

分类号: \_\_\_\_\_ 密级: \_\_\_\_\_

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

# 华东理工大学

## 工程硕士学位论文

木质纤维素生产高光学纯度 D-乳酸以及合成 D-丙交酯的研究

陈明星

指导教师姓名: 鲍杰 教授 生物工程学院

张建 副教授 生物工程学院

申请学位级别: 硕士 专业名称: 生物工程

论文定稿日期: 2022. 5. 12 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: 姓名、职称

评 阅 人: 姓名、职称

## 作 者 声 明

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

论文作者签名：

年 月 日

## 木质纤维素生产高手性纯度 D-乳酸以及合成 D-丙交酯的研究

### 摘要

D-乳酸是聚 D-乳酸 (PDLA) 合成的单体, 目前主要用淀粉类粮食作物为原料以微生物发酵的方式生产得到。以生物量大、来源广泛的木质纤维素为原料生产 D-乳酸以及合成 PDLA 的前体 D-丙交酯具有重要意义。木质纤维素生产 D-乳酸以及合成 D-丙交酯面临以下主要障碍: (1) 木质纤维素经过预处理后会释放大量抑制物, 不仅会对发酵菌株的生长和发酵性能产生不利影响, 还会对后期 D-乳酸的回收和纯度造成不利影响; (2) 木质纤维素经过预处理后, 释放的非葡萄糖 (木糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖) 占总单糖的 30-40%, 这些非葡萄糖不能完全被菌株消耗转化为高浓度的 D-乳酸, 残糖会影响 D-乳酸的得率和后期 D-乳酸的分离纯化。在乳酸发酵过程中, 发酵液的 pH 随着乳酸的积累而不断降低, 菌株的生长代谢受到抑制, 需要外源添加大量中和剂, 导致后期乳酸分离纯化产生大量高盐废弃物。

第一部分工作为木质纤维素干法生物炼制生产 D-乳酸及其纯化。木质纤维素生物质经过干酸预处理后, 用树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 进行生物脱毒, 呋喃类、有机酸和大部分酚醛抑制物被完全脱除, 残留少量酚类抑制物在后续的脱色步骤中被完全去除。使用 D-乳酸工程菌株乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* ZY15 在 30% (w/w) 固含量麦秆和高温 (50 °C) 条件下进行同步糖化与共发酵, 最终将葡萄糖和非葡萄糖单糖 (木糖、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖) 全部转化成高浓度 (128.1 g/L)、高手性度 (99.07%) 的 D-乳酸, 残糖量不超过 1.8 g/L。纤维素 D-乳酸发酵液经过固液分离、活性炭脱色、浓缩结晶、酸化、阳离子树脂吸附的常规分离纯化步骤后, 发酵液中残留的单糖、蛋白质、乙酸和总酚、 $Mg^{2+}$  被去除完全,  $Ca^{2+}$ 、 $K^{+}$ 、 $Na^{+}$ 、 $Cl^{-}$  的浓度降低至 2.2-3.6 mg/g D-乳酸, 获得了具备聚合水准的手性 D-乳酸。

第二部分工作为 D-丙交酯的合成及表征。以纤维素 D-乳酸为聚合单体, 使用常规辛酸亚锡催化剂, D-乳酸经过缩聚和解聚成功合成了 D-丙交酯。以淀粉来源 D-乳酸合成的 D-丙交酯为对照, 对纤维素 D-丙交酯进行了元素组成、熔点、相对分子质量、核磁共振氢谱、红外光谱、手性纯度等结构与性质方面的表征。结果表明, 纤维素 D-丙交酯的表征结果与淀粉 D-丙交酯一致且符合相关文献报道, 验证了以木质纤维素为原料生产高手性纯度的 D-乳酸以及合成聚 D-乳酸的重要前体 D-丙交酯具有可行性, 为今后木质纤维素生产聚 D-乳酸的工业化应用提供了可行性方案。

第三部分工作是采用了适应性进化方法来提高乳酸片球菌 *P. acidilactici* ZY271 的低 pH 耐受性和低 pH 条件下的发酵性能。将适应性进化后的菌株和出发菌株在合成培养基中进行发酵比较以及麦秆同步糖化共发酵, 当发酵 pH 值为 4.0 时, 进化菌株在合成培养基和麦秆 SSCF 的条件下 L-乳酸产量分别是 23.5 g/L、31.4 g/L, 相比于出发菌株分

别提升了 34.7%和 88.5%。为提高菌株在低 pH 条件下的耐受性和发酵性能提供了参考价值。

**关键词：**木质纤维素；D-乳酸；D-丙交酯；同步糖化共发酵；低 pH 的耐受性

## Study on the production of high chiral purity of D-lactic acid and synthesis of cyclic D-lactide from lignocellulose

### Abstract

D-lactic acid is the monomer to synthesize poly (D-lactic acid) (PDLA). At present, D-lactic acid is mainly produced by microbial fermentation using starch crops. It is of great significance to produce D-lactic acid and synthesize cyclic D-lactide as the precursor of PDLA using lignocellulose with great abundance and wide sources as feedstock. However, the major obstacles for D-lactic acid production and D-lactide synthesis from lignocellulose are as follows: (1) A considerable number of inhibitors released from the pretreatment of lignocellulose will not only inhibit the growth of fermentation strains and the fermentation efficiency of D-lactic acid, but also adversely affect the recovery and purity of D-lactic acid; (2) Non-glucose sugars (xylose, galactose, mannose, arabinose) released after the pretreatment of lignocellulose accounted for 30-40% of the total monosaccharides. These sugars can not be completely consumed by the strain into a high concentration of D-lactic acid, and the residual sugars will affect the yield of D-lactic acid and the later separation and purification of D-lactic acid. The pH of fermentation broth decreased with the accumulation of lactic acid during the fermentation process of lactic acid, and results in the inhibition to the growth and metabolism of the strain. The addition of a large number of neutralization agents was required to keep a suitable pH environment for the cell growth, which results in a large number of high-salt wastes in the late separation and purification processes of lactic acid.

The first part of this study is the production of D-lactic acid by lignocellulosic dry biological refining and its purification. A unique fungus *Amorphotheca resinae* ZN1 screened by our laboratory was applied for the biodegradation of the dry acid pretreated lignocellulosic biomass. The furan and organic acid inhibitors were completely removed and a small amount of residual phenolic inhibitors are completely removed in the subsequent decolorization step. Simultaneous saccharification and co-fermentation of wheat straw was carried out at 30% (w/w) solids loading and high temperature (50°C) by the engineered D-lactic acid producing strain *Pediococcus Acidilactici* ZY15. Finally, glucose and non-glucose monosaccharides (xylose, arabinose, mannose and galactose) were all converted into D-lactic acid with high concentration (128.1 g/L) and high chiral purity (99.07%), and the residual sugar content was less than 1.8g/L. Cellulosic D-lactic acid fermentation broth was conducted by the conventional separation and purification steps, including solid-liquid separation, secondary activated carbon decolorization, concentrated crystallization, acidification and adsorption of cation resin. The residual sugars, proteins, acetic acid and total phenols in the fermentation broth were completely removed.  $Mg^{2+}$  was completely removed and the concentration of  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$  and  $Cl^-$  was reduced to 2.2-3.6 mg/g D-lactic acid. Chiral D-lactic acid with polymerization level was obtained.

The second part of this study is the synthesis and characterization of D-lactide. The cellulosic D-lactic acid was a polymeric monomer, and D-lactide was successfully synthesized

by the polycondensation and depolymerization of cellulosic D-lactic acid with the conventional stannous octoate catalyst. The structure and properties of D-lactide from two sources were characterized by elemental composition, melting point, molecular weight, H-NMR, IR and chiral purity with D-lactide synthesized from starch-derived D-lactic acid as control. The results showed that the characterization of D-lactide from the two sources were consistent and in agreement with that in relevant literature reports. This study verified the feasibility of producing high chiral purity of D-lactic acid and synthesizing D-lactide as PLDA precursor using lignocellulosic biomass, and provides a feasible method for the industrial application of PDLA production using lignocellulose in the future.

In the third part of this study, adaptive evolution method was applied to improve the low pH tolerance and fermentation performance of *P. acidilactici* ZY271 under low pH condition. Lactic acid fermentation was carried out at pH 4.0 using synthetic medium and wheat straw feedstock by simultaneous saccharification and co-fermentation. The adaptively evolved strain produced 23.5 g/L and 31.4 g/L of L-lactic acid using the synthetic medium and wheat straw feedstock, respectively. The production of L-lactic acid increased by 34.7% and 88.5% compared with the starting strain. This study provides the reference value for improving the acid tolerance and fermentation performance of strains under low pH condition.

**Key words:** lignocellulose; D-lactic acid; D-lactide; Simultaneous saccharification and cofermentation; Low pH tolerance

## 目录

第 1 章 文献综述 .....	1
1.1 聚 D-乳酸 (PDLA) .....	1
1.2 D-乳酸的生产 .....	1
1.3 木制纤维素的生物炼制 .....	2
1.4 D-乳酸的分离纯化 .....	4
1.5 D-乳酸合成 D-丙交酯以及所面临的主要问题 .....	6
1.6 D-丙交酯的分离纯化 .....	7
1.7 D-丙交酯的检测 .....	8
1.8 本文的立题依据与主要研究内容 .....	9
第 2 章 纤维素 D-乳酸的生产、分离纯化 .....	11
2.1 引言 .....	11
2.2 材料与方法 .....	12
2.2.1 菌株、培养基与培养条件 .....	12
2.2.2 酶和试剂 .....	12
2.2.3 麦秆原料及炼制过程 .....	13
2.2.4 D-乳酸的同步糖化共发酵 .....	13
2.2.5 D-乳酸的分离纯化的方法 .....	14
2.3 结果与讨论 .....	15
2.3.1 麦秆物料脱毒前后的抑制物变化情况 .....	15
2.3.1 D-乳酸的 SSCF 发酵 .....	15
2.3.2 D-乳酸的分离纯化 .....	16
2.4 结论 .....	19
第 3 章 纤维素 D-丙交酯的合成及检测 .....	20
3.1 引言 .....	20
3.2 材料与方法 .....	20
3.2.1 D-丙交酯的合成及纯化的方法 .....	20
3.2.2 D-丙交酯的鉴定方法 .....	21
3.3 结果与讨论 .....	21
3.3.1 D-丙交酯的合成及纯化 .....	21
3.3.2 D-丙交酯的鉴定 .....	23
3.4 结果与讨论 .....	29

---

第 4 章 适应性进化方法提高乳酸片球菌 ZY271 在低 pH 条件下发酵性能	30
.....	30
4.1 引言 .....	30
4.2 材料与方法 .....	30
4.2.1 菌株适应性进行所用培养基和培养条件 .....	30
4.2.2 进化菌株和出发菌株发酵对比时所用培养基及培养条件 .....	31
4.2.3 发酵产物、pH 值、细胞活力以及碱用量的计算 .....	31
4.3 结果与讨论 .....	32
4.3.1 乳酸片球菌在进化体系中的情况 .....	32
4.3.2 进化菌株和出发菌株在不同发酵条件下的发酵对比 .....	33
4.4 本章小结 .....	37
第 5 章 结论与展望 .....	38
5.1 结论与创新点 .....	38
5.2 展望 .....	39
参考文献 .....	40
学术成果 .....	47
致谢 .....	48

## 第1章 文献综述

### 1.1 聚 D-乳酸 (PDLA)

随着社会经济的发展和人们绿色环保意识的加强<sup>[1]</sup>, 研究者研发了大量的绿色环保、生物可降解型的材料, 聚乳酸 (Polylactic acid, PLA) 是最典型的代表之一, 因为它是由小麦、玉米、木薯等可再生农业资源生产得到的, 并且可以很快被微生物降解。PLA 还具有一些非常好的特性, 如生物相容性、透明性, 广泛用于包装 (特别是食品包装) 和医疗领域 (药物运输、组织和骨工程)、农业与工程塑料等领域<sup>[2]</sup>, 它被称为绿色聚合物。PLA 合成的单体是乳酸, 乳酸根据构型的不同分为 L-乳酸和 D-乳酸, 常见的 PLA 有聚 D-乳酸 (PDLA) 和聚 L-乳酸 (PLLA) 两种。

聚 D-乳酸 (PDLA) 与 PLLA 一起经过溶液共混或熔融共混形成聚丙交酯立构复合物, 可以改善 PLA 的热稳定性差、机械强度弱的缺点<sup>[4]</sup>。共聚物的物理性质与 PDLA、PLLA 不同, 熔点大约高 50℃, 力学性能和热降解性等方面比 PDLA、PLLA 有所提高<sup>[5]</sup>。凡凡<sup>[6]</sup>等人提出压力诱导流动成型的方法来制备 PDLA 与 PLLA 共混物, 发现可以在 PLA 内部形成构筑层状片晶网络结构, 既提高 PLA 的耐热性能, 又显著提高材料的韧性; 聚 D-乳酸还可以与其它共聚单体形成具有优良性能的高分子材料, 李伟<sup>[7]</sup>等人发现以聚氧环丙烷(PPO)作为引发剂, 采用开环聚合的方式, 合成了三枝化聚环丙烷-聚乳酸(PPO-PDLA)共聚物, 是一种链序列结构可控、立构规整度高、分子量高达十几万的立构嵌段共聚物。

聚 D-乳酸是由两步法合成, 首先, D-乳酸在高温、低真空下缩聚形成低分子量的 PDLA, 其次, 在高温、高真空下解聚生成环状的 D-丙交酯; 最后, D-丙交酯开环聚合得到高分子量的 PDLA<sup>[8]</sup>。D-丙交酯是聚 D-乳酸的基本单位, 在聚乳酸的合成过程中, D-丙交酯和 L-丙交酯的组成含量直接决定最终合成的 PLA 产品的性能和应用<sup>[9]</sup>。通过控制 D-、L-丙交酯的比例及其沿聚合物主链立体顺序的分布, 可以获得具有不同性能的 PLA 材料, 立体顺序分布将直接影响最终得到的 PLA 产品的热阻隔、机械强度、光学和降解性能<sup>[10]</sup>。

### 1.2 D-乳酸的生产

D-乳酸是一种既含有羟基又含有羧基的有机酸化合物<sup>[11]</sup>, 可以通过化学合成法和生物发酵法得到。化学合成法得到的 D-乳酸同时含有大量 L-乳酸, 不利于后续聚乳酸的合成, 同时某一步反应依靠另一个过程副产物的产生, 从而影响产能和效率<sup>[12]</sup>。发酵法具有底物成本低、能耗低和乳酸手性纯度高的优点, 是现在生产 D-乳酸的主要方法<sup>[13]</sup>。而发酵法主要以玉米、小麦、大米等粮食类作物为原料, 每年 D-乳酸的需求都在急速增加, 这无疑对粮食安全产生了威胁。一部分研究者发现产酸微生物可以将木

质纤维素生物质原料厌氧转化为 D-乳酸<sup>[14]</sup>。最近的研究表明,纤维素来源的 D-乳酸与淀粉类来源的 D-乳酸在发酵浓度、产率、产量方面的差距有所减小<sup>[15]</sup>。

木质纤维素具有来源广泛、价格低廉、绿色环保等优势<sup>[16]</sup>,乳酸发酵菌株可以以玉米秸秆、小麦秸秆、稻草秸秆、竹子等木质纤维素为原料生产 D-乳酸<sup>[17]</sup>。木质纤维素来源的 D-乳酸可以替代淀粉类粮食作物来源的 D-乳酸缓解粮食产量有限的压力,当然也面临以下几方面的挑战:(1)因为这些木质纤维素具有自然形成的、坚硬的细胞壁等结构,所以需要进行前处理将其结构破坏,有利于增加后续酶的接触面积。一般可以通过高温、高压、强酸、强碱进行预处理<sup>[11]</sup>,高温、高压需要很高的能耗;强酸、强碱不仅增加成本,后续的废水污染环境<sup>[18]</sup>;(2)木质纤维素经过预处理后,会释放大量抑制物,包括呋喃醛、弱有机酸、酚醛等<sup>[19]</sup>。这些抑制物会通过影响菌株正常代谢的方式降低乳酸的得率,并且这些抑制物残留在发酵液中影响后续乳酸的分离纯化<sup>[20]</sup>;(3)经过预处理、糖化和酶解后,纤维素溶解为单糖和可溶性低聚物,木聚糖被降解为木糖<sup>[21]</sup>,还会产生其他少量可发酵性单糖(阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖),这些非葡萄糖占总可发酵型单糖的 30-40%<sup>[22]</sup>。很少乳酸发酵菌株可以代谢非葡萄糖,即使可以代谢,代谢速率很慢或者不能完全代谢,大量的残糖一方面影响乳酸的得率,同时会对后续乳酸的分离纯化造成很大的困难;(4)相对于传统淀粉类乳酸发酵液中乳酸分离纯化而言,木质纤维素乳酸发酵液中会含有更多的杂质(有机酸、无机盐、抑制物等)<sup>[23]</sup>。

为了破坏木质纤维素坚硬的结构以及避免能耗高和废水污染,本实验室自主研发了干酸预处理方法,此方法低能耗、零废水产生<sup>[24]</sup>;为了解决抑制物对乳酸发酵和纯化的影响,我们实验室成功筛选得到的脱毒菌株 *A. resinae* ZN1,它可以几乎完全代谢完抑制物而不消耗单糖;为了完全利用五种可发酵性单糖,选用实验室前期改造得到的乳酸片球菌 *P. acidilactici* ZY15 作为 D-乳酸发酵菌株,它可以同步消耗五种单糖,进行高浓度、高手性纯度的 D-乳酸发酵,发酵结束时,发酵液中含有很低浓度的残糖;为了更好的对 D-乳酸发酵液中的 D-乳酸进行回收,开发了一套 D-乳酸回收的常规流程(离心、活性炭脱色、浓缩结晶、酸化、阳离子树脂吸附)。

### 1.3 木质纤维素的生物炼制

玉米秸秆、小麦秸秆等木质纤维素原料需要经过生物炼制,才能转化为可发酵性单糖。木质纤维素是生物量非常广泛的生物资源,由 35%-50% (w/w) 的纤维素、20%-35% 的半纤维素和 10%-25% 的木质素组成<sup>[25]</sup>。纤维素是由 1, 4-糖苷键连接而成的葡萄糖为单体组成的有机化合物,在氢键和范德华力作用下,通过羟基连接的方式组成了微纤维紧密结构,从而构成植物坚硬的细胞壁<sup>[26]</sup>。半纤维素是由葡萄糖和戊糖组成的多糖,半纤维素中含量最多的单体就是木糖<sup>[27]</sup>。木质素是芳香族聚合物,没有明确的一级结构,一般由对香豆素醇、针叶树醇和辛酸醇组成<sup>[28]</sup>。木质纤维素是由单体和微纤维以氢键连接的方式组成,其中的半纤维素、不同糖组成的无规则聚合物以及

其他聚合物（果胶等）相互连接，木质素覆盖其中。这种特殊、复杂的结构使其对生物法和化学法处理产生较强的抗性<sup>[29]</sup>。木质素是一种结构复杂的分子，有苯基丙烷单体组成的三维结构，难以被生物降解，也是植物细胞壁中很难降解的成分，木质素含量越高，对酶解的抗性越强<sup>[30]</sup>。生物质的降解包括得到长链多糖，尤其是纤维素和半纤维素的释放，早期的生物研究中涉及的化学过程主要依靠酸处理，即使在最近几年研究中用到了碱处理和高温条件，其成本高、速度慢、效率低，而且一些预处理会产生大量抑制剂物(即糠醛和 5-羟甲基糠醛)，上述种种条件使木质纤维素到工业化应用遇到了瓶颈<sup>[31]</sup>。

预处理是破坏木质纤维素的结构和提高纤维素水解效率的关键环节，以确保来源广泛的木质纤维素释放出更多的糖供细菌生产所需的生物燃料和生化产品。预处理的主要作用：（1）减小物料粒径，增加表面积；（2）高温、高压条件破坏纤维素结构，增加分子间孔隙率。预处理包括物理、物理-化学、化学、生物等方法<sup>[32]</sup>，目前开发出来的预处理方法有粉碎，稀酸，蒸汽爆破，碱处理等<sup>[33]</sup>。粉碎和蒸汽爆破属于物理方法，它的优点是粉碎后物料颗粒均匀、大小可以控制，缺点是能耗高；碱处理属于化学方法，会产生大量废水；稀酸预处理是化学与物理相结合的方法，可以增加纤维素和半纤维素的溶解，在生物质细胞壁的酸解中，稀酸可以将半纤维素溶解为单糖和可溶性低聚物，木聚糖被降解为木糖<sup>[16]</sup>，木糖的增溶率表明酶可触及性得到提高，接触得更充分，所以糖化时间减短，增加仪器设备使用率，生产速率加快，成本降低。此过程会随着酸用量、反应温度、反应时间的不同而产生不同含量的抑制物<sup>[34]</sup>。本实验室自主研发的干酸预处理是通过巨烈的稀酸预处理过程来破坏木质纤维素的生物顽抗性，干酸预处理采用较高的固液比进行预处理操作，螺带搅拌桨可以让物料与酸液充分混合，可以在低的蒸汽压力下进行高强度的预处理过程，减少能耗，降低设备制造成本，增加设备的使用周期，更加安全<sup>[33]</sup>。预处理得到的物料呈现固态形式，可以进行高密度的运输，物料处于低 pH 值和高抑制物含量的状态，能够进行长期储存。

脱毒是木质纤维素在发酵前必须经过的一个重要环节。木质纤维素生物质原料经过预处理后，产生了一些影响后期菌株生长代谢的抑制物，主要包括呋喃(糠醛，5-羟甲基糠醛)、弱有机酸(乙酸、甲酸、乙酰丙酸)和酚类化合物<sup>[29]</sup>。这些抑制物不仅会影响后续糖化过程中纤维素酶的活性，还会影响菌株的生长，使其不能很好的将可发酵性单糖转化为 D-乳酸<sup>[35]</sup>。目前市面上常用的脱毒方法有：碱处理、水洗、活性炭吸附和生物脱毒<sup>[36]</sup>。碱处理主要通过沉淀作用将有害的物质进行去除，同时通过中和作用将一些酸性有害物质除掉，需要用到固液分离<sup>[37]</sup>；可以通过水洗的方式将物料中水溶性有害物质去除，但是一些不溶于水的有害物质不能除去，并且会造成大量废水的产生以及大量木糖的损失<sup>[38]</sup>；活性炭主要靠吸附作用将有害物质除去，同时需要用到固液分离操作，增加操作步骤和分离成本<sup>[39]</sup>；生物脱毒是目前最受欢迎的脱毒方式之一，主要利用微生物生长代谢作用降解预处理过程所产生的有害物质<sup>[40]</sup>。本实验室自主开发的生物脱毒是为了除去干酸预处理过程中所产生的各种抑制物，实验室筛选到的树

脂枝孢霉 *Amorphotheca resiniae* ZN1 在固态情况下可以将抑制物脱除。生物脱毒有以下优点：（1）脱毒过程避免产生任何废水，无固液分离操作；（2）脱毒终点可以人为控制，可以极大的保留预处理后木质纤维素所释放的木糖；（3）在通气条件下，脱毒时间可以从 72 h 缩短到 36 h，节约了时间成本，提高了设备利用率<sup>[41]</sup>。

酶解是为了更好的将木质纤维素转化为单糖供菌株消耗，原料经过干酸预处理后，半纤维素大部分转化为单糖，主要是木糖<sup>[42]</sup>。纤维素还是以聚合物形式存在，所以需要用到纤维素酶对其进行水解释放出其中的糖，纤维素酶是由多种水解酶组成的一个复杂酶系<sup>[43]</sup>，自然界中很多真菌都能分泌纤维素酶，习惯上将纤维素酶分成三类，c1 酶、cx 酶和  $\beta$  葡糖苷酶<sup>[44]</sup>。c1 酶是对纤维素最先起作用的酶，破坏纤维素链的结晶结构，cx 酶是作用于经 c1 酶活化的纤维素，是分解  $\beta$ -1, 4-糖苷键的纤维素酶， $\beta$  葡糖苷酶可以将纤维二糖、纤维三糖及其他低分子纤维糊精分解为葡萄糖<sup>[45]</sup>。

木质纤维素生物炼制过程中的糖化与发酵一般分为两种模式：一种是分步糖化共发酵<sup>[46]</sup>（Separate hydrolysis and fermentation, SHF），纤维素酶解和糖发酵在两个装置中完成，其特点是酶解和糖化可以在各自适宜的条件下进行，在酶解过程中，纤维二糖的积累会抑制内切与外切葡聚糖酶的活性，酶解反应速率会因为葡萄糖的积累而降低，导致酶解效率不高，影响后期乳酸的生产<sup>[47]</sup>；而另一种是同步糖化与共发酵（Simultaneous saccharification and fermentation, SSF）<sup>[48]</sup>，即纤维素酶解和己糖、戊糖发酵在同一个装置中完成，且用同一个菌株进行发酵。使用此工艺不仅节约设备投入成本、解除葡萄糖对纤维素酶的抑制作用，而且还可以提高乳酸发酵液中乳酸的浓度。

干法生物炼制技术是本实验室自主开发的木质纤维素生物炼制技术，包括干酸预处理、生物脱毒、同步糖化与共发酵。干酸预处理避免了传统预处理产生大量废水和大量碱用量，生物脱毒避免了大量木糖损失和固液分离步骤，同步糖化与共发酵提高了设备利用率和节省了时间成本<sup>[49]</sup>。螺旋带搅拌浆反应器实现了在高固体含量情况下的同步糖化共发酵，这些过程的有效结合有助于干法生物炼制技术的工业化应用。

#### 1.4 D-乳酸的分离纯化

木质纤维素经过干法生物炼制、菌株发酵后就可以得到 D-乳酸发酵液。预处理使纤维素结构破坏的同时也产生了一些有机物，发酵中通过添加氢氧化钙来中和不断积累的乳酸以解决溶液 pH 不断降低而影响菌株正常生长代谢的问题，所以发酵液中乳酸主要以乳酸钙的形式存在<sup>[50]</sup>，发酵前期加入了营养盐，导致了发酵结束后的发酵液中不仅含有高浓度的 D-乳酸，同时含有一些残糖、蛋白质、有机化合物、金属阳离子、阴离子等，所以需要设计一些流程操作才能从杂质丰富的发酵液中将 D-乳酸分离出来。

D-乳酸回收主要是实现以下功能<sup>[51]</sup>：（1）去除固体杂质，以细胞和原料残渣为主；（2）初级回收，将乳酸与主要杂质分离；（3）浓缩和纯化，通过加入酸进行酸化，再进行浓缩。从发酵液中分离纯化乳酸，可以采用以下技术：吸附法、结晶法、溶剂萃取法、离子交换、纳滤（NF）<sup>[52]</sup>。

固液分离主要是为了去除发酵液中的固体杂质，包括菌体蛋白、原料残渣和一些沉淀，为达到固液分离的目的而采用的主要操作方法有重力沉降、离心分离和过滤。实验室中通常采用离心的方法。

在工业中主要是利用活性炭进行吸附<sup>[53]</sup>，木质素纤维素发酵液含有蛋白质、残糖、各种金属离子、酚类化合物而呈现黑褐色。首先需要用活性炭将发酵液进行脱色处理，在活性炭吸附时，需要考虑发酵液中乳酸的浓度、吸附剂的种类、吸附剂的用量、吸附的时间、吸附的温度对吸附的影响<sup>[54]</sup>。吸附剂与吸附质在接触的初期，吸附反应很快，在吸附接近平衡时很慢，两个状态之间吸附速率几乎恒定，因为前期吸附剂含有大量吸附位点，在后期，吸附位点减少，液相和固相中的吸附质相互排斥的作用，剩余一部分位点很难结合吸附质<sup>[55]</sup>。当吸附质 L-乳酸初始浓度为 99.08 g/L 时，活性炭、IRA-67 离子交换树脂用量分别为 1 g 和 2 g 时，乳酸的最大吸附容量为 31.81%和 89.09%<sup>[56]</sup>。

结晶法也是化合物分离纯化的常用方法之一。结晶分为加热浓缩和冷却结晶：加热浓缩是通过加热的方式将溶液中溶剂蒸发留下溶质的方法，它适用于温度对溶解度影响不大的物质<sup>[57]</sup>；而冷却结晶的方法则适用于温度对溶解度影响大的物质。影响结晶的因素还有晶种的质量、结晶的时间、搅拌的速度、溶质的浓度等<sup>[58]</sup>。研究者发现初始乳酸浓度分别为 100 g/L、110 g/L、120 g/L、130g/L 时，其他条件一样的情况下，初始乳酸浓度为 120 g/L 时，结晶的质量最好，而且呈颗粒状，有利于后续分离；当初始乳酸浓度为 130g/L 时，形成的新晶体呈无定形，不利于后续分离纯化，所以结晶初始乳酸浓度控制在 120 g/L 左右最好<sup>[59]</sup>。

溶剂萃取法通过相似相溶的原理利用有机溶剂从乳酸发酵液中提取乳酸。从萃取相中分离精制乳酸时，一般选择不溶于水或微溶于水的试剂作为有机溶剂，长链叔胺不溶于水且具有较好的乳酸萃取能力<sup>[60]</sup>。在进行萃取操作时，需要考虑萃取剂配比、萃取温度、乳酸的浓度对萃取的影响<sup>[61]</sup>。有研究者提出萃取法和盐析法相结合的方法进行乳酸分离，研究发现磷酸盐和低级醇的组合可以起到很好的分离效果<sup>[62]</sup>。

离子交换技术广泛应用于生物分离。在乳酸分离过程中，常用的离子交换剂主要有弱酸性离子交换剂和弱碱性离子交换剂，当需要吸附乳酸溶液中金属阳离子时，可以使用弱酸性离子交换剂，溶液中金属离子可以置换弱酸性离子交换剂中的 H<sup>+</sup>而被吸附，常见的弱酸性离子交换剂有 Amberlite IRA-120；当需要吸附乳酸时，可以选用弱碱性离子交换剂，常见的弱碱性离子交换剂 Amberlite IRA-92 可以作为乳酸吸附的离子交换剂，因为与其他树脂的吸附结果相比，其乳酸纯度和回收率都很高<sup>[63]</sup>。

纳滤（NF）是一种新型的分离纯化方法<sup>[64]</sup>。在进行高固含量的乳酸发酵时，虽然减少了工艺体积和能源消耗，产生了高浓度的乳酸溶液，但是高浓度的乳酸对乳酸发酵菌株的活性有明显的抑制作用，从而降低了总的乳酸产量和转化率。为了提高系统的效率，研究者开发了多种生物反应器和分离策略<sup>[65]</sup>，以降低发酵液中乳酸的浓度，利用支持液膜进行实时酸分离系统、树脂交换系统。以上系统的不稳定性和过程不兼

容性使其应用受到了限制。有一些研究者开始研究了纳滤作为分离和回收乳酸的替代策略，与传统乳酸分离技术相比，纳滤膜（如 NF）是以压力驱动的，具有简单、高选择性（可以区分乳酸和糖）、高效等优点<sup>[66]</sup>。纳滤膜可以排斥多价离子和单糖等小分子，同时渗透单价离子。已经有研究发现可以在发酵前使用纳滤膜将木质纤维素水解液中醋酸和抑制物与糖分离，当 pH 为 3 时，醋酸和呋喃醛截留率很低，木糖和葡萄糖截留率高于 94%<sup>[67]</sup>。

### 1.5 D-乳酸合成 D-丙交酯以及所面临的主要问题

木质纤维素来源的 D-乳酸合成 D-丙交酯的主要的问题是 D-乳酸的纯度是否满足合成的要求<sup>[68]</sup>，因为木质纤维素 D-乳酸发酵液比传统淀粉类 D-乳酸发酵液含有更多的杂质（抑制物、有机酸、残糖、离子等），这就导致木质纤维素 D-乳酸的分离纯化面临更大困难，对 D-乳酸的纯度造成不利影响，从而影响 D-丙交酯的合成。在前面 1.2 中，已经提出了解决办法。

D-乳酸合成 PDLA 主要有两种方法<sup>[69]</sup>：(a) 一步法直接缩聚。利用一些溶剂对单体物质进行酯化，并使用渐变真空和高温去除游离的水，通过此方法得到良好机械性能的高分子量聚酯并不容易，因为乳酸的-OH 和-COOH 允许与杂质中合适的无机或有机多价添加剂交联<sup>[70]</sup>。(b) 两步法聚合。首先合成丙交酯，由丙交酯开环聚合得到聚乳酸。一般通过添加催化剂（如辛酸亚锡）与乳酸充分混合的方式在真空和高温条件下进行缩聚、解聚合成丙交酯。

D-丙交酯是生产高分子量聚 D-乳酸的重要中间体<sup>[71]</sup>，目前丙交酯的合成大部分采用两步法完成：首先，D-乳酸之间脱水缩聚，发生酯化反应形成低分子量的聚 D-乳酸，最后，低分子量的聚 D-乳酸解聚形成 D-丙交酯。在脱水时，需要考虑脱水温度、脱水时间、催化剂的用量对 D-丙交酯合成的影响，聚合阶段往往需要加入催化剂<sup>[72]</sup>，例如辛酸亚锡、异丙醇铝和异丙醇镧，因为丙交酯在这些溶剂中可以充分溶解有利于后续反应。丙交酯开环聚合的机理是配位插入机理（金属络合物）和活化单体机理（有机/阳离子引发剂）<sup>[73]</sup>。配位插入机理在制备高分子量聚乳酸的研究中得到了广泛关注<sup>[74]</sup>。金属基催化剂在丙交酯聚合中起着重要作用，有许多金属基催化剂（镁、锡、钛、锆和锌）在金属和氧原子之间具有共价键<sup>[70]</sup>。从乳酸到聚乳酸的整个过程如图 1.1。

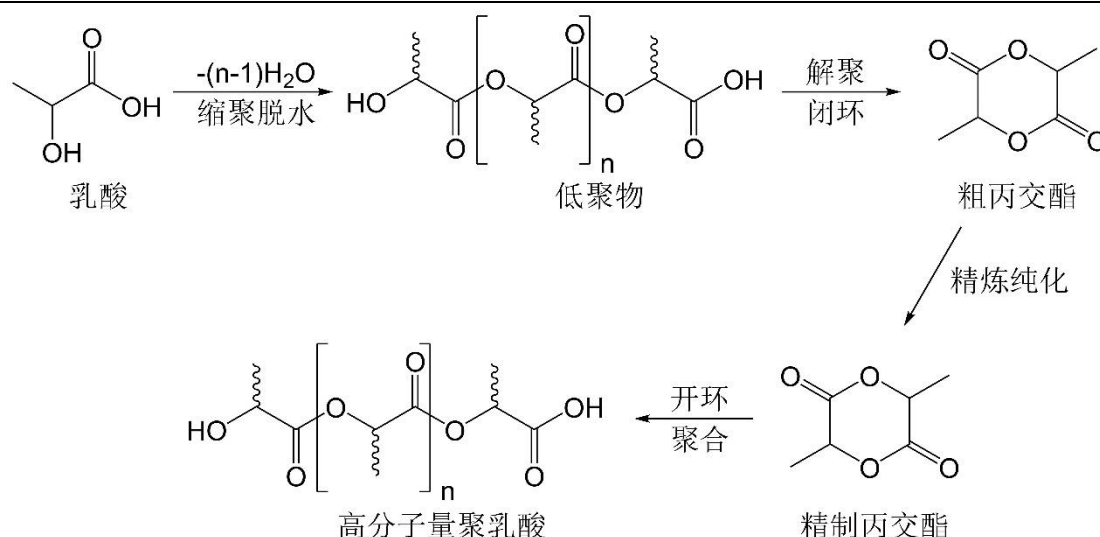


图 1.1 乳酸合成聚乳酸流程图

Figure 1.1 Flow chart of lactic acid synthesis of polylactic acid

崔国振<sup>[75]</sup>等人提出，乳酸的缩聚反应实际上是酯化反应。如果反应体系中含有大量自由水会影响酯化反应速率，水的沸点是 100 °C，乳酸的沸点是 122 °C，所以在常压时缩聚的温度一般选择在 100-122 °C 之间，这样既可以蒸馏出水分的同时，乳酸不会被蒸发，缩聚完成后，升温到 200-250 °C 低聚物进行解聚形成丙交酯；张子勇<sup>[76]</sup>等人提出，采用减压法合成丙交酯，缩聚反应的平衡常数很小，所以要及时排出反应生成的水分，一般是在 180 °C、真空度为 0.67 kPa-13.33 kPa 的条件下进行，不需要添加催化剂，所得的低聚物分子量在 500-2000 的范围内。解聚阶段需要添加氧化物、金属氧化物（氧化锡、氧化硼、辛酸亚锡、辛酸锡等），主要作用是降低反应温度，加速反应速率。

## 1.6 D-丙交酯的分离纯化

丙交酯的形成存在 200 °C 以上的解聚过程，丙交酯被蒸馏出来的同时，未参加反应的乳酸、低分子量的乳酸低聚物、前期合成中产生的水分也会有一部分被蒸馏出来<sup>[10]</sup>。丙交酯的纯度对开环聚合得到的聚乳酸分子质量有显著影响<sup>[77]</sup>，所以需要采取措施将粗丙交酯中的杂质进行去除。

目前丙交酯的纯化方法主要有无水乙醇和乙酸乙酯重结晶：靳文娟<sup>[78]</sup>等人提出，首先可以使用少量的超纯水冲洗粗丙交酯，按料液比 1: 2 (g:ml) 的比例加入重结晶溶剂（无水乙醇或乙酸乙酯），在 50 °C 的水浴摇床中加热使其完全溶解，然后放入 4 °C 冰箱静置 4 h 后得到纯化后的针状丙交酯。可以采用多次或者两种重结晶溶液交替进行重结晶来提高丙交酯的纯度；江昕<sup>[77]</sup>等人提出，用乙酸乙酯和甲苯反复对粗丙交酯进行结晶。随着结晶次数的增加，丙交酯的熔点越来越接近文献报道的值，结晶的次数为五次最合适，继续增加结晶次数，熔点没有变化，但是丙交酯得率明显降低，精制丙交酯经过真空干燥后，放入氯化钙干燥器中保存<sup>[79]</sup>。

本论文对木质纤维素 D-丙交酯所用的纯化方法是利用无水乙醇重结晶二次：按料液比 1: 2 (g:ml) 的比例加入无水乙醇，在 50 °C 的水浴锅中溶解，然后置于 4 °C 冰箱中结晶 4 h，重复上述操作一次。

### 1.7 D-丙交酯的检测

对 D-丙交酯进行鉴定时，一方面，需要对其含有的杂质进行测定，可以用甲醇钠非水滴定法对丙交酯中含有的乳酸成分进行测定<sup>[80]</sup>，其中的水分可以使用卡尔·费歇尔法测定，少量有机杂质可以通过气相色谱进行定量分析，粗丙交酯的质量减去水分、乳酸质量和有机物的质量即为丙交酯的质量。同时，还有一些研究人员采用间接光度法测定乳酸和丙交酯的含量<sup>[1]</sup>。另一方面，需要对其丙交酯本身以下几个方面进行检测，如手性纯度、熔点、<sup>1</sup>H NMR、分子量、元素组成、红外等。

手性纯度是决定丙交酯是否能够合成优良性能聚乳酸的关键因素之一，乳酸有 L、D 两种构型，两分子 L、D-乳酸可以合成三种构型丙交酯（D-丙交酯，L-丙交酯，内消旋丙交酯）。在 D-乳酸合成 D-丙交酯过程中，由于 D-乳酸中含有少量 L-乳酸，合成的丙交酯绝大部分是 D-丙交酯，同时会产生少量 L-丙交酯、内消旋丙交酯<sup>[81]</sup>。在计算丙交酯中 D-丙交酯、L-丙交酯、内消旋丙交酯的含量时，可以用到气相和液相联用，首先利用气相可以将内消旋丙交酯与 D 或 L-丙交酯分开测定，然后利用含有手性柱的液相色谱仪对 D-丙交酯和 L-丙交酯进行测定<sup>[2]</sup>；也可以利用旋光法来测定 D-丙交酯的含量；D-丙交酯的含量也可以通过水解后用 HPLC 进行定量测定，HPLC 的精确度明显高于其他方法<sup>[1]</sup>，其中含有的内消旋丙交酯可以用配备环糊精手性柱的毛细管气相色谱进行测定，L-交酯和 D-丙交酯也可以先经过水解成对应的手性乳酸，然后用配备手性柱的液相色谱进行测定。可以根据 GC 和 HPLC 数据计算 D-乳酸含量<sup>[82]</sup>，但是水解花费时间比较久，所以有一些研究者首先使用气相色谱测定内消旋丙交酯的含量，同时使用旋光法测定混合物和 L-丙交酯标品的比旋光度，D-丙交酯的含量可以通过丙交酯异构体混合物中的内消旋丙交酯的含量和样品、L-丙交酯标品的比旋光度来计算<sup>[70]</sup>。

熔点可以反应丙交酯的纯度，晶体的熔点低于标准值 96 °C 且熔程长则表明丙交酯纯度相对较低<sup>[78]</sup>。可以利用差示扫描量热仪测定丙交酯的熔点，最大吸热峰处所对应的熔点即为丙交酯的熔点，丙交酯的熔点一般在 94-98 °C 之间<sup>[15]</sup>。

<sup>1</sup>H NMR 是判断化合物中 H 原子种类最直接有效的方法。需要根据结果图中不同碳位置的 H 元素与此有机化合物的分子结构进行对比，不能通过核磁共振氢谱对 L-丙交酯（SS）和 D-丙交酯（RR）进行区分<sup>[83]</sup>，因为 L-丙交酯和 D-丙交酯的化学位移是相同的，可以得到有多少种与碳原子连接的氢以及根据峰面积得到它们的比例，但是不能对其定量分析<sup>[84]</sup>。

一般使用质谱仪测定化合物的相对分子质量，贾佳<sup>[15]</sup>等人提出利用 ESI-高分辨率飞行时间质谱仪对 L-丙交酯进行相对分子质量测定。

丙交酯中 C、H 元素含量理论值为 (C: 50%, H: 5.6%), 李藏<sup>[79]</sup>提出丙交酯在元素分析仪 (Elementar Vario EL) 上直接燃烧来测定 C 和 H 元素含量。

红外光谱分析可用于研究分子的结构和化学键, 也可以作为表征和鉴别化合物种类的方法。红外光谱具有高度特征性, 可以采用与标准化合物红外光谱对比的方法来做分析鉴定。李守君<sup>[85]</sup>等人提出, 丙交酯的红外谱图 (FTIR) 在 NaCl 盐片成膜后用 Bruker IFS66V 真空红外光谱仪测定。

## 1.8 本文的立题依据与主要研究内容

近几年, 随着经济社会的发展, 人们环保意识的提高以及与绿色发展相关政策的出台, 越来越多的可生物降解材料被研发生产, 聚 D-乳酸是其中之一。D-乳酸是聚 D-乳酸合成的单体, 市面上销售的 D-乳酸基本是微生物利用淀粉类粮食作物为原料进行发酵生产的, 这无疑对粮食产量增加了压力, 木质纤维素以其丰富性、低成本、可再生的特点成为最具有潜力的 D-乳酸生产原料, 但是木质纤维素生产 D-乳酸以及合成聚 D-乳酸重要前体 D-丙交酯面临以下技术难题: (1) 木质纤维素经过预处理后会产生大量抑制物, 对菌株的生长和后续乳酸的分离纯化产生不利影响; (2) 木质纤维素经过干酸预处理后产生了大量葡萄糖和非葡萄糖 (木糖、甘露糖、半乳糖、阿拉伯糖), 非葡萄糖占总发酵性单糖的 30-40%, 非葡萄糖很难或者不能完全被菌株代谢从而影响 D-乳酸的产量和后续分离纯化; (3) 与淀粉类发酵的 D-乳酸发酵液相比, 木质纤维素生产的 D-乳酸发酵液中含有更多的杂质 (有机酸、无机盐、抑制物等), 对 D-乳酸的分离和后续 D-丙交酯的合成造成非常不利的影

响。为了解决上述三大问题, 第一, 利用本实验室筛选得到专司脱毒的霉菌树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 进行生物脱毒, 可以将呋喃类抑制物和有机酸类抑制物完全脱除, 残留少量酚类抑制物; 第二, 选择对抑制物耐受性强、同步利用五种单糖 (葡萄糖、木糖、麦芽糖、半乳糖、阿拉伯糖) 乳酸片球菌 *P. acidilactici* ZY15 来生产高浓度的 D-乳酸; 第三, 设计了简单、高效的 D-乳酸分离纯化的方法从杂质丰富的发酵液中分离出 D-乳酸。

本论文还做了一部分工作, 采取了适应性进化方法来提高乳酸片球菌 *P. acidilactici* ZY271 的低 pH 耐受性和低 pH 条件下的发酵性能。因为乳酸发酵过程中需要使用大量的中和剂来中和发酵过程中所积累的乳酸以维持较高的发酵 pH, 乳酸以乳酸盐的形式存在于发酵液中, 一方面增加了后期乳酸分离纯化成本, 而且后期会产生大量的高盐废弃物, 所以通过适应性进化技术来提高乳酸发酵菌株的低 pH 耐受性和发酵性能有重要的意义。主要研究内容:

- (1) 开发以木质纤维素 (小麦秸秆) 为原料, 选择脱毒菌株 *A. resinae* ZN1 对经过预处理的木质纤维素进行生物脱毒, 可以将呋喃类抑制物和有机酸类抑制物完全脱除, 残留少量酚类抑制物, 利用可以同步代谢五种单糖的乳酸片球菌 *P. acidilactici* ZY15 作为 D-乳酸发酵菌株来生产高浓度、高手性纯度的 D-乳酸;

- (2) 因为木质纤维素为原料的 D-乳酸发酵液中会含有蛋白质、残糖、酚类化合物、有机酸、金属阳离子、阴离子等各种杂质，所以开发了离心、活性炭脱色、浓缩结晶、酸化、阳离子树脂吸附的操作流程来分离纯化 D-乳酸。
- (3) D-丙交酯是从 D-乳酸到 D-聚乳酸的合成过程中的重要中间体，将上述分离纯化的纤维素 D-乳酸合成 D-丙交酯，以淀粉 D-乳酸合成的 D-丙交酯为对照，对合成的两种来源 D-丙交酯分别进行元素组成、熔点、相对分子质量、核磁共振氢谱、红外光谱、手性纯度等结构与性质方面的表征。
- (4) 利用适应性进化方法提高乳酸片球菌 *P. acidilactici* ZY271 的 pH 耐受性和发酵性能。将乳酸片球菌 *P. acidilactici* ZY271 在合成培养基中进行长期适应性进化后，将进化菌株和出发菌株在合成培养基与木质纤维素物料培养基进行不同的 pH 条件下发酵来判断进化菌株在低 pH 的条件下发酵性能是否有所提高。

## 第2章 纤维素D-乳酸的生产、分离纯化

### 2.1 引言

聚 L-乳酸 (PLLA) 以其生物可加工、生物相容性、生物可降解性而得到广泛应用<sup>[86]</sup>。当然, PLLA 也有一些缺点, 如机械强度差、热稳定性差、结晶速度慢等缺点。越来越多的研究表明聚 D-乳酸 (PDLA) 可以改善 PLLA 这些缺点, 并且 PDLA 还可以和其他化合物聚合形成优良性能的高分子材料<sup>[87]</sup>。PDLA 合成的原料是 D-乳酸, 目前市面上销售的 D-乳酸主要是微生物以淀粉类粮食作物为原料发酵生产得到的, 这无疑对粮食安全构成威胁。木质纤维素具有生物来源广泛、价格低廉、绿色环保等优势, 所以开发以木质纤维素为原料生产 D-乳酸以及合成 PDLA 的重要中间体 D-丙交酯具有重要意义。

以木质纤维素为原料发酵生产 D-乳酸以及后续 D-乳酸的分离纯化面临以下困难:

(1) 木质纤维素经过预处理后会释放大量抑制物, 包括呋喃醛、弱有机酸、酚醛等。这些抑制物会通过影响菌株正常代谢的方式降低 D-乳酸的得率, 这些抑制物残留在发酵液中影响后续 D-乳酸的分离纯化、D-丙交酯的合成; (2) 木质纤维素经过预处理后, 释放的非葡萄糖 (木糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖) 占总单糖的 30-40%, 这些非葡萄糖不能完全被菌株转化为 D-乳酸, 不能得到高浓度的 D-乳酸, 最终发酵液中高浓度残糖会降低 D-乳酸的得率和影响后期 D-丙交酯的聚合; (3) 相对于传统淀粉类 D-乳酸发酵液而言, 木质纤维素生产的 D-乳酸发酵液中含有更多的杂质 (有机酸、无机盐、抑制物等), 后续乳酸分离纯化面临更大的挑战。

基于以上面临的问题, 本章选择脱毒菌株 *A. resinae* ZN1 对麦秆物料进行生物脱毒, 可以将呋喃类抑制物和有机酸类抑制物完全脱除, 会残留少量酚类抑制物; 选择了本实验室前期通过基因工程改造得到的 *P. acidilactici* ZY15 作为 D-乳酸发酵菌株, 可以同步代谢五种单糖并且全部消耗完, 得到高手性纯度、高浓度的 D-乳酸; 发酵液经过离心、活性炭脱色、浓缩结晶、酸化、阳离子树脂吸附步骤进行除杂后得到聚合级 D-乳酸。

本章成功在木质纤维素体系中通过乳酸发酵得到低残糖、高浓度、高手性纯度的 D-乳酸, 经过常规的离心、活性炭脱色、浓缩结晶、酸化、阴离子树脂吸附的分离纯化步骤后得到了聚合级的 D-乳酸, 为木质纤维素生产 D-乳酸提供了可行性方案。

## 2.2 材料与amp;方法

### 2.2.1 菌株、培养基与培养条件

本实验室成功筛选得到的脱毒菌株 *A. resinae* ZN1 保存在中国普通微生物菌种保藏中心 (CGMCC), 注册编号为 7452<sup>[88]</sup>。*A. resinae* ZN1 培养中马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (Potato dextrose agar, PDA) 中, PDA 培养基制备方法如下: 200 g 土豆去皮切碎后, 放入 1 L 去离子水中煮沸 30 min, 用纱布将其过滤后取上清, 将上清放入容量瓶中定容至 1 L, 加入 20 g 葡萄糖, 15 g 琼脂粉。培养条件: 脱毒种子的培养是在 37 °C 恒温箱中静止培养的, 脱毒时以 10% 的接种量加入到待脱毒的物料中, 37 °C 恒温箱中静止培养, 每 12 h 喷洒自来水使其保持湿润的状态。

本章使用的乳酸发酵菌株为 *P. acidilactici* ZY15<sup>[83]</sup>, 保存在 CGMCC, 编号为 13612。发酵种子培养基为 MRS 培养基: 20 g/L 葡萄糖, 10 g/L 蛋白胨, 10 g/L 酵母粉, 5 g/L 无水乙酸钠, 2 g/L 磷酸氢二钾, 2 g/L 柠檬酸氢二铵, 0.58 g/L 无水硫酸镁, 0.25 g/L 一水硫酸锰。培养条件为: 一级种子液放入恒温摇床中在 150 rpm、42 °C 的条件下培养 12h; 二级种子液放入恒温摇床中在 150 rpm、42 °C 的条件下培养 5 h。

首先将保存于 -80 °C 冰箱的菌株在 MRS 固体平板 (MRS 培养基中加入 20 g/L 琼脂粉) 上划线, 放入 30 °C 培养箱中静置培养 12 h 后, 挑取单菌落接种到添加 5 mL MRS 培养基的 10 mL 试管中, 在 30 °C 培养箱中静置培养 12 h 后, 以 10% (v/v) 接种量接种到含有 20 mL MRS 培养基的 100 mL 三角瓶中, 在 30 °C, 150 rpm 条件下培养 12 h 得到一级种子液, 以 10% (v/v) 接种量接种到含有 1% 糖化酶的、200 mL MRS 培养基的 500 mL 三角瓶中, 在 30 °C, 150 rpm 条件下培养 12 h 得到二级种子液。

实验中所涉及到的培养基, 枪头和三角瓶等均在高压灭菌锅中进行灭菌, 灭菌条件为 115 °C 高温下灭菌 20 min。

### 2.2.2 酶和试剂

商业化的纤维素酶购自诺维信中国 (Novozymes, China), 滤纸酶活为 205.6 FPU, 根据 Adney & Baker 的方法<sup>[89]</sup>测得; 纤维二糖酶活为 5144 CBU/mL, 根据 Ghose 的方法<sup>[90]</sup>测得; 蛋白质含量为 79.9 mg 蛋白/mL, 以牛血清白蛋白 BSA 绘制标准曲线, 根据 Bradford 的方法<sup>[91]</sup>测得纤维素酶的蛋白含量。

蛋白胨和酵母粉购自 Oxoid (UK)。葡萄糖、木糖购自探索平台 (上海)。Bradford 蛋白质定量试剂盒购自虫洞空间 (上海)。总酚 (tp) 试剂盒购自苏州格锐思生物科技有限公司。D-乳酸购自麦克林 (上海)。活性炭 200 目 (泰坦、上海)。阳离子交换树脂 Amberlite IRA-120(a strongly acidic resin in H<sup>+</sup> form) 购自 Sigma-Aldrich (US)。

利用高效液相色谱可对葡萄糖、木糖和乳酸以及抑制物进行分析, 使用的检测器为 RID-10A 示差检测器 (Shimadzu, Kyoto, Japan), 色谱柱为 Bio-rad Aminex HPX-87H (Bio-rad, Hercules, CA, USA), 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 为流动相, 柱温为 65 °C, 流动相

流速为 0.6 mL/min。针对于阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖，使用的检测器为 RID-10A 示差检测器 (Shimadzu, Kyoto, Japan)，色谱柱为 HPX-87P column (Bio-rad, Hercules, CA, USA)，灭菌后的超纯水作为流动相，柱温为 80 °C，流动相流速为 0.6 mL/min。

蛋白质含量测定是按照 Bradford (TIANGEN) 蛋白质定量试剂盒测定，总酚测定是根据总酚 (Total Phenols, TP, 苏州格锐思生物科技有限公司) 试剂盒测定。

阳离子交换树脂所用的层析柱规格 (直径 4 cm\*长度 40 cm)，树脂活化方法：流速 10 ml/min, 分别通入 1000 ml、10% (w/w) 的盐酸进行酸化、500 ml 的超纯水进行洗脱、500 ml、10% (w/w) 的氢氧化钠进行去除有机杂质、500 ml 的超纯水进行洗脱、1000 ml、10% (w/w) 的盐酸进行酸化、500 ml 的超纯水进行洗脱后备用，接收乳酸溶液的判断标准是层析柱的出口溶液 pH 为 3-4。

在 D-乳酸分离纯化前后，金属离子 ( $\text{Cl}^-$ 、 $\text{SO}_4^{2-}$ 、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ ) 是通过等离子发射光谱仪 (Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometer, 167 nm-785 nm/725, Agilent, USA) 检测的。

### 2.2.3 麦秆原料及炼制过程

实验中使用了 2020 年秋季河南南阳的小麦秸秆，小麦秸秆通过水洗除去土分，自然晾干至恒重，测得固体含量为 90% (w/w)，经过粉碎机 (SF-300) 粉碎，将得到的小麦秸秆粉末放在密封袋保存待使用<sup>[92]</sup>。

生物炼制过程包括预处理、调 pH 值、磨浆以及生物脱毒等过程<sup>[46]</sup>。玉米秸秆需要经过预处理的方式破坏木质纤维素生物质的顽固结构，才能释放出可发酵性的糖。同时会释放大量抑制物。预处理后的物料通过添加 20% (w/w)  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  调节 pH 至 5.0~5.5，磨浆后用于后续的脱毒过程<sup>[93]</sup>。

生物脱毒是利用专司脱毒的霉菌树脂枝孢霉 *A. resinae* ZN1 来消耗抑制物，*A. resinae* ZN1 可以将呋喃类抑制物和有机酸类抑制物完全脱除，但是会残留少量酚类抑制物<sup>[32]</sup>。在生物脱毒过程中，将培养好的 *A. resinae* ZN1 种子和物料以 1:10 (w/w) 的接种量接种到 15 L 脱毒罐中，脱毒罐中物料的装载量为 4~5 kg，预处理的物料以及种子加入后 50 rpm 搅拌 5 min，通气速率控制为 1 vvm，加热夹套控制温度在 28~30 °C，脱毒时间根据糠醛抑制物的完全脱除时间来确定。物料中抑制物的测定是通过称取 5 g 物料以及 45 g 去离子水置于 250 mL 三角瓶中，30 °C，200 rpm 浸提 2~2.5 h 后取样离心测定上清液中的抑制物含量。

### 2.2.4 D-乳酸的同步糖化共发酵

同步糖化共发酵 (Simultaneous saccharification and co-fermentation, SSCF) 是在 5 L 装有螺带搅拌桨的发酵罐中进行的。将经过预处理和生物脱毒的物料和超纯水以 30% (w/w) 的固体含量放入灭菌锅中，在 115 °C，20 分钟的条件下进行灭菌处理，然后将其放入发酵罐中，纤维素酶用量为 6 mg 酶蛋白/g 纤维素，在 50 °C，150 rpm 条件下预糖化 6 h 后，接入培养好的二级种子液以 10% (v/v) 接种量接入发酵罐中，用 25%

(w/w)  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  控制 pH 为 5.5, 温度为 42 °C, 转速设定为 150 rpm, 发酵 72 h, 发酵过程中测定糖的消耗以及 D-乳酸的产量。

发酵初期需要向发酵罐中额外添加营养盐: 10 g/L 蛋白胨, 15 g/L 酵母粉, 2 g/L 柠檬酸氢二铵, 0.25 g/L 一水硫酸锰

### 2.2.5 D-乳酸的分离纯化的方法

经过 SSCF 所得的乳酸是以乳酸钙的形式存在, 同时发酵液中含有少部分残糖、菌体蛋白、少量的有机酸、阴阳离子等杂质, 同时溶液呈现黑褐色, 所以需要将发酵液经过常规的固液分离、脱色、浓缩结晶、酸化、阴离子树脂吸附的分离纯化步骤后才能得到精制的 D-乳酸。

#### (1) 固液分离

将经过 72 h SSCF 后的 D-乳酸钙发酵液在 115 °C, 20 min 的条件下进行灭菌, 冷却至室温, 随后在超速离心机中 (10000 rpm, 10 min) 进行离心, 以去除木质素残渣和菌体, 得到 1800 mL 左右 D-乳酸钙发酵液上清。

#### (2) 脱色

将上述发酵液上清分装, 用量筒量取 300 mL D-乳酸钙发酵液于 500 mL 的三角瓶中, 添加 7% (W/V) 的活性炭, 套上两层保鲜膜, 用橡皮筋扎好, 在水浴摇床中以 60 °C、150 rpm 的条件下脱色 1.5 h, 然后使用布氏漏斗抽滤分离活性炭和 D-乳酸钙发酵液, 抽滤时用适量常温的超纯水进行滤饼的冲洗, 以回收残留在滤饼上的 D-乳酸钙, 使单个三角瓶的体系维持在 300 mL。得到的滤液继续添加 3% (W/V) 的活性炭, 在 60 °C、150 rpm、1.5 h 的条件下继续进行脱色 1.5 h, 操作同上。

#### (3) 结晶

利用旋转蒸发仪将已脱色的 D-乳酸钙发酵液在 80 °C 下进行浓缩, 将其乳酸浓度浓缩至 150-200 g/L<sup>[94]</sup>, 放入 500 mL 的烧杯中, 再置于 4 °C 冰箱进行乳酸钙的过夜结晶。500 mL 低温 (4 °C) 超纯水对得到的乳酸钙晶体进行淋洗和减压抽滤, 以去除乳酸钙晶体表面上的杂质, 得到较纯的乳酸钙固体结晶。取 1 g 上述乳酸钙固体溶解到 500 mL 的容量瓶中, 用液相色谱仪测定乳酸钙的含水量, 计算出乳酸钙的质量。

#### (4) 酸解

根据乳酸钙质量计算出需要加入的硫酸量, 向乳酸钙晶体加入同质量的超纯水后进行煮沸处理, 向溶解后的 D-乳酸钙溶液中加入 50% (W/W) 的浓硫酸, 充分搅匀后静止 4 h, 待硫酸钙沉淀完全析出后, 通过减压抽滤将上清分离出来, 用适量超纯水进行冲洗滤饼, 得到粗制的纤维素 D-乳酸 (~50 g/L)。

#### (5) 阳离子树脂吸附

将上述 D-乳酸溶液以 10 mL/min 的流速通过经活化后的阳离子交换树脂, 吸附纤维素 D-乳酸中的阳离子 ( $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Na}^{+}$ 等), 收集从层析柱流出的纤维素 D-乳酸溶液, 得到高纯度的、聚合级的纤维素 D-乳酸 (阳离子交换树脂活化方法如 2.1)。

## 2.3 结果与讨论

### 2.3.1 麦秆物料脱毒前后的抑制物变化情况

本章选用 *A. resinae* ZN1 来消耗抑制物。生物脱毒前，对麦秆物料进行了干酸预处理，释放了大量可发酵型单糖，也产生了一些抑制物（表 2.1），比如  $5.78 \pm 0.01$  mg 糠醛/g 干物料（Dry matter, DM）、 $3.52 \pm 0.01$  mg 5-羟甲基糠醛/g DM、 $23.00 \pm 1.01$  mg 乙酸/g DM、 $0.43 \pm 1.00$  mg p-羟基苯甲醛/g DM、 $3.30 \pm 0.01$  mg 丁香醛/g DM 以及  $3.29 \pm 0.01$  mg 香草醛/g DM。如果这些抑制物继续存在物料中，一方面，对发酵菌株的生长代谢产生阻碍作用，不利于可发酵性单糖转化为乳酸；另一方面，发酵液中残留的抑制物和残糖对后续乳酸的分离纯化造成不利影响。经过生物脱毒后，呋喃类抑制物以及有机弱酸类抑制物被完全脱除，只残留少部分酚类抑制物（丁香醛  $1.53 \pm 0.13$  mg /g DM、香草醛  $0.62 \pm 0.12$  mg /g DM）。这样，抑制物基本去除完全，可以上罐进行 D-乳酸发酵。

表 2.1 麦秆物料脱毒前后的抑制物变化情况  
Table 2.1 Changes of inhibitors before and after detoxification

成分	脱毒前 (mg/g 干物料)	脱毒后 (mg/g 干物料)
乙酸	$23.00 \pm 1.01$	ND
糠醛	$5.78 \pm 0.01$	ND
5-羟甲基糠醛	$3.52 \pm 0.01$	ND
p-羟基苯甲醛	$0.43 \pm 1.00$	$0.12 \pm 0.01$
丁香醛	$3.30 \pm 0.01$	$1.53 \pm 0.13$
香草醛	$3.29 \pm 0.01$	$0.62 \pm 0.12$

ND 表示未检测到。

### 2.3.1 D-乳酸的 SSCF 发酵

小麦秸秆原料经过干酸预处理和生物脱毒后，进行高固含量（30%）的 SSCF。如图 2.1 所示，本章用同步代谢五种可发酵性单糖的 *P. acidilactici* ZY15 作为发酵菌株在 5 L 螺旋式搅拌桨的发酵罐中进行同步糖化共发酵生产 D-乳酸。初始时溶液中葡萄糖 67.5 g/L、木糖 50.5 g/L、甘露糖 1.1 g/L、阿拉伯糖和半乳糖合计 8.1 g/L，随着发酵的进行，五种可发酵性单糖同时被消耗，D-乳酸不断积累，72 h 后，发酵液中 D-乳酸产量为 128.1 g/L，D-乳酸手性纯度为 99.07%，总残糖不超过 1.8 g/L（葡萄糖，~0.7 g/L；木糖，~0.6 g/L；阿拉伯糖+甘露糖，~0.2 g/L；半乳糖，~0.3 g/L），发酵液还含有 0.6 g/L 乙酸，0.6 g/L 总酚，大量的菌体蛋白，一些离子（Cl<sup>-</sup>， $32.6 \pm 2.3$  mg/g D-乳酸、Na<sup>+</sup>， $20.7 \pm 1.5$  mg/g D-乳酸、K<sup>+</sup>， $69.4 \pm 2.8$  mg/g D-乳酸、Mg<sup>2+</sup>， $5.7 \pm 0.3$  mg/g D-乳酸、Ca<sup>2+</sup>， $305.8 \pm 12$  mg/g D-乳酸、SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>， $87.8 \pm 3$  mg/g D-乳酸等），总体系为 2000 mL。

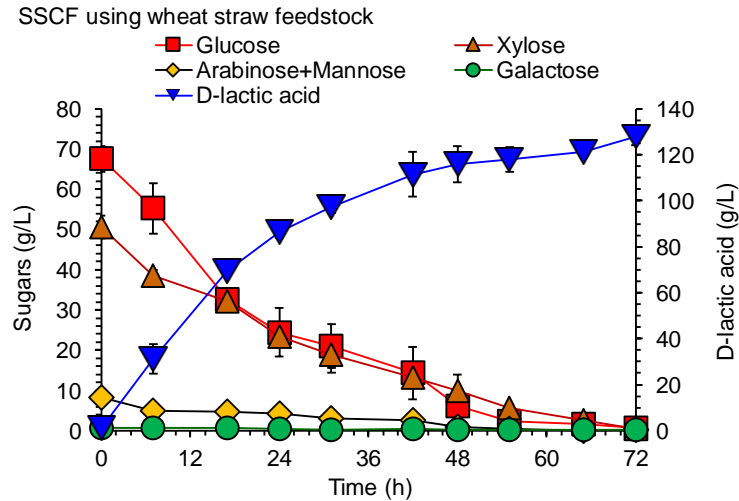


图 2.1 D-乳酸发酵

Figure 2.1 Fermentation of D-lactic acid

发酵条件：10%(V/V)的接种量，30% (W/W) 的固含量，150 rpm，42 °C，用 25% (w/w) 的  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  调节 pH 5.5，发酵 72 h。

生物脱毒后，物料中没有乙酸，而发酵结束后，发酵液中含有 0.6 g/L 乙酸，主要原因是 200 ml 的二级种子液中含有 5 g/L 乙酸钠以及发酵初期加入的无水乙酸钠；因为发酵液中含有酚类物质，所以发酵液的颜色呈黑褐色；发酵液中剩余少量残糖，主要原因是使用了同步糖化共发酵的发酵方式，糖化和发酵是同步进行，随着发酵的进行，木质纤维素还会产生单糖，同时发酵后期 D-乳酸发酵菌株的代谢生长能力会有所降低；发酵液中含有大量的  $\text{Ca}^{2+}$  主要因为在发酵过程中，随着 D-乳酸的积累，溶液的 pH 会不断降低，溶液中存在大量  $\text{H}^+$  会影响菌株代谢路径相关酶的活性，通过添加  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  使发酵液 pH 保持在 5.5，乳酸钙的溶解度在发酵温度 42 °C 条件下而很高； $\text{SO}_4^{2-}$  的来源主要是干酸预处理时添加了 4% 的硫酸。

### 2.3.2 D-乳酸的分离纯化

发酵液中不仅含有高浓度、高手性纯度的 D-乳酸，而且还含有残糖、乙酸、蛋白质、离子等杂质。为了最大程度上保留 D-乳酸的同时尽可能的除去杂质，所以需要对发酵液进行以下的分离纯化操作。如图 2.2 所示，本节将发酵液进行了离心、活性炭脱色、浓缩结晶、酸化、阳离子树脂吸附的常规分离纯化流程。

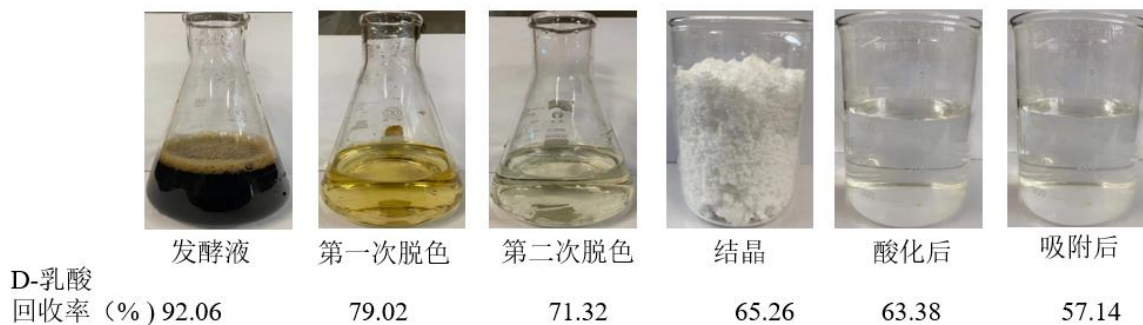


图 2.2 D-乳酸分离纯化过程

Figure 2.2 Separation and purification process of D-lactic acid

离心是为了去除发酵液中含有的大量木质纤维素小麦秸秆固体残渣、菌体蛋白等固体颗粒，得到上清备用，绝大多数菌体蛋白和固体残渣在底部形成沉淀。这一步 D-乳酸损失了 7.94%，一般工业生产至少需要使用 2-3 次去离子水对滤饼进行清洗。本节将 D-乳酸发酵液倒入离心瓶中进行离心，在 10000 rpm 的条件下离心瓶底部沉淀中还含有一部分液体，如果用去离子水冲洗滤饼回收 D-乳酸，滤饼中的杂质也可能被收集到 D-乳酸发酵液中，对后续 D-乳酸的纯度造成不利影响，所以底部固体沉淀直接舍去，没有洗涤，因此 D-乳酸得率较低。未来可以考虑使用滤床进行固液分离，然后使用去离子水进行冲洗滤饼来收集更多的 D-乳酸。

脱色是使用活性炭去除发酵液中酚类物质，酚类物质会使发酵液呈现黑褐色。如果先采取浓缩结晶，乳酸钙的晶体表面会含有大量杂质，而且很难冲洗干净，所以脱色需要在浓缩前完成。大部分研究者是利用 10% (W/V) 的活性炭对淀粉类乳酸发酵液进行一次脱色。本文在实际工作中发现采用 10% (W/V) 的活性炭对纤维素 D-乳酸发酵液进行一次脱色后，溶液呈浅黄色，并且后续很难得到颗粒状结晶，溶液呈稀饭一样的无规则晶体状态，可能原因是脱色时，D-乳酸浓度过高达到 130 g/L，活性炭吸附位点有限，乳酸钙晶体表面还含有大量杂质。考虑到尽量减少乳酸损失的同时得到较好的结晶，最终采用两步脱色法，先后采用 7% (W/V)、3% (W/V) 的活性炭进行脱色，最终溶液几乎呈透明，这一步主要去除酚类物质、少量残糖、少量乙酸。一般工业生产至少需要对活性炭滤饼进行 2-3 次的清洗。为了使脱色后的 D-乳酸溶液中杂质更少，本文仅使用常温超纯水对活性炭滤饼洗涤一次，并且超纯水的使用量较少，为总体系的 25%，本步骤中 D-乳酸损失 21.7%，未来可以考虑使用低温去离子水洗涤多次。

浓缩结晶是为了使上述脱色后的 D-乳酸发酵液中 D-乳酸浓度在 150-200 g/L 的范围内。浓度过低，则后面乳酸钙结晶不充分，乳酸钙损失较多；浓度过高，结晶时晶体呈稀饭状态，很难进行洗晶操作，乳酸钙表面会残留大量杂质，影响 D-乳酸的纯度。浓缩完毕后过夜结晶，对得到的乳酸钙晶体进行淋洗和减压抽滤，以去除乳酸钙晶体表面上的杂质，得到纯净的乳酸钙固体结晶，这一步去除大量的残糖和有机酸、一部分离子，D-乳酸在这一步操作中损失了 6.06%。一般工业生产需要反复循环使用乳酸钙结晶母液。在实际工作中，本文对乳酸钙结晶母液进行浓缩结晶时，随着浓缩的进行，母液中杂质浓度也增加，然而几乎没有新的乳酸钙结晶析出，可能原因是结晶母液杂质过多。未来可以对结晶母液先脱色再结晶，增加乳酸钙得率。

酸化是使用硫酸进行置换反应得到乳酸，这一步操作 D-乳酸损失 1.88%，主要原因是硫酸钙滤饼中含有了乳酸以及中和反应不能完全进行，操作后溶液中  $\text{SO}_4^{2-}$  浓度会增加，因为中和反应添加的硫酸量是根据乳酸钙的量计算得到的，溶液原本就含有预处理添加的硫酸，导致上一步乳酸钙晶体中也含有一部分硫酸钙晶体，加上酸化后硫酸钙溶解度的原因。溶液中残留的大量的  $\text{SO}_4^{2-}$  不会被后续阳离子树脂吸附，一直残留在最终纯化后的 D-乳酸中，导致最终 D-乳酸溶液含有大量  $\text{SO}_4^{2-}$ 。在后续 D-乳酸聚合

反应中，特别是 230 °C 高温的解聚阶段， $\text{SO}_4^{2-}$ 形成的二氧化硫气体会使得反应釜产生大量黑色泡沫，导致丙交酯合成的失败。以后在酸化时，可以考虑适量少加入硫酸的量。

阳离子树脂吸附是为了去除酸化后的乳酸发酵液中阳离子。乳酸发酵液中含有各种阴、阳离子，考虑到乳酸根带负电荷，减少乳酸的损失，所以采用阳离子树脂对乳酸溶液中阳离子进行吸附从而达到除去的目的，D-乳酸溶液经过阳离子树脂吸附后，溶液中阳离子基本去除，最后纯化所得 D-乳酸溶液中离子杂质主要有  $\text{Cl}^-$  和  $\text{SO}_4^{2-}$ 。

同时，对分离纯化前后的 D-乳酸发酵液中的杂质进行了相关检测(表 2.2)，D-乳酸发酵液经过分离纯化后，残留的单糖被去除干净（由初始  $43.2\pm 6.5$  mg/g 乳酸降低至 0 mg/g 乳酸），蛋白质、乙酸和总酚被去除完全（由初始  $56.7\pm 4.0$ ,  $9.4\pm 2.2$  和  $6.2\pm 0.5$  mg/g 乳酸降至 0, 0, 0 mg/g 乳酸）。在 D-乳酸钙发酵液中， $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{K}^+$  初始浓度较高，分别为  $305.8\pm 12$  mg/g 和  $69.4\pm 2.8$  mg/g，经纯化后，浓度分别降低至  $3.6\pm 0.2$  mg/g,  $3.0\pm 0.3$  mg/g。 $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  由初始的  $20.7\pm 1.5$ ,  $32.6\pm 2.3$  mg/g 降至  $2.2\pm 0.2$ ,  $2.8\pm 0.3$  mg/g。 $\text{Mg}^{2+}$  离子初始浓度较低（ $5.7\pm 0.3$  mg/g），经纯化后被完全去除。纤维素 D-乳酸发酵液经过常规的纯化步骤后，残留的杂质（残糖，蛋白质，总酚，离子）被有效去除。

表 2.2 D-乳酸发酵液纯化前后主要杂质比较

Table 2.2 Comparison of main impurities in D-lactic acid fermentation broth before and after purification

成分	纯化前 (mg/g D-乳酸)	纯化后 (mg/g D-乳酸)
单糖	$43.2\pm 6.5$	ND
乙酸	$9.4\pm 2.2$	ND
蛋白质	$56.7\pm 4.0$	ND
总酚	$6.2\pm 0.5$	ND
$\text{Cl}^-$	$32.6\pm 2.3$	$2.8\pm 0.3$
$\text{Na}^+$	$20.7\pm 1.5$	$2.2\pm 0.2$
$\text{K}^+$	$69.4\pm 2.8$	$3.0\pm 0.3$
$\text{Mg}^{2+}$	$5.7\pm 0.3$	ND
$\text{Ca}^{2+}$	$305.8\pm 12$	$3.6\pm 0.2$
$\text{SO}_4^{2-}$	$87.8\pm 3$	$187.8\pm 6$

ND 表示未检测到。

黑褐色的纤维素 D-乳酸发酵液经过常规的离心、活性炭脱色、浓缩结晶、酸化和阳离子树脂吸附纯化步骤后，残糖、蛋白质、总酚、乙酸、 $\text{Mg}^{2+}$  去除干净， $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  含量很低，纯化后的纤维素 D-乳酸具备合成 D-丙交酯的潜力。

## 2.4 结论

与传统的淀粉类粮食作物生产 D-乳酸不同的是，本章利用 *P. acidilactici* ZY15 将来源广泛、生物量大、绿色可再生的玉米秸秆发酵成高浓度、高手性纯度的 D-乳酸，主要结论如下：

(1) 麦秆纤维素经过干法稀酸预处理（零废弃物、零废水产生）和 *A. resinae* ZN1 生物脱毒后，物料中呋喃类抑制物和有机酸类抑制物完全脱除，残留少量酚类抑制物。在 5L 发酵罐中进行 30%固含量的麦秆同步糖化与共发酵，*P. acidilactici* ZY15 将五种单糖（葡萄糖、木糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖）同步代谢完后，得到 1800 ml、D-乳酸浓度为 128.1 g/L 的发酵液，其中 D-乳酸手性纯度为 99.07%，总残糖不超过 1.8 g/L（葡萄糖，~0.7 g/L；木糖，~0.6 g/L；阿拉伯糖+甘露糖，~0.2 g/L；半乳糖，~0.3 g/L）。

(2) D-乳酸发酵液经过常规的固液分离、活性炭脱色、浓缩结晶、酸化、阳离子树脂吸附的纯化流程后，葡萄糖、木糖、乙酸、蛋白质、总酚去除完全，金属离子残留非常少，纯化前发酵液中 D-乳酸手性纯度为 99.07%，纯化后得到高手性纯度（99.54%）、1800 ml、73.23 g/L 的 D-乳酸溶液，D-乳酸的得率为 57.14%，满足 D-乳酸应用和合成 D-丙交酯的要求。为木质纤维素生产 D-乳酸以及 D-乳酸的分离纯化提供了参考方案。

## 第 3 章 纤维素 D-丙交酯的合成及检测

### 3.1 引言

聚 D-乳酸 (PDLA) 一般是采用两步法合成, 首先, D-乳酸合成 D-丙交酯, 然后, D-丙交酯开环聚合合成 PDLA。淀粉类来源的 D-乳酸和纤维素来源的 D-乳酸合成 D-丙交酯会面临 D-乳酸手性纯度不高的问题: 不同的 D-乳酸发酵菌株在生产 D-乳酸的时候, 会产生不同含量的 L-乳酸, D-乳酸发酵液经过分离纯化后, 得到的 D-乳酸中会含有 L-乳酸, 合成的 D-丙交酯中还含有少量 L-丙交酯和内消旋丙交酯, 这就会影响 D-丙交酯的手性纯度, 从而导致聚合反应的成败和影响 D-丙交酯的质量; 另外, 与传统淀粉类粮食作物来源的 D-乳酸发酵液相比, 木质纤维素来源的 D-乳酸发酵液会含有更多的杂质 (有机酸、酚类、离子等), 这不仅对 D-乳酸分离纯化产生不利影响, 而且不利于后续 D-乳酸合成 D-丙交酯。

为了解决 D-乳酸手性纯度不高的问题, 利用实验室前期通过基因工程改造得到的 *P. acidilactici* ZY15 作为 D-乳酸发酵菌株, 最终得到的 D-乳酸手性纯度为 99.07%; 为了避免 D-乳酸所含杂质对 D-丙交酯合成的影响, D-乳酸发酵液经过常规的分离纯化步骤后, 葡萄糖、木糖、乙酸、蛋白质、总酚去除完全, 金属离子残留非常少。

本章主要工作是将纯化所得木质纤维素来源的 D-乳酸和市面上购买的淀粉类粮食作物来源的 D-乳酸在相同条件下进行聚合得到 D-丙交酯, 并将这两种来源的 D-丙交酯进行手性纯度、熔点、相对分子质量、 $^1\text{H NMR}$ 、元素含量的表征, 来判断木质纤维素来源的 D-乳酸是否拥有像淀粉类粮食作物来源的 D-乳酸合成 D-丙交酯的能力并鉴定纤维素 D-丙交酯的质量是否满足工业中聚 D-乳酸合成相关的要求。

表征结果显示, 木质纤维素来源的 D-丙交酯和淀粉类粮食作物来源的 D-丙交酯在手性纯度、熔点、相对分子质量、 $^1\text{H NMR}$ 、元素含量方面的结果一致且符合相关文献报道, 为今后木质纤维素生产的 D-乳酸以及合成 D-丙交酯的工业化应用提供了参考价值。

### 3.2 材料与方法

#### 3.2.1 D-丙交酯的合成及纯化方法

首先, 将 2.3 节纯化所得 D-乳酸溶液在旋转蒸发仪中进行浓缩, 旋转蒸发仪的水浴锅温度为  $70\text{ }^\circ\text{C}$ 、压力为  $0.1\text{ Mpa}$ 。乳酸溶液中 D-乳酸浓度浓缩到  $700\text{--}800\text{ g/L}$  左右, 溶液呈油滴状态, 蒸出口无明显水蒸气为止。

采用两步法合成 D-丙交酯: (1) 乳酸缩聚得到低分子量的聚 D-乳酸; (2) 低分子量的聚 D-乳酸解聚得到 D-乳酸的二聚体 D-丙交酯。脱水: 量取  $50\text{ ml}$  的上述乳酸溶液 (大约  $40\text{ g}$  的 D-乳酸) 于  $250\text{ ml}$  的三口圆底烧瓶中, 减压至  $0.01\text{ Mpa}$  后, 逐步加热升温脱水, 蒸馏出乳酸溶液中含有的少量水分和乳酸分子间脱水所形成的水分, 在反应初期,  $30\text{ min}$  中内快速升温到  $80\text{ }^\circ\text{C}$  并保持恒温, 直到出口处无明显水滴生成为止。缩

聚：恢复常压，向烧瓶中加入 1% (W/W) 的辛酸亚锡催化剂，并将乳酸和催化剂混合均匀，随后，反应温度缓慢升到 140℃ 并且保持恒温，继续脱水 1.5 h，使溶液中残余的水分完全被蒸发，直到馏出口几乎没有液体流出，缩聚结束。解聚：换另一个接收瓶，迅速升温到 230-240℃ 并且保持恒温，在反应期间，同时压力慢慢加到真空度为 0.098 Mpa，冷凝管和接收瓶中会有黄色固体产生，此为粗制 D-丙交酯。另外，在脱水和缩聚过程中，向冷凝管中通入常温的自来水，在解聚过程中，需要关闭冷凝管中的循环水。

粗 D-丙交酯的纯化：将粗 D-丙交酯放入烧杯中，加入无水乙醇，在 50℃ 的水浴锅中进行加热溶解，放入 4℃ 冰箱中进行过夜重结晶。用布什漏斗进行抽滤，因为晶体在滤纸上有空隙，无法得到高真空，可以使用一次性垃圾袋罩住布什漏斗，这样精制的 D-丙交酯含有更少的无水乙醇，随后放入超净台中进行晾干即可。

### 3.2.2 D-丙交酯的鉴定方法

D-丙交酯的手性纯度通过以下条件测定：

使用 Shimadzu Prominence LC-20A (Shimadzu corporation) (岛津公司、日本)，紫外检测器为 SPD-20A UV detector，手性色谱柱为 Superchiral S-IG (勤路生物、上海)，色谱柱尺寸为 0.46 cm I.D. \* 15 cm Length，填料粒径为 5 μm，柱温为 40℃，流动相为 Hexane /EtOH/TFA = 90/10/0.05 (v/v/v)，即 正己烷/乙醇/三氟乙酸 = 90/10/0.05 (v/v/v)，检测波长为 220 nm，流速为 0.9 ml/min。

手性纯度(ee 值)计算公式：

D-型的手性纯度 = (D 的峰面积 - L 的峰面积) / (D 的峰面积 + L 的峰面积) \* 100%。

D-丙交酯的红外吸收光谱是由红外光谱仪 (7800~350/cm 0.01/cm/6700, USA) 进行测定，对其官能团和结构进行表征。

D-丙交酯的核磁共振氢谱是通过核磁共振仪 (Ascend 600, China) 来测定 D-丙交酯的空间结构和构型的分析 (以氘代氯仿为溶剂，共振频率 600 Hz，扫描次数 64 次)。

D-丙交酯的相对分子质量是通过 ESI-高分辨飞行时间质谱仪 (Xevo G2 TOF MS, Waters, USA) 来测定。

D-丙交酯的熔点是通过差示扫描量热仪 (DSC 8500, China) 来测定。

D-丙交酯的元素含量是通过元素分析仪 (VARIO EL CUBE, ELEMENTAR, Germany) 来测定。

## 3.3 结果与讨论

### 3.3.1 D-丙交酯的合成及纯化

木质纤维素来源的 D-乳酸进行两步聚合反应得到粗 D-丙交酯，如图 3.1，在反应前期 D-乳酸分子间脱水发生酯化反应，接受口不断有水滴产生，在反应后期，即低分子量的聚 D-乳酸解聚时，即使关闭冷凝管中的循环水，反应釜中的高温热蒸汽也会在冷凝管口积累大量粗 D-丙交酯 (图 3.1 (b))，此时粗丙交酯呈块状、微黄色，因为 D-

乳酸的聚合存在高温解聚过程，D-丙交酯的蒸汽中会夹带一些杂质，如未反应的 D-乳酸、缩聚过程中产生的自由水、聚 D-乳酸的低聚物，所以得到的粗 D-丙交酯会含有杂质。

将上述粗 D-丙交酯放入烧杯中，加入无水乙醇溶解并过夜结晶（图 3.1 (c)），重复结晶一次，得到的晶体即为精制的 D-丙交酯（如图 3.1 (d)），与此同时，将市面上购买的、淀粉类粮食作物来源的 D-乳酸在相同条件下聚合、纯化，得到了淀粉类粮食作物来源的 D-丙交酯。由于 D-丙交酯容易吸潮，需要将得到的精制 D-丙交酯放在超净台中，打开风机使空气加速流通，D-丙交酯中含有的无水乙醇更好的挥发干净，2 h 后（如图 3.2），装好放入干燥皿进行保存。木质纤维素来源的 D-丙交酯经过两次重结晶后得率为 11.2%，淀粉类粮食作物来源的 D-丙交酯经过两次重结晶后得率为 12.5%。

D-丙交酯得率偏低的主要原因聚合设备较为简单，不适合作为定量合成。如丙交酯蒸发后在冷凝管口和管壁大量积累，管口基本堵住，到达收集瓶进行称量计算的丙交酯仅占很小的比例。本实验的目的是为了验证纤维素 D-乳酸作为单体合成 D-丙交酯的可行性，定量的考虑很少，下一步工作需要使用更合适的聚合反应设备和收集设备，已获得较高的 D-丙交酯得率。另外，随着结晶次数增加，丙交酯中含有的杂质会更少，同时损失的丙交酯更多。

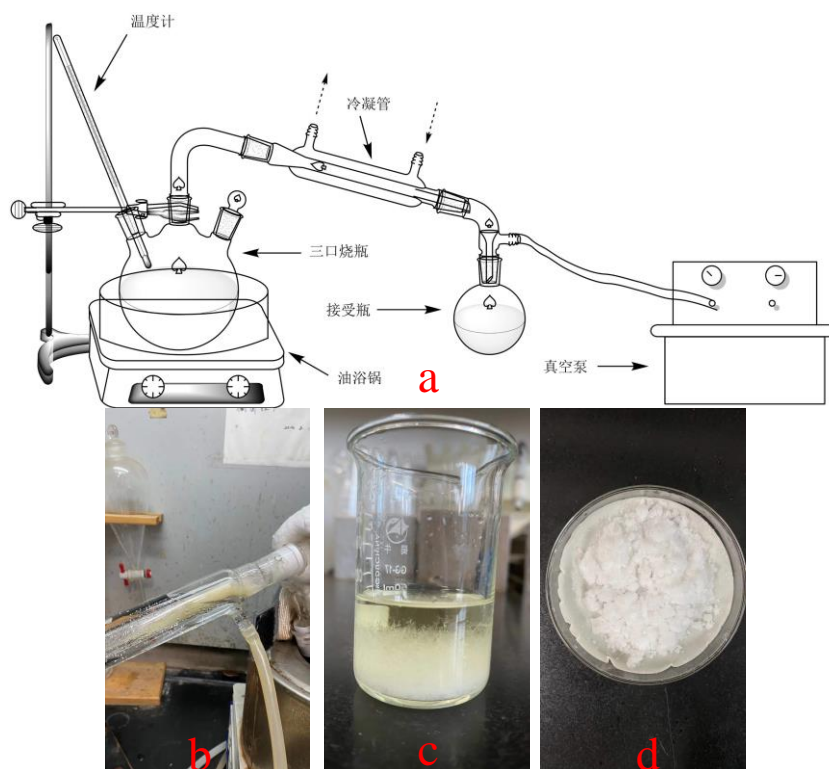


图 3.1 木制纤维素 D-乳酸合成 D-丙交酯 (a) 实验装置图, (b) 粗 D-丙交酯, (c) 粗 D-丙交酯在乙醇中重结晶, (d) 纯化后的 D-丙交酯

Figure 3.1 Synthesis of D-lactide from cellulosic D-lactic acid (a) Experimental device diagram, (b) crude D-lactide, (c) crude D-lactide recrystallized in ethanol, (d) purified D-lactide



图 3.2 分离纯化后精制的 D-丙交酯 (a) 淀粉类粮食作物来源的 D-丙交酯, (b) 木质纤维素来源的 D-丙交酯

Figure 3.2 Purified D-lactide after separation and purification (a) D-lactide from starch crops, (b) D-lactide from lignocellulosic

### 3.3.2 D-丙交酯的鉴定

为了判断上述纤维素来源的 D-丙交酯是否具有应用价值, 将纤维素来源的 D-丙交酯和淀粉类粮食作物来源的 D-丙交酯分别进行了手性纯度、熔点、相对分子质量、 $^1\text{H}$  NMR、元素含量的表征。

前期得到的木质纤维素来源的 D-乳酸中含有 0.46% 的 L-乳酸, 所以后期得到的 D-丙交酯中理论上会含有少量的 L-丙交酯, 为了测试此检测条件下的手性色谱柱是否对这两种丙交酯具有分离的功能, 首先将等量的淀粉类粮食作物来源的 L-丙交酯和淀粉类粮食作物来源的 D-丙交酯配成溶液, 进行测定手性纯度, 如图 3.3 (a), 淀粉类粮食作物来源的 D-丙交酯出峰时间为 9.964 min, 淀粉类粮食作物来源的 L-丙交酯出峰时间为 10.800 min, 由此可以判断此种方法可以测定样品中 L-丙交酯和 D-丙交酯的相对含量; 随后对淀粉类粮食作物来源的 D-丙交酯单独进样检测 3.3 (b), 出峰时间为 9.848 min, 其中有少量 L-丙交酯在 10.830 min 处出峰, 根据峰面积大小可以得出淀粉类粮食作物来源的 D-丙交酯中, D-丙交酯占 99.75%; 对木质纤维素来源的 D-丙交酯单独进样检测 3.3 (c), 出峰时间为 9.870 min, 其中有少量 L-丙交酯在 10.783 min 处出峰, 根据峰面积大小可以得出纤维素来源的 D-丙交酯中 D-丙交酯占 99.99%。由此可以得出, 木质纤维素 D-丙交酯的手性纯度高于淀粉 D-丙交酯, 木质纤维素来源的 D-丙交酯的手性纯度满足工业要求。

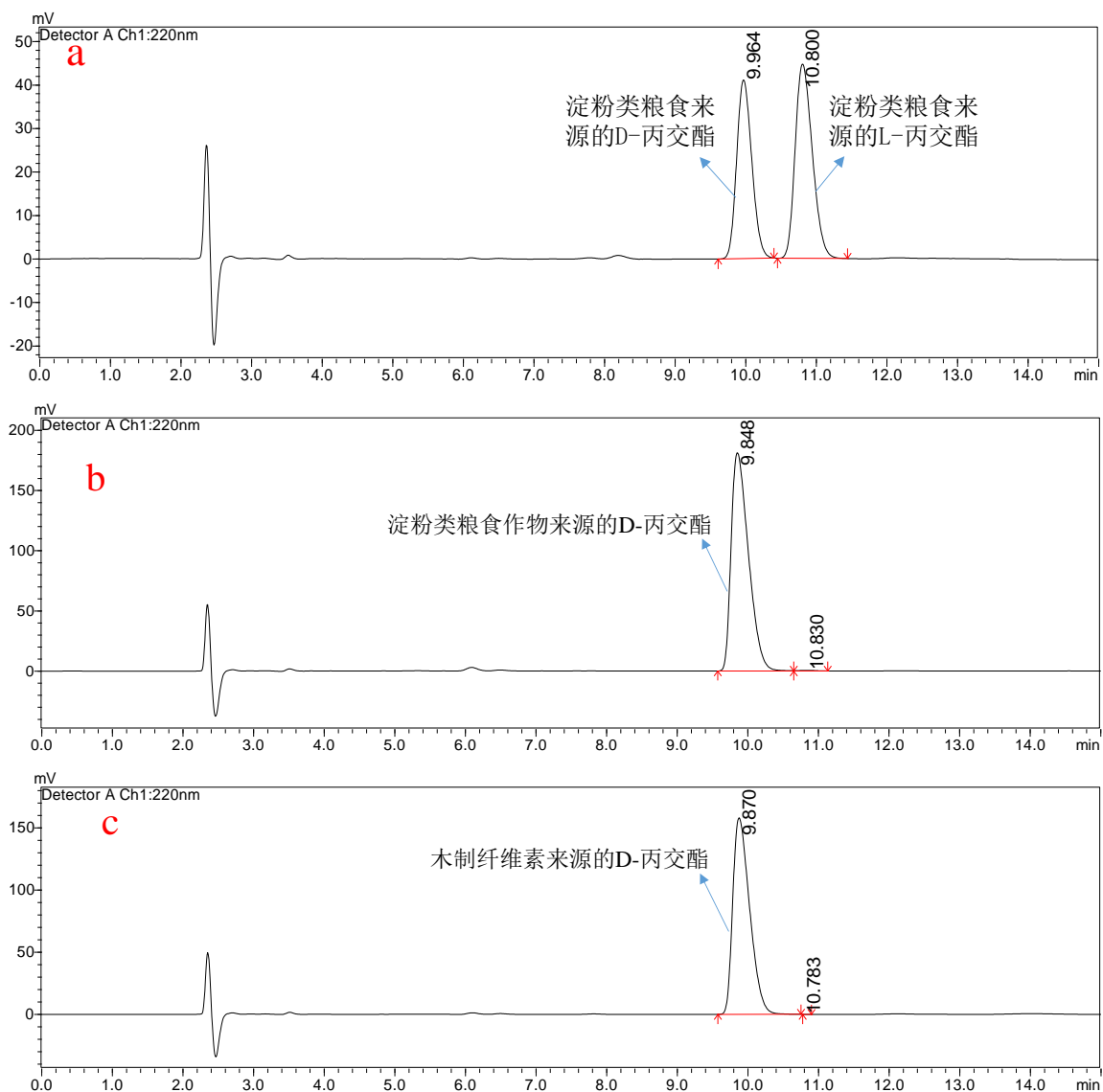


图 3.3 三种不同来源的 D-丙交酯的手性纯度分析 (a) 淀粉类粮食作物来源的 D-丙交酯和淀粉类粮食作物来源的 L-丙交酯, (b) 淀粉类粮食作物来源的 D-丙交酯, (c) 木质纤维素来源的 D-丙交酯

Figure 3.3 Chiral purity analysis of d-lactide from three different sources (a) D-lactide from starch crops and L-lactide from starch crops, (b) D-lactide from starch crops, (c) D-lactide from lignocellulosic sources

利用 KBr 压片法对两种不同原料来源 D-丙交酯进行了红外测定, 来验证丙交酯的二级结构, 图 3.4 是淀粉类粮食作物来源的 D-丙交酯和木质纤维素来源的 D-丙交酯的红外光谱图, 两种来源 D-丙交酯的红外光谱图显示在  $651\text{ cm}^{-1}$ 、 $935\text{ cm}^{-1}$  处存在环骨架振动峰, 证明有环状结构存在;  $1098\text{ cm}^{-1}$  处显示为 C-O-C 酯对称伸缩振动峰;  $1272\text{ cm}^{-1}$  处显示为 C-O-C 酯反对称伸缩振动峰;  $1766\text{ cm}^{-1}$  处显示酯 C=O 伸缩振动峰;  $1457\text{ cm}^{-1}$  处显示  $\text{CH}_3$  的弯曲振动峰。两种原料来源的 D-丙交酯的红外光谱图结果一致<sup>[78]</sup>。

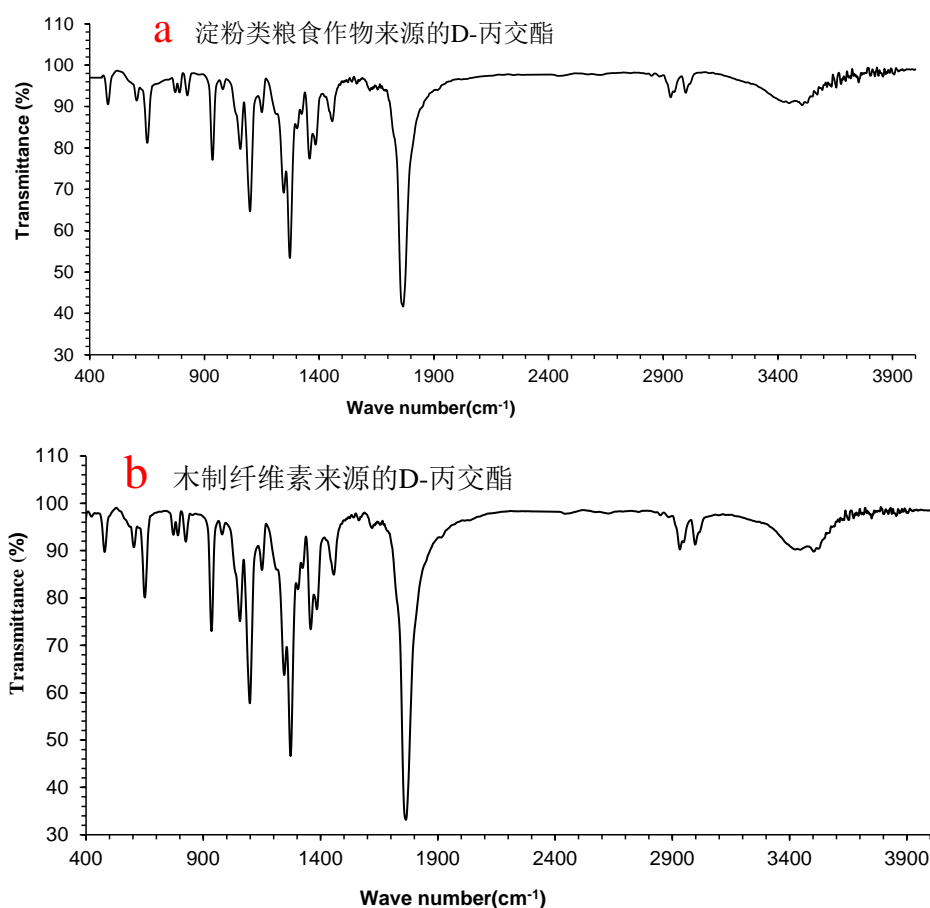


图 3.4 两种不同来源的 D-丙交酯的红外光谱 (a) 淀粉类粮食作物来源的 D-丙交酯, (b) 木质纤维素来源的 D-丙交酯

Figure 3.4 FT-IR of D-lactide from two different sources (a) D-lactide from starch crops, (b) D-lactide from Lignocellulosic

如图 3.4 是利用 H-NMR 对淀粉类粮食作物来源的 D-丙交酯、木质纤维素来源的 D-丙交酯进行核磁共振鉴定，在 1.63 ppm 和 5.03 ppm 附近出现了峰，峰面积比为 3:1，1.63 ppm 和 1.64 ppm 出现了二重峰，强度比是 1:1；5.03 ppm、5.04 ppm、5.05 ppm、5.06 ppm 出现了四重峰，强度比是 1:3:3:1，为两处环上碳和环外碳所连接氢的峰，在丙交酯分子式中，它们的原子比也是 1:3。7.26 ppm 为溶剂甲醇的峰，0 ppm 的峰是起点，其他还有两处峰是少量杂质的峰，如无水乙醇、水。淀粉类粮食作物来源的 D-丙交酯、木质纤维素来源的 D-丙交酯的共振氢谱一致。

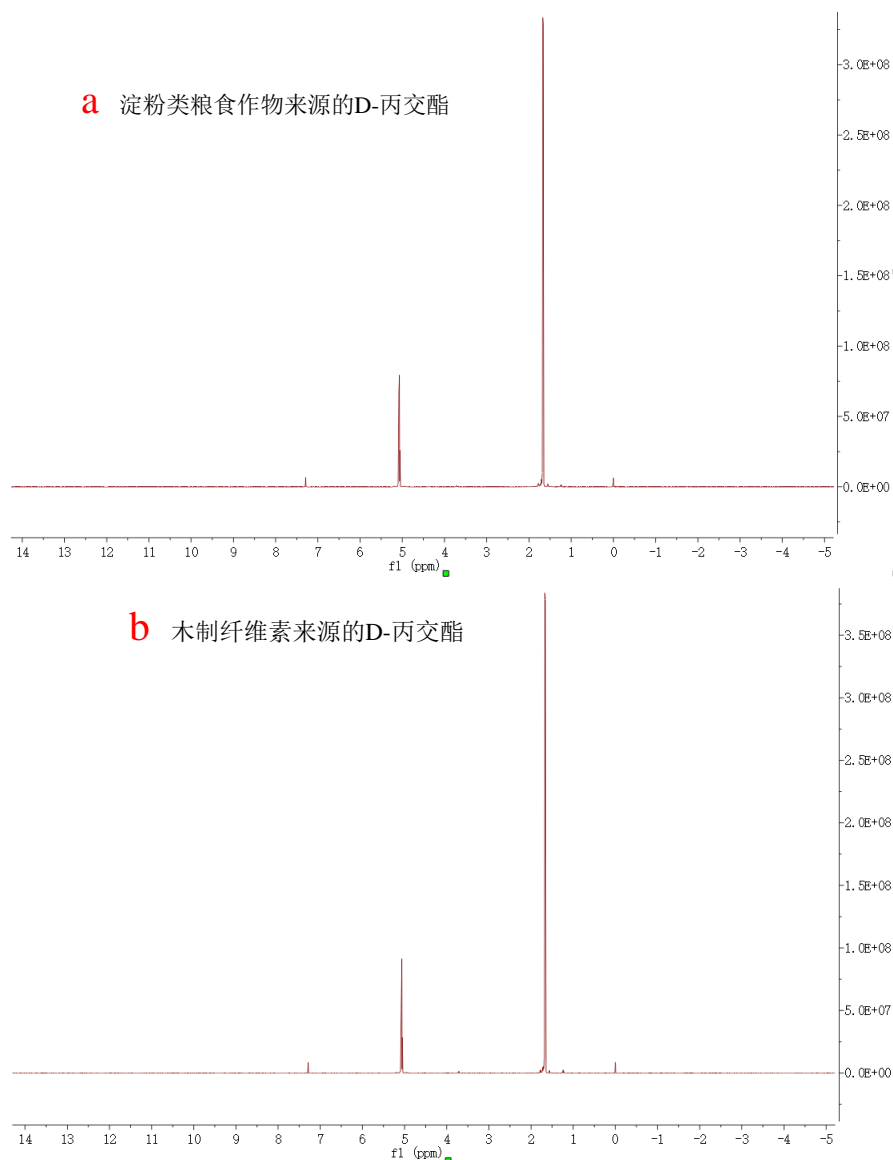


图 3.4 两中不同来源的 D-丙交酯的核磁共振氢谱 (a) 淀粉类粮食作物来源的 D-丙交酯；(b) 木质纤维素来源的 D-丙交酯

Figure 3.4 NMR spectra of D-lactide from two different sources (a) D-lactide from starch crops, (b) D-lactide from Lignocellulosic

3.5 利用 ESI-高分辨时间质谱仪测定淀粉类粮食作物来源 D-丙交酯、木质纤维素来源 D-丙交酯的相对分子质量，在检测过程中，以甲醇为溶剂加钠处理，满足的关系式： $199.0581 = [M + Na + CH_3OH]$ ，在同样条件下，淀粉类粮食作物来源 D-丙交酯、木质纤维素来源 D-丙交酯的测定结果一样 199.0581，减去钠和甲醇的相对分子质量为 144.0581，表明两种来源的 D-丙交酯的相对分子质量与理论值 144 相同。

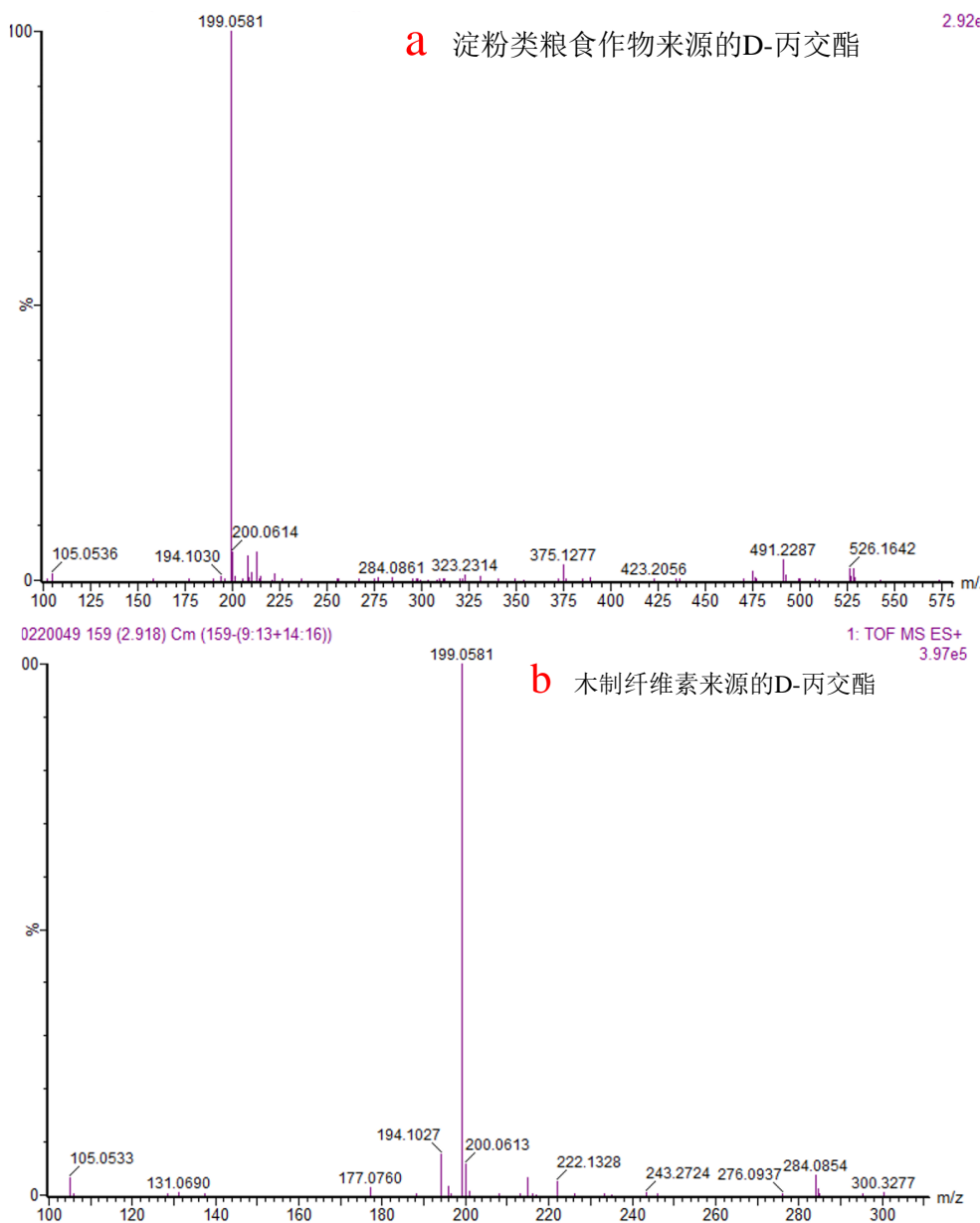


图 3.5 两种不同来源的 D-丙交酯的相对分子质量 (a) 淀粉类粮食作物来源的 D-丙交酯, (b) 木质纤维素来源的 D-丙交酯

Figure 3.5 Relative molecular mass of D-lactide from two different sources (a) D-lactide from starch crops, (b) D-lactide from Lignocellulosic

利用差示扫描量热仪 (DSC) 对淀粉类粮食作物来源的 D-丙交酯、木质纤维素来源的 D-丙交酯进行熔点测定 (图 3.6), 淀粉类粮食作物来源的 D-丙交酯的熔点在  $95.2^{\circ}\text{C}$ , 木质纤维素来源的 D-丙交酯的熔点在  $96.1^{\circ}\text{C}$ , 都符合相关文献报道丙交酯的温度 ( $94\text{-}98^{\circ}\text{C}$ )。

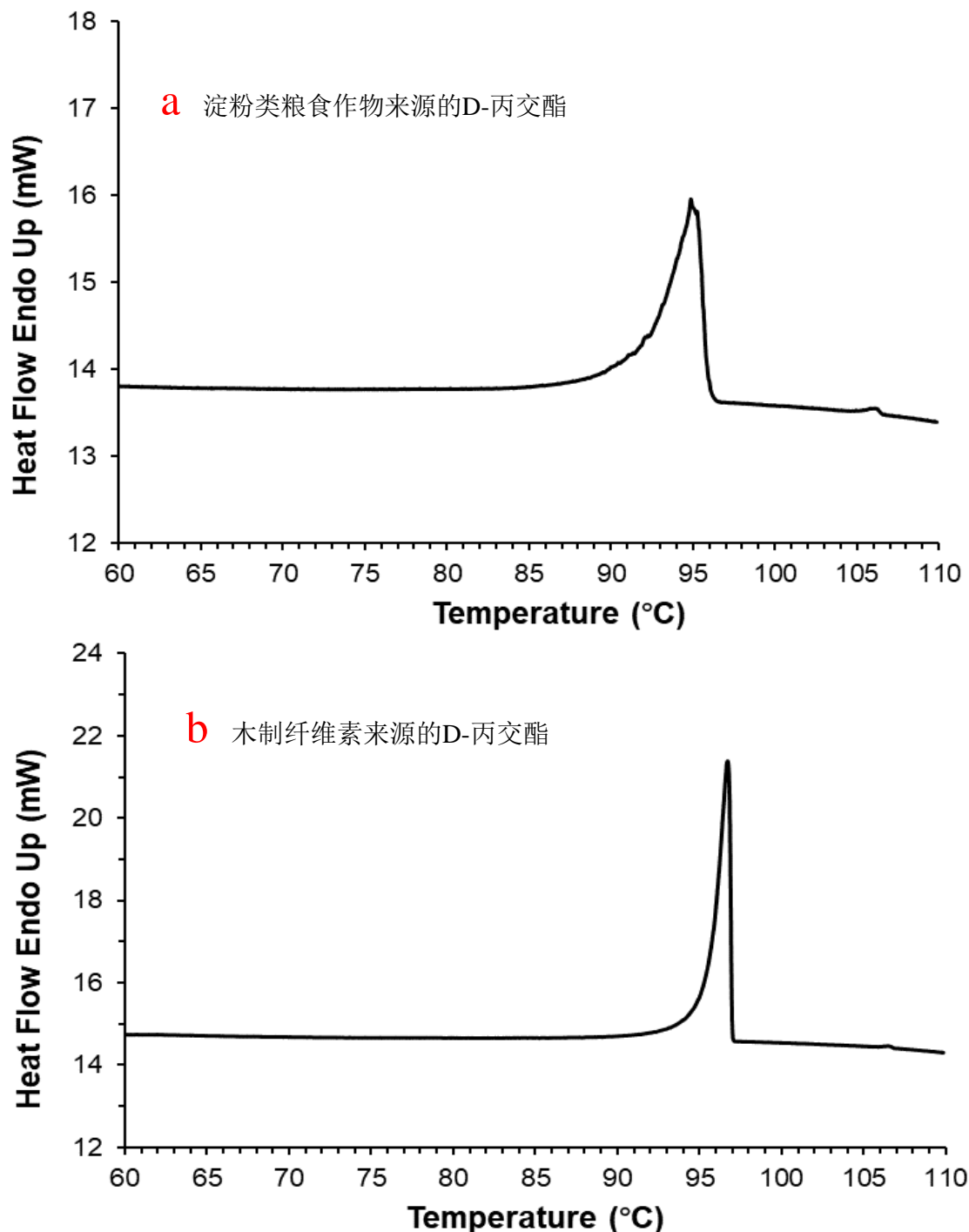


图 3.6 两种不同来源的 D-丙交酯的熔点 (a) 淀粉类粮食作物来源的 D-丙交酯, (b) 木质纤维素来源的 D-丙交酯

Figure 3.6 Melting points of D-lactide from two different sources (a) D-lactide from starch crops, (b) D-lactide from Lignocellulosic

利用元素分析仪 (C、H、N、S、O/VARIO EL CUBE、德国 ELEMENTAR) 对淀粉类粮食作物来源 D-丙交酯、木质纤维素来源 D-丙交酯的 C、H 含量进行了测定, 淀粉类粮食作物来源的丙交酯含有  $49.76 \pm 0.02\% \text{C}$ 、 $5.39 \pm 2.22\% \text{H}$ , 木质纤维素来源的 D-丙交酯含有  $49.72 \pm 0\% \text{C}$ 、 $5.40 \pm 4.51\% \text{H}$ 。市售乳酸所得丙交酯和纤维素乳酸所得丙交酯的 C、H 含量一致且符合文献报道 (50% C、5.6% H)。

### 3.4 结果与讨论

本章的主要工作是将分离纯化后的木质纤维素来源 D-乳酸和淀粉类粮食作物来源的 D-乳酸进行了聚合反应, 得到了 D-丙交酯, 并对两种来源的 D-丙交酯进行了手性纯度、<sup>1</sup>H-核磁共振、相对分子质量、熔点、元素含量的鉴定, 淀粉类粮食作物来源的 D-丙交酯、木质纤维素来源的 D-丙交酯在核磁共振、相对分子质量、熔点、元素含量方面鉴定结果一致且符合相关文献报道。木质纤维素来源的 D-丙交酯的手性纯度为 99.99% 高于淀粉类粮食作物来源的 D-丙交酯 (99.75%)。

两中不同来源的 D-丙交酯的经过两次无水乙醇重结晶后得率 11% 左右。文献中报道粗丙交酯的得率 50% 左右, 经过两次重结晶后精制丙交酯得率 30%<sup>[78]</sup> 左右, 本章得到的两种来源 D-丙交酯得率偏低的主要原因是聚合所用的实验设备简陋, 本实验的目的是为了验证纤维素 D-乳酸作为单体合成 D-丙交酯的可行性, 定量的考虑很少, 下一步工作需要使用更合适的聚合反应设备和收集设备, 已获得较高的 D-丙交酯得率。另外, 随着结晶次数增加, 丙交酯中含有的杂质会更少, 同时损失的丙交酯更多。。

本章实验结果可以得出, 证明了纤维素 D-乳酸作为单体合成 D-丙交酯的可行性, 为今后木质纤维素 D-乳酸生产 D-丙交酯提供了可行性的方案。

## 第 4 章 适应性进化方法提高乳酸片球菌 ZY271 在低 pH 条件下发酵性能

### 4.1 引言

由于乳酸的  $pK_a = 3.86$ ，用微生物发酵法生产乳酸时，需要通过外源添加大量的碱（ $Ca(OH)_2$ 、 $CaCO_3$ 、 $NaOH$  以及  $NH_3 \cdot H_2O$  等）作为中和剂的方式来提高发酵液的 pH 值，乳酸主要以乳酸盐形式存在于发酵液中，后期需要经过酸化等步骤才能得到乳酸，这样不仅增加分离纯化的成本，也会产生大量固体高盐废弃物，增加了环境污染<sup>[95]</sup>，低 pH 值还会影响发酵指标<sup>[11]</sup>。提高乳酸片球菌的低 pH 耐受性使其在低 pH 的条件下也能正常发酵具有重要意义。

提高乳酸片球菌的低 pH 耐受性主要有两个方向，其一，通过代谢工程改造技术主动的改造菌株的代谢路径来提高低 pH 耐受性，代谢工程改造时，面对着错综复杂、相互关联的代谢途径，往往改造效果不理想；其二，通过自然适应性进化技术使其提高低 pH 耐受性，适应性进化技术是一种直接、高效的方法，在高浓度抑制物、高盐、高温等特定条件下成功进化得到了相应耐受、高产菌株<sup>[96]</sup>。

本实验室在之前的工作中，得到了一株具有优良的木制纤维素 L-乳酸发酵的生产菌株 *P. acidilactici* ZY271，它可以同步代谢五种可发酵性单糖（葡萄糖、木糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖），进行高浓度、高纯度 L-乳酸发酵，但在低 pH 条件下发酵性能不是很好。在本章中，主要通过调整培养基成分的适应性进化的方法来改造此菌株，将进化后的菌株和出发菌株在不同 pH（4.0、4.5、5.0、5.5）、不同培养基（小麦秸秆、合成培养基）中进行发酵对比，来确定进化菌株是否有更好的发酵性能。

### 4.2 材料与方法

#### 4.2.1 菌株适应性进行所用培养基和培养条件

本实验室前期改造得到的 *P. acidilactici* ZY271 是一株具有优良发酵性能的 LAB 菌株，对于木质纤维素来源的抑制物以及高温胁迫具有很高的耐受性<sup>[97]</sup>，在低 pH 值的条件下生长代谢能力比较弱<sup>[98]</sup>。将其培养在含有 20 ml MRS 培养基的 100 ml 三角瓶中，整个适应性进化过程可以分为五个阶段。

第 I 阶段：常规 MRS 培养基（20 g/L 葡萄糖，10 g/L 蛋白胨，10 g/L 酵母粉，5 g/L 无水乙酸钠，2 g/L 磷酸氢二钾，2 g/L 柠檬酸氢二铵，0.58 g/L 无水硫酸镁，0.25 g/L 一水硫酸锰），一天转接一次，转接了 18 次；

第 II 阶段：培养基成分和培件条件不变，由一天转接一次变成两天转接一次，转接了 27 次；

第 III 阶段：用 2 mL 100 g/L 的 L-乳酸溶液将 20 ml MRS 培养基的 pH 调至到 4.0，在此培养基中培养两天，然后再在常规 20 ml MRS 培养基培养一天，两种培养基交替转接，转接了 7 次；

第 IV 阶段：将常规 MRS 培养基的 5 g/L 无水乙酸钠降低为 1g/L，其他成分不变，三天转接一次，转接了 39 次；

第 V 阶段：改成常规 MRS 培养基，两天转接一次，转接了 109 次。

#### 4.2.2 进化菌株和出发菌株发酵对比时所用培养基及培养条件

将保存于-80℃冰箱中的出发菌株 *P. acidilactici* ZY271 的种子接种到 100 ml 三角瓶中进行活化，三角瓶含有 20 ml 的 MRS 培养基，首先，在 42 ℃、150 rpm 的摇床中培养 12 h 后，然后，用移液枪取 5 ml 上述培养液加入到含有 50 ml 新鲜 MRS 培养基的 250 ml 三角瓶中，继续培养 6 h，以 10% (v/v) 的接种量接种到 1 L 发酵罐中进行发酵。进化菌株的种子液直接在进化培养基的体系中获取。

在两种发酵体系中进行发酵比较，一种是在含有 90 g/L 葡萄糖的 MRS 培养基中进行发酵，另一种是在经过预处理并且脱毒好的麦秆物料中进行 SSCF，在 1 L 罐中进行 500 ml 的体系发酵。使用 4 M NaOH 或者 25% (w/w) Ca(OH)<sub>2</sub> 来调节 pH，为了使种子正常生长、数量充足，在发酵前 4 小时内，需要将 pH 保持在 5.5，在发酵过程中取样，用液相色谱检测发酵液中糖的消耗情况、乳酸的生成情况，用紫外分光光度计测定细胞的总数量，稀释涂板法测定活细胞数量。

进化菌株的 SSCF 是在 25%固含量的小麦秸秆中进行的。首先，将经过预处理且脱完毒的物料和超纯水以 25%的固含量装入 1L 的三角瓶中，放入灭菌锅中，在 121 ℃，20 min 的条件下进行灭菌。然后将其放在 50℃、150 rpm 的水浴摇床中进行糖化 12 h，纤维素酶用量为 4 mg 粗蛋白/g 干物料，将上述糖化好的溶液倒入 1 L 发酵罐中进行发酵。在发酵前 4 小时需要将 pH 保持在 5.5，为了使种子正常生长、数量增长起来，在发酵过程中取样，用液相色谱检测发酵液中糖的消耗情况、乳酸生成情况以及细胞的活力。

#### 4.2.3 发酵产物、pH 值、细胞活力以及碱用量的计算

首先，从发酵罐或者三角瓶中取样，用离心机以 12000 rpm、5 min 的条件下离心，取上清，稀释 50 倍，用 0.22 μm 滤膜过滤，然后，用高效液相色谱进行检测 (High performance liquid chromatography, HPLC)，葡萄糖、木糖、乳酸的浓度是在配备 HPX-87H 柱的 HPLC 上进行测定，用 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 作为流动相，柱温箱的温度为 65 ℃，进样流速为 0.6 mL/min。pH 的测定是使用了上海精科 pH 计 (PHS-3C 型号)，细胞活力:取 1 mL 的发酵液，在超净台中用灭菌的超纯水进行稀释到 10<sup>-7</sup>-10<sup>-8</sup>，然后在含有 MRS 固体培养基的平板中进行涂布，将平板用封口膜进行密封，放入 42℃的培养箱中，两到三天平板中会长有乳酸片球菌菌落，进行计数。OD<sub>600</sub> 的测定是用紫外分光光度计在 260 nm 的波长条件下进行测定。

### 4.3 结果与讨论

#### 4.3.1 乳酸片球菌在进化体系中的生长代谢情况

对 *P. acidilactici* ZY271 采取了长期的适应性进化, 如图 4.1 所示, 整个进化过程进行了四次调整, 分为五个阶段共 200 天: 第①阶段是在含有 20 g/L 葡萄糖的 MRS 培养基中培养 24 h, 结束后测得剩余葡萄糖为 6.0g/L 左右, pH 为 4.0 左右, 考虑到 24 h 后, 剩余的葡萄糖很多。随后, 将培养时间由 24 h 增加到 48 h, 即第②阶段。在第②阶段过程中, 对驯化终点发酵液进行检测, 发现剩余的葡萄糖浓度还是 6.0 g/L 左右, pH 3.9, 有略微下降。随着 L-乳酸的积累, 溶液的 pH 由初始的 5.5 降低到 pH 3.9 左右时, 发酵液中存在大量的  $H^+$  影响了细胞内的酶活, 代谢受阻, 所以采取外源添加 L-乳酸的方式将新鲜培养基的初始的 pH 直接调节到 4.0, 即第③阶段。第③阶段, 通过添加外源 L-乳酸将新鲜培养基的 pH 调节到 4.0, 在此培养基中培养两天后, 转入到新的 MRS 培养基中, 不调节 pH 继续培养一天, 交替进行。测得驯化终点的发酵液 pH 为 4.0, 菌株的  $OD_{600}$  小于 1, 菌株难以正常生存, 可能是 MRS 培养基中乙酸钠的浓度过高, 所以将原本 5 g/L 的乙酸钠降低到 1 g/L, 即第④阶段。第四阶段, 培养 72h 后, 发酵液 pH 为 3.65 左右, 剩余残糖为 9 g/L 左右, 接着调整进化培养的条件与第②阶段一样, 即第⑤阶段; 第⑤阶段后期, 发酵液残糖浓度和 pH 不断降低, 最后剩余的葡萄糖浓度在 2.8 g/L 左右, pH 稳定在 3.8 左右。经过 200 次连续转接, 进化菌株生长代谢性能稳定。

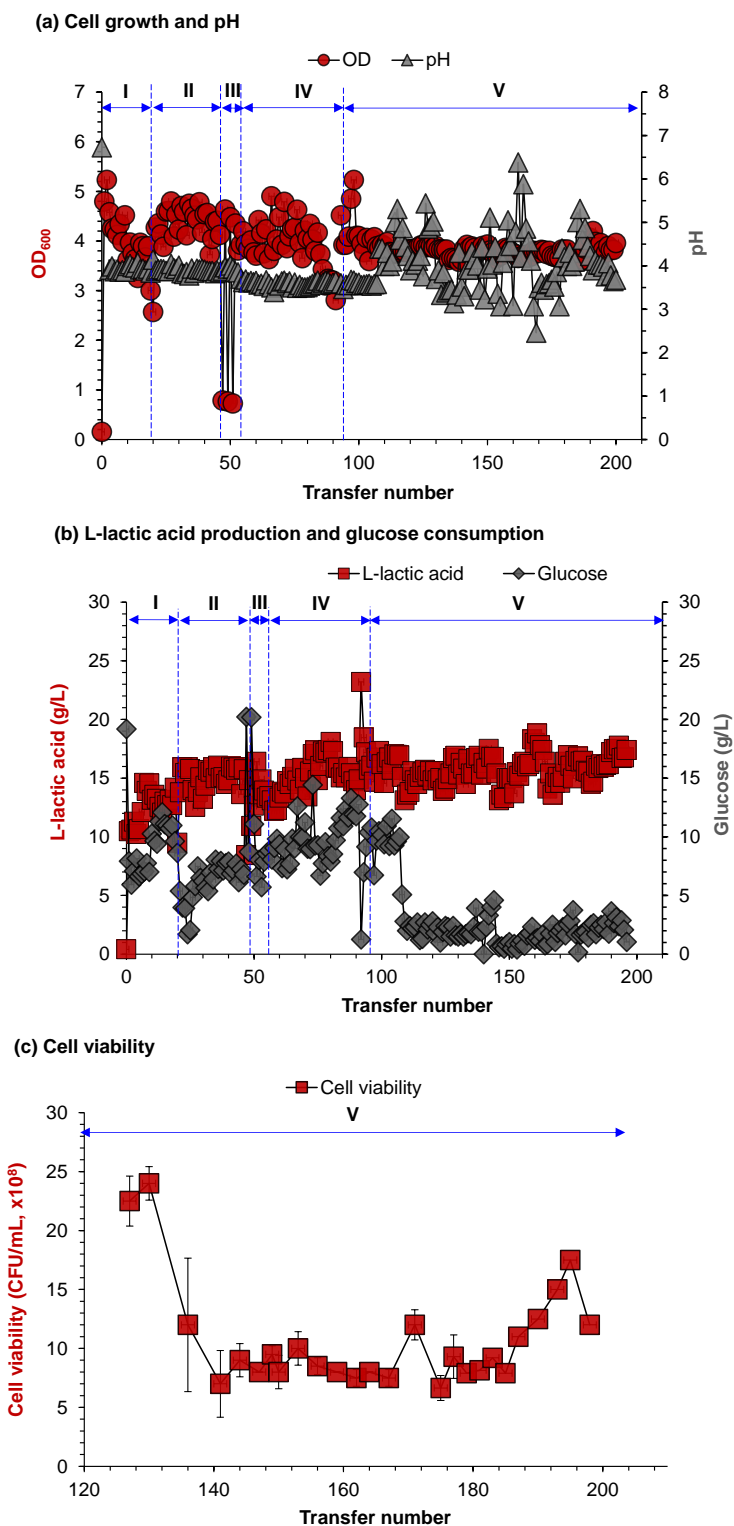


图 4.1 *P. acidilactici* ZY271 在进化体系中的生长代谢情况

Figure 4.1 Growth and metabolism of *P. acidilactici* ZY271 in the evolutionary system

OD<sub>600</sub>、pH 值、L-乳酸生产、葡萄糖消耗以及细胞活力均测定于单次转接的终点。

#### 4.3.2 进化菌株和出发菌株在不同发酵条件下的发酵比较

进化菌株和出发菌株在合成培养基和木质纤维素物料培养基中进行发酵比较，通过控制不同 pH 的条件来探究出发菌株和进化菌株在糖消耗、乳酸生产能力、细胞活力方面的差异。一方面考虑木制纤维素酶反应的最适 pH (4.7-5.3)，木制纤维素原料在糖

化过程中，我们需要外源添加木制纤维素酶将原料中的单糖释放出来，并且在发酵过程中还会释放一部分单糖，另外一方面考虑到乳酸的解离常数 ( $pK_a = 3.86$ )，所以选择四种不同的 pH 4.0、4.5、5.0、5.5 进行探究。

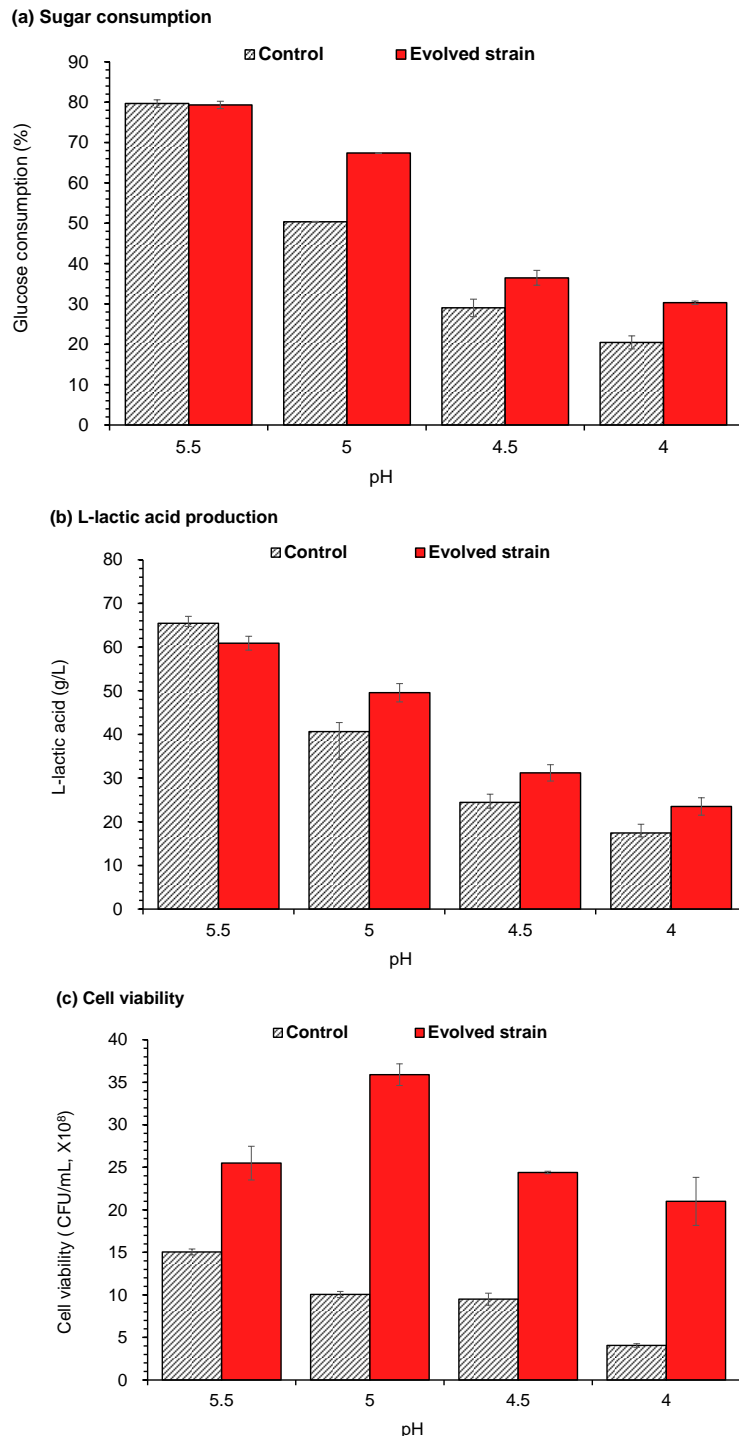


图 4.2 进化菌株与出发菌株在 MRS 培养基中不同 pH 值条件下的 L-乳酸发酵比较

Figure 4.2 Comparison of L-lactic acid fermentation between the evolved strain and the original strain in MRS medium at different pH

发酵条件：以 *P. acidilactici* ZY271 进化前作为对照，发酵是在 1 L 发酵罐中进行，添加 90 g/L 葡萄糖的 MRS 培养基，NaOH 作为 pH 中和剂，对发酵完的培养基进行糖消耗、L-乳酸产量和细胞活力相关测定。

首先，在含有 90 g/L 葡萄糖 MRS 合成培养基中进行发酵，当发酵液 pH 越低时，与菌株生长代谢途径相关的酶的活力下降，葡萄糖消耗能力下降，乳酸的产量降低，由图 4.2 (a)、(b) 可知，随着 pH 由 5.5 降低到 4.0，葡萄糖的消耗率降低，进化菌株在 pH 5.0、4.5、4.0 的条件下葡萄糖消耗率明显高于出发菌株，乳酸产率的趋势和葡萄糖消耗率的趋势基本相同。在 pH 4.5 和 4.0 条件下，进化菌株的 L-乳酸产量分别为 31.2 g/L、23.5 g/L，相比于出发菌株分别提高了 27.7% 以及 34.7%。由 3.2 (c) 可知，pH 由 5.5 到 4.0，进化菌株的细胞活力明显高于出发菌株，在 pH 4.5 和 4.0 条件下，驯化菌株的细胞活力相比于出发菌株分别提高了 1.6 倍和 4.2 倍。从 MRS 培养基的发酵结果对比来看，进化菌株在低 pH 条件下，其细胞活力、糖消耗率、乳酸产率明显高于出发菌株，但是相对于一般发酵的 pH 5.5，进化菌株受到了低 pH 的影响还是很大，发酵各项指标下降明显。

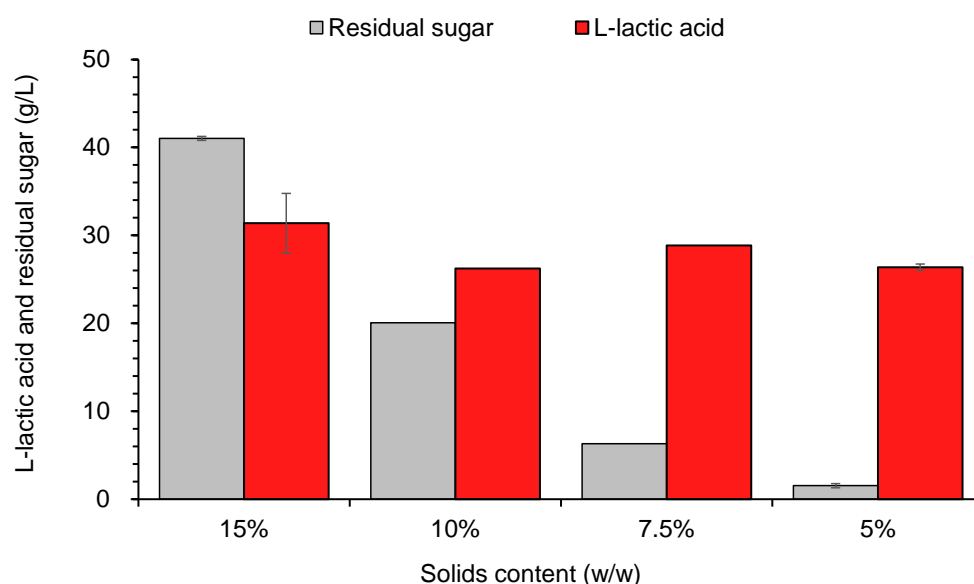


图 4.3 进化菌株在不同固含量、pH 值 4.0 条件下的同步糖化共发酵比较

Figure 4.3 Comparison of SSCF of evolved strains under different solid content and pH 4.0

发酵条件：以预处理脱毒后的麦秆为原料，4 M NaOH 作为 pH 中和剂，预糖化的条件为 50 °C、12 h，以 10% (v/v) 的接种量接入种子液进行发酵；残糖浓度是指发酵结束时葡萄糖和木糖浓度之和，并测定 L-乳酸浓度。

随后进行了驯化菌株在 pH 值 4.0 条件下、不同固含量的同步糖化与共发酵实验，如图 3.3，首先，进行了 5% 固含量的发酵实验，结果发现，剩余的葡萄糖只有 1.5 g/L，L-乳酸的浓度达到 26.2 g/L，因为残糖很少，所以增加了固含量，从 5% 增加到 15%。当固含量由 5% 增加到 7.5% 时，发酵终点的乳酸含量有所增加，残糖的浓度也增大了，继续增加固含量，发酵终点的残糖浓度增加明显，乳酸的产量基本不增加，说明随着固含量增加到一定程度，驯化菌株在低 pH 4.0 条件下，驯化菌株代谢能力趋于饱和，并且高固含量对于传质、传热等方面也有不利影响，当固含量为 15% (w/w) 时，发酵终点的葡萄糖浓度达到 41.0 g/L。实验表明，在 pH 4.0 条件下，只能进行低固含量的低

残糖发酵，若继续增加固含量，发酵终点的残糖浓度过大，对于后期乳酸的分离纯化，增加了成本压力和乳酸损失。

在固含量 15%的前提下，探究驯化菌株和出发菌株在不同 pH (5.5、5.0、4.5、4.0) 条件下的同步糖化共发酵 (图 3.4)。当 pH 为 5.5 和 5.0 时，驯化菌株的活细胞数量高于出发菌株，但是乳酸产量基本相同。当 pH 为 4.5 和 4.0 时，驯化菌株和出发菌株在乳酸产量和细胞活力方面都比高 pH 时低，同时，驯化菌株酸产量和细胞活力明显高于出发菌株，驯化菌株 L-乳酸产量在 pH 值 4.5 以及 4.0 条件下分别为 45.3 g/L 和 31.4 g/L，相比于出发菌株分别提高了 17.2% 和 88.4%。在几种不同发酵 pH 的条件下，驯化菌株的细胞活力明显高于出发菌株，当 pH 在 5.0 及以下时，驯化菌株的细胞活力是出发菌株细胞活力的两倍以上。以上同步糖化共发酵的结果表明，在低 pH 条件下发酵时，驯化菌株的活力明显高于出发菌株，当 pH 低于 5.0 时，出发菌株的乳酸生产能力高于出发菌株，但是整体相对于 pH 5.5 和 5.0 时都下降很多。

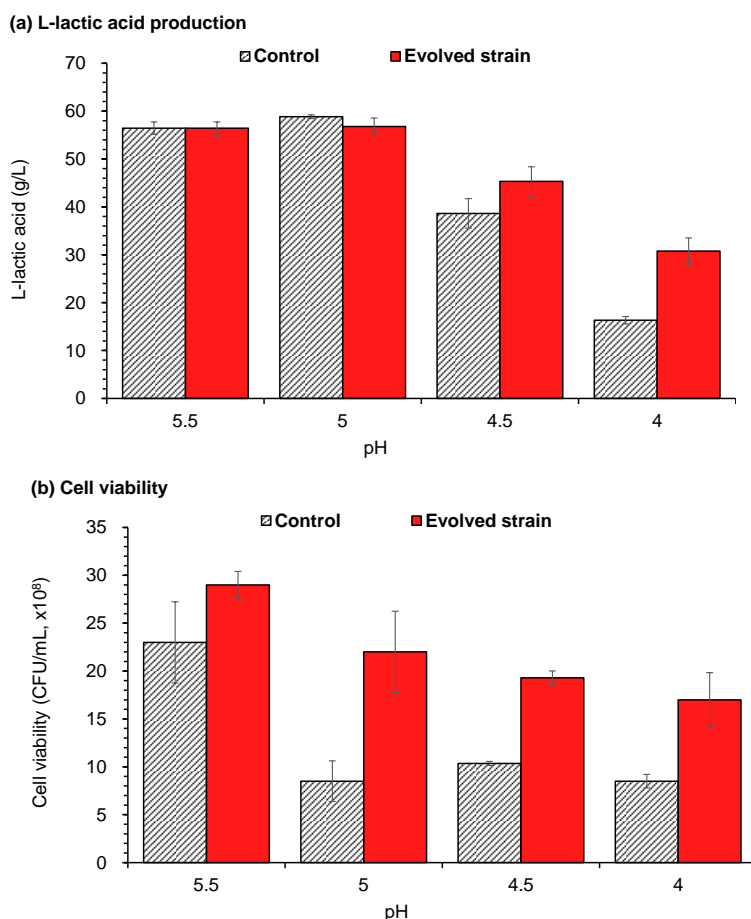


图 4.4 驯化菌株与出发菌株在不同 pH 值条件下的同步糖化共发酵对比

Figure 4.4 Comparison of SSCF of domesticated strain and starter strain under different pH

发酵条件：*P. acidilactici* ZY271 进化前作为对照，以麦秆为原料，15% (w/w) 固含量的 SSCF 生产 L-乳酸。先在 50 °C 下糖化 12 h，调节初始 pH 值为 5.5 后接入种子液进行发酵，以 4 M NaOH 作为中和剂。L-乳酸生产以及细胞活力测定于 48 h 发酵终点。

通过将驯化菌株和出发菌株在合成培养基与木制纤维素物料培养基进行发酵比较，当发酵体系维持的 pH 较低时，驯化菌株在糖消耗、乳酸产率、细胞活性方面都比出发

菌株表现出一定优势，但是两种菌株在低pH的条件下发酵性能都明显低于常规发酵pH 5.5，还需要通过进一步研究来提高乳酸片球菌在低pH的条件下的发酵性能。

#### 4.4 本章小结

本章节采用了适应性进化策略来提高L-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZY271 的低pH值抗逆性以及乳酸发酵性能，并通过MRS培养基发酵以及麦秆物料SSCF来判断进化菌株在低pH值的条件下抗逆性是否有所提高。本章节主要研究结论如下：

(1) 通过在MRS培养基中、低pH值条件下的长期适应性进化培养，最终获得了一株稳定的进化菌株。进化菌株在MRS培养基中进行了发酵以及麦秆物料SSCF，在进行低指标的乳酸发酵时，相比于出发菌株，L-乳酸发酵性能以及细胞活力都有提升。在pH值4.0条件下，进化菌株在合成培养基中的发酵以及麦秆物料中SSCF时，L-乳酸产量分别是23.5 g/L以及31.4 g/L，相比于出发菌株分别提升了34.7%和88.5%，进化菌株相比于出发菌株，其细胞活力都有显著性的提升。

(2) 进化菌株在5% (w/w) 低固含量、pH值4.0下的SSCF，残糖浓度可以降低到1.5 g/L，但进一步提高发酵的固含量，乳酸产量维持在26.2~31.4 g/L之间，但残糖浓度不断增加。进化菌株在低pH值下仅能实现低指标的乳酸发酵，距离实际应用仍有很大的距离。

## 第 5 章 结论与展望

### 5.1 结论与创新点

目前市面上的 D-乳酸基本都是以淀粉类粮食作物为原料通过微生物发酵生产得到的，木质纤维素，如小麦秸秆、玉米秸秆等，具有生物量广泛、价格低廉的优点，是最具有替代淀粉类粮食作物的潜力来生产 D-乳酸。

本论文主要研究在木质纤维素体系中利用 *P. acidilactici* ZY15 生产高浓度、高手性纯度的 D-乳酸，利用简单流程对发酵液中 D-乳酸进行分离纯化，得到了聚合级的 D-乳酸，并且合成高手性纯度的 D-丙交酯，为以后木质纤维素生产 D-乳酸以及合成聚 D-乳酸的重要前体 D-丙交酯提供了可行性方案。

另外，本论文采用了适应性进化方法来提高乳酸片球菌的低 pH 耐受性，使其在低 pH 的条件下也能正常发酵。进化菌株相对于出发菌株在 pH 4.0、4.5、5.0 的条件下具有更好的发酵性能和生长活力。

本论文主要结论如下：

(1) 用小麦秸秆为原料，经过干法生物炼制和生物脱毒后，用 *P. acidilactici* ZY15 进行了 30% 固含量的 SSCF，发酵结束后，得到了高浓度 (128.1 g/L)、高手性纯度 (99.07%) 的纤维素 D-乳酸，残糖不超过 1.8 g/L (葡萄糖，~0.7 g/L；木糖，~0.6 g/L；阿拉伯糖+甘露糖，~0.2 g/L；半乳糖，~0.3 g/L)。

(2) 将上述发酵液经过常规的脱色、浓缩结晶、酸化、阳离子树脂处理的分离步骤后，得到了聚合级的纤维素 D-乳酸，D-乳酸得率为 57.14%，D-乳酸手性纯度为 99.54%，发酵液中原原本残留的单糖被去除干净， $\text{Ca}^{2+}$  和  $\text{K}^{+}$  初始浓度分别为  $305.8 \pm 12$  mg/g 和  $69.4 \pm 2.8$  mg/g，经纯化后，浓度分别降低至  $3.6 \pm 0.2$  mg/g， $3.0 \pm 0.3$  mg/g。 $\text{Na}^{+}$ ， $\text{Cl}^{-}$  由初始的  $20.7 \pm 1.5$ ， $32.6 \pm 2.3$  mg/g 降至  $2.2 \pm 0.2$ ， $2.8 \pm 0.3$  mg/g。 $\text{Mg}^{2+}$  离子初始浓度较低 ( $5.7 \pm 0.3$  mg/g)，纯化后，检测不到。经过常规的纯化步骤后，纤维素来源的 D-乳酸中残留的杂质 (残糖，蛋白质，总酚，离子) 被有效去除，纯化后的纤维素 D-乳酸具备合成 D-丙交酯的潜力。

(3) 将上述纯化后的 40 g 木质纤维素 D-乳酸进行聚合，用常规的辛酸亚锡为催化剂，合成了纤维素 D-丙交酯。以淀粉 D-丙交酯为对照，对纤维素 D-丙交酯进行了元素组成、熔点、相对分子质量、核磁共振氢谱、红外光谱、手性纯度等结构与性质方面的表征。结果表明，纤维素 D-丙交酯的表征结果与淀粉 D-丙交酯一致且符合相关文献报道，验证了以木质纤维素为原料生产高手性纯度的 D-乳酸以及合成聚 D-乳酸的重要前体 D-丙交酯具有可行性，为今后木质纤维素生产聚 D-乳酸的工业化应用提供了可行性方案。

(4) 为了提高 L-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* ZY271 的低 pH 值耐受性以及乳酸发酵性能，进化后的菌株和出发菌株在合成培养基中进行了发酵以及麦秆 SSCF，在 pH 值 4.0 条件下，进化菌株在合成培养基和麦秆 SSCF 中 L-乳酸产量分别是 23.5 g/L、31.4

g/L, 相比于出发菌株分别提升了 34.7%和 88.5%; 在不同 pH 值下的 MRS 培养基发酵以及 SSCF, 进化菌株相比于出发菌株, 其细胞活力都有显著性的提升。

## 5.2 展望

本论文在木质纤维素 D-乳酸的生产、纯化以及 D-丙交酯合成方面和提高 *P. acidilactici* ZY271 的低 pH 值耐受性方面, 还有一些问题需要后续深入研究:

(1) D-乳酸发酵液经过脱色、浓缩结晶、酸化、阳离子树脂吸附后, 纯化后相对纯化前, 残糖、蛋白质、乙酸脱除干净, 阳离子基本除去干净。但是, 纯化后的乳酸中还有较多的  $\text{SO}_4^{2+}$  离子, 原因是稀酸预处理过程中加入了硫酸, 另外, 乳酸钙在酸化过程中未能与硫酸进行充分的反应, 硫酸钙本身存在溶解度的原因。今后对乳酸钙酸化时, 需要考虑发酵液中本身存在的  $\text{SO}_4^{2+}$  离子, 适当少加入一些硫酸。同时, 可以开发其他乳酸分离纯化方法。

(2) 因为实验室的聚合条件有限, 木质纤维素 D-丙交酯和淀粉 D-丙交酯的得率都比文献中报道的低。前期工作主要是鉴定木质纤维素生产 D-乳酸以及合成 D-丙交酯的可行性, 定量分析做的很少, 后期可以使用更好的聚合设备和优化反应条件, 增加纤维素 D-丙交酯的得率。

(3) 适应性进化菌株相对于出发菌株, 在低 pH 4.0、4.5 时, 菌株的活力和发酵性能提高了很多, 但是进化菌株的发酵性能相对于正常发酵 pH5.5 的发酵性能, 整体降低了很多, 只能在低 pH 4.0、4.5 时进行低水平的发酵。今后, 继续进行适应性进化策略来提高 *P. acidilactici* ZY271 的低 pH 值的抗逆性和发酵性能, 同时, 查阅文献, 通过代谢工程来主动改造菌株, 使其在低 pH 时的各项发酵指标得到提高。

## 参考文献

- [1] Feng L, Chen X, Bian X, et al. Calculating D-lactide content by probability using gas chromatographic data[J]. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2012, 110(1): 32-37.
- [2] Takwa M, Larsen M W, Hult K, et al. Rational redesign of *Candida antarctica* lipase B for the ring opening polymerization of D,D-lactide[J]. *Chem Commun (Camb)*, 2011, 47(26): 7300-7308.
- [3] Feng C, Chen Y, Shao J, et al. The Crystallization and Melting Behaviors of PDLA-b-PBS-b-PDLA Triblock Copolymers[J]. *Chinese Journal of Polymer Science*, 2019, 38(3): 298-310.
- [4] 陈璐, 唐颂超, 夏季, 蒲文亮. 高耐热 PLLA-PDLA 共混物的热性能和结晶结构研究[J]. *高分子学报*, 2013, 10(08): 1006-1012.
- [5] Li J. Formation, structure and promoting crystallization capacity of stereocomplex crystallite network in the poly(lactide) blends based on linear PLLA and PDLA with different structures[J]. *Polymer*, 2016, 92(1): 210-221.
- [6] Fan F, Luo J, Ma B. Study on pressure induced flow molding of PLLA / PDLA blends[J]. *Engineering Plastics Application*, 2020, 48(11): 47-54.
- [7] 李伟, 马艳, 李远翔, et al. 高分子量立构复合结晶的三枝化 PPO-PDLA-PLLA 嵌段共聚物[J]. *高等学校化学学报*, 2014, 35(07): 1553-1558.
- [8] Wang J, Gao Q, Zhang H, et al. Inhibitor degradation and lipid accumulation potentials of oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* using lignocellulose feedstock[J]. *Bioresour Technol*, 2016, 218: 892-901.
- [9] Ong R, Chundawat S P S, Hodge D B: Linking Plant Biology and Pretreatment: Understanding the Structure and Organization of the Plant Cell Wall and Interactions with Cellulosic Biofuel Production, *Plants and BioEnergy*, 2014: 231-253.
- [10] Feng L, Bian X, Chen Z, et al. Determination of D-lactide content in lactide stereoisomeric mixture using gas chromatography-polarimetry[J]. *Talanta*, 2017, 164: 268-274.
- [11] Li C, Gao M, Zhu W, et al. Recent advances in the separation and purification of lactic acid from fermentation broth[J]. *Process Biochemistry*, 2021, 104: 142-151.
- [12] Jamshidian M, Tehrany E A, Imran M, et al. Poly-Lactic Acid: Production, Applications, Nanocomposites, and Release Studies[J]. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 2010, 9(5): 552-571.
- [13] Selig M J, Gamaleldin S, Celli G B, et al. The stabilization of food grade copper-chlorophyllin in low pH solutions through association with anionic polysaccharides[J]. *Food Hydrocolloids*, 2020, 98: 134-142.

- [14] Wee Y J, Ryu H W. Lactic acid production by *Lactobacillus* sp. RKY2 in a cell-recycle continuous fermentation using lignocellulosic hydrolyzates as inexpensive raw materials[J]. *Bioresour Technol*, 2009, 100(18): 4262-4270.
- [15] He N, Jia J, Qiu Z, et al. Cyclic l-lactide synthesis from lignocellulose biomass by biorefining with complete inhibitor removal and highly simultaneous sugars assimilation[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2022, 99 (3) :346-360.
- [16] Sun Y, Cheng J Y. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review[J]. *Bioresour Technology*, 2002, 83(1): 1-11.
- [17] Hu M, Wang J, Gao Q, et al. Converting lignin derived phenolic aldehydes into microbial lipid by *Trichosporon cutaneum*[J]. *J Biotechnol*, 2018, 281: 81-86.
- [18] Parisutham V, Kim T H, Lee S K. Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: from pretreatment to biofuel production[J]. *Bioresour Technol*, 2014, 161: 431-40.
- [19] Jing X, Zhang X, Bao J. Inhibition performance of lignocellulose degradation products on industrial cellulase enzymes during cellulose hydrolysis[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009, 159(3): 696-707.
- [20] Kim J H, Block D E, Mills D A. Simultaneous consumption of pentose and hexose sugars: an optimal microbial phenotype for efficient fermentation of lignocellulosic biomass[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 88(5): 1077-85.
- [21] Campos J, Bao J, Liden G. Optically pure lactic acid production from softwood-derived mannose by *Pediococcus acidilactici*[J]. *J Biotechnol*, 2021, 33(5): 1-8.
- [22] Abdel-Rahman M A, Hassan S E-D, Alrefaey H M A, et al. Efficient Co-Utilization of Biomass-Derived Mixed Sugars for Lactic Acid Production by *Bacillus coagulans* Azu-10[J]. *Fermentation*, 2021, 7(1): 28-36.
- [23] Yi X, Gao Q, Bao J. Expressing an oxidative dehydrogenase gene in ethanologenic strain *Zymomonas mobilis* promotes the cellulosic ethanol fermentability[J]. *J Biotechnol*, 2019, 303: 1-7.
- [24] Jonsson L J, Alriksson B N, N O. Bioconversion of lignocellulose inhibitors and detoxification[J]. *Biotechnology for biofuels*, 2013, 16(6): 25-32.
- [25] Corma A, Lborra S, Vely A. Chemical Routes for the Transformation of Biomass into Chemicals[J]. *Chemical Reviews*, 2007, 107(6): 2411-2502.
- [26] Duque A, Álvarez C, Doménech P, et al. Advanced Bioethanol Production: From Novel Raw Materials to Integrated Biorefineries[J]. *Processes*, 2021, 9(2):35-40.
- [27] Bellido C, Bolado S, Coca M, et al. Effect of inhibitors formed during wheat straw pretreatment on ethanol fermentation by *Pichia stipitis*[J]. *Bioresour Technol*, 2011, 102(23): 1086-1074.
- [28] Ma J, Shi S, Jia X, et al. Advances in catalytic conversion of lignocellulose to chemicals and liquid fuels[J]. *Journal of Energy Chemistry*, 2019, 36: 74-86.
- [29] Gu H, Zhang J, Bao J. High tolerance and physiological mechanism of *Zymomonas mobilis* to phenolic inhibitors in ethanol fermentation of corncob residue[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2015, 112(9): 1770-82.

- [30] Taherzadeh M J, Karimi K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review[J]. *Int J Mol Sci*, 2008, 9(9): 1621-51.
- [31] Sewalt V, Fonteont J, Allen V. Fiber composition and in vitro digestibility of corn stover fractions in response to ammonia treatment[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44(10): 3136-3142.
- [32] Ko J K, Um Y, Lee S M. Effect of manganese ions on ethanol fermentation by xylose isomerase expressing *Saccharomyces cerevisiae* under acetic acid stress[J]. *Bioresour Technol*, 2016, 222: 422-430.
- [33] Shao S, Zhang J, Hou W, et al. Lower pressure heating steam is practical for the distributed dry dilute sulfuric acid pretreatment[J]. *Bioresour Technol*, 2017, 238: 744-748.
- [34] Kim S B, Lee S J, Jang E J, et al. Sugar recovery from rice straw by dilute acid pretreatment[J]. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2012, 18(1): 183-187.
- [35] Klinker H B, Thomsen A B, Ahring B K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 66(1): 10-26.
- [36] Yi X, Gao Q, Zhang L, et al. Heterozygous diploid structure of *Amorphotheca resinae* ZN1 contributes efficient biodetoxification on solid pretreated corn stover[J]. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12: 126.
- [37] Yang B, Wyman C E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol[J]. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2008, 2(1): 26-40.
- [38] Jin C, Huang Z, Bao J. High-Titer Glutamic Acid Production from Lignocellulose Using an Engineered *Corynebacterium glutamicum* with Simultaneous Co-utilization of Xylose and Glucose[J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2020, 8(16): 6315-6322.
- [39] Chen H, Liu J, Chang X, et al. A review on the pretreatment of lignocellulose for high-value chemicals[J]. *Fuel Processing Technology*, 2017, 160: 196-206.
- [40] Corma A, Iborra S, Velty A. Chemical Routes for the Transformation of Biomass into Chemicals[J]. *Chemical Reviews*, 2007, 107(6): 2411-2502.
- [41] Gao X, Gao Q, Bao J. Improving cellulosic ethanol fermentability of *Zymomonas mobilis* by overexpression of sodium ion tolerance gene ZMO0119[J]. *J Biotechnol*, 2018, 282: 32-37.
- [42] 曹月乔, 张国良, 王菲菲. 纤维素生物质生产燃料乙醇的研究进展[J]. *淮阴工学院学报*, 2014, 23(1): 46-51.
- [43] Rubin E M. Genomics of cellulosic biofuels[J]. *Nature*, 2008, 454(7206): 841-852.
- [44] Lin R, Cheng J, Ding L, et al. Inhibitory effects of furan derivatives and phenolic compounds on dark hydrogen fermentation[J]. *Bioresour Technol*, 2015, 196: 250-5.
- [45] Liu G, Zhang Q, Li H, et al. Dry biorefining maximizes the potentials of simultaneous saccharification and co-fermentation for cellulosic ethanol production[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 115(1): 60-69.
- [46] 王义强, 张振华. 木质纤维生产燃料乙醇工艺的研究进展[J]. *生物技术学报*, 2010, 2(1): 52-62.

- [47] Wang Y, Tashiro Y, Sonomoto K. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: recent achievements, prospects, and limits[J]. *J Biosci Bioeng*, 2015, 119(1): 10-8.
- [48] Zhang B, Khushik F A, Zhan B, et al. Transformation of lignocellulose to starch-like carbohydrates by organic acid-catalyzed pretreatment and biological detoxification[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2021, 118(10): 4105-4118.
- [49] Zhang J, Chu D, Huang J, et al. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 105(4): 718-28.
- [50] 黄玉堃, 张利华. 代谢改造热带假丝酵母提高 D-乳酸的产量[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(24): 109-115.
- [51] Yankov D. Fermentative Lactic Acid Production From Lignocellulosic Feedstocks: From Source to Purified Product[J]. *Front Chem*, 2022, 10: 823005.
- [52] Mehta N, Singh K, Saxena N S. Comparative analysis of thermal crystallization in Cu<sub>50</sub>Ti<sub>50</sub> and Cu<sub>50</sub>Zr<sub>50</sub> metallic glasses[J]. *Physica B: Condensed Matter*, 2008, 403(21-22): 3928-3931.
- [53] Liu D, Kim K H, Sun J, et al. Cascade Production of Lactic Acid from Universal Types of Sugars Catalyzed by Lanthanum Triflate[J]. *ChemSusChem*, 2018, 11(3): 598-604.
- [54] Bayazit S S, İnci I, Uslu H. Adsorption of Lactic Acid from Model Fermentation Broth onto Activated Carbon and Amberlite IRA-67[J]. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2011, 56(5): 1751-1754.
- [55] Mónica H, Oscar E P. Effect of Steeping Corn with Lactic Acid on Starch Properties[J]. *Gereal Chemistry*, 2004, 81(1): 10-14.
- [56] Rajbhandari P, Kindstedt P S. Compositional Factors Associated with Calcium Lactate Crystallization in Smoked Cheddar Cheese[J]. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88(11): 3737-3744.
- [57] Lu Q Q, Da C, Xie S X, et al. The effect of diluting crystallization droplets on protein crystallization in vapor diffusion method[J]. *Crystal Research and Technology*, 2011, 32(3): 1122-1135.
- [58] Chou Y E, Edwards C G, Luedecke L O. Nonstarter lactic acid bacteria and aging temperature affect calcium lactate crystallization in Cheddar cheese[J]. *Journal of Dairy Science*, 2003, 86(8): 2516-2524.
- [59] Xu K, Xu P. Efficient calcium lactate production by fermentation coupled with crystallization-based in situ product removal[J]. *Bioresour Technology*, 2014, 163: 33-9.
- [60] 吕哲, 周卫强, 等. 乳酸分离技术研究进展[J]. *当代化工*, 2021, 50(4): 918-923.
- [61] 柴红, 谭军. 乳酸的乳化液膜萃取与有机溶剂萃取的比较[J]. *高校化学工程学报*, 1999, 13(1): 56-61.
- [62] 魏搏超, 宋志远, 孙亚琴, 修志龙. 发酵液中乳酸的盐析萃取[J]. *过程工程学报*, 2012, 12(1): 44-48.

- [63] Tong W Y, Fu X Y, Lee S M, et al. Purification of l(+)-lactic acid from fermentation broth with paper sludge as a cellulosic feedstock using weak anion exchanger Amberlite IRA-92[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2004, 18(2): 89-96.
- [64] Xiong B, Richard T L, Kumar M. Integrated acidogenic digestion and carboxylic acid separation by nanofiltration membranes for the lignocellulosic carboxylate platform[J]. *Journal of Membrane Science*, 2015, 489: 275-283.
- [65] Chan W N, Fu Z H, Holtzaple M T. Co-digestion of swine manure and corn stover for bioenergy production in MixAlco consolidated bioprocessing[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2011, 35(10): 4134-4144.
- [66] Giang T, Lunprom S, Liao Q, et al. Enhancing Hydrogen Production from *Chlorella* sp. Biomass by Pre-Hydrolysis with Simultaneous Saccharification and Fermentation (PSSF)[J]. *Energies*, 2019, 12(5).
- [67] Cho Y H, Lee H D, Park H B. Integrated Membrane Processes for Separation and Purification of Organic Acid from a Biomass Fermentation Process[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2012, 51(30): 10207-10219.
- [68] Joglekar H G, Rahman I, Babu S, et al. Comparative assessment of downstream processing options for lactic acid[J]. *Separation and Purification Technology*, 2006, 52(1): 1-17.
- [69] Purnama P, Jung Y, Hong C H, et al. Synthesis of poly(D-lactide) with different molecular weight via melt-polymerization[J]. *Macromolecular Research*, 2012, 20(5): 515-519.
- [70] Olaiya N G, Surya I, Oke P K, et al. Properties and Characterization of a PLA-Chitin-Starch Biodegradable Polymer Composite[J]. *Polymers (Basel)*, 2019, 11(10).
- [71] Abdel-Rahman M A, Tashiro Y, Sonomoto K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits[J]. *J Biotechnol*, 2011, 156(4): 286-301.
- [72] Tao S C, Huang J Y, Gao Y, et al. Small extracellular vesicles in combination with sleep-related circRNA3503: A targeted therapeutic agent with injectable thermosensitive hydrogel to prevent osteoarthritis[J]. *Bioact Mater*, 2021, 6(12): 4455-4469.
- [73] 吴雁, 吴若峰, 陶燕华, 何佩华. L-丙交酯和 D,L-丙交酯共聚物立体化学构型的计算机模拟[J]. *计算机与应用化学*, 2007, 24(5): 659-664.
- [74] 王海利, 周意扬, 等. 接枝咪唑阳离子对聚乳酸结晶行为影响研究[J]. *高分子学报*, 2016, 11(2): 1606-1614.
- [75] 崔国振, 贺继东, 董晶晶, 李永振. L-丙交酯的合成及其纯化条件优化研究[J]. *化学与生物工程*, 2009, 26(12): 41-44.
- [76] 张子勇, 陈燕琼. 丙交酯单体的制备及纯化[J]. *高分子材料科学与工程*, 2003, 19(2): 51-56.
- [77] 江昕, 陈连喜, 贺建华, 李世普. 丙交酯的合成与纯化研究[J]. *武汉理工大学学报*, 2002, 24(4): 42-44.
- [78] 靳文娟, 曹泽璞. L-丙交酯的合成及纯化[J]. *化学与生物工程*, 2015, 32-11(34-36).

- [79] 李藏. 稀土金属配合物的合成、表征及其在丙交酯开环聚合中的应用[J]. 兰州大学, 2017.
- [80] 石朔, 顾林, 杨义浒, 余海斌. 对分子质量线型和星形聚乳酸及其共聚物多元醇的合成、结构与性能[J]. 高分子材料科学与工程, 2016, 32(4): 1-6.
- [81] 诸婷婷, 谢明明, 龚狄荣. 含半不稳定边臂配体的钛配合物催化丙交酯聚合[J]. 材料导报, 2017, 31(7): 40-45.
- [82] Feng L, Bian X, Chen Z, et al. Determination of D-lactide content in purified L-lactide using gas chromatography-high performance liquid chromatography[J]. Polymer Testing, 2011, 30(8): 876-880.
- [83] Zheng Q, Zhang Y, Montazerian M, et al. Understanding Glass through Differential Scanning Calorimetry[J]. Chem Rev, 2019, 119(13): 7848-7939.
- [84] Kumar R, Singh S, Singh O V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives[J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2008, 35(5): 377-391.
- [85] 李守君, 佟德成. 聚 L-丙交酯合成工艺条件研究[J]. 化工新型材料, 2004, 32(4): 32-38.
- [86] Yoon J T, Jeong Y G, Lee S C, et al. Influences of poly(lactic acid)-grafted carbon nanotube on thermal, mechanical, and electrical properties of poly(lactic acid)[J]. Polymers for Advanced Technologies, 2009, 20(7): 631-638.
- [87] Cui X, Juan Z, Jing B. Two-Stage Crystallization Kinetics and Morphological Evolution with Stereocomplex Crystallite-Induced Enhancement for LongChain Branched Polylactide/Poly(D-lactic acid) Blends[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2021, 60(1): 5319-5329.
- [88] Zhang J, Zhu Z N. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation[J]. Biotechnology for biofuels, 2010, 3(26): 1754-1779.
- [89] Criquet S V. Measurement and characterization of cellulase activity in sclerophyllous forest litter[J]. Journal of Microbiology Methods, 2002(5): 10-14.
- [90] Bernard T, Lemont B K, Pierre A C. A Systems Approach to Molecular Structure, Intermolecular Recognition, and Emergence-Dissolvement in Medicinal Research[J]. Medicinal Research Reviews, 1997, 17(4): 303-326.
- [91] Cissé G, Essi M, Nicolas M, et al. Bradford quantification of Glomalin-Related Soil Protein in coloured extracts of forest soils[J]. Geoderma, 2020, 372.
- [92] Xu J, Chen Y Q, Zhang H J, et al. Effect of acetic acid on citric acid fermentation in an integrated citric acid-methane fermentation process[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2014, 174(1): 376-87.
- [93] Aulitto M, Fusco S, Nickel D B, et al. Seed culture pre-adaptation of *Bacillus coagulans* MA-13 improves lactic acid production in simultaneous saccharification and fermentation[J]. Biotechnol Biofuels, 2019, 12: 45.

- [94] Kuo Y C, Yuan S F, Wang C A, et al. Production of optically pure L-lactic acid from lignocellulosic hydrolysate by using a newly isolated and D-lactate dehydrogenase gene-deficient *Lactobacillus paracasei* strain[J]. *Bioresour Technol*, 2015, 198: 651-7.
- [95] Rahman M A, Sonomoto K. Opportunities to overcome the current limitations and challenges for efficient microbial production of optically pure lactic acid[J]. *J Biotechnol*, 2016, 236: 176-92.
- [96] Andrea K, Maria R W M, Rubens M F. Separation and Purification Technologies for Lactic Acid – A Brief Review[J]. *Bioresources*, 2017, 12(3): 6885-6901.
- [97] Wang Y, Ping L, Luan X, et al. A Mutation in VWA1, Encoding von Willebrand Factor A Domain-Containing Protein 1, Is Associated With Hemifacial Microsomia[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 571004.
- [98] Kumar A, Thakur A, Panesar P S. Lactic acid and its separation and purification techniques: A review[J]. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2019, 18(4): 823-853.

## 学术成果

申请专利：

申请号 CN202111163893.8，专利名称：一种乳酸片球菌的进化方法及其应用，类型：中国发明专利，专利申请日 2021/9/30。

已发表论文：

第二作者. Increasing acid tolerance of an engineered lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* for L-lactic acid production. *Fermentation*. 2022, 8(3), 96。

待发表论文：

第一作者 .Cyclic D-lactide synthesis from lignocellulose biomass by dry biorefinery processing

待发表专利：

一种使用木质纤维素生物质为原料生产的手性 D-乳酸合成 D-丙交酯的方法

## 致谢

研究生的三年生活即将画上句号。第一次来学校复试的场景还在脑海中，而我即将毕业离校，三年来有太多的点点滴滴让我依依不舍。三年来，不管在生活还是学习，留下来很多难忘的经历，经历了很多失败，同时，也得到了很多成功的喜悦，三年的研究生生活、学习让我在思想、身体各方面都有很大的进步，它将影响我后面一生。借此机会，在这里，我要向实验室的各位老师、同学以及一直在身后默默支持我的家人们表示最诚挚阿谢意！

首先，特别感谢我的研究生导师鲍杰教授。鲍老师在科研方面都是亲历亲为、兢兢业业，不仅在我论文的选题、实验教程、论文撰写与修改方面给了我极大的帮助和鼓励，而且也教我在生活、为人处事等方面的学习，鲍老师在学术方面的渊博和尽职尽责，以及处事方面永远是我学习的榜样。再次，再次感谢鲍老师。

其次，感谢贾佳师兄、颜钊师兄、何妮玲师姐、金慈师兄在实验方面对我的耐心指导和帮助，每次实验有困难时候，都会用他们渊博的知识帮我分析问题，我从中结合他们的建议，在实验方面一步一步的前进，实验失败很多次，在他们帮助下，最终让我收获了成功；感谢李静、徐迎迎、李景、吴磊、展宝睿师兄、张翼师兄、李治斌师弟、郭晓梦师妹等同学们在生活中的陪伴和帮助。

最后，感谢我的父母、姐姐们、姑爷、姑姑和亲人们在身后默默的帮助和支持，你们在生活中给了我极大的帮助和建议，我马上要踏入社会，我会用实际行动来报道你们的关爱。