

doi: 10.3969/j.issn.2095-0780.2012.01.010

乳酸菌利用罗非鱼下脚料水解液发酵 L-乳酸的探讨

邓楚津, 赖丽芬, 曾少葵, 张小红, 李瑞杰

(广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524088)

摘要: 以罗非鱼 (*Oreochromis* spp.) 下脚料为原料, 采用高温热水抽提法提取其蛋白质作为乳酸菌发酵 L-乳酸的氮源。以酵母膏作为对照, 探讨了保加利亚乳杆菌 (*Lactobacillus bulgaricus*)、嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) 和鼠李糖乳杆菌 (*L. rhamnosus*) 在罗非鱼下脚料水解液培养基中的生长情况及 L-乳酸的产量。结果显示, 3 种乳酸菌在 2 种培养基中均能良好地生长, pH 下降明显; L-乳酸产量随乳酸菌菌种不同而异, 其中鼠李糖乳杆菌在罗非鱼下脚料水解液培养基中发酵 10 h 后, L-乳酸净产量为 $3.38 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 与以酵母膏作为氮源的产酸水平相当。可见罗非鱼下脚料水解液可以替代酵母膏作为 L-乳酸发酵的一种低成本氮源。

关键词: 罗非鱼下脚料; 乳酸菌; L-乳酸; 发酵

中图分类号: TS 254.9

文献标志码: A

文章编号: 2095-0780-(2012)01-0061-06

Research on L-lactic acid fermentation for hydrolysate of tilapia wastes with *Lactobacillus*

DENG Chujin, LAI Lifen, ZENG Shaokui, ZHANG Xiaohong, LI Ruijie

(College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

Abstract: By hot water extraction method, we extracted the protein hydrolysate of tilapia wastes, which is used as a nitrogen source for L-lactic acid fermentation. Compared with yeast extract, we studied the growth of *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* and *L. rhamnosus* in fermentation medium of hydrolysate of tilapia wastes, and observed the yield of L-lactic acid. Results show that the 3 lactic acid bacteria grow better in 2 fermentation mediums and pH decreases obviously. The production of L-lactic acid varies with different lactic acid bacteria. The net yield of L-lactic acid is $3.38 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ after 10 h fermentation with *L. rhamnosus* in the fermentation medium of hydrolysate of tilapia wastes. The yield is considerable to that of the yeast extract. Therefore, the hydrolysate of tilapia wastes can be a substitute for yeast extract and is a low-cost nitrogen source for the yield of L-lactic acid.

Key words: tilapia wastes; *Lactobacillus*; L-lactic acid; fermentation

罗非鱼 (*Oreochromis* spp.) 又称非洲鲫鱼, 原产自非洲, 是世界水产业重点科研培养的热带淡水鱼类, 且被誉为未来动物性蛋白质的主要来源之一^[1]。目前世界罗非鱼年产量约 $300 \times 10^4 \text{ t}$, 2007 年中国的产量 $121 \times 10^4 \text{ t}$, 占全球的 49%, 出口总量占世界 50%^[2]。罗非鱼除部分鲜销外, 主要加工成冻鱼片出口销售, 加工中会产生大量的鱼头、

鱼骨、鱼皮及碎肉等下脚料, 约占原鱼体质量的 40% ~ 65%, 一般将这些下脚料丢弃或掩埋, 或生产鱼骨粉作为饲料廉价销售, 造成环境污染和资源浪费。

乳酸是世界公认的三大有机酸之一, 已被广泛用于食品、药物、医药、轻工和化工等领域。自然界中乳酸主要有 3 种构型: D-乳酸、L-乳酸和 DL-

收稿日期: 2011-09-16; 修回日期: 2011-10-13

资助项目: 广东海洋大学大学生创新实验项目 (CXSY200822, 1056610023)

作者简介: 邓楚津 (1981-), 男, 实验师, 硕士, 从事水产品加工研究。E-mail: chujind@163.com

通讯作者: 曾少葵, E-mail: zsk1105@126.com

乳酸；人体只能代谢 L-乳酸，过多食用 D-乳酸或 DL-乳酸会造成人体代谢功能的紊乱。L-乳酸更多用于生产生物可降解聚合材料——聚乳酸(PLA)，2010 年 PLA 的需求量达到 50×10^4 t，其市场前景很好，应用潜力巨大^[3]。

L-乳酸的生产主要有微生物发酵和化学合成法^[4]。目前国内微生物发酵生产乳酸基本以添加酵母膏作为氮源，其添加量占生产成本的 10% 或以上，极大地限制了其在工业生产中的应用。因此，寻找低成本且高效的 L-乳酸生产氮源是目前的一个研究热点^[5]。鱼类废弃物水解液含有丰富的蛋白质、多肽、矿物质及维生素等营养物质，且底物成本较低，能够代替或部分代替酵母膏作为乳酸发酵的营养来源，从而有利于资源综合利用和提高经济效益^[6]。该研究利用罗非鱼下脚料水解液作为氮源，探讨了保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*, GIM 1.204)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*, GIM 1.83)和鼠李糖乳杆菌(*L. rhamnosus*, GIM 1.325)3 种乳酸菌在罗非鱼下脚料水解液和酵母膏发酵培养基中的生长和 pH 变化情况，并采用高效液相色谱法测定 L-乳酸的含量，以期为乳酸的工业化生产提供基础数据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

罗非鱼下脚料由湛江环球水产有限公司提供，经绞肉机破碎后 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻备用；保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌和鼠李糖乳杆菌均购于广东省微生物研究所菌种保藏中心。

1.2 试剂与仪器

试剂柠檬酸、苹果酸、酵母浸膏、硫酸镁(MgSO_4)、磷酸氢二钾(K_2HPO_4)、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、氯化钠(NaCl)、磷酸二氢铵($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)及磷酸(H_3PO_4)等试剂均为分析纯；甲醇和乙腈为色谱纯；L-乳酸标准品 Sigma-Aldrich L1750，纯度 $\geq 99.0\%$ 。

仪器有 LC-20AD 高效液相色谱仪(日本 SHIMADZU 公司出品)；HPLC 色谱柱，5C18-MS-II；pH 计(上海精密科学仪器有限公司出品)；HH-B.11.600-BS-II 电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械厂出品)；SW-CJ-2F 洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司出品)；YXQ-SG46-280S 手提式压力蒸汽灭菌锅(上海博迅实业有限公司出品)；DL-6M 大容量冷冻离心机(赛特湘仪离心机仪器有限公司出品)；MA110 电子天平(上海第二天平仪器厂出品)；TU-1800S 紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器公司出品)。

1.3 试验方法

1.3.1 酵母膏发酵培养基的制备 按酵母膏 5 g，NaCl 0.2 g， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 g， $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01 g， K_2HPO_4 0.3 g， KH_2PO_4 0.3 g，蔗糖 60 g，蒸馏水 1 000 mL 配制酵母膏发酵培养基，调节 pH 至 6.8，于 $115\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min， $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷藏备用^[7]。

1.3.2 罗非鱼下脚料发酵培养基的制备 1) 罗非鱼下脚料水解液的制备。罗非鱼下脚料水解液的制备过程见图 1，经测定可溶性固形物为 5%。2) 罗非鱼下脚料发酵培养基的制备。按罗非鱼下脚料水解液 1 000 mL，NaCl 0.2 g， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3

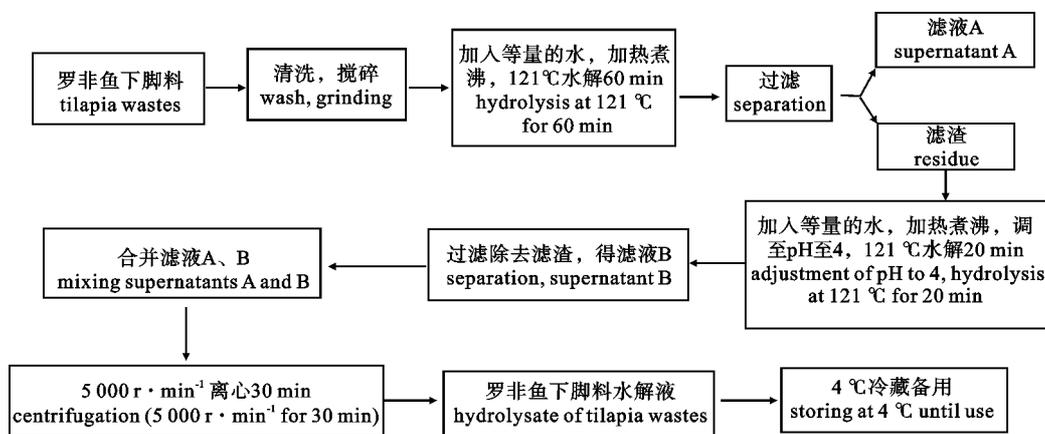


图 1 水解液制备流程图

Fig. 1 Flowchart of preparation of hydrolysate

g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.01 g, K_2HPO_4 0.3 g, KH_2PO_4 0.3 g, 蔗糖 60 g 配制罗非鱼下脚料发酵培养基, 调节 pH 至 6.8, 于 115 °C 灭菌 20 min, 4 °C 冷藏备用^[7]。

1.3.3 菌种的活化及驯化 1) 鼠李糖乳杆菌的活化。鼠李糖乳杆菌的活化培养基为酵母膏 5 g, 蛋白胨 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g, 蔗糖 50 g, 蒸馏水 1 000 mL, 115 °C 灭菌 20 min, 冷却备用。2) 菌种的驯化。驯化培养基为活化培养基(或 10% 脱脂牛奶)与罗非鱼水解液比例 10:0, 8:2, 6:4, 4:6 和 2:8, 蔗糖 $60 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 调节 pH 至 6.8, 105 °C 灭菌 15 min, 冷却备用^[9]。

按 10% 的比例将已活化菌种接入 10:0 驯化培养基中, 在各乳酸菌最适生长温度恒温培养 5 h 至牛奶凝固。摇匀, 按上述方法分别接到 8:2, 6:4, 4:6 和 2:8 培养基中进行菌种驯化, 得到适合在罗非鱼下脚料水解液中生长的菌种^[10]。

1.3.4 乳酸菌菌数和 pH 的测定 乳酸菌菌数的测定以光密度(OD)表示, 菌液稀释后于波长 660 nm($\text{OD}_{660 \text{ nm}}$)处进行比色测定^[11]; 玻璃电极法测定发酵培养基的 pH^[12]。

1.3.5 L-乳酸含量的测定 采用高效液相色谱法(HPLC)测定 L-乳酸的含量^[13]。1) 样品的前处理及测定条件。前处理为称取一定量样品, 加入 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 2.5 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 溶液, 超声震荡 20 min, $4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min 得上清液。沉淀物加入 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 溶液, 超声振荡 5 min 溶解, 离心后合并上清液, 定容至 50 mL, 4 °C 冷藏备用。上机时 $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤。测定条件为色谱柱为 5C18-MS-II; 流动相 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 2.5 的 H_3PO_4 溶液; 检测波长 210 nm; 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量 $10 \mu\text{L}$ 。2) L-乳酸标准曲线的绘制。称取一定量的 L-乳酸标准品, 经流动相溶解后定容。稀释质量浓度为 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $4.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0.22 \mu\text{m}$ 滤膜过滤后上机, 测定其峰面积, 根据其峰面积绘制标准曲线(图 2)。L-乳酸标准的相关系数 $R^2 = 1$, 具有很好的线性关系, 满足试验要求。3) L-乳酸的定性定量。相同色谱条件下将样品色谱图与 L-乳酸标准液色谱图进行对照, 根据保留时间进行定性, 峰面积进行定量。

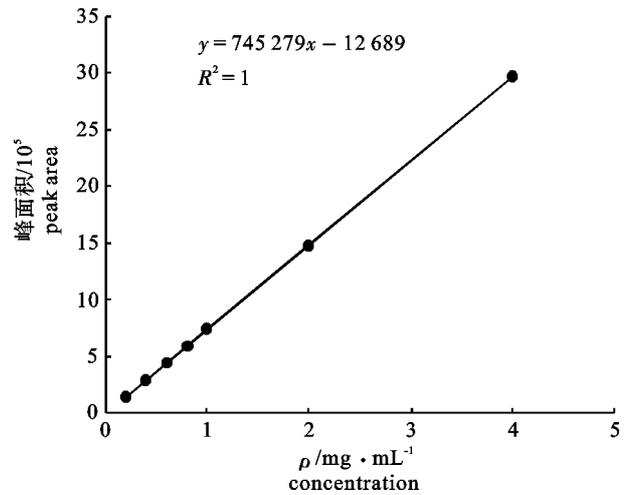


图 2 L-乳酸标准曲线图

Fig. 2 Standard curve for L-lactic acid content

2 结果与分析

2.1 乳酸菌的生长曲线及 pH 变化

2.1.1 酵母膏发酵培养基 分别接种 10% 驯化好的乳酸菌到酵母膏发酵培养基中^[14], 每 2 h 测吸光值和 pH, 考察乳酸菌的生长情况和 pH 变化情况(图 3)。

在酵母膏发酵培养基中, 保加利亚乳杆菌比嗜热链球菌、鼠李糖乳杆菌生长情况要好, 适应时间很短, 4 h 后已经基本稳定, 吸光值高, 菌体浓度高, 生物量基本达到最大值(图 3)。嗜热链球菌、鼠李糖乳杆菌的生长速度比较一致, 1~4 h 为适应期(停滞期), 4 h 后进入对数生长期; 但鼠李糖乳杆菌 8 h 后生长基本稳定, 嗜热链球菌 10 h 后才趋于稳定, 生长情况一般。

3 种乳酸菌在酵母膏发酵培养基中的 pH 变化趋势与其对应的吸光值变化趋势相反(图 3)。保加利亚乳杆菌比嗜热链球菌、鼠李糖乳杆菌 pH 下降更快, 在 0~4 h 呈直线下降, 8 h 后 pH 变化不大; 嗜热链球菌和鼠李糖乳杆菌的产酸能力基本一致, pH 下降趋势相似, 8 h 后基本稳定。pH 下降结果与其生长变化曲线吻合, 产酸量与菌体浓度呈正相关。这与刘颖等^[15]的研究结果一致。

2.1.2 罗非鱼下脚料发酵培养基 分别接种 10% 驯化好的乳酸菌到罗非鱼下脚料发酵培养基中, 每 2 h 测吸光值和 pH, 考察乳酸菌的生长情况和 pH 变化情况(图 4)。

3 种乳酸菌在罗非鱼下脚料发酵培养基中存在

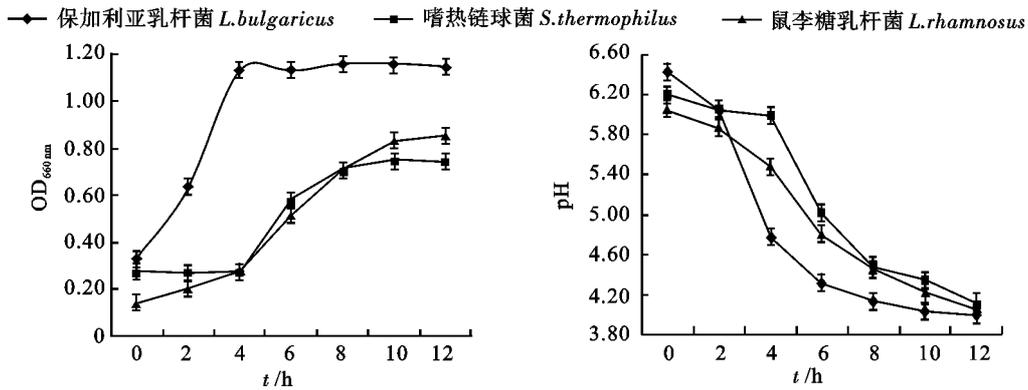


图3 不同乳酸菌在酵母膏培养基的生长曲线和 pH 变化

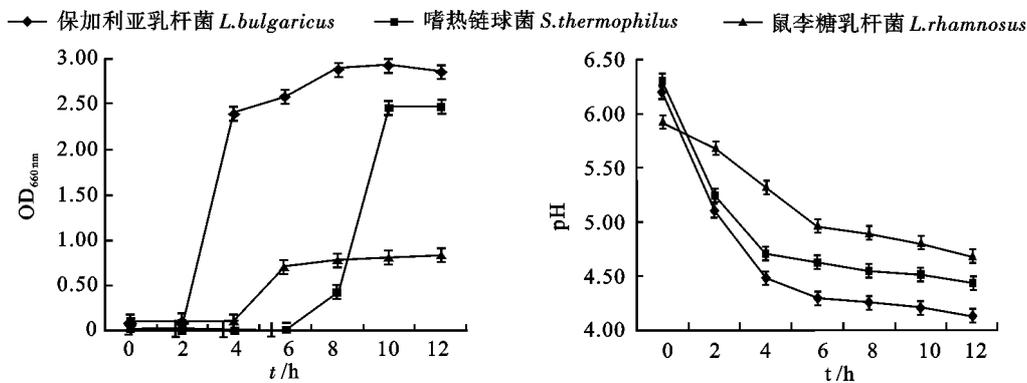
Fig. 3 Growth curve and change in pH of different *Lactobacillus*

图4 不同乳酸菌在罗非鱼下脚料培养基的生长曲线和 pH 变化

Fig. 4 Growth curve and change in pH of different *Lactobacillus*

一个适应期,适应期结束后都能良好生长,菌体浓度高(图4)。保加利亚乳杆菌和鼠李糖乳杆菌的适应时间较短,此外,3种乳酸菌在罗非鱼下脚料发酵培养基中的生长情况明显比酵母膏发酵培养基要好,吸光度值较高,说明罗非鱼下脚料发酵培养基更能大量提供乳酸菌生长的营养物质,可以作为一种乳酸菌发酵的低成本营养源。

3种乳酸菌在罗非鱼下脚料发酵培养基中的pH下降情况与在酵母膏发酵培养基中的情况相似,保加利亚乳杆菌能使pH降低更快,产酸能力更强(图4)。pH下降结果与其生长变化曲线吻合,产酸量与菌体浓度呈正相关。说明乳酸菌也能利用罗非鱼下脚料发酵培养基中的维生素、蛋白质等营养物质来生长、繁殖和产酸,这与GAO等^[6]的研究结果一致。

2.2 L-乳酸净产量的测定

将驯化好的乳酸菌分别在2种发酵培养基中进行发酵,考察L-乳酸净产量情况(图5)。

鼠李糖乳杆菌在罗非鱼下脚料发酵培养基中产L-乳酸较快,净产量也较其他2种菌多,发酵10h后达到 $3.38 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,说明罗非鱼下脚料水解液可以全部或者部分代替酵母膏作为L-乳酸发酵的氮源。据文献报道,以玉米浆为氮源发酵72h的L-乳酸产率为 $11 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[16],玉米浸泡水发酵96h为 $68.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[17],玉米秸秆发酵72h为 $69.15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[18],红豆粉发酵48h为 $92.0 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[19]。显然该研究产量偏低,这可能与发酵时间太短(10h),乳酸菌主要利用营养物质进行自身生长和繁殖,代谢产物转化率低有关^[20]。

为了更直观分析鼠李糖乳杆菌发酵产L-乳酸情况,对鼠李糖乳杆菌在罗非鱼下脚料发酵培养基和酵母膏发酵培养基中的L-乳酸净产量进行对比分析(图6)。

鼠李糖乳杆菌在2种发酵培养基中L-乳酸的增长趋势相似,净产量相差不大,基本达到以酵母膏作为氮源的产酸水平($4.17 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)(图6)。结果

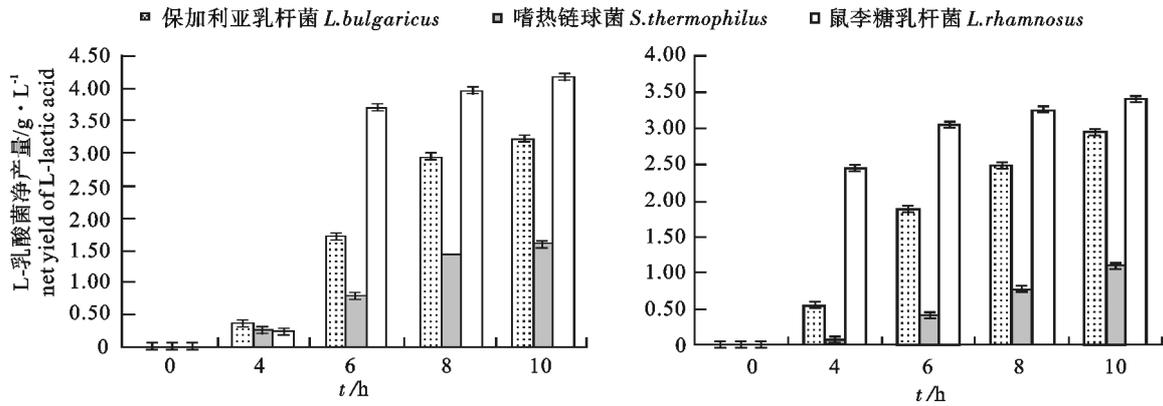


图5 乳酸菌在酵母膏与水解液培养基中 L-乳酸的净产量

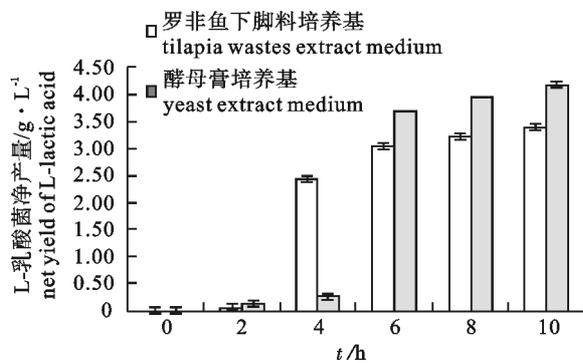
Fig. 5 Net yield of L-lactic acid in yeast extract medium and hydrolysate with *Lactobacillus*

图6 鼠李糖乳杆菌在2种培养基中 L-乳酸的净产量

Fig. 6 Net yield of L-lactic acid of *L. rhamnosus* in both mediums

表明,利用罗非鱼下脚料水解液生产 L-乳酸切实可行,鼠李糖乳杆菌更适合利用罗非鱼下脚料中的营养物质来产生 L-乳酸,它能以最少的氮源生产出相当量的 L-乳酸,这对工业化生产尤为重要。

3 结论

1)保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌和鼠李糖乳杆菌在酵母膏和罗非鱼下脚料发酵培养基中均能很好地生长,pH下降明显,产酸能力较高。从菌体生长及产酸能力情况看,保加利亚乳杆菌优于其他2种乳酸菌。

2)鼠李糖乳杆菌在2种发酵培养基中 L-乳酸的净产量均比保加利亚乳杆菌、嗜热链球菌的高,分别达到 $4.17 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $3.38 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。可见,利用罗非鱼下脚料水解液全部或者部分代替酵母膏作为鼠李糖乳杆菌发酵 L-乳酸的氮源是切实可行的。

3)乳酸菌在罗非鱼下脚料发酵培养基中产 L-

乳酸效果不理想,可能是因为发酵时间太短、乳酸菌主要利用营养物质进行自身生长、繁殖和代谢产物转化率低有关,后续研究应重点对发酵时间进行优化。

参考文献:

- [1] 洪鹏志,杨萍,章超桦,等. 酶解罗非鱼下脚料制备罗非鱼骨粉营养价值分析[J]. 食品与机械, 2007, 22(4): 125-131. HONG Pengzhi, YANG Ping, ZHANG Chaohua, et al. Analysis of nutritive value of the attritioning bone powder of tilapia by-product hydrolysate[J]. Food & Machinery, 2007, 22(4): 125-131. (in Chinese)
- [2] 雷光英,曹俊明,万忠,等. 2008年度广东省罗非鱼产业发展现状分析[J]. 广东农业科学, 2009(7): 240-243. LEI Guangying, CAO Junming, WAN Zhong, et al. The situation of tilapia industry of Guangdong in 2008[J]. Guangdong Agric Sci, 2009(7): 240-243. (in Chinese)
- [3] WEE Y J, KIM J N, RYU H W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications[J]. Food Technol Biotechnol, 2006, 44(2): 163-172.
- [4] 田康明,周丽,陈献忠,等. L-乳酸的发酵生产和聚 L-乳酸的化学加工[J]. 中国生物工程杂志, 2011, 31(2): 102-115. TIAN Kangming, ZHOU Li, CHEN Xianzhong, et al. Fermentation of L-lactic acid and synthesis of poly (L-lactic acid)[J]. China Biotechnol, 2011, 31(2): 102-115. (in Chinese)
- [5] 杨洁彬,郭兴华,李芳,等. 乳酸菌——生物学基础及应用[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999:6-12. YANG Jiebin, GUO Xinghua, LI Fang, et al. *Lactobacillus*: biological basis and application[M]. Beijing: China Light Industry Press, 1999: 6-12. (in Chinese)
- [6] GAO Mintian, NAKOTO H, EIICHI T. Acid-hydrolysis of fish wastes for lactic acid fermentation [J]. Bioresource Technol, 2006, 97(3): 2414-2420.
- [7] 汤保贵,欧柱荣,徐中文,等. 乳酸菌培养条件的优化[J].

- 饲料研究, 2007, 9(8): 49-50.
- TANG Baogui, OU Zhurong, XU Zhongwen, et al. Optimization of culture conditions for *Lactobacillus*[J]. Feed Res, 2007, 9(8): 49-50. (in Chinese)
- [8] 王玉华, 陈萍, 朴春红, 等. 基因组改组鼠李糖乳杆菌生产L-乳酸发酵培养基的优化[J]. 食品科学, 2009, 30(21): 316-319.
- WANG Yuhua, CHEN Ping, PIAO Chunhong, et al. Optimization of fermentation medium composition for L-lactic acid production by genome-shuffled *Lactobacillus rhamnosus*[J]. Food Sci, 2009, 30(21): 316-319. (in Chinese)
- [9] 曾少葵, 杨萍, 陈秀红. 微生物发酵对罗非鱼下脚料蛋白酶解液脱腥去苦效果比较[J]. 南方水产, 2009, 5(4): 58-63.
- ZENG Shaokui, YANG Ping, CHEN Xiuhong. Study on the removal of fish odour and bitter from protein hydrolysates of tilapia by-products by microorganism fermentation[J]. South China Fish Sci, 2009, 5(4): 58-63. (in Chinese)
- [10] SUNHOON K, LEE P C, LEE E G, et al. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin supplemented soybean hydrolysate[J]. Enzyme Microb Technol, 2000, 26(3): 209-215.
- [11] 乔军, 孟庆龄, 贾桂珍. 运用OD值法进行细菌计数的研究[J]. 中国家禽, 1996, 23(4): 26-27.
- QIAO Jun, MENG Qingling, JIA Guizhen. Application method of bacterial count for optical density[J]. China Poultry, 1996, 23(4): 26-27. (in Chinese)
- [12] ROBERT W, ALEXANDRA M, MICHAEL J. Molecular imprinting and solid phase extraction of flavonoid compounds[J]. Kluwer Acad Publ, 2002, 32(3): 379-387.
- [13] 刘国英, 许世荣. 关于提高HPLC法测定乳酸准确性的探讨[J]. 酿酒, 2008, 35(5): 47-48.
- LIU Guoying, XU Shirong. Discussion on improving accuracy of lactate determination through HPLC method[J]. Liquor Making, 2008, 35(5): 47-48. (in Chinese)
- [14] 曾少葵, 郑琪, 杨思新, 等. 混合乳酸菌发酵改善罗非鱼蛋白酶解液风味的研究[J]. 南方水产, 2010, 6(3): 24-31.
- ZENG Shaokui, ZHENG Qi, YANG Sixin, et al. Flavour improvement of hydrolysate from tilapia (*Oreochromis niloticus*) with lactic acid bacteria fermentation[J]. South China Fish Sci, 2010, 6(3): 24-31. (in Chinese)
- [15] 刘颖, 潘丽媚, 谢为天, 等. 鼠李糖乳杆菌LT22培养条件的优化及增殖曲线的绘制[J]. 中国酿造, 2010(4): 49-51.
- LIU Ying, PAN Limei, XIE Weitian, et al. Optimization of culture conditions and the growth curve of *Lactobacillus rhamnosus* LT22[J]. China Brew, 2010(4): 49-51. (in Chinese)
- [16] 丁娟, 魏敏, 张莉. 玉米浆发酵生产L-乳酸的工艺优化[J]. 食品科学, 2011, 32(1): 127-130.
- DING Juan, WEI Min, ZHANG Li. Optimization of L-lactic acid fermentation of corn steep liquor[J]. Food Sci, 2011, 32(1): 127-130. (in Chinese)
- [17] 赵寿经, 朱克卫, 齐红彬, 等. 利用玉米浸泡水发酵生产L(+)乳酸[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(11): 55-58.
- ZHAO Shoujing, ZHU Kewei, QI Hongbin, et al. Study of L(+)-lactic acid production on corn steep liquor media with *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* L1013[J]. Food & Ferment Ind, 2006, 32(11): 55-58. (in Chinese)
- [18] 李鑫, 马瑞, 赵哈璐, 等. 米根霉利用纯糖和不同预处理玉米秸秆酶解糖生产L-乳酸[J]. 生物加工过程, 2010, 8(6): 1-5.
- LI Xin, MA Rui, ZHAO Hanlu, et al. L-lactic acid produced from carbohydrate and enzymatic hydrolyzate of different pretreated corn stovers by *Rhizopus oryzae*[J]. Chin J Bioprocess Eng, 2010, 8(6): 1-5. (in Chinese)
- [19] ALTAF M D, NAVEENA B J, GOPAL R. Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L(+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation[J]. Bioresour Technol, 2007, 98(3): 498-503.
- [20] 俞俊堂, 唐孝宜. 生物工艺学[M]. 上海: 华东理工大学出版社, 1999: 101-102.
- YU Juntang, TANG Xiaoyi. Biotechnology[M]. Shanghai: East China University of Science and Technology Press, 1999: 101-102. (in Chinese)