

米根霉一步发酵法高效积累 L-乳酸的策略

胡嘉欢, 张谷涵, 付永前*, 朱婷婷

(台州学院生物质资源研究所, 浙江 台州 318000)

摘要: 考察了 2 种米根霉发酵生产 L-乳酸方法对 L-乳酸合成的影响, 基于动力学分析, 优化了米根霉一步发酵合成 L-乳酸的策略. 结果表明, 与传统发酵相比, 一步发酵法能极大降低米根霉产酸过程的延滞期, 提高生产强度, 但产物比生成速率大大低于传统发酵法. 最优的一步法合成 L-乳酸的策略为孢子浓度 10^5 个/mL, 葡萄糖浓度 100 g/L, 蛋白胨 3.0 g/L, 培养 24 h 后, 菌体密度不变, 发酵液体积减少 50%. 该条件下, 发酵阶段发酵时间缩短至 13 h, 乳酸产量、生产强度和糖酸转化率分别为 60 g/L, 4.62 g/(L·h) 和 0.8 g/g, 比传统发酵的时间(48 h)和生产强度[1.19 g/(L·h)]分别缩短 72.9% 和提高 288%, 比生成速率和糖酸转化率未降低.

关键词: 高效积累; 高密度; L-乳酸; 一步发酵; 米根霉

中图分类号: Q815 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2017)02-0375-07 **DOI:** 10.12034/j.issn.1009-606X.216303

High-efficiency L-Lactic Acid Production by *Rhizopus oryzae* Using a Novel One-step Fermentation Strategy

HU Jia-huan, ZHANG Gu-han, FU Yong-qian*, ZHU Ting-ting

(Institute of Biomass Resources, Taizhou University, Taizhou, Zhejiang 318000, China)

Abstract: L-Lactic acid fermentation by *Rhizopus oryzae* was investigated using two different fermentation strategies of one-step fermentation and conventional fermentation. Based on analysis of specific growth rate of cell (μ), specific consumption rate of glucose (q_s) and specific rate of L-lactic acid, a novel modified one-step strategy was proposed. The results showed that, compared to conventional fermentation, one-step fermentation reduced the demurrage of the production process and increased the production of lactic acid. However, the specific rate of L-lactic acid formation was significantly lower than during conventional fermentation. A novel modified one-step strategy was proposed: final spores concentration 10^5 mL⁻¹, glucose concentration 100 g/L, peptone concentration 3.0 g/L, the fermentation medium was reduced to 50% of the original amount, while retaining the original total biomass within the tank after 24 h culture. Under the conditions, the lactic acid fermentation time greatly shorten in acid production stage, the maximum lactic acid production, productivity and yield of the lactic acid in acid production stage reached 60 g/L, 4.62 g/(L·h) and 0.8 g/g. The fermentation time and productivity were 72.9% lower and 288% higher than conventional fermentation [48 h and 1.19 g/(L·h)], respectively, than the best results of conventional fermentation. Importantly, the specific rate of L-lactic acid and yield did not decrease.

Key words: high-efficiency production; high cell density; L-lactic acid; one-step fermentation strategy; *Rhizopus oryzae*

1 前言

乳酸是一种常见的有机酸, 是世界公认的三大有机酸之一. 乳酸及其盐类和衍生物广泛用于食品、医药、饲料、化工等领域^[1,2]. 乳酸有 L-乳酸和 D-乳酸两种光学异构体, 人体可分解利用 L-乳酸. 合成 L-乳酸的方法主要有化学合成法、酶法及发酵法^[3], 其中根霉菌尤其

是米根霉因在发酵生产 L-乳酸过程中具有独特的优势(高效、安全、环保等)而越来越多用于 L-乳酸的合成^[4-6], 但由于较低的生产效率而难以实现工业化^[7,8]. 为提高米根霉合成乳酸的生产效率, 大量研究致力于高产菌株的筛选、菌体形态控制、利用低价原料及新型生物反应器^[4,9-11]. 利用米根霉发酵合成 L-乳酸的研究中, 乳酸

收稿日期: 2016-09-22, 修回日期: 2016-10-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 21106091)

作者简介: 胡嘉欢(1995-), 女, 浙江省宁波市人, 本科, 生物工程专业, Tel: 15267665709, E-mail: 1366257348@qq.com; 付永前, 通讯联系人, Tel: 0576-88660340, E-mail: fuyq@tzc.edu.cn.

引用格式: 胡嘉欢, 张谷涵, 付永前, 等. 米根霉一步发酵法高效积累 L-乳酸的策略. 过程工程学报, 2017, 17(2): 375-381.

Hu J H, Zhang G H, Fu Y Q, et al. High-efficiency L-Lactic Acid Production by *Rhizopus oryzae* Using a Novel One-step Fermentation Strategy (in Chinese). Chin. J. Process Eng., 2017, 17(2): 375-381, DOI: 10.12034/j.issn.1009-606X.216303.

产量和生产强度多在 60~120 g/L 和 0.7~2.5 g/(L·h), 远低于乳酸菌的生产效率^[8,12,13], 部分研究尝试通过菌丝球或固定化细胞方法达到了较高的生产水平, 如 Efremenko 等^[14]利用 PVA 凝胶固定化细胞最大化地提高了米根霉发酵产乳酸的生产效率. 但摇瓶培养技术并不适用大规模生产^[8,12]. 因此, 建立简单、可靠、高效的米根霉发酵产乳酸方法仍是难题.

高菌体密度发酵可有效提高代谢产物生产效率^[16], 但在有机酸发酵过程中会大大降低 L-乳酸的产量和糖酸转化率, 所以在米根霉合成乳酸单批次/分批补料发酵过程中鲜有采用该方法^[8,12,17]. 本课题组发现利用一步发酵法合成 L-乳酸, 即米根霉生长和产酸在同一培养基中进行, 持续发酵直至耗糖结束, 与传统乳酸发酵法相比, 菌体密度有较大增加, 同时乳酸的生产强度也明显提高. 迄今为止, 通过米根霉一步发酵控制高菌体密度合成 L-乳酸鲜有报道. 本研究通过优化米根霉一步法高密度发酵合成 L-乳酸的工艺, 为米根霉高效积累 L-乳酸的工业化生产提供理论指导.

2 材料和方法

2.1 菌种

米根霉(*Rhizopus oryzae*) LA-UN-1 (NRRL 395 诱变菌株), 台州学院生物质资源研究所保藏.

2.2 实验试剂

葡萄糖(分析纯), KH_2PO_4 , KCl , CaCl_2 , CaCO_3 均购于广东汕头市西陇化工厂, 琼脂、蛋白胨、尿素、硫酸铵、酵母膏均由国药集团化学试剂有限公司提供, 磷酸(南京盛跃精细化工发展有限公司).

2.3 实验设备与分析仪器

恒温振荡器(太仓市实验设备厂), SBA-40C 生物传感仪(山东微生物研究院), 7.5 L 发酵罐和 5 L 发酵罐(New Brunswick Scientific, USA), BSA224S 电子天平(赛多利斯公司), U3000 高效液相色谱仪(HPLC, 美国戴安公司).

2.4 培养基

传统发酵培养基即种子培养基(g/L): 葡萄糖 20.0, 蛋白胨 2.0, KH_2PO_4 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, pH 自然; 发酵培养基(g/L): 葡萄糖 80, 蛋白胨 2.0, KH_2PO_4 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.04, CaCO_3 50.

一步发酵培养基(g/L): 葡萄糖 100, 氮源[蛋白胨 2.0~4.0, 酵母膏 2, Urea 2.0, $(\text{NH}_2)_2\text{SO}_4$ 2.0], KH_2PO_4 0.2, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2, CaCO_3 50.

2.5 培养方法

2.5.1 米根霉孢子悬浮液的制备

取米根霉菌丝体接种于 PDA 斜面培养基, 置于恒温培养箱中 30℃ 培养 6~7 d, 孢子成熟后用无菌水洗下, 用医用无菌棉过滤得到孢子悬浮液. 采用血球板计数法调整孢子浓度为 10^7 个/mL, 保存于 4℃ 冰箱中待用.

2.5.2 传统乳酸发酵培养

种子培养: 取 50 mL 种子培养基装入 250 mL 的锥形瓶中, 121℃ 加热灭菌 20 min, 取浓度 10^7 个/mL 的孢子液 1 mL 接入锥形瓶中, 在旋转振荡器中以 150 r/min 速率 30℃ 培养 24 h.

乳酸发酵: 7.5 L 发酵罐, 工作体积为 5.0 L, 取 10%(ρ) 种子液接入发酵培养基中进行发酵培养, 溶氧量、搅拌速度和培养温度分别控制在 150 L/h, 300 r/min 和 30℃, CaCO_3 为中和剂.

2.5.3 一步乳酸发酵培养

采用优化的 7.5 L 发酵罐(图 1), 工作体积为 5.0 L, 取浓度 10^7 个/mL 的孢子液 100 mL 接入发酵罐发酵, 直到残糖浓度低于 5.0 g/L. 溶氧量、搅拌速度、培养温度及中和剂均与传统发酵培养一致.

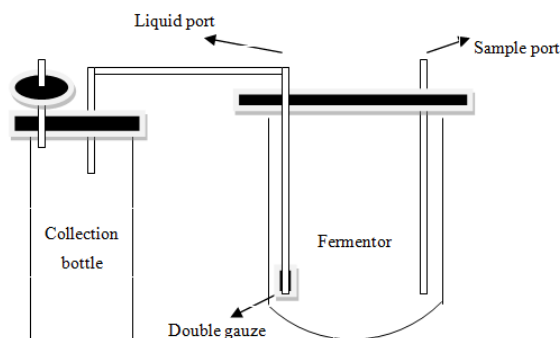


图 1 优化的 7.5 L 发酵罐

Fig.1 Schematic diagram of modified 7.5 L fermenter

2.6 分析方法

在样品中加入过量的 6 mol/L 盐酸进行预处理, 将混合液置于 80℃ 恒温水浴锅中至反应液澄清, 稀释定容至所需体积, 用 0.45 μm 微滤膜抽滤清液, 待用.

糖浓度的测定采用生物传感分析仪.

细胞干重的测定: 将培养物抽滤, 用蒸馏水洗涤 3 次, 抽滤, 60℃ 烘干至恒重(含水量低于 4%), 称重.

乳酸按文献[8]方法测定.

2.7 动力学参数计算

细胞比生长速率(μ , h^{-1})、葡萄糖比消耗速率(q_s , h^{-1})和 L-乳酸比生成速率(q_p , h^{-1})分别按式(1)~(3)计算或用 Origin 绘图软件^[18]拟合细胞生长密度(x , g/L)、剩余葡萄糖浓度(C , g/L)和 L-乳酸产量(p , g/L)数据进行插值计算(时间间隔为 0.1 h)得到.

$$\mu = \frac{1}{x} \frac{dx}{dt} = \frac{1}{x} \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\Delta x}{\Delta t}, \quad (1)$$

$$q_s = -\frac{1}{x} \frac{ds}{dt} = -\frac{1}{x} \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\Delta s}{\Delta t}, \quad (2)$$

$$q_p = \frac{1}{x} \frac{dp}{dt} = \frac{1}{x} \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \frac{\Delta p}{\Delta t}. \quad (3)$$

3 结果与讨论

3.1 传统发酵与一步法发酵特性分析

图 2(a)为传统发酵产乳酸过程，包括米根霉种子培养和产酸发酵 2 个阶段，接种量为 10%，即后期生物量与发酵初始生物量的比值应为 10:1。研究发现，在菌体刚接入发酵培养基时，存在乳酸合成延滞期，可能是由于种子在新的培养环境中有一个适应阶段，影响 L-乳酸的生产强度。为缩短延滞期，提出一步发酵法合成 L-乳酸策略，即菌体培养和乳酸发酵在同一个培养基中持续进行，初始葡萄糖浓度为 100 g/L，结果如图 2(b)所示。

从图可以看出，一步发酵法合成 L-乳酸整个过程明显存在 2 个阶段，菌体生长阶段(0~24 h)和乳酸合成阶段(>24 h)。菌体生长阶段，葡萄糖的消耗主要用于细胞生长，与传统发酵种子培养过程相似。培养 24 h 后，乳酸合成几乎没有延滞期，L-乳酸产量迅速增加，60 h 后，乳酸产量达最高的 62.0 g/L。传统乳酸发酵(包括种子培养和乳酸合成过程)达到乳酸最高产量用了 72 h，而一步发酵法乳酸合成阶段只用了 36 h，比传统乳酸发酵法中乳酸发酵过程的 48 h 缩短了 25%，可见，一步发酵法明显缩短了发酵周期，提高了生产强度。

两种发酵方法的实验结果如表 1 所示。不难发现，一步发酵过程中乳酸生产强度达 1.72 g/(L·h)，比传统发酵[1.19 g/(L·h)]高 45%。这可能是由于一步法发酵阶段延滞时间短、菌体密度大(4.79 g/L，大于传统发酵的 2.18 g/L)所致。一步法乳酸浓度和糖酸转化率分别达 62.0 g/L 和 0.76 g/g，都高于传统发酵法(57 g/L 和 0.71 g/g)。可见高菌体密度的一步法具有高效生产乳酸的能力。

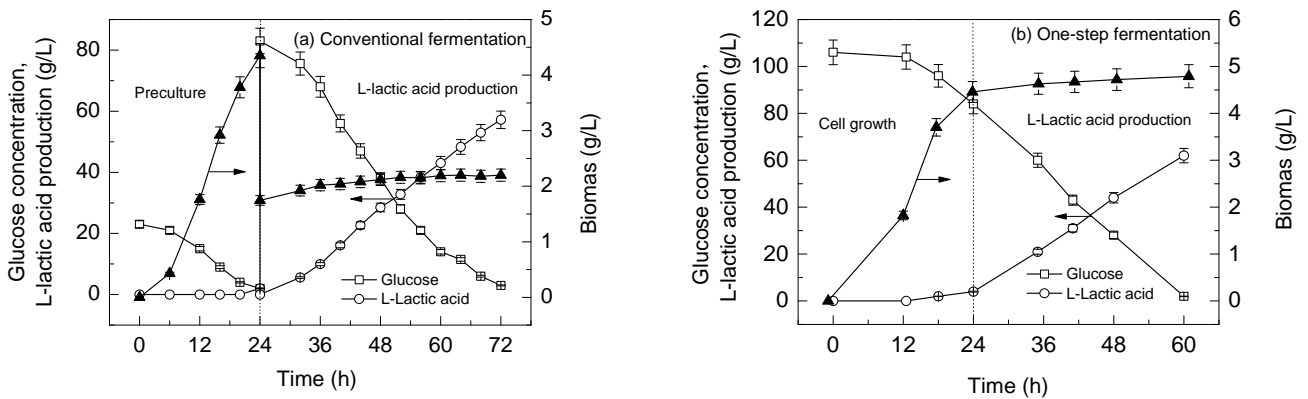


图 2 传统发酵和一步法发酵曲线
Fig.2 Time course of L-lactic acid production using one-step fermentation and conventional fermentation by *R. oryzae*

表 1 传统发酵和一步发酵产乳酸参数对比

Fermentation method	Stage	Time (h)	L-Lactic acid production (g/L)	Productivity [g/(L·h)]	Acid/sugar conversion yield (g/g)	Biomass (g/L)
Conventional	Proculture	24	2.00	-	-	4.35
	Production	48	57.00	1.19	0.71	2.18
One-step	Cell growth	24	2.00	-	-	4.46
	Production	36	62.00	1.72	0.76	4.79

3.2 传统发酵与一步法发酵的动力学分析

为进一步研究 2 种方法的动力学特点，利用插值法对葡萄糖比消耗率(q_s)、细胞比生长速率(μ)及乳酸比生成速率(q_p)进行计算，结果见图 3。如图所示，在种子培养阶段(0~24 h)，2 种方法乳酸比生成速率、细胞比生长速率的变化基本相似，而葡萄糖比消耗率变化不同，一步法是一直增加并达到最大值，而传统发酵是先增加后降低。乳酸合成阶段(>24 h)虽然 2 种方法的细胞比生长速率不同，但差别不明显，而葡萄糖比消耗率及乳酸比

生成速率有显著差别，大部分时间一步法低于传统方法，传统方法中葡萄糖比消耗率及乳酸比生成速率最大值分别为 1.2 和 0.84 h^{-1} ，而一步法的最大值仅有 0.51 和 0.29 h^{-1} ，约为前者的一半。分析表明，一步法不仅缩短了产酸阶段的延滞时间，还增加了菌体密度，二者都能较大提高乳酸的产量和生产强度，但乳酸比生成速率明显降低。考虑经济效益，其底物利用效率不高。因此，提高一步法的乳酸比生成速率将有效解决米根霉发酵产乳酸的瓶颈问题。

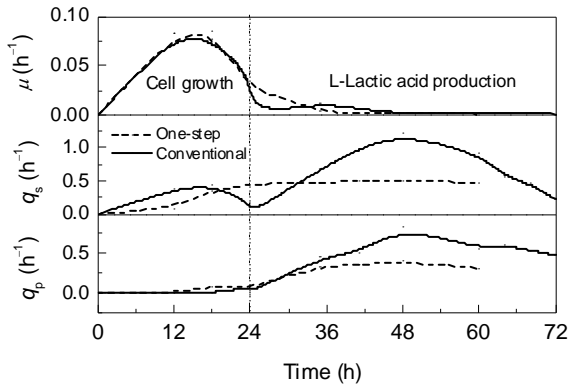


图3 米根霉2种方法合成乳酸的动力学参数
Fig.3 Comparison of kinetic parameters of L-lactic acid fermentation by *R. oryzae* using two methods

3.3 一步发酵法生产乳酸的条件优化

为了提高一步法过程中乳酸比生成速率,设计了不同的实验方案考察氮源、蛋白胨浓度和菌体密度的影响,优化米根霉一步发酵合成L-乳酸的工艺。

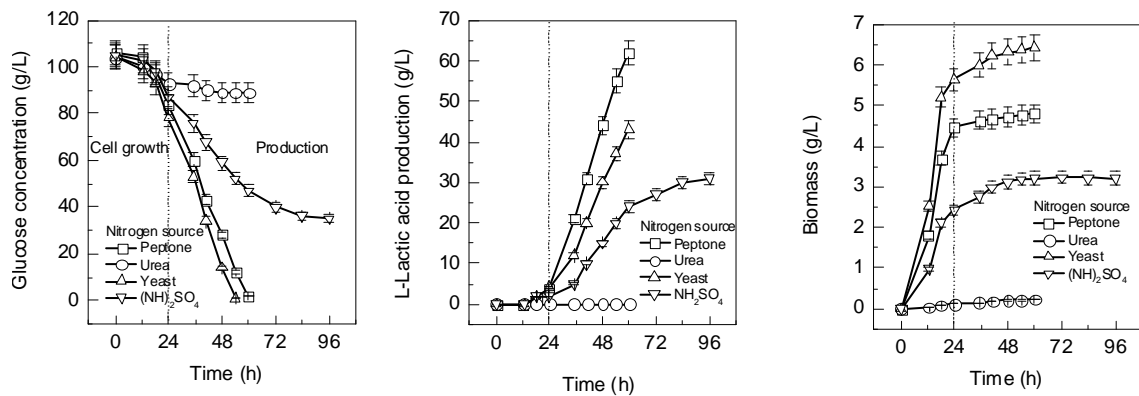


图4 不同氮源对米根霉一步发酵产L-乳酸的影响
Fig.4 Effect of nitrogen source on L-lactic acid production by *R. oryzae* using one-step fermentation

3.3.2 蛋白胨浓度对一步发酵合成L-乳酸的影响

蛋白胨浓度影响各类酶的合成,最终导致代谢产物合成的差异.考察了一步发酵合成L-乳酸过程中初始蛋白胨浓度对发酵的影响,结果见图5和表2.不同初始蛋白胨浓度下,前24h葡萄糖的消耗基本都用于菌体生长,并不产生乳酸,24h后L-乳酸的产量迅速增加,发酵36h后初始蛋白胨浓度为2,3,4g/L时乳酸产量均达到最大值,分别为62,68和64g/L(表2).蛋白胨浓度低于2.0g/L时,产酸阶段细胞几乎不生长,随蛋白胨浓度增大,细胞有缓慢生长迹象,但在2.0~4.0g/L范围内对产酸阶段酸的生成效率和产量没有显著影响.此外蛋白胨初始浓度并不会过多影响乳酸比生成速率.总体上蛋白胨浓度仅能造成生物量的差异,而不会提高乳酸比生成速率。

3.3.1 氮源对一步发酵合成L-乳酸的影响

考察了添加量均为2.0g/L的有机氮(蛋白胨、酵母膏、尿素)和无机氮(硫酸铵)对米根霉一步发酵合成L-乳酸的影响,结果如图4所示.从图可以看出,发酵开始,添加尿素时米根霉菌体几乎不长,24h后几乎没有L-乳酸生成;而以蛋白胨和酵母膏为氮源呈现不同的变化趋势,以酵母膏为氮源菌体生长较快,产生的生物量也较多,24h后达5.63g/L;以蛋白胨为氮源生物量只有4.46g/L,24h后进入发酵阶段,以酵母膏为氮源L-乳酸产量明显比蛋白胨低,发酵结束乳酸产量只37g/L,比蛋白胨为氮源的62g/L减少了40%.以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 为氮源生物量明显比蛋白胨和酵母膏为氮源时少,后期产酸速率及乳酸生成量明显偏低,发酵72h后,乳酸合成基本停滞,葡萄糖也很难消耗.可见蛋白胨最有利于米根霉一步发酵合成L-乳酸,其它氮源都不利于米根霉一步发酵法合成L-乳酸,原因有待进一步分析。

3.3.3 菌体密度对一步发酵合成L-乳酸的影响

采用一步发酵法,初始蛋白胨浓度为3.0g/L,在发酵开始的24h内,葡萄糖消耗、菌体生长和乳酸生成没有变化;发酵24h后,在保留原菌体不变的条件下,减少原发酵液体积0,25%,33%和50%,得到不同的菌体密度(多余的培养基可在后期循环利用,数据未列出).菌体密度对一步发酵合成乳酸的影响和传统发酵比生成速率如图6和表3所示.从图可以看出,产酸阶段,菌体最大密度为8.94g/L,是文献菌体量的5倍^[8]和10倍多^[6,17].24h后随菌体密度升高,糖耗速率与产酸效率显著上升,菌体密度从4.49g/L增加到8.94g/L时,发酵时间从36h缩短到了13h,乳酸的生产强度从1.88g/(L·h)增加到了4.62g/(L·h),发酵时间缩短了64%,而生产强度增加了148%(表3),更表明增加菌体密度能有

效提高乳酸生产强度，但产量并未有较大变化. 菌体密度提高可使乳酸比生成速率增大，且当菌体密度达 8.94 g/L 时，一步法的乳酸比生成速率高于传统发酵，证明

在一定范围内，乳酸比生成速率会随菌体密度升高而降低，但菌体密度增加到一定量时，乳酸比生成速率反而会增加.

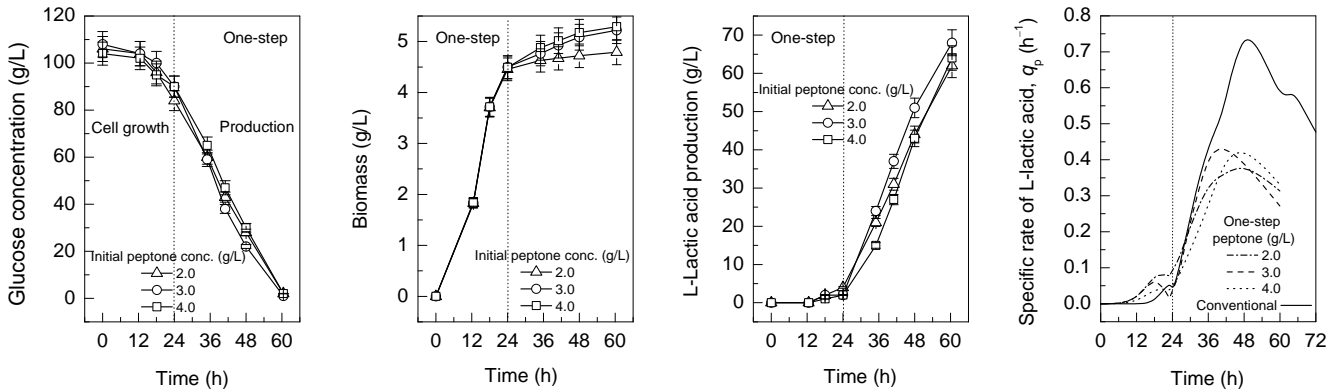


图 5 蛋白胨浓度对米根霉一步发酵产 L-乳酸的影响和传统发酵与一步发酵的比生成速率

Fig.5 Effect of initial peptone concentration on L-lactic acid production using one-step method and specific rate using two methods

表 2 不同蛋白胨浓度下的一步发酵结果

Table 2 Effect of initial peptone concentration on acid production of one-step fermentation

Peptone concentration (g/L)	Time (h)	L-Lactic acid production (g/L)	Productivity [g/(L·h)]	Acid/sugar conversion yield (g/g)	Biomass (g/L)
2.00	36	62	1.72	0.76	4.79
3.00	36	68	1.88	0.76	5.22
4.00	36	64	1.78	0.73	5.28

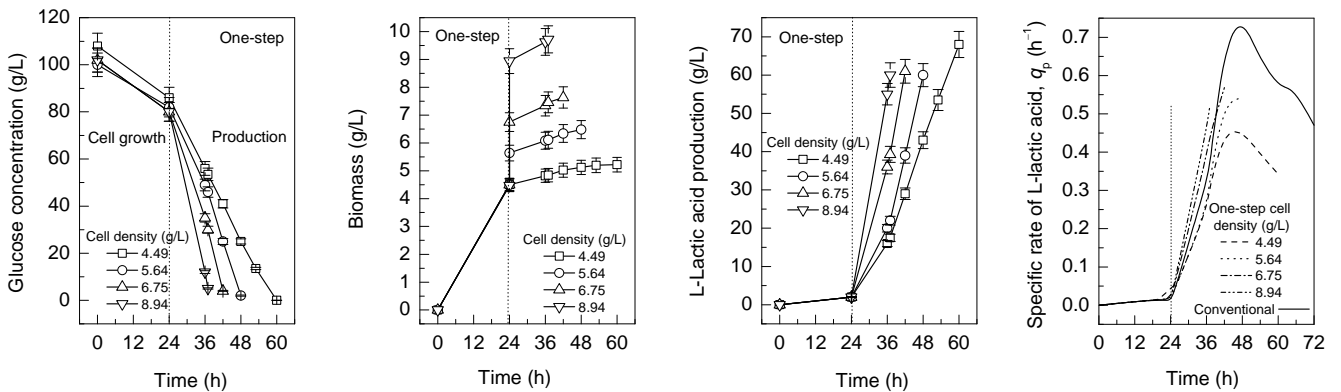


图 6 菌体密度对一步发酵合成乳酸的影响和传统与一步发酵比生成速率的对比

Fig.6 Effect of cell density on L-lactic acid production using one-step fermentation after 24 h by *R. oryzae* and specific rate using two methods

表 3 菌体密度对一步法发酵 24 h 后参数的影响

Table 3 Effect of cell density on acid production after fermentation 24 h using one-step fermentation

Cell density (g/L)	Acid production time (h)	Final biomass concentration (g/L)	L-Lactic acid production (g/L)	Productivity [g/(L·h)]	Acid/sugar conversion yield (g/g)
4.49	36	5.22	68.00	1.88	0.76
5.64	24	6.48	60.00	2.50	0.75
6.75	18	7.63	61.00	3.39	0.80
8.94	13	9.72	60.00	4.62	0.80

3.4 发酵系统的比较

米根霉利用葡萄糖进行固液体发酵合成 L-乳酸已有广泛研究，文献结果与本研究结果的对比见表 4.

固体发酵的缺点是传质效率低，直接导致乳酸产率低下. 为增加真菌生物量并消除真菌菌丝体内部传质的

限制，已开发了数种真菌形态控制方法以增加乳酸的生产强度，如 Efremenko 等^[14]利用 PVA 凝胶固定化米根霉细胞发酵生产 L-乳酸，生产强度达 4.5 g/(L·h)，为目前报道的利用米根霉发酵合成 L-乳酸的最高水平. 但这种摇瓶技术并不适用于乳酸大规模生产，且固定化细

胞会产生额外的成本支出. 如果控制菌体形态为球状, 则整个过程在保持高效的同时将更加经济. 但液体菌球

发酵不论是 L-乳酸产量还是生产效率都较低. 而本实验乳酸的生产强度达 4.6 g/(L·h), 高于文献^[14].

表 4 米根霉利用葡萄糖发酵合成 L-乳酸的对比

Table 4 Comparison of lactic acid production from glucose by cultures of *R. oryzae*

Culture method	Productivity [g/(L·h)]	Yield (g/g)	Reference
Solid fermentation	1.40	0.76	[19]
Flocs on support in jar-fermentor	1.70	0.86	[10]
Flocs on support in air-lift bioreactor	1.80	0.87	[13]
Flocs on support in stirred tank bioreactor	4.03	0.90	[2]
Immobilized on PVA-cryogel	4.50	0.94	[14]
Immobilized on cotton cloth(in rotating fibrous bed bioreactor)	2.50	0.90	[20]
Small pellets in bubble column	2.58	0.88	[21]
Small pellets in jar-fermentor	0.70	0.77	[22]
One-step fermentation total process	1.62	0.60	
One-step fermentation production stage	4.62	0.80	This work

4 结论

对比了一步发酵法和传统发酵法米根霉产 L-乳酸的特性, 考察了氮源、初始蛋白胨浓度及菌体密度对米根霉一步发酵合成 L-乳酸的影响, 得到以下结论:

(1) 一步发酵法不仅能缩短产酸阶段的延滞时间, 还增加了菌体密度, 二者都能较大提高乳酸的产量和生产强度, 但产物比生成速率比传统发酵明显降低, 底物利用效率不高.

(2) 一步发酵法合成 L-乳酸过程中, 以尿素、硫酸铵、酵母膏为氮源都不利于合成 L-乳酸, 而以蛋白胨为氮源有利于合成.

(3) 一步发酵法合成 L-乳酸过程中, 发酵液中初始蛋白胨浓度变化仅能造成生物量的差异, 不会过大地影响产物比生成速率

(4) 一步发酵法合成 L-乳酸过程中, 在一定范围内增加菌体密度(<6.75 g/L)会降低产物比生成速率, 菌体密度增加到一定量时(>6.75 g/L), 产物比生成速率增加.

参考文献:

- [1] Eiteman M A, Ramalingam S. Microbial Production of Lactic Acid [J]. *Biotechnol. Lett.*, 2015, 37(5): 955-972.
- [2] Yu L, Pei X, Lei T, et al. Genome Shuffling Enhanced L-Lactic Acid Production by Improving Glucose Tolerance of *Lactobacillus Rhamnosus* [J]. *J. Biotechnol.*, 2008, 134(1/2): 154-159.
- [3] Ding S F, Tan T W. L-Lactic Acid Production by *Lactobacillus Casei* Fermentation Using Different Fed-batch Feeding Strategies [J]. *Process. Biochem.*, 2006, 41(6): 1451-1454.
- [4] Zhang Z Y, Jin B, Kelly J M. Production of Lactic Acid from Renewable Materials by *Rhizopus fungi* [J]. *Biochem. Eng. J.*, 2007, 35(3): 251-263.
- [5] Bai D M, Li S Z, Liu Z L, et al. Enhanced L-(+)-Lactic Acid Production by an Adapted Strain of *Rhizopus oryzae* Using Corncob Hydrolysate [J]. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2008, 144(1): 79-85.
- [6] Liao W, Liu Y, Frear C, et al. A New Approach of Pellet Formation of a Filamentous Fungus—*Rhizopus oryzae* [J]. *Bioresource. Technol.*, 2007, 98(18): 3415-3423.
- [7] Papagianni M. Fungal Morphology and Metabolite Production in Submerged Mycelial Processes [J]. *Biotechnol. Adv.*, 2004, 22(3): 189-259.
- [8] Fu Y Q, Yin L F, Zhu H Y, et al. Effects of Pellet Characteristics on L-Lactic Acid Fermentation by *R. oryzae*: Pellet Morphology, Diameter, Density, and Interior Structure [J]. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2014, 174(6): 2019-2030.
- [9] Maas R H W, Springer J, Eggink G, et al. Xylose Metabolism in the Fungus *Rhizopus oryzae*: Effect of Growth and Respiration on L-(+)-Lactic Acid Production [J]. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, 35(6): 569-578.
- [10] Kosakai Y, Park Y S, Okabe M. Enhancement of L-(+)-Lactic Acid Production Using Mycelial Flocs of *Rhizopus oryzae* [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 1997, 55(3): 461-470.
- [11] Miura S, Arimura T, Hoshino M, et al. Optimization and Scale-up of L-Lactic Acid Fermentation by Mutant Strain *Rhizopus* sp. MK-96-1196 in Airlift Bioreactors [J]. *J. Biosci. Bioeng.*, 2003, 96(1): 65-69.
- [12] Yu M C, Wang R C, Wang C Y, et al. Enhanced Production of L-(+)-Lactic Acid by Floc-form Culture of *Rhizopus oryzae* [J]. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*, 2007, 38(3): 223-228.
- [13] Park E Y, Kosakai Y, Okabe M. Efficient Production of L-(+)-Lactic Acid Using Mycelial Cotton-like Flocs of *Rhizopus oryzae* in an Air-lift Bioreactor [J]. *Biotechnol. Prog.*, 1998, 14(5): 699-704.
- [14] Efremenko E N, Spiricheva O V, Veremeenko D V, et al. L-(+)-Lactic Acid Production Using Poly(vinyl alcohol)-Cryogel-entrapped *Rhizopus Oryzae* Fungal Cells [J]. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2006, 81(4): 519-522.
- [15] Bai D M, Jia M Z, Zhao X M, et al. L-(+)-Lactic Acid Production by Pellet-form *Rhizopus oryzae* R1021 in a Stirred Tank Fermentor [J]. *Chem. Eng. Sci.*, 2003, 58(3-6): 785-791.
- [16] Riesenber D, Guthke R. High-cell-density Cultivation of Microorganisms [J]. *Appl. Microtechnol. Biotechnol.*, 1999, 51(4): 422-430.
- [17] Liao W, Liu Y, Chen S L. Studying Pellet Formation of a Filamentous Fungus *Rhizopus oryzae* to Enhance Organic Acid

- Production [J]. Appl. Biochem. Biotech., 2007, 136/137/138/139/140(1): 689-701.
- [18] Fu Y Q, Li S, Chen Y, et al. Enhancement of Fumaric Acid Production by *Rhizopus oryzae* Using a Two-stage Dissolved Oxygen Control Strategy [J]. Appl. Biochem. Biotechnol., 2009, 162(4): 1031-1038.
- [19] Soccol C R, Marin B, Lebeault J M, et al. Potential of Solid State Fermentation for Production of L(+)-Lactic Acid by *Rhizopus oryzae* [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1994, 41(3): 286-290.
- [20] Tay A, Yang S T. Production of L(+)-Lactic Acid from Glucose and Starch by Immobilized Cells of *Rhizopus oryzae* in a Rotating Fibrous Bioreactor [J]. Biotechnol. Bioeng., 2002, 80(1): 1-12.
- [21] Zhou Y, Dominguez J M, Cao N, et al. Optimization of L-Lactic Acid Production from Glucose by *Rhizopus oryzae* ATCC 52311 [J]. Appl. Biochem. Biotechnol., 1999, 77/78/79(1): 401-407.
- [22] Liu Y, Liao W, Liu C, et al. Optimization of L-(+)-Lactic Acid Production Using Palletized Filamentous *Rhizopus oryzae* NRRL 395 [J]. Appl. Biochem. Biotechnol., 2006, 129(4): 844-853.