

引用格式:

王世伟, 王卿惠, 刘伊娜. 一株米根霉的鉴定及其发酵产乳酸研究[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2024, 50(6): 31–35.

WANG S W, WANG Q H, LIU Y N. Identification of a strain of *Rhizopus oryzae* and study on its fermentation production of lactic acid[J]. Journal of Hunan Agricultural University(Natural Sciences), 2024, 50(6): 31–35.

投稿网址: <http://xb.hunau.edu.cn>



## 一株米根霉的鉴定及其发酵产乳酸研究

王世伟<sup>1,2</sup>, 王卿惠<sup>3</sup>, 刘伊娜<sup>1,2</sup>

(1.齐齐哈尔大学生命与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161005; 2.抗性基因工程与寒地生物多样性保护重点实验室, 黑龙江 齐齐哈尔 161005; 3.东北农业大学生命科学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:** 米根霉(*Rhizopus oryzae*) 能产生乳酸等有机酸, 在许多领域有重要的应用价值。本研究从黑龙江省北大仓白酒大曲中分离一株霉菌, 经形态学和内转录间隔区(ITS)分子鉴定, 将其命名为米根霉WSW-LYN-001; 对该菌株产乳酸的能力进行了研究, 并对其产乳酸发酵条件进行了优化。结果显示: 以葡萄糖为碳源, 在48 h后, 米根霉发酵液pH达3.2左右, 发酵84 h后乳酸产量可保持在70 g/L左右; 传代次数会影响菌丝团形态, 出现絮状和球状菌丝团, 进而影响乳酸产量; 发酵60 h后, 球状菌丝团发酵液中乳酸产量比絮状菌丝团的更高; 球状菌丝团经pH和中和剂CaCO<sub>3</sub>优化后, 在初始pH为7、发酵60 h后, 乳酸产量最高达134.25 g/L。

**关键词:** 米根霉; rDNA; 内转录间隔区(ITS); 菌种鉴定; 乳酸生产

中图分类号: Q939.97

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2024)06-0031-05

## Identification of a strain of *Rhizopus oryzae* and study on its fermentation production of lactic acid

WANG Shiwei<sup>1,2</sup>, WANG Qinghui<sup>3</sup>, LIU Yina<sup>1,2</sup>

(1.College of Life Sciences and Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161005, China; 2.Key Laboratory of Resistance Gene Engineering and Preservation of Biodiversity in Cold Areas, Qiqihar, Heilongjiang 161005, China; 3.School of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

**Abstract:** *Rhizopus oryzae* produces important organic acids such as lactic acid, and has important application value in many fields. In this study, a fungus was isolated from Baijiu Daqu of Beidacang, Heilongjiang Province, and the strain was identified and named as *Rhizopus oryzae* WSW-LYN-001 using internal transcribed spacer(ITS) identification. The results showed that using glucose as the carbon source, after 48 hours, the pH of fermentation broth reached around 3.2. After 84 hours of fermentation, the lactate production maintained at around 70 g/L. The passage number could affect the morphology of fungal hyphae(flocculent and globular mycelium clusters appeared), which in turn affected lactate production. After 60 hours of fermentation, the lactate production in the fermentation broth of spherical mycelium was higher than that of flocculent mycelium. After pH optimization, the spherical mycelium produced the maximum lactic acid yield of 134.25 g/L after 60 hours of fermentation at an initial pH of 7.

**Keywords:** *Rhizopus oryzae*; rDNA; internal transcribed spacer(ITS); strains identification; lactic acid production

根霉(*Rhizopus*)是乳酸生产理想候选者<sup>[1]</sup>。米根霉(*Rhizopus oryzae*)分子鉴定可通过扩增 DNA 内部

转录间隔区(ITS)来完成<sup>[2]</sup>。米根霉在发酵过程中能产生多种有机酸, 包括乳酸<sup>[3]</sup>、富马酸等<sup>[4]</sup>。乳酸

收稿日期: 2024-08-04

修回日期: 2024-09-16

基金项目: 黑龙江省教育厅基本科研业务费科研项目(1353309482); 2021年度黑龙江省大学生创新创业训练计划项目(202110232101)

作者简介: 王世伟(1965—), 男, 山东肥城人, 博士, 教授, 主要从事微生物发酵工程研究, [wsw888535@sohu.com](mailto:wsw888535@sohu.com)

在奶制品中常用作防腐剂,也可作为调味剂,是目前世界上公认的3大有机酸之一,广泛应用于食品、医药、化工、皮革、纺织、环保和农业等诸多领域<sup>[5]</sup>。米根霉生产的L-乳酸纯度高,是发酵生产L-乳酸的重要菌株<sup>[6]</sup>。本研究从黑龙江北大仓集团有限公司白酒大曲中分离出一株高产乳酸的霉菌,分别对其进行形态学和分子生物学鉴定、产乳酸能力研究及发酵条件优化,以期为乳酸生产提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

材料和培养基:菌株来源于黑龙江北大仓集团有限公司酿酒车间白酒大曲(Baijiu Daqu);其余试验材料包括0.9%无菌生理盐水、PDA培养基(固体培养基含2%琼脂)、种子培养基和发酵培养基等。

ITS1/ITS4通用引物:上游引物ITS1序列为5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3',下游引物ITS4序列为5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3',购置于生物工程(上海)股份有限公司;其他PCR所用PCR Master Mix(2X)购自赛默飞公司。

仪器:朗基多功能PCR仪(MG96+/Y PCR)购置于广州飞迪生物科技有限公司;Alpha凝胶成像系统购置于Alpha Innotech公司;Olympus生物显微镜购自启越电光仪器有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 菌株分离、培养及形态学观察

参照王世伟等<sup>[1]</sup>的方法制备PDA液体和固体培养基。菌株的分离与纯化步骤如下:称曲块2.5g,放入含100mL无菌生理盐水的锥形瓶中,于100r/min、28℃摇床培养12h,获得菌悬液;在无菌条件下,用无菌接种环挑取菌悬液,划线接种于3个PDA固体培养基,28℃倒置培养3d,然后挑取长势好的霉菌菌落转接到新的PDA固体培养基,纯化后接种于PDA液体培养基作为供试菌。

将霉菌菌丝涂布接种于PDA固体培养基,28℃培养1~2d,待长出菌丝和孢子后,制片观察孢子形态;将霉菌孢子转接于PDA液体培养基,于30℃、150r/min培养2d,待长出菌丝球或菌丝

团后,在无菌条件下挑取适量菌丝团,制片观察。

#### 1.2.2 菌株分子生物学鉴定

采用高盐低pH法<sup>[2]</sup>进行霉菌DNA提取与检测,然后通过琼脂糖凝胶电泳检验DNA纯度。真菌的分子生物学鉴定是其应用的基础<sup>[3-4]</sup>。以通用引物ITS1和ITS4为上下游引物,通过PCR扩增ITS序列。PCR反应体系如下:2×mix 25μL,ITS1 2μL,ITS4 2μL,模板DNA 3μL,ddH<sub>2</sub>O 18μL,总体积为50μL。PCR反应程序如下:95℃预变性,3min;95℃变性,30s;52℃退火,1min;72℃延伸,1min;30个循环完成后,72℃延伸5min。PCR反应完成后对扩增产物进行测序,将测得的霉菌rDNA ITS序列输入GenBank中,通过Blast比对,获得相似性最高的序列,参照数据库中已经登记的其他真菌的rDNA ITS序列对霉菌进行分类界定。

#### 1.2.3 菌株产乳酸研究

(1)培养基:斜面PDA培养基、种子培养基(10%葡萄糖+1%酵母粉+5%CaCO<sub>3</sub>)、发酵培养基(10%葡萄糖+5%CaCO<sub>3</sub>)<sup>[5]</sup>。

(2)试剂:1mol/L NaOH溶液,0.05mol/L EDTA溶液,钙指示剂溶液(将1g铬蓝黑R溶于100mL水中即可)。

(3)乳酸钙的测定<sup>[6]</sup>:取发酵培养基菌液,于5000r/min离心10min后得发酵液,再取发酵液1mL滴入含100mL蒸馏水的锥形瓶中,再滴入10mL 1mol/L的NaOH溶液与1~2滴钙指示剂,用EDTA溶液进行滴定,当溶液由紫变成纯蓝色即达滴定终点。L-乳酸质量浓度 $\rho = 9\rho_1/\rho_2$ ,其中, $\rho_1$ 为EDTA溶液质量浓度; $\rho_2$ 为吸取的发酵液的质量浓度。

(4)霉菌产乳酸研究。中和剂在米根霉产乳酸的发酵反应中起重要作用<sup>[7]</sup>。将纯化的霉菌孢子转接到初始pH为7.0的种子培养基中并加入5%中和剂CaCO<sub>3</sub>,培养温度为28℃,摇床转速为200r/min;每隔12h测定pH,共培养72h;设3个重复。种子培养基培养24h后,将生长菌丝剪碎接入发酵产酸培养基,加入适量CaCO<sub>3</sub>,培养108h,每隔12h测L-乳酸产量(质量浓度,下同)。

(5)传代次数对乳酸产量影响的研究。取一定浓度霉菌原液1mL进行接种传代,获得絮状和球

状菌丝团。在转速为 50 r/min、28 °C 恒温摇床中培育，每隔 12 h 取样测乳酸浓度，绘制曲线。为了提升霉菌产乳酸的产量，取球状菌丝团培养液 1 mL (乳酸产量最高)，分别接种到不同初始 pH (6、7、8) 的发酵培养基中，对照组另加入中和剂 (250 g/L CaCO<sub>3</sub>)，装样量为 150 mL，在转速为 150 r/min、28 °C 条件下进行培养，测量乳酸产量。

## 2 结果与分析

### 2.1 霉菌形态学初步鉴定结果

#### 2.1.1 PDA 固体培养基上的霉菌孢子形态观察结果

图 1 所示为霉菌孢子形态。由图 1 可见，霉菌菌体包括菌丝、假根、孢子梗和孢子囊，根据这些形态特点，初步判断该菌为根霉属 (*Rhizopus*)<sup>[8]</sup>。

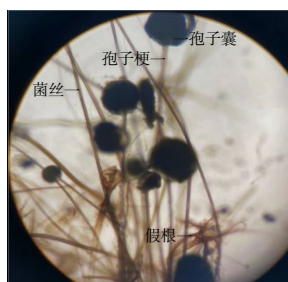


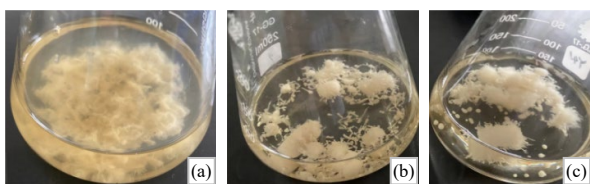
图 1 霉菌孢子形态

Fig.1 Morphology of mold spores

#### 2.1.2 霉菌液体培养及菌丝团观察结果

为了观察液体培养的霉菌菌丝生长状况，挑取 2~3 环 PDA 固体培养的霉菌菌丝转接到 PAD 液体培养基中，装样量为 30 mL，在摇床中培养 1~2 d (150 r/min, 28 °C) 后观察。

米根霉根系发达、菌丝易缠绕结团<sup>[9]</sup>。为了纯化霉菌孢子，在 28 °C、150 r/min 摇床培养进行 2 次液体活化，1 次活化后，形成片状菌丝团 (图 2(a))，颜色暗淡微黄，菌液略微浑浊；2 次活化后，菌丝团已呈棉絮状，出现更多的菊花状和球状菌丝团，颜色变白，发酵液清澈。在不同批次的活化过程中，



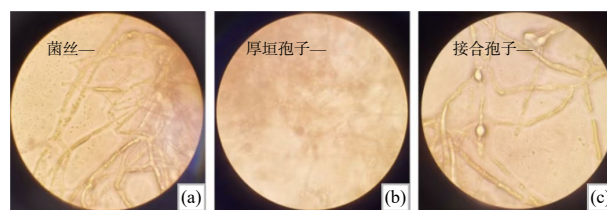
(a) 片状菌丝团; (b) 絮状菌丝团; (c) 球状菌丝团

图 2 不同形态的霉菌菌丝团

Fig.2 Different forms of mycelium clusters of molds

米根霉的菌丝团逐渐出现了絮状和球状形式 (图 2(b) 和图 2(c))，此时该菌已经完全纯化，用于后续显微镜观察并进行 DNA 提取和分子鉴定。

米根霉的孢囊孢子为多室球形，孢子在良好生长条件下先长出发芽管，再形成白色、分枝、气生的菌丝 (图 3(a))，菌丝形成特有的厚垣孢子 (图 3(b))，这一过程为无性生殖；接合孢子 (图 3(c)) 体现了有性生殖过程。培养条件变化可影响米根霉菌丝形态和产酸能力，球状米根霉更适于重复间歇发酵生产 L-乳酸<sup>[10-13]</sup>。因此，有必要对菌丝团形态进行研究。



(a) 菌丝; (b) 厚垣孢子; (c) 接合孢子

图 3 显微镜下霉菌菌丝及孢子形态

Fig.3 Microscopic morphologies of mold mycelium and spores

### 2.2 霉菌 WSW-LYN-001 分子生物学鉴定

提取霉菌 DNA，经 1% 琼脂糖凝胶电泳，纯化后电泳检验 DNA 纯度。利用通用引物 ITS1 和 ITS4 对霉菌 DNA 进行 PCR 扩增，2% 琼脂糖凝胶电泳结果显示，所扩增的 PCR 产物片段长度符合预期基因片段大小。将 PCR 产物送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行测序，测得扩增产物序列长度为 599 bp。

将 PCR 扩增产物序列输入到 NCBI 网进行 BLAST 比对，发现其与 *Rhizopus oryzae* strains CBS395.95 (登录号 AY213624) 序列相似度高达 99%，覆盖率达 96%，由此可以确定被分离出的霉菌为米根霉，将其命名为米根霉 WSW-LYN-001。

### 2.3 米根霉 WSW-LYN-001 产乳酸能力

#### 2.3.1 菌丝团呈片状的米根霉 WSW-LYN-001 的乳酸生产

将纯化的 WSW-LYN-001 孢子从 PDA 斜面转接到初始 pH 为 7.0 的种子培养基 (30 mL) 中，于 28 °C、200 r/min 培养 72 h，设 3 个生物学重复；每隔 12 h 测定 pH，结果见图 4。

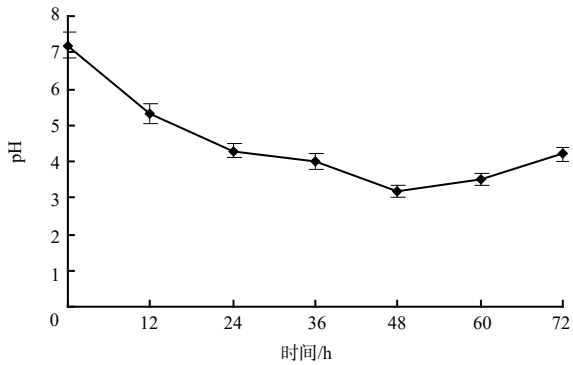


图4 菌丝团呈片状的WSW-LYN-001菌株培养液pH随培养时间的变化

Fig.4 The pH changes of culture solution of WSW-LYN-001 strain with sheet-like mycelium cluster over culture time

由图4可知,发酵[0, 24] h, pH快速下降,可能是米根霉产L-乳酸较快所致;发酵(24, 36] h, pH缓慢降至4左右;发酵(36, 48] h, pH进一步下降至3.2左右;发酵48 h后, pH略有提升,并稳定在4~5,推测这是因为培养基中未加中和剂CaCO<sub>3</sub>,致使L-乳酸大量积累,抑制了乳酸的进一步增加。

将种子培养基长出的菌丝团在无菌状态下剪碎,接入发酵产酸培养基中(设3个生物学重复),加入5% CaCO<sub>3</sub>,其他培养条件不变,培养108 h,其间每12 h测定L-乳酸产量,结果见图5。从图5可以看出,[0, 24] h内,L-乳酸产量随时间延长缓慢增加;(24, 84] h,L-乳酸产量持续稳定提高;发酵后期即84 h之后,L-乳酸产量趋于稳定,为60~70 g/L。

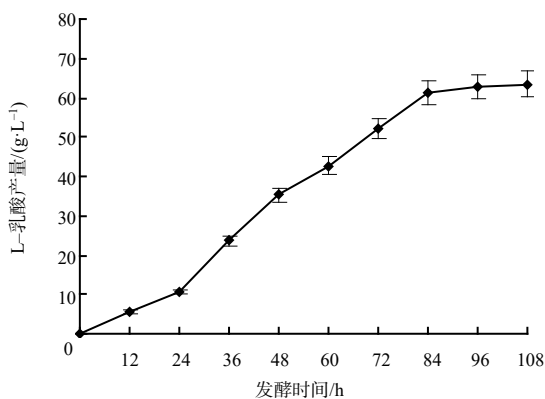


图5 菌丝团呈片状的米根霉WSW-LYN-001L-乳酸产量随发酵时间的变化

Fig.5 The variation in L-lactic acid production by *R. oryzae* WSW-LYN-001 with sheet-like mycelium cluster over fermentation time

### 2.3.2 不同菌丝团形态的米根霉WSW-LYN-001产乳酸情况

在发酵培养基中,经过不同传代次数可获得不同的菌丝团形态。片状菌丝团的米根霉产乳酸能力较弱,絮状和球状菌丝团的米根霉的乳酸生产能力较强。取不同菌丝形态(絮状和球状)的菌株发酵液接种于发酵培养基,于28℃、120 r/min摇床培养,分别在0、12、24、36、48和60 h测定L-乳酸产量,结果见图6。

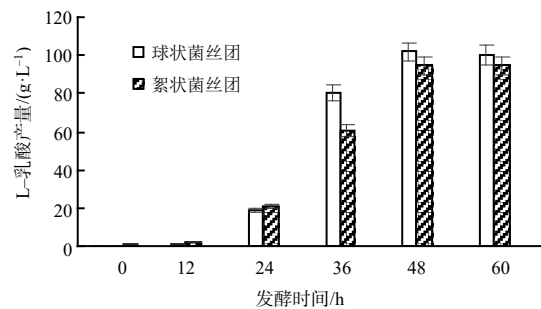


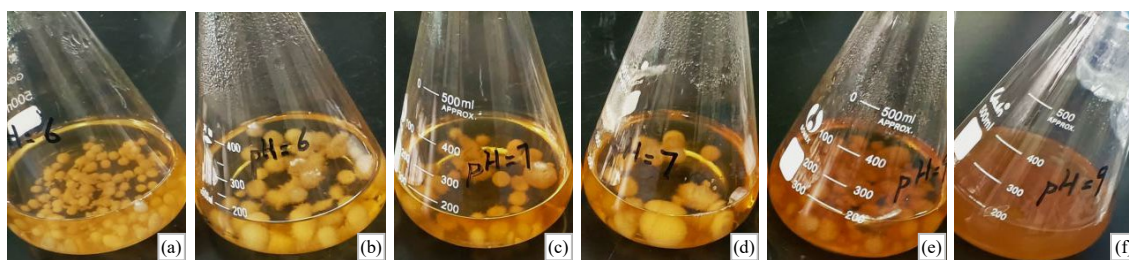
图6 不同菌丝团形态的米根霉WSW-LYN-001菌株L-乳酸产量比较

Fig.6 Comparison of L-lactic production between *R. Oryzae* WSW-LYN-001 strains with different forms of mycelium cluster

由图6可见:[0, 12] h为发酵初期,菌丝生长缓慢,几乎不产生乳酸;(12, 24] h菌丝生长较慢,产生少量乳酸;(24, 36] h,乳酸产量大幅度增加;(36, 48] h乳酸产量增幅趋于缓慢,(48, 60] h乳酸产量基本不再发生变化。在整个生长过程中,球状菌丝团的米根霉的乳酸产量整体上略高于絮状菌丝团的米根霉的乳酸产量。发酵60 h后,絮状菌丝团的米根霉发酵液乳酸产量为94.6 g/L,而球状菌丝团的米根霉发酵液的乳酸产量达100.5 g/L。

### 2.3.3 米根霉WSW-LYN-001球状菌丝团产乳酸发酵条件的优化

考虑到球状菌丝团的米根霉乳酸产量较高,后续优化试验均以球状菌丝团的菌液进行接种发酵培养。不同发酵条件下球状菌丝团的米根霉产乳酸情况见图7。



(a) pH=6, 原始发酵培养基; (b) pH=6, 原始发酵培养基+25 g/L CaCO<sub>3</sub>中和剂; (c) pH=7, 原始发酵培养基; (d) pH=7, 原始发酵培养基+ 25 g/L CaCO<sub>3</sub>中和剂; (e) pH=9, 原始发酵培养基; (f) pH=9, 原始发酵培养基+ 25 g/L CaCO<sub>3</sub>中和剂

图7 不同发酵条件下球状菌丝团的米根霉WSW-LYN-001产乳酸情况

Fig.7 Production of lactic acid by *R. oryzae* WSW-LYN-001 strain with spherical mycelium cluster under different fermentation conditions

从图 7 可见, 处于不同初始 pH 环境下的菌丝团的密度和大小均存在差异。当 pH 为 6 时, 随着中和剂的添加, 菌丝球体积增大, 但数量减少; 当 pH 为 7 时, 菌丝球密度中等, 随着中和剂的添加, 菌丝球增大, 数量减少, 分布不均; 当 pH 为 9 时, 发酵液颜色加深, 菌丝球密度增加, 随着中和剂的添加, 球体形状变模糊。

球状菌丝团菌体接种于不同 pH 条件下, 在发酵 60 h 后乳酸产量也有所不同。在发酵培养基(原培养基中含 50 g/L CaCO<sub>3</sub>)中, 调节 pH 分别为 6、7 和 9, 在对照组的基础上每瓶另加 25 g/L CaCO<sub>3</sub>; pH 为 7 时乳酸产量最高, 比 pH 为 6 时的增加 8.44%; 比 pH 为 9 时的乳酸产量提高 4.15%。同一种菌丝在不同初始 pH 条件下, 乳酸产量不同, 当初始 pH 为 7 时, 球状菌丝团菌体(添加 25 g/L CaCO<sub>3</sub>)乳酸产量达到最高, 为 134.25 g/L。

### 3 结论与讨论

白酒大曲是微生物的优质生境<sup>[14]</sup>。人们已在白酒大曲中分离出多种真菌, 包括根霉菌属。米根霉是乳酸生产优势菌<sup>[15]</sup>。微生物发酵法生产 L-乳酸可达到较高纯度, 这是米根霉产乳酸的优势<sup>[16]</sup>。L-乳酸应用前景十分广阔, 米根霉以葡萄糖为碳源, 在没有进行培养条件优化的前提下, 其产量一般为 44.2~76.6 g/L<sup>[17]</sup>。为了提高米根霉的乳酸生产量可以选择不同的底物。CUI 等<sup>[18]</sup>以甘蔗渣为底物, 利用米根霉生产 L-乳酸, 实现了甘蔗渣向 L-乳酸的高效转化, 最大转化率达 28.45%。另外, 也可以通过优化发酵工艺提高乳酸产量。FU 等<sup>[19]</sup>采用补料分批策略提高 L-乳酸生产效率, 在酸生产阶段, 乳酸最大产量和生产率分别达 162 g/L 和 6.23 g/(L·h), 乳酸生产率提高了 14.3%。本研究从黑龙江北大仓白酒大曲中分离出一种产乳酸的米根霉

WSW-LYN-001, 该菌株表现出较强的乳酸生产能力, 属于高产乳酸菌。在初始 pH 为 7 时, 球状菌丝团的米根霉 WSW-LYN-001 乳酸产量达到 134.25 g/L。米根霉产乳酸时, 菌丝团的形态结构对乳酸的产量有很大的影响, 后续可通过选择不同底物、优化工艺或采用基因工程方法进一步提高菌株的乳酸产量。

### 参考文献:

- [1] 王世伟, 王卿惠, 向文胜, 等. 尖孢镰刀菌 M1 耐热蛋白酶纯化及酶学性质[J]. 微生物学通报, 2021, 48(5): 1604-1615.
- [2] 李春霖, 肖强, 张瑛, 等. 基于 ITS 序列对两株野生大型真菌的鉴定及系统发育分析[J]. 湖北林业科技, 2024, 53(2): 46-50.
- [3] ALAGÖZ E, AÇAR Ş, YÜCEL M, et al. Cloning and screening of the putative hexokinase genes from *Rhizopus oryzae* and their heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Molecular Biology Reports, 2022, 49(9): 8607-8615.
- [4] DANIA V O, ALABI O V, AZUH V O. ITS-based identification and characterization of sweetpotato soft rot disease-causing *Rhizopus* species isolated from Oyo state, southwest Nigeria[J]. Journal of Plant Pathology, 2022, 104: 225-236.
- [5] ZAIN N A M, AZIMAN S N, SUHAIMI M S, et al. Optimization of L(+) lactic acid production from solid pineapple waste(SPW) by *Rhizopus oryzae* NRRL 395[J]. Journal of Polymers and the Environment, 2021, 29(1): 230-249.
- [6] 孙小龙, 陈耀, 付永前. 米根霉分批补料一步发酵法高效积累 L-乳酸的研究[J]. 台州学院学报, 2018, 40(6): 23-29, 44.
- [7] BALASUBRAMANIAN V K, MUTHURAMALINGAM J B, CHEN Y P, et al. Recent trends in lactic acid-producing microorganisms through microbial fermentation for the synthesis of polylactic acid[J]. Archives of Microbiology, 2023, 206(1): 1-19.

(下转第 93 页)

- 1138419.
- [14] 高秀春, 时洪艳, 佟有恩, 等. A 群猪轮状病毒 JS 株 VP6 基因序列分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2007, 29(7): 27–29.
- [15] ZHANG F F, LUO Y Y, LIN C, et al. Epidemiological monitoring and genetic variation analysis of pathogens associated with porcine viral diarrhea in Southern China from 2021 to 2023[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2024, 15: 1303915.
- [16] LUO S C, CHEN X Q, YAN G Z, et al. Emergence of human-porcine reassortment G9P[19] porcine rotavirus A strain in Guangdong Province, China[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2023, 9: 1111919.
- [17] QIAO M L, LI M Z, LI Y, et al. Recent molecular characterization of porcine rotaviruses detected in China and their phylogenetic relationships with human rotaviruses[J]. *Viruses*, 2024, 16(3): 453.
- [18] GENZ B, GERSZON J, POLLOCK Y, et al. Detection and genetic diversity of porcine rotavirus A, B and C in eastern Australian piggeries[J]. *Australian Veterinary Journal*, 2023, 101(4): 153–163.
- [19] 周群, 陈小飞, 阚蕊慈, 等. 2017—2019 年四川地区猪 A 群轮状病毒的分子流行病学调查[J]. *中国农业科学*, 2021, 54(5): 1063–1072.
- [20] AMIMO J O, VLASOVA A N, SAIF L J. Detection and genetic diversity of porcine group A rotaviruses in historic(2004) and recent(2011 and 2012) swine fecal samples in Ohio: predominance of the G9P[13] genotype in nursing piglets[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013, 51(4): 1142–1151.
- [21] LACHAPELLE V, SOHAL J S, LAMBERT M C, et al. Genetic diversity of group A rotavirus in swine in Canada[J]. *Archives of Virology*, 2014, 159(7): 1771–1779.
- [22] YAN N, YUE H, WANG Y W, et al. Genomic analysis reveals G3P[13] porcine rotavirus A interspecific transmission to human from pigs in a swine farm with diarrhoea outbreak[J]. *Journal of General Virology*, 2021, 102(2): 10.

责任编辑: 罗慧敏  
英文编辑: 罗维

(上接第 35 页)

- [8] 王宁, 许丽莉, 刘幽燕, 等. 固定化米根霉全细胞催化  $\alpha$ -萜烯环氧化反应[J]. *化学工程*, 2023, 51(12): 15, 40.
- [9] JEREZ LAZO C, LEE N, TRIPATHI P, et al. A fungus-based soil improvement using *Rhizopus oryzae* inoculum[J]. *Geo-Engineering*, 2024, 15: 18.
- [10] 申高忠, 王怡明, 王芳, 等. 乳酸的发展现状、应用与挑战[J]. *当代化工研究*, 2023(9): 6–8.
- [11] RAWOOF S A A, KUMAR P S, VO D V N, et al. Production of optically pure lactic acid by microbial fermentation: a review[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2021, 19(1): 539–556.
- [12] DULF E H, VODNAR D C, DULF F V. Modeling tool using neural networks for L(+)-lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* NRRL 395 on biodiesel crude glycerol[J]. *Chemistry Central Journal*, 2018, 12(1): 124.
- [13] 郑志, 杜威, 姜绍通, 等. 米根霉不同菌丝体形态对重复间歇发酵生产 L-乳酸的影响[J]. *食品科学*, 2010, 31(9): 166–170.
- [14] WU N, ZHANG J H, QU W, et al. Transcriptome analysis of *Rhizopus oryzae* seed pellet formation using triethanolamine[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14: 230.
- [15] ZAIN N A M, AZIMAN S N, SUHAIMI M S, et al. Optimization of L(+) lactic acid production from solid pineapple waste(SPW) by *Rhizopus oryzae* NRRL 395[J]. *Journal of Polymers and the Environment*, 2021, 29: 230–249.
- [16] SHAN W W, YAN Y L, LI Y D, et al. Microbial tolerance engineering for boosting lactic acid production from lignocellulose[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2023, 16: 78.
- [17] 凌荔, 方尚玲, 牟飞燕, 等. 基于高通量测序技术分析南方清香型白酒大曲的微生物多样性[J]. *酿酒科技*, 2023(1): 51–60.
- [18] CUI Y Y, LIU R, XU L L, et al. Fermentation kinetics of enzymatic hydrolysis bagasse solutions for producing L-lactic acid[J]. *Sugar Tech*, 2018, 20(3): 364–370.
- [19] FU Y Q, SUN X L, ZHU H Y, et al. An optimized fed-batch culture strategy integrated with a one-step fermentation improves L-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2018, 34(6): 74.

责任编辑: 伍锦花  
英文编辑: 柳正