



环境友好材料的 生产与应用

陈 坚 堵国成 编著



化学工业出版社

环境科学与工程出版中心

环境友好材料的生产与应用

陈 坚 堵国成 编著

化学工业出版社
环境科学与工程出版中心
·北 京·

(京)新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

环境友好材料的生产与应用/陈坚, 堵国成编著.
北京: 化学工业出版社, 2002.4
ISBN 7-5025-3721-X

I. 环… II. ①陈…②堵… III. 产品-无污染技术
IV. X384

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2002) 第 013497 号

环境友好材料的生产与应用

陈 坚 堵国成 编著

责任编辑: 董 琳

责任校对: 洪雅姝

封面设计: 蒋艳君

*

化 学 工 业 出 版 社 出版发行
环境科学与工程出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010) 64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京市云浩印刷厂印刷

三河市延风装订厂装订

开本 787×1092 毫米 1/16 印张 22 字数 549 千字

2002 年 4 月第 1 版 2002 年 4 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-3721-X/X·154

定 价: 46.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

前 言

环境保护技术包括水污染控制、大气污染治理、有毒有害物质的降解、清洁可再生能源的开发、废物处置(资源化)、环境监测、环境友好材料的合成、污染环境的修复,以及污染严重的工业企业的清洁生产等方面,其中环境友好材料的生产与应用,主要属于环境生物技术的学科范畴。环境生物技术(Environmental Biotechnology)是近20年来发展起来的一门由现代生物工程与环境工程相结合的新兴交叉学科。国际环境生物技术学会(ISEB)认为,环境生物技术是开发、利用和调节生物系统进行污染环境(土地、水、空气)的补救和环境友好的产品生产过程(包括绿色加工技术和可持续发展技术)。

从广义上讲,环境友好材料应包括两个方面的内容,一是用于污染物源头控制的、对环境有害的已有材料的替代品,如可降解塑料、生物表面活性剂和生物农药等,以及某些环境友好的酶制剂,其应用可以大大减少环境污染问题;二是作用于环境、有利于环境质量控制和改善、其本身也不会产生污染的物质,如环境微生物制剂、环保用酶制剂、生物吸附剂和生物絮凝剂等。虽然国内外学术期刊每年都会发表大量的环境友好材料的研究报告,但对环境友好材料生产与应用进行系统介绍的书籍尚不多见。在借鉴了国外环境友好材料最新研究成果的基础上,考虑到国内的具体情况,作者结合自己多年在环境友好材料方面的研究成果,在本书中对目前环境友好材料从生产、应用和研究前景的角度进行了总体描述。作者不仅对产品生产方法进行了技术阐述,而且提出了进一步研究和工业化的方向,考虑到应用问题,书中也给出了这些技术和产品商业化的状态、程度或应用情况,以及技术或产品生产的经济性。环境友好材料的类别非常之多,但生产和应用的方法是在一定程度上进行通用或借鉴的。作者希望本书有良好的前沿性和科学性、有很强的应用性和实践性,给读者以广泛的参考价值。

参与本书编写工作的还有:王峰(第二章),董云舟(第三章),张兴(第八章)。作者特别感谢中国工程院院士、江南大学(原无锡轻工大学)生物工程学院伦世仪教授的鼓励和指导,感谢所在研究室的博士、硕士研究生给予的帮助。此外,作者还得到了教育部优秀青年教师教学、科研奖励基金的资助。

尽管作者力图在本书中注重系统性、实践性和前沿性,但由于环境友好材料的生产与应用是一门新兴的交叉学科,作者从事这一领域的研究时间不长,书中可能会有错误。若蒙赐教,不胜感激!

编著者

2002.1

目 录

第一篇 环境友好塑料的生产

第一章 聚乳酸的生产与应用	1
第一节 概述	1
第二节 乳酸的生物合成	2
第三节 聚乳酸的合成	11
第四节 聚乳酸的性质和应用	19
参考文献	25
第二章 光降解塑料	26
第一节 概述	26
第二节 光降解过程及机理	29
第三节 光降解塑料的生产	36
第四节 光降解塑料的性能测试方法和手段	37
第五节 光降解塑料的应用	40
参考文献	44
第三章 淀粉塑料的生产与应用	45
第一节 概述	45
第二节 淀粉/聚合物共混塑料	45
第三节 热塑性淀粉	55
第四节 淀粉塑料的应用与存在问题	59
参考文献	62
第四章 聚 β -羟基烷酸 (PHAs) 的生产与应用	63
第一节 概述	63
第二节 聚 β -羟基烷酸的生物合成	66
第三节 聚 β -羟基烷酸流加发酵优化	82
第四节 聚 β -羟基烷酸的提取	104
第五节 聚 β -羟基烷酸的降解	107
第六节 PHAs 的工业化	110
参考文献	113

第二篇 环境友好化学品的生产与应用

第五章 环境友好的重要酶制剂的生产与应用	114
第一节 酶与环境保护	114
第二节 造纸生物技术和木聚糖酶	116
第三节 动物营养生物技术和植酸酶	126

第四节	皮革工业环境友好技术与酶制剂	139
	参考文献	149
第六章	生物表面活性剂的生产与应用	150
第一节	生物表面活性剂概述	150
第二节	生物表面活性剂的发酵生产	162
第三节	生物表面活性剂的合成代谢调节与提取	169
第四节	生物表面活性剂的酶法合成	172
第五节	生物表面活性剂的应用与前景	176
	参考文献	183
第七章	生物农药	184
第一节	农药的现状与发展	184
第二节	生物农药概况	193
第三节	微生物农药	194
第四节	农用抗生素	206
第五节	源于植物的生理活性物质	208
第六节	昆虫生长调节剂	210
第七节	生物农药的问题和发展趋势	211
第八节	我国生物农药的状况和发展	214
	参考文献	216

第三篇 环境质量控制生物制品的生产与应用

第八章	环境微生物制剂	217
第一节	水体脱氮微生物制剂的生产与应用	217
第二节	废水脱色微生物制剂的生产与应用	232
第三节	固体废物消化微生物制剂的生产与应用	240
	参考文献	247
第九章	环保用酶制剂的生产与应用	249
第一节	单加氧酶	249
第二节	木素过氧化物酶	257
第三节	漆酶	274
第四节	极端酶的稳定性及其在废水处理中的应用	276
第五节	环保用酶的固定化	279
	参考文献	284
第十章	生物吸附剂的生产与应用	286
第一节	概述	286
第二节	废水中重金属的种类、来源及其对环境的影响	287
第三节	生物吸附材料的种类	289
第四节	生物吸附机理和吸附动力学	292
第五节	生物吸附剂的制备	298
第六节	生物吸附工艺过程	302

第七节	生物吸附技术的可行性分析	304
第八节	生物吸附剂的应用	305
	参考文献	312
第十一章	生物絮凝剂的生产与应用	314
第一节	水处理剂概述	314
第二节	絮凝剂和生物絮凝剂	317
第三节	生物絮凝剂的基础研究	321
第四节	生物絮凝剂的发酵生产	330
第五节	生物絮凝剂的应用	339
	参考文献	343

第一篇 环境友好塑料的生产

第一章 聚乳酸的生产与应用

第一节 概 述

聚乳酸的研制和开发可追溯到 20 世纪 30 年代，著名高分子化学家 Carothers 对聚乳酸的合成做过报道，但他所得到的聚合物分子量较低，化学性能差，实际用途不大。

1944 年，Filachiene 在 Hovey、Hodgins 及 Begji 研究基础之上，对当时聚乳酸的聚合方法进行了系统的探索，但得到的聚合物分子量仍较低。

1954 年，Du Pont 公司采用新型的聚合方法制备出高分子量的聚乳酸，并对聚合过程申请了专利，但由于当时人们对其性能认识尚不充分，聚乳酸未能进入实用性阶段。

1962 年，美国 Cyanamind 公司发现用聚乳酸制成的可吸收缝合线，克服了以往用多肽制备的缝合线所具有的过敏性，其降解产物乳酸、二氧化碳、水均是无害的天然小分子。

20 世纪 70 年代，聚乳酸在人体内的易分解性和分解产物的高度安全性得到确认。1987 年，Leenslag 等采用四苯基锡为催化剂，制备出高分子量的聚乳酸。在 20 世纪 70~80 年代，有关乳酸聚合物的聚合机制、结构和性质的研究有了很大进展。由于这些研究，以及乳酸发酵和提取技术的重要改进，使得目前人们可以开始进入聚乳酸生产技术和应用推广阶段。

20 世纪 90 年代以后，由于环保的呼声越来越强，人们将目光集中在聚乳酸的性能改进方面，着重进行改性研究及加工工艺的改进，这一时期的研究非常活跃，并取得了一定的成果。从 20 世纪 90 年代至今，国际市场上相继出现了 5 种牌号的聚乳酸树脂。对于其市场前景，生产商 Cargill Dow 公司的总裁认为聚乳酸树脂代替现有的降解材料已成为必然，并具有与烯烃类聚合物竞争的能力。

聚乳酸属于最容易生物降解的热塑料材料——脂肪族聚酯类化合物中的一种，是国内外近年来开发研究最活跃的降解材料之一。聚乳酸是以淀粉、糖蜜等为原料，发酵制得乳酸，再通过化学方法合成的高分子材料，是生物降解性材料中最有发展前途的品种之一。

由于乳酸存在一个羟基和一个羧基 ($\text{HOCH}(\text{CH}_3)\text{COOH}$)，因此，它可以通过聚缩反应被直接转化成低分子量的聚酯。Carother 的前期研究给出了一个合成高分子量聚合物的两步法。第一步是合成环状的乳酸二聚体——丙交酯，并除去副产物水。在第二步，纯化的丙交酯单体通过开环聚合反应被转化成高分子量的聚酯。通过选择适宜的聚合条件，可以合成得到所希望分子量的聚合物。

乳酸是具有光学活性的最小的分子之一。乳酸和丙交酯不仅可以被加工成各种立体异构体，而且通过采用不同异构体得到的聚合物或其衍生物，可具有非常不同的物理和化学性质。

出于塑料废物对环境的污染，人们对可降解塑料的兴趣逐渐增强。传统的化学合成塑料

由于分子量大和疏水性，在环境中很难被降解。事实上，科学家们对传统塑料的降解、再利用、焚烧和转化也作过很多工作，但是，至今塑料废物仍然是一个主要的环境问题。

与塑料饮料瓶不同，某些经常使用的东西，如被污染的食品包装材料、尿布、医院物品，以及妇女卫生用品是不好收集和再使用的。为了满足这些方面的应用需求，乳酸类塑料正在被人们不断开发。

第二节 乳酸的生物合成

一、乳酸合成的生物化学和微生物学

1. 背景

乳酸 (2-hydroxypropanoic acid) 的发酵生产是大家有所共知的。Scheele 在 1780 年从酸牛奶中分离出了乳酸菌，Pasteur 发现这些微生物是牛奶变酸的原因。从 1881 年开始，乳酸菌就被用于工业上生产奶酪、香肠、泡菜和乳酸。在 20 世纪 50~60 年代，乳酸发酵的生化知识得到很大进展。现在，我们面临的关键可能是采用基因工程技术来进行乳酸菌的进一步改造。

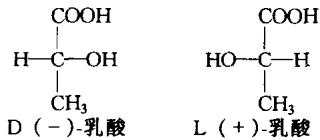


图 1-2-1 乳酸的对映异构体

2. 乳酸代谢途径

乳酸有两种光学异构体，如图 1-2-1 所示。L(+) 型异构体存在于哺乳动物中，很容易被人体吸收。在细菌中，L(+) 和 D(-) 型都存在，它是发酵的终端产物，由丙酮酸还原产生，同时有 NAD^+ 的再生。反应是由以 NAD^+ 为辅基的乳酸脱氢酶催化进行。但是有些细菌中含有无 NAD^+ 为辅基的乳酸脱氢酶，不会造成 NADH_2 的氧化。

乳酸菌的主要代谢发酵分为同型发酵 (homefermentative) 和异型发酵 (heterofermentative) 两部分，具体代谢途径如图 1-2-2 所示。

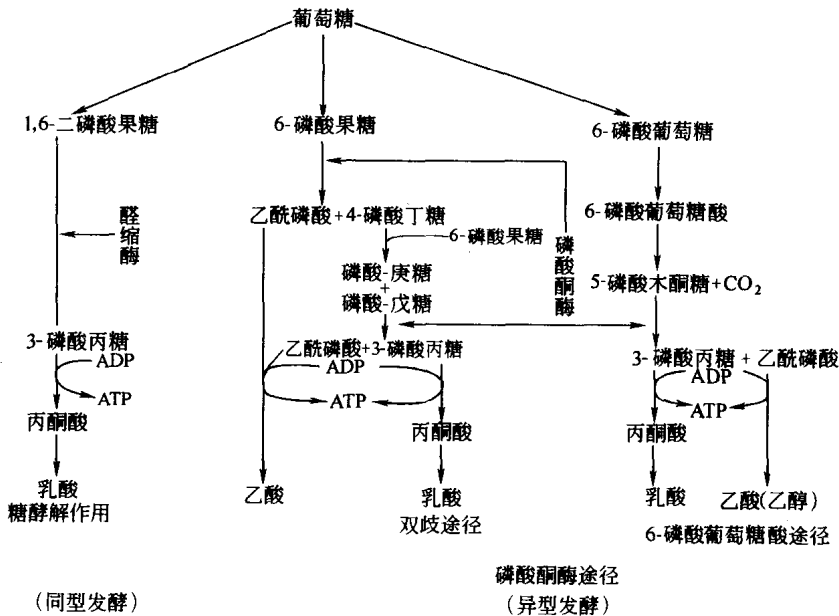


图 1-2-2 乳酸菌中己糖发酵的主要途径

同型发酵细菌通过 Embden-Meyerhof 途径分解代谢己糖，从每摩尔己糖可得到高达 1.8mol 的乳酸，其他产物如乙酸、乙醇和二氧化碳很少。这个转化率相当于从每 100g 葡萄糖产生大于 90g 的乳酸。异型发酵代谢己糖产生的乳酸较少，有较多的其他代谢产物产生，如乙酸、乙醇、甘油、甲酸、甘露醇以及二氧化碳。异型发酵有两条途径，一是 Bifidus 途径，产生的乙酸和乳酸的摩尔比为 3:2；另一条是 6-磷酸葡萄糖途径，产生等摩尔的乳酸、二氧化碳和乙酸或乙醇。由于同型发酵途径乳酸产率高、副产物少，因此其在乳酸工业生产中具有重要的地位。

发酵产生的乳酸异构体类型取决于菌体所具有的乳酸脱氢酶的立体特异性。当一种菌株中同时具有 L-型和 D-型乳酸脱氢酶时，会产生外消旋混合物，或者在有些时候，乳酸脱氢酶产生 L-乳酸后，在乳酸外消旋酶作用下也会得到外消旋混合物。

3. 微生物选育

有许多微生物可以发酵生产乳酸，但是工业上使用的大多数菌株都是乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*) 属。其中有些菌有很高的乳酸合成速率和产率，并且所希望的发酵条件 (温度高于 40℃，较低 pH 值，低氧浓度和高乳酸浓度) 使过程不易染菌。

乳酸杆菌的分类包括专性同型发酵、兼性异型发酵和专性异型发酵。前两类中有些菌具有工业生产价值，因为这些菌以己糖为基质发酵，主要产物是乳酸。对这两类菌选育的基准是：产生乳酸的立体异构性；能利用的碳水化合物类型；复杂营养物 (如维生素和氨基酸) 的需求情况。发酵副产物和对乳酸的承受程度也是要考虑的。总之，最希望得到的菌株能利用便宜的原料快速和完全发酵，需要很少的其他营养。最佳的菌株还应该具有大量生产特定立体结构的乳酸、细胞产量很小、副产物几乎可以忽略的特点。

(1) 异构体的立体特性 采用的菌株生产产品 (乳酸) 的立体异构体情况可以首先查阅文献，然后进行实验验证。由于不同菌体产生的乳酸的立体结构不同，因此，进行实验验证是非常重要的。另外，不同发酵条件也会得到不同的乳酸。

主要生产 L (+) 乳酸的菌种包括 *L. amylophilus*, *L. bavaricus*, *L. casei*, *L. malta-ronicus* 和 *L. salivarius*。生产 D (-) 的菌种有 *L. coryniformis*, *L. delbrueckii* 和 *L. jensenii*。几种乳酸杆菌生产乳酸异构体的情况如表 1-2-1 所示。

表 1-2-1 代表性乳酸杆菌生产乳酸异构体的情况

同型发酵菌	乳酸异构体	兼性异型发酵菌	乳酸异构体
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	D	<i>L. agilis</i>	L
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	D	<i>L. bavaricus</i>	L
<i>L. acidophilus</i>	D/L	<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>	L
<i>L. amylophilus</i>	L	<i>L. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i>	D
<i>L. amylovorus</i>	D/L	<i>L. curvatus</i>	D/L
<i>L. helveticus</i>	D/L	<i>L. homohiochii</i>	D/L
<i>L. jensenii</i>	D	<i>L. maltaromicus</i>	L
<i>L. salivarius</i>	D	<i>L. plantarum</i>	D/L

注：D 或 L 表示总乳酸中该型异构体达到 90% 或以上；D/L 表示总乳酸中 25%~75% 是 L (+) 型。

(2) 可利用的碳水化合物 菌种选育时也要考虑发酵所要提供的碳水化合物。能利用的碳水化合物的范围因菌种而异，可以查些资料，然后进行实验确定。代表性乳酸杆菌所能利用的碳水化合物见表 1-2-2。

用于乳酸发酵的碳水化合物基本上都是农副产品，包括葡萄糖和麦芽糖 (瓜干和玉米淀

表 1-2-2 代表性乳酸杆菌所能利用的碳水化合物

菌 种	碳 水 化 合 物											
	纤维二糖	果糖	半乳糖	葡萄糖	乳糖	麦芽糖	甘露糖	松三糖	核糖	山梨糖	蔗糖	海藻糖
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	d	+	-	+	-	d	-	-	-	+	+	d
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
<i>L. acidophilus</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	d
<i>L. helveticus</i>	-	d	+	+	+	d	-	-	-	+	-	d
<i>L. bavaricus</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
<i>L. casei</i> subsp. <i>casei</i>	+	+	+	+	d	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. curvatus</i>	+	+	+	+	d	+	-	-	+	-	-	-
<i>L. plantarum</i>	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+

注：+表示一生长；-表示一不生长；d表示一取决于不同菌株。

粉水解产物)、蔗糖(甘蔗和甜菜制糖)和乳糖(来自干酪乳清)。采用这些原料在工业上生产乳酸已有很长的历史。制浆造纸产生的亚硫酸盐废液也被尝试过,但用这种原料发酵前需进行预处理。亚硫酸盐废物中含有许多戊糖,由此假如采用兼性异型发酵菌,会有大量乙酸产生。

除了这些原料以外,采用淀粉降解乳杆菌(*L. amylovorus*),或用霉菌(*Aspergillus awamori*)和乳酸链球菌(*Streptococcus lactis*)两步法,直接利用淀粉发酵生产乳酸,也有一些研究。以淀粉直接发酵生产乳酸的产率和速率与采用其他原料时的分批发酵相同,但是这一技术还未工业化。近来,也有尝试利用大麦、木薯、玉米、燕麦或大米得到一些简单的糖,用霉菌米根霉(*Rhizopus oryzae*)直接发酵生产乳酸。但是产率不是令人非常满意,用木薯乳酸得率仅达到70%。通过对菌种和发酵过程进行优化可能会有工业应用价值。

到目前为止,在20世纪30~50年代使用的乳酸发酵原料还会继续使用。由于乳酸聚合物的应用前景非常看好,几个公司和研究所都宣称他们已经开发或正在开发利用这些农副产品生产乳酸的技术,其中包括由美国Argonne国家实验室开发的采用土豆加工下脚料的生产技术,由Batelle开发的采用糖蜜、土豆加工下脚料和乳清的生产技术,由生物化学产品(EcoChem)公司(杜邦和ConAgra的合资公司)开发的采用干酪乳清的生产技术,以及由Cargill和Archer-Daniel Midland开发的采用玉米淀粉生产技术。

(3) 营养需求 乳酸杆菌是一类对营养要求非常苛刻的微生物,需要包括维生素、核苷、氨基酸和无机盐等。所以,一些发酵培养基中常常加入酵母膏、玉米浆、棉籽粉或大豆粉。这些物质的加入会对生产成本有很大的影响,所以需求量要把握好,包括发酵运行成本与培养基成本的关系要确定。由于乳酸菌有的需求不是很清楚,因而经常需要通过实验得出。

所有的乳酸杆菌都需要维生素B,有些菌还需要一些特定的维生素。具体需要的种类因特定菌种而异。不同菌株需要氨基酸的种类基本相似。对特定菌株这些具体的营养要求已由Bergey和Snell进行了综述。

在酵母膏、玉米浆等中,有些成分对菌体生长并不是必要的,但对乳酸杆菌有刺激作用。例如,在玉米浆中含的氨基酸和肽对*L. casei*有刺激作用;番茄酱中含的核酸和核苷对有些乳酸菌有刺激作用。不饱和脂肪酸和甲酸也被发现对有些乳酸菌有刺激作用。

由于乳酸杆菌的生长因子比较复杂和多变,因此最好的方法是针对特定的菌进行培养基优化。例如,Cox等发现对保加利亚乳杆菌(*L. bulgaricus*),酵母膏比玉米浆好,但是两者对菌体产乳酸又有协同作用。Roy等也发现对瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)酵母膏是比玉

米浆好的一种氮源。甜菜糖蜜曾被发现对 *L. helveticus* 的乳酸产率，能起与酵母膏一样的作用，但合成速率略低一些。对 *L. amylovorus*，从碳水化合物利用的角度，棉籽水解物和植物蛋白胨和酵母膏效果一样。这些相同的研究结果表明，更充分水解的氮源物质（游离氨基酸较多）比不充分水解的要产较少乳酸。这一结论在有学者研究以乳清水解物用 *L. bulgaricus* 生产乳酸时得到了进一步证实。

4. 代谢调控

同型发酵和兼性异型发酵乳酸菌通过 Embden-Meyerhof 途径氧化己糖成丙酮酸，然后丙酮酸再主要被还原成乳酸。但是，假如条件合适的话，其他一些发酵产物也会形成。代谢中间产物的种类和浓度与菌种有关，也与环境条件（如培养基组成、pH 值和还原电位）有关。图 1-2-3 为乳酸发酵中丙酮酸厌氧代谢途径。

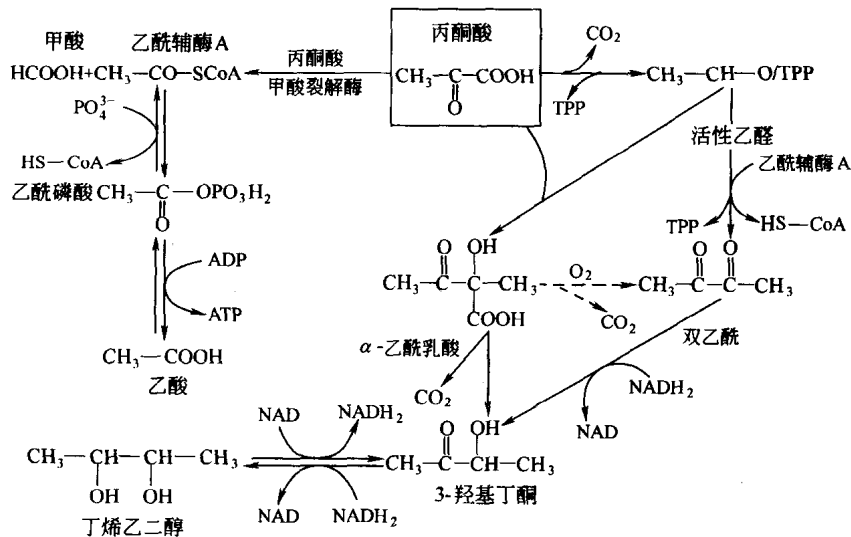


图 1-2-3 乳酸菌中丙酮酸厌氧代谢途径

兼性异型发酵菌将己糖代谢成乳酸，但是如果基质中含有戊糖，那么产物中乳酸、乙酸和 CO_2 将各占一定比例。在葡萄糖限制条件下，同型乳酸发酵会变成异型乳酸发酵，并有乙酸、乙醇和甲酸生成。例如，在低葡萄糖浓度下，*L. casei* 通过己糖非磷酸化途径而不是 Embden-Meyerhof 途径利用葡萄糖，因此，产物将是混合物。又例如，胚芽乳杆菌 (*L. plantarum*) 在低半乳糖浓度下可将大多数丙酮酸代谢成乙酸。

在一定的条件下，一些被归为绝对同型发酵的乳酸菌也会进行异型乳酸发酵。如有研究表明，在葡萄糖限制条件下厌氧生长的 *L. bulgaricus*，当 pH 值改变成碱性时，能异型发酵葡萄糖。这一结果意味着，即使在同型发酵乳酸菌中，也存在其他的丙酮酸代谢途径。

当己糖为惟一碳源时，乳酸发酵中乙酰甲基甲醇和双乙酰通常很低，但是如果丙酮酸多余，这些物质也会大量产生。对嗜酸乳杆菌 (*L. acidophilus*) 加入乳酸，乙酰甲基甲醇和双乙酰的合成会被抑制，但对 *L. casei* 和 *L. brevis*，乙酰甲基甲醇和双乙酰的比生产速率则会增强。

在某些微生物中，如 *L. casei*，乳酸脱氢酶绝对需要 1,6-二磷酸果糖和镁离子。如果这些物质不存在，丙酮酸会被降解成其他产物。

在乳酸菌中，pH 值、溶解氧等环境条件也影响产物的代谢平衡。例如，*L. plantarum*

在厌氧条件下,只有当培养基是碱性时,才能产生乙酸;在好氧条件时,无论培养基是碱性还是酸性,都能产生乙酸。*L.casei* 在好氧或厌氧条件下,不同培养基 pH 值时也会产生不同的产物。另外,其可以将甘露醇转化成乳酸,但在厌氧条件下,甘露醇的转化产物则包括乳酸、乙酸、甲酸和乙醇。

在一定的条件下不仅乳酸菌的发酵产物可以变化,而且乳酸异构体的比例也可调整。例如,用 *L.plantarum* 菌时,在好氧条件下改变培养的 pH 值, L (+) 型和 D (-) 型乳酸的比率将变化。用 *L.casei* 菌时,通过限氮也可得到不同比率的 L (+) 型和 D (-) 型乳酸。

虽然乳酸是同型和兼性异型乳酸发酵菌的主要发酵产物,但在好氧条件下,乳酸会被进一步代谢成乙酸和 CO₂。*L.casei* 和 *L.plantarum* 已被报道能进行乳酸氧化。有学者测试了 23 株乳酸杆菌,其中 21 株被发现能氧化乳酸。

5. 菌种改良

尽管从微生物学研究的起始阶段开始,乳酸杆菌就已经被研究,但是至今,乳酸杆菌的遗传学和基因操作的知识还是非常缺乏。在 20 世纪 80 年代,研究乳酸菌遗传学的研究室有很大增加,得到的信息为采用基因工程技术构建优化的乳酸菌提供了基础。这些技术包括传统的诱变和筛选,也包括重组 DNA 技术。

(1) 传统诱变 对乳酸菌进行化学诱变和照射已取得一些成功,但有关诱变的具体本质还有许多问题不清楚。用 NSG 和 γ 照射处理后的 *L.bulgaricus* 和 *L.casei* 变异株被分离出来后,发现产酸量增加。采用 NSG、甲磺酸乙酯、 γ 照射、UV 照射等得到的 *L.bulgaricus* 和 *L.casei* 变异株也被发现其蛋白水解活性增强。

诱变也用于研究许多营养缺陷型乳酸杆菌的基因损伤问题。失去了许多(但不是全部)氨基酸需求的 *L.casei*、*L.helveticus*、*L.plantarum* 和 *L.acidophilus* 的突变株,可以用多种诱变剂处理后得到。这些研究可以得到一些乳酸菌中调节机制方面的知识,并可能会使乳酸发酵培养基更加简单。最近,采用传统的诱变技术,Argonne National Lab 用紫外照射方法筛选出一株乳酸乳杆菌 (*Lactococcus lactis*) 的乳酸钠抗性株。这种变异株肯定可以在分批或连续发酵中产生高浓度乳酸。类似的研究采用了乙基甲烷进行诱变,也得到了乳酸抗性株,其产乳酸浓度比出发株要明显高一些。

(2) 基因工程 在 20 世纪 80 年代中期,用于乳酸基因改造的手段非常有限,不像其他一些复杂系统如大肠杆菌那样,但现在这方面已有了很大发展,在乳酸菌中克隆和表达同源和异源基因完全可以做到。

为了实现重组 DNA 技术进行乳酸杆菌的改造,已开发出一些适宜的克隆载体和转化系统。起初人们致力于确定原生质体转化系统,但发现这一系统速度慢、效率低并且不稳定。乳酸杆菌的传导也进行了研究,但由于乳酸杆菌噬菌体的基因分析和分子生物学信息较缺乏,应用受到限制。Electroporation 已证明是将 DNA 导入乳酸杆菌的一种有效方法。不少研究者采用这种方法传导 DNA 于不同乳酸杆菌中都得到了较好的结果,但是最佳条件要使不同乳酸杆菌而异。

随着乳酸杆菌基因工程手段的不断完善,有关乳酸杆菌的基因信息也不断增加,这些将用于乳酸生产的改进。进一步的工作可能是改进蛋白酶活性,提高耐酸性,增大乳酸脱氢酶活性,并产生构体绝对单一的乳酸。

二、乳酸发酵过程

1. 环境参数

(1) pH 值的影响 pH 值是发酵过程中很容易控制的参数，它对细胞生长和代谢有很强的作用。从生产的角度来说，为了得到必要的乳酸浓度而使生产过程经济、合理，pH 值控制是绝对需要的。通常，乳酸菌能承受的 pH 值在 3.4~8.0，但生长和生产产品的 pH 值大多在 5.4~6.4，具体最佳值视各菌种而异。

对德氏乳杆菌 (*L. delbrueckii*) 控制 pH 值 4.5~6.0 进行研究发现，在低 pH 值下最大比生长速率下降，总发酵时间延长，在 pH 值 5.4 时细胞产率最大。对 *L. helveticus* 菌，有研究发现，虽然将 pH 值从 4.7 增加到 6.3，乳酸产量也呈线性增长，但在高 pH 值下在发酵结束时，细胞死亡速率很大。

pH 值对乳酸菌的抑制没有直接的影响。低 pH 值将使乳酸的离解平衡朝着非离子形式进行，由于非离子状态的乳酸对微生物是最有毒的，并已有证明会产生抑制，因此低 pH 值使抑制的影响增强。对 *L. delbrueckii*，抑制生长和产物生成的乳酸浓度在 1.3mmol/L，而对 *L. helveticus*，如果乳酸浓度达到 50~70mmol/L，生长将完全停止。

在乳酸发酵中，我们总是希望获得最大的乳酸浓度，因此，一般 pH 值总取在一定的适宜范围的高限。

(2) 温度的影响 大多数乳酸菌在温度 37~42℃ 生长最好，但有些被称为“嗜热”的乳酸菌，温度上限可达 55℃。不同菌株的最佳温度稍微有些不同，如 *L. helveticus*，在温度 38~42℃ 时，生长速率最大，一出这一范围，生长速率急剧下降。而对 *L. amylovorus*，最大乳酸生产速率发生在温度 40~45℃，最终乳酸浓度在温度 30~45℃ 范围内基本相同。也有一些情况，如用奶油色链球菌 (*Streptococcus cremoris*) 发酵时，比生长速率不随温度变化，但比生产速率在高温时有所提高。

(3) 氧的影响 乳酸杆菌是微氧需要菌或耐氧菌，因此，氧的存在对其代谢有重要的影响。好氧环境对有些菌可能有毒害，但对许多其他菌，氧常常是重要的电子受体，使厌氧糖代谢产生的还原性嘧啶核苷再氧化。这将使乳酸菌能利用的基质范围较广，并拥有厌氧条件下停止的代谢途径，也会改进细胞的摩尔产率。

在乳酸生产的发酵罐中，通常总是避免有氧状态，因为氧的存在对生产有影响。在 *L. casei* 好氧培养时，发现最大生长速率较小，葡萄糖的利用和乳酸的生产呈指数曲线变化，由于产生的副产物较多，乳酸产率较低，葡萄糖与乳酸转化的定量关系在好氧条件下不确定。

(4) 搅拌的影响 在好氧发酵中非常重要的搅拌，对乳酸生产没有什么作用。但是，有些研究发现，在采用像乳清这些原料时，由于许多营养物都是存在于不溶解物中，因此，必须采取措施使这些固体物质完全呈悬浮状态。在用乳清发酵生产乳酸时，已经发现乳酸生产速率随着体系中雷诺数的增加而增大，直至雷诺数达到 10000 后，速率保持恒定。另一方面是，乳酸杆菌对剪切力不敏感，采用高的搅拌速率未发现有什么影响。

2. 过程设计基础

对乳酸生产而言，各种环境因素的最佳范围已很清楚，当然不同的菌、采用不同培养基和要求达到不同乳酸浓度时，这些因素的范围会有变化。已有研究证明，乳酸生产既属于生长相关，也属于生长不相关，在细胞生长停止后，菌体会继续发酵。在不同情况下，比生产速率有所不同。由于一些控制因素，如温度、pH 值、高盐浓度和乳酸浓度会造成细胞生长和乳酸合成的不耦联，因此，这些问题都会影响过程设计。

多大的乳酸浓度会使生长与合成不耦联与菌种有关。对 *L. helveticus*，已发现培养基组

成对生产机制有重要影响。用葡萄糖培养基时，由生长非耦联机制产生的乳酸量要小于细胞生长时期产生的乳酸量，但在采用含乳清和酵母膏的培养基时，情况正好相反。因为对细胞生长有抑制的乳酸浓度要比对生产抑制的浓度低得多，因此，非生长耦联机制对达到高乳酸浓度有很大作用。

由不同机制产生的乳酸的比例也取决于发酵过程的操作方式。像连续细胞循环或固定化细胞这样的过程，生产主要是依靠非生长耦联机制，培养基和环境因素等对机制的影响应该具体分析。

乳酸的毒性是影响发酵生产过程的主要问题。有关环境条件变化对毒性的影响，已有一些研究，大多数提出的解决办法已经应用在过程或系统的开发中，可以减少抑制。实际上，较好的发酵过程是通过提高反应速率而不是产物浓度来提高生产强度，尽可能地缩短发酵时间。

当需要得到高乳酸浓度时，需要提供高糖浓度，这时，初始糖浓度也是一个重要的设计参数。乳酸产量在对数生长期是葡萄糖消耗的线性函数，葡萄糖对乳酸的产率基本都在 $0.9 \sim 0.95 \text{g/g}$ ，变化不大，而用于细胞生长和维持的葡萄糖消耗可以忽略不计。但是，也有研究证明，对某些菌，如 *L. delbrueckii*，初始葡萄糖浓度从 5% 增加到 33% 导致菌体最大比生长速率从 0.55h^{-1} 下降到 0.18h^{-1} 。初始葡萄糖浓度在 15% 以上对发酵会产生严重的负面影响，但对反应器设计而言，由于葡萄糖浓度要被控制在较低水平，因此是有利的。

3. 发酵方式

对高效、高产率的发酵方式过去的几年中已有不少研究。但大多数研究均是在实验室规模进行的，虽然有了一些令人鼓舞的结果，但还看不出在不久的将来能在工业上像分批发酵那样进行应用。在发酵工业，分批发酵是最熟悉的，其他一些发酵方式由于在过程放大方面还存在一些问题，因此还需要进一步研究才能工业化。

(1) 分批发酵 分批发酵是至今工业上一直采用的方法，已经有 50 多年的历史。在美国，发酵法生产乳酸直到 1992 年被化学合成法替代。但在欧洲，发酵法仍然在使用。

在 20 世纪的 40~50 年代，在美国，由于用 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 和 $\text{Ca}_3(\text{CO})_2$ 调 pH 值，乳酸是以乳酸钙的形式生产。发酵条件随着不同生产者采用不同的菌种和原材料而不同。但无论哪个公司，pH 值和温度总是被维持在上述范围内，但最终的乳酸浓度和发酵时间则取决于碳源。当碳源采用葡萄糖或水解淀粉糖，菌种为 *L. delbrueckii*，初糖浓度为 12%~15% 时，发酵时间为 3~6d。当采用牛奶乳清为原料时，初糖浓度为 5%，菌种为 *L. bulgaricus*，发酵时间为 1~2d，最大生产强度可达到 $1 \sim 2 \text{g}/(\text{L} \cdot \text{h})$ 。在这些工业规模设备中，不采取灭菌措施，因为乳酸对大多数其他微生物均有抑制。

近年来，通过采用良好的设备设计、过程参数（特别是温度和 pH 值）控制，也包括菌种改良，乳酸的发酵速率有了改进。人们研究的重点也从原料和终产物转到对发酵过程。

关于乳清的利用，现在主要的目的是发酵乳清本身，而不是乳酸。用于 pH 值控制的现在是 NH_4OH 而不是以前的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ，发酵液进行蒸发浓缩，最终产物是蛋白质含量相当 55% 的，其中 75% 是来自乳酸铵。

(2) 连续搅拌反应器 (CSTR) 中的连续发酵 虽然在工业上乳酸生产没有采用连续发酵的方法，但连续发酵的可行性已作过一些研究。早在 1931 年，Whittier 和 Rogers 就进行的中试研究，但由于当时灭菌和过程控制条件很差，结果不甚理想。为了进一步了解连续发

酵过程, 在 1966 年, Childs 和 Welsby 采用水解淀粉糖, *L. delbrueckii* 类菌, 又进行了尝试。结果令人鼓舞: 在一步系统中生产强度达到 3.7g/L, 两步系统中 4.3g/L。这个结果比同样条件下分批过程的结果要高 60%。

在连续搅拌反应器的操作过程中, 乳酸的毒性对细胞生长起着很重要的作用, 乳酸浓度升高, 细胞生长将下降。在单级恒化器, 这时细胞生长速率等于稀释率, 乳酸浓度是稀释率的函数, 稀释率越高, 菌体生长越快(直到最大比生长速率), 但乳酸浓度越低, 没有被利用的糖浓度越高。在恒化器中, 乳酸发酵是典型的菌体生长与产物形成相耦联的发酵类型。最大生产强度将靠近最大稀释率, 但这时糖的利用效率最低。

同样的, 在采用不同培养基、菌种和操作条件时, 不同的研究得出了不同的结果, 但相似的规律还是有的。一般说来, 采用一步发酵, 当稀释率低于 0.1h^{-1} 时, 糖利用可以非常完全, 乳酸的最大浓度可在 36~58g/L。在稀释率 0.4h^{-1} 时, 生产强度可以达到 8~9g/(L·h), 但糖的转化率只有 60%。

在一步发酵前后再加一步或多步已被证明是有效的, 可以得到较高乳酸浓度和糖利用率。这样的系统可以将生长耦联和非耦联的过程分开, 也可以减少第一级中乳酸对细胞生长的抑制。对于含 5% 以上糖的原料, 有建议采用多级系统, 并且已有两步或三步过程被用于 *Streptococcus cremoris* 发酵乳清渗透液生产乳酸, 比一步过程生产强度得到提高。也有研究试图优化这一系统中各级的稀释率。

连续培养也会使细胞代谢发生变化。对 *L. bulgaricus*, 有报道, 菌体的形态变化与稀释率有关; 对 *L. helveticus* 和戊糖片球菌 (*Pediococcus pentosaceus*), 在高稀释率下可以得到高 L-D 乳酸比例。另外, 也发现与分批培养一样, 乳酸对葡萄糖的产率在不同发酵条件下不一样。这些对于每一个具体生产过程都应该认真对待。

(3) 细胞循环反应器 细胞循环反应器开发的目的是想通过在发酵罐中维持高细胞密度而增加乳酸生成速率。具体是将一个 CSTR 与一个细胞分离装置相耦联, 细胞分离装置将细胞回收后再将其返回入反应器。这一系统的优点是将细胞可以全部存留在反应器中。由于菌体不会被洗出, 因此, 稀释率可以大大高于细胞生长速率。

细胞循环系统的生产强度可以几倍于分批或其他连续培养系统, 具体情况还与菌种和操作条件有关, 报道的数值是在用 *L. delbrueckii* 发酵葡萄糖生产乳酸时, 生产强度在乳酸 35g/L 达到 76g/(L·h), 在乳酸 60g/L 时达到 150g/(L·h); 用 *L. bulgaricus* 发酵乳清渗透液生产乳酸, 乳酸 117g/L 时生产强度为 84g/(L·h)。一般 60g/L 的乳酸浓度在这种系统中都能达到。乳酸的抑制使得本来可以发酵降低的葡萄糖浓度偏高, 但如果乳酸浓度在抑制浓度以上, 即使稀释率高达 2.55h^{-1} , 葡萄糖转化也可以完全。细胞浓度可达到 60~140g/L。

这种系统一个有趣的特点是, 一旦达到高细胞浓度和稳态, 细胞基本不再生长, 大部分乳酸由生长非耦联机制产生。结果, 只需要提供很少量的氮源和生长因子维持细胞浓度。但是, 有些营养物必须添加, 因为已经证明, 乳酸的形成需要蛋白质的合成。对生长因子的需求取决于所用的糖源, 在相似条件下, 用乳糖比用葡萄糖时需要多一些, 并且用乳糖乳酸浓度也低一些。

虽然已有研究表明, 这种系统可以稳定运行几个星期, 特别是在低乳酸浓度下, 但是也有报道, 在培养过程和细胞积累过程中, 生物量合成和乳酸生产的比速率是下降的, 并且乳酸比生产速率与菌体比生长速率直接相关。生长速率下降的同时生物量产率也下降, 这是由

于葡萄糖用于乳酸的形成，而不是细胞生长。

细胞完全循环也会对不同菌的代谢产生不同的影响。如对一个外消旋菌种 *L. helveticus*，就发现增加稀释率，L(+)型乳酸比例会增加；对主要产L(+)乳酸的 *L. casei*，随时间的进行D(-)型乳酸会增加，并且在循环了100多小时的细胞中发现一种与通常菌不同的胞内蛋白质；更多的变化是对 *Lactococcus lactis*，在连续全细胞回流过程中，乙酸、甲酸和乙醇会被诱导产生；对 *Lactobacillus* sp 93 SMRICC235，其甚至会从同型乳酸发酵变成异型乳酸发酵。

(4) 固定化细胞反应器 将细胞用胶固定化或固定在惰性载体上主要是为了以下的目的。①在连续培养的反应器中得到高细胞密度，从而可采用高流速；②在重复多批次发酵中，细胞可以使用很长时间；③固定化后可以在恶劣的环境中保护细胞。

处于固定化状态的细胞其紧靠的环境与反应器总的液相环境条件(pH值、产物浓度等)是不一样的，因此已有许多研究针对环境因素对固定化细胞生长动力学和产物形成机制。

几种固定化材料已被用过，其中海藻酸钙用的最多，另外还有聚丙烯酰胺、琼脂、k-角叉菜聚糖和烧结的玻璃球。

固定化对维持细胞处于稳定和活性状态是非常有效的。有报道采用 *L. casei* 和 *L. lactis* 的共固定化，细胞可用于重复分批培养系统20d；将 *L. casei* 在0.2%酵母膏4℃保存，其可以保持活性产乳酸达2个多月；*L. delbrueckii* 在连续培养过程中的半衰期为100d；将 *L. casei* 包埋在琼脂中发现其得到了很好的保护，6%盐浓度存在下仍有发酵活性；类似的结果在用k-角叉菜聚糖固定 *L. delbrueckii* 时也被发现，其对用于乳酸萃取的有机溶剂有一定的抗性。但是在大多数情况，固定化系统达到的生产强度在2.5g/(L·h)以下，低于相应的游离细胞系统。

关于反应器，各种类型的都试过，包括搅拌罐、填充床、流化床等。每一种都有缺陷。填充床反应器不太适合实际应用，主要缺点是pH值很难控制，经常被漏出的细胞堵塞，海藻酸钙粒子会脱钙。用搅拌罐会减少pH值控制问题，除非在粒子内部由于扩散的原因，但搅拌容易使海藻酸钙粒子被破坏，稳定性受影响。用烧结的玻璃球的流化床得到的结果最好，乳酸浓度在25g/L时，生产强度达到13.5g/(L·h)，但在一些条件下大多数糖是被游离细胞转化的。

在这些固定化系统中，不可能同时达到低基质浓度、高固定化细胞浓度和高生产强度。这是因为要使载体内部的细胞生长良好的话，糖的浓度梯度要相当高，以保证糖有较高的扩散速率能从液体中传到载体中。另一个只是在实验室中被检验过的主要的缺点是，系统的工业放大非常困难，主要是在这些系统中，传质和传热对过程的进行影响很大。

(5) 萃取发酵 如前面所述，乳酸发酵过程受抑制，生产速率随乳酸的积累而下降。为了减少抑制，人们研究了几种随程萃取技术，如溶剂萃取、离子交换、透析、电渗析等。总的来说，虽然这些技术应用后取得的发酵结果比原来的分批发酵要好，但是系统较为复杂，大规模生产采用有一定的困难。

透析方面的研究是由Stieber等人研究的，采用了连续的透析装置，可以用较浓的培养基，也得到了比分批发酵要好的结果，但是出料中的乳酸铵浓度较低。电渗析是先有人用游离细胞进行了分批发酵，结果膜的堵塞很严重，然后采用固定化细胞或用超滤的方法进行细胞分离，改进了系统，但增加了额外的设备。采用电渗析的优点是pH值可以通过除去乳酸进行控制，而不要再加碱。在有些电渗析系统中还存在一些问题，如乳酸通过阳离子膜时有