

分类号: _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学

工程硕士学位论文

木质纤维素生物炼制加工链中
微量 D-乳酸的追踪与消除研究

郭晓梦

指导教师姓名: 鲍杰、教授、华东理工大学

刘文波、研究员、上海凯赛生物技术股份有限公司

申请学位级别: 硕士 工程领域: 生物与医药

论文定稿日期: 2023. 5. 8 论文答辩日期: 2023. 6. 2

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: _____

华东理工大学研究生学位论文提交要求

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

研究生学位论文全文电子版由档案馆按①（选择以下一项）方式，转交或不转交图书馆，并提供公开阅览服务。

- ① 可以公开
- ② 3年后公开
- ③ 10年后公开
- ④ 不公开

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

学位论文作者签名：郭晓梦

2023年6月5日

指导教师签名：鲍志

2023年6月5日

国家技术转移中心负责人签名：

（公章）

年 月 日

作者声明

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

论文作者签名：郭晓梦

2023年6月5日

木质纤维素生物炼制加工链中微量 D-乳酸的追踪与消除研究

摘要

手性乳酸是合成聚乳酸的主要单体，其两步法聚合过程包括乳酸单体缩聚、解聚合成丙交酯，以及丙交酯的开环聚合。乳酸的手性纯度 (>99.5%) 是合成丙交酯的关键指标。以资源丰富、价格廉价的木质纤维素原料替代淀粉类粮食作物，通过生物炼制技术生产高手性纯度乳酸在实现聚乳酸大规模产业化方面具有巨大潜力。木质纤维素原料经收集后，需经过预处理、酶促糖化、生物脱毒、乳酸发酵、分离纯化等生物炼制加工过程才能得到手性乳酸。前期研究发现，以敲除 D-乳酸脱氢酶的乳酸片球菌作为生产菌株，经干法生物炼制技术获得的纤维素 L-乳酸产品中始终存在微量 D-乳酸，且在后续分离纯化中难以将其去除，进而对 L-丙交酯和聚乳酸的性能造成威胁。本文针对上述问题，对干法生物炼制过程中杂质 D-乳酸的来源及遏制措施进行了探究，主要包括以下内容：

本文第一部分探究了纤维素 L-乳酸生产过程中杂质 D-乳酸的来源。结果表明干法生物炼制过程中的预处理、糖化、脱毒、发酵、提纯步骤以及脱毒菌株、乳酸发酵菌株均不存在 D-乳酸的生成现象。而生物质原料中的 D-乳酸则是造成 L-乳酸产品手性纯度降低的主要因素。进一步在各类木质纤维素原料中分离得到了众多乳酸生产菌株如鼠乳杆菌 WS1 (*Lactobacillus murinus* WS1)、粪肠球菌 CS2 (*Enterococcus faecalis* CS2)、屎肠球菌 RS4 (*Enterococcus faecium* RS4)、鸡肠球菌 BS2 (*Enterococcus gallinarum* BS2) 等。此类菌株可利用木质纤维素原料中少量的水溶性单糖生产 D-乳酸，从而导致 L-乳酸产品手性纯度降低。

本文第二部分从不同的角度出发提出了三种防止木质纤维素原料中寄生乳酸菌转化可溶性单糖生产 D-乳酸的方法，包括 (1) 降低生物质原料的含水量可形成抑制乳酸菌繁殖的环境从而阻断乳酸的生成；(2) 通过预处理操作将水溶性单糖转化为呋喃醛实现了从源头阻断乳酸生成的目的；(3) 接种 L-乳酸工程菌将水溶性单糖转化为 L-乳酸从而抑制 D-乳酸的生成。这三种策略均有效的降低了生物质原料中 D-乳酸的含量。

本文的第三部分进一步对生物质原料储存过程中乳酸含量变化的规律进行了初步研究。本章发现水溶性单糖和乳酸同时存在时，寄生乳酸菌会优先利用糖生成乳酸；随着糖耗尽寄生乳酸菌开始利用乳酸生成乙酸。寄生乳酸菌将乳酸转化为乙酸的可能代谢途径包括：首先乳酸在乳酸氧化酶的作用下被氧化成丙酮酸并生成过氧化氢，然后丙酮酸继续氧化脱羧生成乙酰辅酶 A 并与磷酸作用，生成乙酰磷酸，进一步转化为乙酸。上述代谢路径仅为初步研究结果，还需进一步验证。

综上所述，本文以生产极高手性纯度的纤维素 L-乳酸为目的，探究了干法生物炼制

过程中杂质 D-乳酸的主要来源途径及其生物合成机制。针对生物质原料中生成和积累的消旋 D-乳酸对 L-丙交酯熔点的影响进行了分析，并提出三条阻断生物质原料中的水溶性单糖向 D-乳酸转化的策略。本研究不仅解决了纤维素乳酸实际生产过程中手性纯度降低的问题，也为生物炼制中木质纤维素原料的长期储存方法提供了思路。

关键词：纤维素 L-乳酸；高手性纯度；生物质原料；水溶性单糖；寄生乳酸菌

Trace and Elimination of D-lactic acid Lignocellulose Biorefining Chain

Abstract

Chiral lactic acid is the main monomer for the synthesis of PLA. The two-step synthesis process includes polycondensation of chiral lactic acid to prepolymer, depolymerization of prepolymer into cyclic lactide, and ring-opening polymerization of lactide. The chiral purity of L-lactic acid (>99.5%) is the key indicators for synthesis of lactide. The production of highly chiral pure L-lactic acid by biorefinery technology with resource-rich and low-cost lignocellulose feedstocks instead of starch food crops has great potential for achieving large-scale industrialization of PLA. Lignocellulose feedstocks is collected and needs to enter the biorefinery process chain of pretreatment, glycation, biological detoxification, and L-lactic acid fermentation to obtain chiral L-lactic acid. Previous studies have found that trace amount of D-lactic acid exists in cellulose L-lactic acid obtained by dry biorefinery technology using the D-lactate dehydrogenase knockout *Pediococcus acidilactici* as the production strain. It is difficult to remove D-lactic acid in the subsequent separation and purification, which seriously and adversely affects the properties of L-lactide and PLA. In view of the above problems, this paper explores the source and containment measures of D-lactic acid in the dry biorefinery process, mainly including the following contents:

In the first part of this thesis, the source of D-lactic acid in cellulosic L-lactic acid production was investigated. The results showed that there was no formation of D-lactic acid in pretreatment, saccharification, detoxification, fermentation and purification steps in the dry biorefinery process, as well as in the detoxified strain and lactic acid fermentation strain. However, the D-lactic acid in biomass feedstocks is the main factor causing a decrease in the chiral purity of L-lactic acid. Furthermore, several lactic acid-producing strains were isolated from lignocellulose feedstocks, including *Lactobacillus murinus* WS1, *Enterococcus faecalis* CS2, *Enterococcus faecium* RS4 and *Enterococcus gallinarum* BS2. Such strains can use a small number of water-soluble sugars in lignocellulose feedstock to produce D-lactic acid, which leads to a decrease in the chiral purity of L-lactic acid products.

In the second part of this thesis, three strategies are proposed from different perspectives to block the conversion of water-soluble sugars to D-lactic acid by parasitic lactic acid bacteria in lignocellulosic raw materials: (1) Reducing the moisture content of biomass feedstock to inhibit the growth of parasitic lactic acid bacteria and thus block the production of lactic acid; (2) Converting the water-soluble sugars to furan aldehydes by pretreatment to block the production of lactic acid at source; (3) Inoculation of L-lactic acid engineered bacteria to

convert water-soluble sugars to L-lactic acid and inhibit the production of D-lactic acid. All three strategies effectively reduced the content of D-lactic acid in biomass feedstock.

In the third part of this thesis, we further studied the variation of lactic acid content during the storage of biomass feedstocks. Parasitic lactic acid bacteria preferentially used sugars to produce lactic acid in the presence of water-soluble sugars and lactic acid. Then it started to use lactic acid to generate acetic acid after the depletion of sugar. The main pathway may be that lactic acid is oxidized to pyruvate and hydrogen peroxide under the action of lactate oxidase, and then pyruvate continues to be oxidatively decarboxylated to generate acetyl-CoA and reacts with phosphoric acid to generate acetyl phosphate, which is further converted into acetic acid. The above metabolic pathways are only preliminary findings and need to be further verified.

Conclusively, with the aim of producing cellulose L-lactic acid with extremely high chiral purity, the main source pathways and biosynthetic mechanisms of D-lactic acid in the dry biorefinery were investigated. The effects of D-lactic acid generated and accumulated in biomass feedstock on the melting point of L-lactide were analyzed. Then three strategies were proposed to block the conversion of water-soluble sugars to D-lactic acid in biomass feedstock. This study not only solved the problem of reduced chiral purity in the actual production process of cellulosic lactic acid, but also provided ideas for the long-term storage of lignocellulosic raw materials in biorefinery.

Keywords: Cellulose L-lactic acid; High chiral purity; Lignocellulose; Soluble sugars; Parasitic lactic acid bacteria

目录

第 1 章 文献综述.....	1
1.1 木质纤维素生物炼制.....	1
1.2 聚乳酸.....	3
1.2.1 聚乳酸的合成方法.....	3
1.2.2 聚乳酸的降解.....	6
1.2.3 聚乳酸的应用.....	7
1.3 乳酸.....	8
1.3.1 乳酸的基本性质.....	8
1.3.2 乳酸合成方法.....	9
1.3.3 乳酸发酵原料.....	9
1.3.4 乳酸发酵微生物.....	10
1.3.5 乳酸的应用.....	12
1.4 丙交酯.....	12
1.4.1 丙交酯的基本性质.....	12
1.4.2 丙交酯的合成.....	13
1.4.3 丙交酯的消旋化.....	14
1.5 本论文立题依据和主要研究内容.....	15
第 2 章 纤维素 L-乳酸中杂质 D-乳酸的引入途径及生成机制研究.....	17
2.1 引言.....	17
2.2 材料与方法.....	18
2.2.1 生物质原料、酶、试剂.....	18
2.2.2 菌株、培养基及培养条件.....	18
2.2.3 干酸预处理、糖化与液态脱毒.....	19
2.2.4 乳酸生产菌株的筛选与鉴定.....	19
2.2.5 分析方法.....	19
2.3 结果与讨论.....	20
2.3.1 生物炼制加工链的 D-乳酸印迹追踪.....	20
2.3.2 生物质原料中乳酸生产菌株的筛选与鉴定.....	22
2.3.3 生物质原料中水溶性单糖的分析.....	25
2.4 本章小结.....	25
第 3 章 木质纤维素生物质中 D-乳酸的生成及其遏制.....	27

3.1	引言	27
3.2	材料与方法	28
3.2.1	生物质原料、酶与试剂	28
3.2.2	菌株、培养基及培养条件	28
3.2.3	生物质原料储存	28
3.2.4	纤维素 L-乳酸的同步糖化共发酵 (SSCF)	28
3.2.5	L-丙交酯的合成	29
3.2.6	分析方法	29
3.3	结果与讨论	29
3.3.1	生物质原料中 D-乳酸的生成及其对 L-丙交酯聚合的影响	29
3.3.2	降低生物质含水量阻断水溶性单糖转化为乳酸的途径	31
3.3.3	通过预处理将水溶性单糖转化为呋喃醛阻断乳酸生成的途径	33
3.3.4	将生物质原料中的水溶性单糖转化为 L-乳酸的 D-乳酸生成阻断途径	38
3.4	本章小结	39
第 4 章 生物质原料密封储存过程中乳酸含量变化的规律研究		41
4.1	引言	41
4.2	材料与方法	41
4.2.1	菌株、培养基及培养条件	41
4.2.2	分析方法	42
4.3	结果与讨论	42
4.3.1	野生乳酸菌代谢葡萄糖和乳酸的能力研究	42
4.3.2	野生乳酸菌代谢 L/D-乳酸的能力研究	43
4.4	本章小结	46
第 5 章 结论与展望		47
5.1	结论	47
5.2	创新点	48
5.3	展望	48
参考文献		49
致谢		63
学术成果		64

第1章 文献综述

随着全球经济发展, 人类需求持续增加, 以煤炭、石油、天然气等化石燃料为主的不可再生资源过度消耗不仅引起了严重的环境污染问题, 而且可能导致能源危机。因此开发具备节约能源、低碳、循环等特性的绿色能源具有迫切的现实意义。木质纤维素作为世界上储量最为丰富的可再生资源, 已获得各界关注, 是替代石化能源的最佳原料之一。不同来源的木质纤维素可用于生产不同的化学品, 如生物燃料(乙醇、甲烷、氢气)、生物基化学品(乳酸、木糖醇、糖酸)及酶(纤维素酶、淀粉酶、蛋白酶)等。随着温室气体排放过多引起的全球变暖和塑料降解引起的塑料污染等问题层出不穷, 木质纤维素来源的生物塑料聚乳酸 PLA 将成为未来的研究热点之一^[1]。

1.1 木质纤维素生物炼制

木质纤维素涵盖农业残渣(秸秆、稻草、甘蔗渣)、林业产品(硬木、软木)、城市固废(废纸)及能源植物(柳枝稷、杨树)等, 来源丰富且极易获得^[2]。木质纤维素是一种复杂的生物质, 由纤维素、半纤维和木质素构成, 其中纤维素占总干重的 20%-50%, 半纤维占 15%-35%, 木质素占 15%-25%, 此外还有少许果胶、蛋白质、脂类和灰分等物质^[3]。纤维素是细胞壁的重要组成部分, 其化学结构非常简单, 是一种通过 β -1,4-糖苷键连接 D-吡喃葡萄糖单体形成的大分子均聚多糖。纤维素分子间平行分布且存在众多氢键, 构成了难以被酶降解的致密结晶结构。纤维素不溶于水、稀酸和多数常见溶剂, 可溶于浓酸、浓碱。半纤维是一种结构相对复杂的异聚糖, 由戊糖(木糖、L-阿拉伯糖)、己糖(甘露糖、葡萄糖、半乳糖)、糠醛酸(葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸)等多种化学物质组合而成。半纤维素的聚合度远低于纤维素, 紧密缠绕在纤维素微纤丝上, 有效地阻碍了纤维素的分解。半纤维素可溶于碱(10% KOH、18% NaOH)、二甲基亚砷, 极少数情况下可溶于热水。木质素是一种多功能的芳香族化学物质, 包裹在纤维素和半纤维的表层, 由羟苯基(H)、愈创木基(G)和紫丁香基(S)三种基本结构组成, 可有效地抑制聚糖解聚^[4-6]。纤维素与半纤维素、果胶、木质素通过氢键连接在一起, 而木质素又通过氢键、共价键与纤维素、半纤维相互作用, 从而形成难以被降解的刚性复杂结构。木质纤维素生物炼制是指通过预处理、酶促水解、生物脱毒和产品发酵等步骤, 将低廉的木质纤维素原料转化为高附加值化学品, 从而替代石油基化合物。

木质纤维素生物质原料结构致密且繁杂, 需毁坏其结晶结构获得可发酵糖, 因此预处理操作是难以避免的步骤。高效率的预处理操作目的是降低纤维素的结晶度和聚合度, 使纤维素中间的氢键断裂, 从而促进酶的可作用效率, 提高后期酶水解得率, 在减少可发酵糖耗损的同时降低抑制物含量、能耗、成本及设备要求和处理周期等^[7]。预处理操作主要有物理、化学、物理-化学和生物法, 其中物理法包含切碎和研磨, 化学法是添加碱、酸、氧化剂或有机溶剂等试剂与原料进行反应。如今最常用的预处理手段是碱预处

理与酸预处理。碱预处理的机制是木质素易在碱性条件下降解，从而促进纤维素和半纤维素酶的可接近性。该法的优点是反应条件温和、抑制物生成量低。缺点是会产生大量废水，对木质纤维素的降解效率较低，酶水解效率较低，而且木质素的脱除会导致部分半纤维素损失^[8]。酸预处理法是将原料与稀酸溶液混合后置于高温高压条件下进行短暂反应，使半纤维素完全降解为单糖、木质素部分降解。此方法对仪器设备要求高，并会产生大量抑制物，但其高效性和可行性是目前最有望实现大规模化应用的技术之一^[9]。相较于常规的稀酸预处理技术，本课题组于 2010 年开创了一种在极高固液比（1:2）条件下进行的干式稀酸预处理技术^[10]，该技术在含有螺带式搅拌桨的预处理反应器中将原料与酸液充分混合，得到高固含量的物料（40%-60%），实现了预处理过程中低能耗和零废水排放，预处理过程中释放的木糖能被保留下来。

预处理操作会使得木质纤维素被过度降解，生成影响后续酶水解步骤及微生物生长代谢的抑制物，其来源途径如图 1.1^[11]。其中，五碳糖降解为糠醛，六碳糖降解为 5-羟甲基糠醛，乙酰基断裂形成弱酸类抑制物（乙酸），木质素降解为酚醛类抑制物（香草醛、丁香醛、苯醌）。目前，常用的抑制物脱除法包括水洗、碱中和、活性炭吸附法、离子吸附法及生物脱毒法等。前几种脱毒方法会在脱除抑制物的过程中会形成大量的工业废水，同时带走诸多可发酵糖，而生物脱毒法成本相对低、反应条件相对温和且不涉及有毒有害化合物，已成为抑制物脱除的研究焦点。Liu 等人^[12]分离出三株（粪肠球菌 B101，乙酸钙不动杆菌 C1 和铜绿假单胞菌 CS）能够利用氨预处理后玉米秸秆中的酚醛类物质，本实验室也分离得到两株可完全降解抑制物的菌株，在后续发酵中使目的产物产量的得到了提高^[13]。

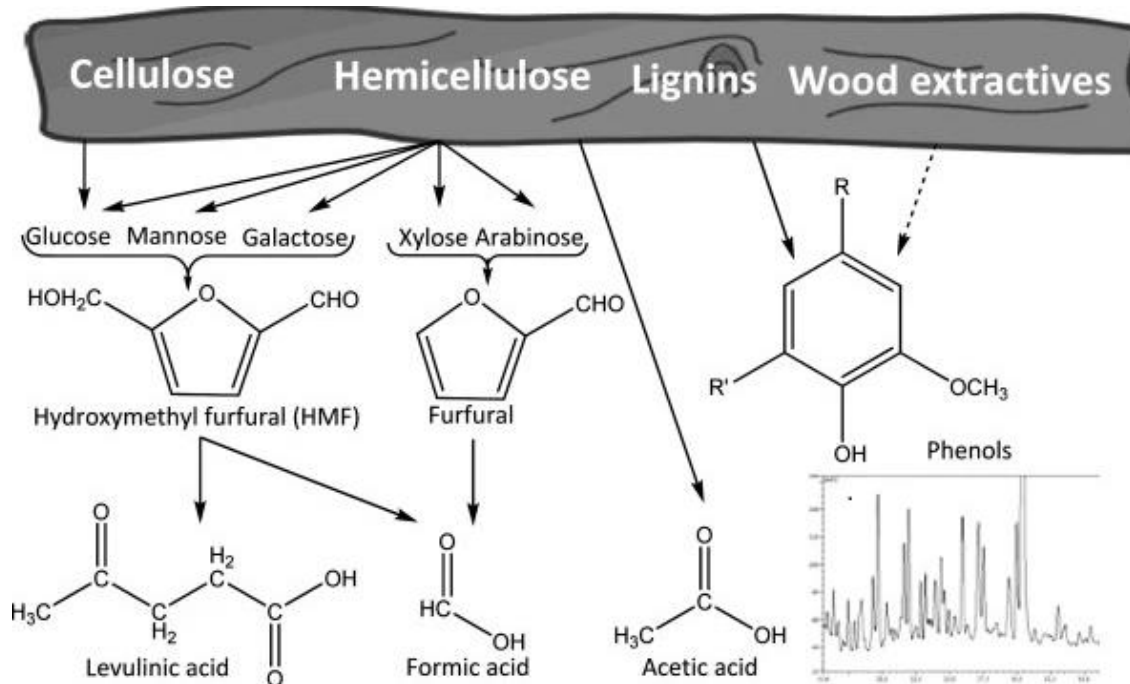


图 1.1 木质纤维素组成及抑制物来源^[11]

Fig. 1.1 Composition and main inhibitor source of lignocellulosic biomass^[11]

木质纤维素在经过预处理和脱毒步骤后，需添加能够水解纤维素和半纤维素的酶，以得到供后续发酵利用的可发酵单糖。利用木质纤维素进行发酵一般有两种方式，分别为分步糖化与发酵（SHF）和同步糖化与共发酵（SSCF）。SHF 是先将木质纤维素原料酶解后把得到的可发酵单糖分离出来，再利用水解液作为底物进行微生物发酵，该法的优点是可在各工段的最优条件下进行，缺点是酶水解过程中释放的单糖浓度高会抑制酶解效率、水解液中初始糖浓度过高会抑制微生物生长以及操作复杂、时间成本高等。SSCF 是酶水解过程和发酵同时进行，该法的优点是微生物可及时利用糖化过程中释放的单糖，消除糖积累对纤维素酶的抑制作用从而提高酶解效率、产物产量，处理时间快，缺点是糖化与发酵工段的温度、pH 不统一，会导致酶水解效率低，但选择能耐高温的发酵菌株如凝结芽孢杆菌可成功避免这一缺点^[14]。综上所述，相较于 SHF，SSCF 是从木质纤维素等可再生资源中生产乳酸的最优策略之一。

1.2 聚乳酸

聚乳酸（简称 PLA）主要是以可循环再生资源，如玉米、小麦、水稻、土豆等各类农作物及植物秸秆为底物^[15-17]，经预处理操作和微生物发酵后得到乳酸，乳酸在经过分离纯化、浓缩、预聚、解聚之后进一步聚合而制成的，又称聚丙交酯，属于聚酯家族。PLA 的生产过程不会产生化学废弃物，并且在使用之后可通过自然界中的微生物、酸、碱、水等功能媒介降解为二氧化碳和水，是一种新型的可降解高分子材料，其性能与石油基聚酯材料相媲美^[18]。

聚乳酸的分子式为 $(C_3H_4O_2)_n$ ，通常不溶于水，储存于 2-8°C 的条件下^[19]，不同旋光异构体的聚乳酸基本性质如表 1.1 所示。聚乳酸有三种旋光异构体，分别为聚 L-乳酸（PLLA）、聚 D-乳酸（PDLA）和聚 D,L-乳酸（PDLLA），分别由乳酸或丙交酯的左旋体（-）、右旋体（+）、消旋体聚合而成。其中 PLLA 和 PDLA 具有结晶性和较高的熔点，而聚 D,L-乳酸熔点低、无旋光性、强度低、容易分解。在人类和其它哺乳动物中仅能代谢 L-型异构体，因此 PLLA 的应用范围更为广泛。

表 1.1 不同旋光异构体的聚乳酸基本性质^[20]

Table 1.1 Basic properties of polylactic acid with different optical rotation isomers^[20]

聚乳酸种类	性质				
	熔融温度 /°C	玻璃化温度 /°C	热分解温度 /°C	机械性能	降解时间 /月
聚 D-乳酸	180	55-65	310	硬而脆	12-30
聚 L-乳酸	170-175	55-65	310	硬而脆	12-30
聚 D,L-乳酸	无定型非晶态、无固定熔点	55-65	185-200	硬而脆	6-12

1.2.1 聚乳酸的合成方法

PLA 以乳酸为聚合单体，由多个乳酸分子间的羟基（-OH）和羧基（-COOH）缩水

聚合而成。据报道合成聚合物 PLA 的方法有四种，分别为直接缩聚法、共沸脱水缩合法、丙交酯开环聚合法^[21]及微生物发酵法。

(1) 直接缩聚法

直接缩聚法又称一步聚合法，具体为乳酸分子的羟基和羧基在等摩尔浓度下脱水缩合形成的低聚物，然后通过添加偶联剂和酯化剂催化低分子量的聚合物合成相对分子质量更高的 PLA。这种方法通过借助有机溶剂将聚合单体乳酸进行酯化反应并利用高温和渐进式真空除去生成的水^[22]，Ponmanee 等^[23]利用鼠李糖乳杆菌发酵得到的乳酸为单体，在 PTSA 的催化作用下采取直接缩聚法成功聚合出了分子量为 232 Da 的聚乳酸；Zhao 等^[24]以混合的 DL-乳酸为原料，在氯化锡的催化作用下直接缩聚合成了 4100 Da 的 PDLLA。该法的优点是成本低，步骤简易，同时也具有不可避免的缺点。首先是安全，该反应过程中产生的蒸馏副产物不能在体内降解，会在医疗应用中引起严重的并发症。其次是通过该法所得到的 PLA 相对分子质量不高，机械性能差。同时在该工艺中使用的偶联剂和辅助剂增加了该工艺的复杂性，需在后期纯化过程中引入双三氯甲基碳酸酯才能将其去除，而易燃溶剂的添加增加了潜在隐患，因此这种方法不适合广泛的应用。

(2) 共沸脱水缩合法

共沸脱水缩合法是在共沸溶液中直接缩聚，包括游离水的去除、低聚物缩聚、溶体缩聚、聚乳酸被冷却到熔融温度以下形成颗粒并结晶等步骤^[25]。共沸溶液是两种或两种以上化学液体的混合物，使用这种方法可实现高分子量聚乳酸的合成。黎莉^[26]等研究了催化剂的种类和添加量、乳酸与溶剂的比例及反应时间对聚乳酸制备的影响，最终合成了相对分子质量为 6.6×10^4 的 PLA。在另一研究中，Kim 等^[27]使用氯化锡作为催化剂、采用共沸缩聚法合成了高分子量（33,000 Da）的 PLLA。乳酸分子间脱水形成的水分子是影响 PLA 聚合的主要因素，Yin 等^[28]通过在聚合过程中加入与水反应的镁或甲醇镁作为脱水剂，显著提高了 PLA 分子量。该法的优点是反应温度低、反应过程容易控制，共沸溶液的存在有益于降低蒸馏压力和反应体系粘度、排出小分子水，合成高分子量的 PLA 并通过分子筛的作用从溶剂中分离，降低了后期纯化的难度。缺点是聚合过程耗时，添加的甲苯或二甲苯等有机溶剂易引发环境污染问题。

(3) 丙交酯开环聚合法

丙交酯开环聚合法又称二步法，是目前比较成熟且生产高分子量聚合物 PLA 最常见的方法，主要包括乳酸缩聚、解聚生成丙交酯的环状二聚体及丙交酯开环聚合生成聚乳酸。具体过程是将乳酸加入到含有真空和搅拌器的反应釜中进行脱水缩合，再加入氧化锌、四氯化锡、三氯化镁等催化剂催化乳酸低聚物解聚生成丙交酯，接着在以丙交酯为前体，在辛酸亚锡、二氯化锡、三氯化硼等催化剂的作用下使其开环发生聚合反应，从而获得分子量更高的聚乳酸。开环聚合（ROP）包括阳/阴离子开环聚合两类，前者产生的聚乳酸分子量较低，而后者易加剧聚乳酸的外消旋化。Ehsani 等^[29]通过研究催化剂种类、聚合温度及压力等条件，发现氯化锡和辛酸锡作为催化剂时丙交酯转化率最高，并且其合成速率随着反应温度的上升、压力的降低而增加，但过高的温度会降低粗丙交

酯的光学纯度和化学纯度。虽然在 ROP 的过程中需要添加催化剂，但可以通过改变反应条件控制 PLA 的分子量和纯度，是目前国内外工业上普遍使用的技术。

丙交酯开环聚合法除了使用锡类化合物作为催化剂之外，还可利用无毒无污染的酶作为催化剂。据报道，目前已有研究使用酶作为 ROP 中的催化剂来制备无金属聚乳酸，从而降低聚合温度。Rahmayetty^[30,31]等人使用假丝酵母脂肪酶、念珠菌脂肪酶作为催化剂实现了丙交酯的开环聚合，成功聚合出了不含重金属的高分子量聚合物，可用于生物医学材料。这种以脂肪酶为催化剂，采用 ROP 合成聚乳酸的过程不仅未使用金属催化剂，还使解聚过程中的温度从 200-250°C 降低到了 60-110°C，减少了能源消耗^[32-34]。聚乳酸的分子量及性能在很大程度上受丙交酯单体质量的影响，而丙交酯的性质又与温度、压力、低聚物的分子量和催化剂等因素相关。相较于一步法，通过丙交酯开环聚合法可以合成分子质量更高的 PLA，但对中间产物丙交酯的质量要求也高。该法聚合过程长，收率相对低，合成成本高。

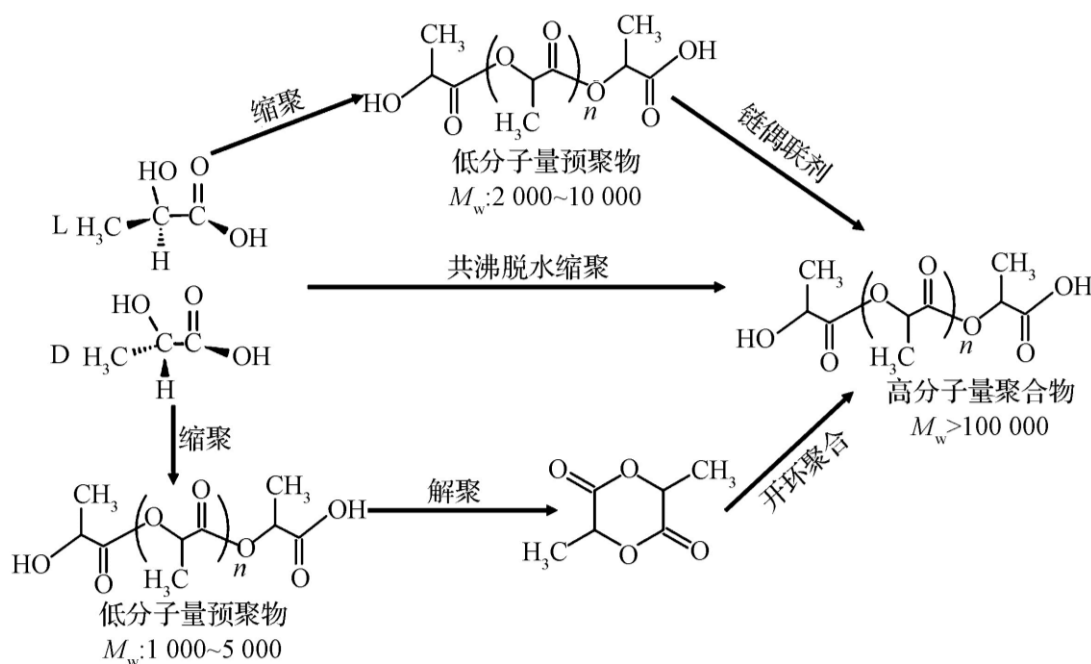


图 1.2 聚乳酸合成途径示意图^[35]

Fig. 1.2 Diagram of synthesis pathway of polylactic acid^[35]

(4) 微生物发酵法

微生物发酵法是通过基因工程手段改造微生物使其在发酵过程中生产目标产物聚乳酸及其共聚物的方法，目前所发现的与聚乳酸及其共聚物合成有关的酶是丙酸辅酶 A 转移酶和聚羟基链烷酸 (PHA) 合酶 (图 1.3)^[36]。Jung 等^[37,38]为了促进聚乳酸及其共聚物的生物合成，将 MBEL 6-19 PHA 合酶 (PhaC1Ps6-19) 在体外进行诱变以生成乳酰辅酶 A，同时将大肠杆菌生产 PLA 代谢途径中的 *ackA*, *ppc* 和 *adhE* 基因敲除，并基于计算机基因组规模的代谢通量将启动子从 *ldhA* 和 *acs* 替换为 *trc*，从而使大肠杆菌重组

菌株可用于生产聚乳酸。Shi 等^[39]在大肠杆菌中构建了含替代 I 类 PHA 合成酶(PhaCCs)和 *sulA* 基因的工程菌株 *E. coli* MS6, 实现了以葡萄糖为原料生产高分子量聚乳酸, PLA 的浓度和平均分子量分别为 955.0 mg/L、21000 Da。利用微生物发酵法生产的 PLA 适用于生物医学方面, 具有高分子量, 强度高等优点。与其他方法相比利用微生物生产 PLA 仍然具有挑战性, 其生产率低。

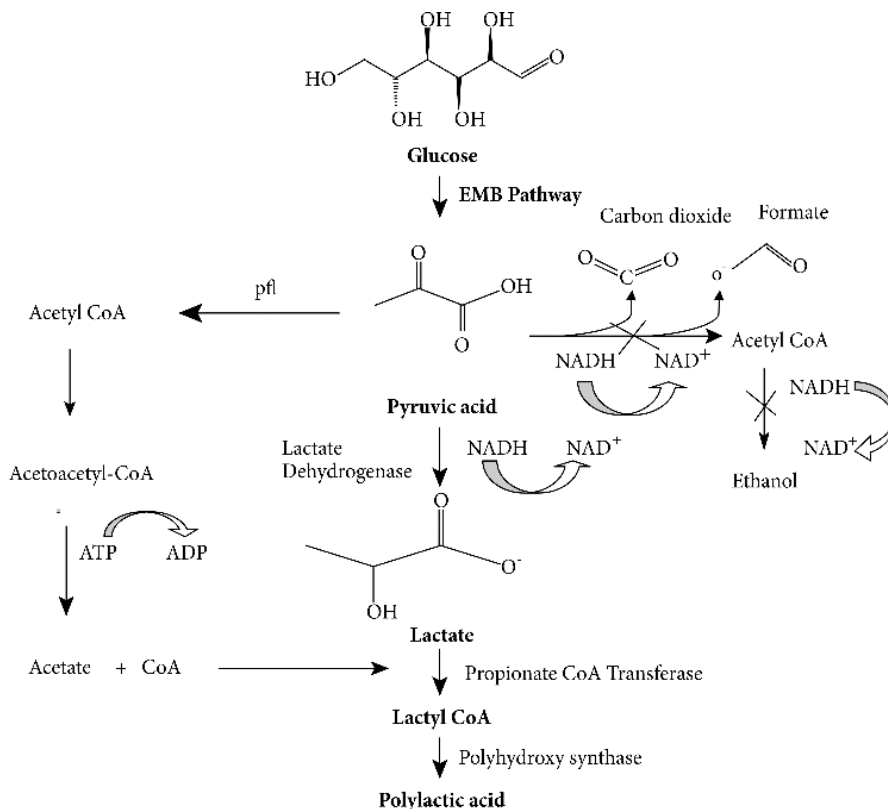


图 1.3 通过代谢工程生产聚乳酸的示意图^[36]

Fig. 1.3 A schematic presentation of production of poly(lactic acid) by metabolic engineering^[36]

1.2.2 聚乳酸的降解

在“双碳”战略背景下, 生物可降解性塑料被广泛应用于解决环境问题。聚乳酸的降解关键是由主链、侧链和交叉链的断裂引起的, 通常有水解和生物酶解两种方式^[40]。

聚乳酸的水解过程可分为两个阶段: 首先是非结晶区的降解, 水分子首先渗入非结晶区, 水解主链上的 C-O 键, 之后酯键断裂, 形成短链聚合物(如低聚物、二聚体或单体)。其次是结晶区的降解, 当非结晶区降解完成后, 水分子开始进入结晶区, 由晶区边缘向晶区内部扩散, 直到聚乳酸和低聚物被彻底降解为水和二氧化碳^[18,41-43]。

微生物降解法是自然界中最常见的方式, 通常涉及两种酶, 分别为细胞外解聚酶和细胞内解聚酶。当高分子量的 PLA 被水解成分子量小于 100,000 Da 低聚物时, 聚乳酸降解微生物开始作用。首先微生物向外排出细胞外解聚酶, 将低聚物或低分子量化合物分解成更短的小分子, 然后在进入细胞, 通过细胞内降解酶进一步分解^[44]。聚乳酸可被许多微生物降解, 普遍为放线菌, 少数为细菌或真菌, 如芽孢杆菌、腐殖菌等^[45]。有文

献表明, 镰刀酶念珠菌、青霉菌可彻底降解聚 D-乳酸, 部分可降解聚乳酸低聚物; 一些酶类也可催化聚乳酸的降解, 如羧基酯酶、角质酶、脂肪酶、蛋白酶 K 等^[46,47]。

聚乳酸的降解与许多因素有关, 首先是结晶区与否, 聚乳酸结晶区的分子结构排列致密, 水或酶分子难以进入其内部, 因此降解速度慢于非结晶区。其次是聚乳酸的分子量大小和分布, 分子量越小、分布越分散聚合物的结构越疏松, 水越容易进入引起聚合物的水解, 从而加速降解速率。此外, 聚乳酸的降解速率还与其粒径、形状、湿度、温度、pH、结晶度、D-异构体百分比、残留乳酸含量、催化剂中的金属杂质等因素有关^[48]。

1.2.3 聚乳酸的应用

与其他石油基聚合物相比, PLA 的生产过程十分环保, 如合成聚乳酸的单体乳酸可通过可再生生物质原料发酵得到, 而且用于乳酸发酵的生物质基质还可固定二氧化碳, 具有节约能源、缓解温室效应的作用。其次 PLA 材料在使用后可降解为乳酸或二氧化碳、水, 从而减少垃圾的填埋量, 改善农业经济。与其他脂肪族聚酯相比, PLA 具备高机械强度、高模量、生物可降解性、生物相容性、生物吸收性、透明度、节能、低毒性和易加工性等特性, 可广泛应用于医疗、包装、农业等各个领域。

(1) 包装行业中的应用

聚乳酸具有优良的拉伸强度和耐溶剂性, 可被制作成各种形式的塑料。Auras 等^[49]通过将两种 PLA 薄膜样品和聚苯乙烯 (PS)、聚对苯二甲酸乙二醇酯 (PET) 聚合物进行对比, 发现 PLA 薄膜的拉伸强度高于 PS, 熔点和玻璃转化温度均比 PET 和 PS 高, 这使得 PLA 更适合热封和热加工。聚乳酸具有较强的生物相容性, 不会释放出或产生有害物质, 可作为包装盒等产品与食品直接接触; 其具有的阻隔性能可用作水果蔬菜保鲜袋, 隔绝外界空气防止被氧化; 还可通过与抗菌材料复合, 用作抗菌包装, 广泛应用于食品包装、薄膜制品、一次性餐具及服装等领域。

(2) 农业生产中的应用

聚乳酸很容易被天然存在的环境微生物降解成二氧化碳和水, 而传统塑料如 PE、PP、PS 和 PVC 等都具有抵抗微生物攻击的能力。因此聚乳酸可被做成农用地膜、幼苗保护膜、果实保护套、渔网等产品^[50], 减少对环境的污染, 并且在降解过程中形成的聚乳酸低聚物或乳酸可作为农作物的肥料, 促进其生长, 提高产量^[51]。

(3) 医疗行业中的应用

聚乳酸是生物医学领域中的良好候选者。聚乳酸来源的手术缝合线不仅满足缝线要求的强度, 而且还可随着伤口愈合慢慢在体内分解。聚乳酸制成的骨骼固定材料、医疗材料和器械、药物传递微球等诸多治疗产品^[52,53], 均可在体内自然分解后排出, 降低重复开刀给患者造成的伤害^[54]。聚乳酸可作为金属器械的替代物, 避免其产生的应力遮挡效应。PLA 还是抗癌、心脏病、高血压、止痛等长期服用药物的最佳载体, 这些应用给医疗技术带来了巨大进步^[55]。

(4) 工业领域的应用

在汽车行业, 关于限制二氧化碳的排放规定已逐步实施, 因此汽车供应商和制造商

正在做出重大努力以减少燃料消耗和排放，聚乳酸的高拉伸强度、刚度且易于成型等特点，可替代金属部件或其他部件应用于汽车上面。丰田是第一家使用含有天然纤维（红麻）的 PLA 来生产备用轮套的制造商，于 2003 年安装在丰田的 Raum 上^[56]。Kumar 等人^[57]成功地制造了不同质量的苧麻纤维增强 PLA 生物复合材料，应用于汽车仪表板面板。由于 PLA 具有碳中和的优势，还被应用于个人电脑、手机、汽车等零件方面，预计未来还将有许多其他要求材料环境兼容性的应用，如育婴箱等。

1.3 乳酸

乳酸(α -羟基丙酸)，是合成丙交酯、聚乳酸的主要前体，是一种天然存在的有机酸，也可以通过发酵或者化学合成法来制备的重要的化工产品，在人体、动物、植物和微生物中普遍存在^[58]。

1.3.1 乳酸的基本性质

乳酸(LA)是一种最基础的羧基酸，分子式为 $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ ，相对分子质量为 90.08。乳酸标品为无味、无色液体，工业品为无色至浅黄色液体，具有吸湿性，其基本性质如表 1.2 所示^[59]。乳酸分子中存在的不对称性碳原子使其具有光学活性，可分为 L-乳酸和 D-乳酸(图 1.4)，分别由 L-乳酸脱氢酶(LLDH)和 D-乳酸脱氢酶(DLDH)催化丙酮酸所得^[60]。由等比例 L-乳酸和 D-乳酸掺杂而成的 DL-乳酸为外消旋乳酸，不具旋光性。两种异构体除了旋光性不同以外，其物理性质均一致(熔点、溶解度、解离常数、密度等)，因此通过传统的分离技术很难将两种异构体分开。由高光学纯度的手性 D-乳酸/L-乳酸分别作为单体聚合而成的聚 D-乳酸/聚 L-乳酸，其耐热性能和力学性能均优于 D,L-混合型乳酸聚合而成的聚 D,L-乳酸^[18,61]。因此，对于聚乳酸工业来说，手性乳酸的重要性远大于 D, L-混合型的内消旋乳酸。因 L-乳酸存在于所有动物和微生物的代谢系统中，并且 D-乳酸不能被人体代谢，因此 L-乳酸的需求范围更加广泛。

表 1.2 乳酸的基本性质^[59]

Table 1.2 Basic properties of lactic acid^[59]

性质	L-乳酸	D-乳酸	内/外消旋乳酸
密度(20°C, g/L)		1.249	
熔点(°C)	53.0	52.8	16.8
沸点(°C)	125 (760 mm Hg)	103 (15 mm Hg)	82.0 (D, L, 0.5 mm Hg) 122.0 (D, L, 15 mm Hg)
解离常数(pKa, 25°C)	3.79	3.83	3.86
溶解性	易溶于乙醇、水、丙酮、甘油；不溶于氯仿、石油醚、二硫化碳等；与醚完全混溶		

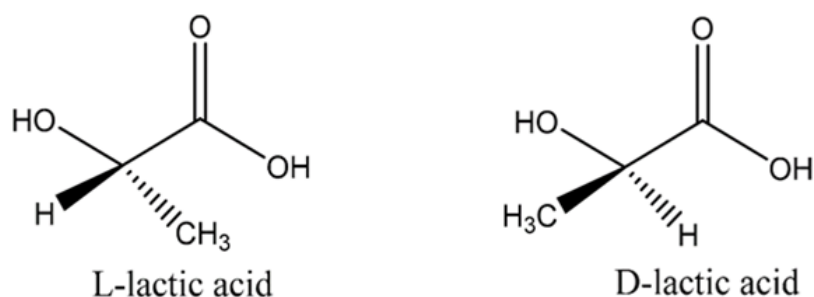


图 1.4 乳酸的结构式

Fig. 1.4 Molecular formula of Lactic acid

1.3.2 乳酸合成方法

乳酸于 1780 年由瑞典科学家 Scheele 初次发现，乳酸菌于 1878 年初次从酸奶中分离得到，并在 1881 年实现了乳酸的工业化生产^[62,63]。乳酸主要通过化学合成和微生物发酵两种方法生产^[7]。

其中化学合成法包含乳腈法、丙烯腈法和丙酸法三种。乳腈法合成乳酸的原理是，乙醛和氰化酸（HCN）在高压条件下由碱性催化剂催化得到粗乳腈，粗乳腈经过蒸馏纯化后在浓盐酸或浓硫酸作用下水解生成外消旋乳酸^[64,65]。丙烯腈法是丙烯腈在硫酸存在时水解生成乳酸，丙酸法是丙酸经过氯化、水解后得到乳酸。虽然这三种方法能够实现乳酸的大规模生产，但使用的原材料普遍有毒且成本昂贵，未达到绿色化学的标准^[7]。另外利用化学法水解生成的乳酸是 D-和 L-混合型的外消旋乳酸，应用价值较小。

微生物发酵法是利用微生物（乳酸菌或霉菌）和底物降解酶将淀粉或纤维素类生物质糖化并同时转化为乳酸。根据微生物利用糖时不同的代谢路径和产物类别可将乳酸发酵分为同型发酵和异型发酵。异型发酵中糖经由戊糖磷酸（HMP）途径生产乳酸，同时伴随着大量其他副产物（如乙酸、乙醇、甲酸、二氧化碳等）的生成，而在同型发酵中糖通过糖酵解（EMP）途径只产乳酸这一种产物，理论转化率 100%，因此同型发酵生产的乳酸产量更高，应用价值更广泛^[66]。微生物发酵法由于具有底物成本、生产温度、能耗相对较低，以及不同微生物可以选择性的生产手性 D-乳酸或 L-乳酸等优势，因此相比于化学合成法，微生物发酵是一种更有前景的手性乳酸生产方式^[67]。

1.3.3 乳酸发酵原料

全球通过微生物发酵法生产的乳酸约占乳酸总产量的 90%，其中 34%的成本来自于原料。目前通过扩大工艺规模来降低乳酸成本的可行性很低，因此寻找可再生资源作为底物进行纯 L/D-乳酸的生产成为现在的研究重点^[68]。

（1）糖和淀粉类

淀粉是一种可生物降解的生物基多糖，由直链淀粉和支链淀粉构成，在大多数植物中通过光合作用合成。小麦、玉米、木薯、大米等淀粉类物质是乳酸生产的潜在原料，利用淀粉类物质作为底物进行乳酸发酵可以避免葡萄糖抑制。Yao 等^[69]分别以玉米淀粉

和糊化玉米淀粉为底物, 利用凝结芽孢杆菌同时糖化和发酵 (SSF) 生产 L-乳酸, L-乳酸的产量分别为 0.26、11.75 g/L, L-乳酸的手性纯度达到 99.5%。Pejin 等^[70]以啤酒槽水解物 (BSG)、麦芽根提取物 (MRE)、豆粕提取物 (SME) 等工业副产品为底物, 利用鼠李糖乳杆菌进行 L-乳酸发酵, 实现了基于工业副产品生产高手性纯度 (99.7%) 乳酸。Zhou 等^[71]以甘蔗渣亚硫酸浆 (BSP) 为底物, 利用嗜热凝结芽孢杆菌 CC17 进行 L-乳酸同步糖化发酵, 降低了纤维酶的用量, 乳酸产量为 110 g/L, 0.72 g/g 纤维素。Bai^[72]等人以葡萄糖为底物, 利用乳酸乳杆菌进行分批补料发酵生产 L-乳酸, 乳酸产量达 210 g/L, 产率为 2.2 g/L·h。Ye 等^[73]以木糖为底物在 50°C 条件下, 利用凝结芽孢杆菌 C106 进行分批补料发酵, 乳酸产量达到 215.7 g/L, 产率达到 4.0 g/L·h。

由于直接利用各种糖类 (葡萄糖、果糖等) 和淀粉 (如玉米、土豆、木薯) 直接进行乳酸合成的成本昂贵, 使大规模工业化生产受到限制, 因此寻找廉价的、丰富的非食品材料生产乳酸更具有吸引力。

(2) 厨余垃圾

人们生活及食品加工、餐饮行业等活动中产生的垃圾, 包括丢弃的蔬菜叶、剩菜、剩饭、瓜果皮、鸡蛋壳、茶叶渣、骨头、过期的烘焙产品等, 都含有丰富的碳水化合物, 适合乳酸菌的生长^[74-78]。Ahmad 等^[79]以厨余垃圾为原料, 进行 L-乳酸的发酵, 并将其有效的转化为 PLA, 可有效缓解城市对垃圾管理的担忧。

(3) 木质纤维素

木质纤维素原料来源广泛 (农业, 农工业和林业), 成本低廉, 具有丰富的可发酵糖和可再生性, 是低成本生产乳酸的原料之一, 发展前景广阔。利用木质纤维素生产乳酸的加工链主要包括预处理 (降解木质纤维素基质结构)、酶水解 (将木质纤维素酶解为可发酵糖)、脱毒 (抑制酶水解、菌株生长的抑制物脱除)、发酵 (将糖转化为目标产物)。Zhang 等^[80]人以玉米秸秆和豆粕提取物为底物, 利用可以共同代谢葡萄糖和木糖的工程菌株植物乳杆菌进行 D-乳酸的生产, D-乳酸的浓度为 61.4 g/L, 产量为 0.72 g/g 纤维素。Zhang 等人^[81]以小麦秸秆为原料实现了 L-乳酸的连续同步糖化与共发酵, 乳酸产量达到 107.5 g/L, 产率为 2.69 g/L·h。除此之外, 玉米芯、玉米纤维水解液、木材水解液、麦麸、稻草等生物质原料也被用于乳酸生产^[82-85]。

(4) 其他

甘油是生物柴油的副产品, Hong^[86]等以甘油为底物, 利用大肠杆菌 AC-521 进行批次补料发酵生产乳酸, 乳酸含量达到 85.8 g/L, 产率为 0.97 g/L·h。微藻对生长环境要求低, 可在任何地方生长、成熟周期短、含有丰富的可发酵糖, 且不含木质素, 是乳酸发酵的一种潜在原料^[87]。还有奶酪制造业的副产品乳清, 由乳糖、蛋白质、脂肪、水溶性维生素、矿物盐和一些微生物必需营养成分组成, 也可用于乳酸发酵^[88]。寻找廉价、丰富且易于获取的原料进行发酵生产乳酸是最有效且经济的关键之一。

1.3.4 乳酸发酵微生物

自然界中有多种微生物可以通过发酵产生乳酸, 主要有真菌和细菌两大类。大多数

细菌可以利用单糖（半乳糖等）和双糖（蔗糖、麦芽糖等）为底物进行乳酸发酵，常见的有乳杆菌属（德氏乳杆菌、鼠李糖乳杆菌、植物乳杆菌）、芽孢杆菌属（凝结芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌）、片球菌属（乳酸片球菌）及肠球菌属（屎肠球菌、肠球菌）等^[89]。但野生菌株生产的乳酸大多为混合的 L、D-乳酸并且产量低，如在野生菌株副干酪乳酸菌中含有两个 L-LDH 和一个 D-LDH^[90]，野生乳酸片球菌中同时含有 *ldhL* 和 *ldhD*^[91]，德氏乳杆菌生产的 D-乳酸手性纯度最高只能达到 95%^[92]。少数野生菌株可生产纯 L/D-LA，如从 55°C 的土壤样品中分离出的凝结芽孢杆菌，该菌株可不进行灭菌生产手性纯度为 99.4% 的 L-乳酸，乳酸产率为 95.8%^[14]。除此之外还可通过基因工程手段对野生乳酸菌进行改造，从而实现高手性纯度、高浓度的乳酸生产。本实验室之前从玉米秸秆中水解液中筛选到一株耐高温的野生乳酸片球菌 DQ2，之后进行基因改造分别敲除了 *ldhL* 和 *ldhD* 得到了生产光学纯 D/L-乳酸的工程菌株，因其利用木糖能力弱又分别在改造后的两株菌株中构建了木糖代谢途径同时敲除 *pkt* 基因，减少副产物的同时提高光学纯 D/L-LA 的产量^[93]。在利用细菌生产乳酸过程中主要有以下几个障碍：（1）大多数细菌同时含有 L-乳酸脱氢酶和 D-乳酸脱氢酶，产物多为 L、D-乳酸的混合物；（2）副产物多，如乙酸、乙醇、二氧化碳等；（3）对培养基的营养成分要求高等，生产成本相对霉菌较高。但由于乳酸菌生长迅速、繁殖速度快、乳酸产量和产率高、操作方便，因此一直是乳酸发酵研究的焦点。

真菌中的根霉属，尤其是米霉菌，因其能生产高手性纯度的 L-乳酸而广受关注。根霉菌属营养需求低，可利用多种基质，例如直接利用生物质原料和淀粉类物质进行乳酸发酵，无需添加纤维素酶和淀粉酶。Trakarnpaiboon 等人^[94]从液化木薯淀粉中分离出一株耐热根霉菌，可直接利用木薯淀粉进行乳酸发酵，乳酸产量最高可达 118 g/L，产率为 1.25 g/L·h。使用根霉菌属进行乳酸发酵存在很多缺陷，如发酵副产物多（乙醇、琥珀酸、苹果酸等），主产物乳酸生产速率慢，氧气需求增加了能源消耗，以及发酵过程中菌丝成团影响乳酸的分离纯化等。

大肠杆菌、酵母具有相对清晰的遗传背景，且营养需求简单，通常利用基因工程手段对其进行改造，从而实现高产量、高手性乳酸的生产。大肠杆菌可利用多种碳源进行乳酸发酵，通过基因工程手段对其进行改造生产 D-乳酸的研究于 1999 年首次报道，亲本菌株 *E. coli* RR1 在以葡萄糖为底物时，可同时产 D-乳酸、乙酸、乙醇、甲酸等物质。为减少除 D-乳酸之外的副产物生成，作者将乙酰磷酸酶基因（*pta*）和琥珀酸生成途径的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因（*ppc*）敲除后，得到的双敲除菌株实现了纯 D-乳酸的生产，产率达到 0.9 g/g 葡萄糖^[95]。酵母是一种发酵性能良好的工业菌株，可在低 pH(1.5) 环境中生长，无需添加碱对发酵液进行中和，因此得到了很多研究者的青睐。Osawa 等^[96]在 *PDC1* 启动子控制下整合了 L-乳酸脱氢酶编码基因，构建了乙醇途径缺陷的 *Candida boidinii*，乳酸浓度和得率达到 85.90 g/L 和 1.79 g/L·h。

蓝藻是一种光合微生物，利用阳光、二氧化碳、水和无机盐合成有机物，有研究将 L-乳酸脱氢酶编码基因导入蓝藻中，得到了 LA 生产菌株，有利于缓解全球变暖效应^[97]。

1.3.5 乳酸的应用

近年来乳酸的全球市场价约 11 亿美元，根据每年 12.8%的复合增长率预计到 2025 年将翻一番^[2]。目前乳酸的应用主要有四大类：食品、化妆品、医疗医药和化工行业^[98]。

在食品和饮料行业，乳酸被 Food and Drug Administration (FAD) 公认为安全的食品添加剂，对乳酸的需求很高（占乳酸总需求的 35%）。乳酸具有温和的酸味，可添加到糖果、饮料、啤酒和其他产品中用作酸化剂、调味剂、pH 中和剂及灭菌剂；添加到罐头、腌制酸菜中不仅改变果蔬的风味，还可用作防腐剂；添加到面包中可做膨松剂；也是酸奶、黄油和罐装蔬菜发酵工艺中不可缺少的成分。在医疗行业，乳酸可被用于植入物、药丸、透析、手术缝合线和控制药物释放系统中。乳酸还可与一些金属离子混合以补充人体所需的微量金属元素，如 L-乳酸钙、L-乳酸锌、L-乳酸亚铁。在化妆品行业，乳酸具有良好的锁水功效可被当作保湿剂添加到沐浴露、护肤品等保湿产品中；乳酸可抑制酪氨酸酶的活性从而被添加到美白产品中；乳酸的弱酸性可抑制微生物的生长，被用于祛痘产品和抗氧化产品中^[99]。在化学工业，乳酸可与其他试剂进行各种化学反应生成其他化学制品，如乙醇、乙醛（脱羧基）、丙二醇、环氧丙烷（加氢）、丙酸（得氢失氧）、丙烯酸（脱水）、乳酸乙酯、丙交酯（缩合）等。乳酸的衍生物、盐和酯被用作乳化剂和增塑剂。此外，相较于传统的有机除垢剂，乳酸具有更强的清洁去垢能力，因此可被添加到清洁产品中如浴室清洁剂、咖啡机除垢剂等^[100]。

乳酸作为聚乳酸的主要聚合单体，在生物聚合物方面的应用显著增长，占乳酸需求的最大比例（39%），乳酸在催化剂作用下脱水缩合、解聚生成丙交酯，进而产生具有高分子量、高结晶度、高拉伸度的聚合物，被广泛应用^[101-105]。

1.4 丙交酯

丙交酯是通过两步法（ROP）合成聚乳酸的重要前体。聚乳酸的聚合进程、结晶度、降解特性及光学纯度、分子量很大程度上都受丙交酯的化学纯度和光学纯度的影响^[35]。丙交酯与其他单体或聚合物共聚后，如苹果酸、葡聚糖、三亚甲基碳酸酯（TMC）、聚（ ϵ -己内酯）、聚乙二醇（PEG）和聚乙醇酯（PGA）等，可被用作医疗（例如假体和膜）、药物输送和水凝胶的生物基材料、药物载体、可生物降解性的弹性支架以及生产装置、包装等^[106-109]。

1.4.1 丙交酯的基本性质

丙交酯（Lactide）是一种无色透明片状或针状晶体，分子式为 $C_6H_8O_4$ ，易吸水水解，可溶于有机溶剂（苯、甲苯）、醇类（甲醇、异丙醇）、含氧（乙酸乙酯、四氢呋喃、丙酮）和有机氯化物（二氯甲烷、氯仿）等溶剂中，并在不同溶剂中的溶解度随着温度的升高而增加^[110,111]。由于乳酸分子中存在的不对称性碳原子，使合成的丙交酯具有三种旋光异构体，L-丙交酯（LLA）、D-丙交酯（DLA）和内消旋丙交酯（meso-lactide）^[112]，其结构式如图 1.5 所示。LLA 和 DLA 是对映异构体，具有相同的理化性质^[113]。内消旋丙交酯是由一分子 L-乳酸和一分子 D-乳酸经化学成环后合成的化合物，其熔点较低，

因此最容易水解且最难提纯和保存；外消旋丙交酯 (*rac*-lactide) 是由等摩尔的 L-丙交酯和 D-丙交酯经过物理混合后形成的消旋体，其熔点较高且无旋光性^[114]，其熔点如表 1.3 所示。四种丙交酯均单独聚合或互相共聚，还可以在在某些条件下相互转化^[115]，其中 L-丙交酯和外消旋丙交酯常用作聚合 PLA 的前体。

表 1.3 丙交酯的熔点^[111]

Table 1.3 Thermal properties of lactides^[111]

	熔点 (°C)
L-丙交酯	95–98
D-丙交酯	95–98
内消旋丙交酯	53–54
外消旋丙交酯	122–126

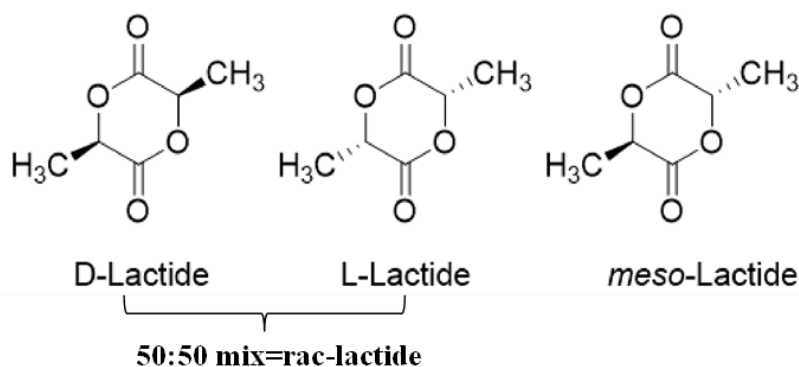


图 1.5 丙交酯的立体异构体^[66]

Fig. 1.5 Stereoisomers of lactides^[66]

1.4.2 丙交酯的合成

(1) 乳酸为原料

丙交酯的合成机制是两分子乳酸脱水缩合后生成乳酸低聚物，接着乳酸低聚物再在催化剂、减压作用下，进行“背咬和”的催化酯基转移反应，最终合成丙交酯。丙交酯的质量取决于乳酸异构体的种类、浓度、反应温度、催化剂的种类以及添加量等重要因素^[29,116,117]。目前，以乳酸为单体合成丙交酯的方式有减压法和常压法，其中减压法应用甚广。

减压法合成丙交酯的具体过程为：乳酸先在 80-140°C、减压条件下进行脱水缩合，然后将生成的乳酸低聚物在减压、高温 (200-300°C)、催化剂作用下解聚生成丙交酯、线性低聚物或更大的环状低聚物^[118]。乳酸缩聚阶段温度过高容易引起低聚物的提前解聚以及乳酸的消旋化，从而影响丙交酯的纯度和收率；乳酸解聚阶段温度过高时会加速碳化、氧化等副反应。Zhang 等人^[119]在以 L-乳酸为原料、辛酸亚锡为催化剂合成丙交酯过程中发现当温度升高时内消旋丙交酯的质量分数会增加，当反应温度为 200°C 时内消

旋丙交酯的质量分数达到 14.6%，并分别用不同纯化法得到的 L-丙交酯合成了相对分子质量为 1.85×10^5 和 5.05×10^5 的聚乳酸，这表明 L-丙交酯的光学纯度对聚乳酸的相对分子质量有很大的影响。Yoo 等^[116]在研究温度、压力、催化剂类型对丙交酯聚合的影响时，也发现高温下内消旋丙交酯含量高，而且当催化剂为锡基类化合物且添加量为 1%、压力低时丙交酯产量最高，外消旋化程度最低，Xu 等人^[120]研究了乳酸浓度对丙交酯合成的影响，发现冷凝水对丙交酯的形成有很大的影响，因此高浓度的乳酸更适合作为原料进行丙交酯的合成。

常压法与减压法合成机制相同，需要在高温和添加催化剂的条件下进行，差异是常压法无须进行减压操作，而是在反应体系中添加“惰性气体”（如 CO_2 或 N_2 等），降低丙交酯蒸汽的分压并从反应体系中带走生成的丙交酯。惰性气体的流量和反应温度是影响丙交酯产率的主要原因，当气体流量小时，丙交酯的馏出率随温度的升高而增加。当气体流量大时，丙交酯的馏出率受温度影响，因为温度低时，丙交酯的生成速率慢，即使气体流量再大也不会增加馏出率；当温度高时，会发生焦化、碳化等形成其他副产物，从而降低丙交酯的馏出率^[121,122]。Upare 等人^[123,124]提出了一种新型的在常压下通入氮气利用复合催化剂 $\text{SnO}_2\text{-SiO}_2$ 制备丙交酯的方法， $\text{SnO}_2\text{-SiO}_2$ 是一种市售的脱水催化剂，使得丙交酯的收率达到 94%，光学纯度接近 100%，并且稳定性持久。

减压法合成丙交酯通常在添加催化剂、高温、高真空体系下进行^[125]，真空操作有助于排出水分子，促进缩聚反应正向进行，并提高解聚阶段丙交酯的馏出率；然而该反应需在高真空度和气密性好的环境中进行，此要求增加了机械真空泵等设备使用和维护的困难，如反应初期真空度过高会在带走水的同时将反应底物乳酸带出，降低丙交酯得率。常压法合成丙交酯具有操作成功率高的优势，通过通入惰性气体可带走反应系统中的氧气，降低了丙交酯氧化和焦化的概率，有助于提高产品的产率和纯度；但该法脱水时间较长，生产效率低。

（2）其他为原料

以乳酸乙酯为原料合成丙交酯的原理与乳酸相似，首先是乳酸乙酯经缩聚后脱除乙醇生成乳酸乙酯齐聚物，然后乳酸乙酯齐聚物于高温（大于 200°C ）条件下经热拉链反应解聚生成丙交酯，反应过程中需将乙醇和丙交酯及时移除。王等^[126]以乳酸乙酯为原料探究了催化剂种类及添加量、反应温度、时间等要素对丙交酯得率的影响，当催化剂为锡粉、添加量为 1%（w/t%）、缩聚温度与解聚温度分别不高于 240°C 和 220°C 时，合成的丙交酯得率最高。

Hiroshi 等^[127]以 2-卤代丙酸碱金属或稀土金属盐为单体、非水溶剂为媒介，于 $200\text{-}250^\circ\text{C}$ 、2.53 MPa 条件下成功聚合出了光学纯度为 95% 的丙交酯。该反应过程快，但需在加压条件下完成，且未参与反应的卤代丙酸盐难以从产品中彻底去除，得率较低。另外，Ohara 等人^[128]以乳酸铵为前体，在加热条件下同时脱氨、脱水成功制得丙交酯。

1.4.3 丙交酯的消旋化

据报道，在利用乳酸为原料采用两步法合成聚乳酸的过程中，L-乳酸、L-丙交酯及

聚 L-乳酸均可向 D-异构体转化,发生消旋化,反之亦然;也可转化为内消旋丙交酯^[129]。当聚合物聚 L-乳酸中存在 D-异构体时,会降低其结晶度和熔点,D-异构体的含量高于 12%时其结晶性消失,变成无定型聚合物。Motoyama 等人^[130]研究了 MgO 颗粒大小对丙交酯消旋化的影响,发现在高于 200°C时 L-丙交酯转化为内消旋丙交酯和 D-丙交酯,MgO 颗粒的减小能够有效抑制低聚物和内消旋丙交酯的生成。Fan 等人^[131]研究了钙离子对丙交酯消旋化的影响,发现在高温下钙离子容易使得 L-乳酸外消旋化从而加速内消旋丙交酯的形成。

1.5 本论文立题依据和主要研究内容

据不完全统计,世界上每年大约有 1.4 亿吨的石油基聚合物产生,并在使用完后以工业废弃物的形式回归于大自然中^[132]。这些石油基聚合物难以直接在自然界中分解,从而会引起严重的白色污染和温室效应^[133]。而聚乳酸(PLA)作为一种具有优异生物相容性、优良抑菌性、良好透气性的绿色高分子材料,能够被微生物分解成二氧化碳和水,是目前最具发展潜力的新型可降解高分子材料^[18],可作为石油基聚合材料的重要替代品。聚乳酸大规模产业化的两个关键因素是降低 PLA 的生产成本和提高 PLA 产品性能。PLA 的成本主要来自乳酸。目前,90%的乳酸是通过生物发酵得到的,其中超过 34%的成本来自原料^[7]。可再生的木质纤维素原料来源广泛、资源丰富,含有多种可发酵糖,是降低乳酸成本的最佳原料之一。PLA 合成最常用的技术是丙交酯开环聚合法,包括 L-乳酸的解聚、缩聚合成丙交酯和丙交酯的开环聚合。在 L-丙交酯合成过程中 D-乳酸的存在将不可避免地产生内消旋丙交酯,最终对 PLA 产品的生产工艺、理化性质及玻璃转化温度、机械性能等特性产生严重的负面影响。因此提高 L-乳酸的手性纯度(99.6%-99.9%)是制备丙交酯和聚乳酸的关键。

在前期研究中已构建了以干酸预处理-生物脱毒-高固含量同步糖化与共发酵为核心的干法生物炼制技术,实现了木质纤维素来源的全部单糖(葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖)以协同速率生产 L-乳酸。然而,在合成的纤维素 L-乳酸中始终存在微量的 D-乳酸(0.2-0.6%),并在提纯过程中维持不变,导致 L-乳酸缩聚和解聚后合成的 L-丙交酯手性度降低,进而对高分子量聚乳酸的指标产生不利影响。本研究在木质纤维素生物炼制合成 L-乳酸的干法生物炼制平台上,通过对生物炼制加工链进行全步骤的印迹追踪,确认微量 D-乳酸的主要来源和生物合成路径;围绕遏制生物质中 D-乳酸合成这一核心目标,设计可行策略并进行试验验证,彻底消除纤维素 L-乳酸产品中存在的微量 D-乳酸。具体研究工作如下:

(1) 从木质纤维素原料产地的收集作为起点,对运输与储存、预处理、生物脱毒、糖化、乳酸发酵进行全步骤的印迹跟踪,分析不同来源的 D-乳酸对纤维素 L-乳酸手性纯度的影响,确定 D-乳酸的主要来源途径。之后通过对生物质原料中的乳酸生产菌株进行筛选和水溶性单糖的测定,来探究乳酸的生物合成机制。

(2) 探究了不同条件下生物质原料中乳酸的生成情况及生成的 D-乳酸对 L-丙交酯

聚合的影响，并从不同角度提出三条策略遏制生物质原料中的水溶性单糖向 D-乳酸转化，为提高纤维素 L-乳酸的手性纯度提供强有力的技术支持。

(3) 针对生物质原料储存过程中乳酸先增加后降低的现象，通过将生物质原料中分离得到的内源寄生乳酸菌在不同条件下进行发酵验证，以初步确定乳酸代谢的可能途径。

第2章 纤维素 L-乳酸中杂质 D-乳酸的引入途径及生成机制研究

2.1 引言

手性 L-乳酸作为聚乳酸的聚合单体，其手性纯度对 PLA 生产过程至关重要，微量 D-乳酸存在会严重影响聚合物的结晶度、生物降解速率等特性^[134]。近年来，随着“环境友好”的倡导，生物可降解塑料 PLA 应用市场逐渐广泛，手性乳酸的需求量不断扩大。利用廉价的木质纤维素原料进行高手性纯度 L-乳酸合成，其过程中各项可量化的关键技术指标和环境排放指标与玉米淀粉原料合成手性乳酸的指标基本持平，是取代淀粉生产乳酸的潜在原料之一。

在前期的研究工作中发现，以木质纤维素生物质原料生产的 L-乳酸中始终存在微量的 D-乳酸（0.2-0.6%），且难以将其分离去除。相较于从淀粉原料出发得到的乳酸发酵液，纤维素乳酸发酵液成分更加复杂，其中含有大量的木质素固体微粒，其粘度值比前者高一个数量级以上^[135]。使用手性色谱来分离 L/D-乳酸成本高昂，对纤维素乳酸发酵液也不适用。而利用代谢工程或生物合成学方法改造乳酸发酵菌株，进一步降解微量 D-乳酸的可行性也很低：微量 D-乳酸的转化需通过 D-乳酸脱氢酶将其氧化为丙酮酸，但丙酮酸作为糖酵解末端产物具有高代谢通量，因此该反应的驱动力极低，在未发生高浓度 L-乳酸大量降解的情况下，微量 D-乳酸降解途径极难实现。因此切断 D-乳酸的引入源头或生成途径是实现木质纤维素来源的高手性纯度 L-乳酸及 L-丙交酯的关键策略。

在以木质纤维素生物质为原料生产 L-乳酸时不仅需要经过原料的运输与储存、干酸预处理、糖化、生物脱毒等几个工段，还需要添加酶、氮源等发酵辅料，才可利用乳酸发酵菌株进行 L-乳酸和 D-乳酸的合成。小麦秸秆、玉米秸秆是应用最多的木质纤维素原料，其中通常含有 4%-12%的葡萄糖、果糖、蔗糖等水溶性游离碳水化合物，极易被微生物利用生成混合 L、D-乳酸等。酶制剂纤维素酶、糖化酶是真菌、细菌或其他微生物的发酵产物^[136,137]，氮源如玉米浆是玉米浸泡水的浓缩物，以及在生物炼制过程中繁杂的步骤，均有导致 D-乳酸增加的风险。目前关于木质纤维素来源的 L-乳酸生产中，大多数研究的重点是通过基因工程手段对乳酸生产菌株进行改造来提高 L-乳酸的手性纯度及产量或者是寻找廉价的底物来降低生产成本^[138]，然而关于成分复杂的发酵原料、发酵辅料及发酵过程中存在的微量 D-乳酸对纤维素 L-乳酸的影响鲜有报道。

本章基于干酸预处理-生物脱毒-高固含量同步糖化与共发酵为核心的干法生物炼制技术，首次通过从木质纤维素原料产地的收集作为起点，对运输与储存、预处理、脱毒、糖化、发酵等过程进行全步骤的印迹跟踪，分析不同来源的 D-乳酸对纤维素 L-乳酸手性纯度的影响，最终确认 D-乳酸的主要来源及生物合成途径。

2.2 材料与方法

2.2.1 生物质原料、酶、试剂

本章实验所用的生物质原料种类、收获时间及地点如表 2.1 所示。其中，小麦秸秆、玉米秸秆、稻草三种原料使用锤式粉碎机粉碎后（粉碎机筛网的直径约为 10 mm）用于实验或装袋储存，玉米纤维是湿磨法生产玉米淀粉的副产物，竹屑是从竹制品加工厂收集的。

表 2.1 不同生物质原料的收获时间及地点

Table 2.1 Harvesting time and location of different lignocellulose feedstocks

原料种类	收获时间	收获地点
小麦秸秆 (Wheat straw)	2021 年秋季	河南省南阳市
玉米秸秆 (Corn stover)	2020 年秋季	河南省南阳市
稻草 (Rice straw)	2019 年夏季	江西省宜春市
竹屑 (Bamboo shavings)	2020 年夏季	江苏省宜兴市
玉米纤维 (Corn fiber)	2020 年秋季	山东寿光巨能金玉米开发有限公司

所用商业纤维素酶 Cellic CTec2.0 购自诺维信（中国）公司，采用 NREL (LAP-006) 法测得纤维素滤纸活性为 203.2 FPU/mL^[139]，采用 Ghose 法测得纤维二糖酶活性为 4900 CBU/mL^[140]，采用 Bradford 法测得蛋白浓度为 87.3 mg/mL^[141]。

糖化酶 GA-L NEW 购自杰能科（中国）公司，酶活为 103900 WU/mL。

所需的试剂中，蛋白胨和酵母粉从牛津有限公司（汉普郡，英国）购买，豆粕、棉粕分别从中粮集团（上海）、佳慧饲料（河北）购买，其它试剂如葡萄糖、果糖、柠檬酸氢二铵、硫酸铵等均购买自国药化学试剂有限公司（上海）。

水溶性单糖和乳酸的测定方法：将不同的木质纤维素原料与去离子水以 1:20 的固液比混合后，装至 1 L 的锥形瓶中，在 30°C、150 rpm 的水浴摇床中浸提 1 h，将得到的混合液在 12000 rpm 条件下离心 5 min，上清液用于乳酸及单糖测定。

2.2.2 菌株、培养基及培养条件

本章所使用的生物脱毒菌株宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89 (CGMCC 17665)，用于代谢木质纤维素来源的呋喃醛和酚醛类抑制物（如糠醛、羟甲基糠醛、乙酸等）^[13]。

本章所使用的培养基：

(1) PDA 培养基：取 200 g 土豆去皮切碎，加入 1 L 去离子水煮沸 30 min，接着用纱布过滤得到上清液，加入 20 g 葡萄糖、15 g 琼脂后定容至 1 L。

(2) SM 合成培养基：20 g/L 葡萄糖、1 g/L 酵母提取物、2 g/L 磷酸二氢钾、1 g/L 硫酸铵、1 g/L 七水硫酸镁。

(3) MRS 培养基：22 g/L 葡萄糖，10 g/L 蛋白胨、4 g/L 酵母提取物、8 g/L 牛肉膏、3 g/L 无水乙酸钠、2 g/L 柠檬酸氢二铵、2 g/L 三水磷酸氢二钾、0.2 g/L 七水硫酸

镁、0.05 g/L 一水硫酸锰、1 mL/L 吐温 80，用于筛选乳酸生产菌株。

(4) 用于筛选乳酸生产菌株的 MRS 固体培养基：在 MRS 液体培养基中添加 1% (w/v) 的碳酸钙、15-20 g/L 的琼脂。

将脱毒菌株 *P. variotii* FN89 划线于 PDA 平板后，在 37°C 条件下静置培养 3 天，然后加入 10 mL 吐温 80 溶液收集孢子并转移至 100 mL SM 培养基中，在 300 rpm、37°C 条件下培养 20 h，得到孢子液。

所使用的培养基、枪头和三角瓶等需在 115°C 的高压灭菌锅中灭菌 20 min。

2.2.3 干酸预处理、糖化与液态脱毒

根据张^[10]的方法对小麦秸秆原料进行干酸预处理，具体过程为：将原料与稀酸溶液以 2:1 (w/w) 的固液比加入 20 L 预处理反应器中，在 175°C 下处理 5 min，搅拌速度为 50 rpm。

预处理后的麦秆用 20% (w/w) 的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 溶液将 pH 调至 5.5，然后根据实验室之前的方法进行预糖化与脱毒。具体过程为：将调完 pH 的小麦秸秆物料在装有螺带式搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行预糖化，糖化条件为 30% (w/v) 固含量，纤维素酶用量为 5 mg 蛋白/g 干物料，温度为 50°C，转速为 200 rpm，时间为 12 h。预糖化结束后立即转入含有六直叶 Rushton 搅拌桨的 3 L 发酵罐中，降温至 37°C，以 10% (v/v) 的接种量将脱毒菌株 *P. variotii* FN89 的孢子液接入，进行生物脱毒，搅拌速度 750 rpm，通气量 1.0 vvm。

2.2.4 乳酸生产菌株的筛选与鉴定

首先分别称取 10 g 木质纤维素原料（麦秆、玉米秸秆、稻草、竹屑、玉米纤维）置于 250 mL 灭菌锥形瓶中，加入 140 mL 无菌水混匀后于 37°C、150 rpm 条件下浸提 1 h，得到悬浮液。取 10 mL 悬浮液加入到 50 mL MRS 液体培养基中，42°C、150 rpm 条件下富集培养 12 h。接着将富集培养液用灭菌水分别稀释 10^{-1} - 10^{-9} 并涂布于含有 1% CaCO_3 (w/v) 的 MRS 平板上进行初筛，42°C，培养 2-3 d。从溶钙圈明显且单菌落多的平板上挑八个单菌落分别进行三代纯化培养。具体过程为：从初筛平板上挑取单菌落接种于含有 5 mL MRS 培养基的试管中，在 42°C 下培养 12 h，测定乳酸含量并重新划线于含有 1% CaCO_3 (w/v) 的 MRS 平板上，42°C 下培养 2-3 d，完成第一代纯化培养。按此步骤完成第二代和第三代纯化培养。

最后将纯化得到的单菌落在含有 5 mL MRS 培养基的试管中培养 12 h 后，转接至含有 20 mL MRS 的培养基中继续培养 12 h，收集细胞，用细菌基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱性）抽提分离菌的 DNA，采用通用引物 27F 和 149R 进行 PCR 扩增以得到细菌的 16S rDNA，序列分别为 27F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'，149R: 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3'。将纯化后的 PCR 产物在上海擎科生物有限公司测序，并在 NCBI 基因库中进行序列比对^[142-144]。用 MEGA 11 软件中的 Neighbor-Joining 方法构建系统进化树。

2.2.5 分析方法

葡萄糖、果糖、乳酸等可溶性组分含量使用高效液相色谱法测定，泵型号为 LC-20AD，

检测器为示差折光检测器 RID-10A, 色谱柱 (300 mm × 7.8 mm) 为 Bio-Rad Aminex HPX-87H, 柱温 65°C, 流动相为 5 mM H₂SO₄ 溶液, 流速为 0.6 mL/min。

L/D-乳酸的浓度通过 D/L-Lactic Acid Kit (Megazyme International Ireland, Bray, Wicklow, Ireland) 中的方法进行测定, 根据反应过程中 NADH 的变化量来计算。用分光光度计 Biomate 3 S (Thermo Scientific Massachusetts, USA) 在 340 nm 下测定 NADH 的增加量。

2.3 结果与讨论

2.3.1 生物炼制加工链的 D-乳酸印迹追踪

木质纤维素原料在原产地收获后, 需经过运输与储存、预处理、脱毒、糖化、L-乳酸发酵等完整的生物炼制加工链, 才能获得手性 L-乳酸。整个加工链中的任何一个步骤, 都有从外界环境引入或内部合成 D-乳酸的风险, 并直接影响到最终 L-乳酸的手性纯度。因此, 确定 D-乳酸的具体来源才能从源头切断 D-乳酸的引入。

为了确定纤维素 L-乳酸中 D-乳酸的具体来源途径, 本章分别对常见的几种生物质原料 (麦秆、玉米秸秆、稻草、玉米纤维、竹屑)、发酵辅料 (酶制剂、外源营养成分) 以及纤维素 L-乳酸生物炼制过程中的 D-乳酸进行了印迹追踪 (表 2.2)。

首先是生物质原料中存在的乳酸。结果表明, 在几种生物质原料中均存在或多或少 L-乳酸和 D-乳酸 (表 2.2)。其中新收获的小麦秸秆、稻草及玉米秸秆中的 D-乳酸含量相对较高, 分别为 0.54、0.38、0.18 mg/g DM, 在干法生物炼制平台的 L-乳酸发酵案例中^[145,146], 相当于发酵液中的 D-乳酸浓度为 243.0、169.1、81.0 mg/L, 占纤维素 L-乳酸的 0.188%、0.131%、0.0628%, 已经达到影响 L-乳酸手性纯度的程度。竹屑和玉米纤维中的 D-乳酸含量较低 (0.013、0.027 mg/g DM), 相当于发酵液中的 D-乳酸浓度为 5.84、12.0 mg/L, 占 L-乳酸的 0.0045%、0.0093%, 对 L-乳酸手性纯度影响较小。然而, 在实际场景中生物质原料经过较长时间储存且受潮湿环境的影响后, 会导致物料含水量升高, D-乳酸含量也会显著增加。当麦秆含水量达到 25% 时, 在密封储存两个月后 D-乳酸的浓度较新收获麦秆中的 D-乳酸浓度增加了一个数量级以上, 从 0.54 mg/g DM 增加到 5.16 mg/g DM, 相当于发酵液中的 D-乳酸浓度增加到 2.32 g/L、约占 L-乳酸含量的 1.8%, 已经严重影响了 L-乳酸的手性纯度。以上结果表明生物质原料中普遍存在微量的 L-乳酸和 D-乳酸, 并且在储存过程中其含量会逐渐积累, 对纤维素 L-乳酸的手性纯度造成非常恶劣的影响。

表 2.2 生物质原料和添加的酶、氮源中乳酸含量及对 L-乳酸发酵液的影响

Table 2.2 L- and D-lactic acids in contents in lignocellulose feedstocks, fermentation additives and enzymes in biorefinery chain

	L-lactic acid (mg/g DM or mg/L)	D-lactic acid (mg/g DM or mg/L)	Equivalent D-lactic acid in fermentation broth (mg/L) ^a	Equivalent D-lactic acid in L-lactic acid product (mg/g) ^b
Raw feedstocks				
Wheat straw	1.18	0.54	243.0	1.88
Corn stover	0.31	0.18	81.0	0.628
Rice straw	0.53	0.38	169.1	1.31
Corn fiber	2.88	0.027	12.0	0.093
Bamboo shavings	0.018	0.013	5.84	0.045
Stored feedstock				
Wheat straw ^c	6.14	5.16	2322.0	17.98
Nitrogen additives ^d				
Yeast extract	1.84	1.50	16.50	0.128
Peptone	1.23	0.92	10.12	0.0784
Cottonseed meal	ND	ND	ND	ND
Soybean meal	ND	ND	ND	ND
Enzymes				
Cellulase	ND	ND	ND	ND
Glucoamylase	2860	3160	3.16	0.0245

^{a,b} 本研究中折合的纤维素乳酸发酵体系为 2 L，固含量 30%，糖化过程中纤维素酶的添加量为 4 mg 蛋白/g 干物料，种子液接种量为 10% (v/v)，种子液中糖化酶量为 1% (v/v)；^c 25% 含水量的小麦秸秆，密封储存 2 个月；^d 酵母浸粉、蛋白胨、棉粕、豆粕的添加量分别为 11、11、22、22 g/L 麦秆水解液；ND 代表未检测到；DM 代表干物质

其次是生物炼制过程中需要添加的酶制剂、氮源等发酵辅料中的 L-乳酸和 D-乳酸含量。木质纤维素原料经预处理、生物脱毒后需添加纤维素酶进行糖化释放可发酵糖，经检测纤维素酶 CTec 2 中未发现 D-乳酸，因此可排除纤维素酶的影响。L-乳酸发酵菌株 *P. acidilactici* 已敲除 D-乳酸脱氢酶，不产生 D-乳酸^[93]。但在进行种子液培养时会添加 1% (v/v) 的糖化酶以防止菌体絮凝，经检测，糖化酶中的 D-乳酸为 3.16 g/L，相当于发酵液中的 D-乳酸浓度为 3.16 mg/L，占 L-乳酸的 0.00245%，对 L-乳酸的手性纯度产生的影响极为有限，然而仍需要对糖化酶的来源渠道和储存环境进行严格的监控。乳酸发酵还需添加较多的氮源物质，由于玉米浆中含较高浓度的 D-乳酸，在 L-乳酸发酵中不适用^[147]。目前还可以使用的氮源物质包括酵母提取物、蛋白胨、植物蛋白（棉粕和豆粕）等，其中酵母提取物和蛋白胨中的 D-乳酸分别为 1.50、0.92 mg/g DM，相当于发

酵液中的 D-乳酸浓度分别为 16.50 mg/L、10.12 mg/L，占 L-乳酸含量的 0.0128%、0.00784%；植物蛋白（棉粕和豆粕）中未检测到乳酸的存在。以上结果表明，酶制剂及氮源物质中也存在引入微量 D-乳酸的风险，但其含量较低；与生物质原料中携带的 D-乳酸相比，对 L-乳酸的手性纯度影响相对较小。

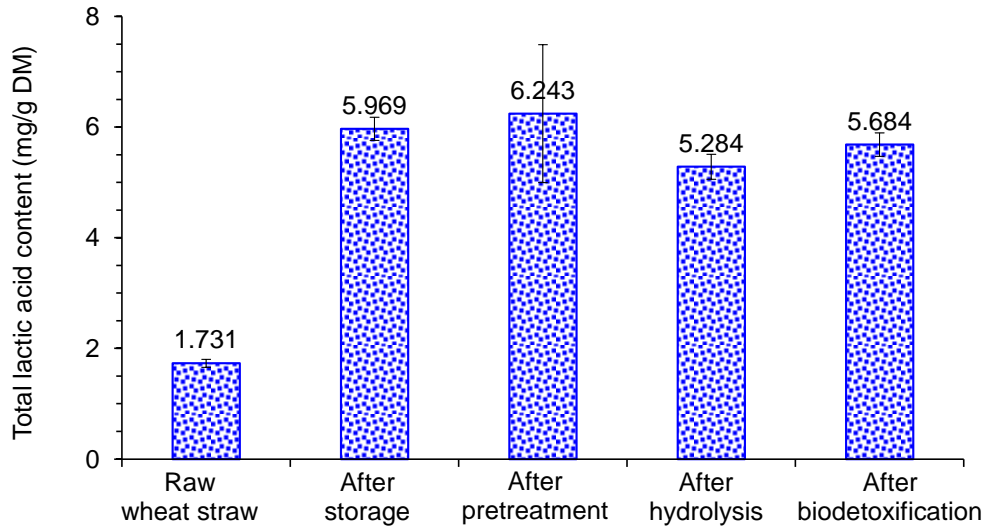


图 2.1 生物炼制加工链中总乳酸含量的测定

Fig. 2.1 Total lactic acid contents based on dry wheat straw weight in biorefinery processing chain

最后，对生物炼制过程中各个步骤的总乳酸进行了跟踪，目的是确定生物质原料中存在的乳酸在生物炼制加工链中是否会被降解或有新的乳酸源混入。图 2.1 是以麦秆为原料经过干法生物炼制加工链生产 L-乳酸的案例，主要包括麦秆原料的储存、干酸预处理、高固含量酶促糖化、生物脱毒完全降解水解液中的抑制物，最终以同步糖化共发酵的方式生产 L-乳酸。通过测定生物炼制加工链中乳酸发酵之前各个步骤的总乳酸含量，我们发现在新收获麦秆中即有一定量的乳酸（ 1.73 ± 0.07 mg/g DM），并于储藏阶段大量增加至初始原料的 3.4 倍（ 5.97 ± 0.21 mg/g DM）。含有乳酸的麦秆在经过预处理（ 6.24 ± 1.25 mg/g DM）、酶促糖化（ 5.28 ± 0.23 mg/g DM）、生物脱毒（ 5.68 ± 0.21 mg/g DM）后乳酸总含量维持相对稳定，这表明生物质原料中的 D-乳酸在生物炼制加工链中无明显的降解和生成，生物质原料中存在的 D-乳酸最终会进入纤维素 L-乳酸中，导致其手性纯度降低。与酶制剂（纤维素酶、糖化酶）和氮源（酵母浸粉和蛋白胨）中存在的 D-乳酸相比（ 0.0245 mg/g L-乳酸和 0.0784 - 0.128 mg/g L-乳酸），生物质原料中存在 D-乳酸会最终导致发酵液中 D-乳酸的含量高达 17.98 mg/g L-乳酸（表 2.2），因此生物质原料中存在的 D-乳酸是造成纤维素 L-乳酸手性纯度偏低的主要来源途径。

2.3.2 生物质原料中乳酸生产菌株的筛选与鉴定

木质纤维素生物质中内源性乳酸的形成至少需要两个前提条件：寄生乳酸菌和内源性水溶性单糖的存在。以往的研究结果表明，玉米秸秆、麦秆等农作物秸秆类型的木质纤维素生物质中不仅存在大量的寄生乳酸菌和水溶性单糖，而且还含有少量维生素、蛋

白质及脂类，为乳酸生产菌株的生长和代谢提供了重要条件^[90,148-150]。

本课题组在之前的研究中已从玉米秸秆水解液中分离得到一株耐高温的野生乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2^[151]。因此为了探究生物质原料中是否普遍存在乳酸生产菌株，本章又对上述几种典型的木质纤维素原料（小麦秸秆、玉米秸秆、稻草、竹屑及玉米纤维）进行了乳酸生产菌株的筛选和鉴定。将生物质原料经过浸提、富集培养、初步涂布筛选后，在含 1% CaCO₃ (w/v) 的 MRS 固体培养基上均出现了透明圈明显的白色或乳白色菌落，如图 2.2 所示。然后从每种生物质原料的初筛平板培养基上分别挑取 8 个单菌落进行三代纯化培养，编号为 WS1 - WS8、CS1 - CS8、BS1 - BS8、RS1 - RS8、CF1 - CF8，在培养 2-3 d 后也均长出了透明圈明显的单菌落（图中仅展示了每种物料的其中一个单菌落纯化过程）。

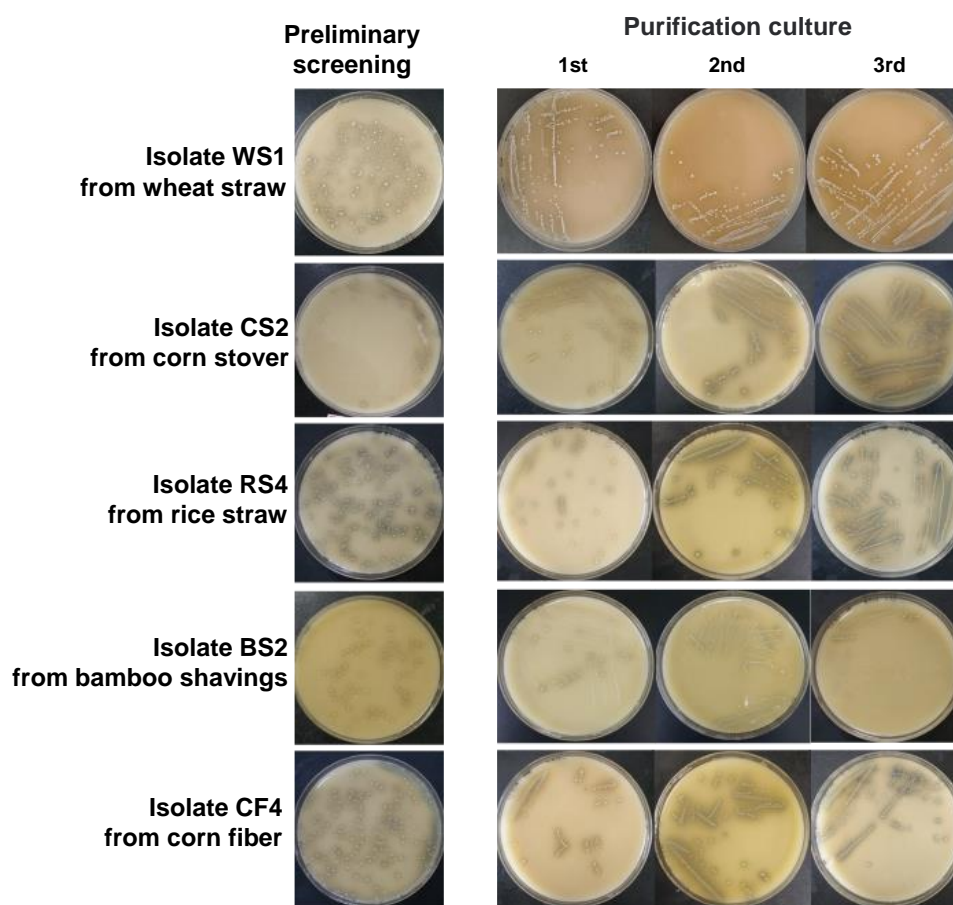


图 2.2 初筛、纯化过程中分离菌株的菌落形态

Fig. 2.2 The morphology of isolated strains in preliminary screening and purification process
 培养条件：在含有 1% CaCO₃ (w/v) 的 MRS 平板上涂布或划线后置于 42°C 条件下培养 48-72 h
 WS: wheat straw, CS: corn stover, RS: rice straw, BS: bamboo shavings, CF: corn fiber

将纯化后得到的菌株按试剂盒方法抽提 DNA，用细菌通用引物 27F 和 149R 分别扩增得到其 16S rDNA 片段后测序，并在 NCBI 基因文库中对序列进行比对，构建系统发育树（图 2.3）。结果表明，所分离纯化得到的 40 株野生菌株中，WS1 菌株的 16S rDNA

序列与鼠乳杆菌 *Lactobacillus murinus* 相似, CS1-CS8 的 16S rDNA 序列与粪肠球菌 *Enterococcus faecalis* 相似, WS2-WS5、RS1-RS8、CF1-CF8 的 16S rDNA 序列与屎肠球菌 *Enterococcus faecium* 相似, BS2-BS4 的 16S rDNA 序列和鸡肠球菌 *Enterococcus gallinarum* 相似, 相似性均为 99.7% 以上, 并将这四种菌株分别命名为 *Lactobacillus murinus* WS1、*Enterococcus faecium* RS4、*Enterococcus faecalis* CS2、*Enterococcus gallinarum* BS2, 这些筛选得到的菌株均属于乳酸菌。将筛选得到的乳酸菌进行复筛发酵时也都检测到了乳酸的生成 (图 2.4), 这表明木质纤维素原料中乳酸菌的存在是一种普遍现象。

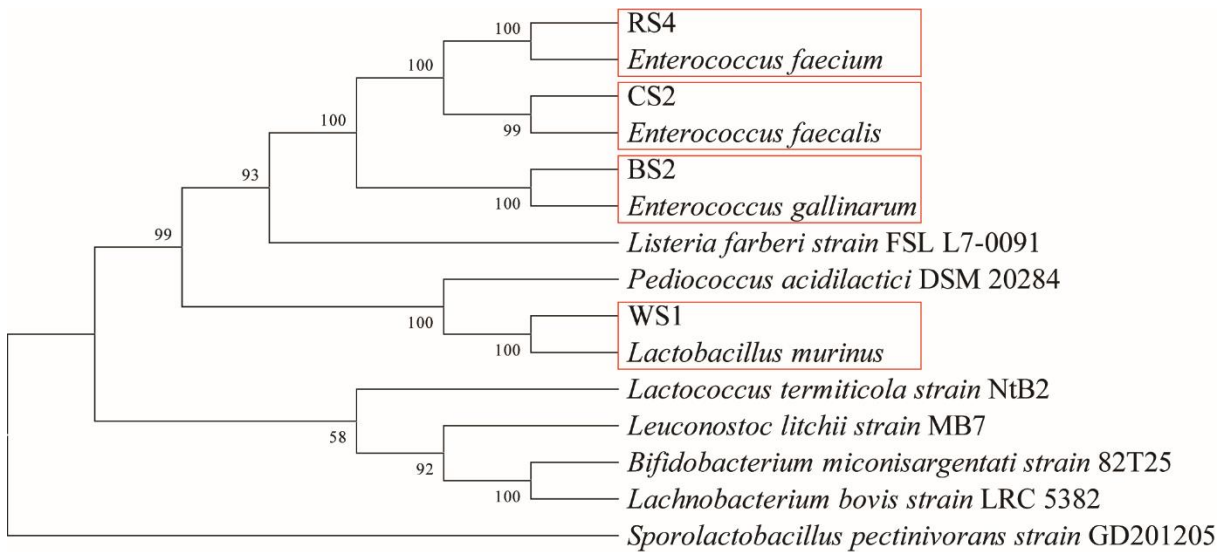


图 2.3 基于分离菌株的 16S rDNA 基因序列构建的系统发育树

Fig. 2.3 Phylogenetic tree based on the 16S rDNA sequence analysis

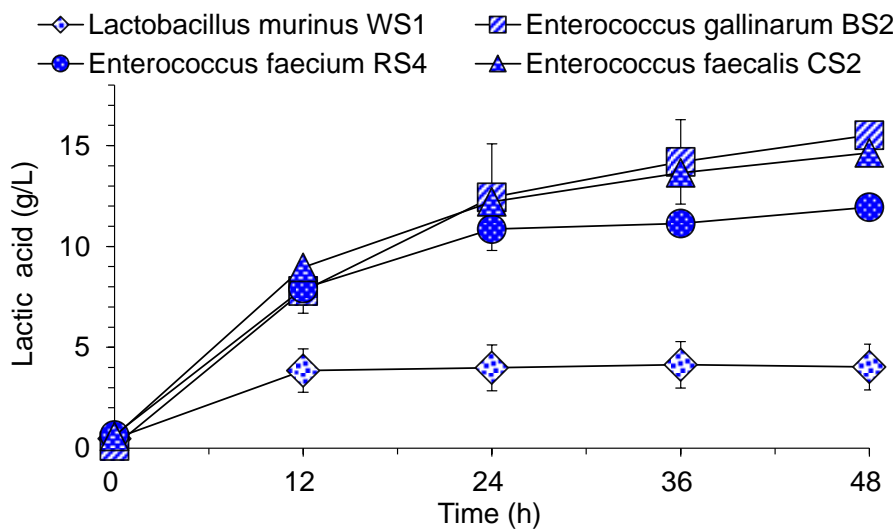


图 2.4 分离菌株的发酵验证

Fig. 2.4 Fermentation verification of isolated strains

发酵条件: 在含有 50 mL 简化 MRS 培养基的 250 mL 摇瓶中进行发酵, 葡萄糖浓度为 40 g/L, 温度为 42°C, 转速为 150 rpm, 用 0.6 g CaCO₃/g 糖调节 pH

2.3.3 生物质原料中水溶性单糖的分析

生物质原料中通常都含有一定量的水溶性单糖，包括葡萄糖、果糖和蔗糖等^[152]。本研究分别对上述五种木质纤维素原料（麦秆、玉米秸秆、稻草、竹屑、玉米纤维）进行浸提和浓缩后测定了其中水溶性单糖含量。结果表明（表 2.3），每种原料中都含有一定量的葡萄糖和果糖，未检测到蔗糖。其中新收获的玉米秸秆中水溶性单糖含量最高，葡萄糖和果糖分别为 23.35 ± 2.05 、 31.40 ± 0.85 mg/g DM，总糖约占木质纤维素生物质干重的 5.4%。其次是新收获的小麦秸秆中水溶性单糖含量，葡萄糖和果糖分别为 14.65 ± 0.32 、 24.22 ± 3.06 mg/g DM，总糖约占干重的 3.9%左右。储存 1-2 年的稻草、竹屑、玉米纤维中的水溶性单糖含量较少，但总糖含量仍然占到干重的 1%左右。此结果与以往研究结果一致，表明生物质原料中存在水溶性碳水化合物是一种普遍现象^[153]。

以小麦秸秆为例，如果其中的水溶性单糖（果糖和葡萄糖总量为 38.87mg/g DM）完全转化为 L、D-乳酸（L、D-乳酸生成比例参考野生菌株 *P. acidilactici* DQ2）^[151]，将生成约 26.0、13.0 mg/g DM 的 L、D-乳酸。生成的这部分 D-乳酸如前面结论一样稳定存在于后期的生物炼制过程中，在干法生物炼制平台的 L-乳酸发酵案例中^[93,154]，可能使发酵液中的 D-乳酸浓度增加 40 mg D-乳酸/g L-乳酸，并最终导致 L-乳酸手性纯度降低约 5.0%，表明由生物质原料中的内源水溶性单糖转化生成的 D-乳酸已完全具备影响最终纤维素 L-乳酸手性纯度的风险。

表 2.3 不同生物质原料中的水溶性单糖含量

Table 2.3 Soluble sugars in several biomass feedstocks

Biomass feedstocks	Glucose (mg/g DM)	Fructose (mg/g DM)	Total sugar (mg/g DM)
Wheat straw	14.65 ± 0.32	24.22 ± 3.06	38.87 ± 3.39
Corn stover	23.35 ± 2.05	31.40 ± 0.85	54.75 ± 2.90
Rice straw	3.17 ± 0.31	6.55 ± 0.69	9.72 ± 0.37
Bamboo shavings	0.87 ± 0.08	3.38 ± 0.87	4.25 ± 0.94
Corn fiber	3.16 ± 0.69	8.50 ± 1.75	11.66 ± 2.43

将新收获的小麦秸秆、玉米秸秆，储存 1-2 年的稻草、竹屑、玉米纤维分别与去离子水以 1:20 固液比混合后置于 30°C、150 rpm 水浴摇床中浸提 1 h，取样离心后测定上清液中的水溶性单糖含量

2.4 本章小结

为探究木质纤维素生物质来源的 L-乳酸发酵液中微量 D-乳酸存在的主要原因，本章通过对生物质原料、发酵辅料及生物炼制加工链中的 D-乳酸进行印记追踪，分析不同来源的 D-乳酸对纤维素 L-乳酸手性纯度的影响，确定了 D-乳酸的主要来源途径；并通过对生物质原料中乳酸生产菌株的筛选和鉴定、水溶性单糖的分析初步确定生物质原料中 D-乳酸生成的主要机制。本章的主要结论如下：

(1) 在生物炼制加工链中，所需的酶制剂、氮源及木质纤维素生物质原料中均存在或多或少的 D-乳酸，且在干酸预处理、酶促糖化、生物脱毒过程中维持相对稳定，其中生物质来源的 D-乳酸对纤维素 L-乳酸的手性纯度影响最显著，可使得 L-乳酸的手性纯

度降低 1.8%左右。

(2) 从麦秆、玉米秸秆、稻草、玉米纤维、竹屑五种生物质中筛选分离得到的鼠乳杆菌 WS1 (*Lactobacillus murinus* WS1)、粪肠球菌 CS2 (*Enterococcus faecalis* CS2)、屎肠球菌 RS4 (*Enterococcus faecium* RS4)、鸡肠球菌 BS2 (*Enterococcus gallinarum* BS2) 四株产乳酸均属于乳酸菌属，普遍存在于生物质原料中。

(3) 通过对几种生物质原料中的水溶性单糖进行测定、分析，发现麦秆、玉米秸秆、稻草、玉米纤维、竹屑中的水溶性单糖（主要为葡萄糖和果糖）含量约占生物质干重的 0.4%-5.5%左右，表明生物质原料中水溶性单糖的存在是一种普遍现象，且为乳酸的生成提供了前提条件。

第3章 木质纤维素生物质中 D-乳酸的生成及其遏制

3.1 引言

农作物秸秆如小麦秸秆、玉米秸秆、稻草等是主要的生物质能源，分布广泛、成本低廉、具有可再生性，其中除了纤维素、半纤维素、木质素这些主要成分之外，还含有一些由水溶性碳水化合物（WSC）、蛋白质、矿物质、维生素等构成的水溶性成分。Niu 和 Tishler 等人^[153,155,156]分别收集了多种来源于不同地区、不同收获时间且处于成熟期的麦秆、玉米秸秆、稻草等秸秆类作物，测得其中的 WSC 含量约占干重的 2%-12%。这类水溶性碳水化合物主要包括葡萄糖、果糖、蔗糖，在农作物生长初期用于种子淀粉合成，随着农作物逐渐成熟，部分会残存于木质纤维素生物质中，其种类和含量与秸秆的种类、结构成分（叶、茎）、成熟度以及储存条件有关。作为典型的可发酵糖，它们极易被附着在秸秆上的一系列细菌、酵母、和丝状真菌利用，生成 L、D 乳酸混合物或其他副产物^[157]，并留存于整个生物炼制加工链和后续分离纯化过程中，最终影响目标产物的手性纯度和化学纯度^[150]。

L-乳酸作为可降解高分子材料聚乳酸（PLA）的主要聚合单体，其手性纯度需达到 99.6%以上，这意味着 L-乳酸发酵液中的 D-乳酸必须低于 0.4%甚至更低。一旦微量的 D-乳酸存在于 L-乳酸产品中，会不可避免地在 L-丙交酯合成过程中产生内消旋丙交酯，最终对 PLA 的生产工艺、理化性质及晶体结构、机械性能等特性产生严重的负面影响。小麦秸秆作为最常用的木质纤维原料之一，其中的水溶性单糖可达 13%^[155]，如果将这部分游离糖全部换算成混合乳酸（L-乳酸与 D-乳酸的比例为 2:1），则最终 L-乳酸发酵液中会含有约 18 g/L 的 D-乳酸，致使 L-乳酸的手性纯度降低 10%左右，因此遏制生物质原料中水溶性单糖向 D-乳酸转化是提高纤维素 L-乳酸手性纯度的关键策略。从小麦秸秆中提取水溶性单糖或者生成的 L、D-乳酸混合物及其他水溶性成分的可行性极低，这是因为麦秆中的水溶性成分仅为干重的 10%左右，如果使用水浸提的方式去除低浓度的 L、D 乳酸及 WSC，将会产生大量的废水，从而增加大规模生产手性乳酸的成本。

本章基于生物质原料中存在的寄生乳酸菌和水溶性单糖，设计实验探究了不同条件下麦秆中乳酸的生成情况及生成的 D-乳酸对 L-丙交酯聚合的影响，并围绕遏制生物质原料中 D-乳酸合成这一核心目标提出三种策略：形成抑制寄生乳酸菌繁殖的环境、切断内源水溶性单糖的乳酸转化途径、选择性的将水溶性单糖转化为 L-乳酸，均有效的消除了生物质来源的 D-乳酸进入最终的纤维素 L-乳酸产品中。本研究通过从生物质原料出发提出三条遏制 D-乳酸的生成的策略，为合成高手性纯度的纤维素 L-乳酸提供了强有力的技术支持。

3.2 材料与方法

3.2.1 生物质原料、酶与试剂

本章实验所用的小麦秸秆于 2021 年秋季从河南省南阳市收获，使用锤式粉碎机粉碎后（粉碎机筛网的直径约为 10 mm）立即用于实验或装袋储存。

本章使用的酶及其他试剂同 2.2.1

3.2.2 菌株、培养基及培养条件

本章所使用的乳酸发酵菌株 *Pediococcus acidilactici* ZY271 (CGMCC 13611) [93]，用于生物质原料储存过程中将水溶性单糖转化为 L-乳酸及同步糖化共发酵过程中纤维素 L-乳酸的生产。

乳酸发酵菌株 *Pediococcus acidilactici* DQ2 (CGMCC 7471) [151]，用于生物质原料储存过程中将水溶性单糖转化为混合 L、D-乳酸。

本章所使用的培养基：

简化 MRS 培养基：20 g/L 葡萄糖，10 g/L 酵母粉，5 g/L 无水乙酸钠，0.58 g/L 七水硫酸镁，0.25 g/L 一水硫酸锰，蛋白胨、三水磷酸氢二钾、柠檬酸氢二铵的浓度同 2.2.2。在 1 L 液体培养基中的添加 15 -20 g 琼脂制备固体培养基。

乳酸发酵菌株 *P. acidilactici* ZY271 和 *P. acidilactici* DQ2 培养方法一样。具体过程为：从 -80°C 超低温冰箱中拿出 2 ml 菌液冻存管，接种至 20 mL 简化 MRS 培养基中，活化 12 h；然后以 10% 的接种量转接至 100 mL 简化 MRS 培养基中扩培 5 h。扩培后的菌液作为后续实验的种子液，培养条件为 42°C、150 rpm，该过程无需调节 pH。

脱毒菌株 *P. variotii* FN89 的培养方式同 2.2.2。

3.2.3 生物质原料储存

木质纤维素原料的储存方式分为两种：一种是在新收获的麦秆中直接接种 10% (v/w) 的 *P. acidilactici* ZY271 菌液用于将水溶性单糖转化为 L-乳酸；另一种是将麦秆完全清洗、烘干后（未检测到水溶性单糖和乳酸）添加葡萄糖、果糖和 *P. acidilactici* DQ2 菌液将水溶性单糖转化为 L、D-乳酸。将小麦秸秆原料按实验设计进行不同的处理后放入 80 × 60 cm 的密封袋中，抽出空气，在室温条件下进行密封储存，此步骤参考青贮、黄储秸秆饲料的生产过程 [158]。定期取样，测定其中的乳酸和残糖，方法同 2.2.1。

该批次麦秆的含水量为 $22.75 \pm 1.77\%$ 。根据 NREL 法 LAP-002 和 LAP-005 测得 [159,160]，其中的纤维素、木聚糖、木质素、灰分含量分别为 $34.31 \pm 0.14\%$ 、 $21.30 \pm 1.78\%$ 、 $22.12 \pm 0.07\%$ 、 $10.63 \pm 0.28\%$ 。

3.2.4 纤维素 L-乳酸的同步糖化共发酵 (SSCF)

预处理、糖化、生物脱毒过程同 2.2.3。

同步糖化共发酵过程在 3 L 发酵罐中进行。在液态脱毒结束后立即关闭通气量，升温至 42°C 以 10% (v/v) 的接种量将 *P. acidilactici* ZY271 种子液与营养盐加入到发酵罐中进行同步糖化与共发酵，用 25% (w/w) 氢氧化钙调节 pH 至为 5.5，转速为 300 rpm，

发酵时间 72 h。每 24 h 取样，样品在 12000 rpm 下离心 5 min，上清液用于检测葡萄糖、木糖、乳酸浓度。

3.2.5 L-丙交酯的合成

根据 He^[154]的方法进行丙交酯的合成，具体过程为：将不同比例的 L、D-乳酸混合溶液加入到 250 mL 圆底烧瓶中，在 80°C、0.01 MPa 条件下维持 30 min 脱水生成乳酸低聚物。恢复常压，加入 1.0% (v/w) 的辛酸亚锡，缓慢升温至 140°C，保持 1.5 h 使反应体系中的水分完全蒸发。然后迅速升温至 230-240°C，逐步减压至真空 (0.098 MPa)，直至圆底烧瓶中无液体残留，淡黄色液体在冷凝管与接收器中结晶后得到粗丙交酯。

将得到的粗丙交酯在 50°C 无水乙醇溶液中溶解，然后置于 4°C 冰箱中重新结晶析出。重复此步骤两次，然后将纯化后的丙交酯在真空冷冻机中干燥。

3.2.6 分析方法

葡萄糖、果糖、木糖、乳酸、抑制物等组分使用高效液相色谱测定，方法见 2.2.5。

L-乳酸的手性纯度用 D/L-Lactic Acid Kit 试剂盒测定，方法见 2.2.5。

丙交酯的熔点测定：采用热同步分析仪 (STA 449 F5 Jupiter)，在氮气保护条件下，升温速率为 5°C/min 表征丙交酯。

3.3 结果与讨论

3.3.1 生物质原料中 D-乳酸的生成及其对 L-丙交酯聚合的影响

生物质原料中寄生乳酸菌和水溶性单糖的共同存在，使得其中的水溶性单糖在储存过程中被乳酸菌转化成乳酸成为可能。由于这些乳酸菌产生的乳酸都是非单一的，即 L-乳酸和 D-乳酸共同存在，最终降低了纤维素 L-乳酸的手性纯度。本章以麦秆作为生物质原料对象，对其中所含水溶性单糖转化为外消旋乳酸的规律进行了研究。

为探究生物质原料储存过程中 L-和 D-乳酸的生成情况，本章分别模拟了不同含水量条件下的新收获麦秆。一般新收获的麦秆中含水量为 10%-20% 左右，在潮湿环境下长期储存会达到 20-30% 以上，若受到雨水侵蚀则可能会增加至 70-80%，而干旱季节或干燥处理后的麦秆含水量也可能低于 10%。本研究将完全水洗、烘干后麦秆（未检测到葡萄糖、果糖、乳酸）添加不同质量的水、葡萄糖和果糖来模拟不同含水量的麦秆，15% 含水量代表正常收获麦秆状态、25% 含水量代表潮湿环境存放状态的麦秆。将上述两类原料混合均匀后，以 10% (v/w) 的接种量接种从玉米秸秆水解液中分离得到的野生型乳酸菌株 *P. acidilactici* DQ^[151]，抽出空气，密封储存，定期监测不同时期麦秆中的糖耗及产乳酸情况（图 3.1）。

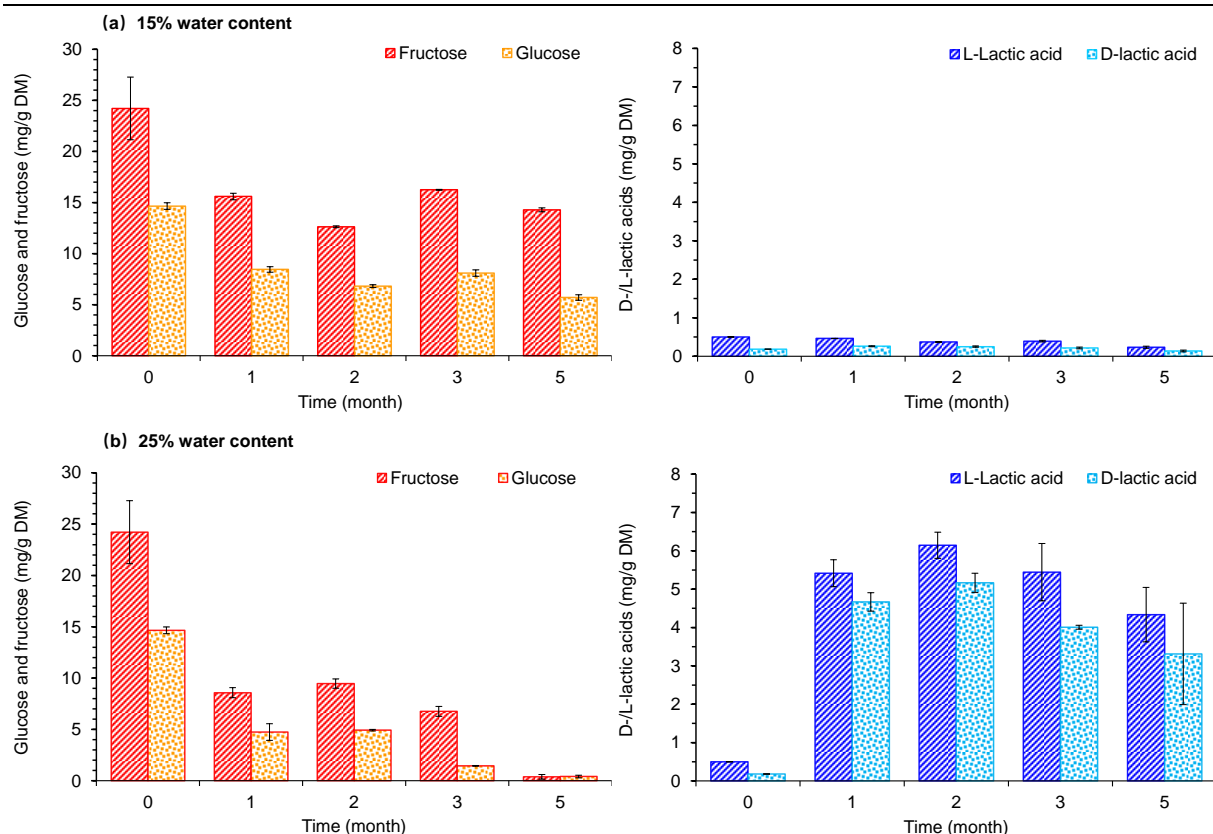


图 3.1 不同含水量 (w/w) 条件下的麦秆在密封储存过程中水溶性单糖和乳酸的转化

Fig. 3.1 Soluble sugars and lactic acid in wheat straw at different storage conditions moisture content (w/w) during storage

(a) 15%含水量 (b) 25%含水量

储存条件：以 10% (v/w) 的接种量将 *P. acidilactici* DQ2 添加到完全清洗、烘干的麦秆上，初始葡萄糖及果糖含量根据新收获麦秆中对应的含量进行添加，混匀后装入密封袋中，抽出空气室温条件下密封储存

在经过五个月的密封储存后，15%含水量条件下的麦秆中乳酸无明显增加，L、D-乳酸分别从 0.37、0.18 mg/g DM 增加到 0.50、0.25 mg/g DM，pH 从 7.13 降到 6.97。水溶性单糖消耗速率也相对较慢，葡萄糖、果糖分别从 14.65、24.0 mg/g DM 下降到 6.81、14.28 mg/g DM。而当秸秆储藏不当、受到雨雪直接侵袭时，含水量会上升到 25% 甚至更高。这种情况下，在经过五个月储存后麦秆中的乳酸含量显著增加，L、D-乳酸分别从 0.50、0.18 mg/g DM 增加到 6.14、5.16 mg/g DM，同时 pH 值由最初的 7.11 下降到 4.91。总糖消耗速率明显高于同期的 15% 含水量麦秆，葡萄糖、果糖含量分别从 14.65、24.0 mg/g DM 下降到 0.41、0.38 mg/g DM (图 3.1)。这些结果说明，原料中同时存在水溶性单糖和寄生乳酸菌时，在储存过程中必然会产生 D-乳酸，并且原料的含水量越高，生成的 D-乳酸越高，对 L-乳酸手性纯度影响更大。在 25% 含水量条件下储存五个月的麦秆中，D-乳酸最高可达 5.16 mg/g DM，此含量可导致干法生物炼制生产 L-乳酸发酵案例中^[93,154]，L-乳酸的手性纯度降低 2% 左右。

L-乳酸作为 L-丙交酯的聚合单体，其手性纯度是 L-丙交酯聚合的核心因素之一。而

生物质原料中存在的 D-乳酸会稳定存在于生物炼制加工链的全过程中，并最终进入 L-乳酸发酵液中，降低 L-乳酸的手性纯度，进一步影响 L-丙交酯的性能。其中丙交酯的熔点是聚乳酸聚合过程中被重点关注的特性之一，因为通过 ROP 合成 PLA 的温度通常介于丙交酯的熔点和 PLA 降解温度之间^[161]。在前面的研究中我们发现，新收获状态下、25%含水量条件下储存两个月状态下（表 2.2）及内源水溶性单糖完全转化为乳酸状态下的麦秆中 D-乳酸生成量，换算到 L-乳酸发酵液中 D-乳酸的含量分别约 1.88、17.98、40 mg/g L-乳酸。因此我们在市售 L-乳酸中添加了不同含量的 D-乳酸（1.7、15、40 mg/g L-乳酸分别代表上述三种状态下麦秆中生成的 D-乳酸含量占比），进行 L-丙交酯的合成，并测定不同条件下 L-丙交酯的熔点（表 3.1），来探究不同手性纯度的 L-乳酸对 L-丙交酯性能的影响。

表 3.1 不同手性纯度的 L-乳酸合成的 L-丙交酯的熔点测定

Table 3.1 Melting point of L-lactide samples synthesized from L-lactic acid containing trace D-lactic acid

D-lactic acid in L-lactic acid monomer ^a (mg/g)	Melting point of synthesized L-lactide (°C)
Control	95-98 ^[111]
0.0	99.16
1.7 ^b	113.91
15.0 ^c	86.59
40.0 ^d	85.90

^a 根据麦秆原料中乳酸的含量设定 L、D-乳酸的比例；^{b、c} 在新收获和储存两个月的麦秆中存在的 D-乳酸会致使发酵液中增加 1.7 (~1.88)、15.0 (~17.98) mg D-乳酸/g L-乳酸；^d 麦秆中的可溶性单糖完全转化为乳酸时会致使发酵液中增加 40.0 mg D-乳酸/g L-乳酸。

据文献报道，L-丙交酯和 D-丙交酯标品的熔点为 95-98 °C，内消旋丙交酯的熔点为 53-54 °C，外消旋丙交酯（D,L-丙交酯）的熔点为 122-126 °C^[111]。实验结果表明（表 3.1），不添加 D-乳酸时合成的 L-丙交酯熔点为 99.16 °C，与文献报道 95-98 °C 接近。当 D-乳酸的含量为 1.7 mg/g L-乳酸时，L-丙交酯的熔点为 113.91 °C。随着 D-乳酸含量的增加，丙交酯的熔点逐渐降低，当 D-乳酸的含量为 40 mg/g L-乳酸时丙交酯的熔点降至 85.90 °C，这表明 D-乳酸的存在极大地影响了 L-丙交酯的性质，增加了其内消旋化程度，进而可能对合成高分子质量、高性能的聚乳酸产生严重的负面影响。

3.3.2 降低生物质含水量阻断水溶性单糖转化为乳酸的途径

纤维素 L-乳酸中的微量 D-乳酸主要来自于生物质原料中的内源水溶性单糖在寄生乳酸菌作用下生成的 D-乳酸。为了遏制生物质来源的 D-乳酸进入最终 L-乳酸产品中，我们采取了三条策略从源头切断或改变外界条件来抑制 D-乳酸的生成。

在 Han 的研究中表明，较高含水量的玉米秸秆在储存过程中有利于促进乳酸发酵，即低含水量可抑制乳酸的生成^[150]。因此我们考虑是否可以通过降低生物质原料的含水量来抑制微生物的生长，从而遏制水溶性单糖向混合 L、D-乳酸转化。同时由生物质原料中 D-乳酸的生成研究结果也可知（图 3.1），在密封储存过程中，25%含水量麦秆中乳

酸的生成量约为 15%含水量条件下的 256 倍,因此第一条策略为通过降低含水量来阻断水溶性单糖转化为乳酸。为探究该策略的可行性,我们以 25%含水量条件下储存的麦秆为对照组,在完全水洗、烘干后的麦秆中添加不同质量的水、葡萄糖和果糖使其含水量为 8%,代表干旱季节或干燥处理后的麦秆,并接种 *P. acidilactici* DQ2 菌液进行密封储存,定期监测麦秆中的糖耗及产乳酸情况(图 3.2)。

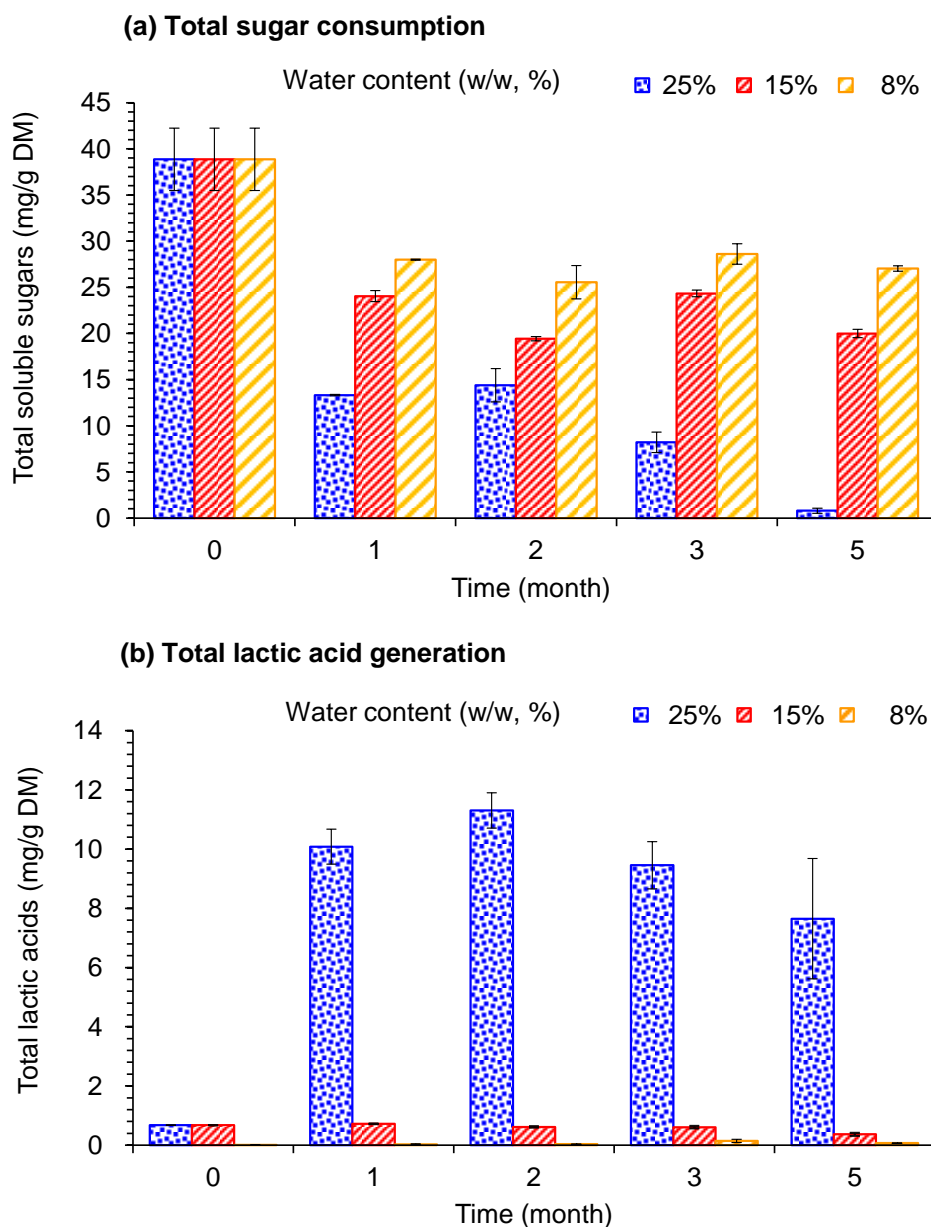


图 3.2 麦秆的初始含水量对密封储存过程中水溶性单糖和乳酸转化的影响

Fig. 3.2 Effect of initial water content of wheat straw on conversion of water-soluble sugars and lactic acid during sealed storage

(a) 总糖(葡萄糖和果糖)消耗 (b) 总乳酸生成

储存条件:以 10% (v/w) 的接种量将 *P. acidilactici* DQ2 菌体添加到完全清洗、烘干的麦秆上,初始葡萄糖及果糖含量根据新收获麦秆中对应的含量进行添加,混匀后装入密封袋中,抽出空气室温条件下密封储存。

在生物质原料密封储存过程中乳酸的生成和水溶性单糖的消耗与其初始含水量密切相关（图 3.2）。当麦秆含水量为 8%时，经过五个月的储存后，总水溶性单糖消耗量和乳酸生成量最低，其中总水溶性单糖从 38.87 mg/g DM 降低到 27.03 mg/g DM，总乳酸从 0.012 mg/g DM 增加到 0.035 mg/g DM。当麦秆含水量增加到 15%，糖耗速率明显增快，总水溶性单糖降低到 19.98 mg/g DM，总乳酸含量从 0.68 增加到 0.72 mg/g DM。而在 25%含水量条件下，麦秆中的总水溶性单糖几乎耗尽（0.80 mg/g DM），总乳酸含量从 0.68 mg/g DM 增加到 11.30 mg/g DM，乳酸的生成量是 8%含水量条件下的 474 倍。因此对生物质原料进行干燥处理或储存在干燥的环境可以有效的降低乳酸的生成，是阻断 D-乳酸生成的可行策略。

该策略提供了一个生物质原料前处理的重要原则，即收获和储存需要干燥环境。新鲜收获的生物质原料通过太阳曝晒或风干便能达到降低含水量的目的，且该过程能耗较低，具有较高的可行性。在实际操作上，生物质物料 8%含水量的干燥程度是难以实现的，长期储存下维持生物质原料 15%的含水量，在以一年作为一个收获周期的时间范围内，需要严格的储存环境，如避开雨雪侵袭、而又正常通风的半封闭空间中才有可能做到。

3.3.3 通过预处理将水溶性单糖转化为呋喃醛阻断乳酸生成的途径

第二种策略是通过预处理将生物质原料中的水溶性单糖及时转化为呋喃醛等抑制物，从生物炼制加工链的第一步（预处理步骤）切断乳酸生成的碳水化合物来源，而生成的抑制物可在加工链的后续生物脱毒步骤降解。本研究以彻底水洗去除所有单糖和乳酸的麦秆物料为对照组，分别补加葡萄糖、果糖和乳酸得到不同储存时期的麦秆，包括新收获麦秆（15.0 mg/g DM 葡萄糖、24.0 mg/g DM 果糖，不含乳酸）、储藏初期麦秆（此时一半的初始水溶性单糖转化为乳酸，葡萄糖、果糖分别为 7.5、12.0 mg/g DM，L、D-乳酸分别为 13.0、6.5 mg/g DM）和储藏后期麦秆（此时水溶性糖完全转化为乳酸，L、D-乳酸按照 *P. acidilactici* DQ2 的 2:1 比例，分别为 26.0、13.0 mg/g DM，无水溶性单糖）。将三种模拟不同储存阶段的麦秆物料进行干酸预处理，分析可溶性单糖转化生成抑制物的状况以及对 L-乳酸手性纯度的影响。

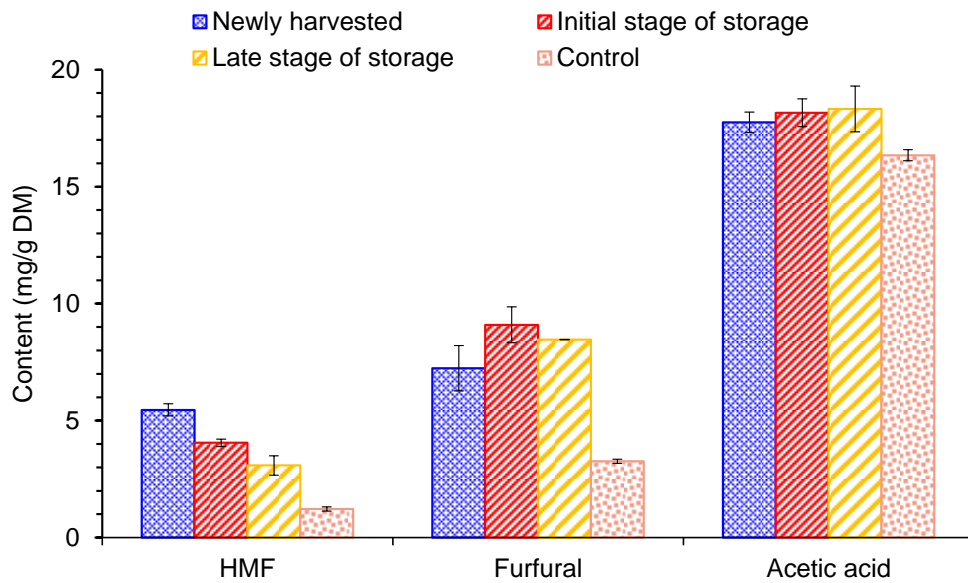


图 3.3 不同储存时期的麦秆在干酸预处理过程中生成的抑制物含量

Fig. 3.3 Inhibitors in wheat straw at different stages during dry acid pretreatment

对不同时期的麦秆进行干酸预处理, 在 175°C 条件下反应 5 min, 硫酸用量为 3.8% (g 硫酸/g 干物料) 新收获麦秆中葡萄糖和果糖分别为 15.0、24.0 mg/g DM, 无乳酸; 储藏初期麦秆中初始水溶性单糖的一半转化为乳酸, 此时葡萄糖、果糖、L、D-乳酸分别为 7.5、12.0、13.0、6.5 mg/g DM; 储藏后期的麦秆中水溶性单糖完全转化为乳酸, L、D-乳酸分别 26.0、13.0 mg/g DM; 对照组为完全清洗、烘干后麦秆, 其中未检测到葡萄糖、果糖、乳酸。

水溶性单糖 (葡萄糖和果糖) 在麦秆储存过程中被寄生乳酸菌转化为乳酸, 而在干酸预处理过程中被降解成 HMF^[11], 部分被降解成糠醛^[162] (图 3.3)。其中新收获麦秆中水溶性单糖含量最高, 生成的 HMF 含量也最高 (5.46 ± 0.26 mg/g DM); 随着生物质原料中水溶性单糖含量的减少生成的 HMF 含量逐渐降低, 储藏初期、储藏后期的麦秆中 HMF 含量降低为 4.05 ± 0.16 、 3.08 ± 0.41 mg/g DM, 不含糖的对照组最低 (1.23 ± 0.091 mg/g DM)。乳酸作为酸催化剂会加强预处理效果, 使预处理过程中所产生木糖和阿拉伯糖进一步降解为糠醛, 因此糠醛生成量最高的是同时含有水溶性单糖和乳酸的储藏初期麦秆 (9.09 ± 0.77 mg/g DM), 其次是只含有乳酸的储藏后期麦秆 (8.46 ± 0.012 mg/g DM) 和只含有水溶性单糖的新收获麦秆 (7.24 ± 0.97 mg/g DM), 对照组中糠醛含量最低 (3.26 ± 0.092 mg/g DM)。乙酸在不同储存时期麦秆中的含量基本一致 (17.75 ± 0.44 - 18.32 ± 0.98 mg/g DM), 这是因为乙酸是由半纤维素中的乙酰基断裂生成的。这些结果表明通过预处理操作可将生物质原料中的可溶性单糖基本转化为呋喃醛, 从而避免其向乳酸的转化, 实现对生物质原料中 D-乳酸生成的遏制。

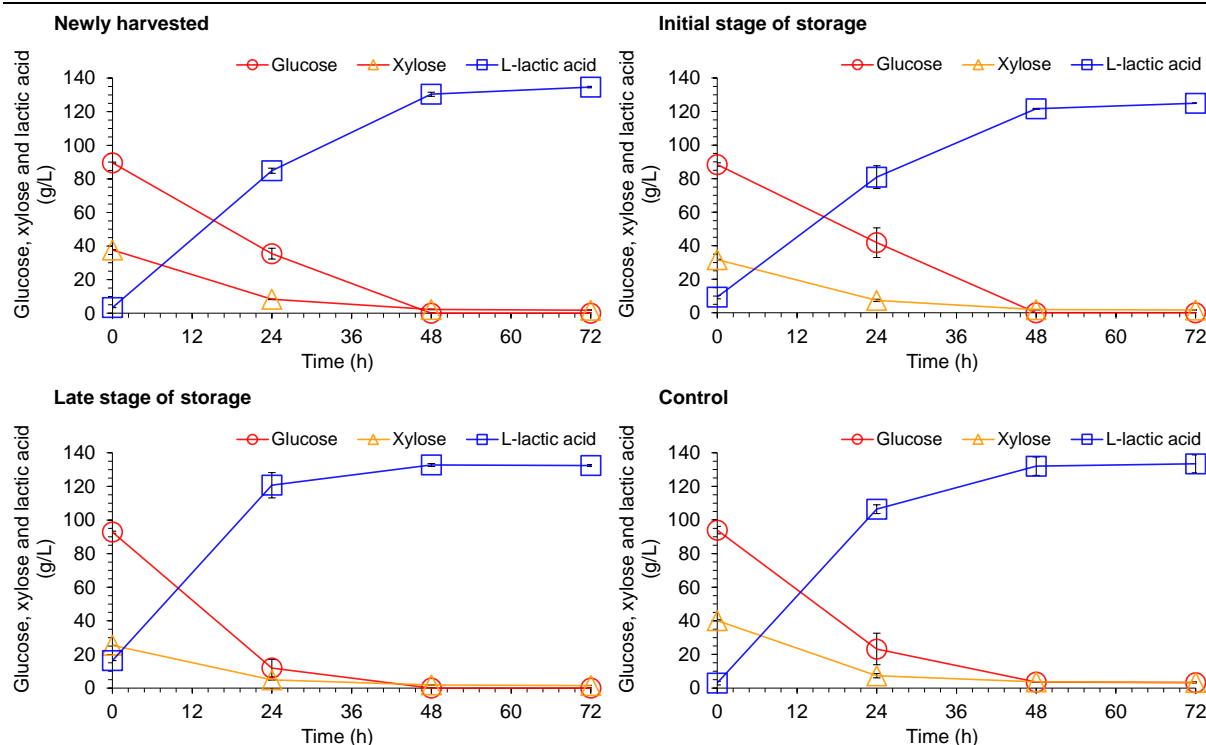


图 3.4 不同储存时期的麦秆在乳酸菌 *P. acidilactici* ZY271 的作用下进行同步糖化与共发酵

Fig. 3.4 Simultaneous saccharification and co-fermentation by *P. acidilactici* ZY271 using wheat straw from different storage periods

发酵条件：小麦秸秆的固含量为 30% (w/w)，纤维素酶 CTec2 的用量为 4 mg 酶蛋白/g 干物料；以 10% (v/v) 的接种量接种乳酸菌 *P. acidilactici* ZY271，在 42°C、300 rpm 的 3 L 发酵罐中进行同步糖化与共发酵；用 25%(w/w)的 Ca(OH)₂ 调节 pH，使其维持在 5.5。

将上述四种预处理后的麦秆进行生物脱毒去除抑制物后，接种乳酸发酵菌株 *P. acidilactici* ZY271 进行同步糖化共发酵生产 L-乳酸（图 3.4），并比较发酵液中 D-乳酸的含量和 L-乳酸的手性纯度（表 3.2）。结果表明，首先是发酵初期乳酸和糖的浓度，储藏初期和储藏后期的两组麦秆在接种种子液 *P. acidilactici* ZY271 后乳酸的含量分别为 9.38 ± 1.10 、 16.34 ± 0.05 g/L，显著高于原始物料中不含有乳酸的两组麦秆 2.93 ± 1.06 、 3.41 ± 0.12 g/L，这是由于麦秆在储存过程中生成的乳酸稳定存在于生物炼制过程中，最终进入 L-乳酸产品中。初始葡萄糖浓度无明显差异，初始木糖浓度在储藏初期和储藏后期的两组麦秆中浓度较低 (25.41 ± 0.04 - 31.65 ± 0.29 g/L)，可能是因为在相同预处理条件下，乳酸的存在增加了预处理强度，使得预处理后产生的木糖更多降解为糠醛，这种现象也进一步解释了糠醛含量的差异。其次是乳酸产量，总的乳酸浓度基本没有明显差异，但是在含有乳酸的两组麦秆中由乳酸菌 *P. acidilactici* ZY271 发酵而产生的乳酸分别为 115.61 g/L 和 116.09 g/L，低于不含乳酸的两组麦秆 129.85 g/L、 131.2 g/L，造成这种现象的原因可能是储藏初期、后期的麦秆中初始木糖的损失（20%和 33%）和初始乳酸含量的抑制作用（图 3.4）。最后是 L-乳酸的手性纯度，在新收获麦秆发酵液中 D-乳酸

浓度最低 (0.53 ± 0.068 g/L), L-乳酸的手性纯度最高 (99.61%), 与对照组结果相近 (0.62 ± 0.091 g/L 和 99.53%), 而经过储藏后的麦秆发酵液中 D-乳酸浓度会增至新收获麦秆发酵液中 D-乳酸的 8.9-14.9 倍 ($4.76 \pm 0.36 - 7.90 \pm 0.17$ g/L), L-乳酸的手性纯度也显著降低 (94.03% - 96.18%) (表 3.2)。

通过直接对新收获的麦秆进行预处理操作, 将水溶性单糖转化为呋喃醛等抑制物, 可有效地降低发酵液中 D-乳酸的浓度, 并显著提高 L-乳酸的手性纯度。这一方法从源头彻底切断水溶性单糖向 D-乳酸转化, 而从糖转化生成的抑制物可以通过生物脱毒的方式完全降解, 可行性较高。然而, 这一策略的前提是生物质原料收获后立即进入生物炼制加工链的第一步 (预处理步骤), 而收获、运输和仓储即使在最高的效率下也需要一定时间, 此时已经有部分水溶性单糖不可控的转化为 D-乳酸 (表 2.2), 因此该策略在实际的操作中具有局限性。

表 3.2 不同储存时期麦秆的组成成分及发酵液中初始糖浓度和纤维素 L-乳酸的手性纯度

Table 3.2 Composition of wheat straw at different stages and initial sugar, lactic acid chirality in the fermentation broth

Wheat straw at different stages	Water soluble sugars in wheat straw (mg/g DM)	Lactic acids in wheat straw (mg/g DM)	Hydrolysate (g/L)			D-lactic acid in fermentation broth (g/L)	L-lactic acid chirality (% w/w)
			Glucose	Xylose	Lactic acid		
Newly harvested (No sugar conversions)	Glucose 15.0 Fructose 24.0	L-lactic acid 0.0 D-lactic acid 0.0	89.59±0.40	37.70±0.19	3.41±0.12	0.53±0.068	99.61
Initial stage of storage (half sugars converted to lactic acids)	Glucose 7.5 Fructose 12.0	L-lactic acid 13.0 D-lactic acid 6.5	88.44±0.96	31.65±0.29	9.38±1.10	4.76±0.36	96.18
Late stage of storage (all sugars converted to lactic acids)	Glucose 0.0 Fructose 0.0	L-lactic acid 26.0 D-lactic acid 13.0	92.81±0.63	25.41±0.04	16.34±0.05	7.90±0.17	94.03
Control (No sugars or lactic acids contained)	Glucose 0.0 Fructose 0.0	L-lactic acid 0.0 D-lactic acid 0.0	93.96±2.17	40.16±0.42	2.93±1.06	0.62±0.091	99.53

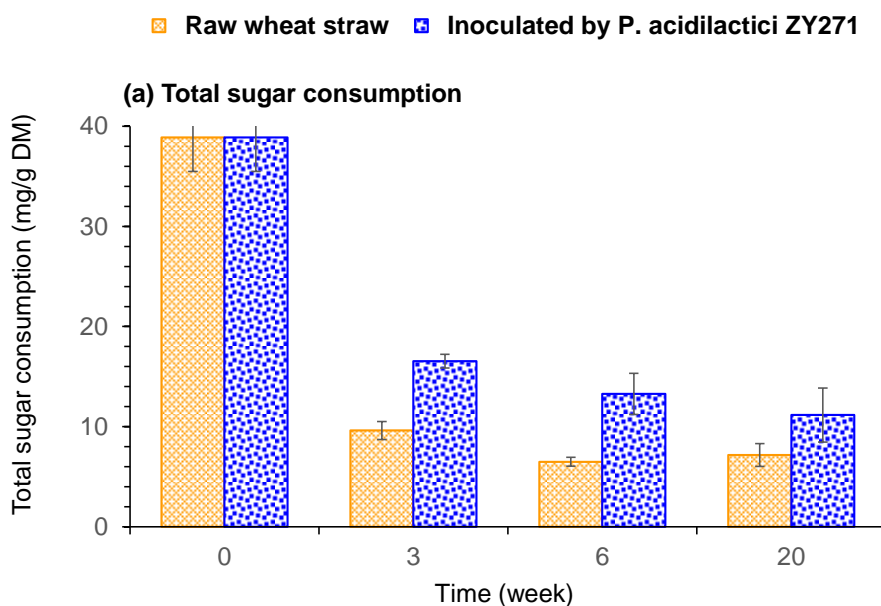
发酵条件：小麦秸秆的固含量为 30% (w/w)，发酵菌株为 *P. acidilactici* ZY271，在 42°C、300 rpm 的发酵罐中进行同步糖化与共发酵；在通过预处理操作后，新收获麦秆和对照组中未检测到乳酸，储藏初期麦秆和储藏后期麦秆中的乳酸含量分别为 28.61 ± 0.26 、 56.93 ± 0.38 mg/g DM。

3.3.4 将生物质原料中的水溶性单糖转化为 L-乳酸的 D-乳酸生成阻断途径

生物质原料中的寄生乳酸菌大多为消旋乳酸菌，同时产生 L-乳酸和 D-乳酸。第三种策略是在生物质原料储存阶段接种生产单一 L-乳酸的工程菌株，将生物质中的内源性可发酵单糖（葡萄糖和果糖）尽可能的转化为 L-乳酸，减少由寄生乳酸菌消耗单糖生成 D-乳酸的风险。

本章在新收获麦秆中以 10% (v/w) 的接种量喷洒 L-乳酸发酵菌株 *P. acidilactici* ZY271 的培养液，并以不做任何处理的新收获麦秆为对照，测定不同时期小麦秸秆中葡萄糖、果糖及 L、D-乳酸的转化进行验证（图 3.5）。结果表明，接种 *P. acidilactici* ZY271 菌液的麦秆在密封储存过程中 L-乳酸含量显著增加，在储存 20 周后 L-乳酸的含量达到 9.42 mg/g DM，是未处理的麦秆中 L-乳酸含量的 42.8 倍（0.22 mg/g DM），这说明在麦秆中接种 L-乳酸发酵菌株可以将可溶性单糖有效转化为 L-乳酸。虽然新收获的小麦秸秆中一般已有部分水溶性单糖转化为 L-、D-乳酸（分别为 1.18、0.54 mg/g DM），但接种 L-乳酸生产菌株促进了 L-乳酸的生成，使 D-乳酸在总乳酸中的含量占比从 29.43% 降低到 2.73%（图 3.5 c）。接种菌液的麦秆中总糖消耗速度略低于对照组麦秆，这是由于 L-乳酸生产菌株生成的 L-乳酸降低了原料储存环境的 pH，从而减缓了微生物对糖的消耗速率（图 3.5 a）。此外，我们还发现未接种工程菌的麦秆中 L-乳酸含量从 1.18 mg/g DM 到 0.22 mg/g DM，呈下降趋势（图 3.5 b），可能是因为寄生乳酸菌或其它杂菌可以同时利用水溶性单糖及乳酸作为底物进行生长和代谢^[163]。

此策略可有效将生物质原料中的水溶性单糖转化为目的产物 L-乳酸，抑制了寄生乳酸菌向 D-乳酸的转化，从而提高纤维素 L-乳酸的手性纯度和 L-乳酸的产量^[150]。但是，本方案需要培养固体生物质原料质量的 10% 的乳酸工程菌种子液，而且种子液与固体生物质原料的混合以及长期密封储存（乳酸厌氧发酵）等操作也会产生较高的成本，因此该方案的实施需要仔细考虑成本因素。



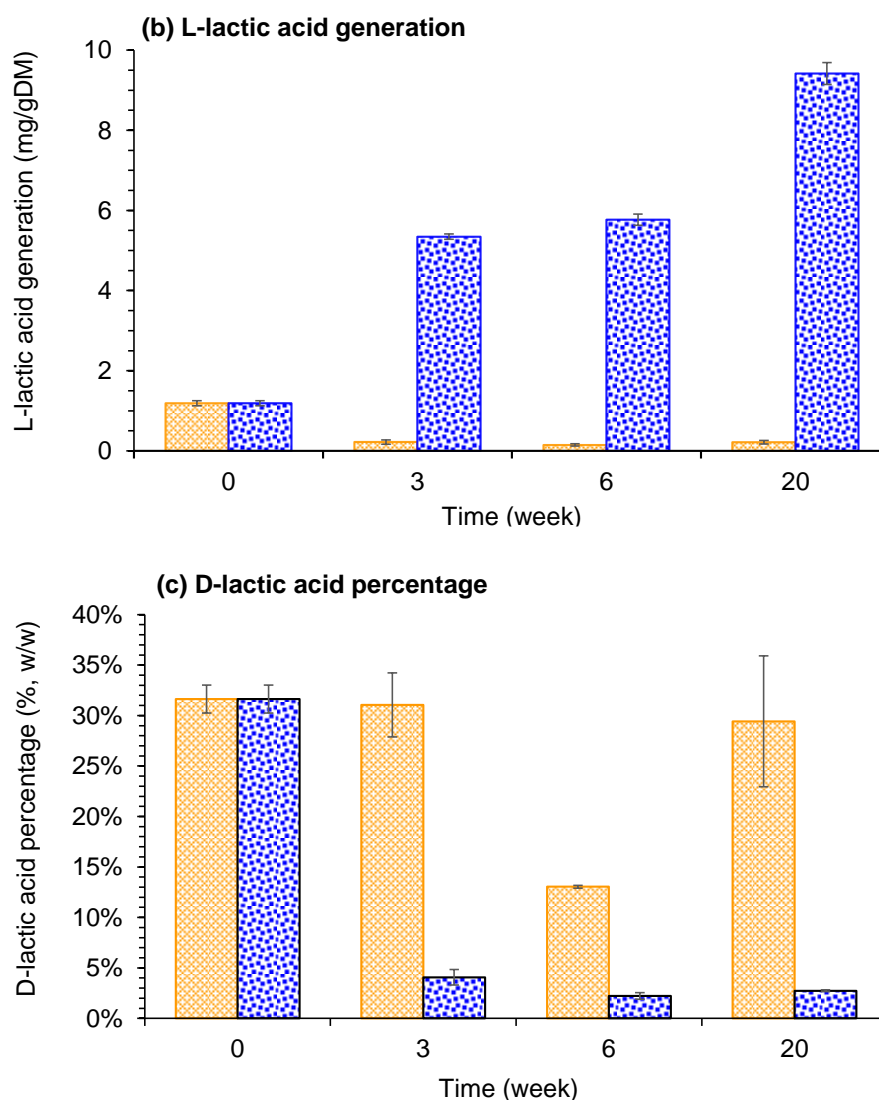


图 3.5 接种 *P. acidilactici* ZY271 的小麦秸秆在厌氧储存过程中乳酸及可溶性单糖含量的变化

Fig. 3.5 Soluble sugar and lactic acid in wheat straw with *P. acidilactici* ZY271 inoculated during anaerobic storage

(a) 总糖的消耗 (b) L-乳酸的生成 (c) D-乳酸在总乳酸中的占比

以 10% (v/w) 的接种量将 *P. acidilactici* ZY271 添加到小麦秸秆物料上, 混合均匀后厌氧储存 20 周, 添加的菌液中 L-乳酸和葡萄糖分别为 1.10 mg/g DM、1.14 mg/g DM, 无果糖; 以未接种乳酸菌 *P. acidilactici* ZY271 且不做任何处理麦秆作为对照。

3.4 本章小结

木质纤维素生物质来源的 D-乳酸是造成纤维素 L-乳酸手性纯度降低的主要途径。本章以小麦秸秆为研究对象, 探究了不同含水量条件下麦秆中 D-乳酸的生成量以及生成的 D-乳酸对 L-丙交酯性能 (熔点) 的影响; 为遏制生物质原料中 D-乳酸的生成提供了三条主要策略, 均有效的避免了 D-乳酸的生成。本章的主要结论如下:

(1) 水溶性单糖和寄生乳酸菌共存时, 生物质原料在储存过程中必然会产生 D-乳

酸，并随着原料含水量的增加而增加；并且在 L-丙交酯合成过程中 D-乳酸的存在严重影响了合成产品的熔点，增加了 L-丙交酯的内消旋化程度。

(2) 生物质原料的初始含水量与水溶性单糖转化为乳酸的效率息息相关，当麦秆的初始含水量为 8% 时，密封储存五个月后，乳酸的生成量是 15% 含水量条件下的 53.9%，25% 含水量条件下的 0.21%，因此降低生物质原料的含水量可以有效的抑制水溶性单糖转化为乳酸，是一条可行的策略。

(3) 生物质原料中的水溶性单糖在干酸预处理过程中几乎被降解成 HMF，部分被焦糖化为糠醛。通过在预处理步骤中将水溶性单糖转化为呋喃醛类抑制物，使 L-乳酸的手性纯度从 94.03% 提高到 99.61%，是从源头彻底切断水溶性单糖向 D-乳酸转化的一条策略。

(4) 生物质原料中的寄生乳酸菌会将水溶性单糖转化为混合 L-、D-乳酸，通过向生物质原料中接种生产单一 L-乳酸的工程菌株，可抑制杂菌的生长同时将水溶性单糖尽可能的转化为 L-乳酸，相比于未经过处理的对照组，L-乳酸的含量提高了 42.8 倍，D-乳酸的占比降低了 26.7%，为遏制 D-乳酸的生成提供了一条可行的策略。

第4章 生物质原料密封储存过程中乳酸含量变化的规律研究

4.1 引言

第三章提出了两条在生物质原料储存过程中遏制水溶性单糖向 D-乳酸转化的策略, 通过降低生物质原料的含水量或选择性的将水溶性单糖转化为 L-乳酸可有效的避免 D-乳酸的生成。然而不同条件下的麦秆在储存过程中均出现了一个奇怪的现象, 即储存初期乳酸含量随着可发酵糖的消耗逐渐增加, 而在储藏后期随着水溶性单糖的消耗殆尽乳酸逐渐下降。此外在以木质纤维素或其他原料为底物进行 L/D-乳酸生产的研究中, 我们发现在发酵后期也会出现类似的现象^[164]。

乳酸是微生物发酵过程中乳酸脱氢酶氧化丙酮酸的产物, 广泛存在于植物、动物和微生物中, 在食品、制药、皮革、化学和纺织工业中有许多不同的应用, 其中可作为底物进行丙酮酸及其他生物基化学品的合成。目前已报道了几种可以氧化乳酸的微生物酶, 如来自 *Pediococcus sp.* 的乳酸氧化酶^[165]、*Pseudomonas stutzeri* SDM 的乳酸脱氢酶^[166]、*Bakers yeast* 的乙醇酸氧化酶^[167]和乳酸消旋酶^[168]等均可将乳酸转化为丙酮酸或其他产物。在麦秆储存过程中乳酸的生成和消耗是否是这几种酶起作用还需要进一步研究。

本章为了探究麦秆密封储存过程中乳酸生成与降解的原因, 利用从生物质原料中筛选出来的四种野生乳酸菌分别在含有不同浓度的葡萄糖、L-乳酸及 D-乳酸的条件下进行发酵, 通过检测乳酸转化过程中生成的产物及副产物来分析上述几种酶在乳酸消耗过程中是否起作用, 最终确定生物质原料中乳酸生成与降低的可能途径。

4.2 材料与方法

4.2.1 菌株、培养基及培养条件

本章所使用的菌株, 鼠乳杆菌 *L. murinus* WS1、鸡肠球菌 *E. gallinarum* BS2、屎肠球菌 *E. faecium* RS4、粪肠球菌 *E. faecalis* CS2 是第二章从生物质原料中筛选得到的野生乳酸菌。

本章所使用的培养基如下:

(1) 含乳酸的 MRS 培养基: 3 g/L 葡萄糖、2 g/L L-乳酸, 其他成分及浓度同 3.2.2。

(2) 含 L/D-乳酸的无糖 MRS 培养基: 1.0 g/L L/D-乳酸、无葡萄糖, 其他成分及浓度同 3.2.2。

四株菌株的种子液培养方法与乳酸菌 *P. acidilactici* 的培养方法相同, 见 3.2.2。

将培养 12 h 的种子液在 12000 rpm、4°C 条件下离心 5 min, 弃上清, 并用灭菌超纯水将菌体清洗两次, 最后去上清, 并以 10% 的接种量分别将清洗后的菌体接种至含有 50 mL 培养基的 250 mL 锥形瓶中进行发酵。

4.2.2 分析方法

葡萄糖、乳酸、乙酸等物质的含量使用 HPLC 测定，方法同 2.2.5。

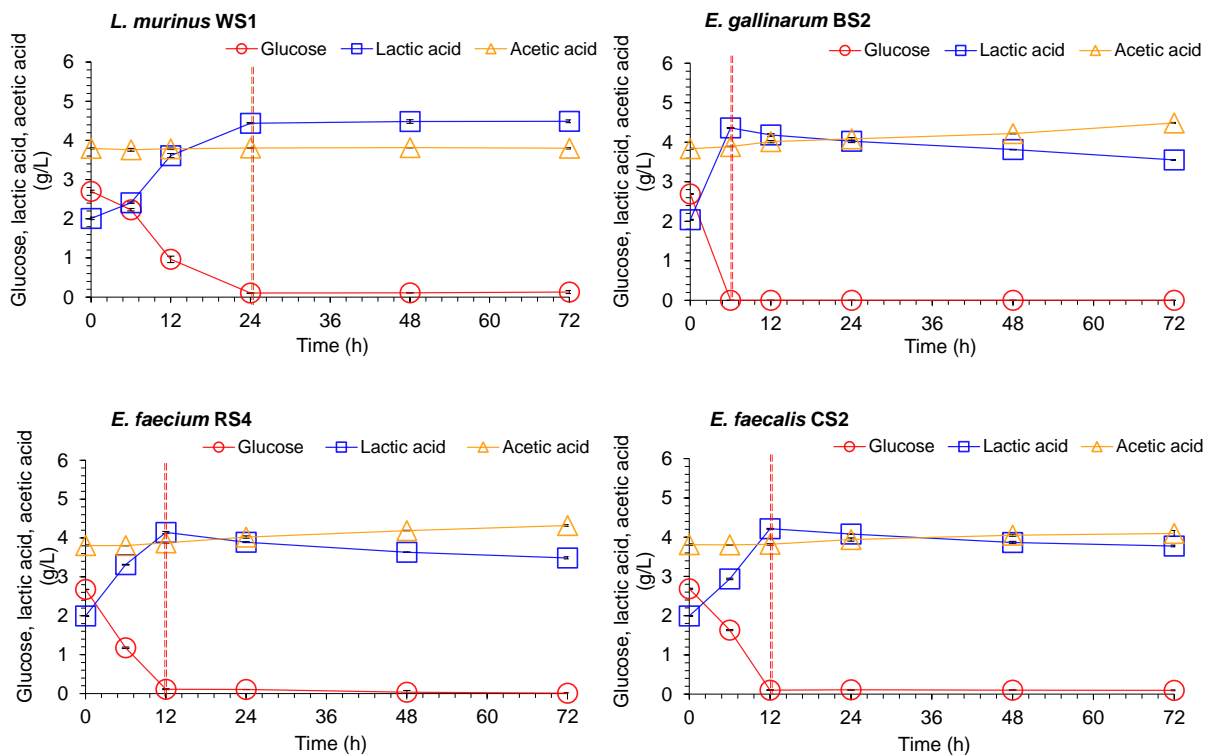
过氧化氢试纸购自芜湖鲸辉生物科技有限公司，测定步骤为：将过氧化氢试纸的反应区浸入 10 mL 待测样品中等待 10 s，然后迅速取出甩干液体，静置 60 s，与比色卡对比得出过氧化氢的含量。

4.3 结果与讨论

4.3.1 野生乳酸菌代谢葡萄糖和乳酸的能力研究

在第三章研究中，我们发现生物质原料储存初期的乳酸含量呈上升趋势，随着水溶性单糖的消耗初期生成的乳酸会逐渐降低（图 3.1 和图 3.5 b）。为了探究乳酸菌对葡萄糖和乳酸的利用规律，本章将生物质原料中分离获得的几种乳酸菌 *L. murinus* WS1、*E. gallinarum* BS2、*E. faecium* RS4、*E. faecalis* CS2 分别在同时含有葡萄糖、L-乳酸的 MRS 培养基中进行发酵验证。结果表明，当葡萄糖和 L-乳酸同时存在时，四株寄生乳酸菌均先以葡萄糖为底物进行乳酸发酵；当葡萄糖耗尽后，乳酸浓度开始逐渐降低并伴随着乙酸的生成（图 4.1 a）。在发酵前 6 h，即乳酸菌以葡萄糖为碳源进行发酵时未检测到过氧化氢的生成（图 4.1 b）。在发酵过程中乳酸的变化规律与本文在生物质原料储存过程中乳酸含量变化趋势一致，也与 Duwat 等^[163]的研究近似，乳酸菌在以葡萄糖为碳源时无论是厌氧还是有氧情况下其主要产物均为乳酸，当葡萄糖耗尽时则从发酵状态进入呼吸状态，利用乳酸生成乙酸维持菌体生长。

(a) Conversion of glucose, lactic acid, and acetic acid



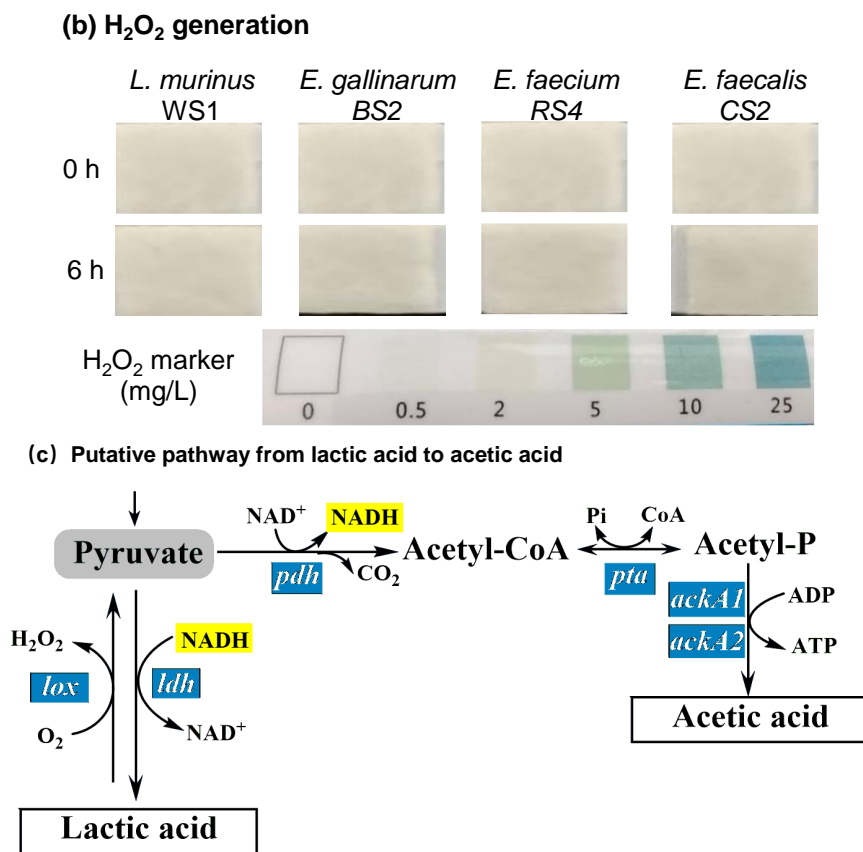


图 4.1 分离菌株利用低浓度葡萄糖和乳酸的能力

Fig. 4.1 The conversion of low concentration glucose and lactic acid by isolated strains

(a) 葡萄糖、乳酸、乙酸含量；(b) 过氧化氢的检测；(c) 乳酸向乙酸代谢途径

发酵条件：在含有 3 g/L 葡萄糖、2 g/L 乳酸的 50 mL 简化 MRS 培养基中接种 10% 分离菌的菌体，42°C 条件下发酵 72 h。ldh：乳酸脱氢酶；lox：乳酸氧化酶；pdh：丙酮酸脱氢酶；pta：磷酸乙酰转移酶；ack：乙酸激酶。

4.3.2 野生乳酸菌代谢 L/D-乳酸的能力研究

根据文献报道，乳酸向乙酸的转化途径可能为：乳酸首先通过酶的作用生成中间产物丙酮酸，然后丙酮酸在向乙酸转化，Guo 等^[169]等已对该转化途径中的丙酮酸代谢机制进行了详细的研究，因此本章重点分析了乳酸生成丙酮酸的可能转化途径。

目前参与乳酸转化的酶主要有乳酸消旋酶、乳酸脱氢酶和乳酸氧化酶，本章分别对这三种酶进行分析以初步确定生物质原料中乳酸降解的主要途径。首先我们排除了乳酸消旋酶的作用，该酶是一种 α/β 折叠的镍依赖性酶，主要负责 L-乳酸和 D-乳酸之间的相互转化^[168]。而不同条件下的麦秆在储存过程中，乳酸含量达到最高值后开始逐渐降低，没有出现 L、D-乳酸此消彼长的现象（图 3.1、图 3.5 b 及图 4.2），因此乳酸消旋酶起作用的概率很小。

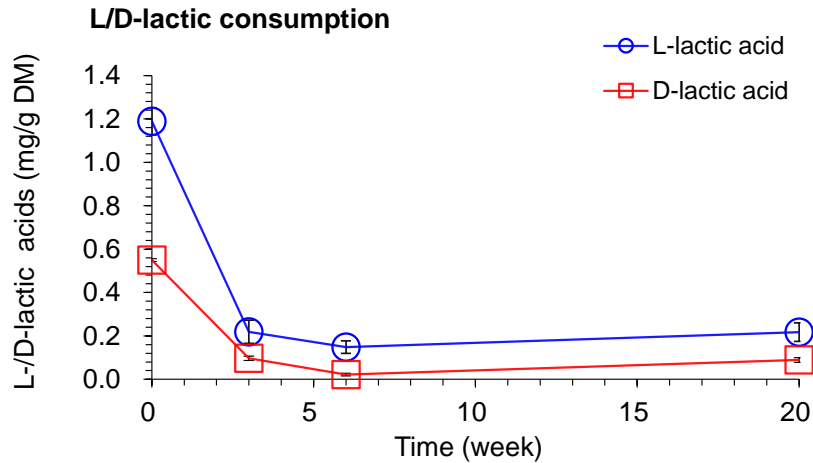


图 4.2 生物质原料中 L/D-乳酸的转化

Fig. 4.2 Conversion of L/D-lactic acid in raw wheat straw

其次是乳酸氧化酶 (Lox)，该酶是一种以黄素单核苷酸作为辅酶的黄素蛋白，催化乳酸氧化成丙酮酸并将分子氧还原为过氧化氢^[147]。为验证野生乳酸菌是否在乳酸氧化酶的作用下代谢乳酸，本章分别将分离得到的四种乳酸菌在含有 1.0 g/L、D-乳酸的无糖 MRS 培养基中进行摇瓶发酵。结果表明，四株菌株均可以在 72 h 内将 1.0 g/L 的 L-乳酸消耗完，同时伴随着乙酸和过氧化氢的生成 (图 4.3 a)。而在含有葡萄糖和 L-乳酸的发酵条件下，未检测到过氧化氢的生成 (图 4.1 b)，这表明这几种乳酸菌在以乳酸为唯一碳源时，才会产生过氧化氢，也进一步说明乳酸菌是在乳酸氧化酶的作用下代谢乳酸的。乳酸菌利用乳酸为底物生成乙酸的主要途径可能是，在有氧条件下乳酸菌可以利用分子氧接受电子将乳酸转化为丙酮酸^[163]并生成过氧化氢，然后丙酮酸氧化脱羧生成的乙酰辅酶 A 再与磷酸作用，生成乙酰磷酸，进一步转化为乙酸 (图 4.1 c) 或参与到脂类和萜类的合成代谢中^[170-172]。

与 L-乳酸近似，D-乳酸含量在葡萄糖耗尽后也在缓慢降低 (图 4.2)。本研究在含有 1.0 g/L D-乳酸的无糖 MRS 培养基发酵中，除在 *E. gallinarum*. BS2 培养条件下可以检测到微量过氧化氢之外，其他三株菌株均为未发现有乳酸消耗、乙酸和过氧化氢生成的现象 (图 4.3 b)，这说明能够利用 D-乳酸的菌株较少。与 L-乳酸氧化酶相比，虽然 D-乳酸氧化酶 (Lox) 合成量、酶活性较低，但 D-乳酸氧化酶和其催化 D-乳酸氧化反应导致的 D-乳酸降低现象依然存在。

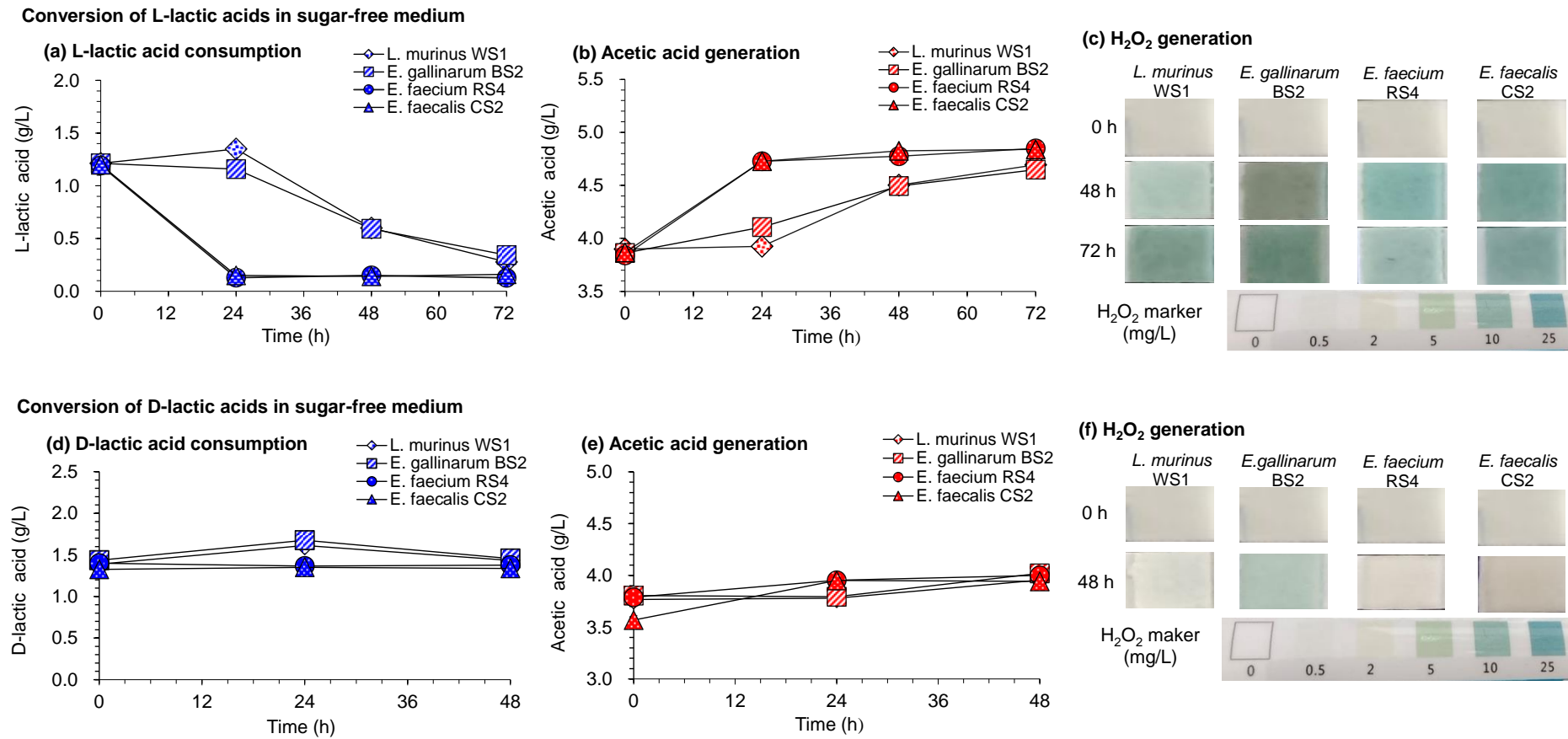


图 4.3 分离菌株在含有 1.0 g/L L/D-乳酸的无糖 MRS 培养基中进行发酵

Fig. 4.3 Conversion of L/D-lactic acid in sugar-free MRS by isolated strains

(a) (b) (c): 在含有 L-乳酸的无糖 MRS 培养基中进行发酵, 分别为 L-乳酸的消耗、乙酸的生成及过氧化氢的生成

(d) (e) (f): 在含有 D-乳酸的无糖 MRS 培养基中进行发酵, 分别为 D-乳酸的消耗、乙酸的生成及过氧化氢的生成

发酵条件: 在含有 1.0 g/L L/D-乳酸的 50 mL 简化 MRS 培养基中接种 10%分离菌株的菌体, 42°C条件下发酵 48 h 或 72 h, 并检测过氧化氢的生成。

最后是 NAD 依赖性的乳酸脱氢酶，催化丙酮酸和乳酸之间的相互转化^[169]。有研究表明部分乳酸菌会随着糖的消耗从同型发酵转化为异型发酵，此时糖代谢速率降低，乳酸脱氢酶活性受到抑制^[173-175]；其次是在乳酸浓度较高的条件下乳酸脱氢酶才会催化乳酸生成丙酮酸^[176]。而本研究中，小麦秸秆在储存后期水溶性单糖含量较低，乳酸脱氢酶的活性也可能受到抑制，因此在消耗乳酸的过程中起作用的概率较小。并且我们在以 D-乳酸为底物进行发酵时（图 4.3 b）也未发现 D-乳酸被消耗，说明乳酸脱氢酶的逆反应很难被激活。综上分析，在将乳酸转化为乙酸的过程中乳酸氧化酶起主导作用，乳酸消旋酶和乳酸脱氢酶起次要作用或不起作用。本研究通过乳酸菌发酵过程中的一些代谢产物变化分析了乳酸生成乙酸的可能途径，但具体代谢机制和代谢途径还需要进一步研究。

4.4 本章小结

本章通过将生物质原料中筛选得到的四株乳酸菌 *L. murinus* WS1、*E. gallinarum* BS2、*E. faecium* RS4、*E. faecalis* CS2 分别在不同条件下进行发酵验证，探究了寄生乳酸菌利用葡萄糖和乳酸的能力并分析乳酸生成乙酸的主要途径。主要结论如下：

（1）在葡萄糖和乳酸同时存在的条件下，生物质原料中存在的寄生乳酸菌会优先利用葡萄糖生成乳酸，葡萄糖耗尽之后开始利用乳酸生成乙酸。

（2）生物质原料中存在的寄生乳酸菌均可以利用 L-乳酸生成乙酸，并伴随着过氧化氢的生成，主要途径可能为：乳酸菌在乳酸氧化酶的作用下将乳酸氧化为丙酮酸并生成过氧化氢，然后丙酮酸氧化脱羧生成的乙酰辅酶 A 再与磷酸作用，生成乙酰磷酸，进一步转化为乙酸。

（3）从生物质原料中分离得到的寄生乳酸菌代谢 D-乳酸的能力较弱，只有 *E. gallinarum* BS2 可利用微量的 D-乳酸，并生成过氧化氢。通过将分离菌株在不同实验条件下进行发酵验证，初步解释了生物质原料中乳酸降低的现象。

第5章 结论与展望

5.1 结论

L-乳酸作为合成可降解高分子材料聚乳酸（PLA）的主要聚合单体，其生产成本和手性纯度是制约高分子量聚乳酸大规模产业化的两个关键因素。在本实验室的前期研究工作中已实现了以成本廉价、来源广泛的木质纤维生物质为碳水化合物原料、采用干法生物炼制技术生产纤维素 L-乳酸的目的，然而得到的纤维素乳酸发酵液中总是存在微量 D-乳酸，造成 L-乳酸的手性纯度下降。基于此现象本研究通过对干法生物炼制过程中可能引入 D-乳酸的发酵原料、发酵辅料及过程进行印迹追踪，确定对 L-乳酸手性纯度影响最显著的 D-乳酸来源途径。针对生物质原料中 D-乳酸的生成机制，通过对生物质原料中水溶性单糖和产乳酸菌株的分析得到了生物质原料中内源乳酸生成的两个必须前提条件。将不同含水量的小麦秸秆进行储存，测试生成的 D-乳酸在 L-丙交酯合成过程中产生的影响，并围绕遏制生物质中 D-乳酸生成和积累这一核心目标，从不同的角度出发提出了三条阻断水溶性单糖转化为 D-乳酸的策略。在小麦储存过程中发现乳酸的生成与消耗存在某种规律，通过将筛选分离得到的菌株进行发酵，验证该现象的普遍性及乳酸消耗的可能途径。本文的主要结论如下：

（1）在以木质纤维素为原料进行 L-乳酸生产的干法生物炼制技术过程中，生物质原料、酶制剂、氮源中均存在或多或少的 D-乳酸，并在干酸预处理、酶促糖化、生物脱毒过程中维持相对稳定，其中对 L-乳酸手性纯度影响最大的是生物质原料中存在的 D-乳酸。

（2）生物质原料中的内源水溶性单糖和寄生乳酸菌为乳酸的生成提供了前提条件，并且由常规储存环境条件下麦秆中的水溶性单糖转化生成的 D-乳酸使得 L-乳酸的手性纯度降低约 1.8%，L-丙交酯的熔点降低约 12.6℃。D-乳酸的存在显著影响了 L-丙交酯的熔点，增加了其内消旋化程度。

（3）通过降低生物质原料的含水量形成抑制寄生乳酸菌繁殖的环境、将水溶性单糖转化为呋喃醛类抑制物切断内源水溶性单糖的乳酸转化途径、接种 L-乳酸生产菌株将可溶性单糖选择性的转化为 L-乳酸，三条策略均有效的抑制了生物质原料中 D-乳酸的生成。

（4）针对生物质原料储存过程中乳酸先升高后降低的现象，通过将分离得到的野生乳酸菌在含有不同浓度的葡萄糖、L-/D-乳酸的条件下进行发酵验证，得出乳酸菌消耗乳酸生成乙酸的主要可能途径为，乳酸在乳酸氧化酶的作用下生成丙酮酸并产生过氧化氢，然后丙酮酸氧化脱羧生成的乙酰辅酶 A 再与磷酸作用，生成乙酰磷酸，进一步转化为乙酸。

5.2 创新点

(1) 在木质纤维素生物炼制合成 L-乳酸的干法生物炼制平台上, 针对发酵产品中存在的杂质 D-乳酸, 首次从发酵原料(木质纤维素生物质)、发酵辅料(酶制剂、氮源)及生物炼制过程中追踪了 D-乳酸的印记, 并且发现生物质原料中生成的 D-乳酸会对纤维素 L-乳酸的手性纯度造成显著影响。

(2) 基于生物质原料中水溶性单糖和寄生乳酸菌的存在, 提出了三种遏制 D-乳酸生成的策略, 为降低纤维素 L-乳酸中 D-乳酸含量提供了新思路, 也为生物炼制中木质纤维素原料的长期储存提供了方法。

(3) 通过监测乳酸菌利用乳酸生成乙酸发酵过程中底物、产物及副产物的变化, 得到乳酸菌代谢乳酸的可能主要途径。

5.3 展望

本论文针对以木质纤维素生物质为原料, 合成 L-乳酸的干法生物炼制过程中, 微量 D-乳酸的来源途径、生成机制、以及遏制措施等问题进行了探究, 成功降低了纤维素 L-乳酸中的 D-乳酸的含量, 实现了高纯度 L-乳酸的生产。本研究仍存在较多不足的地方, 需要进行深入的研究:

(1) 在培养乳酸菌 *P. acidilactici* 的过程中会加入 1% (v/v) 的糖化酶以防止菌体絮凝, 而糖化酶中含有较多的 D-乳酸, 增加了降低 L-乳酸手性纯度的风险。为了减少糖化酶来源的 D-乳酸, 可以在避免菌体絮凝的情况下探究糖化酶的最低添加量。

(2) 生物质原料中寄生乳酸菌的存在是一种普遍现象, 通过在以 D-乳酸为唯一碳源的培养基中进行筛选、鉴定是否可以获得一株利用 D-乳酸能力较强的菌株。

(3) 生物质原料储存过程中由水溶性单糖转化生成的乳酸是否可以加强预处理效果还需要进一步研究。

(4) 针对生物质原料储存过程中乳酸降低的现象, 本研究通过野生乳酸菌发酵过程中的一些代谢产物变化分析了乳酸代谢的可能途径, 后期还需要通过基因工程手段对其具体的代谢机制和代谢途径进行研究, 进而构建一株在代谢微量 D-乳酸的同时生产 L-乳酸的工程菌株。

参考文献

- [1] Dana HR, Ebrahimi F. Synthesis, properties, and applications of polylactic acid-based polymers. *Polymer Engineering and Science*. 2023, 63(1): 22-43.
- [2] Yankov D. Fermentative lactic acid production from lignocellulosic feedstocks: from source to purified product. *Frontiers in Chemistry*. 2022, 10: 823005.
- [3] Rubin EM. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*. 2008, 454(7206): 841-845.
- [4] Banerjee S, Mudliar S, Sen R, Giri B, Satpute D, Chakrabarti T, Pandey RA. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr*. 2010, 4(1): 77-93.
- [5] Meng XZ, Ragauskas AJ. Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014, 27: 150-158.
- [6] Lynd LR, Weimer PJ, Van ZH, Pretorius IS. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2002, 66(4): 739-739.
- [7] 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.
- [8] Kim JS, Lee YY, Kim TH. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2016, 199: 42-48.
- [9] Cao SL, Pu YQ, Studer M, Wyman C, Ragauskas AJ. Chemical transformations of populus trichocarpa during dilute acid pretreatment. *Rsc Advances*. 2012, 2(29): 10925-10936.
- [10] Zhang J, Wang XS, Chu DQ, He YQ, Bao J. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2011, 102(6): 4480-4488.
- [11] Jonsson LJ, Alriksson B, Nilvebrant NO. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6(1): 16.
- [12] Liu Y, Zheng JY, Xiao JX, He XD, Zhang KX, Yuan SX, Peng ZT, Chen Z, Lin XQ. Enhanced enzymatic hydrolysis and lignin extraction of wheat straw by triethylbenzyl ammonium chloride/lactic acid-based deep eutectic solvent pretreatment. *American Chemical Society*. 2019, 4(22): 19829-19839.
- [13] Zhang B, Zhan BR, Bao J. Reframing biorefinery processing chain of corn fiber for cellulosic ethanol production. *Industrial Crops and Products*. 2021, 170(2): 113791.
- [14] Qin JY, Zhao B, Wang XW, Wang LM, Yu B, Ma YH, Ma CQ, Tang HZ, Sun JB, 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).
- [15] Altaf M, Naveena BJ, Venkateshwar M, Kumar EV, Reddy G. Single step fermentation of starch to L (+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using inexpensive nitrogen sources to replace peptone and yeast extract-optimization by RSM. *Process Biochemistry*. 2006, 41(2): 465-472.
- [16] John RP, Gangadharan D, Nampoothiri KM. Genome shuffling of *Lactobacillus delbrueckii* mutant and *Bacillus amyloliquefaciens* through protoplasmic fusion for L-lactic acid production from starchy wastes. *Bioresource Technology*. 2008, 99(17): 8008-8015.
- [17] John RP, Nampoothiri KM, Pandey A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, 74(3): 524-534.
- [18] Farah S, Anderson DG, Langer R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications - a comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, 107: 367-392.
- [19] Ranjan R, Bajpai P, Tyagi R. Mechanical characterization of banana/sisal fibre reinforced PLA hybrid composites for structural application. *Engineering International*. 2013, 1.
- [20] 刘文涛, 徐冠桦, 段瑞侠, 鹿孟张, 袁梦杰, 陈金周. 聚乳酸改性与应用研究综述. *包装学报*. 2021, 13(2): 3-13.
- [21] Jamshidian M, Tehrani EA, Imran M, Jacquot M, Desobry S. Poly-lactic acid: production, applications, nanocomposites, and release studies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2010, 9(5): 552-571.
- [22] Hartmann MH. High molecular weight polylactic acid polymers. *Biopolymers From Renewable Resources*, Springer Berlin Heidelberg. 1998, 367-411.
- [23] Ponmanee L, Pechyen C, Sirisansaneeyakul S. Synthesis of polylactic acid from fermentative lactic acid by direct polycondensation for materials application. *International Conference on Advanced Materials Engineering and Technology (ICAMET)*, Penang M. 2012, 625:495.
- [24] Zhao YM, Wang ZY, Wang J, Mai HZ, Yan B, Yang F. Direct synthesis of poly (D,L-lactic acid) by melt polycondensation and its application in drug delivery. *Journal of Applied Polymer Science*. 2004, 91(4): 2143-2150.
- [25] Fukushima K, Kimura Y. An efficient solid-state polycondensation method for synthesizing stereocomplexed poly (lactic acid) with high molecular weight. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*. 2008, 46(11): 3714-3722.
- [26] 黎莉, 唐颂超, 王庆海, 潘泳康, 王婷兰. 溶液共沸法直接合成较高分子量的聚乳

- 酸. 华东理工大学学报 (自然科学版). 2006, (6): 672-675.
- [27] Kim KW, Woo SI. Synthesis of high-molecular-weight poly (L-lactic acid) by direct polycondensation. *Macromolecular Chemistry and Physics*. 2002, 203(15): 2245-2250.
- [28] Yin M, Yang R, Li D. Effect dehydrants to increasing molecular weight of condensed polylactic acid. *International Conference on Mechanical, Material Engineering (MME), Hubei Univ Automot Technol, Shiyan, Peoples R China.*, 2014, 465:525.
- [29] Ehsani M, Khodabakhshi K, Asgari M. Lactide synthesis optimization: investigation of the temperature, catalyst and pressure effects. *E-Polymers*. 2014, 14(5): 353-361.
- [30] Rahmayetty, Sukirno, Prasetya B, Gozan M. Synthesis and characterization of L-lactide and polylactic acid (PLA) from L-lactic acid for biomedical applications. *International Symposium of Biomedical Engineering (ISBE), Depok City, Indonesia*. 2017, 1817: 020009.
- [31] Idris A, Bukhari A. Immobilized candida antarctica lipase B: hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. *Biotechnology Advances*. 2012, 30(3): 550-563.
- [32] Omay D, Guvenilir Y. Synthesis and characterization of poly (D,L-lactic acid) via enzymatic ring opening polymerization by using free and immobilized lipase. *Biocatalysis and Biotransformation*. 2013, 31(3): 132-140.
- [33] Lassalle VL, Ferreira ML. Lipase-catalyzed synthesis of polylactic acid: an overview of the experimental aspects. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2008, 83(11): 1493-1502.
- [34] Matsumura S, Mabuchi K, Toshima K. Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of lactide. *Macromolecular Rapid Communications*. 1997, 18(6): 477-482.
- [35] Auras R, Harte B, Selke S. An overview of polylactides as packaging materials. *Macromolecular Bioscience*. 2004, 4(9): 835-864.
- [36] Riaz S, Fatima N, Rasheed A, Riaz M, Anwar F, Khatoun Y. Metabolic engineered biocatalyst: a solution for PLA based problems. *International Journal of Biomaterials*. 2018, 1963024-1963024.
- [37] Jung YK, Lee SY. Efficient production of polylactic acid and its copolymers by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*. 2011, 151(1): 94-101.
- [38] Jung YK, Kim TY, Park SJ, Lee SY. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of polylactic acid and its copolymers. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010, 105(1): 161-171.
- [39] Shi M, Li M, Yang A, Miao X, Yang L, Pandhal J, Zou H. Class I polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase increased polylactic acid production in engineered *Escherichia coli*.

- Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2022, 10.
- [40] Ahmad A, Banat F, Alsafar H, Hasan SW. An overview of biodegradable poly (lactic acid) production from fermentative lactic acid for biomedical and bioplastic applications. Biomass Conversion and Biorefinery. 2022,1-20.
- [41] Tsuji H, Ikada Y. Properties and morphology of poly (L-lactide) 4, effects of structural parameters on long-term hydrolysis of poly (L-lactide) in phosphate-buffered solution. Polymer Degradation and Stability. 2000, 67(1): 179-189.
- [42] Kalendova A, Smotek J, Stloukal P, Kracalik M, Slouf M, Laske S. Transport properties of poly (lactic acid)/clay nanocomposites. Polymer Engineering and Science. 2019, 59(12): 2498-2501.
- [43] Santoro M, Shah SR, Walker JL, Mikos AG. Poly (lactic acid) nanofibrous scaffolds for tissue engineering. Advanced Drug Delivery Reviews. 2016, 107: 206-212.
- [44] Gorrasi G, Pantani R. Hydrolysis and biodegradation of poly (lactic acid). Synthesis, Structure and Properties of Poly (Lactic Acid). 2018, 279: 119-151.
- [45] Butbunchu N, Pathom-Aree W. Actinobacteria as promising candidate for polylactic acid type bioplastic degradation. Frontiers in Microbiology. 2019, 10.
- [46] 刘建伟, 赵强, 万昌秀. 医用聚乳酸体内降解机理及应用研究进展. 航天医学与医学工程. 2001, 14(4): 308-312.
- [47] Panyachanakul T, Sorachart B, Lumyong S, Lorliam W, Kitpreechavanich V, Krajangsang S. Development of biodegradation process for poly (DL-lactic acid) degradation by crude enzyme produced by *Actinomadura keratinilytica strain T16-1*. Electronic Journal of Biotechnology. 2019, 40: 52-57.
- [48] Park KI, Xanthos M. A study on the degradation of polylactic acid in the presence of phosphonium ionic liquids. Polymer Degradation and Stability. 2009, 94(5): 834-844.
- [49] Auras RA, Harte B, Selke S, Hernandez R. Mechanical, physical, and barrier properties of poly (lactide) films. Journal of Plastic Film & Sheeting. 2003, 19(2): 123-135.
- [50] Hiljanen-Vainio M, Varpomaa P, Seppälä J, Törmälä P. Modification of poly (L-lactides) by blending: mechanical and hydrolytic behavior. Macromolecular Chemistry and Physics. 1996, 197(4): 1503-1523.
- [51] Neppalli R, Causin V, Marigo A, Meincken M, Hartmann P. Effect of electrospun ethylene vinyl alcohol copolymer (EVOH) fibres on the structure, morphology, and properties of poly (lactic acid) (PLA). Polymer. 2013, 54(21): 5909-5919.
- [52] Hamad K, Kaseem M, Yang HW, Deri F, Ko YG. Properties and medical applications of polylactic acid: a review. Express Polymer Letters. 2015, 9(5): 435-455.
- [53] Savioli Lopes M, Jardini AL, Maciel FR. Poly (lactic acid) production for tissue engineering applications. International Congress of Chemical and Process Engineering

- Chisa, Prague, Czech Republic. 2012, 42: 1402-1413.
- [54] Lasprilla AJR, Martinez GAR, Lunelli BH, Jardini AL, Maciel R. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - a review. *Biotechnology Advances*. 2012, 30(1): 321-328.
- [55] 王身国. 可生物降解的高分子类型、合成和应用. *化学通报*. 1997, (2): 48-51.
- [56] Islam MS, Kovalcik A, Hasan M, Thakur VK. Natural fiber reinforced polymer composites. *International Journal of Polymer Science*. 2015.
- [57] Kumar N, Das D. Fibrous biocomposites from nettle (*Girardinia diversifolia*) and poly (lactic acid) fibers for automotive dashboard panel application. *Composites Part B-Engineering*. 2017, 130: 54-63.
- [58] 吴宇琼, 李定或, 吴元欣. 发酵法生产乳酸的提取与精制研究进展. *食品工业科技*. 2003, (1): 106-108.
- [59] Komesu A, De Oliveira JAR, Martins LHD, Maciel MRW, Maciel R. Lactic acid production to purification: a review. *Bioresources*. 2017, 12(2): 4364-4383.
- [60] Okano K, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H, Kondo A. Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 85(3): 413-423.
- [61] Murariu M, Dubois P. PLA composites: from production to properties. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, 107: 17-46.
- [62] Li G, Zhao MH, Xu F, Yang B, Li XY, Meng XX, Teng LS, Sun FY, Li YX. Synthesis and biological application of polylactic acid. *Molecules*. 2020, 25(21): 5023.
- [63] Vijayakumar J, Aravindan R, Viruthagiri T. Recent trends in the production, purification and application of lactic acid. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. 2008, 22(2): 245-264.
- [64] Pal P, Sikder J, Roy S, Giorno L. Process intensification in lactic acid production: a review of membrane based processes. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*. 2009, 48(11-12): 1549-1559.
- [65] Ghaffar T, Irshad M, Anwar Z, Aqil T, Zulifqar Z, Tariq A, Kamran M, Mehmood S. Recent trends in lactic acid biotechnology: a brief review on production to purification. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*. 2014, 7(2): 222-229.
- [66] Castro-Aguirre E, Iniguez-Franco F, Samsudin H, Fang X, Auras R. Poly (lactic acid)-mass production, processing, industrial applications, and end of life. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, 107: 333-366.
- [67] Wee YJ, Kim JN, Ryu HW. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technology and Biotechnology*. 2006, 44(2): 163-172.
- [68] Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production

- by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*. 2013, 31(6): 877-902.
- [69] Yao K, Zhou QX, Liu DM, Chen SM, Yuan K. Comparative proteomics of the metabolic pathways involved in L-lactic acid production in *Bacillus coagulans* BCS13002 using different carbon sources. *Lwt-Food Science and Technology*. 2019, 116.
- [70] Pejin J, Radosavljevic M, Pribic M, Kocic-Tanackov S, Mladenovic D, Djukic-Vukovic A, Mojovic L. Possibility of L (+) lactic acid fermentation using malting, brewing, and oil production by-products. *Waste Management*. 2018, 79: 153-163.
- [71] Zhou J, Ouyang J, Xu QQ, Zheng ZJ. Cost-effective simultaneous saccharification and fermentation of L-lactic acid from bagasse sulfite pulp by *Bacillus coagulans* CC17. *Bioresource Technology*. 2016, 222: 431-438.
- [72] Bai DM, Wei Q, Yan ZH, Zhao XM, Li XG, Xu SM. Fed-batch fermentation of *Lactobacillus lactis* for hyper-production of L-lactic acid. *Biotechnology Letters*. 2003, 25(21): 1833-1835.
- [73] Ye LD, Zhou XD, Bin Hudari MS, Li Z, Wu JC. Highly efficient production of L-lactic acid from xylose by newly isolated *Bacillus coagulans* C106. *Bioresource Technology*. 2013, 132: 38-44.
- [74] Pleissner D, Lam WC, Sun Z, Lin CSK. Food waste as nutrient source in heterotrophic microalgae cultivation. *Bioresource Technology*. 2013, 137: 139-146.
- [75] Tang JL, Wang XC, Hu YS, Ngo HH, Li YY. Effect of pH on lactic acid production from acidogenic fermentation of food waste with different types of inocula. *Bioresource Technology*. 2017, 224: 544-552.
- [76] Zhang B, He PJ, Ye NF, Shao LM. Enhanced isomer purity of lactic acid from the non-sterile fermentation of kitchen wastes. *Bioresource Technology*. 2008, 99(4): 855-862.
- [77] Kwan TH, Pleissner D, Lau KY, Venus J, Pommeret A, Lin CSK. Techno-economic analysis of a food waste valorization process via microalgae cultivation and co-production of plasticizer, lactic acid and animal feed from algal biomass and food waste. *Bioresource Technology*. 2015, 198: 292-299.
- [78] Tang JL, Wang XC, Hu YS, Ngo HH, Li YY. Dynamic membrane-assisted fermentation of food wastes for enhancing lactic acid production. *Bioresource Technology*. 2017, 234: 40-47.
- [79] Ahmad A, Othman I, Rambabu K, Bharath G, Taher H, Hasan SW, Banat F. Polymerization of lactic acid produced from food waste by metal oxide-assisted dark fermentation. *Environmental Technology & Innovation*. 2021, 24.
- [80] Zhang YX, Vadlani PV, Kumar A, Hardwidge PR, Govind R, Tanaka T, Kondo A. Enhanced D-lactic acid production from renewable resources using engineered *Lactobacillus plantarum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, 100(1): 279-

- 288.
- [81] Zhang B, Li J, Liu XC, Bao J. Continuous simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) for cellulosic L-lactic acid production. *Industrial Crops and Products*. 2022, 187.
- [82] Guo W, Jia WD, Li Y, Chen SL. Performances of *Lactobacillus brevis* for producing lactic acid from hydrolysate of lignocellulosics. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010, 161(1-8): 124-136.
- [83] Saha BC, Nakamura LK. Production of mannitol and lactic acid by fermentation with *Lactobacillus intermedius* NRRL B-3693. *Biotechnology and Bioengineering*. 2003, 82(7): 864-871.
- [84] Wee YJ, Yun JS, Park DH, Ryu HW. Biotechnological production of L (+)-lactic acid from wood hydrolyzate by batch fermentation of *Enterococcus faecalis*. *Biotechnology Letters*. 2004, 26(1): 71-74.
- [85] John RP, Nampoothiri KM, Pandey A. Simultaneous saccharification and L (+)-lactic acid fermentation of protease-treated wheat bran using mixed culture of *Lactobacilli*. *Biotechnology Letters*. 2006, 28(22): 1823-1826.
- [86] Hong AA, Cheng KK, Peng F, Zhou S, Sun Y, Liu CM, Liu DH. Strain isolation and optimization of process parameters for bioconversion of glycerol to lactic acid. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2009, 84(10): 1576-1581.
- [87] Nguyen CM, Kim JS, Hwang HJ, Park MS, Choi GJ, Choi YH, Jang KS, Kim JC. Production of L-lactic acid from a green microalga, *hydrodictyon reticulum*, by *Lactobacillus paracasei* LA104 isolated from the traditional Korean food, makgeolli. *Bioresource Technology*. 2012, 110: 552-559.
- [88] Li YB, Shahbazi A. Lactic acid recovery from cheese whey fermentation broth using combined ultrafiltration and nanofiltration membranes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2006, 132(1-3): 985-996.
- [89] 李秀康. 产高光学纯度 L-乳酸菌株 HY-U36 发酵及提取条件优化. 硕士学位论文. 山东农业大学. 2017.
- [90] Tian XW, Liu XH, Zhang YF, Chen Y, Hang HF, Chu J, Zhuang YP. Metabolic engineering coupled with adaptive evolution strategies for the efficient production of high-quality L-lactic acid by *Lactobacillus paracasei*. *Bioresource Technology*. 2021, 323: 124549.
- [91] Yi X, Zhang P, Sun JE, Tu Y, Gao QQ, 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.
- [92] Bustamante D, Tortajada M, Ramon D, Rojas A. Production of D-lactic acid by the

- fermentation of orange peel waste hydrolysate by lactic acid bacteria. *Fermentation*. 2020, 6(1): 1.
- [93] 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.
- [94] Trakarnpaiboon S, Srisuk N, Piyachomkwan K, Yang ST, Kitpreechavanich V. L-Lactic acid production from liquefied cassava starch by thermotolerant *Rhizopus microsporus*: characterization and optimization. *Process Biochemistry*. 2017, 63: 26-34.
- [95] Chang DE, Jung HC, Rhee JS, Pan JG. Homofermentative production of D- or L-lactate in metabolically engineered *Escherichia coli* RR1. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, 65(4): 1384-1389.
- [96] Osawa F, Fujii T, Nishida T, Tada N, Ohnishi T, Kobayashi O, Komeda T, Yoshida S. Efficient production of L-lactic acid by crabtree-negative yeast *Candida boidinii*. *Yeast*. 2009, 26(9): 485-496.
- [97] Angermayr SA, Paszota M, Hellingwerf KJ. Engineering a cyanobacterial cell factory for production of lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012, 78(19): 7098-7106.
- [98] Ouyang J, Ma R, Zheng Z, Cal C, Zhang M, Jiang T. Open fermentative production of L-lactic acid by *Bacillus sp strain* NLO1 using lignocellulosic hydrolyzates as low-cost raw material. *Bioresource Technology*. 2013, 135: 475-480.
- [99] Wee YJ, Kim JN, Ryu HW. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technology and Biotechnology*. 2006, 44(2): 163-172.
- [100] 曾翔. 耐高温高产乳酸菌的选育及乳酸发酵新工艺研究. 硕士学位论文. 华中科技大学. 2011.
- [101] Jompang L, Thumsorn S, On JW, Surin P, Apawet C, Chaichalermwong T, Kaabbuathong N, O-Charoen N, Srisawat N. Poly (lactic acid) and poly (butylene succinate) blend fibers prepared by melt spinning technique. *Energy and Materials Science and Engineering Symposium (EMSES)*, Ubon Ratchathani, Thailand. 2013, 34: 493-499.
- [102] Li WX, Xu ZW, Chen L, Shan MJ, Tian X, Yang CY, Lv HM, Qian XM. A facile method to produce graphene oxide-g-poly (L-lactic acid) as an promising reinforcement for PLLA nanocomposites. *Chemical Engineering Journal*. 2014, 237: 291-299.
- [103] Pivsa-Art S, Tong-Ngok T, Junngam S, Wongpajan R, Pivsa-Art W. Synthesis of poly (D-lactic acid) using a 2-steps direct polycondensation process. *Energy and Materials Science and Engineering Symposium (EMSES)*, Ubon Ratchathani, Thailand. 2013, 34: 604-609.
- [104] Shi DJ, Hua JT, Zhang L, Chen MQ. Synthesis of bio-based poly (lactic acid-co-10-

- hydroxy decanoate) copolymers with high thermal stability and ductility. *Polymers*. 2015, 7(3): 468-483.
- [105] Padee S, Thumsorn S, On JW, Surin P, Apawet C, Chaichalermwong T, Kaabbuathong N, O-Charoen N, Srisawat N. Preparation of poly (lactic acid) and poly (trimethylene terephthalate) blend fibers for textile application. *Energy and Materials Science and Engineering Symposium (EMSES)*, Ubon Ratchathani, Thailand. 2013,34: 534-541.
- [106] Na DH, Emami F, Yazdi SJM. Poly (lactic acid)/poly (lactic-co-glycolic acid) particulate carriers for pulmonary drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Investigation*. 2019, 49(4): 427-442.
- [107] Avgoustakis K. Pegylated poly (lactide) and poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles: preparation, properties and possible applications in drug delivery. *Current Drug Delivery*. 2004, 1(4): 321-333.
- [108] Cheng Y, Deng S, Chen P, Ruan R. Polylactic acid (PLA) synthesis and modifications: a review. *Frontiers of Chemistry in China*. 2009, 4(3): 259-264.
- [109] Nofar M, Sacligil D, Carreau PJ, Kamal MR, Heuzey MC. Poly (lactic acid) blends: processing, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019, 125: 307-360.
- [110] Cunha BLC, Bahu JO, Xavier LF, Crivellin S, Lodi L, Jardini AL, Maciel R, Schiavon M, Concha VOC, Severino P, Souto EB. Lactide: production routes, properties, and applications. *Bioengineering-Basel*. 2022, 9(4): 164.
- [111] Masutani K, Kimura Y. PLA synthesis, from the monomer to the polymer, Poly (lactic acid) science and technology: processing, properties, additives and applications. The Royal Society of Chemistry. 2014.
- [112] Feng LD, Zhang B, Bian XC, Li G, Chen ZM, Chen XS. Thermal properties of polylactides with different stereoisomers of lactides used as comonomers. *Macromolecules*. 2017, 50(16): 6064-6073.
- [113] Tang ZH, Chen XS, Yang YK, Pang X, Sun JR, Zhang XF, Jing XB. Stereoselective polymerization of rac-lactide with a bulky aluminum/schiff base complex. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*. 2004, 42(23): 5974-5982.
- [114] Chen Z, Xie C, Xu Z, Wang YL, Zhao HP, Hao HX. Determination and correlation of solubility data and dissolution thermodynamic data of L-lactide in different pure solvents. *Journal of Chemical and Engineering Data*. 2013, 58(1): 143-150.
- [115] Feng LD, Chen XS, Sun B, Bian XC, Chen ZM. Water-catalyzed racemisation of lactide. *Polymer Degradation and Stability*. 2011, 96(10): 1745-1750.
- [116] Yoo DK, Kim D, Lee DS. Synthesis of lactide from oligomeric PLA: effects of temperature, pressure, and catalyst. *Macromolecular Research*. 2006, 14(5): 510-516.

- [117] Yarkova AV, Novikov VT, Glotova VN, Shkarin AA, Borovikova YS. Vacuum effect on the lactide yield. International Scientific Conference on Chemistry and Chemical Engineering in XXI Century (CCE), Tomsk Polytechn Univ, Tomsk, Russia. 2015, 15: 301-307.
- [118] Bendix D. Chemical synthesis of polylactide and its copolymers for medical applications. *Polymer Degradation and Stability*. 1998, 59(1): 129-135.
- [119] Zhang HP, Ruan JM, Zhou ZC, Li YJ. Preparation of monomer of degradable biomaterial poly (L-lactide). *Journal of Central South University of Technology*. 2005, 12(3): 246-250.
- [120] Xu XL, Liu LJ. A study on highly concentrated lactic acid and the synthesis of lactide from its solution. *Journal of Chemical Research*. 2021, 45(9-10): 856-864.
- [121] 祖恩峰. L-丙交酯的合成、表征及共聚. 硕士学位论文. 西北工业大学, 2006.
- [122] 苏涛, 覃玉莹, 马华, 韦磊. 常压 CO₂ 气流法制 D,L-丙交酯. *精细化工*. 1999, (3): 43-45.
- [123] Upare PP, Yoon JW, Hwang DW, Lee UH, Hwang, YK, Hong DY, Kim JC, Lee JH, Kwak SK, Shin H, Kim H, Chang JS. Design of a heterogeneous catalytic process for the continuous and direct synthesis of lactide from lactic acid. *Green Chemistry*. 2016, 18(22): 5978-5983.
- [124] Heo S, Park HW, Lee JH, Chang YK. Design and evaluation of sustainable lactide production process with an one-step gas phase synthesis route. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2019, 7(6): 6178-6184.
- [125] Upare PP, Hwang YK, Chang JS, Hwang DW. Synthesis of lactide from alkyl lactate via a prepolymer route. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2012, 51(13): 4837-4842.
- [126] 王浩. 丙交酯的合成新工艺研究. 硕士学位论文. 天津大学, 2004.
- [127] Hiroshi Ono HP. Process for the production of lactide. US 4966982, 1990-10-30.
- [128] Obara H, Kawamoto T. Preparation of a lactide and polylactic acid by vaporising ammonia from ammonium lactate and simultaneously dehydrating and cyclically dimerising. US 018362, 1999-01-08.
- [129] Tsukegi T, Motoyama T, Shirai Y, Nishida H, Endo T. Racemization behavior of L,L-lactide during heating. *Polymer Degradation and Stability*. 2007, 92(4): 552-559.
- [130] Motoyama T, Tsukegi T, Shirai Y, Nishida H, Endo T. Effects of MgO catalyst on depolymerization of poly-L-lactic acid to L,L-lactide. *Polymer Degradation and Stability*. 2007, 92(7): 1350-1358.
- [131] Fan YJ, Nishida H, Shirai Y, Endo T. Racemization on thermal degradation of poly (L-lactide) with calcium salt end structure. *Polymer Degradation and Stability*. 2003, 80(3):

- 503-511.
- [132] Shah AA, Hasan F, Hameed A, Ahmed S. Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotechnology Advances*. 2008, 26(3): 246-265.
- [133] Jiao J, Zeng X, Huang X. An overview on synthesis, properties and applications of poly (butylene-adipate-co-terephthalate)-PBAT. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research*. 2020, 3(1): 19-26.
- [134] Inkinen S, Hakkarainen M, Albertsson AC, Sodergard A. From lactic acid to poly (lactic acid) (PLA): characterization and analysis of PLA and its precursors. *Biomacromolecules*. 2011, 12(3): 523-532.
- [135] Hou WL, Kan JL, Bao J. Rheology evolution of high solids content and highly viscous lignocellulose system in biorefinery fermentations for production of biofuels and biochemicals. *Fuel*. 2019, 253: 1565-1569.
- [136] Vadala BS, Deshpande S, Apte-Deshpande A. Soluble expression of recombinant active cellulase in *E. coli* using *B.subtilis* (natto strain) cellulase gene. *Journal, Genetic Engineering & Biotechnology*. 2021, 19(1): 7.
- [137] Kumar P, Satyanarayana T. Microbial glucoamylases: characteristics and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2009, 29(3): 225-255.
- [138] 姜旭, 王丽敏, 张桂敏, 于波, 曾庆韬. 基因工程菌发酵生产 L-乳酸研究进展. *生物工程学报*. 2013, 29(10): 1398-1410.
- [139] Adney B, Baker J. Measurement of cellulase activities. Laboratory analytical procedure. Technical Report NREL/TP51042628. National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden CO. 1996.
- [140] Ghose T. Measurement of cellulose activities. *Pure and Applied Chemistry*. 1987, 59: 257-268.
- [141] 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: 248-254.
- [142] Kang WL, Pan LN, Peng C, Dong L, Cao SF, Cheng HN, Wang YG, Zhang CC, Gu RX, Wang JQ, Zhou HB. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from human milk. *Journal of Dairy Science*. 2020, 103(11): 9980-9991.
- [143] Meidong R, Nakao M, Sakai K, Tongpim S. *Lactobacillus paraplantarum* L34b-2 derived from fermented food improves the growth, disease resistance and innate immunity in *Pangasius bocourti*. *Aquaculture*. 2021, 531.
- [144] Kanklai J, Somwong TC, Rungsirivanich P, Thongwai N. Screening of GABA-producing lactic acid bacteria from Thai fermented foods and probiotic potential of *Levilactobacillus brevis* F064A for GABA-fermented mulberry juice production.

- Microorganisms. 2021, 9(1).
- [145] He NL, Fang C, Qiu ZY, Bao J. Increasing sodium lactate production by enhancement of Na⁺ transmembrane transportation in *Pediococcus acidilactici*. Bioresource Technology. 2021, 323: 124562.
- [146] 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.
- [147] Okano K, Sato Y, Hama S, Tanaka T, Noda H, Kondo A, Honda K. L-lactate oxidase-mediated removal of L-lactic acid derived from fermentation medium for the production of optically pure D-lactic acid. Biotechnology Journal. 2022, 17(4): e2100331.
- [148] Cui X, Hui S, Sobhi M, Ju XX, Guo J, Dong RJ. Butyric acid fermentation during ensiling of wilted maize stover for efficient methane production. Acs Sustainable Chemistry & Engineering. 2020, 8(17): 6713-6721.
- [149] Han XS, Dong WT, Bao J. Upgrading steam pretreatment by converting water-soluble carbohydrates into lactic acid prior to pretreatment. Biomass Conversion and Biorefinery. 2021, 13(1): 43-49.
- [150] Han XS, Hong F, Liu G, Bao J. An approach of utilizing water-soluble carbohydrates in lignocellulose feedstock for promotion of cellulosic L-lactic acid production. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2018, 66(39): 10225-10232.
- [151] Zhao K, Qiao QG, Chu DQ, Gu HQ, Dao TH, Zhang J, Bao J. Simultaneous saccharification and high titer lactic acid fermentation of corn stover using a newly isolated lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* DQ2. Bioresource Technology. 2013, 135: 481-489.
- [152] Tian J, Yin X, Zhang JG. Changes of the fermentation quality and microbial community during re-ensiling of sweet corn stalk silage. Italian Journal of Animal Science. 2022, 21(1): 168-177.
- [153] Niu WJ, Han LJ, Liu X, Huang GQ, Chen LJ, Xiao WH, Yang ZL. Twenty-two compositional characterizations and theoretical energy potentials of extensively diversified China's crop residues. Energy. 2016, 100: 238-250.
- [154] He NL, Jia J, Qiu ZY, Fang C, Liden G, Liu XC, Bao J. Cyclic L-lactide synthesis from lignocellulose biomass by biorefining with complete inhibitor removal and highly simultaneous sugars assimilation. Biotechnology and Bioengineering. 2022, 119(7): 1903-1915.
- [155] Tishler Y, Samach A, Rogachev I, Elbaum R, Levy AA. Analysis of wheat straw biodiversity for use as a feedstock for biofuel production. Bioenergy Research. 2015, 8(4): 1831-1839.

- [156] Chen SF, Mowery RA, Scarlata CJ, Chambliss CK. Compositional analysis of water-soluble materials in corn stover. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, 55(15): 5912-5918.
- [157] Willcock J, Magan N. Impact of environmental factors on fungal respiration and dry matter losses in wheat straw. *Journal of Stored Products Research*. 2001, 37(1): 35-45.
- [158] Fitzsimons A, Duffner F, Curtin D, Brophy G, O'Kiely P, O'Connell M. Assessment of *Pediococcus acidilactici* as a potential silage inoculant. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992, 58(9): 3047-3052.
- [159] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, Crocker D. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. Technical Report NREL/TP-510-42623. National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden CO. 2008.
- [160] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, Crocker D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Technical Report NREL/TP-510-42618. National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden CO. 2012.
- [161] Groot W, Van Krieken J, Sliekersl O, De VS. Production and purification of lactic acid and lactide. *Poly (Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications*. 2011, 1-18.
- [162] Huang HM, Chen JB, Zheng MF, Zhang LL, Ji HF, Cao HJ, Dai FX, Wang L. Precursors and formation pathways of furfural in sugarcane juice during thermal treatment. *Food Chemistry*. 2023, 402.
- [163] Duwat P, Sourice S, Cesselin B, Lamberet G, Vido K, Gaudu P, Le Loir Y, Violet F, Loubiere P, Gruss A. Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *Journal of Bacteriology*. 2001, 183(15): 4509-4516.
- [164] Okano K, Uematsu G, Hama S, Tanaka T, Noda H, Kondo A, Honda K. Metabolic engineering of *Lactobacillus plantarum* for direct L-lactic acid production from raw corn starch. *Biotechnology Journal*. 2018, 13(5): e1700517.
- [165] Sztajer H, Wang W, Lunsdorf H, Stocker A, Schmid RD. Purification and some properties of a novel microbial lactate oxidase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1996, 45(5): 600-606.
- [166] Ma CQ, Gao C, Qiu JH, Hao JR, Liu WW, Wang AL, Zhang YN, Wang M, Xu P. Membrane-bound L- and D-lactate dehydrogenase activities of a newly isolated *Pseudomonas stutzeri* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, 77(1): 91-98.

- [167] Gough S, Dostal L, Howe A, Deshpande M, Scher M, Rosazza JNP. Production of pyruvate from lactate using recombinant *Pichia pastoris* cells as catalyst. *Process Biochemistry*. 2005, 40(8): 2597-2601.
- [168] Desguin B, Soumillion P, Hausinger RP, Hols P. Unexpected complexity in the lactate racemization system of lactic acid bacteria. *Fems Microbiology Reviews*. 2017, 41: S71-S83.
- [169] Guo TT, Zhang L, Xin YP, Xu ZS, He HY, Kong J. Oxygen-inducible conversion of lactate to acetate in heterofermentative *Lactobacillus brevis* ATCC 367. *Applied and Environmental Microbiology*. 2017, 83(21): e01659-17.
- [170] Eckhardt TH, Skotnicka D, Kok J, Kuipers OP. Transcriptional regulation of fatty acid biosynthesis in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*. 2013, 195(5): 1081-1089.
- [171] Kaneda K, Kuzuyama T, Takagi M, Hayakawa Y, Seto H. An unusual isopentenyl diphosphate isomerase found in the mevalonate pathway gene cluster from *Streptomyces sp strain* CL190. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001, 98(3): 932-937.
- [172] Nordkvist M, Jensen NBS, Villadsen J. Glucose metabolism in *Lactococcus lactis* MG1363 under different aeration conditions: requirement of acetate to sustain growth under microaerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, 69(6): 3462-3468.
- [173] Thomas TD, Ellwood DC, Longyear VM. Change from homo- to heterolactic fermentation by *Streptococcus lactis* resulting from glucose limitation in anaerobic chemostat cultures. *Journal of Bacteriology*. 1979, 138(1): 109-117.
- [174] Garrigues C, Loubiere P, Lindley ND, Cocaign-Bousquet M. Control of the shift from homolactic acid to mixed-acid fermentation in *Lactococcus lactis*: predominant role of the NADH/NAD⁺ ratio. *Journal of Bacteriology*. 1997, 179(17): 5282-5287.
- [175] Yamada T, Carlsson J. Regulation of lactate dehydrogenase and change of fermentation products in *Streptococci*. *Journal of Bacteriology*. 1975, 124(1): 55-61.
- [176] 黄艳娜, 许光涛, 游春苹. 乳酸菌中乳酸脱氢酶的研究进展. *食品工业科技*. 2016, 37(8): 369-373.

致谢

白驹过隙，时光荏苒，忙碌而充实的三年研究生生活即将结束。蓦然回首，思绪万千，在这里由衷的感谢一直鼓励、支持和帮助过我的老师、亲人及朋友们。

首先，我要感谢我的导师鲍杰教授。鲍老师专业知识渊博，为学严谨求实，待人和蔼可亲，指导有方，让我由衷钦佩。特别是在论文写作过程中，从选题、结构、成文到批注修改，都倾注了大量的心血和精力。在此特别向我的导师鲍杰老师表示我最诚挚的谢意和最美好的祝福。

其次，感谢张斌老师在科研上给予的指导和帮助；感谢何妮玲师姐不耐烦的教我各种实验技能和操作方法；感谢金慈、颜钊、刘琪、王雅、韩涛、张翼、徐迎迎、李静、陈明星、吴雷、李景等师兄、师姐们，同届李治斌、杨虎成、任大宇以及韩莹、韩庆美、刘娇、武师南、张凌霄、陈峙苇等师妹、师弟们对我的帮助和包容；感谢我的室友苏欣欣、林桂红、李雪莹在生活上给予的帮助。

最后，感谢我的父母和我的弟弟一直以来对我的支持和鼓励，感谢我的男朋友带给我的安全感和幸福感，你们的理解和包容将成为我前行的坚强后盾。

学术成果

待发表论文:

Xiaomeng Guo¹, Zhibin Li¹, Niling He¹, Bin Zhang, Xiucui Liu, Jie Bao*. Detection and elimination of trace D-lactic acid in lignocellulose biorefining chain: Generation, flow, and impact on chiral lactide synthesis. **Biotechnology and Bioengineering**.

申请专利:

1. **郭晓梦**, 何妮玲, 鲍杰, 徐敏, 刘修才。一种木质纤维素原料的前处理方法-喷洒乳酸优势菌。专利申请号: 202211153745.2。
2. **郭晓梦**, 何妮玲, 鲍杰, 徐敏, 刘修才。一种木质纤维素原料的前处理方法-干燥控制含水量。专利申请号: 202211153759.4。

卷内备考表

本卷情况说明

本卷共 陆拾肆 页

立卷人 _____

检查人 _____

立卷时间 _____