

分类号: \_\_\_\_\_ 密级: \_\_\_\_\_

UDC: \_\_\_\_\_

# 华东理工大学

## 工程硕士学位论文

低消旋乳酸含量植物蛋白氮源在纤维素手性乳酸发酵中的应用

韩莹

指导教师姓名: \_\_\_\_\_ 鲍杰 教授 华东理工大学

张明明 研究员 上海凯赛生物技术有限公司

张斌 博士 华东理工大学

申请学位级别: \_\_\_\_\_ 硕士 \_\_\_\_\_ 工程领域: \_\_\_\_\_ 生物与医药 \_\_\_\_\_

论文定稿日期: \_\_\_\_\_ 2024.5.28 \_\_\_\_\_ 论文答辩日期: \_\_\_\_\_ 2024.5.30 \_\_\_\_\_

学位授予单位: \_\_\_\_\_ 华东理工大学 \_\_\_\_\_

学位授予日期: \_\_\_\_\_

答辩委员会主席: 刘文波 高级工程师

答辩委员会成员: 张旭 副教授

万俊芬 副教授

# 华东理工大学研究生学位论文提交要求

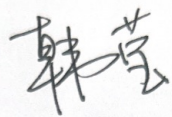
根据校学位评定委员会要求，研究生学位论文全文（含纸质版和电子版）必须提交档案馆保存。

研究生学位论文全文电子版由档案馆按\_\_\_\_\_（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

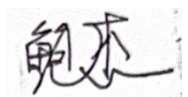
注：选择②、③或④的需经学校国家技术转移中心备案，以为学校技术转移提供服务。

学位论文作者签名：



2024 年 6 月 2 日

指导教师签名：



2024 年 6 月 3 日

国家技术转移中心负责人签名：

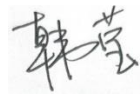
（公章）

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

论文作者签名：



2024年5月28日

## 低消旋乳酸含量植物蛋白氮源在纤维素手性乳酸发酵中的应用

### 摘要

手性乳酸是合成聚乳酸的关键单体,必须具备高手性纯度并实现低成本的发酵生产。氮源物质是影响手性乳酸发酵成本的重要因素。乳酸菌进行乳酸发酵需要添加含有各种氨基酸和营养因子的复合氮源物质。酵母提取物是手性乳酸发酵的最佳氮源物质,但其高昂的价格会显著增加发酵成本;玉米浆是工业发酵常用的廉价氮源,但其含有大量消旋乳酸无法用于高手性纯度的乳酸生产。豆粕、棉籽粕等植物蛋白的消旋乳酸含量较低,但其对乳酸手性纯度的影响以及替代酵母提取物的潜力尚不清晰。本文针对上述问题,对低消旋乳酸含量的植物蛋白氮源在纤维素手性乳酸发酵中的应用进行了研究。

本文第一部分评估了八种主要的植物蛋白作为替代氮源进行手性乳酸发酵的潜力。研究发现,植物蛋白通过碱性蛋白酶催化水解以释放游离氨基酸和短肽,对固液比和水解时间等酶水解关键参数进行条件优化,并以获得的植物蛋白水解液作为氮源、干法生物炼制技术获得的小麦秸秆作为碳源进行了乳酸发酵。结果表明,豆粕中的消旋乳酸含量低,摇瓶发酵获得的纤维素 L-乳酸产品手性纯度为 99.8%,达到了聚合级乳酸单体的手性纯度标准,是合格的植物蛋白替代氮源。

本文第二部分对豆粕作为氮源进行了纤维素手性乳酸的发酵评价。选择工业级酵母提取物作为对照组,在 3 L 生物反应器中以 30% (w/w)固含量的小麦秸秆为碳源,探究了加入豆粕水解液对糖化、脱毒和发酵的影响。由于豆粕中存在氨基酸缺陷无法满足发酵工程菌株 *Pediococcus acidilactici* ZY271 的生长代谢需求,需添加少量酵母提取物进行弥补。豆粕水解液与酵母提取物作为组合氮源,在仅添加对照 25%的酵母提取物的条件下,L-乳酸产量达到 122.9 g/L,得率为 88.1%,手性纯度为 99.8%,实现了与酵母提取物为氮源一致的发酵指标。

本文第三部分对豆粕作为廉价氮源发酵纤维素 L-乳酸进行了初步的技术经济评价。结果表明,以硫酸催化水解的豆粕水解液的营养组分有较大损失,乳酸产量较低;新鲜玉米浆作为氮源发酵的 L-乳酸手性纯度仅有 96.9%无法进行聚 L-乳酸的合成。以酶解的豆粕和低用量的酵母提取物为组合替代氮源生产乳酸获得了与对照组一致的发酵指标,将氮源成本降低了 56.7%,生产 1 千克手性乳酸的氮源成本仅为 1.41 元。

综上所述,本文对碱性蛋白酶水解豆粕及其加入方式对纤维素 L-乳酸发酵影响进行了详细的实验研究,确定了豆粕与低用量工业级酵母提取物作为廉价替代氮源配方,为纤维素手性乳酸的工业发酵提供了一种具有成本效益的氮源配方解决方案。

**关键词:** 氮源物质; 纤维素乳酸; 手性纯度; 小麦秸秆; 植物蛋白

## **Nitrogen ingredients derived from plant proteins containing low racemic lactic acid for cellulosic chiral lactic acid fermentation**

### **Abstract**

Chiral lactic acid is the key monomer for the synthesis of polylactic acid. Cost-effective lactic acid should have high chiral purity products and low production costs. Nitrogen additive is the essential factor affecting the fermentation of chiral lactic acid. Complex nitrogen additives containing various amino acids and nutrient components are required for lactic acid bacteria fermentation. Yeast extract is the optimal nitrogen source for chiral lactic acid fermentation, but its expensive price significantly increases the cost of fermentation. Corn steep liquor is the cheap alternative nitrogen additive commonly used in industrial fermentation. However, its large racemic lactic acids are not suitable for chiral lactic acid production. Plant proteins such as soybean meal and cottonseed meal have low racemic lactic acid, but their impact on the chiral purity of lactic acid products and their potential for replacing expensive yeast extracts is unclear. This study addresses the above problems using plant proteins with low racemic lactic acids contents as nitrogen ingredients for cellulosic chiral lactic acid fermentation.

In the first part, the potential of eight major plant proteins as alternative nitrogen sources for chiral lactic acid fermentation was characterized. It was found that plant proteins were hydrolyzed by alkaline protease catalysis to release free amino acids and short peptides, and the key parameters of enzymatic hydrolysis, such as solid-liquid ratio and hydrolysis time, were optimized. The obtained hydrolysate of plant proteins was used as nitrogen additive, and wheat straw obtained by dry biorefinery technology was used as carbon source for lactic acid fermentation. The results showed that the chiral purity of cellulose L-lactic acid product obtained by shake flask fermentation was 99.8%, which reached the chiral purity standard of polymerization-grade lactic acid monomer, and it was a qualified alternative nitrogen source of plant protein.

In the second part, the fermentation of cellulosic chiral lactic acid was evaluated using soybean meal as the nitrogen source. Industrial grade yeast extract as nitrogen source was selected as the control group, The effect of adding soybean meal hydrolysate on saccharification, detoxification, and fermentation was explored in a 3 L bioreactor with 30% (w/w) solids of wheat straw as carbon source. The results showed that the existence of amino acid defects in soybean meal did not meet the growth and metabolic demand of fermentation engineered strain *Pediococcus acidilactici* ZY271. A low amount of yeast extract was added to compensate the insufficiency. The combined nitrogen source of soybean meal hydrolysate and yeast extract

achieved 122.9 g/L cellulosic L-lactic acid, a yield of 88.1%, and the chiral purity of 99.8% with the addition of only the control 25% yeast extract, realizing fermentation indexes consistent with the addition of yeast extract as the nitrogen source.

The third part carried out the preliminary techno-economic evaluation of the fermentation of cellulosic L-lactic acid process with soybean meal as a cheap nitrogen source. The results showed that the soybean meal hydrolysate catalyzed by sulfuric acid hydrolysis had a large loss of nutrient fractions resulting in lower lactic acid production. The chiral purity of L-lactic acid from fresh corn leachate as a nitrogen source for fermentation was only 96.8%, and poly-L-lactic acid could not be synthesized. The production of lactic acid by replacing the nitrogen source with the combination of enzymatically hydrolyzed soybean meal and the low dosage of yeast extract obtained fermentation indexes consistent with those of the control group, more importantly, reduced the cost of the nitrogen source by 56.7%, and the cost of the nitrogen source for chiral lactic acid production was only 1.41 CNY per kg L-lactic acid.

Conclusively, this paper presented a detailed experimental study about the effects of alkaline protease hydrolysis of soybean meal and the mode of incorporation on cellulosic L-lactic acid fermentation, and identified soybean meal with a low dosage of industrial-grade yeast extract as the inexpensive alternative nitrogen source formulation. This study provided a cost-effective nitrogen-source formulated solution for the industrial fermentation of cellulosic chiral lactic acid.

**Keywords:** Nitrogen additives; Cellulosic lactic acid; Chiral purity; Wheat straw; Plant proteins

## 目录

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| 第 1 章 文献综述.....                      | 1  |
| 1.1 聚乳酸与手性乳酸.....                    | 1  |
| 1.1.1 聚乳酸的应用.....                    | 1  |
| 1.1.2 手性乳酸的生产.....                   | 2  |
| 1.2 乳酸菌发酵生产手性乳酸的廉价碳源.....            | 4  |
| 1.2.1 淀粉.....                        | 4  |
| 1.2.2 木质纤维素.....                     | 4  |
| 1.2.3 其它廉价碳源.....                    | 7  |
| 1.3 乳酸菌发酵生产手性乳酸的廉价氮源.....            | 7  |
| 1.3.1 玉米浆.....                       | 8  |
| 1.3.2 植物蛋白及水解.....                   | 8  |
| 1.3.3 其他廉价氮源.....                    | 9  |
| 1.3.4 氮源对乳酸产品手性纯度的影响.....            | 10 |
| 1.4 本文的立题依据和主要研究内容.....              | 12 |
| 第 2 章 植物蛋白作为廉价氮源生产纤维素 L-乳酸可行性探究..... | 13 |
| 2.1 前言.....                          | 13 |
| 2.2 材料与方法.....                       | 13 |
| 2.2.1 原料、酶与试剂.....                   | 13 |
| 2.2.2 菌株、培养基和培养条件.....               | 14 |
| 2.2.3 植物蛋白的酶水解.....                  | 14 |
| 2.2.4 小麦秸秆的干酸预处理和固态脱毒.....           | 15 |
| 2.2.5 小麦秸秆的糖化与 L-乳酸摇瓶发酵.....         | 15 |
| 2.2.6 分析方法.....                      | 16 |
| 2.2.7 植物蛋白水解得率的计算.....               | 16 |
| 2.2.8 L-乳酸手性纯度的计算.....               | 17 |
| 2.3 结果与讨论.....                       | 17 |
| 2.3.1 廉价植物蛋白作为有机氮源的筛选和表征.....        | 17 |
| 2.3.2 植物蛋白的水解条件优化.....               | 20 |
| 2.3.3 植物蛋白对复合氮源替代程度的探究.....          | 26 |
| 2.4 本章小结.....                        | 29 |

|  |    |
|--|----|
| 第 3 章 豆粕酶解产物作为替代氮源发酵生产纤维素 L-乳酸.....      | 30 |
| 3.1 前言.....                              | 30 |
| 3.2 材料与方法.....                           | 30 |
| 3.2.1 原料、酶与试剂.....                       | 30 |
| 3.2.2 菌株、培养基和培养条件.....                   | 31 |
| 3.2.3 豆粕的酶水解.....                        | 31 |
| 3.2.4 小麦秸秆的糖化和液态脱毒.....                  | 31 |
| 3.2.5 小麦秸秆的 L-乳酸发酵.....                  | 32 |
| 3.2.6 分析方法.....                          | 32 |
| 3.2.7 L-乳酸手性纯度的计算.....                   | 32 |
| 3.3 结果与讨论.....                           | 32 |
| 3.3.1 工业级酵母提取物为有机氮源的 L-乳酸发酵.....         | 32 |
| 3.3.2 豆粕水解液作为替代氮源进行纤维素 L-乳酸发酵.....       | 35 |
| 3.3.3 工业生物炼制技术背景下廉价组合氮源用于纤维素 L-乳酸生产..... | 39 |
| 3.4 本章小结.....                            | 41 |
| 第 4 章 纤维素 L-乳酸发酵氮源的初步经济技术评价.....         | 42 |
| 4.1 前言.....                              | 42 |
| 4.2 材料与方法.....                           | 42 |
| 4.2.1 原料、酶与试剂.....                       | 42 |
| 4.2.2 菌株、培养基及培养条件.....                   | 42 |
| 4.2.3 豆粕的酸水解.....                        | 42 |
| 4.2.4 小麦秸秆的糖化、液态脱毒与乳酸发酵.....             | 43 |
| 4.2.5 分析方法.....                          | 43 |
| 4.2.6 L-乳酸手性纯度和得率计算.....                 | 43 |
| 4.3 结果与讨论.....                           | 44 |
| 4.3.1 酸水解的豆粕为有机氮源的 L-乳酸发酵.....           | 44 |
| 4.3.2 玉米浆为有机氮源的 L-乳酸发酵.....              | 45 |
| 4.3.3 不同氮源组合背景下的 L-乳酸发酵和成本评价.....        | 46 |
| 4.4 本章小结.....                            | 50 |
| 第 5 章 结论与展望.....                         | 51 |
| 5.1 结论.....                              | 51 |
| 5.2 创新点.....                             | 51 |

|             |    |
|-------------|----|
| 5.3 展望..... | 52 |
| 参考文献.....   | 53 |
| 学术成果.....   | 65 |
| 致谢.....     | 66 |

## 第1章 文献综述

石油基塑料的过度使用是当前人类面临的最具挑战的环境问题之一<sup>[1, 2]</sup>。不可生物降解的塑料在垃圾填埋场和海洋中积累, 导致大量鸟类和水生动物的死亡, 同时也对人类生命健康造成严重威胁。因此使用生物基聚合物制成的可降解塑料代替石油基塑料具有重要意义<sup>[3, 4]</sup>。与传统塑料相比, 生物基塑料在可再生性、生物相容性、低碳足迹、能源效率等方面具有显著优势<sup>[5]</sup>。由于生物塑料可以通过绿色低碳的可持续生产方式获取, 其大规模应用有望解决目前严峻的资源环境问题。欧洲生物塑料协会预测, 2023 年全球生物塑料产能超过 210 万吨, 预计未来五年将扩大至 740 万吨<sup>[6]</sup>。聚乳酸 (PLA) 作为最具代表性的生物塑料, 以低成本的可再生能源生产具有经济效益的乳酸单体成为当前热点研究之一<sup>[7]</sup>。

### 1.1 聚乳酸与手性乳酸

#### 1.1.1 聚乳酸的应用

乳酸作为一种极具价值的平台化合物, 可以应用于各种领域: 在食品行业可以用作生物防腐剂、pH 调节剂、食品酸化剂以及乳化剂<sup>[8]</sup>; 在化妆品行业可以用作皮肤美白剂、保湿剂和去角质剂<sup>[9]</sup>; 在医药行业可以用作透析液、手术缝合线以及血管内溶液<sup>[10]</sup>; 在化工行业, 乳酸的高溶解度可以作为清洗剂和除垢剂等绿色溶剂<sup>[11]</sup>。

聚乳酸主要通过手性乳酸的工业聚合或丙交酯的开环聚合形成, 是化石基聚合物的理想替代品。2020 年全球聚乳酸市场规模为 5 亿美元左右, 预计 2021 至 2028 年将以 18.1% 的增长率持续增加<sup>[12]</sup>。聚乳酸的高分子量、可生物降解性、生物相容性、优异加工性能、温度稳定性以及水不溶性使其具有广泛的工业应用。

##### (1) 医疗

聚乳酸因具备自然降解的特性, 无需额外移除, 同时对人体安全无毒, 故被广泛应用于医疗植入物领域, 如组织生长促进、骨移植以及骨折固定装置等。在实际应用中, 聚乳酸常与其他材料如蛋白质或聚合物(如胶原蛋白、聚乙醇酸和碳纤维等)结合使用, 以实现稳定骨折、固定肌腱和韧带以及提升机械性能等多重功能。此外, 使用聚乳酸制备的医疗器械还可作为金属医疗器械的替代品。肌肉骨骼健康解决方案公司 Zimmer Biomet 生产了一种以聚 L-乳酸为原料制成的组织附着装置 Bio-Statak, 具有与金属装置相当的可靠性和耐久性<sup>[13]</sup>。

##### (2) 纤维和纺织品

聚乳酸因其具有结合化合物的能力, 可以通过纺丝加工成纤维, 适用于纤维应用<sup>[14]</sup>。聚乳酸强大的吸水性成为湿巾的合适候选者, Biovation 开发出了一种由聚乳酸制成的一

次性抗菌湿巾。此外，聚乳酸纤维也受到汽车行业的关注，例如包括福特公司在内的多家汽车公司正在研究将聚乳酸应用于地垫等汽车内饰。聚乳酸还具有吸湿排汗性、透气性、隔热和防汗缓冲能力，可以作为服装生产原料从而替代尼龙和聚对苯二甲酸乙二醇酯（PET）等不可生物降解材料<sup>[15]</sup>。

### （3）包装材料

聚乳酸因其出色的生物相容性、拉伸强度以及热塑加工性等一系列物理特性，已广泛用作食品包装材料。美国食品药品监督管理局（FDA）亦认可聚乳酸在食品包装领域的应用，确认其可直接与生物制品接触，从而确保食品的安全与卫生。2020年，在生产瓶罐容器以及新鲜食品包装的原料中，聚乳酸的收入份额超过36%<sup>[12]</sup>。将聚乳酸应用于包装材料领域已成为当前研究的热点之一。Ayse 等人<sup>[16]</sup>成功将可生物降解的聚乳酸与金属银相结合，制备出具有抗菌特性的薄膜，这项创新为包装材料的发展开辟了新的可能性；Ghozali 等人<sup>[17]</sup>尝试将各种金属氧化物的添加在聚乳酸薄膜中以增加其抗菌性；Risyon 等人<sup>[18]</sup>合成了具有出色机械性能、透水性、透氧性的聚乳酸/合金纳米管仿生复合材料，有效解决以往聚乳酸低柔韧性，结晶性能和阻隔性能低效的问题，为食品包装行业提供了可持续的环保材料。

#### 1.1.2 手性乳酸的生产

2022年我国聚乳酸市场需求量为40万吨，预计2025年将增加到208万吨<sup>[19]</sup>。欧洲生物塑料预计2028年全球可降解生物塑料的生产占比将达到62.0%，其中聚乳酸占比最高，为43.6%<sup>[6]</sup>。乳酸（LA）的化学名称为 $\alpha$ -羟基丙酸，是合成聚乳酸的关键单体<sup>[20,21]</sup>，分子结构为 $C_2H_5OCOOH$ ，通常以白色粉末或无色及黄色液体的形式存在，其基本性质如表1.1所示<sup>[3,22]</sup>。乳酸作为一种手性化合物，其分子中羧基 $\alpha$ 位的碳原子为不对称碳原子，因此具有L(+)和D(-)两种对映异构体。L-乳酸为左旋型乳酸、D-乳酸为右旋型乳酸（图1.1）。L-乳酸和D-乳酸具有相同的理化性质，区别在于它们的旋光性不同，依靠传统的分离技术无法将两种异构体完全分开。L-乳酸与D-乳酸等摩尔量混合的DL-乳酸称为外消旋乳酸，不具有旋光性。乳酸分子中存在的羟基(-OH)和羧基(-COOH)这两种官能团可以进行多种反应，其化学活性与其理化性质有关，包括在水介质中pH呈酸性以及反应的多样性<sup>[9,23]</sup>。L-乳酸在动物和微生物的代谢系统中普遍存在，而D-乳酸在人体中无法被有效代谢。因此，L-乳酸因其更广泛的生物利用性而具有更高的市场需求<sup>[24]</sup>。

高手性纯度的L-乳酸和D-乳酸单体聚合形成聚L-乳酸和聚D-乳酸，其耐热性能和机械性能均高于以D,L-乳酸混合物聚合形成的聚D,L-乳酸<sup>[25,26]</sup>，这主要是因为L-和D-乳酸的比例会影响聚乳酸的物理性质与可降解性。因此在工业乳酸生产中，纯L-乳酸和纯D-乳酸比D,L-乳酸更具有应用价值<sup>[27]</sup>。

表 1.1 乳酸的基本性质<sup>[22]</sup>

Table 1.1 Basic properties of lactic acid <sup>[22]</sup>

| 性质                | L-乳酸                          | D-乳酸  | D,L-乳酸 |
|-------------------|-------------------------------|-------|--------|
| 密度 (20°C, g/L)    | 1.249                         | 1.249 | 1.249  |
| 熔点 (°C)           | 53                            | 52.7  | 16.8   |
| 沸点 (1.87 kPa, °C) | 82                            | 103   | 122    |
| 解离常数 (pKa, 25°C)  | 3.79                          | 3.83  | 3.73   |
| 溶解性               | 易溶于水、乙醇、丙酮、甘油；不溶于氯仿、石油醚、二硫化碳等 |       |        |

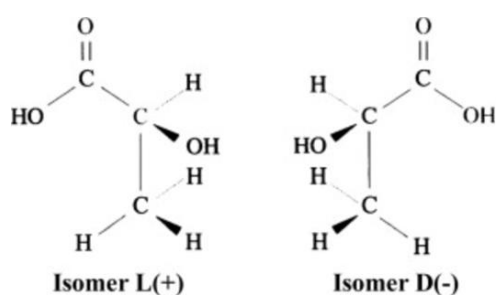


图 1.1 L-乳酸和 D-乳酸的结构式<sup>[3]</sup>

Fig. 1.1 Structural formulae of L-lactic acid and D-lactic acid <sup>[3]</sup>

乳酸的工业生产主要有化学合成途径和微生物发酵途径两种。化学合成途径生产乳酸常用乳腈法。第一步是将氰化氢加入到乙醛中生成乳腈，第二步使用硫酸或盐酸对乳腈进行水解，从而生成乳酸，此过程会生成副产物氯化铵或硫酸铵<sup>[28]</sup>。化学方法合成乳酸的水解反应需要极高的温度和金属催化剂<sup>[29]</sup>，并且最终生产得到的是 DL-乳酸的外消旋混合物，这导致乳酸的物理和化学性质无法控制，从而得到的混合乳酸不能用于食品、制药和医疗行业<sup>[20,30]</sup>。日本的 Musashino 公司和美国的 Sterling Chemicals 公司是最后几家以化学方法生产乳酸的大型制造商。

微生物发酵途径生产乳酸是指使用微生物菌株利用可发酵性糖进行生长代谢生成乳酸，通过微生物发酵生产的乳酸约占全球乳酸产量的 90%以上<sup>[31]</sup>。乳酸菌的代谢路径决定了乳酸发酵的类型，同型发酵通过糖酵解（EMP）途径生成单一乳酸产物；异型发酵通过磷酸戊糖（HMP）途径和 EMP 途径生成乳酸，同时会有乙酸、二氧化碳、乙醇等副产物产生<sup>[10]</sup>。生产 L-乳酸的微生物主要为乳酸菌（Lactic acid bacteria, LAB）和根霉菌（*Rhizopus sp.*），生产 D-乳酸的菌株主要为乳杆菌属（*Lactobacillus*）、芽孢杆菌属（*Bacillus*）、芽孢乳杆菌属（*Sporolactobacillus*）以及明串珠菌属（*Leuconostoc*）<sup>[32]</sup>。相较于化学合成，通过微生物发酵能够生产高手性纯度的乳酸，不需要较高的发酵温度，

因此能耗低、二氧化碳排放量低，同时还可以利用可再生基质进行发酵，降低对化石原料的依赖<sup>[20, 33]</sup>。

## 1.2 乳酸菌发酵生产手性乳酸的廉价碳源

乳酸菌自身不能合成多种必需氨基酸，通常在营养丰富环境中生长，例如动物肠道、植物降解物及乳制品中。复杂的自然环境使其能够代谢多种碳水化合物。当乳酸菌使用纯度较高的糖进行发酵时，获得的产物纯度也较佳，可以节省下游产物的纯化成本。然而，纯糖的使用与乳酸生产经济性背道而驰，因为纯糖价格昂贵，而乳酸是一种廉价的工业产品。因此，在乳酸生产中使用农作物及其加工副产品等廉价碳源，可以有效降低生产成本<sup>[31]</sup>。

### 1.2.1 淀粉

农作物来源的淀粉（小麦、玉米、木薯、大米、高粱等）是常见的乳酸生产底物<sup>[34-36]</sup>。淀粉水解成葡萄糖和麦芽糖后才可以作为可发酵糖被乳酸菌利用，因此需要先加入淀粉酶对淀粉进行液化或者糊化处理来产生葡萄糖<sup>[37]</sup>；也可以由产淀粉酶的菌株将淀粉分解为葡萄糖，再进行乳酸菌发酵生产乳酸<sup>[38]</sup>。然而，这些农作物作为人类重要的粮食来源，如果将其作为生产乳酸的原料，会威胁到人类粮食安全<sup>[27]</sup>。因此，寻找非粮来源的原料作为乳酸发酵的碳源对工业化乳酸生产至关重要。

### 1.2.2 木质纤维素

木质纤维素生物质包括森林残渣（木材、树枝、树叶）、农业残渣（玉米秸秆、麸皮）、能源植物（桉树、杨树）和纤维素废弃物（城市固体废物和食物垃圾）等，是一种分布广泛且具有经济效益的可再生资源，全球年产量在 1500 亿吨左右<sup>[39-43]</sup>。在应对能源短缺和环境污染这两大全球性挑战，以及推动经济社会可持续发展方面，生物质资源展现出了广阔的应用前景。联合国环境与发展会议（UNCED）预测到 2050 年，生物质资源的利用量将占据世界资源总使用量的一半<sup>[44]</sup>。

木质纤维素由纤维素、半纤维素、木质素、极性和非极性物质组成，包括 40-50% 的纤维素、25-30% 的半纤维素、15-20% 的木质素以及微量的果胶、氮化合物和无机成分等<sup>[45, 46]</sup>。纤维素作为植物细胞壁的稳固框架，是由 D-吡喃葡萄糖单体通过  $\beta$ -(1,4)糖苷键紧密连接而成的同多糖。这种化学键的结合以及额外的氢键赋予了纤维素强大的刚性，使其结构坚固且难以断裂。纤维素不溶于水、稀酸等多数常见溶剂，但可溶于浓酸和浓碱。半纤维素是一种由直链和支链多糖构成的异质聚合物。这些多糖包括戊糖（如木糖和阿拉伯糖）、己糖（如葡萄糖、半乳糖和甘露糖）以及酸性糖（如葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸）。由于半纤维素的聚合度较低且缺乏结晶区，它相较于纤维素更易于降解为单糖。而木质素则是一种结构复杂的疏水芳香族聚合物，它紧密地包裹在纤维素和半纤维素的表面，为植物细胞壁提供了额外的保护。这种聚合物是由苯丙烷结构单元（丁香基，愈

创木脂基和聚羟基苯酚)通过醚键和双碳键连接形成,可以有效阻止多糖解聚<sup>[47-50]</sup>。纤维素、半纤维素和木质素三者之间的相互作用形成了难以降解的复杂结构。利用生物炼制技术从木质纤维素生物质中生产乳酸的主要工艺包括预处理(破坏木质纤维素基质的结构)、脱毒(对阻碍菌株生长的抑制物进行脱除)、糖化(将木质纤维素解聚为可发酵性糖)、发酵(将可发酵糖转化为乳酸产品)。

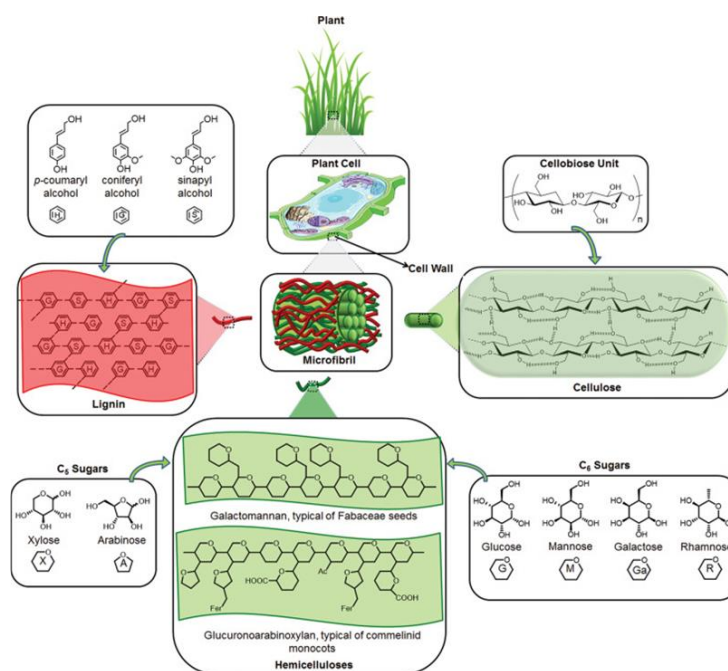


图 1.2 木质纤维素结构示意图<sup>[51]</sup>

Fig. 1.2 Schematic structure of lignocellulose<sup>[51]</sup>

### (1) 预处理

木质纤维素的结构复杂,其中的纤维素和半纤维素难以被直接水解。预处理能破坏其中的木质素和半纤维素,改变纤维素晶体结构,使其暴露并增强与酶的相互作用,从而提高后续酶水解的效率<sup>[52]</sup>。预处理操作方法主要有以下四种:(1)物理预处理方法,包括机械破碎法、微波处理法、超声波处理法、高能电子辐射法、高温热解法等。(2)化学法,包括浓酸、稀酸、碱、氧化剂、离子液体、有机溶剂等。(3)物理-化学法,包括蒸汽爆破法、氨纤维膨爆(AFEX)法、电催化法等。(4)生物预处理,包括微生物法、厌氧消化法和酶法等。目前最广泛使用的预处理方法是碱预处理和稀酸预处理<sup>[53-55]</sup>。碱预处理方法主要取决于木质素在碱溶液中的溶解性能<sup>[56,57]</sup>。碱溶液与连接半纤维素和木质素等通过皂化反应断裂酯键,使木质纤维素结构松散、孔隙增加,降低聚合度和结晶度,为后续的酶水解创造有利条件,有助于酶更易于渗透并与其反应,从而更有效地将木质纤维素转化为生物能源或其他有价值的化学品<sup>[58]</sup>。此法的优势是对可发酵性糖的

损失很小,可以在室温和自然大气压下进行,木质素破坏的比较彻底,但是在水洗过程会产生大量废水,对环境造成严重污染<sup>[59]</sup>。稀酸预处理法是使用浓度小于 10%的酸为催化剂,在 100-240°C的温度和高于 10 个大气压的压力条件下持续数分钟,降解部分木质素并将半纤维素转化为单糖<sup>[60]</sup>。此方法反应快速、所使用的酸无需回收且适合连续生产,但对设备要求较高、反应条件剧烈并且会产生大量的抑制物<sup>[61]</sup>。与传统的稀酸预处理方法相比,本实验室于 2011 年研发出一种在高固体含量(物料与酸溶液的质量比为 2:1)条件下进行的干法稀酸预处理技术,使用物理-化学结合法,通过高温高压和强酸的共同作用破坏木质纤维素的结构<sup>[62]</sup>。该法具有极低蒸汽消耗量和零酸性废水产生的独特优势,预处理后的物料可以在高固含量下进行后续的脱毒、糖化和发酵。

### (2) 脱毒

预处理是生物炼制工艺的决定性步骤,可以克服木质纤维素生物质的生物顽固性以释放可发酵性糖<sup>[63]</sup>。但是在此过程中会产生有毒化合物,包括过量戊糖和己糖降解产生的呋喃醛、乙酰基氧化产生的弱有机酸以及木质素降解产生的酚醛。这些抑制性化合物会强烈抑制乳酸菌的活力。因此,必须通过脱毒步骤以去除木质纤维素原料在预处理过程中产生的抑制物。常用的脱毒方法包括水洗、活性炭吸附、碱中和、离子吸附以及生物脱毒等,前几种方法在脱毒过程中会不可避免的导致可发酵性糖的大量流失或废水的产生<sup>[64]</sup>。生物脱毒可以避免有机溶剂的使用,通过特定微生物进行生物脱毒可以有效地将抑制物完全降解为二氧化碳和水,同时将可发酵性糖保存下来,已经成为抑制物脱除的研究焦点<sup>[65-68]</sup>。

本实验室从预处理后的玉米秸秆中新分离得到的一株生物脱毒菌宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89<sup>[69]</sup>,与之前分离出的树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 相比,表现出更快的细胞生长速率、更好的解毒性能和对低 pH 值的耐受性。早期的生物脱毒方法通过将 *A. resinae* ZN1 或 *P. variotii* FN89 的孢子或菌丝体接种到新鲜的预处理木质纤维素物料上,以固态发酵的方式进行生物脱毒<sup>[64,70]</sup>。由于 *P. variotii* FN89 的菌丝体不易断裂,在高转速的生物反应器中可以较好生长,因此也可以进行液态脱毒。这两种生物脱毒方式均可以实现对糠醛、5-羟甲基糠醛(HMF)、乙酸等主要抑制物的完全脱除,除此之外,液态脱毒的时间相对较短,在生物反应器中进行可以通过 pH 的变化在线监测脱毒终点。相较于固态脱毒,可发酵性糖尤其是木糖的损失较低<sup>[71]</sup>。

### (3) 糖化和发酵

经过预处理及脱毒这两步生物炼制工艺后的木质纤维素会保留大部分的纤维素组分以及半纤维素降解为木聚糖和木寡糖,需要通过纤维素酶水解成以葡萄糖、木糖为主的可发酵性单糖,使用商业纤维素酶(包括内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶以及木聚糖酶)可以最大程度的提高木质纤维素原料的水解效率。

木质纤维素经过糖化后需要进行发酵将糖转化为乳酸产品，发酵方式主要有两种，分别为分步糖化与发酵（SHF）和同步糖化共发酵（SSCF）。SHF 是指木质纤维素原料经过酶水解后得到可发酵糖，将残渣过滤，得到的上清液作为底物进行微生物发酵。这种发酵方法的优势是糖化和发酵工艺可以分别在最优条件下进行，并且在后续更容易提取纯化产物，劣势是酶水解释放出来的高浓度单糖会抑制纤维素酶的作用效果以及周期较长、操作繁琐等。SSCF 指的是糖化和发酵在同一反应器中进行，预处理后的木质纤维素经过纤维素酶的降解成可发酵糖的同时转化成发酵产物。该方法的优势是可以避免水解过程中底物对酶的抑制以及发酵菌株可以无间断的利用单糖进行生长和代谢，极大的提高了发酵速率。本研究使用发酵菌株 *P. acidilactici* ZY271 生长的最佳温度为 42°C，接近糖化的最佳温度 50°C，较高的发酵温度减少了频繁温度切换带来的能耗和成本。综上，SSCF 相较于 SHF 更适合作为木质纤维素生产乳酸的发酵方式。

### 1.2.3 其它廉价碳源

糖蜜是制糖过程中糖液浓缩析出结晶糖后残留的棕褐色粘稠液体，是一种非粮的碳源物质<sup>[72]</sup>。糖蜜根据制糖原料不同包括甘蔗糖蜜、甜菜糖蜜和淀粉糖蜜等，可以用作动物饲料，也可以用于生产乙醇、乳酸和蛋白等<sup>[73, 74]</sup>。Monteagudo 等人<sup>[75]</sup>以甜菜糖蜜为原料利用德氏乳杆菌生产了 57.0 g/L 乳酸。Göksungur 等人<sup>[76]</sup>从预处理的甜菜糖蜜中生产乳酸，批量发酵的乳酸转化率和发酵速率分别为 95.4%和 4.83 g/L/h。Xu 等人<sup>[77]</sup>以甘蔗糖蜜和葡萄糖为共同碳源，利用凝结芽孢杆菌 H-1 通过补料分批发酵生产了 168.3 g/L 乳酸。

餐厨垃圾是食品加工和餐饮行业等人类活动中产生的垃圾，包括丢弃的蔬菜叶、水果皮、茶叶渣、剩饭菜、肉类、蛋壳、过期的面包等，由于其丰富的蛋白质含量和易于发酵的碳水化合物，十分适合乳酸菌的生长<sup>[78-80]</sup>。Yousuf 等人<sup>[81]</sup>以经过酶处理的混合食物垃圾为原料，分批发酵的乳酸产量为 52.0 g/L。

微藻是一类生长在海洋的光合自养型微生物，以藻类生物质作为乳酸生产的碳源具有如下优势<sup>[82]</sup>：（1）微藻中不含有木质素，从而简化了转化为可发酵糖的周期<sup>[83]</sup>；（2）在海洋中广泛分布，收获周期极短，约为 1-10 天<sup>[84]</sup>；（3）可以利用光能固定一氧化碳，从而降低原料成本<sup>[85]</sup>。Nguyen<sup>[83]</sup>等人利用淡水网藻中 47.5%的还原糖通过副干酪乳杆菌 LA104 和棒状乳杆菌生产得到 36.6 g/L 的 D-乳酸，手性纯度为 98.7%。

## 1.3 乳酸菌发酵生产手性乳酸的廉价氮源

乳酸菌的氨基酸合成能力有限，需要在含有丰富营养物质的培养基中才能够生长和代谢。充足的氮源物质对于乳酸生产具有重要意义。酵母提取物和蛋白胨是酵母细胞和微生物蛋白原料通过精细加工得到的速效成品氮源，粗蛋白含量在 70%左右，总氮量在 10%以上，富含氨基酸、核苷酸、核苷、维生素、生长因子等多种营养物质，二者通常

按比例搭配作为复合氮源使用，是乳酸发酵所需的理想氮源物质。He 等人<sup>[86]</sup>以酵母提取物和蛋白胨作为乳酸片球菌的有机氮源，分批发酵 72 h 生产的乳酸产量为 129.4 g/L，发酵速率为 1.80 g/L/h，L-乳酸手性纯度为 99.6%。然而，对于工业乳酸生产而言，以酵母提取物和蛋白胨为氮源并不具备经济效益，其中酵母提取物的成本可以占到总工艺成本的 38%，是限制乳酸经济生产的主要因素<sup>[87]</sup>。因此有诸多关于寻找生产乳酸的低成本替代氮源的研究。

### 1.3.1 玉米浆

全球玉米年产量超过 10 亿吨，约占世界粮食总产量的 35%。在玉米淀粉的生产过程中，收获的玉米需要经过亚硫酸盐浸泡，每浸泡 1 吨的玉米会产生 0.8 吨的浸泡水，这些玉米浸泡水经过浓缩后得到的黄褐色液体即为玉米浆<sup>[88]</sup>。玉米浆含有丰富的可溶性蛋白、维生素、无机盐和生长因子等，因此被广泛用作培养基添加剂以促进微生物生长代谢，是微生物发酵常用的廉价氮源<sup>[89]</sup>。Kona 等人<sup>[90]</sup>利用黑曲霉，以玉米浆为氮源，生产了  $640 \pm 36$  单位/毫升的葡萄糖氧化酶；Agarwal 等人<sup>[91]</sup>以玉米浆为氮源，甘蔗糖蜜为碳源，利用大肠杆菌发酵 36 h 得到了 7.1 g/L 琥珀酸；Ladero 等人<sup>[92]</sup>以玉米浆为氮源，橘皮废料为碳源，生产的 D-乳酸得率为 88%，发酵速率为 3.25 g/L/h；Wang 等人<sup>[93]</sup>以玉米浆为氮源，甜高粱汁为碳源，凝结芽孢杆菌和鼠李糖乳杆菌为混合发酵菌株在分批发酵方式下生产了 121 g/L 的 L-乳酸。然而，由于玉米浸泡在开放环境中进行，浸泡液中丰富的营养物质极易被乳酸菌所污染，导致玉米浆中存在大量的 DL-乳酸，总乳酸含量在 15-25%。以玉米浆作为氮源，会导致生产的乳酸手性纯度严重下降，无法作为聚乳酸合成的单体。因此，以聚乳酸单体为目标的手性乳酸发酵需要选择玉米浆之外的其它廉价氮源作为替代品。

### 1.3.2 植物蛋白及水解

植物蛋白是指来源于植物的蛋白质，其种类丰富多样。其中，完全蛋白质是指含有各种必需氨基酸并且比例分配适宜的蛋白质，比如大豆蛋白。然而大多数蛋白质由于它们缺乏某些必需氨基酸属于不完全蛋白质。在各类植物中，谷类的蛋白质含量通常较低，在 6-10%之间，而且所含的必需氨基酸种类并不全面；坚果类如核桃等，其蛋白质含量可以达到 15-30%。在豆科类植物中，如大豆、豌豆和花生等的蛋白质含量较高，部分豆类的蛋白质含量甚至可以达到 40%。值得注意的是，一些油料作物不仅富含油脂，还含有丰富的蛋白质。这些农作物在榨油后剩余的残渣，如豆粕、菜籽粕、花生粕、棉籽粕、芝麻粕等，都可以作为乳酸菌发酵的氮源物质，为发酵过程提供必要的营养需求。

豆粕是大豆榨油之后得到的副产品，豆粕中含有 40-44%的粗蛋白，1-2%的脂肪，10-15%的碳水化合物以及多种矿物质、维生素和氨基酸，还含有异黄酮、磷脂等生物活性物质，并且是植物油粕中产量最高，应用最广泛的农业深加工副产品。80%以上的豆粕被应用于饲料添加，是饲料业中最广泛的植物性蛋白来源，此外还可以用于食品和微

生物发酵等领域<sup>[94]</sup>。Liang 等人<sup>[95]</sup>以 54.2 g/L 的豆粕和 1 g/L 的酵母提取物为氮源，甘蔗糖蜜为碳源，对德氏乳杆菌在含有甘蔗糖蜜和豆粕水解液中进行适应性进化后作为发酵菌株，在补料分批发酵方式下生产 112.3 g/L 的 D-乳酸，发酵速率为 2.4 g/L/h。由于大豆本身也含有丰富的蛋白质和营养物质，可以作为氮源，Tian 等人<sup>[96]</sup>以大豆水解液为氮源，利用嗜热乳杆菌通过分批发酵得到 114.6 g/L 的 L-乳酸，其发酵速率为 2.6 g/L/h。

棉籽粕、花生粕和菜籽粕是来自相应农作物榨油的副产物，蛋白含量较高也可以作为微生物发酵的氮源物质。Zhang 等人<sup>[97]</sup>对脱酚的棉籽蛋白进行酸水解后作为氮源，小麦秸秆为碳源，利用乳酸片球菌 ZY271 通过批次发酵的 L-乳酸产量为 94.0 g/L。Wang 等人<sup>[98]</sup>以 40 g/L 酶解的花生粕为氮源，葡萄糖为碳源，利用芽孢乳杆菌进行补料分批发酵的 D-乳酸产量为 207.0 g/L。Brock 等人<sup>[99]</sup>以葡萄糖为碳源，菜籽粕为氮源并且补加氨基酸和维生素，利用菊糖芽孢乳杆菌补料分批发酵的 D-乳酸产量为 221.0 g/L，发酵速率为 1.55 g/L/h。除此之外，玉米胚芽粕、棕榈粕、葵花籽粕和芝麻粕也是榨油的副产物，但截至目前还未作为乳酸发酵的添加氮源进行研究。

来自农产品加工副产物的植物蛋白虽然含有丰富的氮源物质，但是均以大分子的蛋白质存在，需要经过水解降解为小分子肽和氨基酸后才可以被微生物所利用<sup>[100]</sup>。蛋白的水解方式主要有化学水解和酶水解两种。化学水解是在高温和高浓度酸或碱条件下对蛋白质进行水解，虽然成本低廉且易于操作，但水解过程难以控制，往往会过度水解导致其中的营养成分被破坏，并且化学水解后需要对水解液进行中和<sup>[101]</sup>。Brock 等人<sup>[99]</sup>在 121°C 和 3 mol/L 硫酸条件下将菜籽粕水解 20 min 后将水解物作为乳酸发酵的氮源。Tannenbaum 等人<sup>[102]</sup>在 95°C 和 pH 为 12.5 的条件下利用氢氧化钠对鱼蛋白水解 20 min 后，将鱼蛋白水解物作为微生物发酵的氮源物质。强酸或碱对水解设备的严重腐蚀使得化学水解并不适用于工业应用。酶水解是利用内切或外切蛋白酶水解分子内肽键或分子末端肽键将大分子蛋白质断裂成肽段或氨基酸，有时使用两种及以上的复合酶进行联合水解效果会更好<sup>[99]</sup>。Liang 等人<sup>[95]</sup>使用风味蛋白酶、核酸内切酶和内切蛋白酶对豆粕在 55°C 和 pH 为 7.5-8.0 的条件下水解 6 h 得到豆粕水解液作为乳酸发酵的氮源。Zhang 等人<sup>[103]</sup>利用碱性蛋白酶和风味蛋白酶对豆粕进行酶水解制备豆粕寡肽，其三氯乙酸氮溶指数可达 72.3%。酶水解的反应条件相对温和，但通常水解并不彻底，大多数的水解产物为肽段，反应结束后需要对蛋白酶进行灭活处理。

### 1.3.3 其他廉价氮源

除玉米浆和植物蛋白外，其它一些较高蛋白质含量的廉价物质也被作为乳酸发酵的替代氮源。Ooi 等人<sup>[104]</sup>以干酵母细胞 (DYC) 作为氮源替代昂贵的酵母提取物，以木薯淀粉为碳源，利用凝结芽孢杆菌 WCP10-4 通过同步糖化发酵生产的 L-乳酸产量为 148.1 g/L，将氮源成本从 38% 降低至 23%。Yao 等人<sup>[105]</sup>从奶牛粪便中提取蛋白质作为氮源，利用米根霉 NRRL-395 生产 L-乳酸，产量为 57.7 g/L。Gao 等人<sup>[106]</sup>设计了 30 g/L 米糠

水解产物和 3 g/L 酵母提取物的组合培养基氮源，利用鼠李糖乳杆菌进行发酵，L-乳酸产量为 83.0 g/L，发酵速率为 1.99 g/L/h，相比于仅以米糠水解液为氮源的 L-乳酸产量（68 g/L）提高了 22.1%；而 Wang 等人<sup>[107]</sup>以脱脂米糠水解液既作为氮源又作为碳源，在补料分批发酵方式下利用鼠李糖乳杆菌生产得到了 210 g/L 的 L-乳酸。Lu 等人<sup>[108]</sup>以橡子淀粉为碳源，麦麸水解液为替代氮源，通过分批发酵方式利用鼠李糖乳杆菌 NBRC 3863 生产乳酸，L-乳酸产量为 57.6 g/L，发酵速率为 1.6 g/L/h。

#### 1.3.4 氮源对乳酸产品手性纯度的影响

通过使用高蛋白含量的农业残渣或者加工副产品，以替代价格昂贵的酵母提取物和蛋白胨可以有效降低氮源成本。由于乳酸菌分布广泛，一些廉价氮源在储存和加工过程中极易被乳酸菌污染，从而含有混合的手性乳酸，这会对发酵得到的乳酸产品的手性纯度造成影响。在诸多廉价替代氮源生产乳酸的研究中，乳酸的产量为关注重点。如表 1.2 所示，很少有文献关注乳酸产品的手性纯度，而高手性纯度的乳酸单体是合成聚乳酸的重要前提。微生物发酵即使获得了高产量的乳酸，但是较低或未知手性纯度的乳酸作为聚乳酸单体的意义十分有限。

表 1.2 使用廉价碳源或氮源进行乳酸发酵对产品手性纯度的影响

Table 1.2 Effect of lactic acid fermentation using inexpensive carbon or nitrogen sources on product chiral purity

| 发酵菌株                | 发酵方式   | 碳源   | 氮源              | 乳酸产量<br>(g/L) | 发酵速率<br>(g/L/h) | 手性纯度<br>(%) | 来源                             |
|---------------------|--------|------|-----------------|---------------|-----------------|-------------|--------------------------------|
| 凝结芽孢杆菌、<br>鼠李糖乳杆菌   | 分批发酵   | 甜高粱汁 | 玉米浆             | 121           | 2.18            | \           | Wang 等人 <sup>[93]</sup>        |
| 德氏乳杆菌               | 补料分批发酵 | 甘蔗糖蜜 | 豆粕水解液、<br>酵母提取物 | 112.3         | 2.40            | 99.6        | Liang 等人 <sup>[95]</sup>       |
| 嗜热乳杆菌               | 分批发酵   | 甜高粱汁 | 大豆水解液           | 114.6         | 2.61            | \           | Tian 等人 <sup>[96]</sup>        |
| 鼠李糖乳杆菌              | 分批发酵   | 葡萄糖  | 米糠水解液、<br>酵母提取物 | 83.0          | 1.99            | \           | Gao 等人 <sup>[106]</sup>        |
| 鼠李糖乳杆菌              | 分批发酵   | 橡子淀粉 | 麦麸水解液           | 57.6          | 1.60            | \           | Lu 等人 <sup>[108]</sup>         |
| 芽孢乳杆菌               | 补料分批发酵 | 葡萄糖  | 豌豆籽水解液          | 122.6         | 1.02            | 99.6        | Michalczyk 等人 <sup>[109]</sup> |
| 梭状芽孢杆菌、<br>大肠杆菌、肠球菌 | 分批发酵   | 甘蔗糖蜜 | 玉米浆             | 112.3         | \               | 95.6        | Sun 等人 <sup>[110]</sup>        |

#### 1.4 本文的立题依据和主要研究内容

聚乳酸是目前生产量最大的生物基聚合材料，合成聚乳酸需要手性纯度高于 99.5% 的乳酸作为单体<sup>[111]</sup>。影响聚乳酸大规模产业化的两个关键因素分别是乳酸单体的生产成本和手性纯度指标<sup>[21, 112, 113]</sup>。木质纤维素作为一种分布广泛、价格低廉并且储量丰富的可再生生物质，以其替代粮食作物为原料生产乳酸具有显著优势。利用乳酸片球菌工程菌株 *P. acidilactici* ZY271 将木质纤维素生物质通过生物炼制技术转为手性乳酸是生产聚乳酸单体的一种理想方式，已经实现了高指标手性乳酸的生产。

氮源是限制单体乳酸经济生产的关键因素之一，乳酸菌的生长代谢过程中对氮源营养物质的需求较高。酵母提取物和蛋白胨作为乳酸生产的理想氮源，可以获得最佳的发酵效率，但是对于乳酸的工业生产无法负担其昂贵成本。以往有不少针对使用廉价替代氮源生产乳酸的研究，但是存在对廉价氮源中的消旋乳酸关注度低以及作为替代氮源的营养成分不足等问题，无法在降低氮源物质成本的同时满足高手性纯度和高乳酸产量这两个关键指标。本研究为了实现在木质纤维素体系下利用廉价植物蛋白生产高手性纯度的 L-乳酸进行了如下研究：

(1) 对主要的榨油加工副产品来源的植物蛋白进行表征、筛选和关键参数优化，确定合适的候选替代氮源，以期达到与酵母提取物和蛋白胨作为氮源基本一致的发酵水平。

(2) 在工业生物炼制技术背景下以木质纤维素生物质为原料同步糖化共发酵生产高手性纯度 L-乳酸，最终确定植物蛋白的组合氮源。

(3) 对不同组合氮源条件下的乳酸生产进行初步的技术经济评价，对乳酸生产的氮源配方进行成本计算。

## 第2章 植物蛋白作为廉价氮源生产纤维素 L-乳酸可行性探究

### 2.1 前言

氮源物质的使用对乳酸生产具有关键作用。酵母提取物和蛋白胨含有丰富的氨基酸、维生素以及生长因子，是微生物生长和乳酸发酵的最佳氮源<sup>[20]</sup>。然而酵母提取物和蛋白胨的使用对于乳酸的工业生产并不具有成本效益。前期的研究工作中发现，以一些廉价的农业残渣或食品加工副产品作为乳酸发酵的替代氮源，虽然可以极大降低乳酸的生产成本，但是却存在两个关键问题：其一是某些氮源物质中始终存在少量 D-乳酸，且难以将其分离去除，这将严重影响最终 L-乳酸产品的手性纯度；其二是以这些廉价氮源作为替代氮源进行乳酸发酵，发酵速率和乳酸产量大幅降低，无法获得以酵母提取物和蛋白胨持平的发酵指标。因此寻找低含量消旋乳酸的廉价替代氮源同时获得乳酸生产的最佳发酵指标是实现木质纤维素来源的高手性纯度 L-乳酸的关键策略。

本章首先对不同来源的氮源物质进行表征，分析其粗蛋白以及消旋乳酸含量。通过对酶水解后的植物蛋白作为氮源进行乳酸发酵评价，筛选出潜在的替代氮源。其次通过对候选的植物蛋白进行固液比和水解时间的优化，确定最佳的酶水解条件。最后在其基础上，确定工业级酵母提取物的最低添加量，以实现与酵母提取物和蛋白胨为氮源发酵产量基本一致的高手性纯度 L-乳酸。

### 2.2 材料与方法

#### 2.2.1 原料、酶与试剂

本章实验使用的小麦秸秆于 2021 年收获自河南南阳，使用锤式粉碎机（筛网直径为 10 mm）对其粉碎后进行装袋储存。小麦秸秆通过两步酸解法测定其组分<sup>[114]</sup>，纤维素含量为 31.2%，半纤维素含量为 24.3%，木质素含量为 19.4%，灰分为 9.6%，其中各组分均按照干重计算。

商业纤维素酶 Cellic Ctec 2.0 购自北京诺维信公司，其初始酶活为 256.1 FPU/mL，利用 Bradford 法测得蛋白浓度为 87.3 mg/mL<sup>[115]</sup>。糖化酶 GA-L NEW 购自无锡杰能科公司，酶活为 103900 WU/mL。碱性蛋白酶购自潍坊康地恩生物科技有限公司，酶活为 200,000 U/g。

试剂级酵母提取物和蛋白胨购自贝辛斯托克牛津有限公司，工业级酵母提取物购自宜昌安琪酵母有限公司。豆粕购自连云港中粮集团有限公司，棉籽粕购自海安家惠生物科技有限公司。花生粕、菜籽粕、芝麻粕、玉米胚芽粕、棕榈粕和葵花籽粕均购自潍坊华懋饲料有限公司。其他试剂如一水合葡萄糖、柠檬酸氢铵、硫酸铵、一水合硫酸锰等均购自上海国药化学试剂有限公司。

## 2.2.2 菌株、培养基和培养条件

### (1) 生物脱毒菌株

本章所使用的生物脱毒菌株宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89 (CGMCC 17665), 是从预处理后的玉米秸秆上筛选获得的一株可以代谢多种抑制物(糠醛、5-羟甲基糠醛、乙酸等)的霉菌<sup>[70]</sup>。

*P. variotii* FN89 可保存在 Potato-Dextrose-Agar (PDA) 培养基。制备方法如下: 称取 200 g 土豆并去皮, 切碎成直径约为 5 mm 的不规则块状, 放入 1 L 的去离子水中煮沸 30 min。用细纱布过滤煮沸后的混合物, 在过滤后得到的上清液中加入 22 g 一水葡萄糖和 15 g 琼脂, 用去离子水将溶液定容至 1 L。

固态脱毒的种子培养方法为取一支保存在-80℃冰箱的 *P. variotii* FN89 菌种冻存管, 用 1mL 的无菌水溶解干菌体, 倒入新鲜的 PDA 平板, 在 37℃静置培养 4 天后, 用平板划线转接至新鲜 PDA 平板培养 4 天后, 将此平板上 *P. variotii* FN89 的孢子与 500 g 新鲜预处理物料均匀混合, 在 37℃下培养, 待孢子长满物料表面后均匀混合。在培养期间混合至二次长满物料表面后作为固态脱毒的种子。

### (2) 手性乳酸发酵菌株

本章所使用的发酵菌株为 *Pediococcus acidilactici* ZY271 (CGMCC 13611), 由 *Pediococcus acidilactici* TY112 (CGMCC 8664) 经代谢工程改造得到, 可以实现木质纤维素生物质中戊糖和己糖的全糖代谢生产手性 L-乳酸<sup>[16]</sup>。

*P. acidilactici* ZY271 种子培养基为 Man-Rogosa-Sharp (MRS) 培养基: 22 g/L 一水合葡萄糖、10 g/L 蛋白胨、10 g/L 酵母提取物、5 g/L 无水乙酸钠、2 g/L 柠檬酸氢二铵、2.6 g/L 三水合磷酸氢二钾、0.58 g/L 七水合硫酸镁、0.25 g/L 一水合硫酸锰。固体培养基的制备为在 1 L 的液体培养基中加入 15-20 g 的琼脂。

发酵菌株的种子液培养方法如下: 从-80℃超低温冰箱中取出一支保藏的 *P. acidilactici* ZY271 冻存管, 将解冻的菌液接种至含有 20 mL MRS 培养基的锥形瓶中置于 42℃、150 rpm 的条件下活化 6 小时。活化完成后, 以 10%(v/v)的接种量将活化后的菌液转移至含有 100 mL MRS 培养基的锥形瓶中, 随后向培养基中加入 1.2 g 的碳酸钙以维持体系的 pH 值在 5.5 左右, 此外, 为了防止菌液粘稠和絮凝, 还需加入 1%(v/v)的糖化酶<sup>[17]</sup>。在相同条件下培养 6 小时后得到的种子液用于后续 L-乳酸发酵。

## 2.2.3 植物蛋白的酶水解

对于不同植物蛋白的酶水解实验如下, 将 5 g 植物蛋白分别与 20 g 去离子水于 250 mL 锥形三角瓶中混合, 用 5 mol/L 的氢氧化钠调整体系 pH 至碱性蛋白酶的最适 pH 值 10, 然后加入 0.25 g 碱性蛋白酶粉末, 待固体碱性蛋白酶充分溶解后放置于恒温水浴摇床中, 在 60℃、150 rpm 的条件下进行水解 24 h。水解结束后在灭菌锅中以 105℃、10min 条件下对蛋白酶进行处理, 静置至常温后放置于 4℃冷藏冰箱储存。用 EP 管取样后于

12,000 rpm 下离心 5 min, 取上清液, 用 10 g/L 的氢氧化钠稀释 10 倍后检测谷氨酸含量。发酵时植物蛋白的添加量为 20 g/L, 按照 1:4 (w/w) 的固液比, 需加入 100 g 的植物蛋白水解液。

对于不同固含量的豆粕酶水解实验如下, 将 5 g 豆粕分别与 20 g、30 g、40 g、50 g 和 60 g 去离子水混合 (固液比分别为 1:4、1:6、1:8、1:10 和 1:12, 单位为 w/w), 用 5 mol/L 氢氧化钠将体系 pH 调至 10, 然后加入 0.25 g 碱性蛋白酶粉末, 待充分溶解后于恒温水浴摇床中在 60°C、150 rpm 的条件下水解 24 h。灭酶处理后, 取样、离心、稀释后检测谷氨酸含量。豆粕水解液于 4°C 冰箱冷藏, 发酵时豆粕的添加量为 20 g/L, 根据不同的固液比加入对应用量的水解液。不同固含量的棉籽粕水解液制备同上。

对于不同水解时间的豆粕酶水解实验, 将 5 g 豆粕与 50 g 去离子水混合 (固液比 1:10, 单位为 w/w), 用 5 mol/L 氢氧化钠调节体系的 pH 至 10, 加入 0.25 g 碱性蛋白酶, 充分溶解后置于 60°C、150 rpm 的水浴摇床中分别水解 6 h、12 h、24 h、36 h、48 h。水解结束后于 105°C 下灭酶处理 10 min, 取样、离心、稀释后检测谷氨酸含量。豆粕水解液于 4°C 冰箱冷藏。不同水解时间的棉籽粕水解液制备同上。

#### 2.2.4 小麦秸秆的干酸预处理和固态脱毒

根据 Zhang 等人<sup>[62]</sup>的方法对小麦秸秆物料进行干酸预处理, 将物料与稀酸溶液以 2:1 (w/w) 固液比分别加入到 20 L 的预处理反应器中, 其中浓硫酸的添加量为每 1 kg 干基小麦秸秆加入 38 g 浓硫酸。通入高温蒸汽, 待温度上升到 175°C, 压强为 1.0 MPa 后反应 5 min, 搅拌转速为 50 rpm。预处理后的物料颜色为黑色, 含水量在 50% (w/w) 左右, pH 2.0 左右。预处理后的小麦秸秆用碳酸钙调至纤维素酶的最适 pH 5.5 左右, 混匀后通过盘式粉碎机将物料研磨成大小均匀的颗粒, 放置于 4°C 冰箱冷藏。

固态脱毒的具体方法为将含有 *P. variotii* FN89 孢子的 500 g 小麦秸秆物料作为种子与 2000 g 未脱毒物料均匀混合后放入 37°C 培养箱中维持 48 h 左右, 为使小麦秸秆物料保持湿润每隔 12 h 喷洒一次去离子水。在脱毒过程中每 6 h 取样检测主要抑制物糠醛、HMF、乙酸的浓度。当糠醛和 HMF 的浓度为零, 乙酸浓度在 2 g/L 以下时, 表明脱毒结束。

#### 2.2.5 小麦秸秆的糖化与 L-乳酸摇瓶发酵

糖化和发酵在 250 mL 锥形瓶中进行。按照 25% (w/w) 固含量的体系分别加入已经固态脱毒的小麦秸秆物料、灭菌水、植物蛋白水解液和碳酸钙。其中植物蛋白的初始添加量为 20 g/L, 即在 50 mL 体系下添加量为 1 g, 例如在 1:4 (w/w) 固液比条件下水解的水解液的添加量为 5 g, 灭菌水的添加量需要减去水解液的用量以保证体系的固含量不变。碳酸钙的用量为体系中可发酵性糖含量的 60%, 用来调控后续发酵过程的 pH。加入纤维素酶以进行糖化, 酶用量为 4 mg protein/g dry material, 在恒温水浴摇床中以 50°C、150 rpm 条件下预糖化 12 h。预糖化结束后, 以 10% (v/v) 接种量接入 *P. acidilactici* ZY271,

加入 2 g/L 柠檬酸氢二铵为无机氮源和 0.25 g/L 一水合硫酸锰为营养盐。在恒温气浴摇床中发酵 72 h，发酵参数为 42°C、150 rpm。每隔 24 h 取样检测葡萄糖、木糖、乳酸以及细胞活力。其中细胞活力的检测方法为将样品稀释后在 MRS 固体培养基上涂布，在 42°C 培养箱中静置两天后通过平板菌落计算 CFU (Colony-Forming-Units, 菌落形成单位)。

### 2.2.6 分析方法

谷氨酸通过 SBA-90D 生物传感分析仪 (Biology Institute, Shandong Academy of Sciences, Shandong, China) 进行检测，用 10 g/L 氢氧化钠作为稀释溶剂。试剂级酵母提取物与蛋白胨的谷氨酸含量测定按照 1:4 (w/w) 固液比在 30°C、150 rpm 下浸提 30 min，离心后取上清检测<sup>[97]</sup>。

粗蛋白含量和上清的游离氮含量通过全自动凯氏定氮仪 (PeiOu Analysis Instrument, Shanghai, China) 进行测定。对于粗蛋白含量的测定，需将粉末状样品烘干至恒重后称取 1 g 左右加入消化管；对于上清液中游离氮含量的测定，直接取 1 mL 左右的上清液加入消化管，催化剂为 0.85 g 的七水硫酸铜与 4.5 g 的硫酸钾，10 mL 的浓硫酸为消化提供酸性环境。将消化管置于红外石英消化炉中，通过加热进行消化。在此过程中，蛋白质中的铵根被硝化成无机态的硫酸铵。这一步骤是测定蛋白质中氮含量的关键，因为它将有机态的氮转化为易于测定的无机态形式。当消化管中的液体呈澄清状则表明消化完成。待消化管冷却至室温后，用凯氏定氮仪测量样品的粗蛋白含量以及上清的游离氮含量。凯氏定氮的反应原理为消化管中的铵根离子与强碱氢氧化钠在高温蒸汽下反应，生成的氨气由管路收集后与硼酸溶液反应，生成的偏硼酸铵经盐酸滴定生成氯化铵，根据盐酸的滴定量计算粗蛋白和氮含量。

葡萄糖、木糖、乙酸、糠醛、HMF、乳酸等组分是通过高效液相色谱仪进行测定，其型号为 LC-20AD (Shimadzu, Kyoto, Japan) 色谱柱型号为 Aminex HPX-87H, 300 mm × 7.8 mm (Bio-Rad, Hercules, USA)，示差折光检测器型号为 RID-10A (Shimadzu, Kyoto, Japan)，柱温为 65°C，以 0.5 mM 的硫酸作为流动相，流速为 0.6 mL/min。

D-乳酸通过高效液相色谱仪进行测定，其型号为 SPD-20A (Shimadzu, Kyoto, Japan)，色谱柱型号为 MCI GEL CRS10W, 4.6 mm × 50 mm (Mitsubishi, Japan)，UV 检测器的检测波长为 254 nm，柱温为 25°C，以 2 mM 的硫酸铜作为流动相，流速为 0.5 mL/min。

### 2.2.7 植物蛋白水解得率的计算

以 pH-stat 法<sup>[118]</sup>计算植物蛋白的水解得率 DH (Degree of hydrolysis)，公式如下：

$$\text{水解得率 (\%)} = \frac{V_{\text{NaOH}} \times N_{\text{NaOH}}}{\alpha \times M_p \times h_{\text{tot}}} \times 100\% \quad (2-1)$$

式 (2-1) 中  $V_{\text{NaOH}}$  表示氢氧化钠的用量 (mL),  $N_{\text{NaOH}}$  表示氢氧化钠的摩尔浓度 (mol/L),  $\alpha$  表示 pH-stat 的校正因子 ( $\alpha=0.4626$ ),  $M_p$  表示植物蛋白的质量 (g DM),  $h_{\text{tot}}$  表示植物蛋白中肽键的总数 (mmol/g protein)。

谷氨酸得率 (Yield of glutamic acid) 以植物蛋白水解后游离的谷氨酸含量与植物蛋白原有的谷氨酸含量的比值计算, 公式如下:

$$\text{谷氨酸得率 (\%)} = \frac{C_{\text{GA}}}{V \times M_p \times M_{\text{GA}} \times 1000} \times 100\% \quad (2-2)$$

式 (2-2) 中  $C_{\text{GA}}$  表示水解液中的谷氨酸浓度 (g/L),  $V$  表示水解的体系 (mL),  $M_p$  表示植物蛋白的质量 (g DM),  $M_{\text{GA}}$  表示植物蛋白中谷氨酸质量 (mg/g DM)。

### 2.2.8 L-乳酸手性纯度的计算

L-乳酸的手性纯度定义为 L-乳酸的浓度与总乳酸浓度的比值, 具体的计算公式为:

$$\text{L-乳酸手性纯度 (\%)} = \frac{C_{\text{LA}} - C_{\text{D-LA}}}{C_{\text{LA}}} \times 100\% \quad (2-3)$$

式 (2-3) 中  $C_{\text{LA}}$  表示发酵终点的乳酸浓度 (g/L);  $C_{\text{D-LA}}$  表示发酵终点的 D-乳酸浓度 (g/L)。

## 2.3 结果与讨论

### 2.3.1 廉价植物蛋白作为有机氮源的筛选和表征

氮源是实现乳酸经济生产的主要限制因素之一, 寻找替代氮源可以有效降低其成本<sup>[119]</sup>。因此我们对常见的复合氮源、廉价氮源中的粗蛋白含量和乳酸含量进行了表征 (表 2.1)。酵母提取物和蛋白胨作为乳酸生产的最佳复合氮源, 具有最高的粗蛋白含量, 但其价格昂贵。玉米浆是生产玉米淀粉的副产品, 价格低廉且含有丰富的蛋白质等营养物质, 是较为理想的替代氮源, 但其含有 20% 以上的混合手性乳酸, 其中 D-乳酸的含量占 50% 以上, 以其作为乳酸发酵的氮源, 会严重降低 L-乳酸产品的手性纯度。豆粕、棉籽粕、花生粕、菜籽粕、芝麻粕、玉米胚芽粕、棕榈粕和葵花籽粕等植物蛋白价格低廉、不含或含有极低量的 L-或者 D-乳酸, 其中玉米胚芽粕中混合乳酸的含量最高仅为 2% 左右。上述植物蛋白的粗蛋白含量在 10%-50% 之间, 其中葵花籽粕的粗蛋白含量最低为 11%, 而豆粕和棉籽粕的粗蛋白含量是其 4 倍左右。

为了探究了上述植物蛋白作为廉价有机氮源进行乳酸发酵的可行性, 在 1:4 (w/w) 固液比下进行酶水解, 并将水解液作为氮源在摇瓶条件下进行了纤维素 L-乳酸的发酵。由于本研究所用的发酵菌株 *P. acidilactici* ZY271 在发酵前期生长和代谢速率较快, 因此选择发酵 24 h 的 CFU 来表征菌株的生长情况。结果如图 2.2 显示, 植物蛋白水解液中的游离谷氨酸含量与乳酸菌的细胞活力和最终的乳酸产量变化趋势一致, 试剂级酵母提取物和蛋白胨中游离谷氨酸含量最高为 9.30 g/L, 以其为氮源发酵 72 h 的乳酸产量也最高

为 99.49 g/L，发酵 24 h 对应的细胞活力为  $3.31 \times 10^9$  CFU/ mL。不同种类植物蛋白的酶水解液作为替代氮源发酵，菌株细胞活力和乳酸产量均难以达到对照组的生产水平，其中豆粕和棉籽粕水解液的替代效果最好，发酵 24 h 的细胞活力分别为  $0.59 \times 10^9$  CFU/ mL 和  $0.42 \times 10^9$  CFU/ mL；发酵 72 h 的乳酸产量分别为 44.06 g/L 和 35.07 g/L，水解后相应的游离谷氨酸含量分别为 1.25 g/L 和 0.85 g/L。其它植物蛋白作为替代氮源的乳酸产量均在 30 g/L 以下。以上述八种植物蛋白为替代氮源生产的手性乳酸纯度主要取决于氮源本身所含的 D-乳酸浓度以及乳酸产品的浓度，其中玉米胚芽粕的 D-乳酸含量最高，发酵的乳酸产量较低，导致最终的手性纯度仅有 96.31%，其它植物蛋白得到的乳酸产品手性纯度均在 99% 以上。上述实验结果与表 2.1 中的粗蛋白含量和 D-乳酸含量的趋势一致。八种植物蛋白中，豆粕和棉籽粕的粗蛋白含量最高，相对含有更多的氨基酸组分，在相同水解条件下产生的游离氨基酸含量更高，发酵时菌株可以直接利用更多的氮源物质进行生长和代谢，从而获得更高的乳酸产量。因此后续以豆粕和棉籽粕作为手性乳酸发酵的替代氮源进行深入研究。

表 2.1 常用有机氮源及植物蛋白的表征

Table 2.1 Characterizations of organic nitrogen sources and plant proteins

| 有机氮源                     | 等级  | 粗蛋白含量<br>(% DM) | L-乳酸含量<br>(mg/g DM) | D-乳酸含量<br>(mg/g DM) | 来源                   |
|--------------------------|-----|-----------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| (i) 复合氮源 <sup>[97]</sup> |     |                 |                     |                     |                      |
| 酵母提取物                    | 试剂级 | 65.8 ± 0.1      | 1.8 ± 0.1           | 1.5 ± 0.2           | 英国, 贝辛斯托克, 牛津国际有限公司  |
| 蛋白胨                      | 试剂级 | 76.0 ± 1.4      | 1.1 ± 0.1           | 0.9 ± 0.2           | 英国, 贝辛斯托克, 牛津国际有限公司  |
| 酵母提取物                    | 工业级 | 76.9 ± 0.9      | 0.9 ± 0.1           | 1.2 ± 0.1           | 中国, 湖北宜昌, 安琪酵母股份有限公司 |
| (ii) 含有大量消旋乳酸的替代氮源       |     |                 |                     |                     |                      |
| 玉米浆                      | 工业级 | 43.1 ± 0.5      | 85.6 ± 1.6          | 130.2 ± 1.8         | 中国, 湖北宜昌, 安琪酵母股份有限公司 |
| (iii) 含有低量消旋乳酸的植物蛋白替代氮源  |     |                 |                     |                     |                      |
| 豆粕                       | 饲料级 | 46.3 ± 0.7      | 1.7 ± 0.1           | 0.7 ± 0.1           | 中国, 江苏连云港, 中粮集团有限公司  |
| 棉籽粕                      | 饲料级 | 45.0 ± 0.9      | 1.5 ± 0.1           | 0.5 ± 0.1           | 中国, 江苏海安, 家惠生物科技有限公司 |
| 花生粕                      | 饲料级 | 40.4 ± 0.8      | 0.5 ± 0.1           | 1.2 ± 0.1           | 中国, 山东潍坊, 华懋饲料有限公司   |
| 菜籽粕                      | 饲料级 | 31.5 ± 0.6      | 0.2 ± 0.1           | \                   | 中国, 山东潍坊, 华懋饲料有限公司   |
| 芝麻粕                      | 饲料级 | 37.7 ± 0.4      | 0.2 ± 0.1           | \                   | 中国, 山东潍坊, 华懋饲料有限公司   |
| 玉米胚芽粕                    | 饲料级 | 16.1 ± 0.8      | 7.9 ± 0.2           | 10.7 ± 0.4          | 中国, 山东潍坊, 华懋饲料有限公司   |
| 棕榈粕                      | 饲料级 | 21.4 ± 0.3      | 0.2 ± 0.1           | \                   | 中国, 山东潍坊, 华懋饲料有限公司   |
| 葵花籽粕                     | 饲料级 | 11.8 ± 0.4      | 6.1 ± 0.3           | 1.6 ± 0.2           | 中国, 山东潍坊, 华懋饲料有限公司   |

“\” 表示 D-乳酸的含量低于 0.05 mg/g DM。

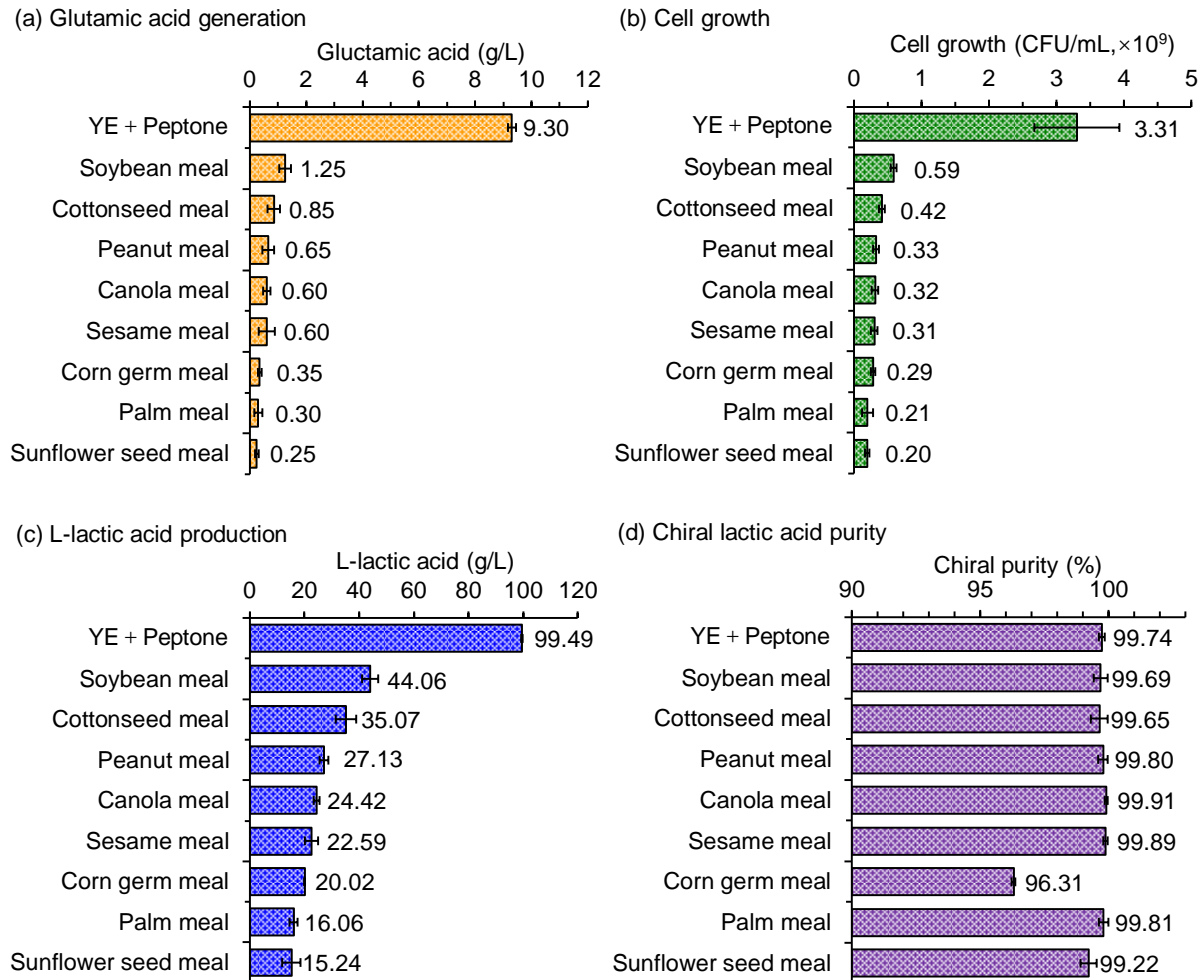


图 2.1 植物蛋白作为替代氮源发酵纤维素乳酸的潜力评价

Fig. 2.1 Potential evaluation of plant proteins as alternative nitrogen sources for lactic acid fermentation

(a)、(b)、(c)、(d)分别表示植物蛋白水解后的游离谷氨酸浓度、作为氮源发酵 24 h 的细胞活力、发酵 72 h 的乳酸产量以及乳酸产品的手性纯度。对照组为 15 g/L 试剂级的酵母提取物和 10 g/L 试剂级的蛋白胨。250 mL 摇瓶中进行 SSCF，使用固态脱毒的预处理物料，25% (w/w) 固含量，10% (v/v) 接种量，发酵条件 42°C、150 rpm，发酵时间 72 h。

### 2.3.2 植物蛋白的水解条件优化

豆粕、棉籽粕等农业残渣中的蛋白质含量较高，然而生产乳酸的细菌通常缺乏足够的酶系统来充分利用其中的组分<sup>[98]</sup>。因此需要将植物蛋白中的蛋白质组分通过催化剂水解成小分子肽和游离氨基酸来提高乳酸的产率<sup>[106]</sup>。过去蛋白水解通常使用酸或碱为催化剂，造成环境污染的同时会破坏掉重要的营养物质<sup>[120]</sup>。以生物制品酶为催化剂，环境友好且水解条件温和、易于控制。在酶水解过程中，蛋白酶用量、底物浓度以及水解时间通常是决定水解效率的重要因素。

根据本实验室之前的研究结果<sup>[97]</sup>, 5% (g 酶/g DM) 的蔚蓝碱性蛋白酶是水解植物蛋白的最适酶用量。本节对植物蛋白水解的固液比和水解时间进行了探究。pH-stat 法作为常见的蛋白质水解得率的测定方法, 其原理是根据水解过程中释放的氢离子来计算水解得率<sup>[118]</sup>。如图 2.2 所示, 豆粕和棉籽粕中第一大氨基酸均为谷氨酸, 分别占到豆粕和棉籽粕总氨基酸含量干重的 18%和 22%, 因此谷氨酸的得率亦可作为水解程度的重要指标。因此本章使用基于氢离子浓度和基于游离谷氨酸浓度两种方法来对植物蛋白的酶水解得率进行表征。

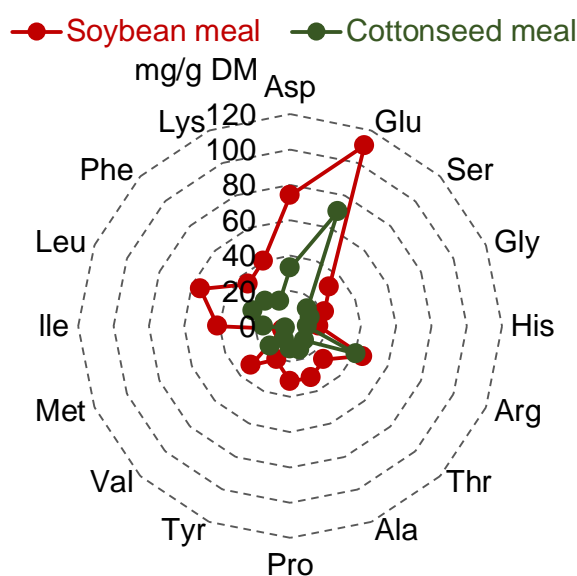


图 2.2 植物蛋白中氨基酸含量分布图

Fig. 2.2 Distribution of amino acid content in plant proteins

豆粕和棉籽粕在不同固液比下进行酶水解的水解得率, 以及作为氮源发酵 24 h 的细胞活力、发酵 72 h 的乳酸产量如图 2.3 (a)、(b)所示。对照组的氮源为试剂级酵母提取物和蛋白胨, 发酵 24 h 的细胞活力为  $3.31 \times 10^9$  CFU/ mL, 发酵 72 h 的乳酸产量最高为 99.49 g/L。对于豆粕, 随着水解固含量的降低, 水解得率显著升高, 当固液比降低到 1:12 (w/w)时, 水解得率是 1:4 (w/w)固液比的 3 倍以上。上述结果表明在较低的底物浓度下, 5% (g 酶/g DM) 的蔚蓝碱性蛋白酶对底物的催化效率较高。当固液比从 1:10 (w/w)降低到 1:12 (w/w), 水解得率仅提高了 1.69%。以不同固含量水解的豆粕为氮源进行乳酸发酵, 发酵 24 h 的细胞活力随着豆粕水解固液比的降低呈上升趋势, 在固液比 1:10 (w/w)下菌株细胞活力最高为  $0.95 \times 10^9$  CFU/ mL, 发酵 72 h 乳酸产量的变化趋势和细胞活力一致, 产量达到了 58.81 g/L。不同固含量下棉籽粕的水解得率、细胞活力以及乳酸产量的变化趋势和豆粕一致。在 1:10 (w/w)的固液比下达到了最大的菌株细胞活力和最高的乳酸产量, 分别为  $0.72 \times 10^9$  CFU/ mL 和 49.92 g/L。两种植物蛋白在 1:10 (w/w)的固液比

下的水解得率虽然基本一致，但是以豆粕为氮源发酵的细胞活力和乳酸产量均高于棉籽粕，这是因为棉籽粕本身的总氨基酸含量相比豆粕存在约一倍的差距，从而在发酵时棉籽粕提供给发酵菌株的氮源物质低于豆粕。相比之下两种植物蛋白在最佳固液比水解后的细胞活力和乳酸产量均与对照组存在较大差距，接下来将进一步对酶水解的时间进行优化，从而提高乳酸发酵的产量。

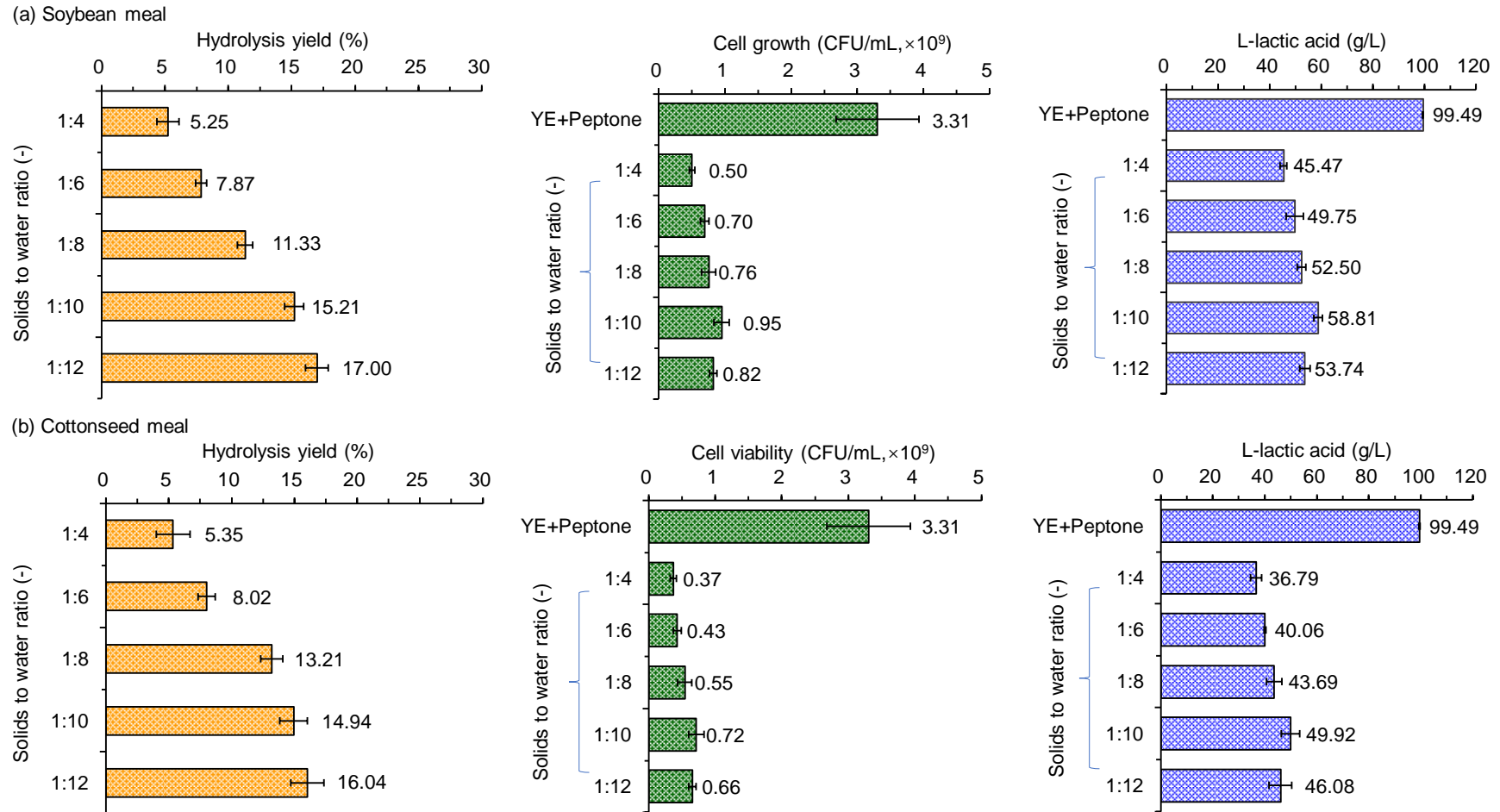


图 2.3 不同酶水解固液比的植物蛋白作为氮源进行摇瓶纤维素 L-乳酸发酵

Fig. 2.3 Enzymatically hydrolyzed plant proteins with different solids to water ratio (-) as organic nitrogen sources for lactic acid fermentation in flasks

(a)、(b)分别表示豆粕和棉籽粕在不同固液比下的水解得率、以其作为氮源发酵 24 h 的细胞活力、发酵 72 h 的乳酸产量。在这里水解得率被定义为水解后植物蛋白的谷氨酸得率。对照组添加 15 g/L 试剂级的酵母提取物和 10 g/L 试剂级的蛋白胨。250 mL 摇瓶 SSCF，使用固态脱毒的预处理物料，25% (w/w) 固含量，10% (v/v) 接种量，发酵条件为 42°C 和 150 rpm，发酵时间为 72 h。

水解时间也会影响酶与底物结合效率。因此在酶水解的固含量研究基础上探究了不同酶水解时间下两种植物蛋白的水解效率。使用滴定消耗的氢氧化钠用量和水解液中游离的谷氨酸含量对水解效率进行表征,同时测定了植物蛋白不同水解时间的上清液中氮含量。结果如图 2.4 (a)、(b)所示,对于豆粕,基于两种方法的水解得率均随着水解时间的延长呈抛物线变化,在 24 h 后基本稳定,分别为 38.57%和 20.46%,水解时间从 24 h 增加到 48 h,水解得率仅分别增加了 4.79%和 1.05%。不同酶解时间的豆粕水解液中的氮含量的变化也呈同一趋势,在水解 12 h 后游离氮含量基本稳定。在棉籽粕的水解过程中,随着水解时间的延长,基于碱滴定的水解得率始终呈上升趋势,水解时间为 48 h 时,水解得率达到了 59.07%;而基于水解液中游离谷氨酸含量的水解得率在 24 h 时为 15.73%,水解 48 h 时为 18.09%,仅增加了 2.36%;棉籽粕水解液中上清氮含量在水解 12 h 后也基本稳定。基于碱滴定的水解得率持续升高可以用棉籽粕中存在的某些代谢产物来解释,这些代谢产物包括棉酚、环丙烯脂肪酸、单宁和植酸<sup>[121]</sup>。其中棉酚是一种多酚羟基双萘酚类化合物,最高可以占到棉籽粕干重的 2%。由于棉酚中含有醛基和羧基,并且羧基的化学性质活泼且酸性较强可以和碱性物质反应生成棉酚盐<sup>[122]</sup>。然而基于碱滴定得到的水解得率就是利用氢氧化钠来改变水解体系的 pH,从而与实际水解得率存在误差,植物蛋白水解液中的游离氮含量随水解时间的变化也可以来证明这种误差的存在。相比之下,基于水解液中游离谷氨酸含量得到的水解得率则可以较为真实的反应水解效率。

经过不同水解时间处理后的豆粕和棉籽粕作为氮源在摇瓶条件下发酵乳酸,发酵 24 h 的细胞生长和发酵 72 h 的乳酸产量如图 2.4 (a)、(b)所示。随着水解时间的延长,以豆粕作为氮源进行发酵的菌株细胞活力呈先上升后下降趋势,水解 24 h 的豆粕作为氮源下菌株的细胞活力最高为  $1.26 \times 10^9$  CFU/ mL。发酵 72 h 的乳酸产量的变化趋势基本和菌株的细胞活力变化趋势同步,乳酸产量在豆粕水解 36 h 达到最高为 68.11 g/L。棉籽粕的变化趋势和豆粕相似,其水解 36 h 作为氮源发酵的菌株细胞活力和乳酸产量达到最大值分别为  $0.83 \times 10^9$  CFU/ mL 和 56.13 g/L。在经过最佳的水解时间 36 h 处理后,豆粕作为氮源发酵的乳酸产量比棉籽粕高 11.98 g/L。

通过对酶水解关键参数的优化,分别以豆粕和棉籽粕作为替代氮源发酵的乳酸产量相较于初始表征提高了 54.62%和 60.05%。在最佳固液比和水解时间下,豆粕相较于棉籽粕表现出更为出色的替代氮源潜能。研究发现基于碱滴定得到的水解得率并不适用于像棉籽粕这种本身存在酸性物质的植物蛋白的表征,而基于水解液中游离谷氨酸含量的水解得率则可以弥补这一缺陷,较为客观反应棉籽粕的水解效率。

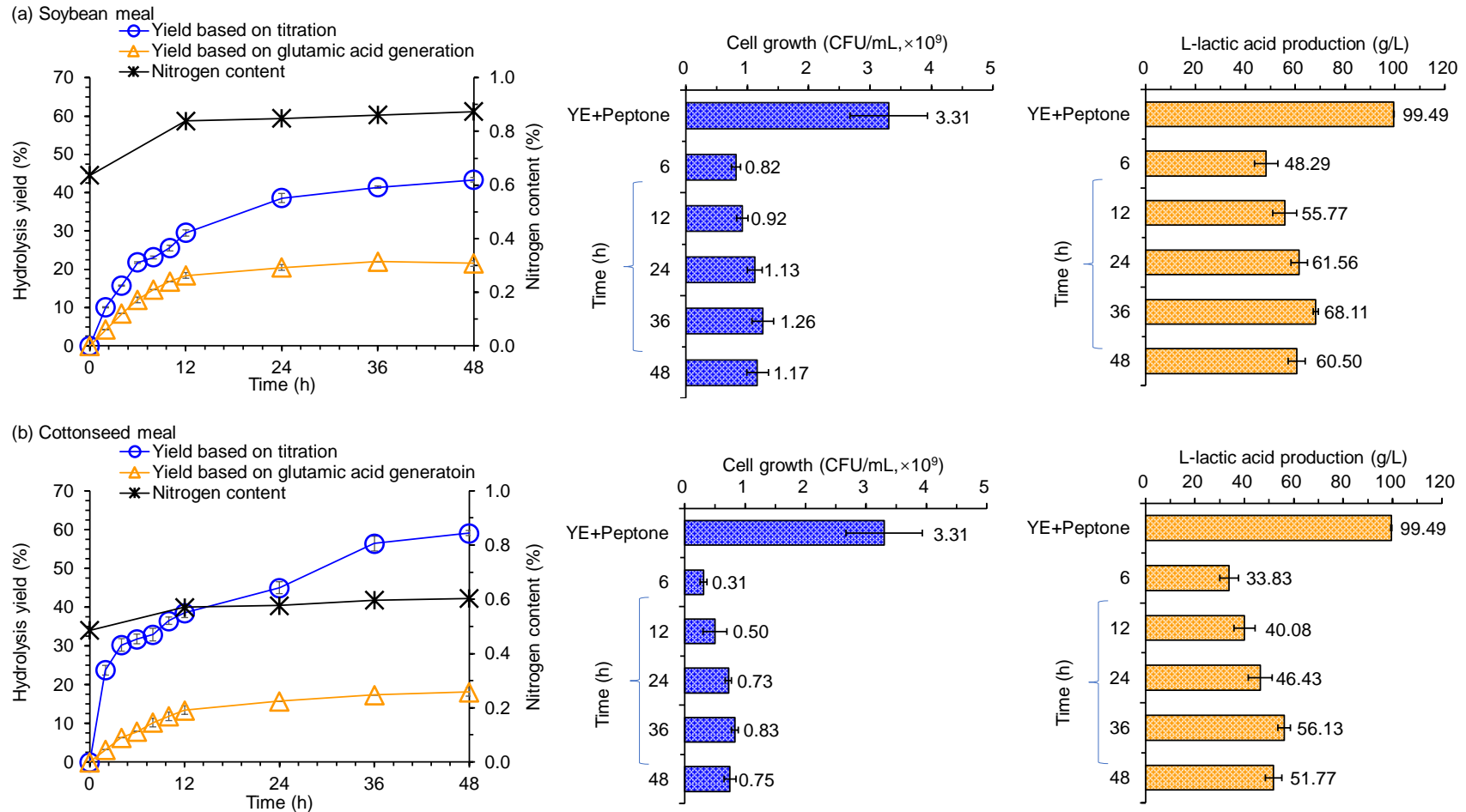


图 2.4 不同酶水解时间的植物蛋白作为氮源进行摇瓶纤维素 L-乳酸发酵

Fig. 2.4 Plant proteins with different enzymatic hydrolysis times as organic nitrogen sources for lactic acid fermentation in flasks

(a)、(b)分别表示豆粕和棉籽粕在不同水解时间下的水解得率，上清氮含量、以其作为氮源发酵24 h的细胞活力、发酵72 h的乳酸产量。在这里水解得率由两种方法定义，分别为基于水解后植物蛋白的谷氨酸含量和基于氢氧化钠滴定的用量。在250 mL摇瓶中进行SSCF，使用固态脱毒的预处理物料，25% (w/w) 固含量，10% (v/v) 接种量，发酵条件为42°C和150 rpm，发酵时间为72 h。

### 2.3.3 植物蛋白对复合氮源替代程度的探究

酵母提取物和蛋白胨作为昂贵复合氮源进行发酵获得了较佳的乳酸产量。植物蛋白虽然价格低廉,但以植物蛋白水解液为氮源进行乳酸发酵存在乳酸菌株的细胞活力下降以及乳酸产量降低的问题(图 2.3 和图 2.4)。为了尽可能提高乳酸发酵的产量,对植物蛋白的用量进行了探究。在摇瓶中以不同浓度的植物蛋白作为有机氮源进行乳酸的发酵,结果如图 2.5 (a)、(b) 所示。以豆粕水解液作为替代氮源,随着其用量的增加,菌株在发酵 24 h 的细胞活力显著提高,当豆粕用量为 25 g/L 时细胞生长状况最佳,此时 CFU 达到  $1.83 \times 10^9$  CFU/mL,豆粕的用量从 25 g/L 增加到 30 g/L,细胞活力基本不变。发酵 72 h 的乳酸产量和菌株的细胞活力变化情况相偶联,在豆粕用量为 25 g/L 时乳酸产量最高为 78.14 g/L,然后趋于稳定。对于棉籽粕,发酵 24 h 菌株的细胞活力和发酵 72 h 的乳酸产量的随着棉籽粕用量的增加的变化趋势和豆粕相似,在用量为 25 g/L 时发酵效果最佳,分别为  $1.27 \times 10^9$  CFU/mL 和 63.32 g/L,棉籽粕用量增加到 30 g/L 时的细胞活力和乳酸产量不再变化。在植物蛋白最佳用量下,豆粕做为替代氮源下菌株的细胞活力和乳酸产量分别比棉籽粕高 44.09%和 23.40%,但是与复合氮源的对照组相比,即使是替代效果较好的豆粕,发酵 72 h 的乳酸产量还存在 20.49%的差异。Zhang 等人<sup>[123]</sup>以豆粕为氮源,补料分批发酵仅得到了 61.4 g/L 纤维素 D-乳酸。因此,必须在发酵培养基中添加一些富含氨基酸、生长因子等营养物质,来提高 L-乳酸的产量以及得率<sup>[95, 124]</sup>。

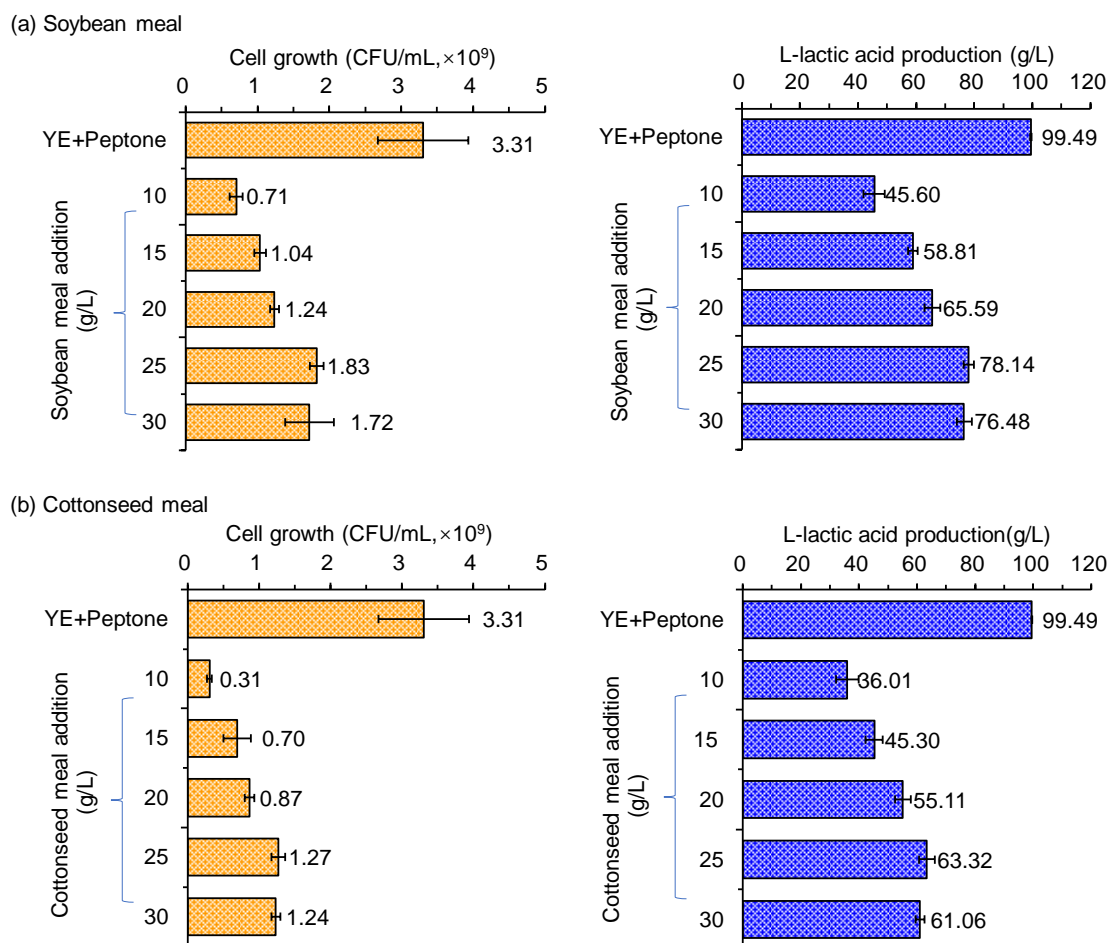


图 2.5 不同用量的植物蛋白作为氮源的摇瓶纤维素 L-乳酸发酵

Fig. 2.5 L-cellulose lactic acid fermentation using different dosage of plant protein as organic nitrogen source in flasks

(a)、(b)分别表示不同用量的豆粕和棉籽粕作为有机氮源发酵 24 h 的细胞活力以及发酵 72 h 的乳酸产量。植物蛋白酶水解条件为 1:10 (w/w)固液比, 60°C, 150 rpm, 36 h, 碱性蛋白酶的用量为植物蛋白质量的 5% (g 酶/g 植物蛋白)。在 250 mL 摇瓶中进行 SSCF, 使用固态脱毒的预处理物料, 25% (w/w)固含量, 10% (v/v)接种量, 发酵条件为 42°C和 150 rpm, 发酵时间为 72 h。

酵母提取物可以作为乳酸菌利用的优质营养来源, 其中包括氨基酸、嘌呤、嘧啶以及 B 族维生素等。酵母提取物作为提高乳酸产量和发酵速率的最佳氮源物质, 工业级酵母提取物的价格相比试剂级的酵母提取物更便宜, 因此本小节进一步尝试通过在植物蛋白水解液中添加最低量的工业级酵母提取物来弥补乳酸产量差距。文献研究表明, 即使补充少量酵母提取物也可以显著提高乳酸的产生<sup>[95, 125]</sup>。在摇瓶条件下进行乳酸发酵, 结果如图 2.6 (a)、(b)所示。对于豆粕, 添加工业级酵母提取物对乳酸发酵有促进作用, 当工业级酵母提取物的用量增加到 5.0 g/L, 发酵 24 h 菌株的细胞活力从 1.83 CFU/mL, ×10<sup>9</sup> 增加到 3.06 CFU/mL, ×10<sup>9</sup>, 提高了 67.21%; 发酵 72 h 的乳酸产量从 78.13 g/L 增加到 94.32 g/L, 提高了 20.72%, 基本达到了对照组试剂级酵母提取物和蛋白胨为氮

源的发酵水平。工业级酵母提取物的加入使发酵氮源中含有更为全面的营养物质来支持发酵菌株的生长与代谢,从而获得了较高的乳酸产量。以棉籽粕为氮源进行乳酸发酵时,酵母提取物的加入对菌株的细胞活力、乳酸产量并未有明显的提升。添加 5 g/L 的工业级酵母提取物时发酵 24 h 的细胞活力为  $1.49 \times 10^9$  CFU/ mL, 相较于不添加工业级酵母提取物仅提高了 17.32%, 发酵 72 h 的乳酸产量为 69.71 g/L, 仅增加了 10.09%, 仍然比对照组的乳酸产量低 28.76%。

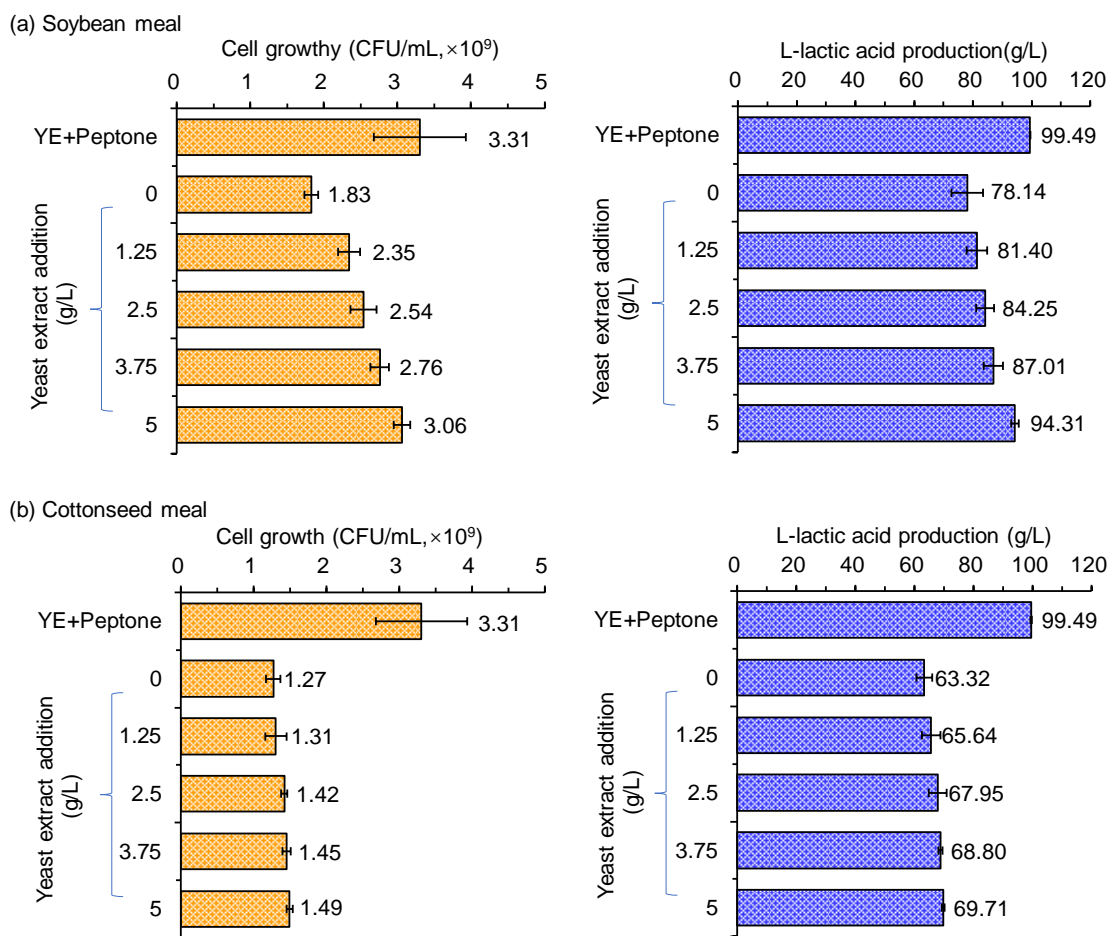


图 2.6 植物蛋白与工业级酵母提取物作为氮源的摇瓶纤维素 L-乳酸发酵

Fig. 2.6 L-cellulose lactic acid fermentation using plant protein and different usage of industrial grade yeast extract as organic nitrogen source in flasks

(a)、(b)分别表示 25 g/L 的豆粕和棉籽粕补加不同用量的工业级酵母提取物作为有机氮源发酵 24 h 的细胞活力和发酵 72 h 的乳酸产量。植物蛋白酶水解条件为 1:10 (w/w)固液比, 60°C, 150 rpm, 36 h, 碱性蛋白酶的用量为植物蛋白质质量的 5% (g 酶/g 植物蛋白); 植物蛋白的添加量为 25 g/L, CFU 测定时间为摇瓶发酵 24 h。在 250 mL 摇瓶中进行 SSCF, 使用固态脱毒的预处理物料, 25% (w/w) 固含量, 10% (v/v) 接种量, 发酵条件为 42 °C和 150 rpm, 发酵时间为 72 h。

通过对植物蛋白用量以及补加工业级酵母提取物最低用量作为乳酸发酵替代氮源的探究发现, 25 g/L 的豆粕和 5 g/L 的工业级酵母提取物作为有机氮源, 可以获得与复合氮源接近的菌株细胞活力与乳酸产量。然而 25 g/L 的棉籽粕在补加 5 g/L 酵母提取物后作为有机氮源进行乳酸发酵的效果与对照组还存在 28.76% 的差距。目前鲜有关于未脱酚棉籽粕作为廉价氮源高产纤维素乳酸的研究, 棉籽粕中的抗营养因子特别是棉酚的存在可能降低氨基酸的利用率, 而高蛋白含量的棉籽粕在用作动物饲料时一般会经过脱酚处理<sup>[122]</sup>。上述结果表明作为廉价植物蛋白的选择, 豆粕相较于棉籽粕更适合作为替代氮源。

## 2.4 本章小结

使用低含量消旋乳酸的植物蛋白作为乳酸发酵氮源是实现低生产成本、高手性纯度纤维素 L-乳酸的主要途径。本章以廉价的植物蛋白为研究对象, 对多种植物蛋白进行表征, 并评价其作为 L-乳酸发酵替代氮源的可能性; 探究了不同固液比和不同酶水解时间的植物蛋白水解效率以及作为氮源发酵时对乳酸产量的影响; 通过乳酸发酵指标确定植物蛋白的用量和工业级酵母提取物的最少添加量, 获得与对照条件十分接近的乳酸产量和手性纯度。本章的研究结论如下:

(1) 不同来源的植物蛋白中均含有较低量的 L-乳酸和 D-乳酸, 以豆粕和棉籽粕为替代氮源发酵获得了较高的乳酸产量和手性纯度, 是 L-乳酸发酵的候选氮源。

(2) 对豆粕和棉籽粕进行了酶水解条件优化, 最适固液比和最佳水解时间分别为 1:10 (w/w) 和 36 h, 以优化后的植物蛋白水解液作为氮源发酵时 L-乳酸浓度分别为 68.1 g/L 和 56.1 g/L, 手性纯度均为 99.8%。

(3) 确定豆粕和棉籽粕作为乳酸发酵氮源的用量为 25 g/L, 在此基础上通过补加工业级酵母提取物来获得最高的乳酸产量。对于豆粕, 补加 5 g/L 的酵母提取物可以实现和 15 g/L 酵母提取物和 10 g/L 蛋白胨的复合氮源接近的乳酸产量, L-乳酸手性纯度为 99.7%; 对于棉粕, 补加相同用量的酵母提取物仅产生 69.7 g/L 的 L-乳酸, 手性纯度为 99.6%。

(4) 相较于棉籽粕, 豆粕更适合作为乳酸发酵的替代氮源。

## 第3章 豆粕酶解产物作为替代氮源发酵生产纤维素 L-乳酸

### 3.1 前言

第二章通过对不同的植物蛋白进行评价和筛选,对潜在的替代氮源进行酶水解固液比、酶水解时间以及植物蛋白用量的优化,确定了豆粕为乳酸发酵的最佳替代氮源。以最适用量的豆粕水解液和工业级酵母提取物为组合氮源,利用 *P. acidilactici* ZY271 以小麦秸秆为原料进行纤维素 L-乳酸发酵,实现了与酵母提取物和蛋白胨作为复合氮源基本持平的发酵指标。

预处理后的小麦秸秆产生的抑制物通过固态生物脱毒对其脱除,但该法仅在实验室操作下可以实现,在大规模操作下不具备可行性。液态脱毒通过在位 pH 的实时监测从而具备可视化的脱毒终点以及操作的便捷性可以被应用于工业乳酸的生产。因此生物炼制的顺序转变为预处理、糖化、液态脱毒和发酵。然而,在发酵前加入豆粕水解液会使得发酵液体积增加 25%,无法实现高固含量的纤维素 L-乳酸的生产。

本章首先研究了以相对廉价的工业级酵母提取物为氮源进行纤维素 L-乳酸的生产,确定与试剂级酵母提取物和蛋白胨为氮源得到的乳酸产量一致的工业级酵母提取物用量,并以其作为对照。其次针对添加豆粕水解液对发酵固含量的稀释问题提出了两种解决方案并进行验证:(1)将豆粕水解液提前至糖化阶段加入,同时减少水的添加量以保持 SSCF 体系固含量不变;(2)将豆粕水解的固液比从 1:10 (w/w)提高至极限 1:3 (w/w),仍然在发酵阶段加入,从而对体系固含量的影响降至最低。最后探究了豆粕水解液和工业级酵母提取物的添加方式对生物炼制工艺中糖化、脱毒和发酵的影响。

### 3.2 材料与amp;方法

#### 3.2.1 原料、酶与试剂

经过干酸预处理的小麦秸秆由太原凯赛生物技术有限公司于 2023 年 8 月提供。根据 NREL 组分测定方法,测得小麦秸秆纤维素含量为 31.07%,半纤维素含量为 0.44%,游离葡萄糖含量为  $30.83 \text{ mg} \pm 0.57 \text{ mg/g}$ ,游离木糖含量为  $136.70 \text{ mg} \pm 1.98 \text{ mg/g}$ ,其中各组分均按照干重计算。

纤维素酶 Cellic CTec 3 HS 购自北京诺维信公司,根据 Brandford 方法测得酶蛋白含量为  $90.1 \text{ mg/mL}$ 。糖化酶 GA-LNEW 购自无锡杰能科公司,酶活为  $103900 \text{ WU/mL}$ 。碱性蛋白酶购自潍坊康地恩生物科技有限公司,酶活为  $200,000 \text{ U/g}$ 。

试剂级酵母提取物和蛋白胨购自贝辛斯托克牛津有限公司,工业级酵母提取物购自宜昌安琪酵母有限公司。豆粕购自连云港中粮集团有限公司。其他试剂如一水合葡萄糖、柠檬酸氢铵、硫酸铵、一水合硫酸锰等均购自上海国药化学试剂有限公司。

### 3.2.2 菌株、培养基和培养条件

#### (1) 生物脱毒菌株

本章所用生物脱毒菌株为 *P. variotii* FN89, 该菌株是从预处理后的玉米秸秆上筛选得到的并可以代谢多种抑制物(糠醛、5-羟甲基糠醛、乙酸等)的霉菌<sup>[70]</sup>。

*P. variotii* FN89 在 PDA 培养基中保存, PDA 培养基制备方法见 2.2.2。其液态脱毒种子培养基为 Synthetic-Medium (SM) 培养基, 包括: 20 g/L 葡萄糖、2.6 g/L 三水合磷酸氢二钾、0.5 g/L 氯化钙、1 g/L 硫酸铵、1 g/L 酵母提取物、1 g/L 七水硫酸镁。

液态脱毒种子液的培养方法为将脱毒菌株 *P. variotii* FN89 在 PDA 平板上划线, 于 37°C 培养箱静置 3 天后, 用 10 mL 新鲜的 SM 培养基将孢子刮至 100 mL 的 SM 培养基中, 于恒温气浴摇床中在 37°C、300 rpm 条件下培养 24 h, 得到的孢子液用于液态脱毒。

#### (2) 手性乳酸发酵菌株

本章所用发酵菌株为 *P. acidilactici* ZY271, 其来源、培养基及培养条件同 2.2.2。

### 3.2.3 豆粕的酶水解

根据 2.3.2 和 2.3.3 的结果, 发酵时豆粕的最佳用量为 25 g/L, 即按照 1:10 (w/w) 的固液比水解后, 1L 的发酵体系中需加入 275 g 的豆粕水解液。其制备方法为分别将 25 g 豆粕与 250 g 去离子水加入 1 L 的锥形瓶中, 用 5 mol/L 的氢氧化钠将体系 pH 调至 10, 添加 1.25 g 的碱性蛋白酶, 酶用量为豆粕质量的 5% (g 酶/g 豆粕)。在 60°C、150 rpm 的恒温水浴摇床中水解 36 h。水解结束后于 105°C 下灭酶 10 min, 静置到室温后放入 4°C 冰箱冷藏。

对于 1:3 (w/w) 固液比豆粕的酶水解, 考虑到高固含量的水解液在摇瓶中传质不均, 碱性蛋白酶无法有效与豆粕结合, 因此在 5 L 的生物反应器中进行酶水解。具体的水解方法为按照 1:3 (w/w) 固液比的体系分别加入去离子水、豆粕。由于高固液比下, 豆粕难以搅拌均匀, 必须添加纤维素酶先进行液化。首先用 5 mol/L 的硫酸将体系 pH 调至 5.5, 加入纤维素酶, 酶用量为 4 mg protein/g dry material, 在 50°C、200 rpm 条件下液化 12 h, 使其成为液浆。然后用 5 mol/L 的氢氧化钠将体系 pH 调至 10, 加入碱性蛋白酶, 酶用量为豆粕质量的 5% (g 酶/g 豆粕)。将反应器的温度和转速分别设置为 60°C、200 rpm, 在此条件下水解 36 h。水解结束后于 105°C 下灭酶处理 10 min, 静置到室温后放入 4°C 冰箱冷藏。

### 3.2.4 小麦秸秆的糖化和液态脱毒

预处理的物料用碳酸钙将 pH 调至 5.5 左右, 通过盘式磨浆机将物料研磨成大小均匀的颗粒。在装有螺带式搅拌桨的 5 L 生物反应器中按照 30% (w/w) 固含量的体系加入去离子水和植物蛋白水解液, 将温度和转速分别设置为 50°C、200 rpm。待体系温度接近 50°C 时, 加入纤维素酶, 酶用量为 4 mg protein/g dry material。再将物料分批加入, 每半小时添加一次直至所有物料加入到生物反应器中后糖化 12 h。

将糖化结束后得到的液浆立即转移到装有六直叶搅拌桨的 3 L 生物反应器中，温度设定为 37°C，将脱毒菌株 *P. variotii* FN89 的孢子液以 10% (v/v) 接种量倒入后开始液态脱毒，搅拌转速为 750 rpm，通气量为 1.0 vvm。根据 Han 等人<sup>[71]</sup>的研究，相较于葡萄糖和木糖，*P. variotii* FN89 优先消耗抑制物（糠醛、HMF、乙酸等），导致 pH 升高。当达到脱毒终点时，*P. variotii* FN89 会积累大量的有机酸并导致体系的 pH 的下降，这些有机酸包括糠酸和苯甲酸，以及正十六烷酸和十八烷酸等几种长链脂肪酸。因此通过监测脱毒过程中的 pH 值的在线变化，确定液态脱毒终点。

### 3.2.5 小麦秸秆的 L-乳酸发酵

液态脱毒结束后立即关闭通气，降低搅拌转速至 300 rpm，升温至 42°C 后以 10% (v/v) 接种量将 *P. acidilactici* ZY271 的种子液，无机氮源以及营养盐加入到 3 L 生物反应器中进行同步糖化共发酵，发酵过程中通过蠕动泵流加 25% (w/w) 的氢氧化钙调节体系 pH 稳定至 5.5，发酵 72 h。每 12 h 取样，在 12,000 g 下离心 5 min 后取发酵上清用于葡萄糖、木糖、乳酸、D-乳酸的测定。发酵 24 h 取样检测菌株的细胞活力，检测方法为将样品稀释后在 MRS 固体培养基上涂布，在 42°C 培养箱中静置两天后通过平板菌落计算 CFU (Colony-Forming-Units, 菌落形成单位)。

### 3.2.6 分析方法

葡萄糖、木糖、糠醛、HMF、乙酸、乳酸和 D-乳酸等组分的测定方法见 2.2.6。

### 3.2.7 L-乳酸手性纯度的计算

L-乳酸手性纯度的计算方法见 2.2.8。

## 3.3 结果与讨论

### 3.3.1 工业级酵母提取物为有机氮源的 L-乳酸发酵

在第二章以植物蛋白作为低成本氮源生产纤维素 L-乳酸的可行性研究过程中，使用的小麦秸秆物料经过干酸预处理后，通过固态生物脱毒方式去除糠醛、HMF 以及乙酸等抑制物，然后进行同步糖化共发酵生产乳酸。这种脱毒方式在实验室规模上是可行有效的，但并不适用于大规模操作，存在以下缺陷：（1）大规模好氧固态发酵的成本高；（2）混合、曝气和散热的耗电量大；（3）操作时间长；（4）固体生物质的运输效率低下；（5）脱毒完成的物料容易受到污染；（6）无法确定生物脱毒终点。对于液态脱毒，预处理后的固态物料首先通过糖化后成为液浆，通过接种脱毒菌株在适当的曝气和搅拌条件下进行生物脱毒。此时，生物反应器的数量被缩减为单个，用于糖化和生物脱毒；同时更好的传热和传质以促进细胞的生长从而加速抑制物的降解；生物脱毒后的液浆在密闭容器和管道中运输可有效防止其污染；最重要的是，可以通过在位对 pH 的监测从而快速的确定脱毒终点，完成从生物脱毒到发酵的工艺切换。因此接下来的探究均以液态脱毒方式对预处理的物料进行生物脱毒，生物炼制的流程转变为预处理、预糖化、脱毒和

发酵，同时为了获得较高的初始可发酵性糖浓度，从而在批次发酵中获得更高的纤维素 L-乳酸的产量和手性纯度，因此将 SSCF 过程中的固含量提高至 30% (w/w)。

实验室规模下进行纤维素 L-乳酸发酵使用试剂级酵母提取物和蛋白胨为有机氮源、柠檬酸氢二铵为无机氮源，为发酵菌株提供包括氨基酸、B 族维生素、生长因子等营养物质，从而获得了最高的乳酸产量和产率，通常以其作为不同氮源研究的对照条件。然而，对于工业乳酸的生产，试剂级酵母提取物价格昂贵，以其为氮源生产乳酸的成本远高于乳酸产品本身。虽然工业级酵母提取物纯度相对略低，但价格仅为试剂级酵母提取物的十分之一，以其作为对照条件的参考性和可行性相对较高。因此，本小节探究了工业级酵母提取物的用量对 *P. acidilactici* ZY271 发酵生产纤维素 L-乳酸的影响。分别以 5 g/L、10 g/L、20 g/L 的工业级酵母提取物为有机氮源进行乳酸发酵。如图 3.1 所示，以 15 g/L 试剂级酵母提取物和 10 g/L 试剂级蛋白胨作为有机氮源的对照组，在发酵 72 h 时乳酸产量为 121.9 g/L。对于实验组，工业级酵母提取物为有机氮源的乳酸产量和发酵速率与酵母提取物用量成正比，以 5 g/L、10 g/L、20 g/L 酵母提取物为氮源发酵 72 h 的乳酸产量分别为 59.5 g/L、73.2 g/L、123.0 g/L，发酵速率分别为 0.83 g/L/h、1.02g/L/h 和 1.71 g/L/h。其中，以 5 g/L 和 10 g/L 的酵母提取物为氮源发酵时发酵液中残留大量葡萄糖和少量木糖，表明此用量的酵母提取物无法满足乳酸发酵时 *P. acidilactici* ZY271 的氮源需求，导致发酵结束时乳酸浓度仅有对照组的 48.8%和 60.0%；当酵母提取物的用量增加到 20 g/L 时，乳酸发酵结果显著提高，产乳酸和耗糖速率与对照组的结果十分接近，葡萄糖和木糖在发酵 60 h 后基本耗尽，发酵 72 h 得到了和对照组一致的乳酸产量。以上结果表明对于 *P. acidilactici* ZY271，以工业级的酵母提取物为有机氮源，20 g/L 的用量可以获得最高产量的乳酸（123.0 g/L）和最高的发酵速率（1.71 g/L/h），L-乳酸的手性纯度为 99.8%。

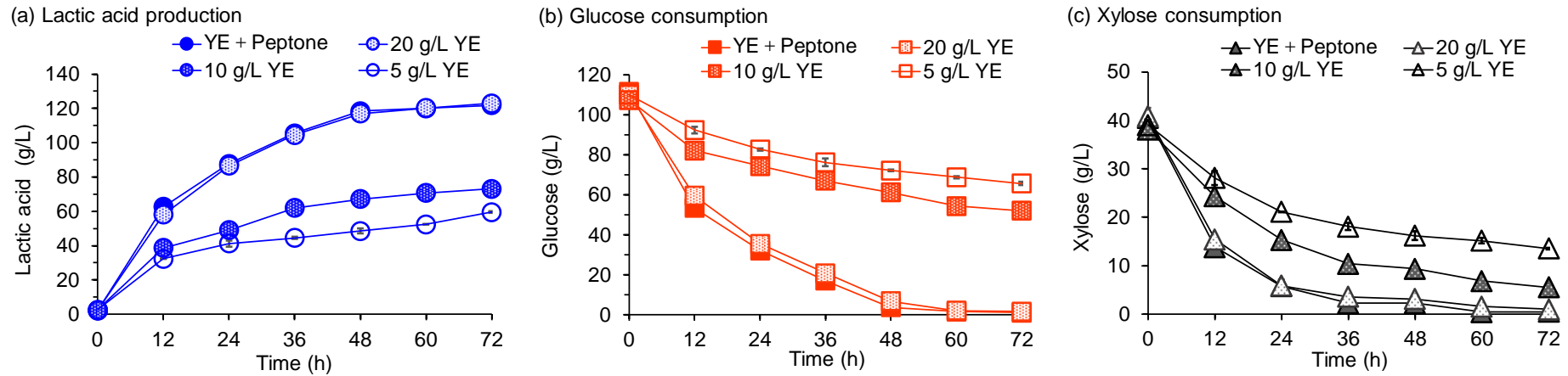


图 3.1 工业级酵母提取物为有机氮源生物反应器发酵生产纤维素 L-乳酸

Fig. 3.1 Fermentation of industrial grade yeast extract as organic nitrogen source for cellulose L-lactic acid production in bioreactor

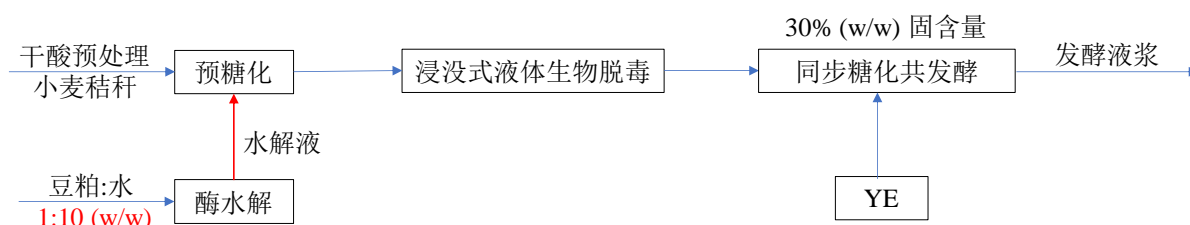
图 (a)、(b)、(c)分别表示不同用量的工业级酵母提取物为有机氮源在 3 L 生物反应器中发酵生产纤维素 L-乳酸过程中的产酸以及葡萄糖、木糖的消耗情况。对照组有机氮源为试剂级的酵母提取物和蛋白胨，用量分别为 15 g/L 和 10 g/L，无机氮源为柠檬酸氢二铵，用量为 2 g/L；实验组的有机氮源分别为 5 g/L、10 g/L、20 g/L 的工业级酵母提取物，无机氮源为 10 g/L 硫酸铵。营养盐为 0.25 g/L 的一水合硫酸锰。发酵条件为 30% (w/w)固含量，10% (v/v)接种量接入 *P. acidilactici* ZY271，42°C，300 rpm 下发酵 72 h。

### 3.3.2 豆粕水解液作为替代氮源进行纤维素 L-乳酸发酵

2.3.2 和 2.3.3 的实验结果表明，豆粕的酶水解最适固液比为 1:10 (w/w)，发酵时最适的添加量为 25 g/L。在此条件下，发酵时豆粕水解液的添加量占到发酵体系的 25% (v/v)左右。在生物反应器规模下同步糖化共发酵 (SSCF) 生产纤维素 L-乳酸的生物炼制工艺顺序为预处理、糖化、液态脱毒和发酵。如果在发酵时加入豆粕水解液，其 25% (v/v) 的添加量会对发酵的固含量造成严重稀释，从而初始的可发酵性糖浓度会下降，最终会极大影响纤维素 L-乳酸的产量和手性纯度。如果使用高于 30% (w/w) 固含量条件对小麦秸秆进行糖化，发酵时加入豆粕水解液进行稀释从而将固含量控制在 30% (w/w) 左右。在极高的固含量条件下会出现严重的混合和传质不均，无法保证糖化和液态脱毒的正常进行。

为了克服这个问题，提出了两种解决方案：方案 (1) 将豆粕水解液替代糖化阶段加入的部分水，从而无需提高糖化和液态脱毒的固含量，同时也不会降低发酵的固含量，最终以实现 30% (w/w) 固含量的纤维素 L-乳酸发酵。方案 (2) 将豆粕酶水解的固液比从 1:10 (w/w) 提升至极限 1:3 (w/w)，通过尽可能降低水解液中水的占比从而减少其对发酵固含量的稀释作用。豆粕水解液仍在发酵阶段加入，发酵固含量仍然在 30% (w/w) 左右 (图 3.2)。为了探究上述两种方案的可行性，在 3 L 生物反应器中进行了如下探究实验。

方案 (1): 酶水解固液比不变，水解液提前至糖化阶段替代部分水加入



方案 (2): 酶水解固液比提高，水解液仍然在发酵阶段加入

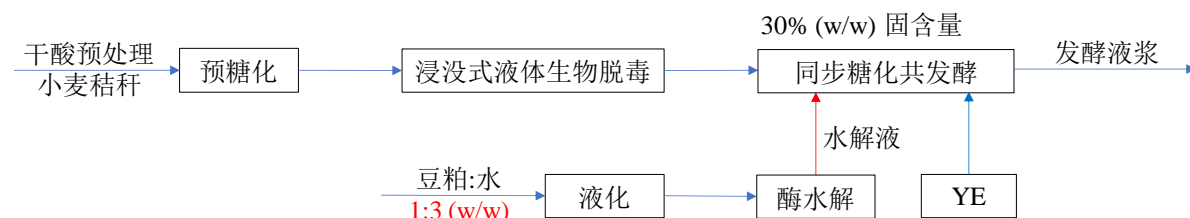


图 3.2 小麦秸秆在 30% (w/w) 固含量下 SSCF 生产纤维素 L-乳酸工艺流程图

Fig. 3.2 Process flow diagram for cellulose L-lactic acid production by SSCF at 30% (w/w) solid content

方案 (1) 的豆粕水解液的制备条件不变，豆粕在 1:10 (w/w) 固液比、60°C、150 rpm 条件下利用碱性蛋白酶水解 36 h。豆粕水解液在糖化时加入，水解液的添加量为体系的

25% (v/v)。根据 2.3.3 的结果, 发酵时工业级酵母提取物的添加量设置了 3 个浓度梯度, 分别为 0 g/L、2.5 g/L 和 5 g/L。具体的发酵结果如图 3.3 所示。30% (w/w) 固含量的小麦秸秆经过糖化和液态脱毒后, 释放的总糖 (葡萄糖和木糖) 浓度在 150 g/L 左右。20 g/L 工业级酵母提取物的对照组获得了最高的乳酸浓度 123.0 g/L。以 25 g/L 豆粕为有机氮源, 发酵 72 h 的乳酸产量仅有 65.3 g/L, 并且存在大量残糖, 包括 63.3 g/L 的葡萄糖和 10.4 g/L 的木糖。这与 2.3.2 的摇瓶结果 (78.1 g/L) 存在差异, 推测是由于豆粕水解液的提前添加, 即在糖化阶段加入, 在液态脱毒过程中, 生物脱毒菌株 *P. variotii* FN89 消耗了豆粕水解液中的部分营养物质从而造成了上述乳酸浓度差异。当工业级酵母提取物的用量提升到 2.5 g/L 时, 发酵 72 h 的乳酸浓度为 93.4 g/L, 比不添加工业级酵母提取物提高了 43.0%, 剩余的葡萄糖和木糖分别下降了 33.2% 和 29.3%。当工业级酵母提取物的用量增加到 5 g/L 时, 发酵 72 h 的乳酸浓度为 122.9 g/L, 平均发酵速率为 1.71 g/L/h, 与对照组 20 g/L 工业级酵母提取物得到的 123.0 g/L 乳酸和 1.71 g/L/h 的发酵速率一致。以上结果表明仅以豆粕水解液作为 30% (w/w) 固含量小麦秸秆进行 L-乳酸发酵时的有机氮源会导致乳酸产量和发酵速率变低。这是因为豆粕水解液中的某些氨基酸、B 族维生素等营养物质不足, 另外在糖化阶段加入豆粕水解液导致脱毒过程中 *P. variotii* FN89 对部分氮源物质的消耗, 进一步降低了最终的乳酸产量。当添加 5 g/L 工业级酵母提取物时, 可以有效弥补豆粕水解液中营养物质本身的不足以及在脱毒阶段的消耗, 实现与对照组同等的乳酸产量和发酵速率, 并且将工业级酵母提取物的用量降低了 75%。

方案 (2) 中豆粕与水的固液比从 1:10 (w/w) 提升到 1:3 (w/w), 即去离子水的添加量减少了 70%, 液化 12 h 后, 加入碱性蛋白酶, 在 60°C、150 rpm 条件下水解 36 h。得到的豆粕水解液在发酵时加入, 添加量为 25 g/L 豆粕。由于其极高的固液比, 对 30% (w/w) 固含量的发酵体系影响并不显著, 发酵 0 h 的总糖含量仍在 150 g/L 左右。高固含量的豆粕水解液与不同添加量的工业级酵母提取物作为有机氮源进行乳酸发酵的结果如图 3.4 所示。在不添加工业级酵母提取物的条件下, 发酵 72 h 的乳酸产量为 84.2 g/L, 比糖化阶段加入 1:10 (w/w) 固液比的豆粕水解液作为有机氮源发酵时的乳酸浓度高出 33.0%, 表明在脱毒阶段, 脱毒菌株确实消耗了豆粕水解液中的部分营养物质用于自身生长, 导致发酵菌株的营养不足, 最终使得乳酸产量的降低。即使在发酵时加入高固含量的豆粕水解液, 与对照组相比仍然存在 31.5% 的差距, 当工业级酵母提取物的用量为 2.5 g/L 时, 发酵 72 h 的乳酸产量为 97.2 g/L, 与对照组的乳酸差距缩减至 20.9%。随着工业级酵母提取物的用量增加至 5 g/L 时, 发酵 72 h 的乳酸产量为 120.9 g/L, 与 20 g/L 酵母提取物为有机氮源的发酵结果基本一致。

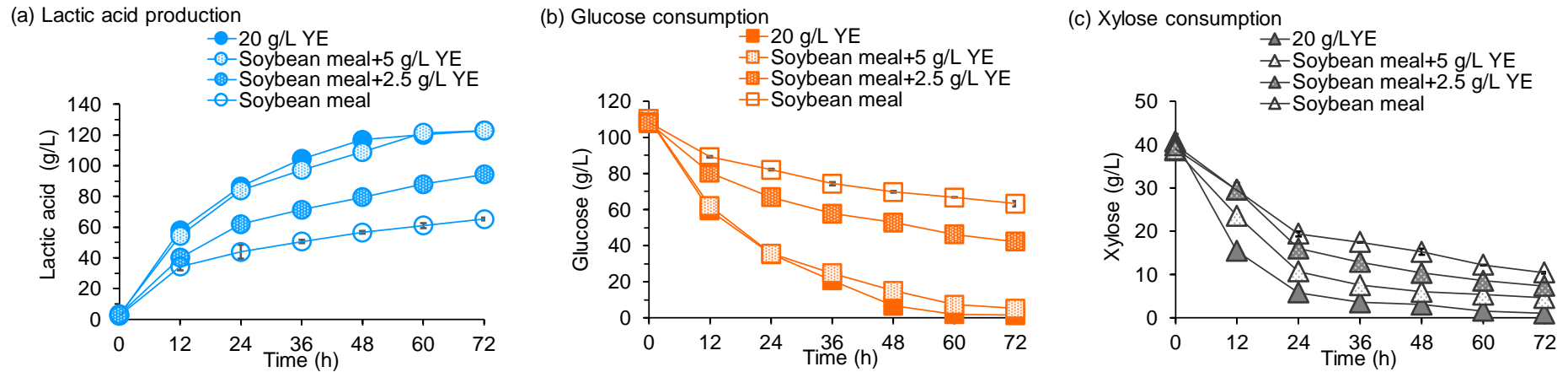


图 3.3 豆粕（糖化时加入）与工业级酵母提取物作为有机氮源生物反应器发酵生产纤维素 L-乳酸

Fig. 3.3 Fermentation of soybean meal with industrial grade yeast extract as organic nitrogen source for cellulose L-lactic acid production in bioreactor

图 (a)、(b)、(c)分别表示豆粕水解液与不同用量的工业级酵母提取物作为氮源在 3 L 生物反应器中发酵生产纤维素 L-乳酸的产量以及葡萄糖、木糖的消耗。其中，对照组为 20 g/L 的工业级酵母提取物，实验组为酶水解的豆粕分别与 0 g/L、2.5 g/L、5 g/L 的工业级酵母提取物的组合氮源，豆粕水解液在糖化时加入，其中含有 25 g 的豆粕，即发酵时豆粕的添加量为 25 g/L。无机氮源均为 10 g/L 的硫酸铵。营养盐添加为 0.25 g/L 的一水合硫酸锰。发酵条件为 30% (w/w)固含量，10% (v/v)接种量接入 *P. acidilactici* ZY271，42°C，300 rpm 下发酵 72 h。

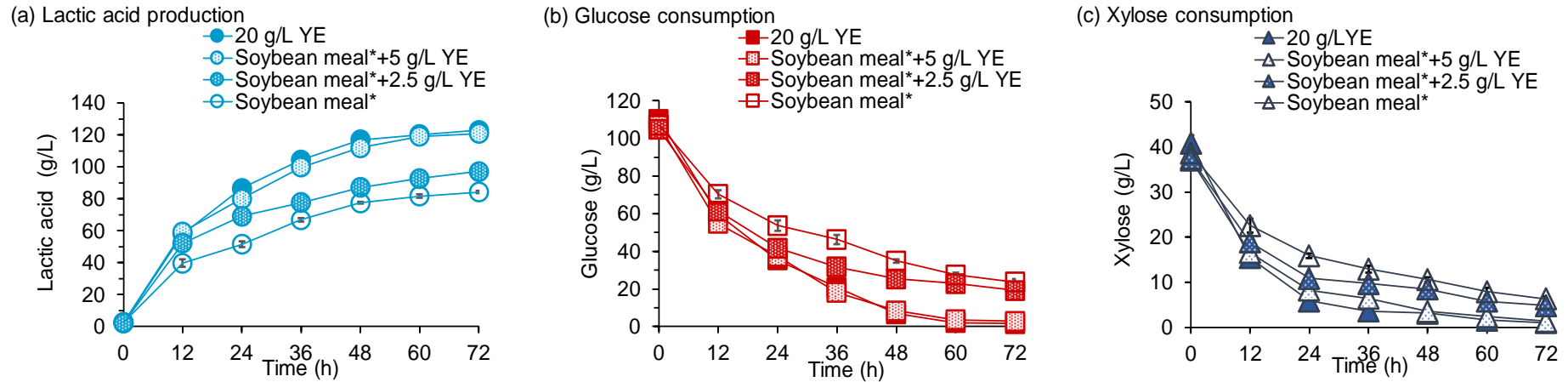


图 3.4 豆粕\*（发酵时加入）与工业级酵母提取物作为有机氮源生物反应器发酵生产纤维素 L-乳酸

Fig. 3.4 Fermentation of soybean meal with industrial grade yeast extract as organic nitrogen source for cellulose L-lactic acid production in bioreactor

图分别表示豆粕水解液与不同用量的工业级酵母提取物作为氮源在 3 L 生物反应器中发酵生产纤维素 L-乳酸的产量以及葡萄糖、木糖的消耗。其中，对照组为 20 g/L 的工业级酵母提取物，实验组为酶水解的豆粕分别与 0 g/L、2.5 g/L、5 g/L 的工业级酵母提取物的组合氮源，豆粕\*表示水解在固液比 1:3 (w/w) 下进行，豆粕水解液在发酵时加入。豆粕的添加量为 25 g/L。无机氮源均为 10 g/L 的硫酸铵。营养盐添加为 0.25 g/L 的一水合硫酸锰。发酵条件为 30% (w/w) 固含量，10% (v/v) 接种量接入 *P. acidilactici* ZY271，42°C，300 rpm 下发酵 72 h。

针对在乳酸发酵时加入豆粕水解液会降低固含量的问题，上述两种解决方案，无论是将豆粕水解液提前到糖化阶段加入，还是提高豆粕水解的固液比从而在发酵阶段加入，均可以有效避免对乳酸发酵固含量的降低。重要的是，均需要在此基础上补加 5 g/L 的工业级酵母提取物作为有机氮源，才可以获得与对照条件一致的乳酸产量和发酵速率。然而，由于豆粕的含水量较低，仅有 10% (w/w) 左右，其具有吸水膨胀特性，方案 (2) 中极高的固液比使得加入到水解体系中的去离子水很快就被豆粕所吸附，较大的体系粘度会导致碱性蛋白酶的溶解性降低，并且碱性蛋白酶无法与豆粕有效结合，会极大程度降低酶解效率。因此在水解前需要加入纤维素酶对其进行液化处理 12 h 后，再进行后续的水解。额外的液化步骤不仅增加了水解的时间和成本而且使水解过程变得更加繁琐。因此，方案 (1) 对于工业生物炼制技术背景下的纤维素 L-乳酸生产更具可行性和吸引力。

### 3.3.3 工业生物炼制技术背景下廉价组合氮源用于纤维素 L-乳酸生产

本小节探究了豆粕水解液、工业级酵母提取物提前加入对糖化、液态脱毒以及发酵的影响。豆粕水解液在糖化过程中作为部分水加入，经过灭酶处理后的碱性蛋白酶，基本不会对纤维素酶的活性产生影响。通过对正常糖化、加入豆粕糖化结束后的葡萄糖和木糖含量进行测定，两种糖化方式下获得的糖含量基本相同（正常糖化下后葡萄糖含量为  $106.1 \pm 2.6$  g/L，木糖含量为  $44.7 \pm 0.6$  g/L；加入豆粕糖化下后葡萄糖含量为  $104.3 \pm 3.4$  g/L，木糖含量为  $43.9 \pm 0.9$  g/L），表明豆粕水解液的加入基本对糖化没有负面影响。

后续的液态脱毒过程结果如图 3.5 (a)，对正常脱毒、含有豆粕脱毒、含有豆粕和酵母提取物的脱毒上述三种脱毒过程进行监测。三种脱毒方式的脱毒时间均在 36 h 左右，初始糠醛含量在 1.5 g/L 左右，脱毒 27 h 后料液中均未检测到糠醛；初始 HMF 含量也在 1.5 g/L 左右，在 30 h 后被完全去除；乙酸的初始含量较高在 10 g/L 左右，脱毒菌株 *P. variotii* FN89 先利用糠醛和 HMF 作为碳源，当糠醛和 HMF 基本耗尽后才开始脱除乙酸，脱毒结束时残留 2 g/L 左右的乙酸，以防脱毒菌株 *P. variotii* FN89 开始消耗可发酵糖。根据图 3.5 (a) 的结果，加入氮源进行脱毒发酵上清液中的游离氮含量均有不同程度的下降，在脱毒过程中加入豆粕的氮含量从 0.32% 下降到 0.21%，降低了 34.4%；而在脱毒过程中加入豆粕和酵母提取物的游离氮含量从 0.41% 下降到 0.24%，减少了 41.5%，脱毒过程中加入酵母提取物后氮含量减少的更多。以上结果表明豆粕和酵母提取物的加入并未提高脱毒菌株对抑制物的脱除速率、缩短脱毒时间，反而仅消耗其中的营养成分用于自身的生长。

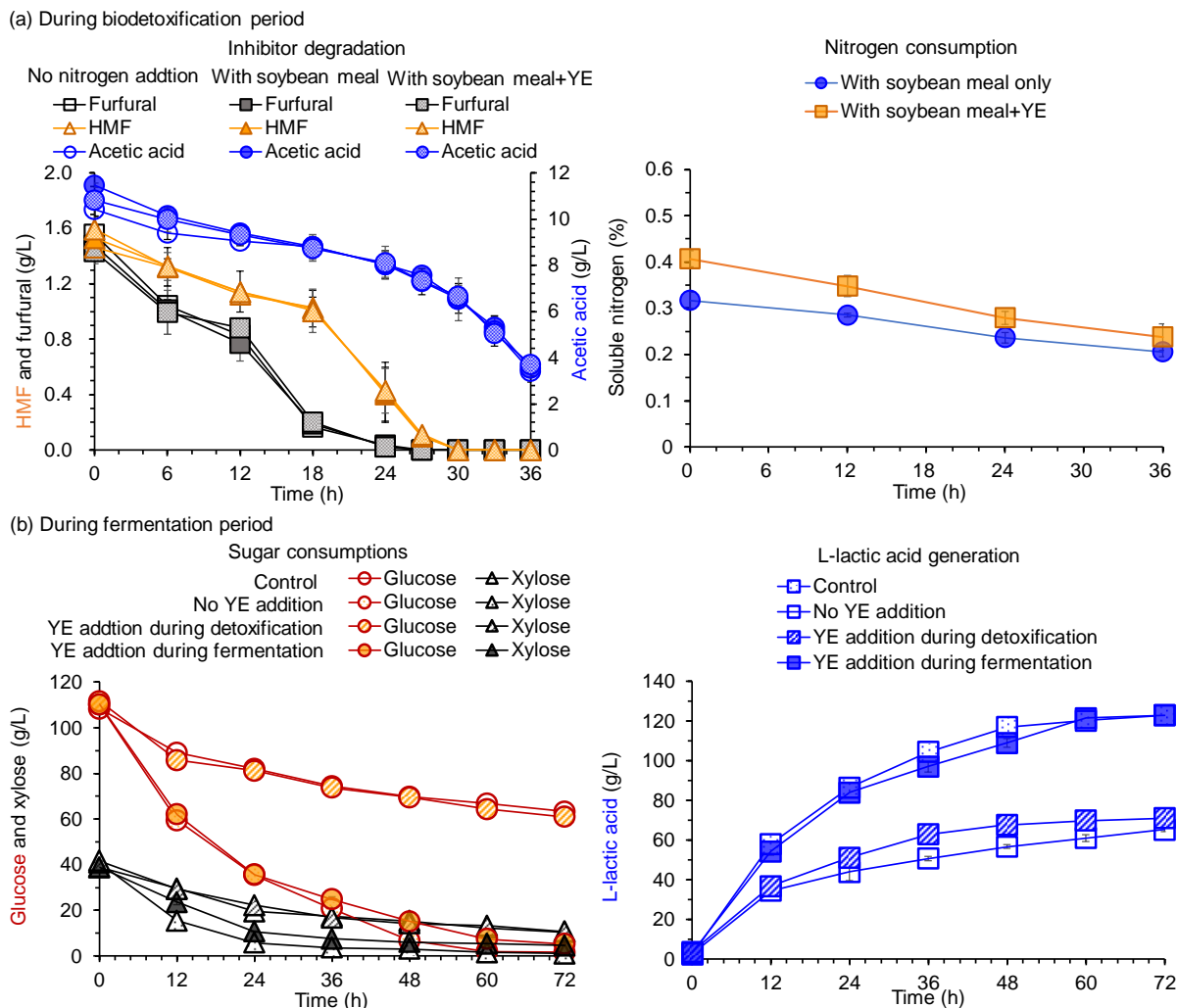


图 3.5 *P. acidilactici* ZY271 利用小麦秸秆进行 30% (w/w)固含量的生物反应器 SSCF

Fig. 3.5 SSCF of *P. acidilactici* ZY271 at 30% solids loading of wheat straw feedstock in bioreactors

(a)表示不加入氮源脱毒、加入豆粕脱毒以及加入豆粕和 YE 脱毒这三种脱毒方式过程中抑制物的去除以及游离氮含量的变化；(b)分别表示以 20 g/L 工业级酵母提取物为有机氮源、25 g/L 豆粕为有机氮源、25 g/L 豆粕 + 5 g/L 工业级酵母提取物（脱毒加）为有机氮源、25 g/L 豆粕 + 5 g/L 工业级酵母提取物（发酵加）为有机氮源发酵的糖耗和产酸情况，其中 25 g/L 的豆粕均以水解液的形式在糖化时加入。无机氮源为 10 g/L 硫酸铵。发酵条件为 3 L 生物反应器 SSCF，30% (w/w)固含量，*P. acidilactici* ZY271 的接种量为 10% (v/v)，发酵条件为 42°C和 300 rpm，发酵时间为 72 h。营养盐添加为 0.25 g/L 一水合硫酸锰。

豆粕水解液和工业级酵母提取物的提前加入，虽然并没有对糖化和液态脱毒产生影响，但是在脱毒过程中，脱毒菌株对豆粕水解液和工业级酵母提取物中营养物质尤其是氮源的消耗可能会对后续的乳酸发酵造成影响。因此在 3L 生物反应器中进行了以豆粕作为替代氮源同时补加工业级酵母提取物的发酵验证实验，探究豆粕水解液和工业级酵母提取物的提前加入对发酵的影响。根据 3.3.1 的实验结果，工业级的酵母提取物的用

量为 20 g/L 时，发酵 72 h 的乳酸产量为 123.3 g/L，葡萄糖和木糖基本耗尽，以 20 g/L 工业级酵母提取物为有机氮源的发酵结果作为对照条件。豆粕水解液在糖化阶段加入，发酵时不加入酵母提取物，72 h 的乳酸产量为 65.9 g/L，剩余 63.3 g/L 葡萄糖和 10.4 g/L 木糖。当在脱毒时加入酵母提取物进行发酵，72 h 后获得的乳酸产量仅有 71.0 g/L，同时剩余 60.9 g/L 的葡萄糖和 10.6 g/L 的木糖。此结果仅以豆粕水解液为氮源发酵得到的乳酸产量（65.9 g/L）接近，表明酵母提取物中的重要营养成分在脱毒过程中被脱毒菌株消耗，导致在发酵过程中菌株因缺乏氨基酸、营养因子等不能进行正常生长和代谢产酸。在发酵时加入酵母提取物，批次发酵 72 h 获得的乳酸产量为 122.9 g/L，与对照条件的发酵结果基本一致，并将工业级酵母提取物的用量降低了 75%。上述结果表明，豆粕水解液的提前加入对后续发酵基本没有影响，但是在脱毒前加入工业级酵母提取物会导致最终的乳酸产量显著下降。这可能是因为豆粕中的某些非必需氨基酸对于脱毒菌株和发酵菌株都是过剩的，而工业级酵母提取物中的某些必需氨基酸等营养物质经过脱毒菌株消耗，在发酵过程不足以维持发酵菌株 *P. acidilactici* ZY271 的生长和代谢。

### 3.4 本章小结

本章以工业级酵母提取物和豆粕水解液为研究对象，首先探究了不同用量工业级酵母提取物作为有机氮源对乳酸发酵的影响；其次针对豆粕水解液的加入对发酵固含量的影响提出了两种解决方案并进行验证；最后探究了有机氮源的加入对生物炼制工艺的影响。得到如下结论：

（1）以 20 g/L 的工业级酵母提取物作为有机氮源，可以获得和以 15 g/L 的试剂级酵母提取物和 10 g/L 试剂级蛋白胨作为有机氮源时基本一致的发酵速率和乳酸产量，L-乳酸的手性纯度为 99.8%。

（2）将豆粕水解液提前到糖化阶段加入和将豆粕水解的固液比提高至极限从而在发酵阶段加入均可以避免体系固含量的降低，在保证发酵指标一致的前提下，以豆粕作为乳酸发酵的氮源可以将工业级酵母提取物的用量降低 75%，乳酸产品的手性纯度为 99.8%。然而后者需要预先进行额外的液化才能进行后续的酶水解，增加了植物蛋白处理的时间和成本。

（3）豆粕水解液和工业级酵母提取物的提前加入对糖化和液态脱毒不仅没有积极影响，而且由于脱毒过程中 *P. variotii* FN89 消耗了其中的部分营养物质，导致乳酸发酵产量显著下降。而在发酵阶段加入工业级酵母提取物可以有效将此影响降至最低，最终乳酸产品浓度为 122.9 g/L，平均发酵速率为 1.71 g/L/h，L-乳酸的手性纯度为 99.8%。

## 第4章 纤维素 L-乳酸发酵氮源的初步经济技术评价

### 4.1 前言

乳酸的发酵成本是决定聚乳酸产业化生产的关键因素。木质纤维素生物质由于其来源广泛、价格低廉，可以作为乳酸生产的原料从而有效降低碳源成本。酵母提取物和蛋白胨作为乳酸发酵的最佳氮源选择，其成本占到 30%以上，是仅次于糖原料的第二大成本项。因此选择低成本的替代氮源是进一步实现乳酸经济生产的主要策略。

第二章通过对廉价植物蛋白进行筛选和表征，优化了植物蛋白酶水解的固液比和水解时间，探究了植物蛋白用量和工业级酵母提取物的最少添加量，确定了豆粕作为替代氮源的最适条件。第三章将豆粕水解液和工业级酵母提取物与生物炼制工艺相结合，探究其最适的添加模式将不良影响降至最低，从而获得与对照组一致的发酵速率、乳酸产量和手性纯度，与此同时将工业级酵母提取物的用量降低了 75%。

本章首先探究了化学水解的豆粕作为乳酸发酵替代氮源的可行性；其次研究了经过不同处理方式的玉米浆作为有机氮源对乳酸发酵的影响；最后根据本文所做的研究对 6 个不同氮源组合案例下的纤维素 L-乳酸发酵进行了整理，并对上述案例，包括乳酸产量、发酵速率、理论得率以及 L-乳酸手性纯度在内的发酵指标和包括有机氮源、催化剂与无机氮源在内的氮源成本分别进行初步的技术经济评价。

### 4.2 材料与方法

#### 4.2.1 原料、酶与试剂

本章实验所用的经过干酸预处理的小麦秸秆由太原凯赛生物技术有限公司于 2023 年 8 月提供，预处理后各组分含量见 3.2.1。

纤维素酶 Cellic CTec 3 HS 购自北京诺维信公司，根据 Brandford 方法测得酶蛋白含量为 90.1 mg/mL。糖化酶 GA-LNEW 购自无锡杰能科公司，酶活为 103900 WU/mL。

豆粕购自连云港中粮集团有限公司，玉米浆购自太原凯赛生物技术有限公司，其他试剂如硫酸、氢氧化钙、一水合葡萄糖、柠檬酸氢铵、硫酸铵、一水合硫酸锰等均购自上海国药化学试剂有限公司。

#### 4.2.2 菌株、培养基及培养条件

本章所用生物脱毒菌株为 *P. variotti* FN89，其来源、培养基及培养条件见 3.2.2。

本章所用发酵菌株为 *P. acidilactici* ZY271，其来源、培养基及培养条件见 2.2.2。

#### 4.2.3 豆粕的酸水解

将 25 g 豆粕与 250 g 硫酸溶液在 1L 锥形瓶中混合，加入顺序为豆粕、去离子水以及硫酸，其中硫酸用量为 6.25% (g 酸/g 豆粕干重)。均匀混合后于恒温水浴摇床中水解

24 h, 温度设置为 90°C, 转速设置为 150 rpm。水解结束后, 对豆粕酸水解液进行固液分离, 收集过滤得到的水解残渣于 4°C 冷藏冰箱保存, 水解残渣在发酵前加入。之后用轻质碳酸钙粉末调节上清液的 pH, 由于碳酸钙与硫酸的中和反应会生成二氧化碳, 因此当加入碳酸钙后, 没有气泡产生结束中和。中和结束后对豆粕酸水解液进行抽滤, 将中和反应生成的硫酸钙沉淀过滤以去除, 将获得的上清液放置于 4°C 冷藏冰箱保存。

#### 4.2.4 小麦秸秆的糖化、液态脱毒与乳酸发酵

对于以酸水解的豆粕为有机氮源的乳酸生产, 将豆粕酸水解液在糖化阶段与物料和去离子水按照 30% (w/w) 固含量的体系一同加入到装有螺带式搅拌桨的 5 L 生物反应器中进行糖化, 温度为 50°C, 转速为 200 rpm, 糖化 12 h 后将液浆立即转移到装有六直叶搅拌桨的 3 L 生物反应器中进行生物脱毒, 将温度设置为 37°C, 转速为 750 rpm, 以 10% (v/v) 接种量接入 *P. variotti* FN89 种子液, 将通气量调整为 1.0 vvm 开始液态脱毒。当 pH 达到峰值时表明脱毒结束, 立即关闭通气, 将温度升至 42°C, 转速降低为 300 rpm。随后以 10% (v/v) 接种量加入 *P. acidilactici* ZY271 种子液, 无机氮源和营养盐后开始发酵 72 h, 发酵过程通过蠕动泵流加 25% (w/w) 的氢氧化钙以控制体系的 pH 在 5.5。每 24 h 取样直至发酵结束, 测定葡萄糖、木糖、乳酸以及 D-乳酸的浓度。

对于以玉米浆为有机氮源的乳酸生产, 玉米浆在发酵阶段加入。糖化阶段按照 30% (w/w) 固含量加入物料和去离子水, 糖化 12 h 后接入 *P. variotti* FN89 种子液开始生物脱毒。液态脱毒结束后接入 *P. acidilactici* ZY271 种子液, 加入有机氮源、无机氮源、营养盐后进行乳酸发酵。糖化、生物脱毒和发酵过程中的参数控制同上。

#### 4.2.5 分析方法

葡萄糖、木糖、糠醛、HMF、乙酸、乳酸等组分使用高效液相色谱测定, 方法见 2.2.6。

D-乳酸的浓度通过高效液相色谱检测, 方法见 2.2.6。

#### 4.2.6 L-乳酸手性纯度和得率计算

L 乳酸的手性纯度计算方法见 2.2.8。

根据 Qiu 等人<sup>[126]</sup>的方法, 纤维素 L-乳酸的得率被定义为发酵的 L-乳酸产量与理论 L-乳酸产量的比值。理论 L-乳酸产量根据纤维素和木糖转化为乳酸的化学计量比值计算所得。具体计算公式如下:

$$\text{乳酸得率 (\%)} = \frac{C_{LA^*} \times V_{LA^*} - C_{LA} \times V_{LA}}{M_{\text{Biomass}} \times (PCT_{\text{Cellulose}} \times 1.111 + PCT_{\text{Xylose}}) \times 1} \times 100\% \quad (4-1)$$

式 (4-1) 中字母的释义如下:

$C_{LA^*}$  表示发酵 72 h 的乳酸浓度 (g/L);  $V_{LA^*}$  表示发酵 72 h 体系的体积 (L);  $C_{LA}$  表示发酵 0 h 的乳酸浓度 (g/L);  $V_{LA}$  表示发酵 0 h 体系的体积 (L);  $M_{\text{Biomass}}$  表示初始发酵体系中干物料的质量 (g);  $PCT_{\text{Cellulose}}$  表示初始发酵体系干物料中纤维素的含量 (g/g);  $PCT_{\text{Xylose}}$  表示初始发酵体系干物料中木糖含量 (g/g); 1.111 表示纤维素转化为

葡萄糖当量的转化系数；1 表示葡萄糖与木糖转化为乳酸的转化系数。液体体积根据 SSCF 运行的水质量平衡计算。

### 4.3 结果与讨论

#### 4.3.1 酸水解的豆粕为有机氮源的 L-乳酸发酵

化学水解因其操作简单、成本低廉一直是蛋白水解的主要方式。以酶水解的豆粕作为替代氮源，需要加入 5 g/L 的工业级酵母提取物作为补充氮源才可以实现和对照条件下 20 g/L 工业级酵母提取物作为有机氮源一致的乳酸产量、得率和发酵速率。然而，化学水解的高温以及浓酸或碱条件可以弥补酶水解条件下水解不完全的不足。因此，本小节探究了豆粕在酸水解后作为替代氮源进行 30% (w/w) 固含量的小麦秸秆发酵乳酸的可行性。

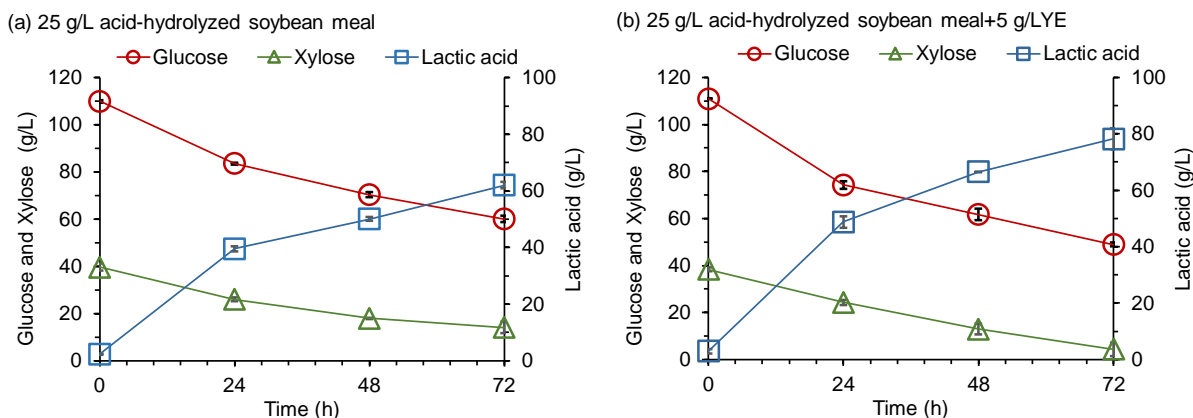


图 4.1 酸水解的豆粕作为替代氮源发酵过程中的糖耗和乳酸产量变化

Fig. 4.1 Changes in sugar consumption and lactic acid production in fermentation of acid-hydrolyzed soybean meal as alternative nitrogen source

(a)、(b)分别表示 25 g/L 酸水解的豆粕作为替代氮源和 25 g/L 酸水解的豆粕+5 g/L 工业级酵母提取物作为替代氮源进行纤维素 L-乳酸发酵的产酸和耗糖变化，其中豆粕酸水解液在糖化阶段加入。无机氮源为 10 g/L 硫酸铵，营养盐为 0.25 g/L 一水合硫酸锰，均在发酵阶段加入。发酵条件为 30% (w/w) 固含量，10% (v/v) 接种量接入 *P. acidilactici* ZY271，42°C，300 rpm 下发酵 72 h。

图 4.1 (a)表示经过酸水解的豆粕（豆粕用量为 25 g/L）作为有机氮源的发酵结果。发酵 72 h 乳酸产量为 62.04 g/L，并且发酵液中还残留 60.04 g/L 葡萄糖和 14.06 g/L 木糖。经过酸水解的豆粕作为替代氮源与相同用量的经过酶水解的豆粕（发酵 72 h 乳酸产量为 65.3 g/L，见 3.3.2）相比，乳酸产量没有显著变化。图 4.1 (b)表示的是以 25 g/L 经过酸水解的豆粕和 5 g/L 工业级酵母提取物作为有机氮源的发酵结果。发酵 72 h 的乳酸浓度为 78.23 g/L，相比于不补加工业级酵母提取物提高了 26.1%，葡萄糖和木糖浓度分

别下降了 18.4%和 69.0%。但与对照条件（20 g/L 工业级酵母提取物）的乳酸产量（123.3 g/L）相比存在 36.6%的差距。豆粕在高温和强酸的条件下被彻底地水解，但是剧烈的反应条件易导致蛋白质被过度水解，从而造成营养物质流失，使得乳酸菌可以利用的氮源物质减少，代谢产生的乳酸浓度不高，即使补加一定量的工业级酵母提取物，仍然无法弥补豆粕在酸水解中被破坏的营养物质。此外，酸水解对容器的腐蚀性还会缩短设备的使用年限。

#### 4.3.2 玉米浆为有机氮源的 L-乳酸发酵

玉米浆作为玉米淀粉生产过程中的副产物，富含可溶性蛋白和多种游离氨基酸，是微生物发酵的常用廉价有机氮源<sup>[127-129]</sup>。其中玉米浆干粉是由新鲜的玉米浆经过低温、瞬间加热喷雾干燥而成，含水量在 10% (w/w)左右，易于储存，并且可以有效保留水溶性的蛋白。玉米浆干粉在发酵工业中发挥着重要作用，其应用范围广泛，涵盖了抗生素、维生素、氨基酸以及酶制剂等多个生产领域。在生物发酵过程中，玉米浆干粉可以作为水溶性植物蛋白和水溶性维生素等营养元素的补充剂，为微生物的生长代谢提供了必要的营养物质<sup>[130]</sup>。为了探究玉米浆作为乳酸发酵的有机氮源的可行性，分别以 25 g/L 玉米浆干粉和 25 g/L 新鲜玉米浆作为氮源在 3 L 生物反应器中进行 30% (w/w)固含量小麦秸秆的乳酸发酵。

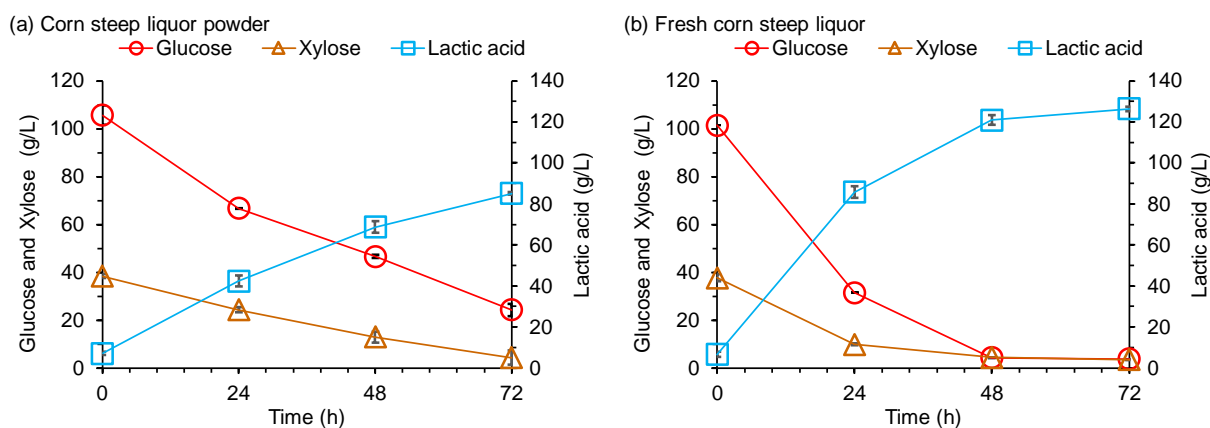


图 4.2 不同状态的玉米浆作为替代氮源发酵的糖耗和产酸变化

Fig. 4.2 Changes in sugar consumption and lactic acid production in the fermentation of corn steep liquor in different states as alternative nitrogen source

(a)、(b)分别表示干粉和液体状态的玉米浆作为替代氮源进行纤维素 L-乳酸发酵，玉米浆的用量为 25 g/L DM，无机氮源为 10 g/L 硫酸铵，营养盐为 0.25 g/L 一水合硫酸锰，均在发酵时加入。发酵条件为 30% (w/w)固含量小麦秸秆，10% (v/v)接种量接入 *P. acidilactici* ZY271，在 42°C，300 rpm 下发酵 72 h。

结果如图 4.2 (a)所示, 以玉米浆干粉作为氮源进行乳酸发酵, 在发酵前 24 h 仅得到了 42.4 g/L 的乳酸, 发酵 48 h 乳酸产量仅为 68.8 g/L, 发酵 72 h 的乳酸产量为 85.1 g/L, 发酵液中残留 24.3 g/L 的葡萄糖和 4.4 g/L 的木糖, L-乳酸的手性纯度仅为 96.0%。然而, 根据图 4.2 (b)的结果, 以新鲜的玉米浆为氮源进行乳酸发酵, 在发酵前 24 h, 葡萄糖和木糖的消耗速率分别为 2.91 g/L/h 和 1.16 g/L/h, 乳酸的生产速率为 3.30 g/L/h, 是相同发酵时间下以玉米浆干粉为氮源进行乳酸发酵时耗糖和产酸速率的 2 倍左右。葡萄糖和木糖在 48 h 基本耗尽, 发酵 72 h 的乳酸产量为 126.3 g/L, 但 L-乳酸的手性纯度仅有 96.8%。上述结果表明, 在相同的发酵条件下, 以新鲜玉米浆作为乳酸发酵的氮源可以获得更高的乳酸产量、得率和发酵速率。仅以新鲜玉米浆为有机氮源时无需补加工业级酵母浸粉, 玉米浆中所含的营养物质可以支持 *P. acidilactici* ZY271 的生长和代谢。相较于玉米浆, 玉米浆干粉虽然便于储存和运输, 但是在发酵过程中发现, 干粉状态下的玉米浆容易凝聚成团, 不易溶解。即使在 30°C 下进行短时间的超声处理, 玉米浆干粉也无法完全溶解。发酵阶段将玉米浆干粉的溶液加入到 1L 的体系中, 在 42°C 和 300 rpm 条件下, 一定时间后玉米浆干粉即使完全溶解, 但是由于 *P. acidilactici* ZY271 在发酵前 12 h 到 24 h 生长和代谢最为迅速, 此时没有足够的可溶性氮源物质用来支撑其自身生长, 这导致了乳酸发酵速率降低、产量下降。

#### 4.3.3 不同氮源组合背景下的 L-乳酸发酵和成本评价

第一部分对在不同来源的氮源组合下, 对 30% (w/w)固含量下以小麦秸秆为碳源时纤维素 L-乳酸的发酵指标进行了评价 (表 4.1)。

案例 1 以 15 g/L 试剂级酵母提取物和 10 g/L 试剂级蛋白胨为有机氮源, 2 g/L 柠檬酸氢二铵为无机氮源, 发酵 72 h 获得的乳酸产量为 121.5 g/L, 乳酸得率为 88.7%, 发酵速率为 1.69 g/L/h, L-乳酸纯度达到了 99.7%。以案例 1 氮源组合的发酵结果作为对照 1。案例 2 以 20 g/L 工业级酵母提取物为有机氮源, 10 g/L 硫酸铵为无机氮源发酵纤维素 L-乳酸的产量为 123.3 g/L, 得率为 90.1%, 发酵速率为 1.71 g/L/h, 手性纯度为 99.8%。以案例 2 的氮源组合的发酵结果作为对照 2。

案例 3 使用了 25 g/L 新鲜玉米浆作为替代氮源, 无机氮源为 10 g/L 硫酸铵, 发酵获得乳酸产量为 126.3 g/L, 得率和发酵速率分别为 89.7%和 1.66 g/L/h。然而, 由于玉米浆中 D-乳酸的存在, 导致最终的 L-乳酸手性纯度仅有 96.8%。案例 4 以 25 g/L 酸水解的豆粕作为替代氮源, 10 g/L 硫酸铵为无机氮源, 发酵的乳酸产量仅有 62 g/L, 乳酸得率和发酵速率相较于案例 1 和案例 2 分别下降了 55.5%和 49.4%。案例 5 以 25 g/L 酶水解的豆粕作为替代氮源, 10 g/L 硫酸铵为无机氮源, 发酵得到了 65.9 g/L 乳酸, 得率为 41.6%, 发酵速率和手性纯度分别为 0.92 g/L/h 和 99.8%。案例 6 表示的是以 25 g/L 酶水解的豆粕和 5 g/L 工业级酵母提取物作为有机氮源, 10 g/L 无机氮源为硫酸铵, 各

项发酵指标分别为乳酸产量 122.6 g/L，乳酸得率 88.1%，发酵速率 1.70 g/L/h，手性纯度 99.8%，与案例 1 和案例 2 的发酵指标基本一致。

案例 1、案例 2 和案例 6 均可以实现高乳酸产量 ( $\geq 120$  g/L) 以及高手性纯度 ( $\geq 99.5\%$ ) 的纤维素 L-乳酸的生产，案例 1 中有机氮源的昂贵成本仅可以在实验室规模下可以实现，案例 2 中将有机氮源替换成了较为便宜的工业级酵母提取物，而案例 6 将有机氮源中工业级酵母提取物的用量减少了 75%。案例 3 中以玉米浆作为替代有机氮源获得的乳酸产量虽然显著高于案例 4 和案例 5 中分别以酸水解和酶水解的豆粕作为替代有机氮源的乳酸产量，但是由于 D-乳酸的存在，L-乳酸产品的手性纯度仅有 96.8%。案例 4 的发酵结果表明，植物蛋白进行酸水解，虽然能够对其进行较为彻底的水解，但是水解过程难以控制，过度水解破坏植物蛋白中的营养物质从而导致无法支持发酵过程中乳酸菌的生长和代谢。案例 5 中的酶水解的豆粕作为替代氮源由于水解得到的营养物质不足也导致最终的发酵指标偏低。

第二部分对上述 6 个案例中进行了氮源成本计算，包括有机氮源成本、催化剂成本以及无机氮源成本。其中案例 2 和案例 6 可以作为工业乳酸发酵的氮源配方。案例 2 中的有机氮源为工业级酵母提取物，其成本为 3180 元/吨乳酸，占总氮源成本的 97.6%，无机氮源硫酸铵的成本为 78 元/吨乳酸。总氮源成本为 3206 元/吨乳酸，相比于案例 1 的总氮源成本下降了 93.6%。案例 6 以酶水解的豆粕和工业级酵母提取物作为有机氮源，其成本为 1200 元/吨乳酸，无机氮源硫酸铵的成本为 78 元/吨乳酸，碱性蛋白酶作为催化剂的成本为 130 元/吨乳酸。生产 1 吨乳酸的总氮源成本为 1410 元，其中有机氮源的成本占 85.4%，而工业级酵母提取物的成本占到 66.6%。无机氮源成本占总氮源成本的 5.5%，催化剂占总氮源成本的 9.1%。乳酸发酵的氮源成本主要来源于酵母提取物，而酵母提取物作为提高乳酸产量和发酵速率最佳的氮源物质，以豆粕作为替代氮源的基础上适量添加 25%用量的酵母提取物可以实现和以 20 g/L 酵母提取物为氮源一致的发酵指标，最终将总氮源成本降低了 56.8%。

表 4.1 不同氮源组合背景下的纤维素 L-乳酸发酵评价

Fig. 4.1 Fermentation evaluation of cellulosic L-lactic acid in the context of different combinations of nitrogen sources

|                                | 有机氮源添加                            | 无机氮源添加          | 水解催化剂             | 产量<br>(g/L) | 得率<br>(%) | 生产率<br>(g/L/h) | 手性纯度<br>(%) | 工业配方<br>可行性   |
|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------|-------------------|-------------|-----------|----------------|-------------|---------------|
| 30% (w/w)固含量小麦秸秆作为碳源 SSCF 乳酸评价 |                                   |                 |                   |             |           |                |             |               |
| 案例 1                           | 15 g/L 酵母提取物;<br>10 g/L 蛋白胨 (试剂级) | 2 g/L<br>柠檬酸氢二铵 | \                 | 121.5       | 88.7      | 1.69           | 99.7        | 否 (仅可用于实验室条件) |
| 案例 2                           | 20 g/L 酵母提取物<br>(工业级)             | 10 g/L 硫酸铵      | \                 | 123.3       | 90.1      | 1.71           | 99.8        | 是             |
| 案例 3                           | 25 g/L 玉米浆干粉                      | 10 g/L 硫酸铵      | \                 | 126.3       | 89.7      | 1.66           | 96.8        | 否 (低手性纯度)     |
| 案例 4                           | 25 g/L 豆粕                         | 10 g/L 硫酸铵      | 6.25 g/L 硫酸       | 62.0        | 39.8      | 0.86           | 99.7        | 否 (低乳酸产量)     |
| 案例 5                           | 25 g/L 豆粕                         | 10 g/L 硫酸铵      | 1.25 g/L<br>碱性蛋白酶 | 65.9        | 41.6      | 0.92           | 99.8        | 否 (低乳酸产量)     |
| 案例 6                           | 25 g/L 豆粕;<br>5 g/L 酵母提取物 (工业级)   | 10 g/L 硫酸铵      | 1.25 g/L<br>碱性蛋白酶 | 122.9       | 88.1      | 1.70           | 99.8        | 是             |

表 4.2 不同氮源组合背景下的纤维素 L-乳酸成本评价

Fig. 4.2 Cost evaluation of cellulosic L-lactic acid in the context of different combinations of nitrogen sources

|                      | 有机氮源成本<br>(元/吨 乳酸) | 水解催化剂成本<br>(元/吨 乳酸) | 无机氮源成本<br>(元/吨 乳酸) | 总氮源成本<br>(元/吨 乳酸) |
|----------------------|--------------------|---------------------|--------------------|-------------------|
| SSCF 纤维素 L-乳酸的氮源成本评价 |                    |                     |                    |                   |
| 案例 1                 | 49,880             | \                   | 190                | 50,070            |
| 案例 2                 | 3180               | \                   | 78                 | 3260              |
| 案例 3                 | 90                 | \                   | 70                 | 1600              |
| 案例 4                 | 790                | 10                  | 180                | 980               |
| 案例 5                 | 750                | 240                 | 140                | 1130              |
| 案例 6                 | 1200               | 130                 | 78                 | 1410              |

注：原料价格由当地供应商提供，酵母提取物（试剂级）300,000 元/吨，蛋白胨（试剂级）426000 元/吨，酵母提取物（工业级）28,000 元/吨，玉米浆 700 元/吨，豆粕 2810 元/吨，硫酸 470 元/吨，碱性蛋白酶 18,000 元/吨，柠檬酸氢二铵 16,500 元/吨，硫酸铵 1350 元/吨。

#### 4.4 本章小结

本章探究了酸水解的豆粕或玉米浆分别作为替代氮源对乳酸发酵的影响,并对本研究涉及到的不同氮源组合背景下,分别对纤维素 L-乳酸的发酵指标和氮源成本进行了评价及计算。主要结论如下:

(1) 以硫酸为催化剂对豆粕进行水解,在高温和强酸条件下无法控制水解程度,这会破坏豆粕中的营养成分,即使补加 5 g/L 的工业级酵母提取物也很难有效提高的乳酸产量。

(2) 以新鲜的玉米浆作为有机氮源得到的乳酸产量显著高于以相同用量玉米浆干粉为氮源的乳酸产量,推测是由于玉米浆干粉的溶解性较差。但是玉米浆中存在大量的 D-乳酸,最终 L-乳酸产品手性纯度仅为 96.0%,不能应用于工业化纤维素 L-乳酸的生产。

(3) 在不同氮源组合下进行纤维素 L-乳酸,其中以 20 g/L 工业级酵母提取物和 10 g/L 硫酸铵的氮源组合发酵 72 h 的乳酸产量为 123.3 g/L,发酵速率为 1.71 g/L/h,得率为 90.1%,L-乳酸手性纯度为 99.8%,生产 1 千克乳酸的氮源成本为 3.26 CNY;以 25 g/L 酶水解的豆粕和 5 g/L 工业级酵母提取物为有机氮源,10 g/L 硫酸铵为无机氮源的组合下发酵 72 h 的乳酸产量为 122.6 g/L,发酵速率为 1.70 g/L/h,得率为 88.1%,L-乳酸手性纯度为 99.8%,生产 1 千克乳酸的氮源成本为 1.41 元,将总氮源成本降低了 56.8%。

## 第5章 结论与展望

### 5.1 结论

高手性纯度 L-乳酸是合成可生物降解塑料聚 L-乳酸的关键聚合单体，生产成本和手性纯度是限制高分子材料聚乳酸大规模生产的主要因素。低成本、可再生的木质纤维素可以作为生产手性乳酸的碳源。试剂级的酵母提取物和蛋白胨作为发酵培养基的有机氮源价格昂贵，工业乳酸生产无法负担其成本；以乳酸含量尚不清晰的农业残渣为替代氮源，可能会造成 L-乳酸手性纯度的下降。基于此现象本研究围绕低成本氮源、高发酵指标和高手性纯度乳酸产品这一核心目标，通过筛选农业残渣中低含量消旋乳酸的植物蛋白作为乳酸发酵的潜在氮源，研究酶水解过程中的关键参数以提高水解效率；优化廉价组合氮源以提高手性乳酸的产量；设计工业生物炼制技术背景下的工艺流程，最终实现高浓度和高手性纯度的纤维素 L-乳酸发酵。

本文的主要结论如下：

(1) 通过对八种常见植物蛋白的消旋乳酸含量以及作为替代氮源的潜力进行了评价，确定了酶水解的最适固液比和水解时间分别为 1:10 (w/w)和 36 h。豆粕中的消旋乳酸含量低，以其为替代氮源进行摇瓶发酵的纤维素 L-乳酸产量最高，乳酸产品的手性纯度为 99.8%，是最具竞争力的替代氮源。

(2) 经过干酸预处理的小麦秸秆作为碳源，豆粕作为替代氮源，以 30% (w/w)固含量在 3 L 生物反应器中进行 SSCF。豆粕中固有的氨基酸缺陷无法满足乳酸菌的生长代谢需求，通过补加 5 g/L 工业级酵母提取物作为组合氮源，发酵得到的纤维素 L-乳酸产量、平均发酵速率、得率和手性纯度分别达到了 122.6 g/L、1.71 g/L/h、88.1%以及 99.8%，与 20 g/L 工业级酵母提取物为有机氮源的发酵指标基本持平。

(3) 对豆粕作为廉价氮源发酵纤维素 L-乳酸过程进行了初步技术经济评价。使用豆粕和低用量工业级酵母提取物作为组合廉价氮源，生产 1 千克手性乳酸的总氮源成本为 1.41 元，相较于单独使用工业级酵母提取物作为氮源的成本降低了 56.8%。

### 5.2 创新点

(1) 以酶水解的豆粕作为高手性纯度 L-乳酸发酵的替代氮源，在实现与复合氮源一致的发酵指标前提下，有效将工业级酵母提取物的用量降低了 75%。

(2) 针对发酵培养基高氮源成本和乳酸产品的低手性纯度，首次设计了面向工业乳酸生产的廉价组合氮源并进行了初步的技术经济评价，实现生产 1 千克的高手性纯度 L-乳酸的氮源成本为 1.41 元，有效将氮源成本降低了 56.8%。为高手性纯度乳酸产品的产业化生产提供了更为廉价的氮源配方。

### 5.3 展望

本文提出以豆粕酶解产物和低用量的工业级酵母提取物作为廉价组合氮源，实现了低成本、高乳酸产量和高手性纯度的纤维素 L-乳酸生产。但是还有如下需要深入探讨的部分：

(1) 尽管对豆粕的酶水解条件优化后有效提高了水解效率，但碱性蛋白酶的单一作用对蛋白质的降解程度有限，无法使豆粕释放出更多的有效营养物质，同时较长的水解时间会延长乳酸产品的生产周期。因此，后续的研究可以尝试使用多种蛋白酶联合水解的方式来提高豆粕的水解效率。

(2) 对于发酵工程菌株 *P. acidilactici* ZY271 的营养需求研究不够细化，后续可以详细探究其细胞生长和代谢路径中的限制性氨基酸，通过单独添加一些必需氨基酸和生长因子来弥补植物蛋白中的营养缺陷从而降低工业级酵母提取物的添加量，进一步降低乳酸发酵成本。

(3) 新鲜的玉米浆虽然价格低廉并且含有丰富的营养物质，但是存在大量的消旋乳酸，无法作为替代氮源生产高手性纯度的乳酸产品。后续的研究可以通过对发酵菌株进行代谢工程改造或者对玉米浆进行酶处理，将玉米浆中存在的乳酸转化成中间产物丙酮酸，以实现消旋乳酸的去除。

## 参考文献

- [1] Tan C, Tao F, Xu P. Direct carbon capture for the production of high-performance biodegradable plastics by cyanobacterial cell factories [J]. *Green Chemistry*, 2022, 24(11): 4470-83.
- [2] Kumar R, Sadeghi K, Jang J, Seo J. Mechanical, chemical, and bio-recycling of biodegradable plastics: A review [J]. *Science of The Total Environment*, 2023, 882: 163446.
- [3] Swetha T A, Ananthi V, Bora A, Sengottuvelan N, Ponnuchamy K, Muthusamy G, Arun A. A review on biodegradable polylactic acid (PLA) production from fermentative food waste - Its applications and degradation [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 234: 123703.
- [4] Nanda S, Patra B R, Patel R, Bakos J, Dalai A K. Innovations in applications and prospects of bioplastics and biopolymers: a review [J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2022, 20(1): 379-95.
- [5] Bradu P, Biswas A, Nair C, Sreevalsakumar S, Patil M, Kannampuzha S, Mukherjee A G, Wanjari U R, Renu K, Vellingiri B, Gopalakrishnan A V. Recent advances in green technology and Industrial Revolution 4.0 for a sustainable future [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2023, 30(60): 124488-519.
- [6] Bioplastics market development update 2023 Growth resumption: global production capacities of bioplastics 2023-2028 [EB/OL]. [2023-2].<https://www.european-bioplastics.org/market/>.
- [7] Ramezani Dana H, Ebrahimi F. Synthesis, properties, and applications of polylactic acid-based polymers [J]. *Polymer Engineering and Science*, 2022, 63.
- [8] Madhavan Nampoothiri K, Nair N R, John R P. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(22): 8493-501.
- [9] John R P, Nampoothiri K M, Pandey A. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74(3): 524-34.
- [10] Lasprilla A J R, Martinez G A R, Lunelli B H, Jardini A L, Filho R M. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices — A review [J]. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(1): 321-8.

- [11] Ahmad A, Banat F, Taher H. A review on the lactic acid fermentation from low-cost renewable materials: Recent developments and challenges [J]. *Environmental Technology & Innovation*, 2020, 20: 101138.
- [12] Balla E, Daniilidis V, Karlioti G, Kalamas T, Stefanidou M, Bikiaris N, Vlachopoulos A, Koumentakou I, Bikiaris D. Poly(lactic Acid): A versatile biobased polymer for the future with multifunctional properties—From monomer synthesis, polymerization techniques and molecular weight increase to PLA applications [J]. *Polymers*, 2021, 13: 1822.
- [13] Castro-Aguirre E, Iñiguez-Franco F, Samsudin H, Fang X, Auras R. Poly(lactic acid)—Mass production, processing, industrial applications, and end of life [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, 107: 333-66.
- [14] 陶永亮, 王旭丽, 周鑫. 聚乳酸纤维在纺织中的应用 [J]. *天津纺织科技*, 2024, (01): 44-7.
- [15] Mochizuki M. Textile Applications [M]. *Poly(Lactic Acid): Synthesis, structures, properties, processing, and applications*. 2010: 469-76.
- [16] Oz A, Süfer Ö, Çelebi Y. Poly (Lactic Acid) films in food packaging systems [J]. 2017, 2.
- [17] Ghozali M, Fahmiati S, Triwulandari E, Restu W K, Farhan D, Wulansari M, Fatriasari W. PLA/metal oxide biocomposites for antimicrobial packaging application [J]. *Polymer-Plastics Technology and Materials*, 2020, 59(12): 1332-42.
- [18] Risyon N P, Othman S H, Basha R K, Talib R A. Characterization of polylactic acid/halloysite nanotubes bionanocomposite films for food packaging [J]. *Food Packaging and Shelf Life*, 2020, 23: 100450.
- [19] 闫东雨. 聚乳酸市场技术分析 [J]. *信息记录材料*, 2023, 24(09): 8-11.
- [20] Alves de Oliveira R, Komesu A, Vaz Rossell C E, Maciel Filho R. Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design—From economic to production aspects [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2018, 133: 219-39.
- [21] Dusselier M, Van Wouwe P, Dewaele A, Makshina E, Sels B F. Lactic acid as a platform chemical in the biobased economy: the role of chemocatalysis [J]. *Energy & Environmental Science*, 2013, 6(5).
- [22] Castillo Martinez F A, Balciunas E M, Salgado J M, Domínguez González J M, Converti A, Oliveira R P d S. Lactic acid properties, applications and production: A review [J]. *Trends in Food Science & Technology*, 2013, 30(1): 70-83.

- [23] Zhang F, Liu J, Han X, Gao C, Ma C, Tao F, Xu P. Kinetic characteristics of long-term repeated fed-batch (LtRFb) l-lactic acid fermentation by a *Bacillus coagulans* strain [J]. *Engineering in Life Sciences*, 2020, 20(12): 562-70.
- [24] Wee Y-J, Kim J-n, Ryu H W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications [J]. *Food Technology and Biotechnology*, 2006, 44: 163-72.
- [25] Farah S, Anderson D G, Langer R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, 107: 367-92.
- [26] Murariu M, Dubois P. PLA composites: from production to properties [J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2016, 107: 17-46.
- [27] Abdel-Rahman M A, Tashiro Y, Sonomoto K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits [J]. *Journal of Biotechnology*, 2011, 156(4): 286-301.
- [28] Gražina J, Bartkiene E, Zadeike D, Klupsaite D. 2. Biorefinery approach for the utilization of dairy by-products and lignocellulosic biomass to lactic acid [M]. 2020: 31-56.
- [29] Nduko J M, Matsumoto K i, Taguchi S. Biological lactate-polymers synthesized by one-pot microbial factory: Enzyme and metabolic engineering [M]. *Biobased Monomers, Polymers, and Materials*. American Chemical Society. 2012: 213-35.
- [30] Dey P, Pal P. Direct production of l (+) lactic acid in a continuous and fully membrane-integrated hybrid reactor system under non-neutralizing conditions [J]. *Journal of Membrane Science*, 2012, 389: 355-62.
- [31] Hofvendahl K, Hahn-Hägerdal B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources1 [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 26(2): 87-107.
- [32] 黄国昌, 熊大维, 张婷, 邱小忠. 发酵法生产乳酸的研究进展 [J]. *江西科学*, 2014, 32(05): 660-6.
- [33] Abdel-Rahman M A, Tashiro Y, Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes [J]. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(6): 877-902.
- [34] Zhang D X, Cheryan M. Starch to lactic acid in a continuous membrane bioreactor [J]. *Process Biochemistry*, 1994, 29(2): 145-50.

- [35] Hofvendahl K, Hahn-Hägerdal B. l-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of *Lactobacilli* and *Lactococci* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, 20(4): 301-7.
- [36] Giraud E, Champaviller A, Raimbault M. Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(12): 4319-23.
- [37] Åkerberg C, Hofvendahl K, Hahn-Hägerdal B, Zacchi G. Modelling the influence of pH, temperature, glucose and lactic acid concentrations on the kinetics of lactic acid production by *Lactococcus lactis ssp. lactis* ATCC 19435 in whole-wheat flour [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, 49(6): 682-90.
- [38] Kurosawa H, Ishikawa H, Tanaka H. L-lactic acid production from starch by coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Streptococcus lactis* [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1988, 31(2): 183-7.
- [39] Xu Y P, Duan P G, Wang F. Hydrothermal processing of macroalgae for producing crude bio-oil [J]. *Fuel Processing Technology*, 2015, 130(C): 268-74.
- [40] Liu W J, Tian K, Jiang H, Zhang X S, Ding H S, Yu H Q. Selectively improving the bio-oil quality by catalytic fast pyrolysis of heavy-metal-polluted biomass: Take copper (Cu) as an example [J]. *Environmental Science and Technology*, 2012, 46(14): 7849-56.
- [41] Deng W, Feng Y, Fu J, Guo H, Guo Y, Han B, Jiang J, Kong L, Li C, Liu H, Nguyen P, Ren P, Wang F, Wang S, Wang Y, Wang Y, S. Wong S, Yan K, Yan N, Yang X, Zhang Y, Zhang Z, Zeng X, Zhou H. Catalytic conversion of lignocellulosic biomass into chemicals and fuels [J]. *Green Energy Environment*, 2023, 8:10 -114.
- [42] Wang S, Cheng A, Liu F, Zhang J, Xia T, Zeng X, Fan W, Zhang Y. Catalytic conversion network for lignocellulosic biomass valorization: a panoramic view [J]. *Industrial Chemistry and Materials*, 2023, 1:188-206.
- [43] Parisutham V, Kim T H, Lee S K. Feasibilities of consolidated bioprocessing microbes: From pretreatment to biofuel production [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 161: 431-40.
- [44] Effendi A, Gerhauser H, Bridgwater A V. Production of renewable phenolic resins by thermochemical conversion of biomass: A review [J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2008, 12(8): 2092-116.
- [45] Mori T, Tsuboi Y, Ishida N, Nishikubo N, Demura T, Kikuchi J. Multidimensional high-resolution magic angle spinning and solution-state NMR characterization of <sup>13</sup>C-labeled plant metabolites and lignocellulose [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): 11848.

- [46] Knauf M, Moniruzzaman M. Lignocellulosic biomass processing: A perspective [J]. *International Sugar Journal*, 2004, 106(1263): 147-50.
- [47] Karimi K, Taherzadeh M J. A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: Composition, imaging, and crystallinity [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 200: 1008-18.
- [48] Jönsson L J, Martín C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 199: 103-12.
- [49] Balat M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review [J]. *Energy Conversion and Management*, 2011, 52(2): 858-75.
- [50] Chundawat S P S, Beckham G T, Himmel M E, Dale B E. Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals [J]. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2011, 2(1): 121-45.
- [51] Isikgor F H, Becer C R. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers [J]. *Polymer Chemistry*, 2015, 6(25): 4497-559.
- [52] Chandra R P, Arantes V, Saddler J. Steam pretreatment of agricultural residues facilitates hemicellulose recovery while enhancing enzyme accessibility to cellulose [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 185: 302-7.
- [53] Leskinen T, Kelley S S, Argyropoulos D S. Refining of ethanol biorefinery residues to isolate value added lignins [J]. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 2015, 3(7): 1632-41.
- [54] Cotana F, Cavalaglio G, Nicolini A, Gelosia M, Coccia V, Petrozzi A, Brinchi L. Lignin as co-product of second generation bioethanol production from ligno-cellulosic biomass; proceedings of the energy procedia [C]. 2014,45: 52-60.
- [55] Mosier N, Hendrickson R, Ho N, Sedlak M, Ladisch M R. Optimization of pH controlled liquid hot water pretreatment of corn stover [J]. *Bioresource Technology*, 2005, 96(18): 1986-93.
- [56] Mirmohamadsadeghi S, Chen Z, Wan C. Reducing biomass recalcitrance via mild sodium carbonate pretreatment [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 209: 386-90.
- [57] Saratale G D, Jung M Y, Oh M K. Reutilization of green liquor chemicals for pretreatment of whole rice waste biomass and its application to 2,3-butanediol production [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 205: 90-6.

- [58] Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro M J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(13): 4851-61.
- [59] Heggset E B, Syverud K, Øyaas K. Novel pretreatment pathways for dissolution of lignocellulosic biomass based on ionic liquid and low temperature alkaline treatment [J]. *Biomass and Bioenergy*, 2016, 93: 194-200.
- [60] Taherzadeh M J, Karimi K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2008, 9(9): 1621-51.
- [61] Saha B C, Iten L B, Cotta M A, Wu Y V. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(12): 3693-700.
- [62] Zhang J, Wang X, Chu D, He Y, Bao J. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(6): 4480-8.
- [63] Chandel A K, Garlapati V K, Singh A K, Antunes F A F, da Silva S S. The path forward for lignocellulose biorefineries: Bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization [J]. *Bioresour Technol*, 2018, 264: 370-81.
- [64] He Y, Zhang J, Bao J. Acceleration of biodetoxification on dilute acid pretreated lignocellulose feedstock by aeration and the consequent ethanol fermentation evaluation [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9(1): 19.
- [65] Guo H, Zhao Y, Chang J S, Lee D J. Inhibitor formation and detoxification during lignocellulose biorefinery: A review [J]. *Bioresour Technol*, 2022, 361: 127666.
- [66] Raj T, Chandrasekhar K, Morya R, Kumar Pandey A, Jung J-H, Kumar D, Singhania R R, Kim S-H. Critical challenges and technological breakthroughs in food waste hydrolysis and detoxification for fuels and chemicals production [J]. *Bioresource Technology*, 2022, 360: 127512.
- [67] Suryadi H, Judono J J, Putri M R, Eclessia A D, Ulhaq J M, Agustina D N, Sumiati T. Biodelignification of lignocellulose using ligninolytic enzymes from white-rot fungi [J]. *Heliyon*, 2022, 8(2): e08865.
- [68] Xie Y, Hu Q, Feng G, Jiang X, Hu J, He M, Hu G, Zhao S, Liang Y, Ruan Z, Peng N. Biodetoxification of phenolic inhibitors from lignocellulose Pretreatment using *Kurthia huakuii* LAM0618(T) and subsequent lactic acid fermentation [J]. *Molecules*, 2018, 23(10).

- [69] Zhang B, Zhan B, Bao J. Reframing biorefinery processing chain of corn fiber for cellulosic ethanol production [J]. *Industrial Crops and Products*, 2021, 170: 113791.
- [70] Zhang B, Khushik F A, Zhan B, Bao J. Transformation of lignocellulose to starch-like carbohydrates by organic acid-catalyzed pretreatment and biological detoxification [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(10): 4105-18.
- [71] Han T, Zhang B, Yang H, Liu X, Bao J. Changes in pH values allow for a visible detection of the end point in submerged liquid biodetoxification during biorefinery processing [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2023, 11(46): 16608-17.
- [72] Sangproo M, Polyiam P, Jantama S S, Kanchanatawee S, Jantama K. Metabolic engineering of *Klebsiella oxytoca* M5a1 to produce optically pure d-lactate in mineral salts medium [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 119: 191-8.
- [73] Aksu Z, Kutsal T. Lactic acid production from molasses utilizing *Lactobacillus delbrueckii* and invertase together [J]. *Biotechnology Letters*, 1986, 8(3): 157-60.
- [74] Tiwari K P, Pandey A, Mishra N. Lactic acid production from molasses by mixed population of lactobacilli [J]. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene Zweite naturwissenschaftliche Abteilung: Mikrobiologie der Landwirtschaft der Technologie und des Umweltschutzes*, 1979, 134(6): 544-6.
- [75] Monteagudo J M, Rodríguez L, Rincón J, Fuertes J. Kinetics of lactic acid fermentation by *Lactobacillus delbrueckii* grown on beet molasses [J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1997, 68(3): 271-6.
- [76] Göksungur Y, Güvenç U. Batch and continuous production of lactic acid from beet molasses by *Lactobacillus delbrueckii* IFO 3202 [J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1997, 69(4): 399-404.
- [77] Xu K, Xu P. Efficient production of l-lactic acid using co-feeding strategy based on cane molasses/glucose carbon sources [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 153: 23-9.
- [78] Hanssen O J, Syversen F, Stø E. Edible food waste from Norwegian households - Detailed food waste composition analysis among households in two different regions in Norway [J]. *Resources, Conservation and Recycling*, 2016, 109: 146-54.
- [79] Ahmad A, Banat F, Taher H. A review on the lactic acid fermentation from low-cost renewable materials: Recent developments and challenges [J]. *Environmental Technology and Innovation*, 2020, 20.

- [80] Peinemann J C, Demichelis F, Fiore S, Pleissner D. Techno-economic assessment of non-sterile batch and continuous production of lactic acid from food waste [J]. *Bioresource Technology*, 2019, 289.
- [81] Yousuf A, Bastidas-Oyanedel J-R, Schmidt J E. Effect of total solid content and pretreatment on the production of lactic acid from mixed culture dark fermentation of food waste [J]. *Waste Management*, 2018, 77: 516-21.
- [82] Juturu V, Wu J C. Microbial production of lactic acid: the latest development [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2016, 36(6): 967-77.
- [83] Nguyen C M, Kim J S, Hwang H J, Park M S, Choi G J, Choi Y H, Jang K S, Kim J C. Production of l-lactic acid from a green microalga, *Hydrodictyon reticulum*, by *Lactobacillus paracasei* LA104 isolated from the traditional Korean food, makgeolli [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 110: 552-9.
- [84] Schenk P M, Thomas-Hall S R, Stephens E, Marx U C, Mussgnug J H, Posten C, Kruse O, Hankamer B. Second generation biofuels: High-efficiency microalgae for biodiesel production [J]. *BioEnergy Research*, 2008, 1(1): 20-43.
- [85] Oliveira R A d, Komesu A, Rossell C E V, Filho R M. Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design—From economic to production aspects [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2018, 133: 219-39.
- [86] He N, Jia J, Qiu Z, Fang C, Lidén G, Liu X, Bao J. Cyclic l-lactide synthesis from lignocellulose biomass by biorefining with complete inhibitor removal and highly simultaneous sugars assimilation [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2022, 119(7): 1903-15.
- [87] Nancib A, Nancib N, Meziane-Cherif D, Boubendir A, Fick M, Boudrant J. Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* [J]. *Bioresource Technology*, 2005, 96(1): 63-7.
- [88] 王晓杰, 夏春荣, 刘晓兰. 米曲霉发酵 100%玉米浆的工艺条件优化 [J]. *食品与发酵工业*, 2023: 1-10.
- [89] Zhou K, Yu J, Ma Y, Cai L, Zheng L, Gong W, Liu Q-a. Corn steep liquor: Green biological resources for bioindustry [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2022, 194(7): 3280-95.
- [90] Kona R P, Qureshi N, Pai J S. Production of glucose oxidase using *Aspergillus niger* and corn steep liquor [J]. *Bioresource Technology*, 2001, 78(2): 123-6.

- [91] Agarwal L, Isar J, Meghwanshi G K, Saxena R K. A cost effective fermentative production of succinic acid from cane molasses and corn steep liquor by *Escherichia coli* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 100(6): 1348-54.
- [92] de la Torre I, Ladero M, Santos V E. Production of d-lactic acid by *Lactobacillus delbrueckii ssp. delbrueckii* from orange peel waste: techno-economical assessment of nitrogen sources [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2018, 102(24): 10511-21.
- [93] Wang Y, Chen C, Cai D, Wang Z, Qin P, Tan T. The optimization of l-lactic acid production from sweet sorghum juice by mixed fermentation of *Bacillus coagulans* and *Lactobacillus rhamnosus* under unsterile conditions [J]. Bioresource Technology, 2016, 218: 1098-105.
- [94] 李建. 发酵豆粕研究进展 [J]. 粮食与饲料工业, 2009, (06): 31-5.
- [95] Liang S, Jiang W, Song Y, Zhou S-F. Improvement and metabolomics-based analysis of d-lactic acid production from agro-industrial wastes by *Lactobacillus delbrueckii* submitted to adaptive laboratory evolution [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2020, 68(29): 7660-9.
- [96] Tian X, Jiang A, Mao Y, Wu B, He M, Hu W, Chen J, Li W. Efficient l-lactic acid production from purified sweet sorghum juice coupled with soybean hydrolysate as nitrogen source by *Lactobacillus thermophilus* A69 strain [J]. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2019, 94(6): 1752-9.
- [97] Zhang B, Wu L, Liu X, Bao J. Plant proteins as an alternative nitrogen source for chiral purity L-lactic acid fermentation from lignocellulose feedstock [J]. Fermentation, 2022, 8: 546.
- [98] Wang L, Zhao B, Li F, Xu K, Ma C, Tao F, Li Q, Xu P. Highly efficient production of D-lactate by *Sporolactobacillus sp.* CASD with simultaneous enzymatic hydrolysis of peanut meal [J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2011, 89(4): 1009-17.
- [99] Brock S, Kuenz A, Prüße U. Impact of Hydrolysis Methods on the Utilization of Agricultural Residues as Nutrient Source for D-lactic Acid Production by *Sporolactobacillus inulinus* [J]. Fermentation, 2019, 5(1): 12.
- [100] Proteins: From sequence to structure [J]. Chinese Physics B, 2014, 23(7): 078705.
- [101] Kristinsson H G, Rasco B A. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties [J]. Critical Reviews In Food Science And Nutrition, 2000, 40(1): 43-81.

- [102] Tannenbaum S R, Ahern M, Bates R P. Solubilization of fish protein concentrate: an alkaline process [J]. *Food Technology*, 1970, 24(5): 96-9.
- [103] 张晓峰, 王海花, 潘春梅. 豆粕寡肽的制备工艺 [J]. *畜牧与兽医*, 2018, 50(04): 45-9.
- [104] Ooi K Y, Wu J C. Use of dry yeast cells as a cheap nitrogen source for lactic acid production by thermophilic *Bacillus coagulans* WCP10-4 [J]. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*, 2015, 9: 381-5.
- [105] Yao W, Wu X, Zhu J, Sun B, Miller C. Utilization of protein extract from dairy manure as a nitrogen source by *Rhizopus oryzae* NRRL-395 for l-lactic acid production [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(11): 4132-8.
- [106] Gao M T, Kaneko M, Hirata M, Toorisaka E, Hano T. Utilization of rice bran as nutrient source for fermentative lactic acid production [J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(9): 3659-64.
- [107] Wang Y, Yang Z, Qin P, Tan T. Fermentative l-(+)-lactic acid production from defatted rice bran [J]. *RSC Advances*, 2014, 4(17): 8907-13.
- [108] Lu Z, He F, Shi Y, Lu M, Yu L. Fermentative production of L(+)-lactic acid using hydrolyzed acorn starch, persimmon juice and wheat bran hydrolysate as nutrients [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(10): 3642-8.
- [109] Michalczyk A K, Garbaczewska S, Morytz B, Białek A, Zakrzewski J. Influence of Nitrogen Sources on D-Lactic Acid Biosynthesis by *Sporolactobacillus laevolacticus* DSM 442 Strain [J]. *Fermentation*, 2021, 7(2): 78.
- [110] Sun Y, Xu Z, Zheng Y, Zhou J, Xiu Z. Efficient production of lactic acid from sugarcane molasses by a newly microbial consortium CEE-DL15 [J]. *Process Biochemistry*, 2019, 81: 132-8.
- [111] Ncube L K, Ude A U, Ogunmuyiwa E N, Zulkifli R, Beas I N. Environmental impact of food packaging materials: A review of contemporary development from conventional plastics to polylactic acid based materials [J]. *Materials*, 2020, 13(21): 4994.
- [112] Han X, Huang K, Tang H, Ni J, Liu J, Xu P, Tao F. Steps toward high-performance PLA: Economical production of d-lactate enabled by a newly isolated *Sporolactobacillus terrae* strain [J]. *Biotechnology Journal*, 2019, 14(5): 1800656.
- [113] Liu J, Han X, Tao F, Xu P. Metabolic engineering of *Geobacillus thermoglucosidasius* for polymer-grade lactic acid production at high temperature [J]. *Bioresource Technology*, 2024, 393: 130164.

- [114] Sluiterp. A, Hames. B, Ruiz. R, Scarlata. C, Sluiter. J, Templeton. D, Crocker. D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass national renewable, NREL/TP-510-42618 [Z]. National Renewable Energy Laboratory (NREL): Golden, CO, USA. 2012.
- [115] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1): 248-54.
- [116] Qiu Z, Gao Q, Bao J. Engineering *Pediococcus acidilactici* with xylose assimilation pathway for high titer cellulosic l-lactic acid fermentation [J]. Bioresource Technology, 2018, 249: 9-15.
- [117] Liu G, Sun J, Zhang J, Tu Y, Bao J. High titer l-lactic acid production from corn stover with minimum wastewater generation and techno-economic evaluation based on Aspen plus modeling [J]. Bioresource Technology, 2015, 198: 803-10.
- [118] Adler-Nissen J. Enzymic hydrolysis of food protein [M]. 1986.
- [119] Tian X, Chen H, Liu H, Chen J. Recent advances in lactic acid production by lactic acid bacteria [J]. Applied Biochemistry Biotechnology, 2021, 193(12): 4151-71.
- [120] Li J, Sun J, Wu B, He B. Combined utilization of nutrients and sugar derived from wheat bran for d-Lactate fermentation by *Sporolactobacillus inulinus* YBS1-5 [J]. Bioresource Technology, 2017, 229: 33-8.
- [121] Zhang L, Zheng H, Zhang X, Chen X, Liu Y, Tang Y, Zhang W, Wang Z, Zhao L, Guo Y. Effective Degradation of free gossypol in defatted cottonseed meal by bacterial laccases: Performance and toxicity analysis [J]. Foods, 2024, 13(4).
- [122] Wang W-K, Yang H-J, Wang Y-L, Yang K-L, Jiang L-S, Li S-L. Gossypol detoxification in the rumen and *Helicoverpa armigera* larvae: A review [J]. Animal Nutrition, 2021, 7(4): 967-72.
- [123] Zhang Y, Vadlani P V, Kumar A, Hardwidge P R, Govind R, Tanaka T, Kondo A. Enhanced d-lactic acid production from renewable resources using engineered *Lactobacillus plantarum* [J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2016, 100(1): 279-88.
- [124] Nguyen C M, Kim J-S, Nguyen T N, Kim S K, Choi G J, Choi Y H, Jang K S, Kim J-C. Production of l- and d-lactic acid from waste *Curcuma longa* biomass through simultaneous saccharification and cofermentation [J]. Bioresource Technology, 2013, 146: 35-43.

- [125] Lu Z, Lu M, He F, Yu L. An economical approach for d-lactic acid production utilizing unpolished rice from aging paddy as major nutrient source [J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(6): 2026-31.
- [126] Qiu Z, Gao Q, Bao J. Constructing xylose-assimilating pathways in *Pediococcus acidilactici* for high titer d-lactic acid fermentation from corn stover feedstock [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 245: 1369-76.
- [127] Kall M. Determination of total vitamin B6 in foods by isocratic HPLC: A comparison with microbiological analysis [J]. *Food Chemistry*, 2003, 82: 315-27.
- [128] 李坤朋, 许雅洁, 赵锦芳, 王金华. 大肠杆菌工程菌利用玉米浆发酵产 L-乳酸的研究 [J]. *中国酿造*, 2012, 31(12): 64-7.
- [129] 李文友, 赵学明. 玉米浆为有机氮源的 L-乳酸发酵的研究 [J]. *化工时刊*, 2006, (09): 61-3.
- [130] 潘微, 熊莲, 彭万峰, 陈新德, 陈勇. 玉米浆干粉在葡萄糖和木糖混合丙酮丁醇发酵中的应用 [J]. *化工进展*, 2011, 30(12): 2699-703.

## 学术成果

已发表论文:

Bin Zhang<sup>1</sup>, **Ying Han**<sup>1</sup>, Jie Bao\*. Formulating the racemic lactic acids-free nitrogen ingredients from plant proteins for cellulosic chiral lactic acid fermentation. **Industrial Crops & Products**.

## 致谢

感谢鲍杰教授和张斌博士，这两位老师在三年的科研生涯里给我提供了很多建议，帮助我不断提高和改变自己；感谢已经毕业的吴雷、杨虎成、任大宇师兄以及郭晓梦师姐；感谢王雅、刘祺、何妮玲、徐迎迎、宋卓琳、冀娇师姐以及韩涛、张翼、李治斌、王安与普利斯师兄；感谢我的同门武师南、张凌霄、陈峙苇、韩庆美、刘娇以及我的室友骆超超；感谢王新茹、王洁、张兵言、渠超龙、李少凯、黄意程、郭海润师弟师妹们，祝你们科研顺利；感谢给予我支持的家人；最后感谢坚持的自己。无论如何，多谢大家对我生活及科研上的帮助，祝你们生活开心。

# 卷内备考表

本卷情况说明

本卷共 陆拾陆 页

立卷人 \_\_\_\_\_

检查人 \_\_\_\_\_

立卷时间 \_\_\_\_\_