

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (3) :372 - 378; 4 March 2015  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140286

## 米根霉菌球特性对乳酸发酵的影响

章华婷<sup>1</sup>, 黄莹<sup>1</sup>, 付永前<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>台州学院生物质资源研究所, 浙江 台州 318000

<sup>2</sup>南京工业大学生物与制药工程学院, 材料化学工程国家重点实验室, 江苏 南京 210009

**摘要:** 【目的】考察了接种量、蛋白胨和  $\text{CaCO}_3$  浓度对菌球特性(形态、大小、密度和内部结构)的影响,并结合菌球内部结构深入剖析了菌球特性对乳酸发酵的影响。【方法】将孢子液接入到含不同蛋白胨和  $\text{CaCO}_3$  浓度的种子培养基,控制不同的初始孢子浓度,培养 36 h,用图像分析软件进行菌球内部聚集形态结构分析,并进行乳酸发酵。【结果】结果表明,接种量是影响菌球形成以及大小的重要因素,接种量越大,菌球直径越小;蛋白胨浓度对菌球密度影响最大,浓度越高密度越大; $\text{CaCO}_3$  浓度主要影响孢子萌发以及菌丝分枝频率。【结论】菌球密度是影响乳酸产量最显著的因素,低密度的菌球易形成较薄外层和内部菌丝松散或者中空的结构,乳酸产量低,乳酸产量随着密度而增加,当密度增大到  $50 - 60 \text{ kg/m}^3$  时,菌球内部形成外层较厚且紧密程度分布均一和内部较为松散的结构,此时乳酸产量最大;当密度过大时,菌球内部结构致密,影响传氧传质,导致产量下降。

**关键词:** 密度,显微结构,乳酸,菌球特性,米根霉

**中图分类号:** Q815      **文章编号:** 0001-6209(2015)03-0372-07

L-乳酸作为生产绿色环保原料乳酸乙酯以及生物降解塑料-聚乳酸的单体,而越来越引起人们的重视<sup>[1]</sup>。米根霉是微生物合成纯 L-乳酸的主要菌株<sup>[2-3]</sup>。在发酵生产 L-乳酸的过程中,米根霉的生长特性导致了很多问题,尤其是发酵过程中呈现三种不同的形态:团块状、絮状和球状<sup>[4]</sup>。研究表明球状菌体是最适宜发酵产酸的,如何控制米根霉菌体生长为球形成为研究的关键<sup>[5-6]</sup>。

近年来,研究者为了控制米根霉菌球形态而做了不懈努力<sup>[7-8]</sup>。多数认为:菌球直径是影响产酸最重要的因素。他们认为,在宏观尺度上,发酵过程呈

现均一性,但是在微观尺度上,菌球直径将直接影响菌球内部的传热和传质,而导致菌球内部只能一定外围区得到充足的氧气,一旦菌球直径超过一定界限,营养物质将无法达到该区,而引起该区域菌体自溶<sup>[9-10]</sup>。课题组之前的研究发现,米根霉产富马酸的临界大小是在  $1.2 \text{ mm}$ <sup>[8]</sup>。然而,菌球大小并不是决定有机酸产量唯一的形态指标。在其他的研究工作中发现,菌球周边的结构分布以及内部非活性菌丝体比例也是强烈影响产酸的重要因素。Wittier 等<sup>[11]</sup>用组织学染色法在 *Penicillium chrysogenum* 菌球内部辨别出 4 个不同的层:外层(L1, 占到一个

基金项目:国家自然科学基金项目(21106091);国家“863 计划”(2011AA02A206)

\* 通信作者。Tel/ Fax: +86-576-88660338; E-mail: fuyq@tzc.edu.cn;

作者简介:章华婷(1993-),女,浙江金华人,生物工程专业本科生,研究方向为可再生资源利用及微生物的代谢调控。E-mail: 1712837746@qq.com

收稿日期:2014-06-04;修回日期:2014-09-05

2 mm 菌球直径的 60%), 2 个中间层 (L2 和 L3, 38%), 和 1 个中间层 (L4, 2%)。外层细胞质丰富, 适于代谢产物的合成。进一步的研究还表明, 菌球内部结构分布也是非均一的, 有效的传质和传热与菌体内部结构的分布相关, 并最终影响代谢产物的合成<sup>[12-13]</sup>。因此, 在米根霉发酵过程中, 实现种子阶段菌球形态的控制并不能完全解读米根霉生产形态对产酸的影响。如何评价米根霉在发酵过程中形态对于发酵的影响, 并提供量化的指标对发酵过程进行评价指导是需要着重解决的问题。本文用多因素实验的方法寻求建立形态信息与乳酸产量的关联, 为从形态学角度出发为发酵过程的优化提供指导, 并用工程学的原理指导控制形态, 实现 L-乳酸的高产。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

菌种: 米根霉诱变菌株 TZ-45 (*Rhizopus Oryzae* TZ-45), 台州学院生物质资源研究所保藏。

### 1.2 培养基

**1.2.1 种子培养基:** 葡萄糖 20 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g/L, 蛋白胨 1.0 - 3.0 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.2 g/L,  $\text{CaCO}_3$  2.0 - 4.0 g/L。

**1.2.2 发酵培养基:** 葡萄糖 80 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.25 g/L,  $\text{ZnSO}_4$  0.04 g/L 和  $\text{CaCO}_3$  50 g/L。

### 1.3 培养方法

取米根霉孢子悬浮液 (浓度  $10^{10}$  个/L) 接入装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角平底瓶中, 使初始接种量控制在  $(0.009 \times 10^7) - (107.6 \times 10^7)$  个/L,  $30^\circ\text{C}$ , 150 r/min 下摇瓶培养 36 h 得种子液, 进入另外 250 mL 三角瓶发酵。发酵条件: 温度  $30^\circ\text{C}$ , 搅拌转速 150 r/min, 装液量 50 mL, 接种量 10%, pH 由  $\text{CaCO}_3$  控制在 5.5 - 6.0。

### 1.4 糖浓度、生物量和乳酸的测定

**1.4.1 糖浓度的测定:** SBA-40C 生物传感分析仪测定。

**1.4.2 菌丝体干重的测定:** 将培养物抽滤, 并用蒸馏水洗 3 次。抽干后,  $60^\circ\text{C}$  烘干至恒重 (含水量在 4% 以下), 称重。

**1.4.3 乳酸测定:** DIONEX HPLC P680 工作站,

Alltech 有机酸色谱柱 250 mm  $\times$  4.6 mm; Shodex RI-101 示差折光检测器; 流速: 0.8 mL/min; 进样量: 20  $\mu\text{L}$ ; 流动相: 0.005 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; 柱温:  $60^\circ\text{C}$ <sup>[14]</sup>。

### 1.5 菌球平均直径与菌球平均密度分析

取样品 4 mL, 用蒸馏水稀释将菌球悬浮, 置于带 CCD 相机的显微镜下, 调整焦距拍照, 曝光时间设定为 40 ms。所采取得到的数码相片用图像处理软件 (image J 3.0) 进行直径分析。取 100 个以上菌球的直径为菌球的平均直径。菌球平均密度定义为单位湿菌体体积内的菌体干重, 具体计算参见文献 [15] 所述方法。

### 1.6 菌球内部形态的分析

手动选取与当量直径大小接近的菌球 5 - 10 个, 用蒸馏水冲洗 2 - 3 次, 冰冻待用。首先, 用冰冻包埋剂将待切样品包埋, 速冻条件为  $-20^\circ\text{C}$ , 速冻时间为 20 min。将切片置于  $-20^\circ\text{C}$  切片台, 切片厚度为 70  $\mu\text{m}$ 。切片后, 用预冻的载玻片沾取切片, 然后置于室温固定化。沾取的过程中, 注意防止切片卷曲重叠。固定后的切片在显微镜下用于分析菌球的内部形态。选取菌球的最大直径的切片代表菌球的内部结构观察。

### 1.7 菌球切片的内部聚集形态结构分析

菌球内部聚集形态结构的分析采用图像处理软件。该软件由中科院合肥等离子物理研究所郑之明教授惠赠。软件可以将图像灰度边界自适应处理, 然后根据灰度将图像进行分区并统计, 不同的分区采用伪染色技术进行标记。分区以后可以统计不同灰度即不同聚集度的图像, 可以表现菌球内部生物量的致密情况。选取代表菌球内部结构的切片, 分别进行二值化, 灰度化, 染色增强, 统计各部分聚集情况以及聚集情况在菌球中的位置分布。

## 2 结果和讨论

### 2.1 接种量、蛋白胨和 $\text{CaCO}_3$ 浓度对菌球形态及特性的影响

不同接种孢子浓度、蛋白胨和  $\text{CaCO}_3$  浓度对米根霉菌体形态以及菌球直径、密度和生物量的影响如图 1 所示。图 1-A、B 主要阐述了因素对菌球形成以及直径的影响。结果表明, 接种量对菌球的形成以及直径影响最大, 当蛋白胨和菌球  $\text{CaCO}_3$  浓度保持不变时, 菌球直径随着接种量的增加而减小, 接

种量越小越易行成较大菌球,然而,当接种量过大时,反而易形成絮状,其原因可能是,随着接种量从  $0.009 \times 10^7$  增加到  $107.4 \times 10^7$  个/L,菌丝长度以及分支频率大幅增加,但在聚合形式上,能聚集的颗粒以及相互之间的紧凑程度减少了<sup>[6, 16]</sup>;当接种量和  $\text{CaCO}_3$  浓度恒定时,菌球直径随着蛋白胨浓度的增

加而增加,但增加程度没有接种量的影响大,在最低的蛋白胨浓度下,所形成的菌球较小、较轻并且蓬松,使得其易于形成絮状,然而,在高蛋白胨浓度下,米根霉往往形成团状而不利于发酵<sup>[17]</sup>;  $\text{CaCO}_3$  浓度对直径的影响不同于蛋白胨对其的影响,可能是因为  $\text{Ca}^{2+}$  参与调节菌丝延伸和分支机制<sup>[18-19]</sup>,在不

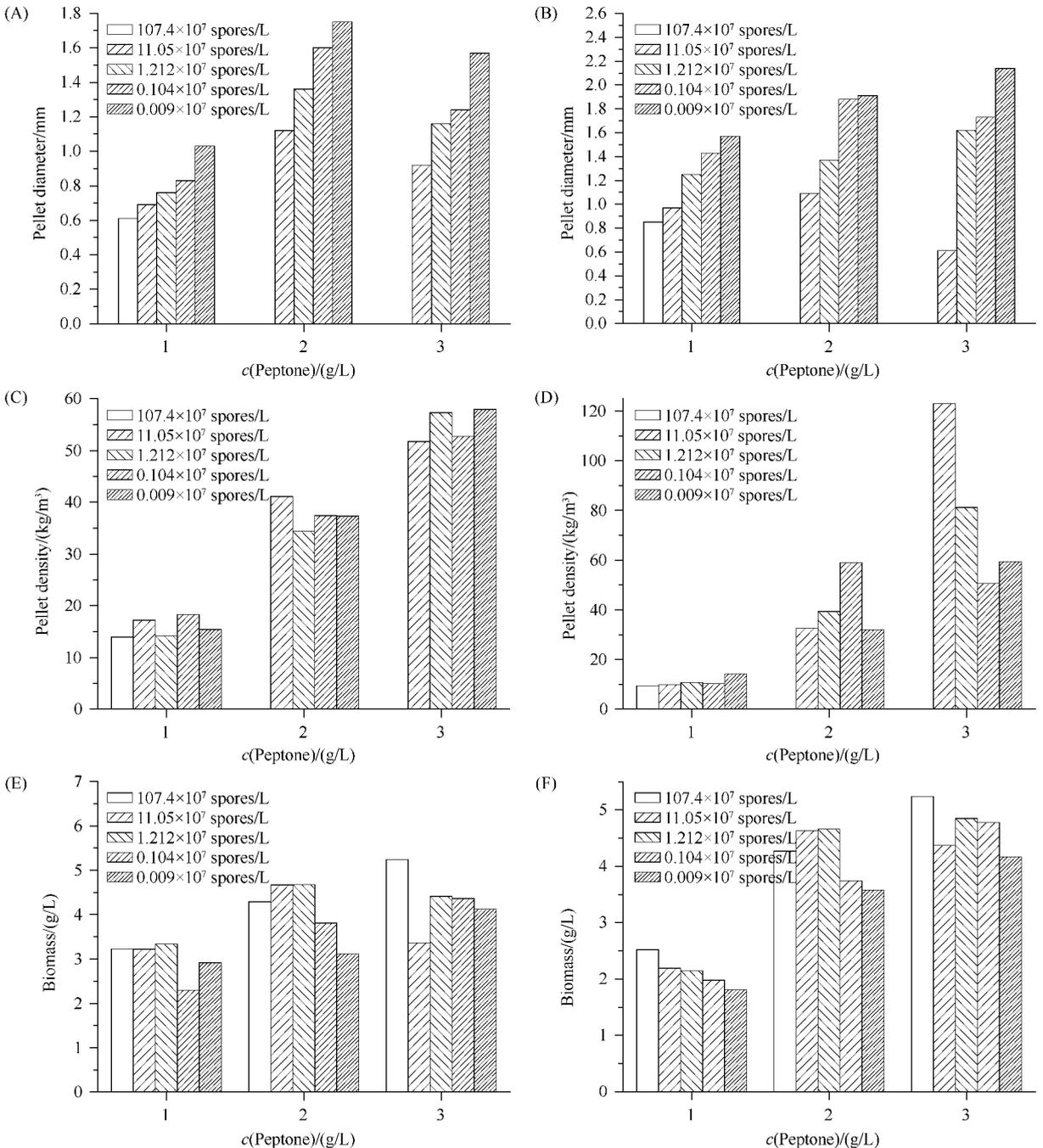


图 1. 蛋白胨、接种孢子浓度和碳酸钙浓度对菌球直径, 菌球密度, 生物量的影响

Figure 1. The effects of peptone, inoculum size, and  $\text{CaCO}_3$  concentration on pellet diameter, pellet density, and biomass. (A) (C) (E) represent  $\text{CaCO}_3$  concentration 2.0 g/L and (B) (D) (F) represent  $\text{CaCO}_3$  concentration 4.0 g/L, respectively.

同的蛋白胨浓度下, 菌丝延伸和分支率不同, 从而导致了变化的多样性<sup>[5]</sup>。

从图 1-C、D 可以看出, 蛋白胨浓度对菌球的密度影响最大。Bai 等<sup>[2]</sup>认为增加  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  浓度, 将会增加菌球直径, 但会导致菌球密度的减小。然而, 本实验的研究结果与 Bai 恰好相反, 菌球的密度是随着蛋白胨浓度的增加而增加, 该结果与 Pavko 等<sup>[6]</sup>相似。Pavko 研究认为氮源的增加将会导致更多的生物量以及菌体平均干重的大幅增长, 然而, 菌球的大小以及数量变化并不明显, 这充分说明了更高的氮源将导致更紧密的菌球结构。这些研究的不同可能是由于所用氮源不同, Liao 等<sup>[5]</sup>研究认为氮源的种类对菌球的形成影响较大, 不同氮源对 *R. oryzae* ATCC 20344 生长以及形态影响的研究表明, 相比其他氮源, 蛋白胨产生更小, 更独特以及更重的菌球<sup>[20]</sup>。有意思的是接种量对菌球密度几乎没有影响。

蛋白胨浓度同样对生物量具有较大的影响(图 1-E、F)。生物量只有当蛋白胨浓度的增加时而增加。然而, 当蛋白胨浓度超过 2 g/L 时, 生物量的变化开始不明显。当蛋白胨浓度恒定时, 接种量和  $\text{CaCO}_3$  浓度对生物量浓度几乎没有影响。

综上所述, 接种量和蛋白胨浓度都影响米根霉菌体的形态。当接种量保持恒定时, 菌球的直径只有轻微变化, 然而, 颗粒密度和生物量是高度依赖于蛋白胨浓度。接种量对直径大小的影响要大于生物量, 其原因可能是在一定范围接种量范围内, 生物量主要受氮源控制。碳酸钙浓度对颗粒直径和密度的影响随着接种量以及蛋白胨浓度的不同而呈现不同变化, 可能是因为它只与孢子萌发、菌丝生长以及菌丝分支频率有关<sup>[5]</sup>。

## 2.2 菌球内部结构分布与乳酸产量的关系

根据图 1 设计的实验, 不同密度的菌球内部结构分布与产酸关系分析见图 2。

基于 K-means 算法分区, 得到菌球内部结构的定量分析情况。其中, 伪染色色彩中的绿色和蓝色代表致密度相对较高的情况, 红色与粉色代表致密度相对较低的情况。通过伪染色, 可以对菌体的致密情况度进行定位以及定量分析。

从形态的结构特征上来讲, 其内部的结构特征是十分丰富的。菌体表现出各种具有典型代表的结构特征, 例如, 整体分散结构的菌球 (fully dispersed pellet), 整体致密的结构 (highly dense aggregated

structure), 内部空洞的结构 (hollow structure), 外部致密内部空洞的结构 (core-shell structure), 整体致密外部毛糙的结构 (flocky dense pellet) 等。

通常来讲, 均匀分布的高度致密的菌球会造成质量传递的困难, 因此会造成菌体产量的下降。在 L-乳酸生产的体系中, 所谓的致密毛糙小球 (small flocky dense pellet) (图 2-A) 展现了很好的乳酸分泌能力, 产量达到了 53.8 g/L。其典型的结构为, 致密的蓝色层与绿色层分布于中心位置, 边缘呈现较为松散红色层和粉色层。可能的原因是, 即使其内部质量分布较为致密, 但是其较小的直径 (0.6 mm) 保证了基质的供应, 而外层毛糙的结构也保证了由菌丝体之间形成的孔通道能够良好的吸收与利用基质; 另外一个典型的结构是壳核结构 (core-shell structure) (图 2-C), 致密紧凑的菌丝体 (蓝色与绿色层) 分布于菌体外部, 在松散层分布在球的内部, 其中致密层与松散层存在明显的结构分区。致密层由大量的菌丝体缠绕而成, 内部则由松散的菌丝体组成。在一项研究中 Driouc<sup>[21]</sup>认为单个菌体中目标产物活性生产层是影响产量的重要因素, 而壳核结构中致密的“shell 结构”细胞层恰恰是活性最高的生产部位。在本体系中, 可以通过调整菌球的密度而获得具有该种结构的菌球, 并且该结构菌球有利于乳酸的生产, 此结构下乳酸生产能力最强; 其他典型的结构包括空洞结构 (hollow structure) (图 2-B、2-F、2-H、2-I)。此结构由薄层紧密层和内部空洞层构成, 绿色或者蓝色的部位环绕分布于菌体外侧, 内部有极为疏松的菌体或者空洞构成 (图 2-B、2-I)。其与壳核结构的区别在于其致密层的厚度以及致密的程度。在厚度上, 壳核结构常为 0.1 mm - 0.3 mm, 而空洞结构的外部致密层常常小于 0.1 mm; 结构的紧密空洞结构也更紧密。从发酵结果上来看, 空洞结构是明显不利于乳酸生产的。其原因可能是, 菌丝体的非均匀分布导致了非活性菌体在内部的大量分布, 造成菌体整体生产活性的下降; 或者由于外部过于致密的结构导致薄层紧密的菌体过量消耗了基质, 菌体内部基质供应不足, 外部生长过剩, 同时直径增加造成恶性循环, 使得整体的菌体催化效率变低<sup>[22-23]</sup>。需要注意的一点是, 空洞结构现象不止会在超过菌球临界直径的菌球中产生, 也会在直径较小的菌球中产生 (图 2-B)。

从整体上来推测, 菌球内部的结构是存在演变过

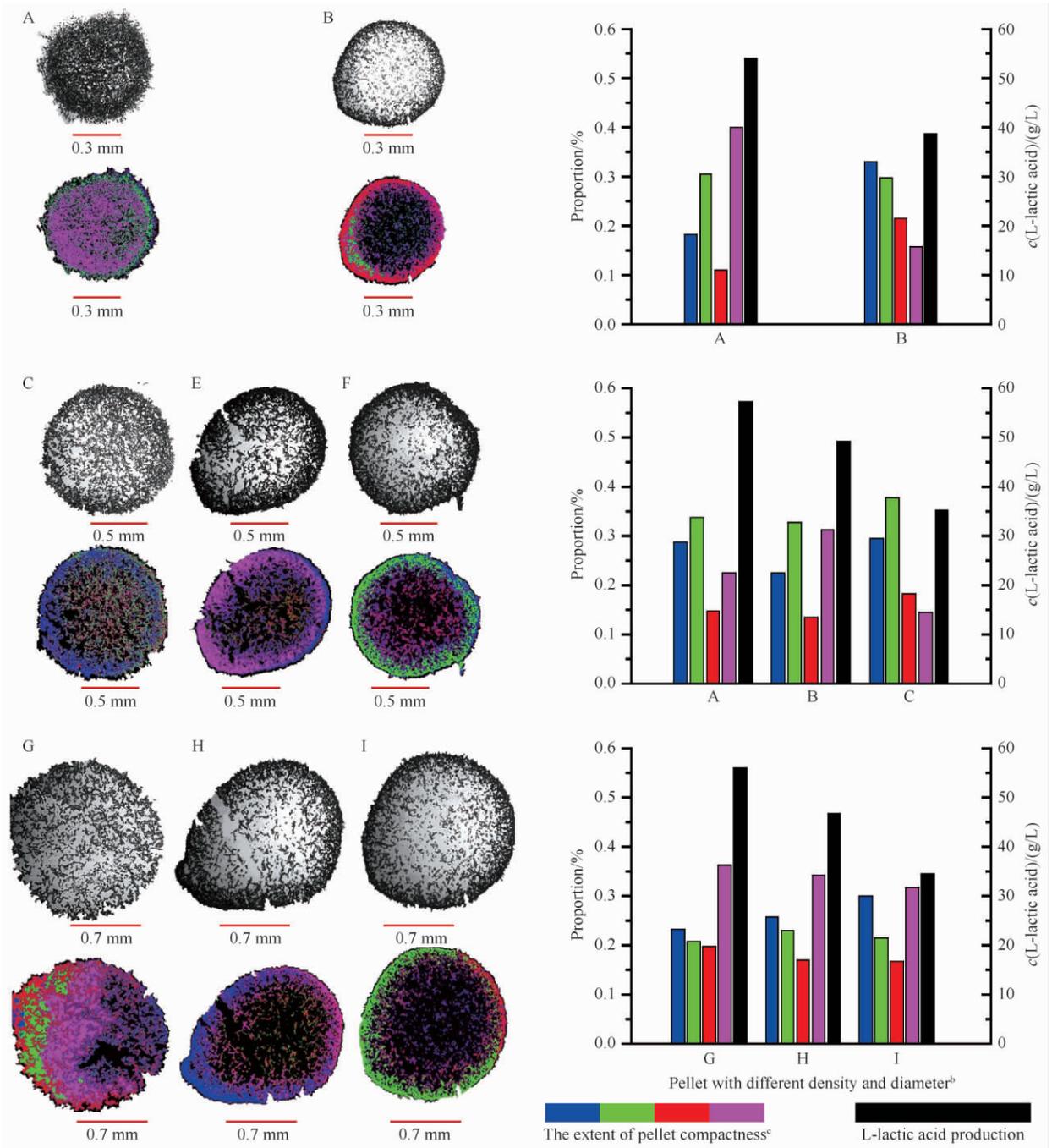


图 2. 米根霉产乳酸和菌球内部结构之间的相关性<sup>a</sup>

Figure 2. The correlation between pellet interior structure and Lactic acid fermentation by *R. oryzae* (A.  $0.6 \pm 0.1$  mm and  $123 \pm 0.6$   $\text{kg}/\text{m}^3$ ; B.  $0.6 \pm 0.1$  mm and  $17.2 \pm 0.3$   $\text{kg}/\text{m}^3$ ; C.  $1.0 \pm 0.2$  mm and  $57.3 \pm 0.3$   $\text{kg}/\text{m}^3$ ; E.  $1.0 \pm 0.2$  mm and  $41.1 \pm 0.6$   $\text{kg}/\text{m}^3$ ; F.  $1.0 \pm 0.2$  mm and  $9.18 \pm 0.4$   $\text{kg}/\text{m}^3$ ; G.  $1.5 \pm 0.2$  mm and  $57.9 \pm 0.4$   $\text{kg}/\text{m}^3$ ; H.  $1.5 \pm 0.2$  mm and  $37.4 \pm 0.2$   $\text{kg}/\text{m}^3$ ; I.  $1.5 \pm 0.2$  mm and  $10.3 \pm 0.2$   $\text{kg}/\text{m}^3$ ). <sup>a</sup>Since the software could not calculate the ratio of hollow pellets, the ratio of hollow pellets is not given in the figure, and the black part of the internal structure of the pellets represent hollow portions; <sup>b</sup>X-axis: Pellet with different density and diameter; <sup>c</sup> Represent the compactness degree: blue was the most compact and pink was the loosest.

程中的,在前期直径较小时,菌球存在致密的结构,密度较大,此时菌球会呈现出边缘毛糙的生长情况;而

当直径进一步加大,分别会演变成为致密的外部结构,此时产酸活跃层成球菌球产量的关键,比如,壳核

结构可以有效增加产酸活跃层, 而空洞结构在外形成薄层的紧密层, 使得产酸活跃层明显降低。也有可能存在这样一种情况, 菌球直径进一步的变化过程中, 菌球的生长基质供应以及生长状况良好, 其内部和外部的生长均匀, 最后表现出层次分明的产酸活跃层, 利于产酸。总体来讲, 菌球结构与产量之间的存在密切联系, 菌球结构的变化引起菌球产酸量变化的原因最有可能是引起产酸活跃层厚度的变化, 为从形态角度优化发酵过程提供了良好的思路。

### 3 结论

考察了接种量、蛋白胨和  $\text{CaCO}_3$  浓度对菌球特性(形态、大小、密度和内部结构)的影响, 并结合菌球内部结构深入剖析了菌球特性对乳酸发酵的影响。基于研究结果, 得到以下结论。

(1) 接种量是影响菌球形成以及大小的重要因素, 接种量越大, 菌球直径越小; 蛋白胨浓度对菌球密度影响最大, 浓度越高密度越大;  $\text{CaCO}_3$  浓度主要影响孢子萌发以及菌丝分枝频率。

(2) 菌球密度是影响乳酸产量最显著的因素, 不同菌体密度呈现不同的菌体内部结构特征。低密度菌球易形成较薄外层和内部菌丝松散或者中空的内部结构, 乳酸产量低; 随着密度的增加, 到  $50-60 \text{ kg/m}^3$  时, 菌球内部形成外层较厚且紧密程度分布均一和内部较为松散的壳核结构, 乳酸产量最大; 当密度过大时, 菌球内部结构致密, 影响传氧传质, 导致产量下降, 但较小的直径 ( $0.6 \text{ mm}$ ) 保证了基质的供应, 而外层毛糙的结构也保证了由菌丝体之间形成的孔通道能够良好的吸收与利用基质, 从而也不影响乳酸的合成。

总体来讲, 菌球结构与产量之间存在密切联系, 菌球结构的变化引起菌球产酸量变化的原因最有可能是引起产酸活跃层厚度的变化, 为从形态角度优化发酵过程提供了良好的思路。

### 参考文献

[1] Zhang ZY, Jin BJ, Kelly M. Production of lactic acid from renewable materials by *Rhizopus fungi*. *Biochemical Engineering Journal*, 2007, 35 (3): 251-263.

[2] Bai DM, Jia MZ, Zhao XM, Ban R, Shen F, Li XG, Xu SM. L (+)-lactic acid production by pellet-form *Rhizopus*

*oryzae* R1021 in a stirred tank fermentor. *Chemical Engineering Science*, 2003, 58 (36): 785-791.

- [3] Liao W, Liu Y, Chen SL. Studying Pellet Formation of a Filamentous Fungus *Rhizopus oryzae* to Enhance Organic Acid Production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2007, 136-140 (12): 689-701.
- [4] Papagianni M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, 2004, 22 (3): 189-259.
- [5] Liao W, Liu Y, Frear C, Chen SL. A new approach of pellet formation of a filamentous fungus-*Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technology*, 2007, 98 (18): 3415-3423.
- [6] Žnidaršič P, Komel R, Pavco A. Influence of some environmental factors on *Rhizopus nigricans* submerged growth in the form of pellets. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 2000, 16 (3): 589-593.
- [7] Liu Y, Liao W, Chen S. Study of pellet formation of filamentous fungi *Rhizopus oryzae* using a multiple logistic regression model. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 99 (1): 117-128.
- [8] Fu YQ, Xu Q, Li S, Huang H, Chen Y. A novel multi-stage preculture strategy of *Rhizopus oryzae* ME-F12 for fumaric acid production in a stirred-tank reactor. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25 (10): 1871-1876.
- [9] Zhou Y, Du JX, Tsao GT. Mycelial pellet formation by *Rhizopus oryzae* ATCC 20344. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2000, 84-86 (19): 779-789.
- [10] Yang CW, Lu ZJ, Tsao GT. Lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* in a Submerged System. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1995, 51-52 (1): 57-71.
- [11] Wittier R, Baumgartl H, Lubbers DW, SchUgerl K. Investigations of oxygen transfer into *Penicillium chrysogenum* pellets by microprobe measurements. *Biotechnology and Bioengineering*, 1986, 28 (7): 1024-1036.
- [12] Žnidaršič P, Pavco A. The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess parameter. *Food Technology and Biotechnology*, 2001, 39 (3): 237-252.
- [13] Žnidaršič P. The influence of some engineering variables upon the morphology of *Rhizopus nigricans* in a stirred tank bioreactor. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 2006, 20 (3): 275-280.
- [14] Fu YQ, Li S, Chen Y, Xu Q, Huang H, Sheng XY. Enhancement of fumaric acid production by *Rhizopus oryzae* using a two-stage dissolved oxygen control Strategy.

- Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 162 (4) : 1031-1038.
- [15] Hille A, Neu TR, Hempel DC, Horn H. Effective diffusivities and mass fluxes in fungal biopellets. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 103 (6), 1202-1213.
- [16] van Suijdam JC, Kossen NWF, Paul PG. An inoculum technique for the production of fungal pellets. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 1980, 10 (8) : 211-221.
- [17] Byrne GS, Ward OP. Effect of Nutrition on Pellet Formation by *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnology and Bioengineering*, 1989, 33 (7) : 912-914.
- [18] Roson GD, Wiebe MG, Trinci APJ. Involvement of  $Ca^{2+}$  in the regulation of hyphal extension branching in *Fusarium graminearum* A 3/5. *Experimental Mycology*, 1991, 15 (22) : 263-272.
- [19] Pera LM, Callieri DA. Influence of calcium on fungal growth, hyphal morphology and citric acid production in *Aspergillus niger*. *Folia Microbiologica*, 1997, 42 (6) : 551-556.
- [20] Pirt SJ, Callow DS. Continuous-flow culture of the filamentous mold *Penicillium chrysogenum* and the control of its morphology. *Nature*, 1959, 184 (6) : 307-310.
- [21] Driouch H, Sommer B, Wittmann C. Morphology engineering of *Aspergillus niger* for improved enzyme production. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 105 (6) : 1058-1068.
- [22] Villena GK, Fujikawa T, Tsuyumu S, Gutiérrez-Correa M. Structural analysis of biofilms and pellets of *Aspergillus niger* by confocal laser scanning microscopy and cryo scanning electron microscopy. *Bioresource Technology*, 2010, 101 (6) : 1920-1926.
- [23] Hille A, Neu TR, Hempel DC, Horn H. Oxygen profiles and biomass distribution in biopellets of *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2005, 92 (5) : 614-623.

## Effects of pellet characteristics on L-lactic acid fermentation by *Rhizopus oryzae*

Huating Zhang<sup>1</sup>, Ying Huang<sup>1</sup>, Yongqian Fu<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Biomass Resources, Taizhou University, Taizhou 318000, Zhejiang Province, China

<sup>2</sup>College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, Jiangsu Province, China

**Abstract:** [Objective] Effects of pellet morphology, diameter, density, and interior structure on L-lactic acid fermentation by *Rhizopus oryzae* were characterized for different inoculum sizes and concentrations of peptone and  $CaCO_3$ .

[Methods] Different initial spore concentrations were inoculated in the preculture medium with different peptone and  $CaCO_3$  concentrations, and cultivated at 30°C for 36 h. Representative pellets were chosen for interior structure analysis and L-lactic acid production.

[Results] Inoculum size was the most important factor determining pellet formation and diameter. Peptone concentration had the greatest effect on pellet density. L-lactic acid production depended heavily on pellet density but not on pellet diameter. Low-density pellets formed easily under conditions of low peptone concentration and often had a relatively hollow structure. This structure greatly decreased production. The production of L-lactic acid increased until the density reached a certain level (50–60 kg/m<sup>3</sup>), which the compact part distributed homogeneously in the thick outer layer of the pellet, and loose in the central layer. Homogeneously structured, denser pellets limited mass transfer.  $CaCO_3$  concentration only had a slight influence on pellet diameter and density.

[Conclusion] This work provides the insight into pellet structure and its relationship with productivity.

**Keywords:** density, L-lactic acid, pellet characteristics, *Rhizopus oryzae*

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (21106091) and by the National High Technology Research and Development Program of China (2011AA02A206)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-576-88660338; E-mail: fuyq@tzc.edu.cn

Received: 4 June 2014/Revised: 5 September 2014