

技术进展

基因工程菌生产 *D*-乳酸研究进展

刘鹏¹, 李爽¹, 贾晓强^{1,2}, 闻建平^{1,2}, 财音青格乐^{1,2}

(1. 天津大学化工学院生物工程系, 天津 300072;
2. 天津大学系统生物工程教育部重点实验室, 天津 300072)

摘要: *D*-乳酸是众多手性物质的合成前体, 广泛应用于化工、农业、食品、医药、环保等领域。近年来, 随着基因工程理论的不成熟发展, 分子生物学技术在 *D*-乳酸生产领域的应用也逐渐受到关注。介绍了利用基因工程技术改造 *D*-乳酸生产菌株的研究现状, 并对未来研究趋势进行了展望。

关键词: *D*-乳酸; 丙酮酸; 基因工程; 基因敲除

中图分类号: Q935; TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2010)10-0013-05

Advances in genetic engineering approaches for *D*-lactic acid production

LIU Peng¹, LI Shuang¹, JIA Xiao-qiang^{1,2}, WEN Jian-ping^{1,2}, CAIYIN Qing-gele^{1,2}

(1. Department of Biochemical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Key Laboratory of Systems Bioengineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: *D*-lactic acid, as an important synthetic precursor of many chiral compounds, is widely used in chemical industry, agriculture, food industry, medicine industry, environmental protection field, and so on. Recently, the application of molecular biotechnology in *D*-lactate production has attracted increasing attention with the development of genetic engineering technology. In this paper, the progress in the modification of *D*-lactate-producing strain by genetic engineering technology is summarized, and the prospects for research trends are made.

Key words: *D*-lactic acid; pyruvate; genetic engineering; gene knock out

乳酸又名丙醇酸, 作为世界公认的三大有机酸之一^[1], 广泛应用于化工、农业、食品、医药、环保等行业。其根据旋光性的不同可分为 *D*-乳酸和 *L*-乳酸。由于 *L*-乳酸具有较好的生物兼容性, 得到了较早的开发和利用。随着 *D*-乳酸新功能的发掘, 尤其是聚 *D*-乳酸能够提高聚乳酸热稳定性的发现^[2], 其生产和应用研究受到了广泛关注, 成为目前研究的热点。随着基因工程理论的不成熟, 分子生物学技术在 *D*-乳酸生产领域的应用也逐渐受到关注。近些年来, 基因工程改造菌株生产 *D*-乳酸取得了一定的研究进展, 本文就这些研究进展进行综述。

1 *D*-乳酸的生产现状

目前, 在世界范围内乳酸生产主要以 *L*-乳酸和 *D*、*L*-乳酸为主, 由于 *L*-乳酸具有非常广泛的应用空间, 所以 *L*-乳酸占据着大份额的乳酸市场。相比之下, 以 *D*-乳酸为主的生产厂家却要少很多, 国际上生产 *D*-乳酸的公司有美国 PGLA-1 公司、荷兰 PURAC 公司、日本达意赛尔(タイセル)公司, 在国内仅有一家中日合资公司江西武藏野生物化工有限

公司生产 *D*-乳酸^[3]。

在工业化生产中, *D*-乳酸的合成主要采用化学合成和微生物发酵这 2 种方法进行生产。传统的化学合成法生成的乳酸为消旋体乳酸, 然后通过化学拆分最终能够得到纯的 *D*-乳酸和 *L*-乳酸, 但同时也增加了 *D*-乳酸的生产成本, 并且这种方法还存在较大的毒性和环境污染问题^[4]。微生物发酵法主要是通过筛选 *L*-乳酸脱氢酶缺陷型菌株来进行发酵生产, 发酵反应条件温和, 对环境污染影响小, 优势明显, 然而筛选得到的菌株对原料具有苛刻的要求, 使得 *D*-乳酸的生产成本一直处于较高水平。所以随着传统发酵技术的发展, 在筛选菌种和改进发酵工艺条件上科技人员进行了大量的工作, 出现了许多新的发酵工艺技术: 同时糖化发酵 (SSF)^[5-6]、固定化法^[7] 和原位分离技术, 该技术还包括电渗析发酵 (EDF)^[7-8]、膜法发酵^[9]、萃取发酵^[10] 等。这种方法中菌株的突变筛选为非定向性, 工作量大且符合要求的阳性结果少, 实验具有一定的随机性与盲目性。

收稿日期: 2010-00-00

作者简介: 刘鹏(1984-), 男, 硕士生; 闻建平(1966-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为环境生物工程、制药生物工程, 通讯联系人,

022-27892061, jpwen@tju.edu.cn。

2 基因工程技术在改造菌株生产 D-乳酸中的研究进展

随着基因工程理论的不成熟发展,分子生物学技术在 D-乳酸生产领域的应用也逐渐受到关注,利用基因工程手段对菌株进行定向改造,减少了工程菌筛选的时间,提高了筛选效率。目前研究的

重点主要集中在乳酸生产菌的 D-乳酸脱氢酶和 L-乳酸脱氢酶的编码基因(*ldhD* 和 *ldhL*)^[11]上。另外还有研究人员对丙酮酸甲酸裂解酶的编码基因(*pfl*)^[12]和丙酮酸脱羧酶基因(*pdh*)^[13]进行敲除,从而提高乳酸支路的通量。表 1 列举了基因工程改造 D-乳酸生产菌的具体实例。

应用基因敲除技术敲除旁路代谢途径中的关键

表 1 D-乳酸生产菌的基因工程技术应用

菌株	改造方法	产量/g·L ⁻¹	得率	参考文献
<i>L. plantarum</i> Δ <i>ldhL1</i>	敲除 <i>ldhL</i>	86.60	0.89	14
<i>L. plantarum</i> Δ <i>ldhL1</i> /pCUS α A	敲除 <i>ldhL</i> , 异源表达 α -淀粉酶	73.20	0.85	14
<i>L. plantarum</i> Δ <i>ldhL1</i> /pCU-CelA	敲除 <i>ldhL</i> , 异源表达 CelA	1.27	—	15
<i>L. plantarum</i> Δ <i>ldhL1</i> /pCU-CelA	异源重组 <i>Aspergillus oryzae</i> 产 β -葡萄糖苷酶降解 β -葡聚糖	1.47	—	15
<i>L. plantarum</i> Δ <i>ldhL1</i> - <i>xpk1</i> ; : <i>tkl</i>	敲除 <i>ldhL</i> , 异源 <i>tkl</i> 替换 <i>xpk1</i>	38.60	0.82	16
<i>L. plantarum</i> Δ <i>ldhL1</i> - <i>xpk1</i> ; : <i>tkl</i> - Δ <i>xpk2</i> /pCU- <i>XylAB</i>	敲除 <i>ldhL</i> , <i>xpk2</i> 异源表达 <i>xylA</i> , <i>xylB</i>	41.20	0.89	16
JP201(<i>pta</i>)	缺失 <i>pta</i>	60.00	0.80	13
JP203(<i>pta</i> , <i>pcc</i>)	缺失 <i>pta</i> , <i>pcc</i>	62.20	0.90	13
SZA0(<i>pflB</i> , <i>frdBC</i>)	敲除 <i>pflB</i> , <i>frdBC</i>	51.80	0.99	17
SZ63(<i>pflB</i> , <i>frdBC</i> , <i>adhE</i> , <i>ackA</i>)	敲除 <i>pflB</i> , <i>frdBC</i> , <i>adhE</i> , <i>ackA</i>	48.60	0.98	17
<i>C. glutamicum</i> Δ <i>ldhA</i> /pCRB204	异源表达 <i>ldhA</i>	120.00	0.99	18
<i>S. cerevisiae</i> (wine yeast, <i>pdh1</i>) OC-2T	异源表达 <i>ldhA</i>	61.50	0.99	12

酶基因,能够有效地抑制副产物的出现,提高乳酸支路的通量,同时敲除 *ldhL*,最终能够得到高光学纯度的 D-乳酸工程菌。进一步在基因敲除的基础之上,通过导入外源性基因,使菌株的生产原料由葡萄糖和果糖等单糖原料逐步向淀粉和纤维素等多糖原料转变。

当前基因工程改造菌株产 D-乳酸主要集中在乳酸菌、大肠杆菌、酵母菌中,下面对 3 种菌的基因工程改造研究现状进行综述。

2.1 乳酸菌(*Lactobacillaceae*)的基因工程改造

在乳酸菌中,大部分丙酮酸都在乳酸脱氢酶的催化下形成其特有的代谢终产物——乳酸。但是,不同的乳酸菌在不同的外界条件下,还会把一部分丙酮酸作为新的起点,通过不同的生化反应途径产生各种代谢产物^[19]。通过对非主要代谢通路中关键酶基因的敲除,实现高光学纯度 D-乳酸的生产。

植物乳杆菌^[20](*Lactobacillus plantarum*)通过异构酶 L-(+)-乳酸脱氢酶和 D-(-)-乳酸脱氢酶来催化丙酮酸分别生成 L-乳酸和 D-乳酸。Thierry F 等对 *L. plantarum* DG30 进行基因改造,首先过表达菌株中 *ldhL*,使 *L. plantarum* 中 L-(+)-乳酸脱氢酶的活性增长了 13 倍,但是这种方法并没有使 *L. plantarum* 的乳酸产量带来明显提高。接着在此基

础上通过双交换的方法敲除了 *ldhL*,使得 *L. plantarum* 只产生 D-乳酸,但最终的乳酸产量也没有显著提高。

D-乳酸生产高成本一个主要的原因就是原材料成本高,原材料的预处理成为高效生产的一个瓶颈问题,目前淀粉是最有望成为乳酸发酵中降低原料成本的物质。大多数乳酸菌不具有直接利用淀粉类物质的能力,所以一般情况下需要把淀粉预处理,比如用 α -淀粉酶水解淀粉。2009 年 Okano 等^[14]敲除了 *L. plantarum* NCIMB 8826 的 *ldhL*,并将 *Streptococcus bovis* 148(*AmyA*) α -淀粉酶基因导入到菌株中,改造后的 *L. plantarum* Δ *ldhL1*/pCUS α A 菌株 D-乳酸产量达到 73.2 g/L,得率为 0.85 g(乳酸)/g(淀粉),并且光学纯度达 99.6%。2009 年 Lu 等^[21]以小麦麸皮为氮源、酵母提取物为生长因子,利用糖化后糙米作为碳源,生产 D-乳酸, D-乳酸的产量达 90.8 g/L,得率达 0.73 g(乳酸)/g(糙米)。这些研究使得从淀粉生产高光学纯度的 D-乳酸变得可行。

纤维素与淀粉同样为多糖,而且纤维素在世界上含量最为丰富,充分利用纤维素作碳源,可以大大降低菌株产 D-乳酸的原料成本,使 D-乳酸的生产具有更高的商业价值。到 2007 年^[22]为止仍没有利用纤维素为碳源生产乳酸的报道,而要使 D-乳酸

生产菌能够利用纤维素作为碳源,可以利用的方法是通过基因工程导入外源基因并成功表达,构建完成的工程菌利用外源酶水解纤维素的产物为底物来生产D-乳酸。2009年Okano等^[15]将*Clostridium thermocellum*菌株的葡聚糖内切酶(EG)基因导入到已经敲除*ldhL*的*L. plantarum*中并表达,达到了直接利用纤维五糖和纤维六糖生产D-乳酸的目的。D-乳酸的得率达0.63 g(乳酸)/g(纤维五碳糖或六碳糖)。在已构建的菌株基础上将*Aspergillus aculeatus*中的葡聚糖外切酶(BGL)基因导入,改造后的菌株*Lantarum ΔldhL1/pCU-CelA*能够利用β-葡聚糖生产D-乳酸,产量达1.47 g/L。上面的研究实现了工程菌直接利用纤维素生产D-乳酸的目标。

在植物组织中,除了纤维素外还有大量的半纤维素,能够充分利用这些物质成为基因改造乳酸菌的目标。半纤维素降解后,大部分物质为木糖和阿拉伯糖,乳酸菌是不能直接利用木糖和阿拉伯糖作为碳源的,因此有研究将催化木糖到5-磷酸酮糖与阿拉伯糖到5-磷酸酮糖的基因导入到能够进行同型发酵的乳酸菌中,利用pp途径生成D-乳酸^[23-24]。采用这种方法,1 mol的5-磷酸木酮糖通过磷酸转酮酶途径转化为1 mol的乳酸,造成了碳源的浪费。为了解决这一问题,Okano等^[16]用来自于*L. lactis* IL 1403的转酮酶基因(*tkl*)替换了*L. plantarum ΔldhL1*中的磷酸转酮酶基因(*xpk1*),构建的菌株*L. plantarum ΔldhL1-xpk1::tkl*能够利用阿拉伯糖生产D-乳酸,D-乳酸的产量达38.6 g/L,对阿拉伯糖的得率为0.82,D-乳酸的光学纯度为99.9%,并且发酵过程中乙酸的产量仅为0.4 g/L,这一研究解决了利用阿拉伯糖作碳源时的同型乳酸发酵的问题。

为了解决利用木糖同型发酵生产D-乳酸的问题,Okano等^[16]将来自于菌株*L. pentosus* NRIC 1069的木糖异构酶基因(*xylA*)和木酮糖激酶基因(*xylB*)导入*L. plantarum ΔldhL1-xpk1::tkl*菌株中,改造后的菌株D-乳酸产量达41.2 g/L,转化率达0.89,D-乳酸的光学纯度达99.2%,这一研究实现了以木糖为原料进行同型乳酸的发酵生产。目前,已经发现有些乳酸菌^[25]能够利用寡聚木糖作为碳源,将降解寡聚木糖的关键酶基因导入同型发酵的乳酸菌株中,可能会实现利用半纤维素为原料进行同型乳酸发酵的愿望。

2.2 大肠杆菌(*Escherichia coli*)的基因工程改造

大肠杆菌能够以相对简单的原料实现D-乳酸

的生产,并且其作为基因工程模式菌株相对于其他菌株来说具有易实现基因操作的优点。但大肠杆菌的乳酸产量以及终产物中乳酸的量都不及乳酸菌,原因就在于大肠杆菌在发酵生产乳酸的同时产生的是有机酸混合物以及乙醇等非酸类物质。通过基因工程可以改造大肠杆菌的代谢网络,增加乳酸途径中的代谢通量,抑制大肠杆菌中其余产酸、醇途径,达到提高乳酸产量之目的。

先前的研究已经表明,可以通过改造*E. coli*来生产L-乳酸^[13,26]和D-乳酸^[13]。文献报道中产乳酸最好的大肠杆菌菌株为JP203^[13]碳基培养葡萄糖转化率为70%~80%。Zhou等^[17]敲除了*E. coli* W3110中延胡索酸还原酶(*frdABCD*)和丙酮酸甲基裂解酶的基因(*pf1B*),抑制了丙酮酸代谢途径中除产乳酸代谢以外的途径,构建了一菌株SZ58,改造后的菌株D-乳酸的产量达51.8 g/L,光学纯度和得率分别达99%和0.99。为了进一步降低乙醇和乙酸等副产物的生成,该研究在此基础上失活了乙酸激酶基因(*ackA*)和乙醇脱氢酶基因(*adhE*),构建了一株产纯D-乳酸的菌株SZ63,改造后的菌株不但消除了乙醇和乙酸的合成,而且将菌株的发酵时间缩短到168 h,D-乳酸的产量达46.8 g/L。

大肠杆菌可直接利用己糖和戊糖作为碳源,这就免去了后续为利用戊糖而进行的菌株改造^[17],但是菌株对酸的耐受性差,生产率较乳酸菌低,致使大肠杆菌在实际应用当中受到限制。

2.3 酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)的基因工程改造

酵母菌对酸有很好的耐受性,使得通过酵母菌发酵产生乳酸成为可能。在厌氧发酵条件下,酵母菌中的丙酮酸脱羧酶以及乙醇脱氢酶催化大量丙酮酸生成了乙醇,通过基因工程方法,抑制酵母菌生成乙醇的代谢途径,增加乳酸途径通量,同时敲除*ldhL*来使酵母菌发酵产高纯度D-乳酸,从而达到酵母菌高产D-乳酸的目的。已有研究表明,在酿酒酵母中存在*pdcl*、*pdcs*和*pdcs6*3个丙酮酸羧化酶基因,这3个基因的存在使得大量的丙酮酸通过乙醇途径生成乙醇,因此若要完全的阻断乙醇的合成途径,必须使得这3个基因完全失活^[27]。

2004年,Ishida等^[28]通过同源重组的方法在*S. cerevisiae* OC-2T中用*ldhL*替换了*pdcl*,*ldhL*转录时的启动子为原*pdcl*启动子。改造后的菌株YIBO-7A的乳酸脱氢酶活性比出发菌株高出5倍,在非中性环境中乳酸产量达50.6 g/L,得率达0.65 g

(乳酸)/g(葡萄糖)。为了增加乳酸的产量, Saitoh^[29]进一步将 4 个拷贝的 *ldhL* 整合到 YIBO-7A 的基因组中, 获得了多拷贝数的基因, 使 *L*-乳酸的产量提高到 68.0 g/L。这一方法同样被应用到 *D*-乳酸的生产中, Ishida 等^[12]将牛的 *ldhD* 导入到 OC-2T 菌株的基因组中, *D*-乳酸的产量达 61.5 g/L。Ishida 等^[30]的研究表明, *pdcl*、*pdcs* 的双基因失活和 *pdcl*、*pdcs*、*pdcs* 三基因的失活可以降低或消除乳酸生产过程中乙醇的生产, 但同时实验数据表明, 在降低乙醇产量的同时也降低了菌体的生长速率, 延长了乳酸生产的发酵时间, 降低了乳酸的生产效率。为了克服这一缺点, 2009 年 Tokuhiro 等^[31]通过对酵母菌中的丙酮酸脱羧酶基因和乙醛脱氢酶基因的敲除, 抑制了发酵过程中乙醇的产生, *D*-乳酸的产量达 71.8 g/L, 得率达 0.74, 并且生产乳酸的发酵时间降低到了 63 h, 与丙酮酸脱羧酶结构基因的双敲除和三敲除菌株相比, 进一步提高了乳酸的生产效率。

纤维素降解后所生成的寡聚糖中主要成分是纤维二糖, 纤维二糖作为葡聚糖外切酶的抑制剂, 其浓度的积累会抑制纤维素的降解, 然而 *S. cerevisiae* 自身不能利用纤维二糖, 因此, 快速同化纤维二糖成为开发纤维素利用型酵母的首要问题。2008 年, Tokuhiro^[32]在 *S. cerevisiae* 中表达了来自 *A. aculeatus* 的 β -葡萄糖苷酶基因 (*BGL1*), 重组后的菌株能够利用纤维二糖生产乳酸, 乳酸的产量达 95 g/L, 得率达 0.7, 而且, 以纤维二糖为原料的乳酸生产效率只是略低于以葡萄糖为原料的乳酸生产效率。

在酵母中, 乳酸得率的提高与菌体的生长不存在明显的对应关系, 当乳酸得率升高时菌体的生长受到了相应的抑制, 这导致了生产效率的降低, 因此, 如何解决这一问题成为酵母菌中乳酸研究的关键。

3 代谢工程改造大肠杆菌生产聚乳酸

通过基因工程的手段可以使菌株利用多糖为原料来发酵产 *D*-乳酸, 降低了发酵中的原料成本, 然而并没有解决在聚乳酸合成中环境污染问题。目前聚乳酸合成一般都是两步合成法, 首先是把生物发酵生产乳酸转化为环状二聚体丙交酯, 然后再通过金属催化剂聚合这种丙交酯, 最终合成聚乳酸(丙交酯法)^[33]。但是这种金属催化剂具有毒性, 对环境污染严重, 人们一直希望确立一种全工序生物工艺聚乳酸合成法, 直接生物合成聚乳酸。

为了解决这个问题, 2009 年 Yu K J 等^[34]通过

联合代谢工程以及酶工程改造大肠杆菌, 实现了一步发酵生产聚乳酸及其共聚物。一步发酵法使得合成聚乳酸及其共聚物的成本大大降低, 具有一定的商业价值。

在这项研究中, 对大肠杆菌的代谢途径进行了深层次设计, 敲除了代谢途径中非目的代谢通路中的关键酶基因(图 1), 其中包括乙酸激酶(*ackA*)、磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(*ppc*)、乙醛/乙醇脱氢酶(*adhE*); 在此基础上, 用 *trc* 启动子替换了 *ldhA*(*D*-乳酸脱氢酶基因)和 *acs*(乙酰辅酶 A 合成酶基因)的启动子, 解除了原系统下对基因表达的限制。为了实现菌株中利用产生的乳酸合成聚乳酸, 导入了外源性基因包括 *Clostridium propionicum* 的丙酰辅酶 A 转移酶(*Pct_{Cp}*)基因和 *Pseudomonas sp.* MBEL 6-19 的 PHA 合成酶 I (*PhaCI_{P6-19}*) 基因, 构建大肠杆菌外源性代谢通路, 2 种基因通过突变筛选提高了在大肠杆菌中合成乳酸辅酶 A 及利用乳酸辅酶 A 合成聚合物的能力, 改造后的大肠杆菌实现了一步

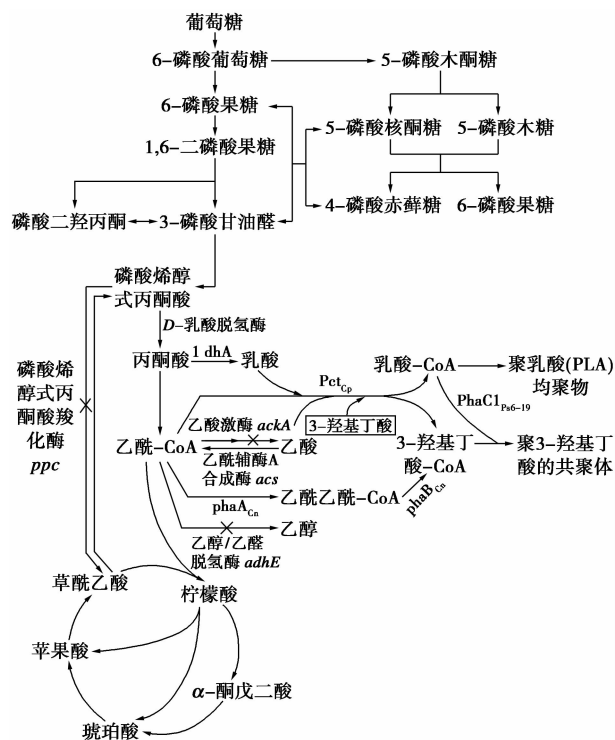


图 1 通过代谢工程理性设计改造大肠杆菌产聚乳酸(PLA)均聚物和聚 3-羟基丁酸的共聚体^[34]

注: *Pct_{Cp}* *Clostridium propionicum* 丙酰辅酶 A 转移酶基因; *PhaCI_{P6-19}* *Pseudomonas sp.* MBEL 6-19 聚羟基烷酸(PHA)合成酶基因; *Pct_{Cp}* 及 *PhaCI_{P6-19}* 都通过突变筛选分别高效地生产乳酸辅酶 A 以及利用乳酸辅酶 A 合成聚 3-羟基丁酸的共聚体 P(3-HB-co-LA)。 *phaA_{Cn}* *Cupriavidus necator* β -酮硫解酶基因; *phaB_{Cn}* *Cupriavidus necator* 乙酰乙酰辅酶 A 还原酶基因。

发酵法直接合成非天然聚合物 PLA 及其共聚体。

在一步发酵合成法中需要添加 3-羟基丁酸(3-HB), 研究小组通过导入 *Cupriavidus necator phaA* 和 *phaB* 基因(分别编码 β -酮硫解酶以及乙酰乙酰辅酶 A 还原酶)用于直接合成 3-羟基丁酸辅酶 A, 使改造的菌株不再依赖添加 3-羟基丁酸用于聚合物的合成。

4 展望

利用基因工程对 D-乳酸产生菌进行改造, 国内外一些研究小组使得菌株能够直接利用多糖物质为原料来进行高光学纯度的 D-乳酸生产。然而菌株的酸耐受性差以及产量低制约着基因工程菌的应用。在未来工作中, 可以对酿酒酵母的酸耐受性机理进行系统研究, 在此基础上, 通过代谢工程对酿酒酵母的酸耐受系统进行合理设计, 利用基因工程的方法将该菌株的酸耐受系统导入到乳酸菌中, 从根本上解决菌株酸耐受性问题, 提高 D-乳酸的生产效率, 达到降低产品成本之目的。

聚乳酸作为可降解材料在环境保护应用上无疑是最前沿的, 然而目前的两步合成法合成聚乳酸是对环境有破坏性影响的。Yu K J 等人实现了一步发酵法合成聚乳酸, 减少了原方法中对环境的破坏, 在生物合成聚乳酸方面获得了突破性进展。在该项研究当中需要更为深层次的代谢途径设计, 同时解决中间产物琥珀酸积累所带来的问题。随着基因工程理论的逐步成熟以及对 D-乳酸合成代谢通路的不断深入研究, 开发底物利用范围广、光学纯度高、转化率高的基因工程菌为以后的发展趋势。

参考文献

- [1] 曾炜, 陈丰秋, 詹晓力. 乳酸的生产技术及其研究进展[J]. 化工进展, 2006, 25(7): 744-749.
- [2] Ikada Y, Jamshidi K, Tsuji H, et al. Stereocomplex formation between enantiomeric poly(lactides)[J]. Macromolecules, 1987, 20: 904-906.
- [3] 胡永红, 管军, 杨文革, 等. 发酵法生产 D-乳酸的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(12): 99-103.
- [4] 许婷婷, 柏中中, 何冰芳, 等. D-乳酸制备研究进展[J]. 化工进展, 2009, 28(6): 991-996.
- [5] Roman A, Yanez R, Garrote G, et al. SSF production of lactic acid from cellulosic biosludges[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(10): 4247-4254.
- [6] Marques S, Santos J A L, Gio F M, et al. Lactic acid production from recycled paper sludge by simultaneous saccharification and fermentation[J]. Biochemical Engineering Journal, 2008, 41(3): 210-216.
- [7] 沈宏宇, 胡永红, 沈树宝, 等. 生物催化剂固定化技术的研究进展[J]. 化工进展, 2003, 22(1): 18-21.
- [8] Yi S S, Lu Y C, Luo G S. Separation and concentration of lactic acid by electro-electrodialysis[J]. Separation and Purification Technology, 2008, 60(3): 308-314.
- [9] Wang Z H, Zhao K F. Kinetics and mass transfer for lactic acid recovered with anion exchange method in fermentation solution[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1995, 47(1): 1-7.
- [10] Wasewar K L, Yawalkar A A, Moulijn J A, et al. Fermentation of glucose to lactic acid coupled with reactive extraction: A review[J]. Industrial & Engineering Chemistry Research, 2004, 43(19): 5969-5982.
- [11] Singh S K, Ahmed S U, Pandey A. Metabolic engineering approaches for lactic acid production[J]. Process Biochemistry, 2006, 41(5): 991-1000.
- [12] Ishida N, Suzuki T, Tokuhiko K, et al. D-Lactic acid production by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2006, 101(2): 172-177.
- [13] Chang D E, Jung H C, Rhee J S, et al. Homofermentative production of D- or L-lactate in metabolically engineered *Escherichia coli* RR1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(4): 1384-1389.
- [14] Okano K, Zhang Q, Shinkawa S, et al. Efficient production of optically pure D-lactic acid from raw corn starch by using genetically modified L-lactate dehydrogenase gene-deficient and α -amylase-secreting *Lactobacillus plantarum* strain[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2009, 75: 462-467.
- [15] Okano K, Zhang Q, Yoshida S, et al. D-Lactic acid production from cellooligosaccharides and β -glucan using L-LDH gene-deficient and endoglucanase-secreting *Lactobacillus plantarum*[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 85(1): 643-650.
- [16] Okano K, Yoshida S, Tanaka T, et al. Homo D-lactic acid fermentation from arabinose by redirection of phosphoketolase pathway to pentose phosphate pathway in L-lactate dehydrogenase gene-deficient *Lactobacillus plantarum*[J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(15): 5175-5178.
- [17] Zhou S, Causey T B, Hasona A, et al. Production of optically pure D-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69: 399-407.
- [18] Okino S, Suda M, Fujikura K, et al. Production of D-lactic acid by *Corynebacterium glutamicum* under oxygen deprivation[J]. Appl Microbiol Biotechnol 2008, 78: 449-454.
- [19] 张刚. 乳酸细菌—基础、技术和应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 92-94.
- [20] Thierry F, Dominique G, Nathalie B, et al. *Lactobacillus plantarum* ldhL gene: Overexpression and deletion[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(3): 596-601.
- [21] Lu Z D, Lu M B, He F, et al. An economical approach for D-lactic acid production utilizing unpolished rice from aging paddy as major nutrient source[J]. Bioresource Technology, 2009, 100: 2026-2031.

层,将部分原料转化为烯烃后进入过渡段,实现原料的完全转化。扩大段的部分催化剂汽提后进入再生器,再生后的催化剂返回密相床层上部。采用至少2根再生立管实现催化剂在扩大段和下部反应段间的连续循环,扩大段为初步分离器,2个串联的旋风分离器将催化剂细粉从产品气体中分离出来,优化后工艺出口产品气体中的催化剂含量为70 $\mu\text{g/g}$ 。MTO工艺在反应温度为400~500 $^{\circ}\text{C}$ 、压力为0.1~0.3 MPa下,乙烯和丙烯摩尔比可以在0.75~1.50调节,乙烯、丙烯选择性之和达到80%, C_2^+ ~ C_4^+ 烯烃选择性大于90%。

将12万t/a聚合级乙烯的鼓泡床反应器与快速流化床反应器相比,前者的底部反应器直径为9.1 m,上部反应器直径为11 m,催化剂装填量为114 t,而后者分别为5.2 m、7.9 m和44 t。与鼓泡床的表观气速为1 m/s相比,快速流化床过渡段的表观气速为1~3 m/s,由于提升段直径较小,在提升段的表观气速更高,反应器的横截面积减小至原来的1/3~1/2,节省了设备投资,同时大幅度减少了催化剂用量。

UOP公司于1999年公开了将甲醇制烯烃流化床反应器与碳四、碳五烯烃催化裂解提升管反应器或流化床反应器耦合以提高乙烯和丙烯收率的工

艺^[3]。甲醇或二甲醚等含氧化合物在流化床反应器中转化为 C_{1-5} 烃类产品气体,经分离后 C_4 烯烃和较重组分进入提升管或流化床反应器(优选反应温度为580~650 $^{\circ}\text{C}$)中进行催化剂裂解反应生成乙烯、丙烯。停留时间较短的烃类裂解提升管反应器可以抑制氢转移反应、提高低碳烯烃收率,单独的流化床反应器可以有效控制来自再生器和流到再生器中的催化剂循环速度,提高低碳烯烃的产品选择性。如采用提升管反应器,催化剂和出口气体都进入MTO流化床反应器中。当采用双流化床反应器进行MTO和催化裂解反应时,MTO反应器和裂解反应器中积碳失活催化剂(含碳质量分数为3%~15%)进入再生器中活化,再生后催化剂(含碳质量分数为1%~5%)根据各反应器的剂油比按一定循环量分别进入MTO反应器和催化裂解反应器中。二烯烃在转化为单烯烃的过程常常伴有氢化过程,为了最大化提高乙烯、丙烯收率,降低甲烷收率,应减少烃类裂解反应器进料中二烯烃的含量。 C_4^+ 组分也可先进入低聚反应器,部分 C_4^+ 组分在低聚反应器中可生成富含 C_{3-6} 成分的烃类物质,其中部分汽油组分进入裂解反应器中反应生成乙烯和丙烯。改进后的工艺使产物中的 $n(\text{丙烯}):n(\text{乙烯})$ 可达1.75,乙烯和丙烯总收率达到85%~90%,副产物

(上接第17页)

- [22] Adsul M, Khire J, Bastawde K, *et al.* Production of lactic acid from cellobiose and cellobiose by *Lactobacillus delbrueckii* mutant Ue-3 [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73: 5055-5057.
- [23] Helanto M, Kiviharju K, Leisola M, *et al.* Metabolic engineering of *Lactobacillus plantarum* for production of L-ribulose [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73: 7083-7091.
- [24] Tanaka K, Komiyama A, Sonomoto K, *et al.* Two different pathways for D-xylose metabolism and the effect of xylose concentration on the yield coefficient of L-lactate in mixed-acid fermentation by the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* IO-1 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 60: 160-167.
- [25] Ohara H, Owaki M, Sonomoto K. Xylooligosaccharide fermentation with *Leuconostoc lactis* [J]. *J Biosci Bioeng*, 2006, 101: 415-420.
- [26] Dien B S, Nichols N N, Bothast R J. Recombinant *Escherichia coli* engineered for the production of L-lactic acid from hexose and pentose sugars [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2001, 27 (4): 259-264.
- [27] Adachi E, Torigoe M, Sugiyama M, *et al.* Modification of metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* by the expression of lactate dehydrogenase and deletion of pyruvate decarboxylase genes for the lactic acid fermentation at low pH value [J]. *J Ferment Bioeng*, 1998, 86: 284-289.
- [28] Ishida N, Saitoh S, Tokuhiko K, *et al.* Efficient production of L-lactic

acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* with a genome-integrated L-lactate dehydrogenase gene [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71: 1964-1970.

- [29] Saitoh S, Ishida N, Onishi T, *et al.* Genetically engineered wine yeast produces a high concentration of L-lactic acid of extremely high optical purity [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71: 2789-2792.
- [30] Ishida N, Saitoh S, Onishi T, *et al.* The effect of pyruvate decarboxylase gene knockout in *Saccharomyces cerevisiae* on L-lactic acid production [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2006, 70: 1148-1153.
- [31] Tokuhiko K, Ishida N, Nagamori E, *et al.* Double mutation of the PDC1 and ADH1 genes improves lactate production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* expressing the bovine lactate dehydrogenase gene [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 82: 883-890.
- [32] Tokuhiko K, Ishida N, Kondo A, *et al.* Lactic fermentation of cellobiose by a yeast strain displaying β -glucosidase on the cell surface [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 79: 481-488.
- [33] Taek H Y, Tae W K, Hye O K, *et al.* Biosynthesis of polylactic acid and its copolymers using evolved propionate CoA transferase and PHA synthase [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 105: 150-160.
- [34] Yu K J, Tae Y K, Si J P, *et al.* Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for the production of polylactic acid and its copolymers [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 105: 161-171. ■