆将通过加料器直接送入发酵罐。

该系统由三个独立运行的 5-L 螺带桨生物反应器组成。具体物料装置和流程如图 3.2 所示。具体操作如下：

(1) F1 反应器内的葡萄糖浓度消耗至 20 g/L 左右时，按一定时间间隔（8-12 h）和比例（20-30 %（w/w）），用真空泵从 F1 反应器中取出发酵液，并在开放条件下补加与取出发酵液相同质量和固含量的物料；

(2) 从 F1 取出的物料在开放条件下加入至 F2 反应器，并在与步骤（2）相同的时间间隔（8-12 h）后，用真空泵从 F2 中按照相同比例取出发酵液至 F3；

(3) 从 F2 取出的物料在开放条件下加入至 F3 反应器；

(4) 按照相同补料/取出比例，重复步骤（2）、（3），F3 反应器的发酵液质量达到设定值（2200 g），同时按照与步骤（2）（3）相同的时间间隔从 F3 取出多出设定值的发酵液；

(5) 当 F3 出料的乳酸浓度在较长时间达到稳定，即认为连续发酵过程成立，若是乳酸浓度出现连续下降时，发酵结束；

(6) F1 的原料补料，需添加与补料固体干重固定比例的纤维素酶、营养盐和水，使其达设定的操作要求。

(7) 用氢氧化钙中和剂（25%, w/w）调节所有反应器中发酵液的 pH，同时中和剂的流加会导致发酵液质量的提高，因此补料中需从补水中扣除氢氧化钙溶液中的水。

在实际操作中为了缩短发酵到达稳态的时间，增加了一个 F1 的平行生物反应器 S1。其操作方法如下：

(1) F1 第一次取料至 F2 时，按照相同的比例从 S1 反应器内中取一定量的发酵液至 F2。S1 无补料操作。

(2) F2 第一次取料至 F3 时，按照相同比例从 S1 反应器内中取一定量的发酵液至 F3 反应器。此时 S1 结束发酵。

数据测定的设定如下：

(1) 每次测定的数据为取料之前的样品数据。

(2) F1 第一次取补料及之前，F1 与 S1 的发酵数据合并后取平均值并入 F1 发酵数据；F2 第一次取补料时，F2 与 S1 的发酵数据合并后取平均值并入 F2 发酵数据。

(3) 最终的发酵数据为达到发酵稳定状态后连续三个点的平均值。

(4) 由于连续操作过程中的数据重复性较差, 仅展示了其中一次的数据。但平行实验中整体趋势和最终稳定状态下乳酸发酵指标基本相似。

3.2.7 分析方法

葡萄糖、木糖、乳酸、乙酸、5-HMF 和糠醛、CFU、乳酸的手性纯度的检测方法详见 2.2.9。

3.2.8 发酵的稀释度、停留时间、乳酸的得率、产率和糖转变为乳酸的得率计算

$$\text{Dilution rate (1/h)} = \frac{D}{H \times n} \quad (3-1)$$

公式中 H (h) 为取补时间间隔; D (% w/w) 为取出发酵液与罐内发酵液的质量比; D (% v/v) 为取出发酵液与罐内发酵液的体积比; n 为连续发酵反应器的个数。

$$\text{productivity(g/L/h)} = \frac{c_2 - c_1}{H \times n} \quad (3-2)$$

公式中 c_1 (g/L) 为出料罐出料时的乳酸浓度, c_2 (g/L) 为出料罐补料后的乳酸浓度; H (h) 为取补时间间隔; n 为连续发酵反应器的个数; 最终产率为发酵到达稳态后 3 次结果的平均值。

$$\text{Yield (g/g sugar)} = \frac{c \times V}{m_1 + m_2} \times 100 \% \quad (3-3)$$

此公式为不考虑残糖时糖转变为乳酸的计算公式, 其中 c (g/L) 是出料罐出料的乳酸浓度; V (L) 是出料罐每次出料时发酵液去除固体后的液体体积, 密度看成与水近似; m_1 (g) 为进料时葡萄糖的量; m_2 为进料时木糖的量; 若是在考虑残糖的情况下, m_1 (g) 需要减去发酵液中残余葡萄糖的量, m_2 需要减去发酵液中残余木糖的量; 最终得率为发酵到达稳态后 3 次结果的平均值。

发酵的停留时间、乳酸得率的计算详见 2.2.10。

3.3 结果与讨论

3.3.1 小麦秸秆干酸预处理及固态生物脱毒

我们根据 NREL 协议中的两步酸解法^[94,95]进行组分测定。2021 年 6 月份原始小麦秸秆中含有: $37.50 \pm 0.08\%$ 纤维素、 $22.70 \pm 0.05\%$ 半纤维素、 $25.41 \pm 0.06\%$ 木质素和 $8.89 \pm 0.01\%$ 灰分 (干基)。6 月份的小麦秸秆因为收集的比较及时, 未发生明显的腐烂情况, 因此比 3 月份的小麦秸秆的纤维素和半纤维素含量高, 同时灰分的含量低。在经过 $175\text{ }^\circ\text{C}$ 、5 min、硫酸用量为 4% (w/w DM) 的预处理后, 我们对物料进行再一次的组分测定, 预处理前后物料的组分变化, 如表 3.1 所示, 经过预处理后, 纤维素的含量变化不大, 但有 94.93% 的半纤维素被破坏并降解为单糖或是其他化合物, 预处理后的物料中可发酵糖约占 20.35%, 这其中包括葡寡糖、木寡糖、葡萄糖和木糖。以预处理后物料的干基为基准, 主要抑制物乙酸、5-羟甲基糠醛 (5-HMF) 和糠醛的含量为 21.73 ± 0.24 、 6.04 ± 0.07 和 2.85 ± 0.13 mg/g DM, 随后本实验用在位生物脱毒

的方法对预处理后的小麦秸秆进行脱毒，在纤维素和半纤维素含量基本不变、仅有少部分可发酵糖损失的情况下，对抑制物 5-HMF 和糠醛进行了完全的脱除，对乙酸也有 76.53% 的脱除，这保证了后续的乳酸发酵中抑制物对发酵菌株的发酵性能基本不会造成影响。由于本论文历时较长且物料耗费巨大，前后所用小麦秸秆组分有所变化，导致发酵过程中糖浓度有所变化。

表 3.1 小麦秸秆预处理前后糖及衍生物的含量

Table 3.1 Sugar and its derivative contents of wheat straw before and after pretreatment

	Components	Contents (% , w/w)
(a) Wheat straw	Cellulose	37.50 ±0.08
	Hemicellulose	22.70 ±0.05
	Lignin	25.41 ±0.06
	Ash	8.89 ±0.01
(b) Pretreated wheat straw	Cellulose	32.78 ±0.02
	Hemicellulose	1.15 ±0.01
	Glu-oligos	0.55±0.04
	Xylo-oligos	1.80±0.07
	Glucose	3.23±0.08
	Xylose	14.77 ±0.26
	Acetate	2.13 ±0.03
	5-HMF	0.59 ±0.08
Furfural	0.26 ±0.07	

3.3.2 在 3 联 500-mL 摇瓶中的乳酸连续同步糖化共发酵

在连续发酵中串联多个条件相同的反应器，会增加底物停留时间，从而可能获得更高的产品浓度、转化率和体积生产率^[78]。然而多个生物反应器的串联却意味着更复杂的实验操作。考虑到在摇瓶中取补的操作更加简便，同时对每次取补的量的控制的可以更为精确，首先在 3 联 500-mL 摇瓶中的进行乳酸连续同步糖化与共发酵的探索。但由于木质纤维素物料的粘稠度高且成分复杂，发酵初始的糖化效果会受到很大的影响，同时恒温摇床的保温效果较差，对发酵菌株的发酵性能也有了更大的考验。因此我们在实验中将发酵的固含量降为 20% (w/w)、每次取补的质量比降为 20% (w/w)、发酵温度调为 42 ℃。

Result: Solids loading 20% (w/w), dilution rate 0.005 h^{-1} ; lactic acid titer $79.5 \pm 2.6 \text{ g/L}$, yield $0.29 \pm 0.01 \text{ g/g}$, productivity $0.44 \pm 0.01 \text{ g/L/h}$

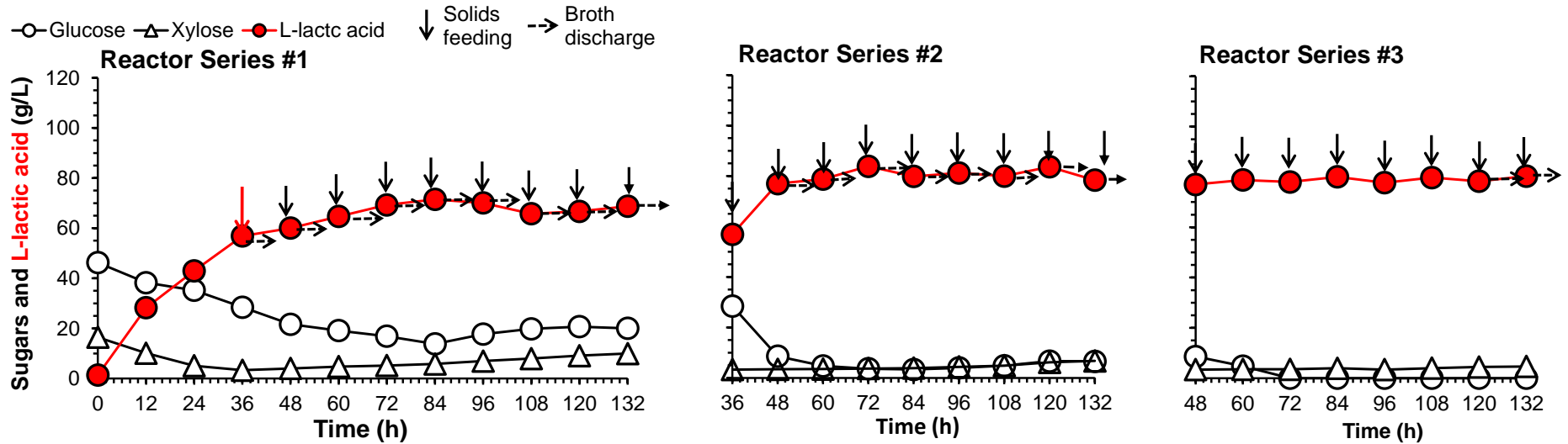


图 3.1 在三联 500 mL 生物反应器中的乳酸连续同步糖化共发酵

Fig. 3.1 Continuous SSCF of lactic acid in three-cascade 500 mL shake flasks.

发酵条件: 20% (w/w) 固含量, 42 °C, 150 rpm, D 为 20% (w/w), H 为 12 h, 稀释度为 0.005 h^{-1} , 保留时间为 180.0 h。

Fermentation conditions: solids loading 20% (w/w), 42 °C, 150 rpm, D 20% (w/w), H 12 h, dilution rate 0.005 h^{-1} , retention time 180.0 h

在 F1 摇瓶中，脱毒后的小麦秸秆经过的 8 h 的糖化后，接菌发酵，发酵 36 h，葡萄糖浓度消耗至 28.7 g/L，开始进行取补料操作，后续每 12 h 进行一次，共进行了 9 次。发酵进行了 132 h。发酵结果如图 3.1 所示。随着取补料的开始 F1、F2、F3 摇瓶中的剩余木糖浓度都逐渐有着小幅度的上升，这种现象与 Brethauer^[69]所提出的在连续发酵的操作中因为纤维二糖的产量随着转化而减慢的观点一致，在一定的稀释度条件下，由于同时进行糖化和发酵两个操作，木糖的生成率较葡萄糖而言，生成速率放缓。在第 5 次的取补料后 F1 摇瓶出现葡萄糖浓度上升、乳酸浓度下降的情况。这表明对于 3 联 500-mL 摇瓶中的乳酸连续发酵，每 12 h 取补 20% (w/w) 发酵液的取补操作对发酵菌株 ZY271 的影响较大。然而随着反应器的增加乳酸浓度下降的趋势逐渐平缓，F3 摇瓶主要用于出料，乳酸产量较为稳定，乳酸浓度也始终稳定在 75-80 g/L，同时糖浓度增长的情况也得到一定的缓解。这表明，多级的 SSCF 操作会减缓取补操作对发酵菌株造成的副作用，3 个生物反应器的串联能够满足稳定的连续发酵的需要。同时即使是在 3 联摇瓶中进行 20% (w/w) 固含量下的乳酸连续发酵，乳酸产量、得率和产率分别也能到达 79.5 ± 2.6 g/L、 0.29 ± 0.01 g/g、 0.44 ± 0.01 g/L/h 的良好发酵表现。

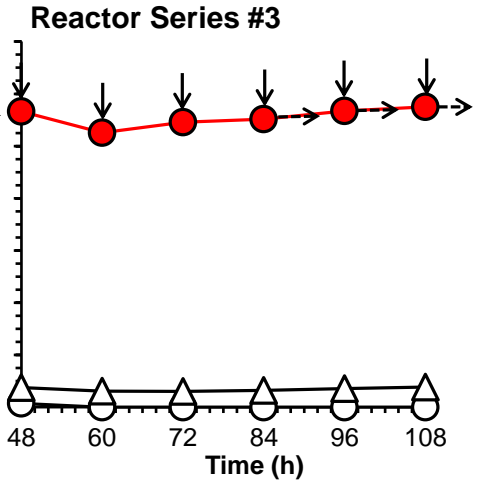
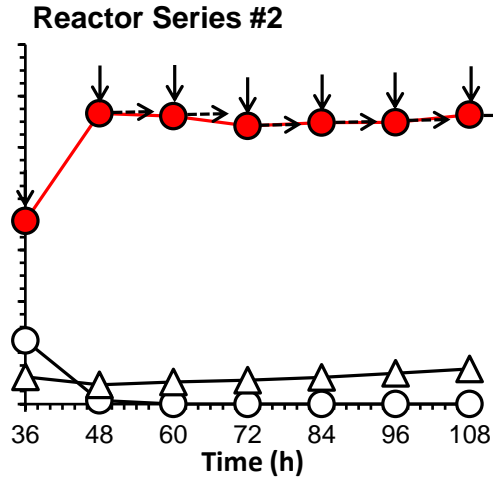
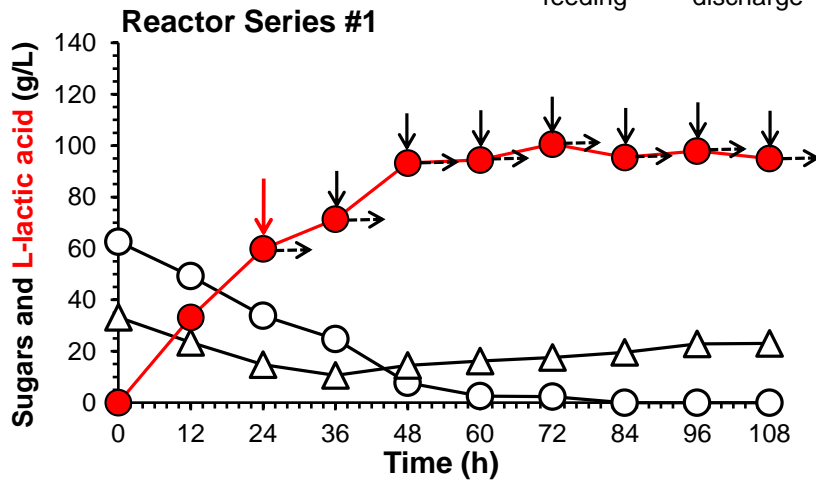
3.3.3 在 3 联 5-L 生物反应器中的乳酸连续同步糖化共发酵

当在单级 5-L 发酵罐的稀释率从 0.017 h^{-1} 提升至 0.025 h^{-1} 时，乳酸浓度在发酵后期仍能保持稳定，同时发酵后期的活菌数也能稳定在 10^9 以上，这表明发酵菌株能够完成此稀释度下的纤维素乳酸连续发酵。对于乳酸产量和得率下降所反应的糖化不完全的问题，尝试串联多个条件相同的生物反应器来增加纤维二糖的转化时间，并相应地减少纤维素酶的负载量。

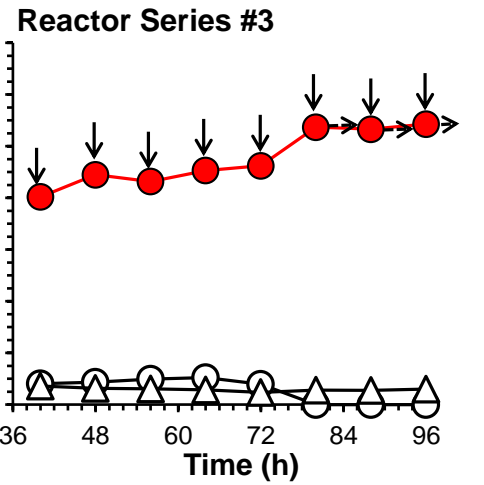
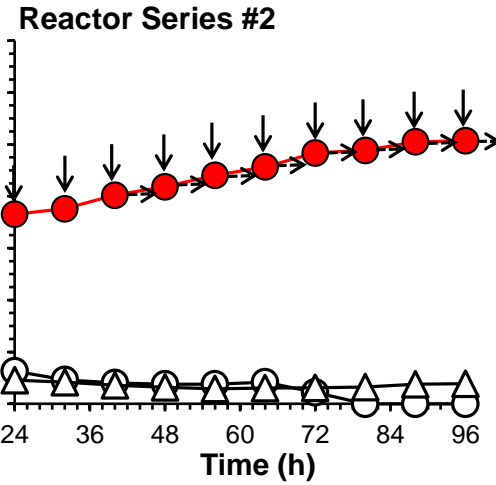
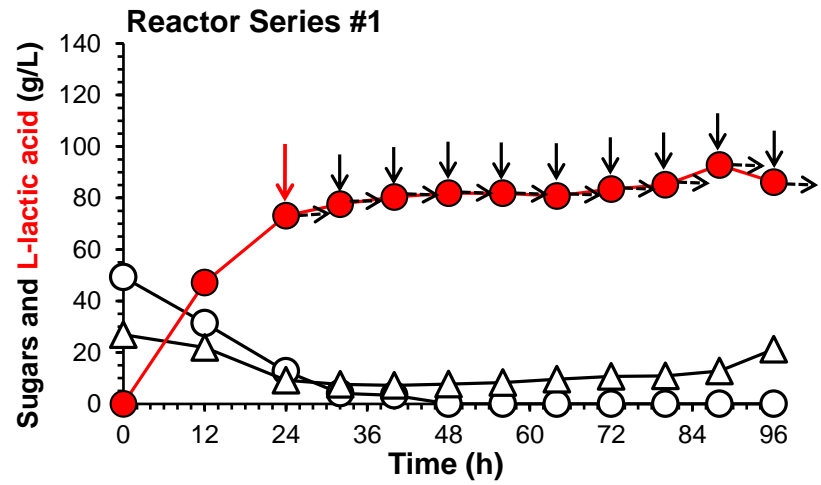
以 3 联 500 mL 摇瓶中的乳酸连续发酵为参考，在实验室规模上，我们串联 3 个条件相同的 5-L 生物反应器来进行乳酸的连续发酵，同时为了减少 F2、F3 生物器到达设定发酵质量的时间，增加一个与一级反应器的平行反应器。

(a) Mode I: Solids loading 30% (w/w), dilution rate 0.008 h^{-1} ; lactic acid titer $112.9 \pm 2.6\text{ g/L}$, yield $0.23 \pm 0.01\text{ g/g}$, productivity $0.94 \pm 0.02\text{ g/L/h}$

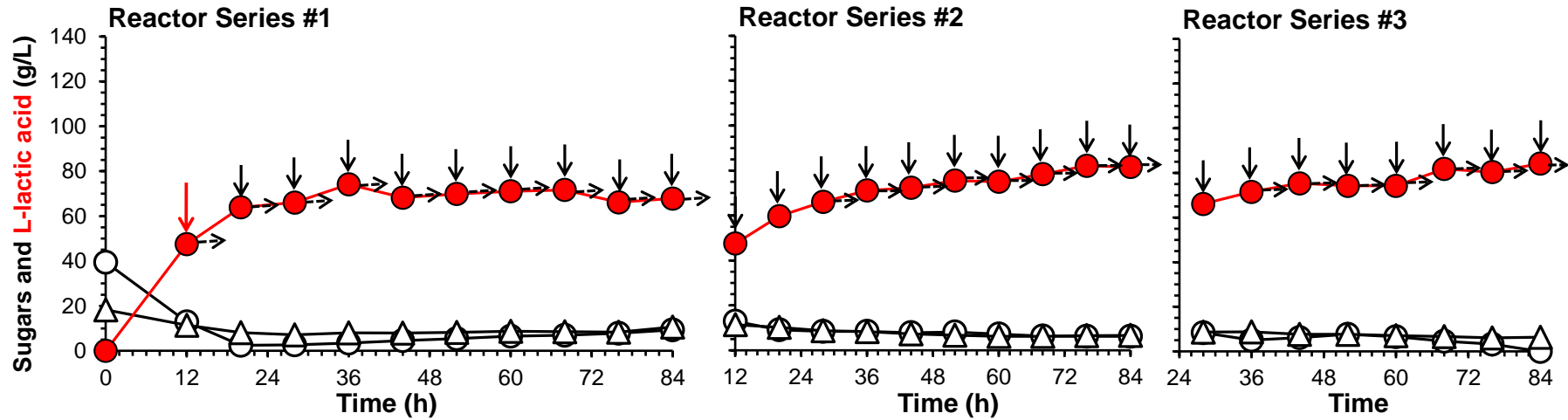
○ Glucose △ Xylose ● L-lactic acid ↓ Solids feeding → Broth discharge



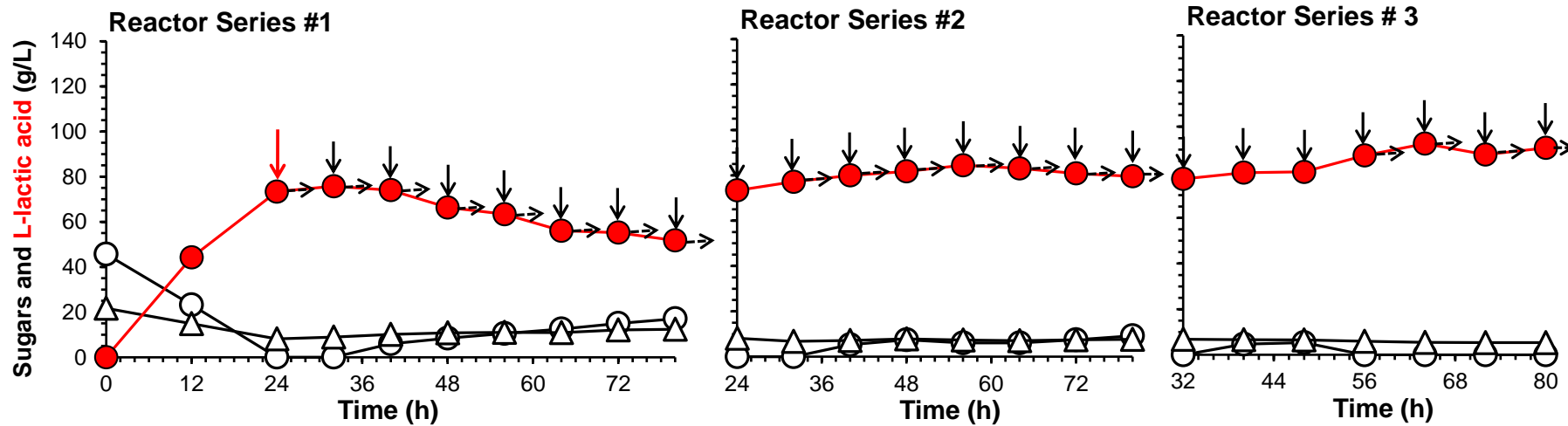
(b) Mode II: Solids loading 25% (w/w), dilution rate 0.008 h^{-1} ; lactic acid titer $107.5 \pm 1.1\text{ g/L}$, yield $0.29 \pm 0.01\text{ g/g}$, productivity $0.89 \pm 0.01\text{ g/L/h}$



(c) Mode III: Solids loading 20% (w/w), dilution rate 0.008 h^{-1} ; lactic acid titer $82.1 \pm 2.1\text{ g/L}$, yield $0.33 \pm 0.01\text{ g/g}$, productivity $0.68 \pm 0.02\text{ g/L/h}$



(d) Mode IV: Solids loading 25% (w/w), dilution rate 0.012 h^{-1} ; lactic acid titer $90.4 \pm 2.2\text{ g/L}$, yield $0.26 \pm 0.01\text{ g/g}$, productivity $1.13 \pm 0.03\text{ g/L/h}$



(e) Mode V: Solids loading 25% (w/w), dilution rate 0.008 h^{-1} ; lactic acid titer $95.8 \pm 2.7 \text{ g/L}$, yield $0.28 \pm 0.01 \text{ g/g}$, productivity $0.83 \pm 0.02 \text{ g/L/h}$

10% (w/w) of seed was supplemented at 32 h and 72 h.

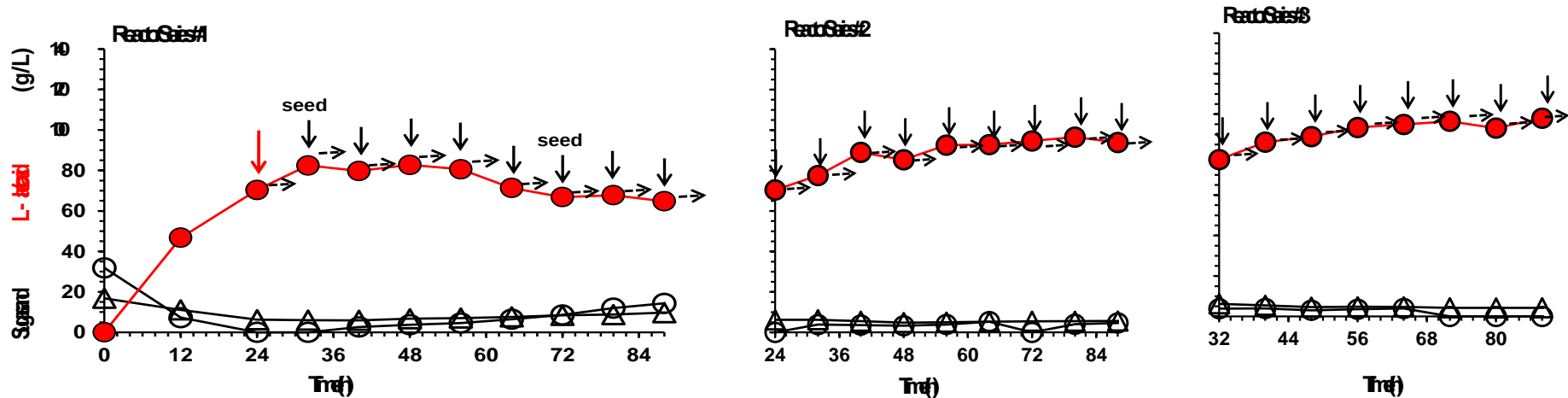


图 3.2 在三联 5-L 生物反应器中的乳酸连续同步糖化共发酵

Fig. 3.2 Continuous SSCF of lactic acid in three-cascade 5-L bioreactors.

发酵条件 (a) 模式I: 30% (w/w) 固含量, D 为 30% (w/w), H 为 12 h, 稀释度为 0.008 h^{-1} , 保留时间为 120.0 h; (b) 模式II: 25% (w/w) 固含量, D 为 20% (w/w), H 为 8 h, 稀释度为 0.008 h^{-1} , 保留时间为 120.0 h; (c) 模式III: 20% (w/w) 固含量, D 为 20% (w/w), H 为 8 h, 稀释度为 0.008 h^{-1} , 保留时间为 120.0 h; (d) 模式IV: 25% (w/w) 固含量, D 为 30% (w/w), H 为 8 h, 稀释度为 0.012 h^{-1} , 保留时间为 106.7 h; (e) 模式V: 25% (w/w) 固含量, D 为 20% (w/w), H 为 8 h, 稀释度为 0.008 h^{-1} , 保留时间为 120.0 h, 在 32 和 72 h 的补料使用 10% (w/w) 的种子液替换了同体积的无菌水。45 °C, 150 rpm

Fermentation conditions: (a) Mode I: solids loading 30% (w/w), D 30% (w/w), H 12 h, dilution rate 0.008 h^{-1} , retention time 120.0 h; (b) Mode II: solids loading 25% (w/w), D 20% (w/w), H 8 h, dilution rate 0.008 h^{-1} , retention time 120.0 h; (c) Mode III: solids loading 20% (w/w), D 20% (w/w), H 8 h, dilution rate 0.008 h^{-1} , retention time 120.0 h; (d) Mode IV: solids loading 25% (w/w), D 30% (w/w), H 8 h, dilution rate 0.012 h^{-1} , retention time 106.7 h; (e) Mode IV: solids loading 25% (w/w), D 20% (w/w), H 8 h, dilution rate 0.008 h^{-1} , retention time 120.0 h, 10% (w/w) of seed was supplemented at 32 h and 72 h. 150 rpm, 45 °C

首先以小麦秸秆为底物在与单罐相同的发酵条件下进行实验,如图 3.2 a 所示,随着生物反应的增加,出料罐的乳酸浓度基本处于发酵后期的高点,并保持稳定。与 3 联摇瓶的乳酸连续发酵相比较,发酵过程中未出现乳酸浓度下降的情况,虽然葡萄糖的浓度基本为零,但随着取补操作的继续,剩余木糖浓度仍然有着逐渐上升的趋势,即使 3 个串联的生物反应器使发酵液在反应器中的停留时间增加,最终出料罐的剩余糖浓度仍有 7.1 g/L,虽然较 3 联摇瓶中的连续发酵有所缓解,但对于后期乳酸的分离提纯仍有不小的影响。接着本实验通过改变发酵固含量、取补料的时间间隔和每次取补的比例来获得更高的产率和转化率。随着发酵固体含量从 30% 下降至 20% (Mode II, Mode III),最终乳酸浓度从 112.9 ± 2.6 g/L 下降至 82.1 ± 2.1 g/L,产率从 0.94 ± 0.02 g/L/h 下降至 0.68 ± 0.02 g/L/h,但乳酸得率从 0.23 ± 0.01 g/g DM 提升至 0.33 ± 0.01 g/g DM、剩余糖浓度从 7.1 g/L 降为 6.4 g/L。这表明随着发酵固含量的下降,物料糖化更加完全,使得乳酸得率提高。当固含量为 25% (w/w) 时,乳酸的产量、产率和得率均相对适中。在此条件下,相比于更高的固含量 30% (w/w),乳酸产量和产率仅下降了 4.8% 和 4.6%,但得率提高了 26.1%;而相比于更低的固含量 20% (w/w),乳酸得率仅下降了 12.1%,此时乳酸的产量和产率分别提高了 30.9% 和 31.2%。因此 25% (w/w) 固体含量下 0.008 h^{-1} 的稀释度可以作为一个相对折中的条件来进行接下来的优化,同时与单个生物反应器的纤维素乳酸的同步糖化共发酵相比(图 2.4 c),乳酸的产量、得率和产率都有着或多或少的提高。随后我们检测最适模式下得到的乳酸手性纯度为 99.3%,这已然能够满足后期分离纯化的要求。

在连续发酵中,稀释度与产品产量、产率等都有着密切的关系,在 Mode II 的基础上,将每次的取补比例从 20% (w/w) 进一步提升至 30% (w/w),此时发酵的稀释度提高到 0.012 h^{-1} 。此时三级生物反应器达到稳定状态所用时间减少至 64 h,其得率和产率也有轻微的增长。但随着取补操作的进行,一级反应器从 36 h 开始出现乳酸浓度降低的情况,虽然后续两个生物反应最终三级反应器出料乳酸浓度仅为 90.4 ± 2.2 g/L,下降了 15.9%。因此在 Mode II 条件下虽然通过提高稀释度提升了乳酸浓度,但乳酸的发酵浓度却达不到工业生产的实际要求。

面对在纤维素乳酸连续发酵过程中发酵液中的残糖浓度较高的情况,通常会采用回收乳酸菌体或细胞固定化的方法,来实现高密度细胞发酵,从而维持微生物生长发酵性能使发酵能够长期运行^[25]。对于木质纤维素体系,由于木质素固体颗粒的存在,难以对细胞进行回收。我们通过在 Mode II 的基础上,在一级反应器发酵 36 h 和 72 h 时分别将补料中部分无菌水换成 10% (w/w) 的种子液。希望通过定期补充种子液的形式维持细胞生长活性,来提高发酵性能。如图 3.2 e,接入额外的发酵种子却造成了乳酸浓度约有 10.79% 的下降,此时产率也有所下降,主要原因可能有两点,一是高浓度乳酸的生长抑制,二是更多的可发酵糖用于了菌种的生长。因此我们仍只选择了 Mode II 作为最佳

的连续发酵条件，在多联生物反应器中的乳酸连续发酵后期剩余的少量残糖我们认为是随着发酵液多周期的更换，本身就不可发酵的糖逐渐积累造成的，后续不再考虑剩余残糖问题。

综上所述，乳酸片球菌 ZY271 具备在 45 °C 条件下进行纤维素乳酸连续 SSCF 的能力。通过应用三级生物反应器系统，在 45 °C、25% (w/w) 固含量、0.008 h⁻¹ 稀释度条件下，相比于单一发酵罐，乳酸产量、得率和产率均有明显提高。此时进一步提高稀释度或补充发酵种子均会造成乳酸发酵性能的下降。

3.3.4 以小麦秸秆为底物的乳酸连续同步糖化共发酵的全过程物料平衡

选择目前最优发酵指标的 Mode II，根据其实验数据进行进一步的物料衡算，验证其可行性。在计算中将三联生物反应器系统看成一个整体。

1000 g 原始玉米秸秆经过稀酸预处理，大部分木聚糖被水解成木糖。预处理过程中生成的糠醛、HMF 在固态脱毒过程中被完全去除。由于在脱毒过程中糠醛和 5-HMF 的代谢优先于乙酸，因此我们控制脱毒时间，使乙酸少量剩余。残余的乙酸可以作为乳酸片球菌发酵培养基组分。

预处理和脱毒物料后的物料在 25% (w/w) 固体含量下进行连续糖化与共发酵生产纤维素乳酸。按照连续 SSCF 的结果，最终生成乳酸钙 367.3 g，折合成乳酸为 303.3 g，转化率为 0.29 g/g 干脱毒物料。在连续发酵过程中，在不考虑残糖的情况下由脱毒物料中的糖转变为乳酸的得率为 74.3%，去除残糖的影响下乳酸的得率为 77.3%。这一得率明显低于批次发酵操作 (~90%)，主要是由于在连续发酵过程中聚糖的水解仍不完全导致，此时脱毒物料中纤维素的转化率仅为 70.0%。尽管通过使用三级反应器增加了停留时间，但以目前的结果来看，随着糖化的不完全，发酵液粘度仍会呈现上升的趋势，这也就要求我们在实际的生产当中需要串联更多的反应器来保证发酵的稳定。

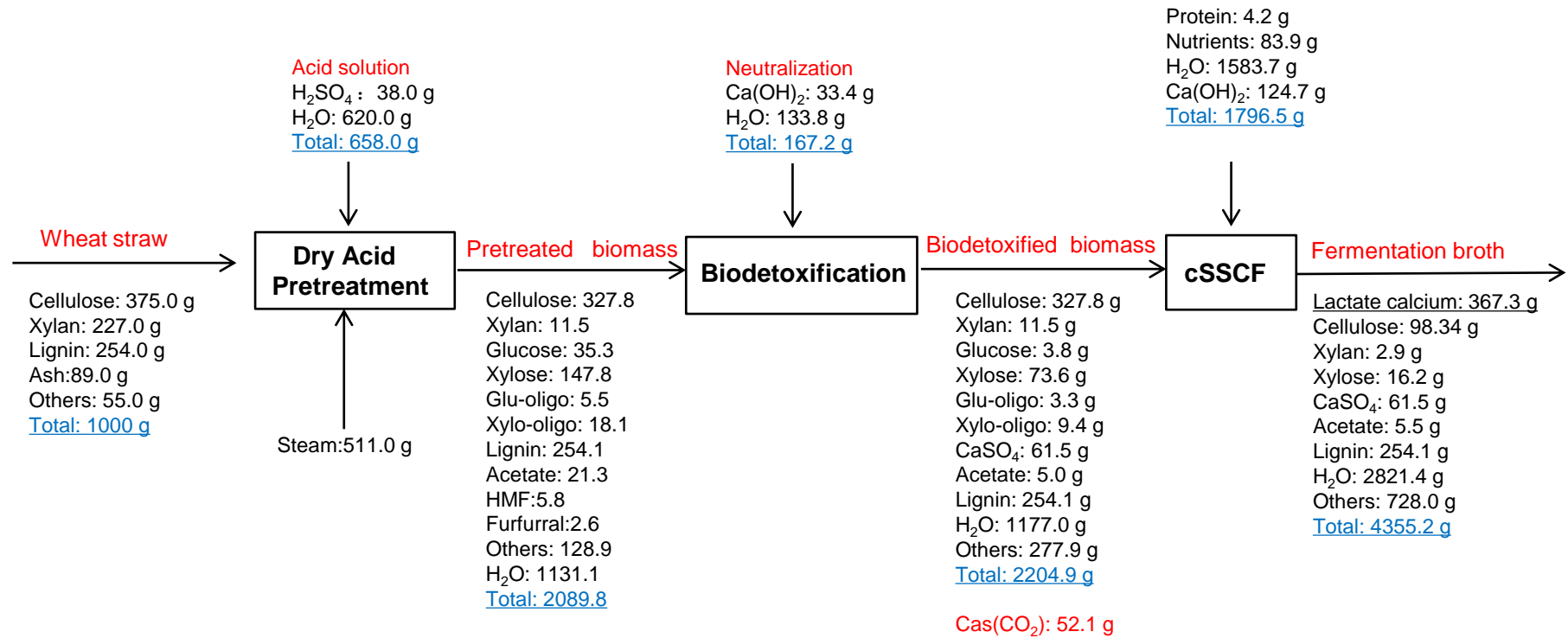


图 3.3 最适模式下纤维素乳酸连续发酵的质量衡算

Fig. 3.3 Mass balance of cSSCF of cellulose lactic acid in optimal mode

发酵条件：25% (w/w) 固含量，45 °C，150 rpm，H 为 8 h，D 为 20% (w/w)，稀释度为 0.008 h⁻¹，保留时间为 120.0 h

注：将 3 联生物反应器中的连续同步糖化与共发酵发酵认定为一个整体的连续发酵系统

Fermentation conditions: Solids loading 25% (w/w), 45 °C, 150 rpm, D 20% (w/w), H 8 h, dilution rate 0.008 h⁻¹, retention time 120.0 h

Note: The cascade bioreactors were considered as a whole for calculation.

3.4 本章小节

本章完成了以小麦秸秆为底物在多级生物反应器中进行了更为彻底的乳酸连续 SSCF。无论是在摇瓶，还是在发酵罐中，均有良好的发酵表现。所得出的结论如下：

(1) 3 个生物反应器的串联足够使以小麦秸秆为底物的连续 SSCF 彻底地完成。在 3 联 500-mL 摇瓶中的连续发酵，即使是在 20% (w/w) 固含量下，稳定状态下的乳酸浓度也能达到 79.5 ± 2.6 g/L，同时得率为 0.29 ± 0.01 g/g，产率为 0.44 ± 0.01 g/L/h。

(2) 相同发酵条件下，在 3 联 5-L 生物反应器中连续 SSCF 生产乳酸的产量比在单级 5-L 生物反应中进行的连续 SSCF 提升了 27.86%。

(3) 确定了 25% (w/w) 固含量、 0.008 h^{-1} 稀释度下乳酸连续发酵为最适的发酵模式。在此模式下得到 107.5 ± 1.1 g/L 的乳酸浓度，同时此时的乳酸得率和产率分别为 0.29 ± 0.01 g/g DM 和 0.89 ± 0.01 g/L/h。

(4) 以最适模式为基础进行了全过程的物料衡算，在不考虑残糖的情况下由脱毒物料中的糖转变为乳酸的得率为 74.3%，去除残糖的影响下乳酸的得率为 77.3%。

第 4 章 结论与展望

4.1 结论

本论文重点关注于对木质纤维素原料的生物转化和乳酸的生物炼制，针对纤维素乳酸的发酵工艺进行推进与创新。目前，纤维素乳酸发酵普遍通过批次发酵中 SSCF 的方式进行。然而从经济性和工业性考虑，连续发酵才是纤维素乳酸最合适的发酵工艺。然而，在发酵过程中只有统一糖化和发酵温度，才使纤维素乳酸的连续 SSCF 成为可能。

另一方面，通过多级生物器的串联可以有效解决单级生物反应中纤维素乳酸连续 SSCF 糖化不彻底的问题，从而使得乳酸的产量和产率增加。然后通过改变发酵条件和操作参数进一步确定了更合适今后工厂应用的发酵模式。

(1) 以小麦秸秆为底物在单级生物反应器中进行乳酸连续 SSCF，确定 45 ℃ 恒温可以有效地完成糖化和发酵。后续进一步增加连续发酵的稀释度，确定单级生物器中的连续 SSCF 可以在 0.025 h⁻¹ 的稀释度条件下获得稳定的发酵结果。

(2) 针对在单级生物反应器的连续 SSCF 中糖化不完全的问题，3 个生物反应器的串联足够缓解因发酵液的更换所带来的负面影响。

(3) 通过对发酵条件和操作参数的调整，得到了一个更适合工厂应用的发酵模式，在此模式下的乳酸发酵得到了 107.5 ± 1.1 g/L 的乳酸浓度，同时此时的乳酸得率和产率分别为 0.29 ± 0.01 g/g DM 和 0.89 ± 0.01 g/L/h。

(4) 对最适模式下的乳酸连续发酵进行了全过程的物料衡算，脱毒物料中的糖有着较好的乳酸转化率。

(5) 本研究所建立的高效连续 SSCF 生产工艺由于发酵过程始终保持恒温，所获得的乳酸纯度、浓度和产量也均有着良好的表现，为真正工业场景下纤维素乳酸的连续生产提供了技术手段。

4.2 展望

本论文改善了纤维素乳酸的发酵工艺，在实验室规模上采用三个生物反应串联的方式实现了以脱毒后小麦秸秆为原料的乳酸连续同步糖化与共发酵，在满足乳酸浓度和手性纯度的基础上，比常规的分批发酵和单个生物反应的连续发酵在产率方面都有着一定程度的提升。然而本论文仍然有着部分的不足之处：

(1) 本论文中的补料方式采取直接补充与原始上罐所需相同的成分（脱毒后的小麦秸秆、纤维素酶、无菌水、营养盐），虽然符合真正意义上的纤维素乳酸的连续发酵，但补料后发酵液的复杂成分和高负载量的纤维素酶等都会对发酵菌株的发酵性能

产生严重的影响。因此可以选择对预处理后的纤维素原料采取先糖化后脱毒的策略，无论是上罐开始还是发酵过中的补料都使用糖化后的糖化液，在后续发酵过程中使发酵菌株直接发酵糖化后的可发酵糖，这种方法不仅减弱了连续发酵中同步糖化与发酵对发酵菌株造成的负面影响，同时糖化脱毒后的发酵液粘度更小，取补料的操作也会更加简便。

(2) 由于本论文的取补料的比例是采用质量比的形式进行衡量，然而氢氧化钙中和剂的添加往往会使发酵体系的总质量增加，虽然在发酵后期每个时间间隔内的碱消耗量趋于稳定，但取补料的前期中碱的使用量不容易称量或是计算，随着补料的进行，发酵体系的总质量会有一些的浮动，因此探索较为准确的方法来衡量发酵过程中中和碱的使用量是必要的。

(3) 本论文仅研究了纤维素乳酸的发酵工艺，在今后真正的工厂应用过程中，需要考虑从原料的前期准备、预处理、糖化脱毒以及后续的微生物发酵等全过程的生产连续化。虽然本论文在最适模式下以原始小麦秸秆出发到连续发酵产乳酸全过程进行了物料衡算，证明了其纤维素乳酸生产的可行性，但其能否真正的符合工厂应用的要求，并在工业上实现乳酸的连续发酵，还有待技术经济性的评估和今后真正的工厂应用。

参考文献

- [1] Shen X, Xin Y, Liu H, Han B. Product-oriented direct cleavage of chemical linkages in lignin. *ChemSusChem*, 2020, 13(17): 4367-4381.
- [2] Zhang Z, Song J, Han B. Catalytic Transformation of lignocellulose into chemicals and fuel products in ionic liquids. *Chemical Reviews*, 2017, 117(10): 6834-6880.
- [3] Ragauskas AJ, Williams CK, Davison BH, Britovsek G, Cairney J, Eckert CA, Frederick WJ, Jr., Hallett JP, Leak DJ, Liotta CL, Mielenz JR, MurphyR, TemplerR, Tschaplinski T. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*, 2006, 311(5760): 484-489.
- [4] Dincer I, Acar C. Review and evaluation of hydrogen production methods for better sustainability. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2015, 40(34): 11094-110111.
- [5] Isikgor FH, Becer CR. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry*, 2015, 6(25): 4497-4559.
- [6] Nwamba MC, Sun F, Mukasekuru MR, Song G, Harindintwali JD, Boyi SA, Sun H. Trends and hassles in the microbial production of lactic acid from lignocellulosic biomass. *Environmental Technology & Innovation*, 2021, 21.
- [7] Cubas-Cano E, González-Fernández C, Ballesteros M, Tomás-PejóE. Biotechnological advances in lactic acid production by lactic acid bacteria: lignocellulose as novel substrate. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2018, 12(2): 290-303.
- [8] Ajala EO, Olonade YO, Ajala MA, Akinpelu GS. Lactic Acid production from lignocellulose – a review of Major challenges and selected solutions. *ChemBioEng Reviews*, 2020, 7(2): 38-49.
- [9] 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 & Technology*, 2013, 30(1): 70-83.
- [10] Wang C, Chang T, Yang H, Cui M. Antibacterial mechanism of lactic acid on physiological and morphological properties of salmonella enteritidis, escherichia coli and listeria monocytogenes. *Food Control*, 2015, 47: 231-236.
- [11] Bozell JJ, Petersen GR. Technology development for the production of biobased

- products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy’s “Top 10” revisited. *Green Chemistry*, 2010, 12(4).
- [12] 邹君, 凌秀琴. 可生物降解性高分子材料-聚乳酸. *广西化纤通讯*, 2000, 28(2): 35-37.
- [13] Zhai S, Liu Q, Zhao Y, Sun H, Yang B, Weng Y. A Review: Research Progress in Modification of Poly (Lactic Acid) by Lignin and Cellulose. *Polymers (Basel)*, 2021, 13(5).
- [14] Mohd Adnan AF, Tan IK. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. *Bioresource Technology*, 2007, 98(7): 1380-1385.
- [15] Cheng M, Qin Z, Chen Y, Hu S, Ren Z, Zhu M. Efficient extraction of cellulose nanocrystals through hydrochloric acid hydrolysis catalyzed by inorganic chlorides under hydrothermal conditions. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2017, 5(6): 4656-4664.
- [16] 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.
- [17] Tripathi N, Monika, Katiyar V. Poly (lactic acid)/modified gum arabic based bionanocomposite films:thermal degradation kinetics. *Polymer Engineering & Science*, 2017.
- [18] Abedi E, Hashemi SMB. Lactic acid production-producing microorganisms and substrates sources-state of art. *Heliyon*, 2020, 6(10): e04974.
- [19] Miller C, Fosmer A, Rush B, McMullin T, Beacom D, Suominen P. Industrial production of lactic acid. *Comprehensive Biotechnology*. 2017: 208-217.
- [20] Wang Y, Tashiro Y, Sonomoto K. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: recent achievements, prospects, and limits. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2015, 119(1): 10-18.
- [21] Hofvendahl, Karin, Hahn-Hagerdal B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 26: 87-107.
- [22] Daful AG, Haigh K, Vaskan P, Görgens J F. Environmental impact assessment of lignocellulosic lactic acid production: Integrated with existing sugar mills. *Food and Bioproducts Processing*, 2016, 99: 58-70.
- [23] 吴佳婧. 凝结芽孢杆菌 LA204 利用木薯发酵生产乳酸的研究. 华中农业大学,

- 2018.
- [24] Ramos JL, Udaondo Z, Fernandez B, Molina C, Daddaoua A, Segura A, Duque E. First- and second-generation biochemicals from sugars: biosynthesis of itaconic acid. *Microbial Biotechnology*, 2016, 9(1): 8-10.
- [25] Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(6): 877-902.
- [26] Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits. *Journal of Biotechnology*, 2011, 156(4): 286-301.
- [27] Zhao K, Qiao Q, Chu D, Gu H, Dao TH, Zhang J, Bao J. Simultaneous saccharification and high titer lactic acid fermentation of corn stover using a newly isolated lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* DQ2. *Bioresource Technology*, 2013, 135: 481-489.
- [28] Yi X, Zhang P, Sun J, Tu Y, Gao Q, Zhang J, Bao J. Engineering wild-type robust *Pediococcus acidilactici* strain for high titer L- and D-lactic acid production from corn stover feedstock. *Journal of Biotechnology*, 2016, 217: 112-121.
- [29] Qureshi AS, Zhang J, Da Costa Sousa L, Bao J. Antibacterial peptide secreted by *pediococcus acidilactici* enables efficient cellulosic open L-Lactic acid fermentation. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2017, 5(10): 9254-9262.
- [30] Qiu ZY, Gao QQ, Bao J. Engineering *pediococcus acidilactici* with xylose assimilation pathway for high titer cellulosic l-lactic acid fermentation. *Bioresource Technology*, 2018, 249: 9-15.
- [31] Qiu ZY, Gao QQ, Bao J. Constructing xylose-assimilating pathways in *Pediococcus acidilactici* for high titer D-lactic acid fermentation from corn stover feedstock. *Bioresource Technology*, 2017, 245: 1369-1376.
- [32] He NL, Jia J, Qiu ZY, Fang C, Liden G, Liu X, 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] Zdanowicz M, Wilpiszewska K, Spychaj T. Deep eutectic solvents for polysaccharides processing. A review. *Carbohydrate Polymers*, 2018, 200: 361-380.
- [34] Kumar R, Singh S, Singh OV. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Indian Journal of Microbiology*, 2008, 35(5): 377-391.

- [35] Chandel AK, Singh OV. Weedy lignocellulosic feedstock and microbial metabolic engineering: advancing the generation of 'Biofuel'. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 89(5): 1289-1303.
- [36] Azad AK, Rasul MG, Khan MMK, Sharma SC, Hazrat MA. Prospect of biofuels as an alternative transport fuel in Australia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2015, 43: 331-351.
- [37] Wang M, Wu M, Huo H. Life-cycle energy and greenhouse gas emission impacts of different corn ethanol plant types. *Environmental Research Letters*, 2007, 2(2).
- [38] 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.
- [39] Zhao X, Zhang L, Liu D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2012, 6(4): 465-482.
- [40] Testa ML, Tummino ML. Lignocellulose biomass as a multifunctional tool for sustainable catalysis and chemicals: An Overview. *Catalysts*, 2021, 11(1).
- [41] Walker LP, Wilson DB. Enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview. *Bioresource Technology*, 1991, 36: 3- 14.
- [42] Antoinette C, Sullivan O. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*. 1997, 4: 173-207.
- [43] Klemm D, Heublein B, Fink HP, Bohn A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie International Edition*, 2005, 44(22): 3358-3393.
- [44] Sarip H, Hossain MS, Azemi MNM, Allaf K. A Review of the thermal pretreatment of lignocellulosic biomass towards glucose production: autohydrolysis with dIC technology. *BioResources*, 2016, 11(4).
- [45] Zhou Z, Liu D, Zhao X. Conversion of lignocellulose to biofuels and chemicals via sugar platform: an updated review on chemistry and mechanisms of acid hydrolysis of lignocellulose. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2021, 146.
- [46] Schwab A, Warner E, Lewis J. 2015 survey of non-starch ethanol and renewable hydrocarbon biofuels producers. Technical Report, No. NREL/TP-6A10-65519. National Renewable Energy Lab. (NREL), Golden, CO (United States) 2016:1-26.
- [47] Sheng Y, Lam SS, Wu Y, Ge S, Wu J, Cai L, Huang Z, Le QV, Sonne C, Xia C. Enzymatic conversion of pretreated lignocellulosic biomass: A review on influence

- of structural changes of lignin. *Bioresource Technology*, 2021, 324: 124631.
- [48] Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, Ladisch M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 2005, 96(6): 673-686.
- [49] Tucker MP, Kim KH, Newman MM, Nguyen QA. Effects of temperature and moisture on dilute-acid steam explosion pretreatment of corn stover and cellulase enzyme digestibility. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2003, 105: 165-177.
- [50] Brownell HH, Yu NK C, Saddler JN. Steam-explosion pretreatment of wood: effect of chip size, acid, moisture content and pressure drop. *Biotechnology and Bioengineering*, 1985, 28(6): 792-801.
- [51] Teymouri F, Laureano-Perez L, Alizadeh H, Dale BE. Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource Technology*, 2005, 96(18): 2014-8.
- [52] Chang VS, Nagwani M, Holtzapple MT. Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1998, 74: 135-159.
- [53] Lee SH, Doherty TV, Linhardt RJ, Dordick JS. Ionic liquid-mediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 102(5): 1368-1376.
- [54] Zhang J, Wang X, Chu D, He Y, Bao J. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 2011, 102(6): 4480-4488.
- [55] Mussatto SI, Roberto IC. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technology*, 2004, 93(1): 1-10.
- [56] Nilvebrant NO, Reimann A, Larsson S, Jönsson LJ. Detoxification of lignocellulose hydrolysates with ion-exchange resins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2001, 91-93.
- [57] Cantarella M, Cantarella L, Gallifuoco A, Spera A, Alfani F. Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSF. *Process Biochemistry*, 2004, 39(11): 1533-1542.
- [58] Dominguez JM, Gong CS, Tsao GT. Pretreatment of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate for xylitol production by yeast. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1996, 57-58.

- [59] Dong H, Bao J. Metabolism: biofuel via biotransformation. *Nature Chemical Biology*, 2010, 6(5): 316-318.
- [60] Zhang J, Zhu Z, Wang X, Wang N, Wang W, Bao J. Biotransformation 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).
- [61] Huang X, Wang Y, Liu W, Bao J. Biological removal of inhibitors leads to the improved lipid production in the lipid fermentation of corn stover hydrolysate by *Trichosporon cutaneum*. *Bioresource Technology*, 2011, 102(20): 9705-9709.
- [62] Liu W, Wang Y, Yu Z, Bao J. Simultaneous saccharification and microbial lipid fermentation of corn stover by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. *Bioresource Technology*, 2012, 118: 13-18.
- [63] Zhang B, Khushik FA, Zhan B, Bao J. Transformation of lignocellulose to starch-like carbohydrates by organic acid-catalyzed pretreatment and biological detoxification. *Bioproducts and Biorefining*, 2021, 118(10): 4105-4118.
- [64] Jeffries TW, Jin YS. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. *Advances in Applied Microbiology*, 2000, (47): 221-268.
- [65] Krishna S, Reddy T, Chowdary G. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource Technology*, 2001, 77: 193-196.
- [66] Nikolaou E, Soufleros EH, Bouloumpasi E, Tzanetakis N. Selection of indigenous *saccharomyces cerevisiae* strains according to their oenological characteristics and vinification results. *Food Microbiology*, 2006, 23(2): 205-211.
- [67] López-Gómez J P, 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.
- [68] Brethauer S, Studer MH, Wyman CE. Application of a slurry feeder to 1 and 3 stage continuous simultaneous saccharification and fermentation of dilute acid pretreated corn stover. *Bioresource Technology*, 2014, 170: 470-476.
- [69] Brethauer S, Wyman CE. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Bioresource Technology*, 2010, 101(13): 4862-74.
- [70] Villadsen J. Innovative technology to meet the demands of the white biotechnology revolution of chemical production. *Chemical Engineering Science*, 2007, 62(24): 6957-6968.

- [71] Hu C. Reactor design and selection for effective continuous manufacturing of pharmaceuticals. *Journal of Flow Chemistry*, 2021, 11(3): 243-263.
- [72] Wang Y, Yin J, Chen GQ. Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. *Current Opinion in Biotechnology*, 2014, 30: 59-65.
- [73] Li T, Chen XB, Chen JC, Wu Q, Chen GQ. Open and continuous fermentation: products, conditions and bioprocess economy. *Journal of Biotechnology*, 2014, 9(12): 1503-1511.
- [74] Zhao B, Wang L, Ma C, Yang C, Xu P, Ma Y. Repeated open fermentative production of optically pure L-lactic acid using a thermophilic *Bacillus sp.* strain. *Bioresource Technology*, 2010, 101(16): 6494-6498.
- [75] Ouyang J, Ma R, Zheng Z, Cai C, Zhang M, Jiang T. Open fermentative production of L-lactic acid by *Bacillus sp.* strain NL01 using lignocellulosic hydrolyzates as low-cost raw material. *Bioresource Technology*, 2013, 135: 475-480.
- [76] Isalan M, Qin J, Zhao B, Wang X, Wang L, Yu B, Ma Y, Ma C, Tang H, Sun J, Xu P. Non-sterilized fermentative production of polymer-grade L-lactic acid by a newly isolated thermophilic strain *Bacillus sp.* 2-6. *PLoS ONE*, 2009, 4(2).
- [77] Yue HT, Ling C, Yang T, Chen XB, Chen YL, Deng HT, Wu Q, Chen JC, Chen GQ. A seawater-based open and continuous process for polyhydroxyalkanoates production by recombinant *Halomonas campaniensis* LS21 grown in mixed substrates. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(18).
- [78] Godoy A, Amorim HV, Lopes M L. Continuous and batch fermentation processes: Advantages and disadvantages of these processes in the Brazilian ethanol production. *ResearchGate*, 2008, 110(1311): 175-181.
- [79] Atlic A, Koller M, Scherzer D, Kutschera C, Grillo-Fernandes E, Horvat P, Chiellini E, Braunegg G. Continuous production of poly([R]-3-hydroxybutyrate) by *Cupriavidus necator* in a multistage bioreactor cascade. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2011, 91(2): 295-304.
- [80] Modenbach AA, Nokes SE. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings -A review. *Biomass and Bioenergy*, 2013, 56: 526-544.
- [81] Mukasekuru MR, Hu J, Zhao X, Sun FF, Pascal K, Ren H, Zhang J. Enhanced high-solids fed-batch enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse with accessory enzymes and additives at low cellulase loading. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2018, 6(10): 12787-12796.
- [82] Stenberg K, Bollok M, Reczey K, Galbe M, Zacchi G. Effect of substrate and

- cellulase concentration on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated softwood for ethanol production. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, 68: 205-210.
- [83] Söderström J, Galbe M, Zacchi G. Separate versus simultaneous saccharification and fermentation of two-step steam pretreated softwood for ethanol production. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 2007, 25(3): 187-202.
- [84] Wee YJ, Ryu HW. Lactic acid production by *Lactobacillus sp.* RKY2 in a cell-recycle continuous fermentation using lignocellulosic hydrolyzates as inexpensive raw materials. *Bioresource Technology*, 2009, 100(18): 4262-4270.
- [85] Zhang J, Chu D, Huang J, Yu Z, Dai G, 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.
- [86] Adney B, Baker J. Measurement of cellulase activities. *Laboratory Analytical Procedure*, 1996, 6: 1-8.
- [87] Ghose TK. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 1987.
- [88] 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): 248-254.
- [89] Ran H, Zhang J, Gao QQ, Lin ZL, Bao J. Analysis of biodegradation performance of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resinae* ZN1. *Biotechnology for Biofuels* 2014, 7.
- [90] Han XS, Bao J. General method to correct the fluctuation of acid based pretreatment efficiency of lignocellulose for highly efficient bioconversion. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2018, 6(3): 4212-4219.
- [91] Zhang J, Bao J. Lignocellulose Pretreatment Using Acid as Catalyst. *Handbook of Biorefinery Research and Technology*. 2018: 1-14.
- [92] 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. *Bioresource Technology*, 2015, 198: 803-810.
- [93] Hou WL, Bao J. Simultaneous saccharification and aerobic fermentation of high titer cellulosic citric acid by filamentous fungus *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 2018, 253: 72-78.
- [94] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Crocker D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. NREL/TP-510-42618. National Renewable

- Energy Laboratory, Golden CO. 2012.
- [95] 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. National Renewable Energy Laboratory, Golden CO. 2008.
- [96] Patel R, Dodia M, Singh SP. Extracellular alkaline protease from a newly isolated *haloalkaliphilic Bacillus sp.*: Production and optimization. *Process Biochemistry*, 2005, 40: 3569-3575.
- [97] Maas RH, Bakker RR, Jansen ML, Visser D, De Jong E, Eggink G, Weusthuis RA. Lactic acid production from lime-treated wheat straw by *Bacillus coagulans*: neutralization of acid by fed-batch addition of alkaline substrate. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2008, 78(5): 751-758.
- [98] Kulozik U, Wilde J. Rapid lactic acid production at high cell concentrations in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, 24: 297-302.

附录I 主要实验试剂

实验试剂	试剂规格	生产商
蛋白胨	BC	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
酵母提取物	BC	安琪酵母股份有限公司
琼脂	BC	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
葡萄糖	AR	上海泰坦科技股份有限公司
木糖	AR	上海泰坦科技股份有限公司
无水乙酸钠	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
柠檬酸氢二铵	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
硫酸氢二钾	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
七水硫酸镁	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
一水硫酸锰	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
氢氧化钙	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
硫酸	AR	上海凌峰化学试剂有限公司

附录 II 主要仪器设备

名称	型号	生产商
立式震荡培养箱	HZ-211KB	江苏华利达实验设备厂
隔水式恒温培养箱	GHP-9160	上海一恒科学仪器
生物反应器	BIOTECH-5L BIOTECH-3L	上海保兴生物设备工程有限公司
恒温水浴振荡器	HZ-92121S	江苏华利达实验设备厂
pH 电极	G301K	苏州汉星分析传感器有限公司
粉碎机	SF-300	上海科太粉碎设备厂
高效液相色谱	LC-20AT	日本岛津公司
紫外检测器	SPD-20A	日本岛津公司
示差检测器	RID-10A	日本岛津公司
蒸汽发生器	HX-36D-2.5	上海华征特种锅炉制造有限公司
预处理反应器	PCF20-1.6	烟台科立化工设备有限公司
超低温冰箱	Forma-86C	Thermo Scientific. LTD. ^[29]
超纯水制备仪	Milli-Q Synthesis	德国默克密理博公司
台式小型高速离心机	5415D	Eppendorf. LTD. (Germany)
立式震荡培养箱	HZ-2111KB	江苏华利达实验设备厂
电子天平	BS233S	瑞士梅特勒利多仪器有限公司

致谢

不知不觉又到说再见的时候，人生至此又告一段落。回想起硕士刚入学时，师兄跟我说这三年很快的，我当时不以为然，现在想想，也终究没有追上时间的脚步。

在浑浑噩噩中度过了本科的前两年，很幸运的是认识我现在的女朋友-曹康宁女士，在她“不考研究生我们就分手”的“威胁”下断了早点毕业打工赚钱的念想，重拾课本。在初试成绩公布后找导师的时候，深深被“生物炼制、航空燃油”等字眼深深吸引，果断给鲍老师发了邮件，仍然很幸运的是，到最后成了鲍老师的门生。我深知自己的自制力不强，在学术造诣上天赋欠缺，在此着重感谢鲍老师！没有你的鞭策和悉心教导，我是没有机会在这边写出这些话的。记得之前，鲍老师布置课后作业让我们深读文献，我当时选的是韩昀身师兄的一篇，对“种子液”这个名词不懂，还去问了师兄，现在想想真的羞愧难当。我本科学的是食品质量与安全，研究生选的是生物工程，这也算是跨专业了吧。在刚进实验室的时候，需要学的东西很多，我的逻辑性不是很高，说话有时候也是东扯一句西扯一句，写东西和汇报时也是一样，是鲍老师准确的指出我的问题，并给我提出解决的方法。在这里再一次向鲍老师提出感谢！记得鲍老师曾带我们这一届毕业生去校外研讨，吃饭期间我坐在鲍老师旁边，鲍老师也注意到我这个毛头小子面对众多大人物的紧张，他主动过来跟我聊天，那时真的感觉到未有的亲切感。在学术中，鲍老师始终坚持严格；在生活中，鲍老师又是那样亲切。这样的鲍老师值得我用一辈子去学习。

另外我还想感谢我的师兄-张斌博士，无论是生活上，还是学习上他都给予了我很大的帮助。在我面前，师兄总是一个充当榜样的角色，在实验室中，无论周围是多么嘈杂，师兄总能静下来，每天都能呆在实验实验到半夜才回去，这也是我佩服的一点，在鲍老师和师兄的身上我看到了作为科研人该有的样子。记得在刚来实验室的时候，师兄带着我熟悉实验室，给我讲下一步要干什么，然后带着我去找鲍老师进行实验探讨，记得研二有一段时间我的思想开了小差，是师兄主动找我谈话，及时把我拉到正轨。到后面的写专利和写论文，师兄还在百忙之中逐字逐句的帮我修改。到现在还没有正式向师兄表示感谢，在这里，我想说：“师兄，谢谢你，祝你前程似锦”。

另外，还需要感谢展宝睿师兄、吴雷在硕士三年对我的帮助。当然，还要感谢实验室的韩涛师兄、何妮玲师姐、张翼师兄、孙鲁欢师姐、华珂君师姐、贾佳师兄、王雅师姐、刘琪师姐、金慈师兄、颜钊师兄、李静、徐迎迎、陈明星、郭晓梦、任大宇、杨虎成、李治斌、研一的师弟师妹们的陪伴。未来加油各位。

最后要感谢的是我家人们。明天我将走出校园，走进社会，未来加油。

2022.4.1 于上海