

私立東海大學化學工程與材料工程研究所

碩士論文

指導教授：顏宏偉 博士

添加絮凝劑與中和劑對於 *Rhizopus oryzae* 直接發酵蕃薯粉生

成乳酸之影響探討

Effects of flocculent agents and neutralizing agents on lactic acid fermentation from
sweet potato starch by *Rhizopus oryzae*



研究生：陳采竹 撰

中華民國 98 年 6 月

謝誌

於研究所一年的研究生活中承蒙指導教授顏宏偉老師於生活、課業及實驗上的輔導，並指導論文的撰寫，在此表示由衷感謝，同時感謝楊芳鏘教授給予的指導與意見。同時感謝顧野松副教授、魏毓宏教授、石信德教授對本論文的指正及建議，給我不同的觀念和視野，使得本論文能更臻充實，在此致上最誠摯的謝意。

研究生活中，要感謝的人實在太多，除了指導教授顏宏偉老師外，非常感謝實驗室的每個成員學長嘉宏、子元、若凡、凱平，學姊素敏、馨怡、秀玲、宜珈在實驗上的指導，以及實驗室同學憶芝、嘉麟、于萱、志昇、怡妘，可愛的學弟妹尚甫、智勇，和玉真，在實驗上面的協助以及鼓勵，並且同學們能夠一起參與休閒及運動，使我在求學期間增加許多歡笑，在我受挫時給我最大的支持和鼓勵，感謝有你們讓我的生活多采多姿。

最後，謹將此論文獻給我的父母親及家人，感謝他們無盡的付出，及生活上與精神上的支持與鼓勵，才可以讓我在求學階段無後顧之憂的進行研究並完成學業，謝謝你們！並再次感謝曾經幫助我的所有人。

ABSTRACT

Lactic acid was produced by *Rhizopus oryzae* (BCRC33071) using sweet potato starch as the substrate. In present studies, mycelial morphology of *Rhizopus oryzae* in submerged fermentation is usually classified three types, filamentous mycelia, pellets, and cotton-like flocs. This study would aim to discuss three mycelial morphology effects on lactic acid production. First, the effects of seed medium morphology (including filamentous mycelia and pellets) on lactic acid production. Second, the effect of different neutralizing agents including 3 N NaOH, 50% (w/v) CaCO₃, 2% (w/v) NH₄CO₃ +10% (w/v) NH₃, and 10% (w/v) NaHCO₃ as the neutralizing agents effects on lactic acid production. Third, the effects of PEG6000, γ -PGA (food grade) and γ -PGA (hydrogel) as the flocculent agents affects on the lactic acid production.

First, different effects of seed medium morphology (including filamentous mycelia and pellets) obviously affected lactic acid production. The pellets of seed medium morphology had the better lactic acid production than filamentous mycelia. Lactic acid at 44.48 g / L and a productivity of 0.93 g/L/h were obtained in the batch with pellet seed medium within 48 h of fermentation. Second, the effect of different neutralizing agents, 2% (w/v) NH₄CO₃ +10% (w/v) NH₃ was not good being a neutralizing agent which has the lowest concentration of lactic acid (30.74 g/L). However, calcium carbonate was a preferred neutralizing agent to produce lactic acid, which had lactic acid at 41.05 g/L with a yield of 68.42% and a productivity of 1.19 g/L/h. Third, 5.0 g/L γ -PGA (food grade) was added to the culture at 16 h, which produced the maximum lactic acid among all flocculent agents, lactic acid at 39.70 g/L with a yield of 66.12% and a productivity of 0.79 g/L/h.

Based on the above three experiments, the different neutralizing agents had the

obvious effect on the lactic acid production, and 50% (w/v) CaCO₃ as neutralizing agent (fermentation time of 34.5 h) was the most suitable for the growth of *R. oryzae* and lactic acid production, lactic acid at 41.05 g/L with a yield of 68.42% and a productivity of 1.19 g/L/h were obtained.

Keyword: PEG6000, γ -PGA, *Rhizopus oryzae*, L- lactic acid

摘要

本研究利用 *Rhizopus oryzae* (BCRC33071) 發酵澱粉生成 L 型乳酸，首先，探討碳氮源種類對 *R.oryzae* 生產 L-乳酸的影響，在確定培養基組成後，由於發酵過程所形成菌體的型態會有很大的差異，其可能型態包括有結構較鬆散的絲狀菌絲體 (mycelium)，或者是球狀且結構較緊密的菌絲球 (pellet)，亦或是生成棉絮狀的菌絲團 (cotton-like flocs)，因此進一步研究菌體型態改變對 L-乳酸發酵的影響性。

對於培養基條件的探討，以 60 g/L 蕃薯粉與 2 g/L NH_4NO_3 為最佳的培養基碳氮源，在起始 pH 6.0 培養條件下，獲得 L-乳酸濃度為 51.07 g/L，產率 85.11%，生產速率 1.06 g/L/h，菌絲型態為菌絲球 (粒徑約 3 mm)，此為搖瓶最適化結果。因此，將搖瓶最適化放大至 5 L 攪拌式發酵槽中，在批次發酵實驗以 3 N NaOH 調控 pH 值，實驗結果顯示在發酵 48 小時獲得乳酸濃度為 39.43 g/L，產率 65.72%，生產速率 0.82 g/L/h，菌絲型態為菌絲狀 (mycelium)，批次發酵槽實驗相較於搖瓶實驗數據，搖瓶實驗有著較佳的 L-乳酸濃度、產率、生產速率，實驗數據顯示不同菌體型態會影響乳酸發酵，因此進一步探討在發酵槽不同的菌絲型態生成對 L-乳酸產量的影響。

菌絲型態改變主要的實驗有利用接菌於發酵槽時種瓶 (seed medium) 培養的菌絲型態 (包括菌絲狀與菌絲球) 對 L-乳酸的影響、利用不同中和劑 (3 N NaOH、50 % (w/v) CaCO_3 、2% (w/v) NH_4CO_3 +10 % (w/v) NH_3 、10% (w/v)

NaHCO₃)添加對 L-乳酸的影響、以及添加絮凝劑 PEG6000、 γ -PGA (food grade)、 γ -PGA (hydrogel)對乳酸生成的影響。首先在不同接種型態之改變，以利用菌絲球接種至發酵培養基，實驗結果為發酵 48 小時，乳酸濃度為 44.48 g/L，生產速率 0.93 g/L/h。添加不同中和劑調控 pH 值對生成乳酸的影響，中和劑為 3 N NaOH 所形成的菌絲型態為菌絲狀，其餘以 50 % (w/v)CaCO₃、2% (w/v) NH₄CO₃+10% (w/v) NH₃、10% (w/v) NaHCO₃ 調控 pH 值所形成的菌絲型態則為菌絲球，對乳酸濃度的影響上，其中以 2% (w/v) NH₄CO₃+10 % (w/v) NH₃ 調控 pH 值所獲得之乳酸產量最低 (30.74 g/L)，而以碳酸鈣作為 pH 值調控之乳酸生產速率為最佳，乳酸濃度為 41.05 g/L，產率 68.42%，生產速率 1.19 g/L/h。最後利用添加絮凝劑 (PEG6000、 γ -PGA (food grade)、 γ -PGA)改變菌絲型態為棉絮團所獲得之結果，以添加 5.0 g/L γ -PGA 可獲得較佳之乳酸發酵結果。在發酵槽中培養第 16 小時時添加 5.0 g/L γ -PGA，可獲得乳酸濃度為 39.70 g/L，產率 66.12%，生產速率 0.79 g/L/h。

綜合以上研究結果，在 5 L 攪拌式發酵槽中，與控制組批次發酵槽實驗 (發酵時間為 48 小時)結果比較，相較於改變菌體接種型態與額外添加絮凝劑對乳酸生成的影響，利用四種中和劑添加對生產 L-乳酸的影響最為明顯，其中又以 50 % (w/v) CaCO₃ 中和劑 (發酵時間為 34.5 小時)，為最適合 *R. oryzae* 生長及生產乳酸，乳酸濃度為 41.05 g/L，產率 68.42%，生產速率 1.19 g/L/h。

關鍵字：PEG6000、 γ -PGA、*Rhizopus oryzae*、L 型乳酸

目錄

摘要.....	I
目錄.....	III
圖目錄.....	VII
表目錄.....	VIII
第一章緒論.....	1
第二章 文獻回顧.....	2
2.1 乳酸簡介.....	2
2.2 乳酸生產方法.....	4
2.2.1 微生物發酵法.....	5
2.2.2 生產方法比較.....	5
2.3 生產乳酸的菌種比較.....	6
2.4 <i>R. oryzae</i> 介紹.....	8
2.4.1 真菌型態對代謝產物之影響.....	8
2.4.2 <i>R. oryzae</i> 發酵澱粉生成乳酸.....	8
2.4.2.1 澱粉酵素(amylase).....	10
2.4.2.2 澱粉糖化酵素(glucoamylase).....	12
2.4.3 <i>R. oryzae</i> 絲狀菌絲的生物特性.....	12
2.5 影響 L-乳酸產量的因子.....	14
2.5.1 物理因素.....	14
2.5.1.1 溫度.....	14
2.5.1.2 pH 值.....	14
2.5.1.3 攪拌與通氣.....	15
2.5.2 化學因素.....	15
2.5.2.1 碳源.....	15

2.5.2.2 氮源.....	16
2.6 絮凝劑介紹	17
2.7 中和劑的影響	18
第三章 實驗材料與分析方法	19
3.1 實驗材料	19
3.1.1 菌株.....	19
3.1.2 實驗藥品.....	19
3.2 實驗儀器	21
3.3 分析方法	22
3.3.1 蕃薯粉濃度分析.....	22
3.3.2 葡萄糖的分析方法.....	22
3.3.3 銨離子濃度分析.....	23
3.3.4 L-乳酸分析	23
3.3.5 α -Amylase 酵素活性分析.....	23
3.3.6 Glucoamylase 酵素活性分析	24
3.4 實驗方法	25
3.4.1 <i>Rhizopus oryzae</i> 孢子懸浮液製備:.....	25
3.4.2 配製種瓶培養基(seed medium):	25
3.4.3 配製發酵培養基(fermentation medium):.....	25
3.4.4 接菌	26
3.5 實驗培養條件	27
3.5.1 搖瓶實驗.....	27
3.5.1.1 不同碳源種類對乳酸產量的影響.....	27
3.5.1.2 不同培養基氮源種類對乳酸產量的影響.....	28
3.5.1.3 不同起始 pH 值對乳酸產量的影響.....	29

3.5.1.4	批次搖瓶發酵實驗.....	29
3.5.1.5	不同絮凝劑種類對乳酸產量的影響.....	30
3.5.2.6	絮凝劑 γ -PGA (food grade) 添加濃度對乳酸產量的影響.....	31
3.5.1.7	小型搖瓶重覆批次實驗對乳酸產量的影響.....	31
3.5.2	攪拌式發酵槽實驗.....	32
3.5.2.1	批次發酵槽實驗.....	32
3.5.2.2	種瓶培養的菌絲型態對乳酸的影響□.....	32
3.5.2.3	不同中和劑調控 pH 值對乳酸產量的影響.....	33
3.5.2.4	添加絮凝劑對乳酸產量的影響.....	33
3.5.2.5	攪拌式發酵槽饋料批次實驗.....	34
第四章	實驗結果與討論.....	35
4.1	論文架構.....	35
4.2	不同碳源種類對乳酸產量的影響.....	37
4.3	不同培養基氮源種類對乳酸產量的影響.....	39
4.4	不同起始 pH 值對乳酸產量的影響.....	41
4.5	批次搖瓶發酵實驗.....	43
4.6	不同絮凝劑對乳酸產量的影響.....	45
4.7	絮凝劑 γ -PGA 添加濃度對乳酸產量的影響.....	48
4.8	小型搖瓶重覆批次實驗對乳酸產量的影響.....	51
4.9	批次發酵槽實驗.....	53
4.10	種瓶不同菌絲型態的探討.....	55
4.11	探討不同中和劑調控 pH 值.....	57
4.12	添加絮凝劑 γ -PGA (food grade) 的探討.....	60

4.13 饋料批次實驗	63
第五章 結果與未來展望	65
5-1 結論	65
5-2 展望	67
參考文獻	68
附錄	74
附錄 1	74
附錄 2	74
附錄 3	75
附錄 4	75

圖目錄	
圖 2-1 L (+) 型乳酸及 D (-)型乳酸結構圖	3
圖 2-2 Map of glucose metabolism in <i>R. oryzae</i>	10
圖 2-3 Mineral support、PEO 及菌絲作用形成綿絮團	17
圖 4-1 論文架構	1
圖 4-2 不同碳源種類發酵生產乳酸	38
圖 4-3 不同氮源種類發酵生產乳酸	40
圖 4-4 起始 pH 值生產乳酸的影響	42
圖 4-5 菌絲型態	43
圖 4-6 批次搖瓶實驗	44
圖 4-7 添加絮凝劑 5.0 g/L 的菌絲型態	46
圖 4-8 控制組與添加 γ -PGA (hydrogel)的菌絲型態	47
圖 4-9 不同絮凝劑對生成乳酸的影響	47
圖 4-10 0 小時添加不同濃度 γ -PGA (food grade)對乳酸生成的影響	49
圖 4-11 16 小時添加不同濃度 γ -PGA (food grade)對乳酸生成的影響	49
圖 4-12 26 小時添加不同濃度 γ -PGA (food grade)對乳酸生成的影響	50
圖 4-13 批次實驗	52
圖 4-14 批次實驗 amylase 與 glucoamylase 酵素活性	52
圖 4-15 發酵槽批次實驗菌絲型態	54
圖 4-16 發酵槽批次實驗	54
圖 4-17 種瓶菌絲球接入發酵槽	55
圖 4-18 種瓶不同型態接入發酵槽的影響	56
圖 4-19 不同中和劑調控 pH 值的菌絲型態	58
圖 4-20 發酵槽銨離子濃度的變化	59
圖 4-21 不同中和劑對生成乳酸的影響	59
圖 4-22 菌絲型態 (3 N NaOH 調控 pH 值)	61
圖 4-23 菌絲型態 (50%(w/v)碳酸鈣調控 pH 值)	61

圖 4-24 添加絮凝劑 γ -PGA (5.0 g/L)對乳酸產量的影響	62
(3 N NaOH 調控 pH 值).....	62
圖 4-25 添加絮凝劑 γ -PGA (5.0 g/L)對乳酸產量的影響	62
(50%(w/v)碳酸鈣調控 pH 值).....	62
圖 4-26 饋料實驗對乳酸產量的影響	64
表目錄	
表 2-1 國際主要乳酸生產企業	4
表 2-2 不同菌種發酵生成乳酸	7
表 3-1 實驗藥品	19
表 3-2 實驗儀器	21

第一章緒論

乳酸為一種人體可代謝的重要有機酸被廣泛應用在與人們日常生活相關的食品、醫藥等。乳酸經由聚合反應可合成聚乳酸 (Polylactic acid)，所製造而成的衍生品具有 100% 生物可降解性，相較使用石化材料，由於農產品澱粉所聚合而成的聚乳酸具有低汙染、無毒等特性，對環境保護具有相當大的貢獻。由於聚乳酸在自然界中可被許多種環境微生物分解，再加上其具有良好的生物體相容性，聚乳酸目前已成為生物分解材料領域中，最具有發展潛力之一的材料。但近年來在全世界講求綠色化學的前提下，用微生物發酵法生產乳酸已成為未來發展的趨勢。全球目前主要兩大生產者，CCA 和 STERLING 兩家公司，於 1990 年世界乳酸總產值達 40×10^3 tons/yr (Datta et al., 1995)，日本 Musashino 則是規模較小的製造廠。但是就經濟效益而言，目前生物發酵法的成本要比化學合成法昂貴許多，主要原因是在所使用的碳源為葡萄糖成本較高，所以如何有效的降低生產成本、提高乳酸產量，是現今必須研究的課題。

第二章 文獻回顧

2.1 乳酸簡介

乳酸 (Lactic Acid) 學名為 2-hydroxypropanoic acid，分子式 $\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}$ ，分子量 90.08，分子中含有一個不對稱的碳原子，所以具有光旋異構體，按其旋光性可分為兩種 leavo (L)型和 dextro (D)型。乳酸廣泛地存在自然界中的有機酸，環境中以 L 型乳酸存在，首先於 1780 年 Scheel 從酸奶中發現 (Narayanan et al., 2004)，乳酸未工業化生產之前，是由乾酪、酸奶、醬油、酵母、肉、醬菜、葡萄酒等食品的自然發酵形成，乳酸也是大部分人體組織代謝的中間產物，人體內含有 L-乳酸脫氫酵素，所以能分解自體或攝入的 L-乳酸，但如果人體內攝入 D-(-)乳酸過量，將引起人體代謝紊亂，尿液出現高酸度。在 1881 年由 Charls E.Avery 首次商業化生產乳酸 (Narayanan et al., 2004)，此後，它廣泛被運用於食品、制藥、紡織、制革、環保和農業中。其產品主要用途為食品工業上的酸味劑、調味劑、防腐劑等以及作為皮革工業之鞣制劑、農業用途之植物生長調節劑等，因具有良好的生物可分解性，因此在手術縫合線和骨科固定材料方面有越來越大的需求。現今試驗級乳酸溶液，純度範圍為 88~92%，溶液中乳酸型態不但會以單分子存在，同時含有寡聚物及聚合物，此外，乳酸溶液與酯類混合達平衡時，會產生自酯化反應，所以，純化乳酸的工作是目前具有挑戰性。而由石化原料合成的乳酸具有 optically inactive (消旋混合物)，經由微生物發酵所得的乳酸具有光學

活性可選擇性，利用挑選不同菌種發酵可得 L 或 D 型乳酸的優點，利用 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 或 Yellow Springs Instruments (YSI) 2700 Glucose Lactate Analyzer 可分析 L 型乳酸。目前乳酸市場正處於聚乳酸聚合物的一個分水嶺，全球乳酸生產規模已大幅上漲而供應乳酸聚合的生產原料，主要是由 Cargill Dow NATUREWORK 廠提供。聚乳酸不是新的一種概念，但是在過去僅有小規模生產生物降解材料，因此在全球能源危機與溫室效應考量下，NATUREWORK 廠利用玉米價值鏈的整合，使聚乳酸產業對於石化方法生產的一些聚合物極具競爭力的生產成本，此外大容量低成本乳酸也引起商業開發成功乳酸酯類(甲基,乙基,丁基等)做為替代那些來自石化污染源丁酮、異丁醇等 (Narayanan et al., 2004)。



圖 2-1 L (+) 型乳酸及 D (-)型乳酸結構圖
(Narayanan et al.,2004)

2.2 乳酸生產方法

現今乳酸工業的生產方法主要有化學合成法和微生物發酵法二種。工業規模的生物發酵法生產 L-乳酸始於 90 年代初。1990 年，主要乳酸生產公司，CCA 和 STERLING，乳酸產量達 40×10^3 噸/年，日本 Musashino 則是規模較小的製造廠，因此，乳酸要成為發展成熟且精製的化學物品，必須提供新的利用價值，例如在氧化物生產過程中，添加塑膠的單體或中間產物，可有效提高生產量，近年來因聚乳酸酯實現產業化，更激起乳酸的發展熱潮。市場成長產能將超過 50 萬噸。乳酸在工業領域的應用已逐步超越其在食品工業的應用，成為乳酸的最大應用市場 (Datta et al.,1995)。

表 2-1 國際主要乳酸生產企業

企業名稱	地域	生產方式	產能 (萬噸/年)	產品
荷蘭 PURAC 公司	荷蘭、美國、巴西	根 黴 發 酵、細菌發 酵	3-5	L-乳酸及衍 生 物
ADM 公司	美國	細菌發 酵	2-3	L-乳酸及其鹽 類
Cargill 公司	美國、西 班牙	細菌發 酵	5-9	L-乳酸
Cargill DOW 公 司	美國	細菌發 酵	14-20	L-乳酸及聚乳 酸
比利時格拉特 公司	比利時	細菌發 酵	3-5	L-乳酸及其鹽 類
法國 RODIA 公 司	法國	細菌發 酵	0.3-0.5	L-乳酸及衍 生 物
日本武藏野公 司	日本	化學合 成	0.3-0.5	DL-乳酸及衍 生 物

(<http://www.tmmfa.org.tw/%A5X%AA%A9%A5Z%AA%AB/magazine/%B2%C441%B4%C1%BBE%A8%C5%BB%C4%E0%AD%AA%BA%B5o%AEi%BE%F7%B7%7C.htm>)

2.2.1 微生物發酵法

微生物發酵法利用的碳源種類廣泛，採用玉米、小麥、馬鈴薯等澱粉物質，廢紙等纖維素物質，或是糖蜜及其他醣類等作為發酵原料。使用批次發酵法，整個批次反應需花4到6天，以葡萄糖為原料，獲得乳酸鹽達90% (w/w)，培養過程產酸，添加碳酸鈣調控pH值，使培養過程發酵液中會同時包含碳酸鹽類，然而，乳酸鈣的濃度為乳酸鹽10% (w/v)，同時對碳源進料濃度及乳酸生成產生抑制效果，通常，先將發酵液過濾菌絲及非溶物質後，再將發酵液加入硫酸，使鹽類轉換為乳酸及不可溶硫酸鈣。在初步純化過程，使用碳源分離管柱及離子交換反應，及脫水反應，獲得藥品級和食品級乳酸，但屬於非熱穩定物品，還必須添加乳化劑、聚合物質等其他物質，乳酸可以與甲醇、或乙醇轉酯化，再利用蒸餾、水解、脫水和酒精回收後，此分離過程產生純度好且熱穩定性高的乳酸產品 (Datta,1995)。

2.2.2 生產方法比較

化學合成法的缺點是所得乳酸產品為為一混合物包括有 D-乳酸及 L-乳酸。另外，由於合成法所用原料是乙醛和劇毒物氫氰酸，工業製程上較具有危險性。微生物發酵法生產乳酸，可通過菌種選育或代謝調控而獲得具有立體單一的 D-乳酸和 L-乳酸，或兩種異構體以一定比例混合的消旋體，以滿足生產聚乳酸的需要。微生物發酵法生產乳酸因其原料來源廣泛、生產成本低、產品光學純度高和安全性好等優點而成為目前生產乳酸的重要方法。

2.3 生產乳酸的菌種比較

生物發酵法生產乳酸，使用的菌種主要分為細菌類及真菌類，細菌發酵一般為厭氧發酵製程，營養成分要求較高，需要外添加多種胺基酸、維生素等，由於營養成分添加要求較多，生長代謝產物也相對多，造成在分離純化乳酸的製程成本提高。而黴菌發酵，其菌體生長營養要求簡單，只需無機氮及少量無機鹽即可，且最後發酵液的副產物較少。對糖類的轉化率則以細菌類乳酸發酵較高，雖然細菌之厭氧發酵程序可以降低能量的耗費，但是容易生成消旋酶，使得細菌類發酵的L-乳酸產生消旋作用，因此細菌類發酵不易獲得高純度的單一型態之乳酸；而根黴菌可以直接利用澱粉原料，無須澱粉先行前處理轉化成糖再進行乳酸發酵，此培養過程稱為同步水解糖化與發酵 (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF)，且黴菌發酵技術簡單，產品容易分離，且很少發現消旋酶的逆轉作用，因此可得光學純度高的L-乳酸。因為*R. oryzae*產乳酸能力良好且產品光學異構純度高，因此常用來作為L-乳酸之工業發酵菌種 (Kandler,1982, Soccol et al.,1994)。表2-2為不同菌種發酵生產乳酸，可看出不論是細菌類 (*Bacillus coagulans*、*Enterococcus faecalis*、*Lactobacillus delbrueckii*、*Lactobacillus manihotivorans*、*Streptococcus bovis*)或黴菌類 (*Rhizopus arrhizus*、*Rhizopus oryzae*)，利用葡萄糖為碳源與其它碳源比較，為可獲得最高乳酸濃度的碳源種類。

表 2-2 不同菌種發酵生成乳酸

Strains	Substrates	L.A. Conc. (g/L)	Yield (g/g)%	Fermentati on period (hrs)	Refs
<i>Bacillus coagulans</i> SIM-7 DSM 14043	glucose	56 (batch) 91.6 (fed-batch)	92-90	10-21	(Michelson et al.,2006)
<i>Enterococcus faecalis</i> RKY1.	glucose+yeast extract	96	94	33	(Oh et al.,2005)
<i>Enterococcus faecalis</i> RKY1.	glucose+ corn steep liquor	103	93	27	(Oh et al.,2005)
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>lactis</i>	glucose	52 (batch)	56	24	(Michelson et al.,2006)
<i>Lactobacillus manihotivorans</i> LMG18011	starch /food wastes	19.5	10	100	(Ohkouchi et al., 2006)
<i>Rhizopus arrhizus</i>	potato waste/soluble starch waste water	18-20	50-80	30-40	(Li et al.,2005)
<i>Rhizopus arrhizus</i> ,	starch	19 –44	85-96	40	(Jin et al.,2003)
<i>Rhizopus arrhizus</i> ,	potato starch wastewater	15	75	48	(Huang et al., 2005)
<i>Rhizopus oryzae</i>	glucose	104	87	36	(刑 , 2006)
<i>Rhizopus oryzae</i>	potato starch wastewater	17-18	78-85	36-48	(Huang et al., 2005)
<i>Rhizopus oryzae</i>	waste potato starch	36	91	36	(Zhang et al., 2007)
<i>Streptococcus bovis</i> 148	raw starch	14.7	88	28	(Narita et al., 2004)

2.4 *R. oryzae* 介紹

2.4.1 真菌型態對代謝產物之影響

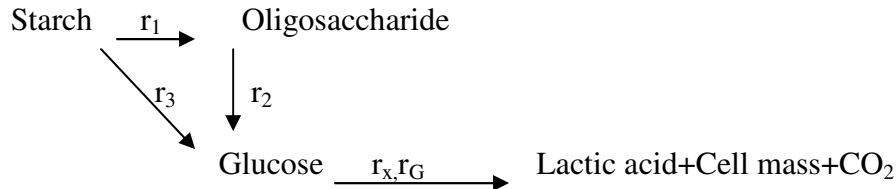
R. oryzae 為真菌類有假根和葡萄菌絲。葡萄菌絲呈弧形，在培養基表面水平生長。葡萄菌絲接生孢子囊梗的部位，接觸培養基處，菌絲伸入培養基內呈分枝狀生長，這是 *R. oryzae* 的重要特徵。其有性繁殖產生接合孢子，無性繁殖形成孢囊孢子。*R. oryzae* 菌絲體白色，在培養基上交織成疏鬆的絮狀菌落，生長迅速，可蔓延覆蓋整個表面。在自然界分布很廣，空氣、土壤以及各種器皿表面都有存在。並常出現於澱粉質食品上，引起饅頭、麵包、甘薯等發霉變質，或造成水果蔬菜腐爛。

2.4.2 *R. oryzae* 發酵澱粉生成乳酸

R. oryzae 是生產 L-乳酸的理想菌種，可直接發酵農產品生產 L-乳酸，用碳酸鈣為中和劑，Suntornsuk 等人藉由通過紫外線誘變或亞硝基胍變處理，得三種高產 L (+)-乳酸的 *R. oryzae* 菌株 1N1、3N4 和 4N6，產酸分別為 17.6 g/L、17.6 g/L 和 19.8 g/L，至少比原始菌株提高 57%，其中 3N4 菌株所產的糖化酵素比原始菌株提高 54%，為直接利用澱粉發酵生產乳酸奠定了基礎 (Suntornsuk et al.,1994)。

在 Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)，從澱粉發酵生產乳

酸的機制：



依據此機制，*Rhizopus oryzae* 能生產澱粉酵素 (amylase) 和糖化酵素 (glucoamylase)，將澱粉同時被降解為寡糖及水解為葡萄糖，而寡糖再經由 amylglucosidase 轉換成葡萄糖，葡萄糖經代謝產生的有機體主要為乳酸、細胞質量、二氧化碳 (Philippidis,1997)。

R. oryzae 為好氧型真菌，就發酵代謝型態而言，其發酵類型屬混合酸發酵，而關於 *R. oryzae* 乳酸發酵代謝通量模型及代謝工程的文獻報導很少。經由 Wright 等人，應用 ^{14}C 放射性同位素標記的方法確定了 *R. oryzae* 體內的代謝網路，研究顯示出 *R. oryzae* 體內存在著兩個丙酮酸代謝庫：一個存在於原生質內丙酮酸分別轉化成乙醇、乳酸、富馬酸、草酰乙酸、蘋果酸；另一個存在於粒線體內，丙酮酸轉化為乙酰輔酵素 A 進入 TCA 循環，產生富馬酸和蘋果酸代謝庫，經過實驗證明細胞外累積的蘋果酸和富馬酸由第一個丙酮酸代謝庫產生 (Wright et al.,1996)。

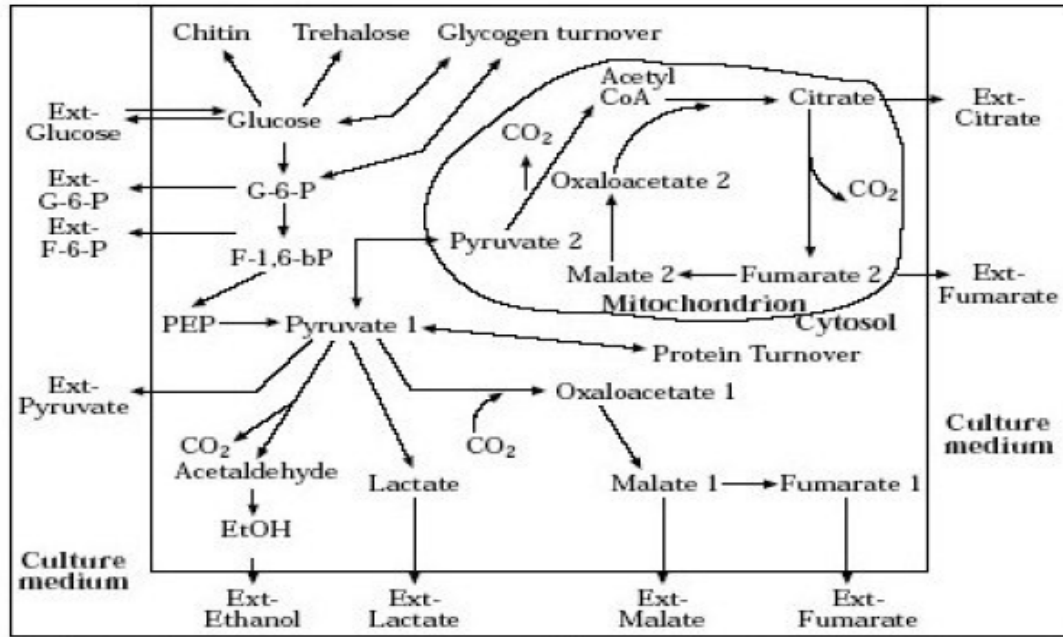
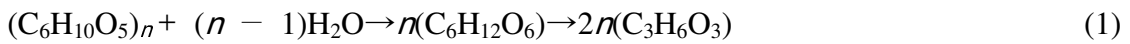


圖 2-2 Map of glucose metabolism in *R. oryzae* (Wright et al., 1996)

所以澱粉經酵素水解轉化成葡萄糖為下式：



而澱粉轉化成葡萄糖的轉化因子：

$$\text{Conversion factor} = \frac{180 \times n}{180 \times n - (n - 1) \times 18} \quad (2)$$

當澱粉裡的葡萄糖鏈很多， n 值很大時，可得 conversion factor 為 1.11，例如，10 克澱粉完全水解可得 11.1 克葡萄糖，理論上，同樣碳源為 10 克澱粉與 10 克葡萄糖經發酵分別可獲得 11.1 克及 10 克乳酸 (Li et al., 2005)。

2.4.2.1 澱粉酵素 (amylase)

澱粉酵素 (amylase) 廣泛分布於植物、動物組織及微生物體。此內切酵素以亂數的規則水解 α -1, 4-糖苷鍵，最終產物為寡糖及葡萄糖。根據作用的方式可

分為：

α -澱粉酵素 (1,4- α -D-Glucan,4-Glucanhydrolase,E.C.3.2.1.1) 與 β -澱粉酵素 (1,4- α -D-Glucan Maltodihydrolase,E.C.3.2.1.2)。

α -澱粉酵素廣泛分佈於動物（唾液、胰臟等）、植物（麥芽、山萮菜）及微生物。微生物的酵素幾乎都是分泌性的。此酵素以 Ca^{2+} 為必需因數並作為穩定因數，及適當的溫度（依不同生物體而有所差異），溫度穩定下，存在受質及 Ca^{2+} ，此時的 α -澱粉酵素迅速地增加。 α -澱粉酵素也被稱之液化及糊化酵素，作用於直鏈澱粉，亦作用於支鏈澱粉，無差別地切斷 $\alpha-1,4$ -鍵。因此，其特徵是引起底物溶液黏度的急劇下降和碘反應的消失，最終產物在分解直鏈澱粉時以麥芽糖為主，此外，還有麥芽三糖及少量葡萄糖。

另一方面在分解支鏈澱粉時，除麥芽糖、葡萄糖外，還生成分支部分具有 $\alpha-1,6$ -鍵的 α -極限糊精 (α -limit dextrins)。

β -澱粉酵素主要見於高等植物中（大麥、小麥、甘藷、大豆等），及部分微生物體。 β -澱粉酵素與 α -澱粉酵素的相同點在於從非還原性末端逐次以麥芽糖為單位切斷 $\alpha-1,4$ -葡聚糖鏈對於像直鏈澱粉那樣沒有分支的底物能完全分解得到麥芽糖和少量的葡萄糖。作用於支鏈澱粉或葡聚糖的時後，切斷至 $\alpha-1,6$ -鍵的前面反應就停止了，因此生成分子量比較大的極限糊精 (Drauz et al.,2002)。

4.2.2.2 澱粉糖化酵素 (glucoamylase)

Glucoamylase (1,4- α -D-Glucan Glucohydrolase , E.C.3.2.1.1)是一種外切水解酵素，亦被稱之 amyloglucosidase 及 γ -amylase，主要可為黴菌生產，尤其是 *Aspergillus*, *Rhizopus* and *Endomyces* 的菌種，而極少存在於植物及動物組織。行為類似 β -澱粉酵素，但同時作用於澱粉非還原端及一些寡多醣上的 α -1,4 與 α -1,6 鍵結，最終產物 β -D-葡萄糖，但澱粉糖化酵素對 α -1,4 與 α -1,6 鍵結並無專一性，也有對 α -1,3 鍵結水解的報導 (Drauz et al.,2002)。

2.4.3 *R. oryzae* 絲狀菌絲的生物特性

在生物發酵過程，絲狀微生物扮演一個重要的角色，成為生產的主要原因。在液體環境下菌體的形態會有很大的差異，絲狀真菌可能會形成網狀結構鬆散的、不規則的（通常菌絲球邊還有突出的菌絲）的菌絲體 (mycelium)、到緊密紮實的圓球稱為菌絲球 (pellet) 都有。主要是受生物因素影響，物理化學的環境，包括剪切力，培養基組成，攪拌速率，培養基濃度。型態影響微生物的生長速度及產物形成，菌量濃度會影響菌體型態從球狀到分散的菌絲都有。從型態學的角度來看，高濃度接菌量的型態是顯現球狀及聚集的菌絲。在使用生化法產乳酸，因為 *R. oryzae* 有不同菌絲型態形成，造成不同的表面積及影響了營養和氧氣的擴散率，所以不同菌絲型態產乳酸會有很大的影響。

真菌形態會影響發酵液的流變性質，進而造成不同的氣液質傳與混合攪拌差

異只在高菌絲球濃度下，才會表現出非牛頓流體性質，當真菌形成球狀菌體懸浮液時，一般來說是屬於低黏性的。而當真菌型態為菌絲狀時，在低菌體濃度時，即會表現非牛頓流體性質。因此，促進球狀菌絲球的形成將有助於發酵液黏度的降低，而整體來說，分散狀的菌絲體會使發酵液整體黏度與擬塑性提高，使得發酵液的混合變困難而形成非均一相，但菌絲球則可以避免產生這樣的困擾。

由於球狀型態易控制及低黏度，所以是方便使用在大量培養，在生物反應器中，菌絲生長很困難去培養，因為具高黏度，噴管的通氣有阻礙，還有擋版及扇葉的因素，在某些狀態下也會形成大的塊狀物 (Part et al.,1998)。菌絲球的形成過程目前仍不是完全清楚，一般被接受有兩個形成的機制:凝聚 (Coagulating type) 及非凝聚 (Noncoagulating type)菌絲球形成。凝聚作用主要分為兩步驟，首先是孢子的凝聚，接著是萌發孢子的凝聚而形成菌絲球。非凝聚作用則是由單一的孢子獨立萌發而成(楊，2001)。於液態培養中，型態的差異除了個別菌種的基因特性外，發酵程式中溫度、pH 值、機械力、培養基組成接菌量等因素皆會影響菌絲型態 (Keshavarz et al.,1990)。

2.5 影響 L-乳酸產量的因子

以 *R. oryzae* 發酵法產乳酸製程，受細胞內和細胞外因子相互作用影響甚鉅。細胞內因子包括微生物的繁殖及一些遺傳上的複製、轉錄和移轉的控制機構。而細胞外因子包括物理因素和化學因素，其中物理因素為溫度、pH 值、通氣與攪拌等所組成，而化學因素包含有使用到的影響因子，例如：碳源、氮源等所構成。

2.5.1 物理因素

2.5.1.1 溫度

由文獻得知，*R. oryzae* 液態培養適用溫度範圍在 30~35 °C 時可以獲得較好的生產效率及產量。最佳溫度為 30 °C 左右，越偏向高溫其菌絲產量越低，溫度過低則菌絲生長顯著遲緩；高於 30 °C 則菌絲造成部分衰老。最佳的生長溫度則依菌種而有所微的差異 (Li et al.,2005)。

2.5.1.2 pH 值

在乳酸產量的影響，pH 值是最常被觀察探討的因子，適合生長的範圍為 pH 5.0-6.0 (Li et al.,2005)，Tay 和 Yang 指出當 pH 從 6.0 降至 4.0，則乳酸、乙醇和反丁烯二酸濃度也會跟著降低(Tay et al.，2002)。Miura 研究顯示在 pH 6.0-6.5，乳酸產量達最高 (93 g/L)(Miura et al.,2003)，Kriřtof'ikov'認為 pH 值的變化對副

產物像是反丁烯二酸沒有影響 (Rosenberg et al., 1995)。

2.5.1.3 攪拌與通氣

由於 *R. oryzae* 屬於耗氧發酵過程，所以氧氣在生產乳酸上扮演極重要之角色，以三角搖瓶做液態培養時，可使用恆溫震盪方式增加培養基的溶氧量，而生物反應器經由通氣與攪拌，將氧氣及微生物所需的基質分散均勻，並促進質量及熱量傳遞之效率，溶氧供給必須能充分滿足微生物之生長需求，不至於造成代謝或產物分泌之限制，提高 DO 值在 70–90%，此時，乳酸可獲得最高產量及生產速率 (Tay et al., 2002)。

2.5.2 化學因素

2.5.2.1 碳源

碳源主要作用為構成細胞物質和供給菌種所需的能源，包括單醣類的葡萄糖 (glucose) 和果糖 (fructose) 等，雙糖類的蔗糖 (sucrose)、乳糖 (lactose)、麥芽糖等。亦有利用多醣類農業廢棄物當作碳源等。Bulut 以 150 g/L 總糖量探討加入不同碳源包括葡萄糖 (glucose)、蔗糖 (sucrose)、糖蜜 (molasses)、角豆莢 (carob pod)、麥糠 (wheat bran) 進行乳酸產率測試。其中以葡萄糖可達 60% 的乳酸轉化率，獲得濃度 90 g/L，結果顯示葡萄糖有較佳的乳酸產率，但以成本考量，葡萄糖價格卻是最高 (Bulut, 2004)。而 Zhang 利用廢棄農作物蕃薯粉發酵生產乳酸，

為價格便宜的碳源種類，可得乳酸濃度 36.4 g/l 及產率 91% (Zhang et al., 2007)。

2.5.2.2 氮源

氮源是構成菌體蛋白質和核酸的主要元素，一般而言，氮源並不提供菌體所需能量，氮源種類可分為：(1)無機氮源：例如銨鹽與其他含氮的無機鹽類如氯化銨，磷酸二銨，硝酸銨等。(2)含碳的有機氮源：例如 YE、黃豆粉、尿素、玉米浸出液、綠豆渣等。

Zhang整理使用的五種氮源，包含無機氮源： $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 NH_4NO_3 ，及有機氮源： $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 、yeast extract 及 peptone。研究指出 $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ 有最高氮源含量(46.7%)，再者為 NH_4NO_3 (35.0%)，peptone含有最低氮源含量(8.8%)，利用 NH_4NO_3 可獲得最高乳酸產率(90.6%) (Zhang et al., 2007)。

2.6 絮凝劑介紹

由於絮凝劑 (flocculants)對懸浮膠體之聚集有很大助益，因此，廣泛應用於自來水、環保廢水處理、食品及發酵工業下游加工程序等方面。根據高分子絮凝劑的組成，可分為無機高分子絮凝劑、有機高分子絮凝劑和微生物絮凝劑三大類，報導以發酵培養基培養 8 小時後添加 3 g/L mineral support 及 12 小時後添加無機高分子絮凝劑 5 ppm polyethylene oxide，造成培養基離子環境改變，zeta potential 隨著離子環境的改變而有所變化，相較於未添加此兩者物質，菌絲與 support 及 PEO 培養基環境，所測得的 zeta potential 下降 55%，使高分子帶電物質在適當 pH 6.0-7.0 下會開展延伸，分子鏈上帶電處 可同時連結多個菌絲及 support，引誘菌絲體改變為棉菌狀，而測量棉絮狀的電子排斥力增加為菌絲狀的 3~5 倍，且提升發酵槽體內培養基與菌體的質傳質傳效果，因此，比菌絲型態為菌絲團，對於乳酸產量有顯著提升 (Kosakai et al.,1997)。

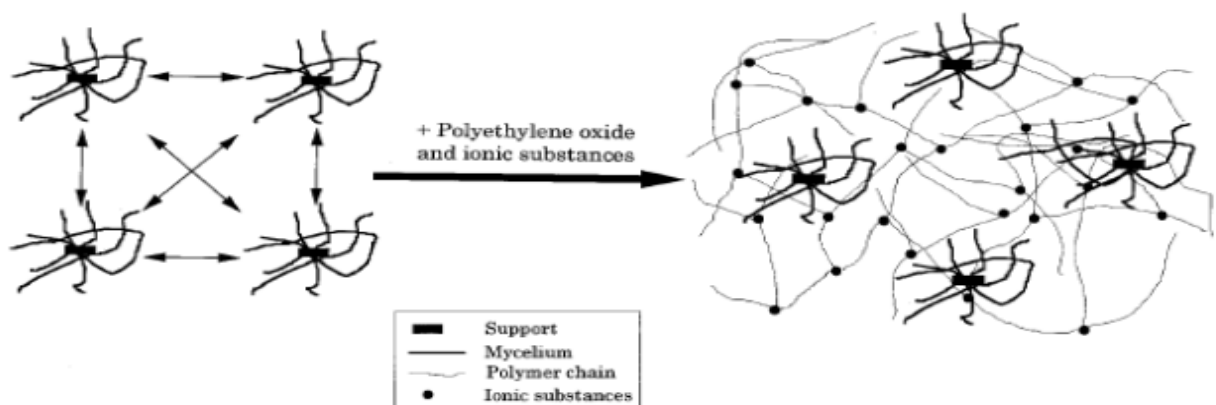


圖 2-3 Mineral support、PEO 及菌絲作用形成綿絮團

(Kosakai et al.,1997)

2.7 中和劑的影響

在發酵產酸過程控制生長pH值，使用的中和劑包含碳酸鈣溶液、碳酸鈉溶液、氫氧化鈉溶液、氫氧化鈣溶液、碳酸氫鈉溶液、氨水與碳酸銨溶液。Petruccioli等人研究中和劑對*Penicillium varibile*生長的影响，碳酸鈣溶液、氫氧化鈉溶液、氫氧化鈉與氯化鈉混合溶液，發現利用氫氧化鈉溶液，會傷害酵素使酵素活性明顯降低，推測酵素以Ca²⁺為穩定因子，因此生產速率以另外兩者含有Ca²⁺為中和劑的效果比氫氧化鈉來的好 (Petruccioli et al., 1997)。碳酸鈣溶液是最常被利用添加在搖瓶與發酵槽中，優點為酸鹼反應溫和的中和劑，對*R. oryzae*不會有中毒作用，但會有添加過量的碳酸鈣溶液在發酵培養基的現象，且碳酸鈣在水中的溶解度為不可溶狀態，必須以磁石持續攪拌，且在純化L型乳酸的過程中，會產生造成環境污染的硫酸鈣 (石膏) (Zhang et al., 2007)，在發酵生產乳酸的過程必須利用碳酸鈣溶液調控pH值，為可能誘導菌體形成菌絲球的因子 (Bai et al., 2003)；Du等人培養*R. oryzae*當添加碳酸鈣培養基pH 5.5形成菌絲球，而缺乏碳酸鈣培養基pH 2.0時則形成絲狀菌絲體，認為以碳酸鈣溶液是形成菌絲球的因素 (Du et al., 1998)；而利用添加氨水與碳酸銨溶液為中和劑，則可同時調控pH值和提供菌體氮源使用，但氨水會對*R. oryzae*造成化學性傷害，因此使用具有緩衝能力的碳酸銨，減緩對菌體的傷害 (賴，2006)。

第三章 實驗材料與分析方法

3.1 實驗材料

3.1.1 菌株

本實驗所採用的菌株，是購自生物資源保存及研究中心，菌種編號 BCRC33071 的 *Rhizopus oryzae*。

3.1.2 實驗藥品

表 3-1 實驗藥品

中文名	英文名	廠牌
γ -聚麩胺酸	γ -poly-glumatic acid	味丹
L(+)型乳酸	L(+)-Lactic acid	Riedel-deHaën
葡萄糖	Glucose	ROQUETTE
馬鈴薯葡萄糖瓊脂	Potato Dextrose Agar	啟新
馬鈴薯葡萄糖萃取物	Potato Dextrose Broth	啟新
蕃薯粉	Sweet potato starch	理想農場
低筋麵粉	Wheat starch	理想農場
碘	Iodine	KANTO
碘化鉀	Potassium iodine	KANTO
蛋白棟	Peptone	DIFCO
太白粉	Corn starch	理想農場
碳酸氫鈉	Sodium hydrogen carbonate	SHOWA
碳酸鈣	Calcium carbonate	SHOWA
碳酸銨	Ammonium carbonate	SHOWA
尿素	Urea	SSAKA
硫酸銨	Ammonium sulfate	SHOWA
磷酸氫二銨	Diammonium hydrogenphosphate	SHOWA

磷酸二氫鉀	Patassium dihydrogenphosphate	SHOWA
氯化鈉	Sodium chloride	SHOWA
氯化銨	Ammonium choride	SHOWA
氫氧化鈉	Sodium hydroxide	SHOWA
甲醇	Methanol	ECHO
聚乙二醇(6000)	Polyethylene glycol	SHOWA
硫酸鎂	Magnesium -sulfate heptahydrate	SHOWA
硫酸鋅	Zinc -sulfate heptahydrate	SHOWA
瓊脂	Agar	DIFCO
硝酸銨	Ammonium nitrate	聯工
酵母萃取物	Yeast Extract	DIFCO
甘油	Glycerol	KANTO
黃豆粉	Soybean power	統一
傳統豆渣	Traditional bean residue	統一
水溶性澱粉	Starch soluble	Riedel-deHaën
再來米粉	Rice starch	日正食品
鹽酸	Hydrochloric acid	OSAKA
玉米粉	Corn starch	日正食品
氨水	Ammonium	KANTO

3.2 實驗儀器

表 3-2 實驗儀器

儀器設備	廠牌	型號
5 公升攪拌式發酵槽	頂生	
Ammonium(NH ₄ ⁺)電極	上泰	27502-03
pH 計	LUTRON	PH-206
葡萄糖分析儀	YSI	2300STAT
分光光度計	THERMO	GENESYS UV10
電子天平	PRECISA	BJ100M
高效能液相層析幫浦	HITACHI	
高速冷凍離心機	HETTICH	EBA3S/10ml
高壓蒸氣滅菌釜	TRIDENT	ET365
烘箱	亮盛	LO-150
恆溫振盪培養箱	亮盛	LUS-150
桌上型微量離心機	HSIANGTAI	MCD2000
超音波振盪器	BRANSON	5210
磁石加熱攪拌器	CHROMTECH	MS-3250B
無菌操作台	海天	3BH-24

3.3 分析方法

3.3.1 蕃薯粉濃度分析

1. 採用 starch-iodine 的分析方式，配製 iodine reagent (5 mM I₂+ 50 mM KI)，及配製 100 g/L 蕃薯粉濃度，以磁石加熱攪拌器加熱溫度為 100°C 下沸騰 5~10 分鐘後，再稀釋成 0.5、1、1.5、2、2.5 g/L 濃度，各取 0.5 ml 體積，加入 0.5 ml 1M HCl，再加入 0.5 ml iodine reagent，反應完畢，各加入 1.5 ml 去離子水，總體積為 3 ml，以分光光度計在波長為 580 nm 測定其光學密度 (Optical density, O.D.)，利用所測量 OD 值作出標準曲線 (附錄 1)所示。

2. 取 1 ml 發酵液在 9000 rpm 離心十分鐘後，取上清液 0.5 ml，加入 0.5 ml HCl (濃度為 1 N)使酵素失活，再加入 0.5 ml iodine reagent 反應完畢後，加入 1.5 ml 去離子水，以分光光度計在波長為 580 nm 量測 O.D.值，求得蕃薯粉濃度 (g/L)。

3.3.2 葡萄糖的分析方法

1. 將 1 ml 發酵液用離心機轉速 9000 rpm 離心十分鐘。
2. 取上清液利用 YSI 2300 STAT Glucose Analyzer 來量測。

3.3.3 銨離子濃度分析

1. 調配 292 g/L NaCl 和 5.34 g/L NH₄Cl (濃度為 0.1 M) ，以 100 ml 定量瓶定量 NH₄Cl 溶液為下列各濃度：10⁻¹ M、10⁻² M、10⁻³ M、10⁻⁴ M 及 10⁻⁵ M，各倒入 250 ml 燒杯，加入 2 ml NaCl (濃度 292 g/L)，將銨離子電極和溫度感測棒放入，以磁石攪拌器攪拌加熱至 30°C，待電位值 (mv)達穩定，紀錄各值，標準線 (附錄 2)所示。

2. 取 100 ml 發酵液，加入 2 ml ISA，將銨離子電極和溫度感測棒放入，以磁石攪拌器攪拌加熱至 30°C，待電位值 (mv)達穩定，紀錄數值，求得銨離子濃度 (g/L)。

3.3.4 L-乳酸分析

取出 1 ml 的菌液，以離心機轉速 9000 rpm 離心 10 分鐘，分離出菌體與上清液，取上清液以高效能液相層析儀- High Performance Liquid Chromatography (HPLC)來分析乳酸濃度，分析條件為 500 mM (NH₄)₂HPO₄ 及 1 % (v/v) H₃PO₄ 為移動相，pH 2.2~2.7，流速設為 1 ml/min，管柱為 C-18Veropak Inertsil 7 ODS-3 4.6x250 mm，偵測波長為 UV 210 nm，標準線 (附錄 3)所示。

3.3.5 α-Amylase 酵素活性分析

1. 採用 starch-iodine 的分析方式 (5 mM I₂+ 50 mM KI)，先配製 10、8、

6、4、2、1 g/L 蕃薯粉濃度，以磁石加熱攪拌器加熱溫度為 100°C 下沸騰 5~10 分鐘後，每個濃度取體積 9 ml 加入 1 ml 蒸餾水，利用 0.01M acetate buffer 調 pH 4.8 後，於恆溫水槽 30°C，150 rpm 條件下反應 30 分鐘，上步驟取 1 c.c. 加入 9 ml 0.1 N HCl 使酵素失活，從上步驟取 1 c.c. 加入 9 ml iodine reagent，反應完畢，以分光光度計在波長為 660 nm 測定其光學密度，利用所測量 OD 值作出標準曲線 (附錄 4) 所示。

2. 將發酵液 5 ml 在離心機 1500 rpm 離心十分鐘後，取 1 ml 上清液，加入 9 ml 濃度為 10 g/L 的蕃薯粉溶液，利用 0.01M acetate buffer 調 pH 4.8 後，於恆溫水槽 30°C，70 rpm 條件下反應 30 分鐘，上步驟取 1 c.c. 加入 9 ml 0.1 N HCl 使酵素失活，從上步驟取 1 c.c. 加入 9 ml iodine reagent，反應完畢，以分光光度計在波長為 660 nm 測定其光學密度，代入標準曲線圖求得濃度，以計算 α -amylase 之活性 (U) (Lee et al., 1993)。

$$U = \frac{blank - sample}{blank \times 10\%}$$

3.3.6 Glucoamylase 酵素活性分析

取 5 ml 的 0.5 g/L 蕃薯粉溶液，0.01M acetate buffer 調 pH 4.8 後，再加入 2 ml 相同的醋酸緩衝液，和 1 ml 的上清液，於恆溫水槽 30°C，70 rpm 條件下反應 30 分鐘後，加入 9 ml 0.1 N HCl 使酵素失活，最後採用葡萄糖分析儀以分析葡萄糖生成量，計算發酵液中 glucoamylase 的活性 (U) (Lee et al., 1993)。

$$U = (\mu\text{mole}/(\text{ml} \cdot \text{min}))$$

3.4 實驗方法

3.4.1 *Rhizopus oryzae* 孢子懸浮液製備:

以濃度為 24 g/L 的 PDA (Potato Dextrose Agar)配製液態培養基， 倒入血清瓶，另外取約 500 ml 的蒸餾水，放入血清瓶中，滅菌 20 分鐘，當培養基冷卻後，在每個培養皿中，加入已培養 8~12 小時長有菌絲狀 *Rhizopus oryzae* 的 seed medium 1 c.c.，加入的培養皿置於 30°C 中靜置恆溫箱活化培養 3 天後，用微量吸管取 5 ml 的蒸餾水加入培養皿中，拿玻棒沾酒精後用火烤後，用玻棒將培養皿中的孢子刮取下來，取 0.8 ml 孢子液和 0.2 ml 無菌甘油均勻混合後，放入微量離心管，並於-20°C 冰箱保存。

3.4.2 配製種瓶培養基(seed medium):

以濃度為 24 g/L 的 PDB (Potato Dextrose Broth)配製 50 ml 的液態培養基，以 1N NaOH 調整 pH 值至 5.5，裝入 250 ml 三角錐型瓶，滅菌 20 分鐘，當培養基冷卻，另取 1 ml *R. oryzae* 孢子懸浮液加入培養基後，放入恆溫振盪培養箱中，以 150 rpm，30°C 進行培養 8~12 小時作為種瓶。

3.4.3 配製發酵培養基(fermentation medium):

將下列藥品加入一個 1000 ml 大燒杯中，加蒸餾水至 1000 c.c.，均勻攪拌

後，以 1N NaOH 調控 pH 值為 6.0，小型搖瓶實驗，發酵培養基體積為 50 ml；

5 L 傳統攪拌式發酵槽實驗，發酵培養基體積為 3 L，滅菌 20 分鐘，此為發酵培養基組成。

Compound	Concentration(g/L)
Sweet potato starch	60
NH ₄ NO ₃	2
KH ₂ PO ₄	0.6
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.25
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.04

3.4.4 接菌

將含有 seed medium 與 fermentation medium 之 500 ml 搖瓶以 75%酒精噴灑滅菌後並置入無菌操作台，取培養 8~12 小時 2.5 ml 的 seed medium (5% 接菌量) 加入 fermentation medium 後，放入恆溫振盪培養箱中，以 150 rpm，30°C 進行培養 72 小時。

3.5 實驗培養條件

3.5.1 搖瓶實驗

3.5.1.1 不同碳源種類對乳酸產量的影響

目的:探討培養基不同碳源種類代替以葡萄糖發酵生成乳酸，找出符合價格低廉且乳酸產量高的澱粉。

1. 50 ml 種瓶培養基 (seed medium) ×1 瓶。
2. 發酵培養基 (fermentation medium) 內添加碳源濃度為 60 g/L 的玉米粉、在來米粉、低筋麵粉、太白粉、蕃薯粉、傳統豆渣。

compound	g/L
Carbon source	60
Yeast Extract	10
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.25
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.04
KH ₂ PO ₄	0.06

3. 接種 2.5 ml seed medium 至上述 50 ml 發酵培養基中，在 30°C、150 rpm、起始 pH 8.0，進行發酵培養，24 小時添加 2 g CaCO₃(s) 調控 pH 值，培養 72 小時。
4. 分析 L-乳酸濃度。

3.5.1.2 不同培養基氮源種類對乳酸產量的影響

目的:探討不同培養基氮源種類對乳酸的影響，以找出符合價格低廉且乳酸產量高的氮源。

1. 50 ml seed medium×1 瓶。

2. fermentation medium 內添加氮源濃度為

compound	g/L
Yeast Extract	10
Urea	2.4
Peptone	6.9
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.2
NH ₄ NO ₃	2
Soybean power	10
(NH ₄) ₂ SO ₄ +YE	0.1+10
(NH ₄) ₂ SO ₄ +Soybean power	0.1+10
(NH ₄) ₂ SO ₄ +Peptone	0.1+6.9
(NH ₄) ₂ SO ₄ +NH ₄ NO ₃	0.1+2

其他組成固定如下:

compound	g/L
Sweet potato starch	60
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.25
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.04
KH ₂ PO ₄	0.06

3. 接種 2.5 ml seed medium 至上述 50 ml fermentation medium 中，在 30℃、150 rpm，起始 pH 8.0，進行發酵培養，24 小時添加 2 g CaCO₃(s) 調控 pH 值，培

養 72 小時。

4. 分析 L-乳酸濃度。

3.5.1.3 不同起始 pH 值對乳酸產量的影響

目的:探討不同起始 pH 對乳酸產量的影響。

1. 50 ml seed medium×1 瓶。

2. fermentation medium 起始 pH 值為 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0。

compound	g/L
Sweet potato starch	60
NH ₄ NO ₃	2
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.25
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.04
KH ₂ PO ₄	0.06

3. 接種 2.5 ml seed medium 至上述 50 ml fermentation medium 中，在 30°C、150 rpm，進行發酵培養，24 小時添加 2 g CaCO₃(s) 調控 pH 值，培養 72 小時。

4. 測量最終 pH 值及 L-乳酸濃度。

3.5.1.4 批次搖瓶發酵實驗

目的:以蕃薯粉為碳源的批次發酵實驗中，蕃薯粉濃度和葡萄糖濃度與乳酸的變化情形。

1. 50 ml seed medium×1 瓶。

2. fermentation medium:

compound	g/L
Sweet potato starch	60
NH ₄ NO ₃	2
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.25
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.04
KH ₂ PO ₄	0.06

3. 接種 2.5 ml seed medium 至上述 50 ml fermentation medium 中，在 30°C、150 rpm，起始 pH 6.0，進行發酵培養，24 小時添加 2 g CaCO₃(s) 調控 pH 值，培養 72 小時。

4. 分析澱粉濃度、葡萄糖濃度及 L-乳酸濃度。

3.5.1.5 不同絮凝劑種類對乳酸產量的影響

目的:探討添加不同絮凝劑種類至發酵培養基對 *R. oryzae* 生長型態的改變且對乳酸產量的影響。

1. 50 ml seed medium×1 瓶。

2. 接種 2.5 ml seed medium 至上述 50 ml fermentation medium 中，在 30°C、150 rpm，起始 pH 6.0，進行發酵培養第 12 小時添加絮凝劑 PEG6000、 γ -PGA (food grade)、 γ -PGA (hydrogel) 至發酵培養基內，濃度分別為 0.24 g/L 和 5.0 g/L，24 小時添加 2 g CaCO₃(s) 調控 pH 值，培養 72 小時。

3. 分析澱粉濃度、葡萄糖濃度及 L-乳酸濃度。

3.5.2.6 絮凝劑 γ -PGA (food grade) 添加濃度對乳酸產量的影響

目的: 探討添加絮凝劑 γ -PGA 至發酵培養基對 *R. oryzae* 生長型態的改變且對乳酸產量的影響。

1. 50 ml seed medium×1 瓶。

2. 於發酵培養 0、16、26 小時後，添加 γ -PGA 濃度為 1 g/L、5 g/L、10 g/L。

在 30°C、150 rpm，起始 pH 6.0，進行發酵培養，24 小時添加 2 g CaCO₃(s) 調控 pH 值，培養 72 小時。

3. 觀察菌體型態及分析 L-乳酸濃度。

3.5.1.7 小型搖瓶重覆批次實驗對乳酸產量的影響

目的: 探討重複批次實驗對乳酸產量的影響。

1. 50 ml seed medium×1 瓶。

2. 發酵培養至 48 小時，以濾網 (200 mesh) 將 50 ml 菌液過濾掉，將濾網上的菌絲體倒入新配製的 50 ml 培養液內，進行發酵 24 小時為一批次，重複批次 13 次。

3. 分析 α -amylase 和 glucoamylase 酵素活性，與澱粉濃度、葡萄糖濃度及 L-乳酸濃度。

3.5.2 攪拌式發酵槽實驗

3.5.2.1 批次發酵槽實驗

目的: 以蕃薯粉為碳源的批次發酵實驗中，蕃薯粉濃度和葡萄糖濃度與乳酸的變化情形。

1. 50 ml seed medium×3 瓶。
2. 接種 150 ml seed medium 至 3000 ml fermentation medium 中，培養基初始 pH 6.0，以 3 N NaOH 調控 pH 5.0，溫度 30°C、攪拌速度 200 rpm、通氣量 2 vvm 進行培養。
3. 分析澱粉濃度、葡萄糖濃度及 L-乳酸濃度。

3.5.2.2 種瓶培養的菌絲型態對乳酸的影響

目的: 探討不同接種的菌絲型態，包含菌絲球及菌絲狀對攪拌式槽發酵生成乳酸的影響。

1. 50 ml seed medium 於第 0 小時添加 6 g/L CaCO₃，培養 24 小時為菌絲球狀×3 瓶。
2. 接種 150 ml seed medium 至 3000 ml fermentation medium 中，培養基起始 pH 6.0，以 3 N NaOH 控 pH 5.0，溫度 30°C、攪拌速度 200 rpm、通氣量 2 vvm 進行培養。

3. 分析澱粉濃度、葡萄糖濃度及 L-乳酸濃度。

3.5.2.3 不同中和劑調控 pH 值對乳酸產量的影響

目的:探討不同中和劑調控 pH 值對菌絲型態及菌絲生長的影響，進而影響發酵生成乳酸。

1. 50 ml seed medium×3 瓶。
2. 分別將接種 150 ml seed medium 至 3000 ml fermentation medium 中，培養基起始 pH 6.0，每槽以不同中和劑 3 N NaOH、50 % (w/v)CaCO₃、2% (w/v)NH₄CO₃ +10 % (w/v) NH₃、10% (w/v)NaHCO₃ 調控 pH 5.0，溫度 30°C、攪拌速度 200 rpm、通氣量 2 vvm 進行培養。
3. 分析澱粉濃度、葡萄糖濃度、銨離子濃度及 L-乳酸濃度。

3.5.2.4 添加絮凝劑對乳酸產量的影響

目的:絮凝劑 γ -PGA (food grade)添加對 *R. oryzae* 生長型態的改變且對乳酸產量的影響。

1. 50 ml seed medium×3 瓶。
2. 於發酵培養 16 小時後，添加 γ -PGA 濃度為 5 g/L。在 30°C、200 rpm，起始 pH 6.0，以 50 % (w/v)CaCO₃ 調控 pH 5.0，溫度 30°C、攪拌速度 200 rpm、通氣量 2 vvm 進行培養。

3. 分析澱粉濃度、葡萄糖濃度及 L-乳酸濃度。

3.5.2.5 攪拌式發酵槽饋料批次實驗

目的:進行發酵槽饋料實驗，探討額外饋料(feeding)對於乳酸生成的影響。

1. 50 ml seed medium×6 瓶。
2. 接種 150 ml seed medium 至 3000 ml fermentation medium 中，培養基起始 pH 6.0，以 50 %(w/v)CaCO₃ 調控 pH 為 5.0，溫度 30°C、攪拌速度 200 rpm、通氣量 2 vvm 進行培養。
3. 於發酵培養 34 小時開始進行蕃薯粉饋料，以磁石加熱攪拌器加熱溫度為 100°C 下沸騰 5~10 分鐘後的 1000 ml 蕃薯粉 (濃度 90 g/L)，在發酵期已達 34 小時後，進行第一次 1000 ml 饋料進入發酵槽內，且在第 58 小時後進入第二次 1000 ml 進行第二次饋料進入發酵槽內，進行發酵培養。
4. 另一發酵槽於發酵培養 34 小時，開始進行蕃薯粉饋料，添加為未經加熱糊化的 1000 ml 蕃薯粉 (濃度 180 g/L)，在發酵期已達 34 小時後，進行一次 1000 ml 饋料進入發酵槽內，進行發酵培養。
5. 分析澱粉濃度、葡萄糖濃度及 L-乳酸濃度。

第四章 實驗結果與討論

4.1 論文架構

如圖 4-1 所示，本研究主要分為三角搖瓶實驗和發酵槽實驗兩主軸，依據探討順序來排列章節，因此在三角搖瓶實驗部分，先探討不同的碳源及氮源種類，確定較佳的碳氮源之後，探討不同的起始 pH 值對乳酸生成的影響，之後探討一次批次實驗、重複批次實驗與添加絮凝劑的影響，最後將三角搖瓶實驗得到的最佳培養基條件，放到大攪拌式發酵槽作探討。

攪拌式發酵槽部分主要以傳統式發酵槽作為生物反應器，首先一次批次實驗中，觀察菌體生長情形，及蕃薯粉、葡萄糖與乳酸的變化，再進一步探討在發酵槽中菌絲型態的改變對乳酸生成的影響，實驗分別為種瓶培養的菌絲型態（菌絲狀與菌絲球）對乳酸的影響、利用不同中和劑對添加乳酸的影響、添加絮凝劑對乳酸生成的影響，最後探討饋料批次實驗 (fed-batch) 對乳酸生成的影響。

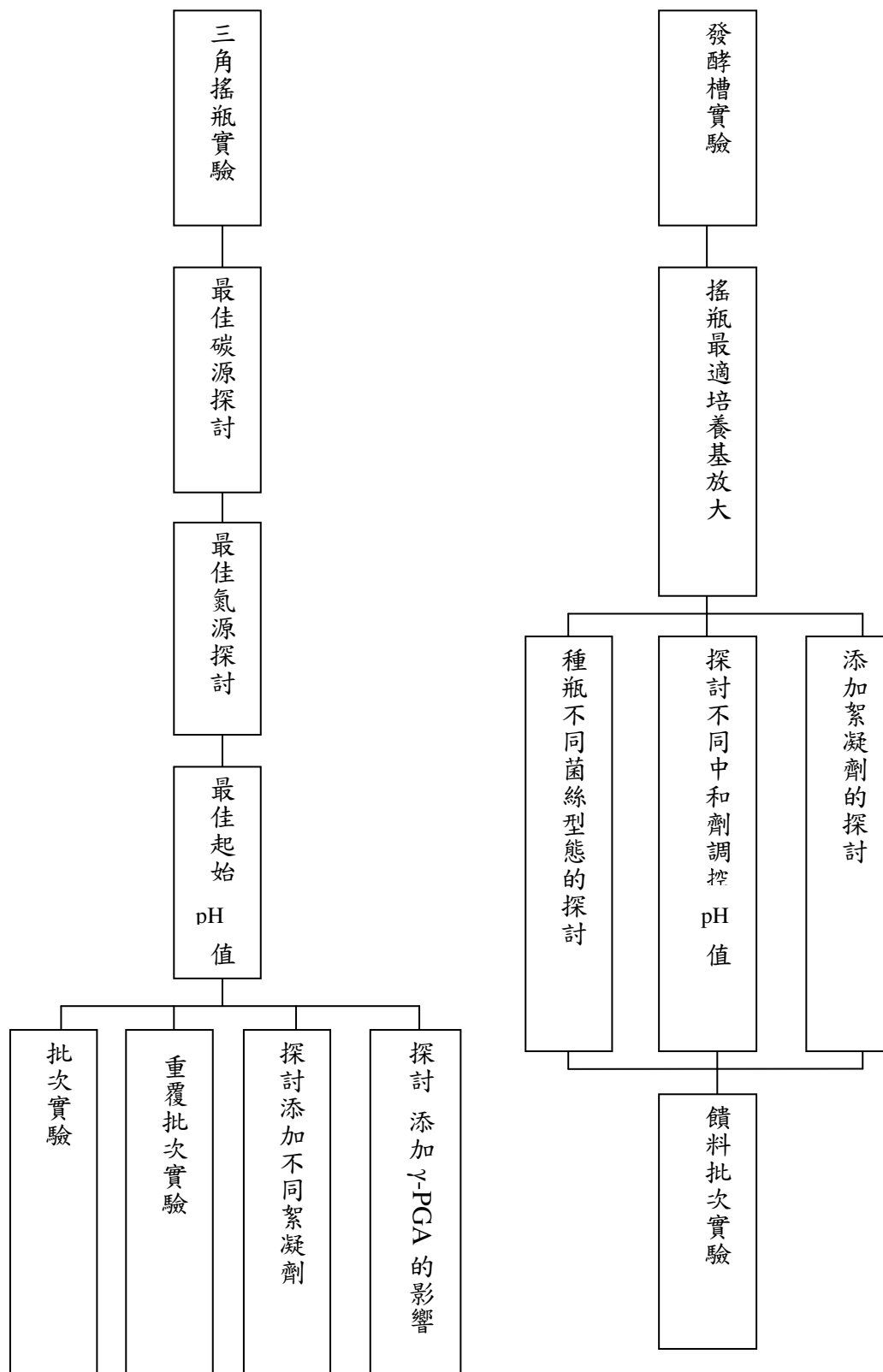


圖 4-1 論文架構

4.2 不同碳源種類對乳酸產量的影響

碳源的選擇是影響菌體生長的關鍵，進而影響乳酸產率，*R. oryzae* 最早用葡萄糖生產乳酸是在 1936 年 (Lockwood et al.,1936)，由於以葡萄糖作為碳源成本高，因此選擇幾種不同澱粉種類作為研究，利用同步水糖化與發酵法，初步使用不同澱粉來源發酵乳酸結果，由於根莖類的蕃薯粉與太白粉(又稱樹薯粉)的澱粉含量，比種子類包括玉米粉，再來米粉，低筋麵粉、傳統豆渣的澱粉含量來的高，文獻指出，potato starch wastes 所測得的澱粉含量高達 90%(w/w) (Zhang et al.,2007)。

實驗結果如圖 4-2，六種不同的碳源 (60 g/L)中，乳酸產量以蕃薯粉 41.47 g/L 和太白粉 37.62 g/L 的為較佳培養基碳源；證明蕃薯粉是一個不錯的選擇，產率為 69.12%，根據文獻說法，60 g 蕃薯粉所含的澱粉量為 54 g，利用 SSF 法發酵生產乳酸，乳酸理論產值為 59.4 g，相較於太白粉，台灣也是盛產蕃薯的國家，所以蕃薯粉擁有較佳的價格競爭性，相較於使用高單價的葡萄糖為碳源，利用蕃薯粉為碳源種類，的確可以減低成本，因此蕃薯粉被選定做為乳酸發酵時之澱粉基質，並進一步探討氮源。

產率=(乳酸濃度 (g/L)/起始蕃薯粉濃度 (g/L))*100%)

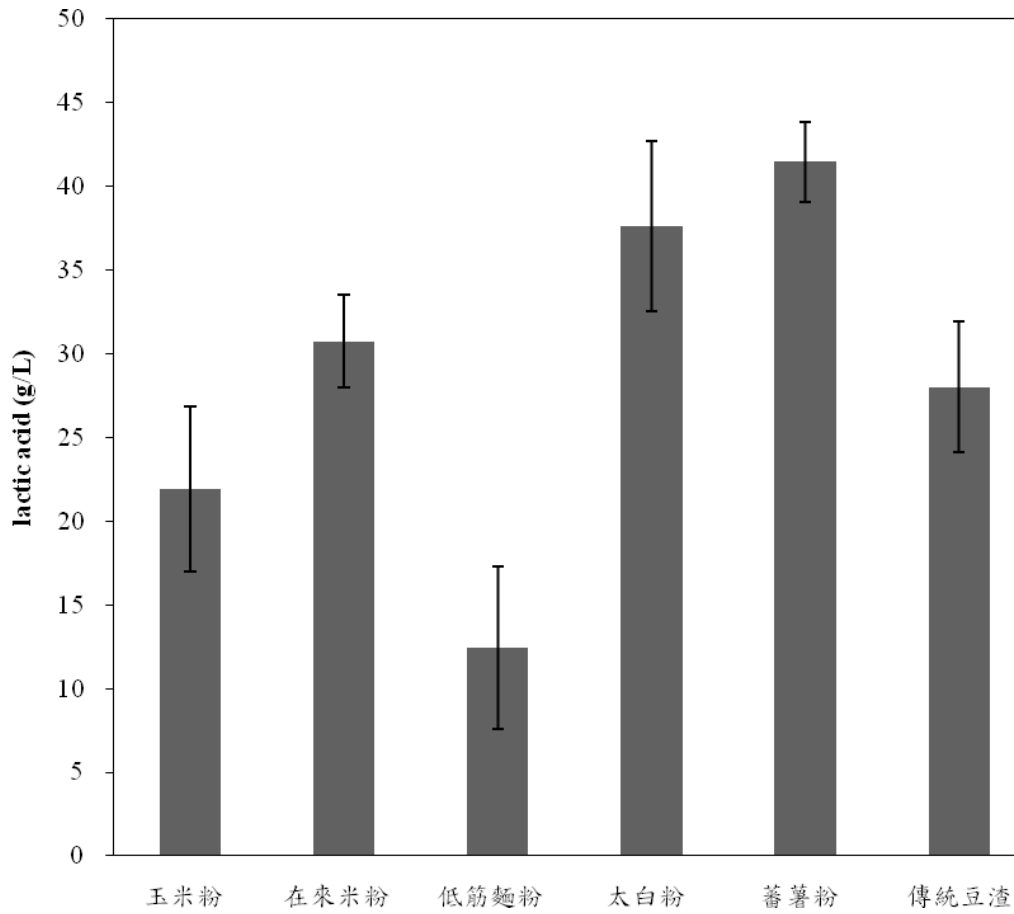


圖 4-2 不同碳源種類發酵生產乳酸

培養條件：

發酵培養基：起始 pH 8.0，培養 24 小時添加 2 g 碳酸鈣調控 pH 值、

轉速 150 rpm、溫度 30°C、培養時間 72 小時

4.3 不同培養基氮源種類對乳酸產量的影響

文獻上探討氮源對乳酸的影響，一般會以碳氮比 (C:N=28~670)來解說，培養基為較低碳氮比 28~168 (g/g)，則會增加乳酸、乙醇及生質的生成，而較高碳氮比 335~670 (g/g)，則傾向生產反丁烯二酸 (Zhang et al., 2007)。

十種不同的氮源組合中，氮源包含無機氮源如 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3 ，及有機氮源如 YE、Urea ($\text{CO}(\text{NH}_2)_2$)、Peptone、黃豆粉，氮源含量比最高為 Urea (46.7%)，依次為 NH_4NO_3 (35.0%)，最低為 Peptone (8.8%)，實驗結果如圖 4-3，以乳酸產量來看，無機氮源 0.1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 與有機氮源 10 g/L YE 的混合獲得最高的乳酸濃度 (41.47 g/L)，0.1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 與其他有機氮源的組合也可得乳酸濃度約 40 g/L，比單獨使用有機氮源的效果都來的好，主要是有機氮源 YE、Urea、Peptone 和黃豆粉比無機氮源更利於被生物體所利用，比使用無機氮源的生質還要來的高 (Prescott et al., 1996)，而實驗結果，尿素則是較差的氮源 (乳酸產值 5.71 g/L)，而使用 2 g/L NH_4NO_3 獲得 40.82 g/L 乳酸，此為無機氮源，價格方面比使用有機與無機混合的氮源較具備競爭力，因此，決定蕃薯粉及 NH_4NO_3 做為基礎培養基碳氮源，作為搖瓶實驗及發酵培養基的基礎培養基。

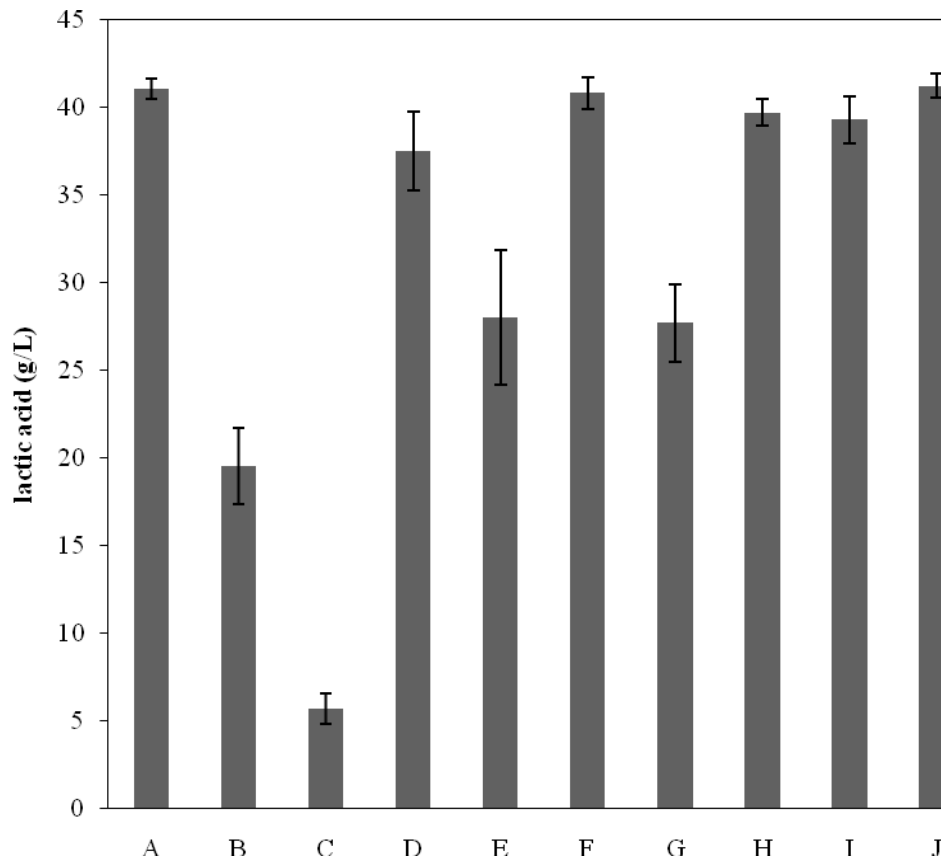


圖 4-3 不同氮源種類發酵生產乳酸

Symbol	Composition
A	0.1 g/L(NH ₄) ₂ SO ₄ + 10 g/L Yeast Extract
B	10 g/L Yeast Extract
C	2.4 g/L Urea
D	6.9 g/L Peptone
E	5.2 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄
F	2 g/L NH ₄ NO ₃
G	10 g/L soybean power
H	0.1 g/L(NH ₄) ₂ SO ₄ +10 g/L soybean power
I	0.1 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ + 6.9 g/L Peptone
J	0.1 g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ + 2 g/L NH ₄ NO ₃

培養條件:

發酵培養基：起始 pH 8.0，培養 24 小時添加 2 g 碳酸鈣調控 pH 值、

轉速 150 rpm、溫度 30°C、培養時間 72 小時

4.4 不同起始 pH 值對乳酸產量的影響

探討 pH 值對乳酸的產量的影響，起始 pH 值影響菌體酵素的酵素活性，包含 amylase 與 glucoamylase，進一步對發酵乳酸有所影響，而實驗結果如圖 4-4，以起始 6.0，可獲得乳酸產量最高為 51.07 g/L，起始 pH 8.0，乳酸產量達到最低為 45.22 g/L，實驗結果顯示起始 pH 值在 5.0~9.0，乳酸的產率都可達 75% 以上，最後所測得的 pH 值，範圍在 5.0~5.5，因此，起始 pH 值決定為 6.0，之後再放大到 5 L 傳統攪拌式發酵槽，起始 pH 6.0。

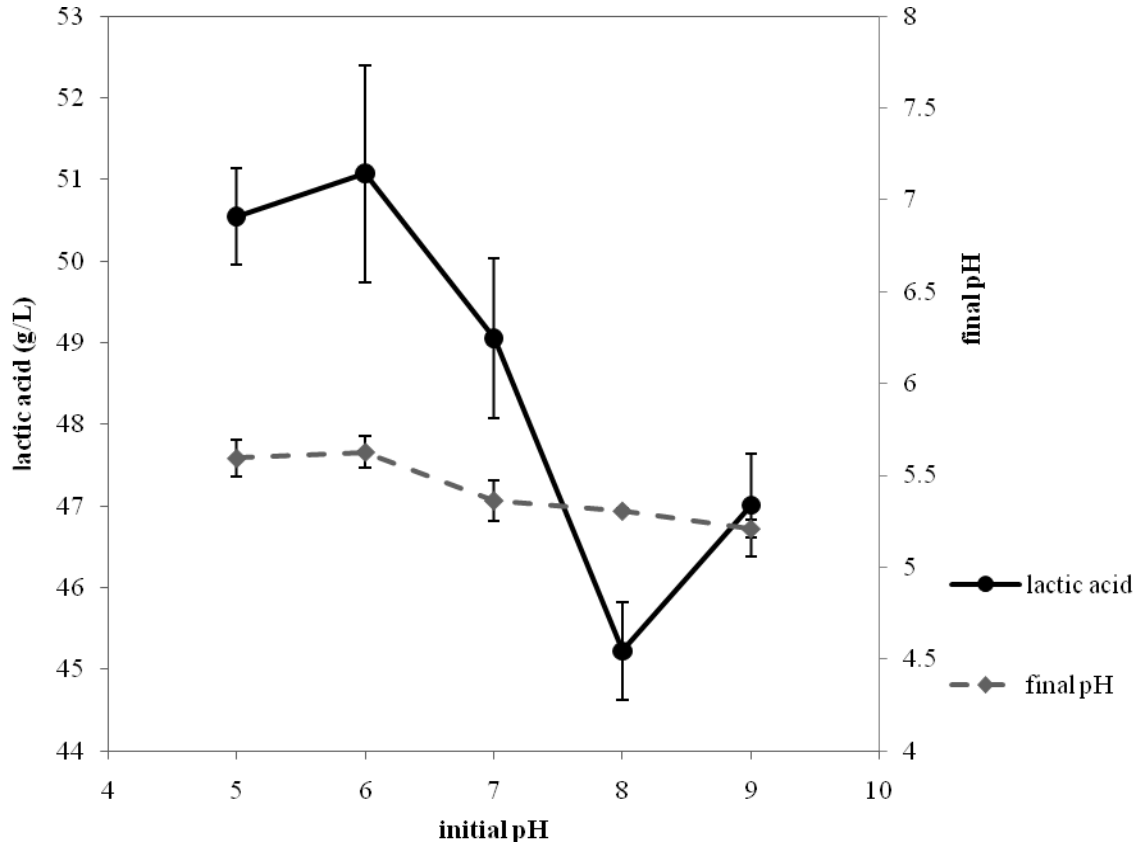


圖 4-4 起始 pH 值生產乳酸的影響

培養條件：

發酵培養基：培養 24 小時添加 2 g 碳酸鈣調控 pH 值、

轉速 150 rpm、溫度 30°C、培養時間 72 小時

4.5 批次搖瓶發酵實驗

發酵 78 小時，觀察菌絲體粒徑約 3 mm 的菌絲球，如圖 4-5 所示。由實驗結果圖 4-6 來看，當發酵時間逐漸增加至 36 小時，葡萄糖濃度迅速累積至約 43.55 g/L，而此時的乳酸濃度約為 13.34 g/L，隨著發酵時間繼續增加至 48 小時，葡萄糖濃度快速的下降至零，而乳酸濃度則增加至約 52 g/L 的一個穩定濃度，結果顯示了，在以蕃薯粉作為乳酸發酵基質時，利用 SSF 生產乳酸，前 36 小時內，澱粉水解速率可能遠大於乳酸發酵速率，導致葡萄糖累積於發酵液中，但隨著培養時間的增加，乳酸代謝過程中所需要的酵素活性逐漸增加，導致葡萄糖濃度迅速下降。

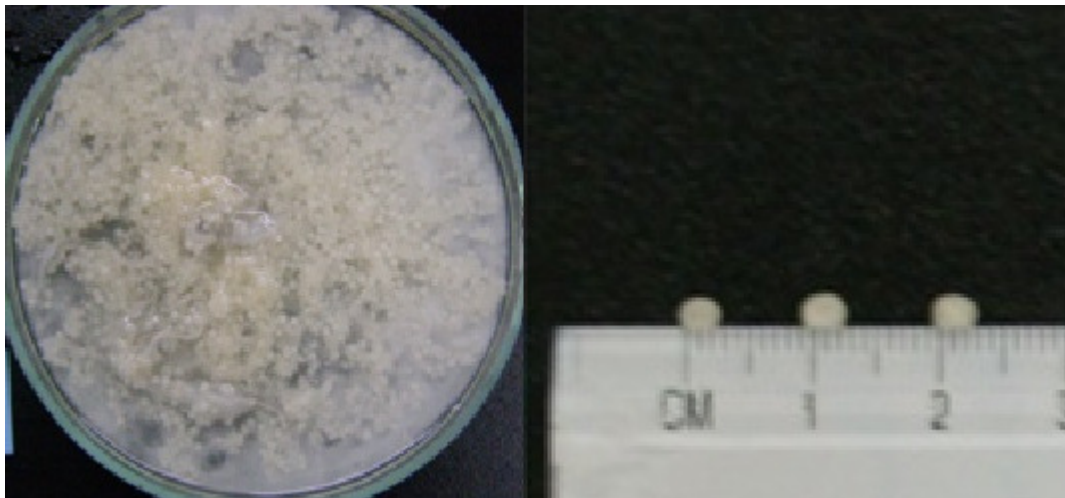


圖 4-5 菌絲型態

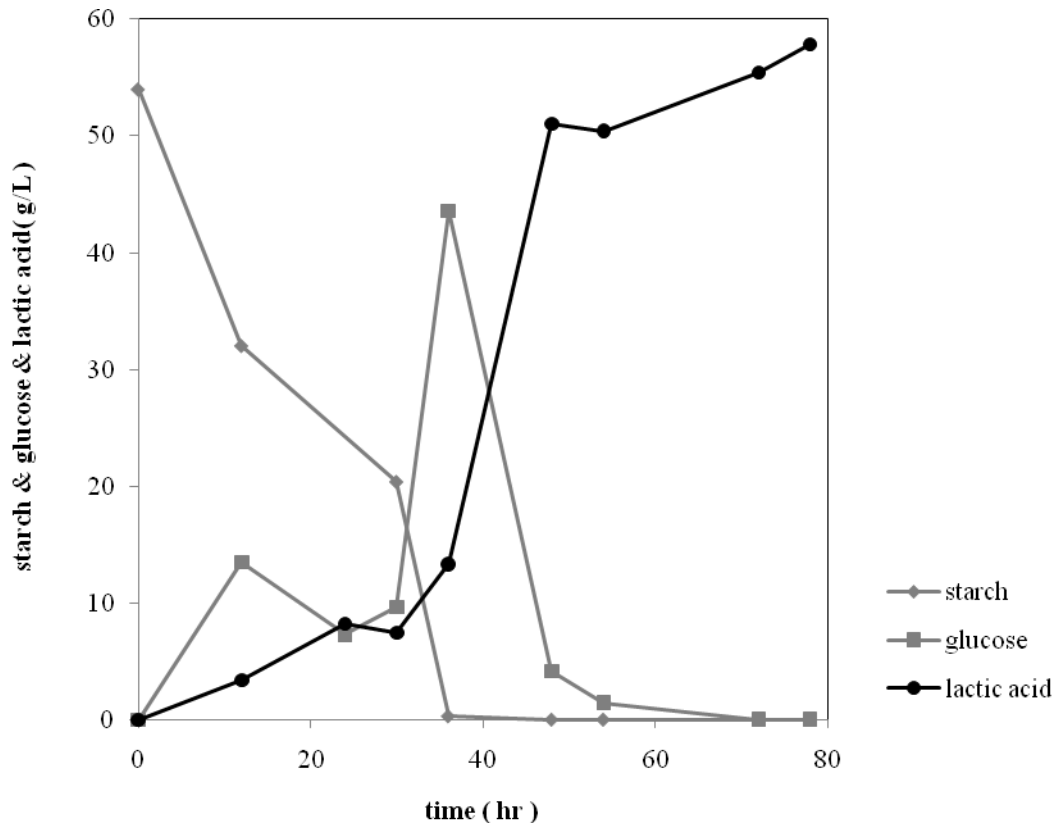


圖 4-6 批次搖瓶實驗

培養條件：

發酵培養基：起始 pH 6.0，培養 24 小時添加 2 g 碳酸鈣調控 pH 值、

轉速 150 rpm、溫度 30°C、培養時間 78 小時

4.6 不同絮凝劑對乳酸產量的影響

在發酵培養 12 小時後，添加在搖瓶濃度 0.24 g/L 的 PEG 6000、 γ -PGA (food grade)、 γ -PGA (hydrogel)，發酵培養至 72 小時，結果如圖 4-9，由於添加絮凝劑濃度太低使乳酸產量，相較於控制組 (52.48 g/L) 沒有明顯變化，菌絲型態也沒有太大的改變，而添加在搖瓶濃度 5.0 g/L 的 PEG6000、 γ -PGA (food grade)、 γ -PGA (hydrogel)，而乳酸濃度分別為 2.26 g/L、51.22 g/L、10.52 g/L，菌絲型態如圖 4-7，由於 5.0 g/L PEG6000，造成菌體毒化作用，菌體生長不佳，抑制菌體利用澱粉代謝發酵產乳酸，而 5.0 g/L γ -PGA (food grade) 則乳酸產量沒與控制組比較沒有太大的差別，但在絮凝劑的作用機制下，菌絲型態與控制組比較，如圖 4-8，控制組的菌絲體為緊密顆粒狀的菌絲球，菌絲體粒徑約 3 mm，而添加 5.0 g/L γ -PGA (food grade)，整體菌絲體形態為鬆散且顆粒小的團絮狀，菌絲顆粒的粒徑約 1 mm，另一個添加 5.0 g/L γ -PGA (hydrogel)，添加架橋過的 γ -PGA 在培養基內， γ -PGA 的氫鍵與培養基有鍵結的作用，使培養基環境的黏度提升，因此菌絲體利用培養基的質傳效果降低許多，造成最後菌體利用澱粉產乳酸的效率明顯低於控制組，因此選擇 γ -PGA (food grade) 做下個搖瓶實驗的探討。

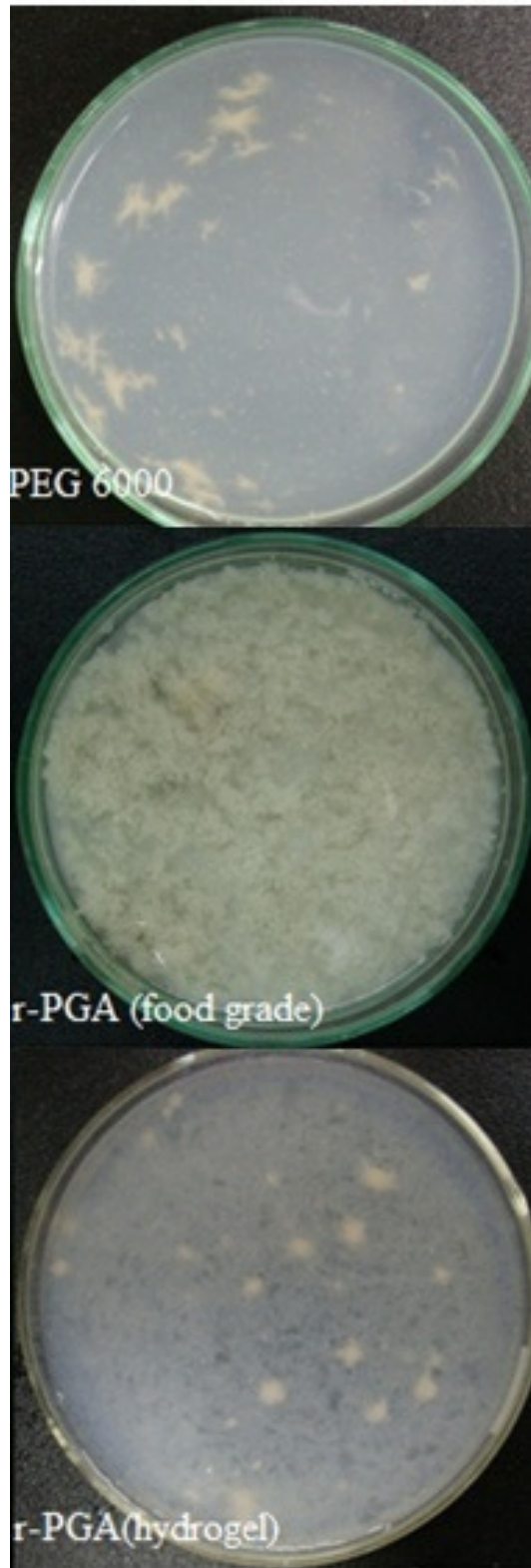


圖 4-7 添加絮凝劑 5.0 g/L 的菌絲型態

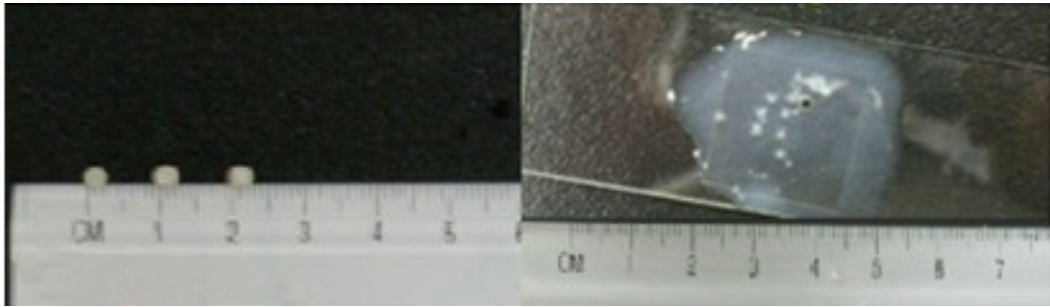


圖 4-8 控制組與添加 γ -PGA (hydrogel) 的菌絲型態

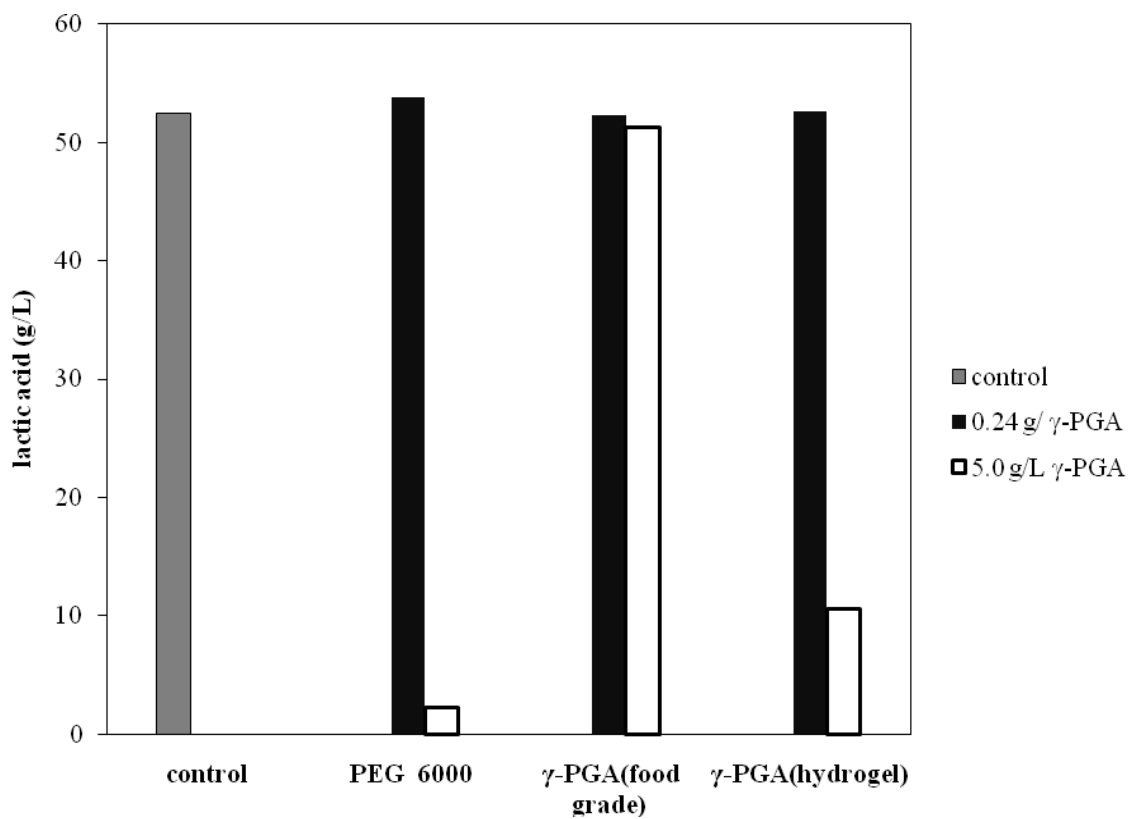


圖 4-9 不同絮凝劑對生成乳酸的影響

培養條件：

發酵培養基：起始 pH 6.0、培養 24 小時添加 2 g 碳酸鈣調控 pH 值、

轉速 150 rpm、溫度 30°C、培養時間 72 小時

4.7 絮凝劑 γ -PGA 添加濃度對乳酸產量的影響

探討添加絮凝劑 γ -PGA 至發酵培養基，對乳酸產量的影響，圖 4-10 為培養 0 小時，添加 1 g/L、5 g/L、10 g/L γ -PGA，培養基澱粉含量最高 (54.0 g/L)，培養基黏度高的環境下，接種的菌絲體與絮凝劑無有效的作用，所以添加 1 g/L γ -PGA 的結果與控制組比較，在培養至 68 小時的乳酸產量約 50 g/L 沒有太大的改變，而 5 g/L、10 g/L γ -PGA，則對乳酸生成有抑制作用，最後乳酸濃度約 37 g/L。

圖 4-11，則為發酵培養 16 小時，添加 γ -PGA，在發酵培養 40 小時，添加 1 g/L γ -PGA 乳酸產量為 52.83 g/L，生產速率為 1.32 g/L/h，此時，控制組乳酸濃度及生產速率分別為 29.62 g/L 與 0.74 g/L/h，相對於控制組，在前個實驗結果圖 4-7，由於菌絲體為顆粒小且鬆散的團狀 (1 mm)，在營養傳遞來說，質傳效率優於控制組的菌絲球 (3 mm)，因此，發酵培養 40 小時，添加 1 g/L、5 g/L、10 g/L γ -PGA，乳酸產量可累積達約 50 g/L，相對於控制組，則在培養 48 小時後，乳酸產量約 50 g/L，證明在搖瓶培養 16 小時後，添加 1 g/L γ -PGA 有提升生產速率達 1.32 g/L/h，未添加此濃絮凝劑的培養基生產速率為 1.06 g/L/h。

圖 4-12 則為發酵培養 26 小時，添加 1 g/L、5 g/L、10 g/L γ -PGA，48 小時乳酸累積量達平緩 (約 50 g/L)。整體實驗結果，以發酵培養 16 小時，添加 1 g/L γ -PGA(food grade)效果最好，可加速乳酸的生產速率 (1.32 g/L/h)。

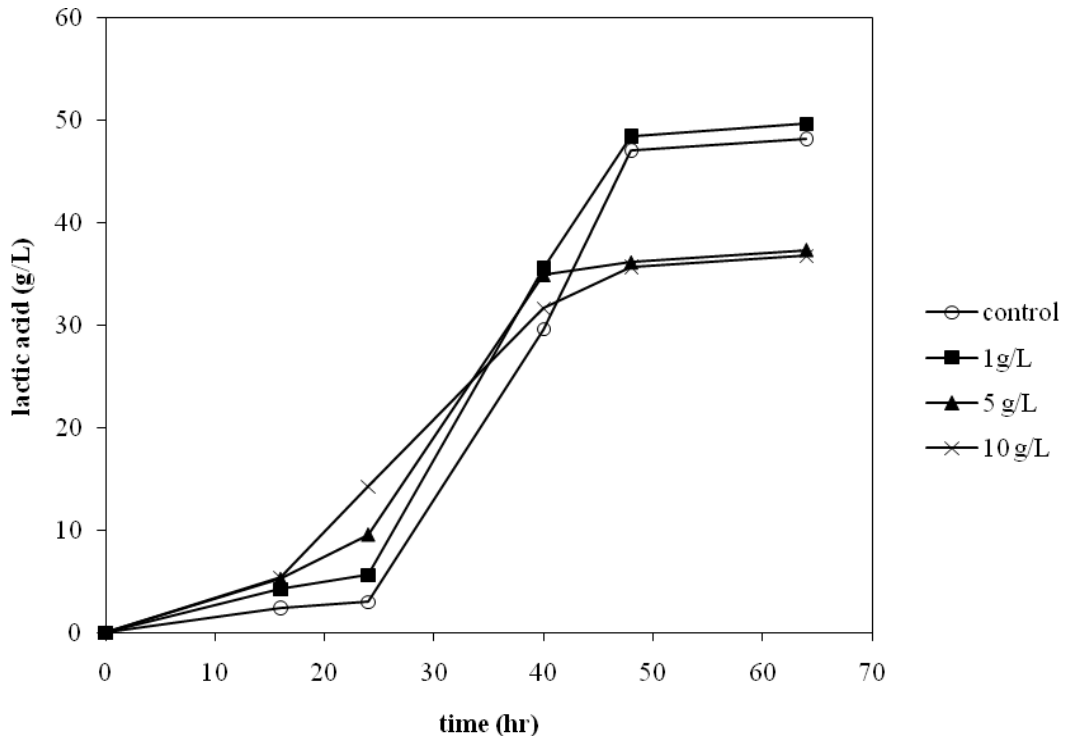


圖 4-10 0 小時添加不同濃度 γ -PGA (food grade) 對乳酸生成的影響

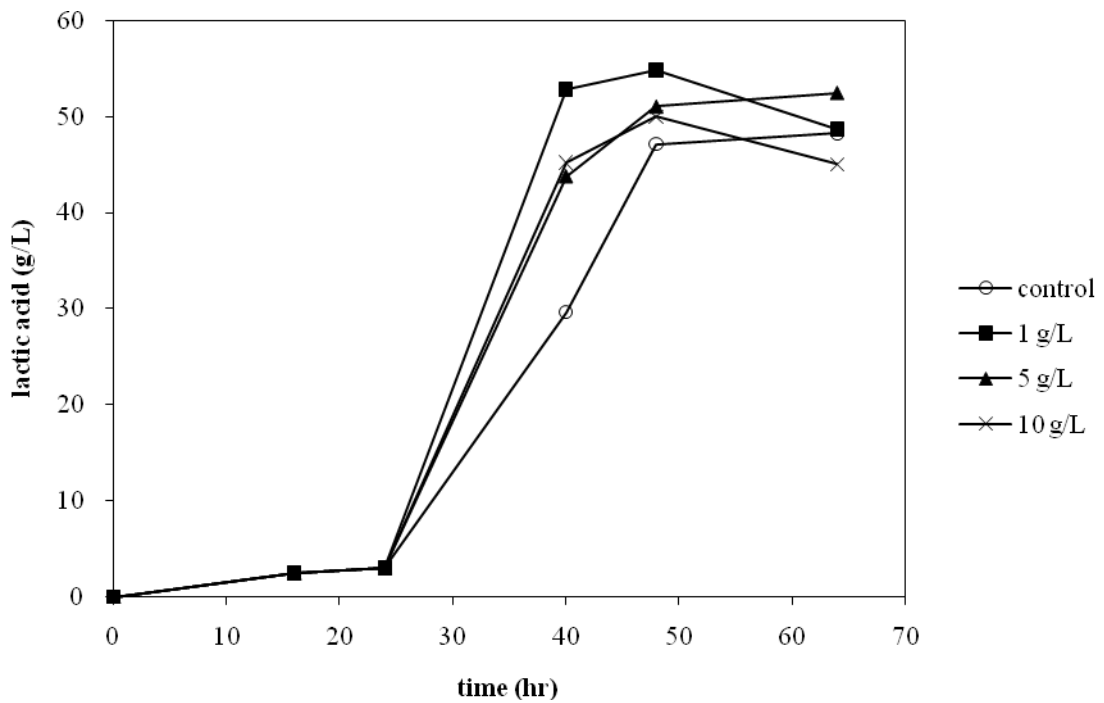


圖 4-11 16 小時添加不同濃度 γ -PGA (food grade) 對乳酸生成的影響

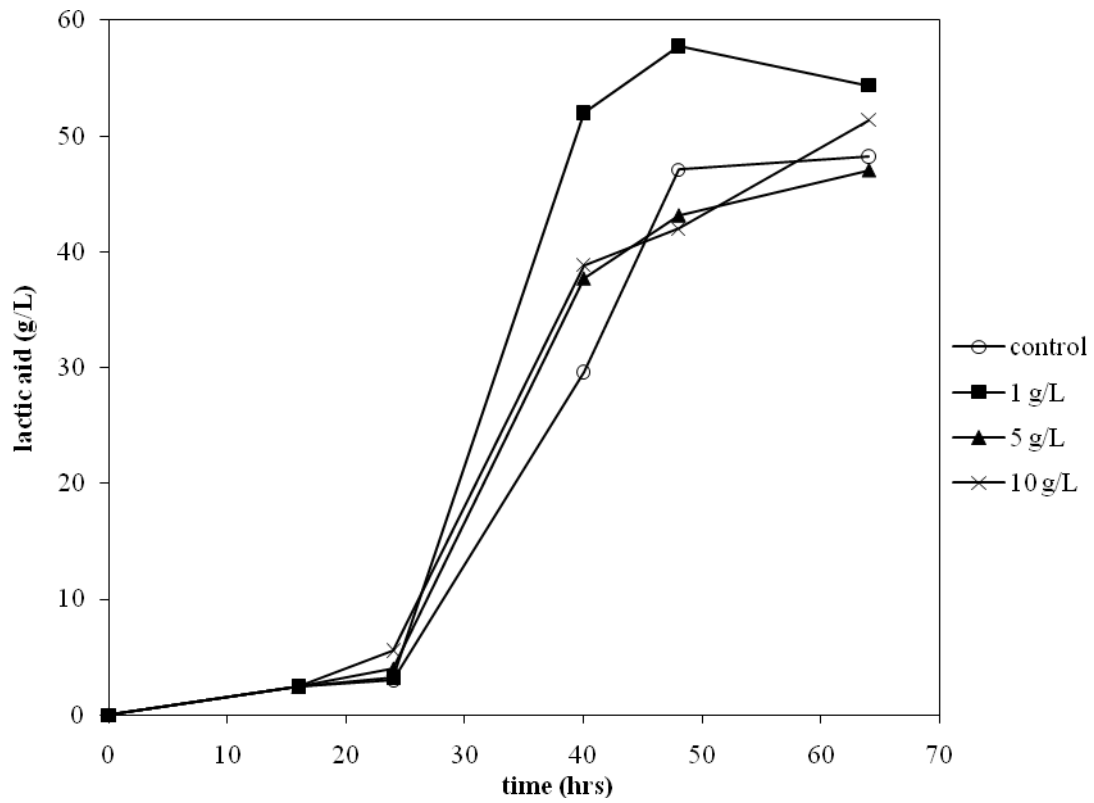


圖 4-12 26 小時添加不同濃度 γ -PGA (food grade) 對乳酸生成的影響

培養條件：

發酵培養基：起始 pH 6.0、培養 24 小時添加 2 g 碳酸鈣調控 pH 值、

轉速 150 rpm、溫度 30°C、培養時間 68 小時

4.8 小型搖瓶重覆批次實驗對乳酸產量的影響

實驗結果圖 4-13 顯示在第一次批次，發酵培養 48 小時，此時以蕃薯粉為基質的碳源已被菌體經代謝利用完，而乳酸發酵累積達到約 52 g/L，將菌體取出重新加入新的培養液，重複批次高達十三次，由實驗結果圖 4-6 顯示每次批次發酵培養 36 小時，地瓜粉皆已被菌體經代謝利用完，且乳酸每次回收濃度皆可達約 40 g/L 以上，有效地縮短乳酸發酵時間，所以進一步分析在此重複批次發酵實驗中，其澱粉水解酵素與澱粉糖化酵素活性的變化情形，進而對地瓜粉發酵生成乳酸的影響。

搖瓶進行重複批次發酵實驗，由圖 4-13 顯示第一次批次，發酵培養 48 小時，乳酸發酵累積達到約 52 g/L，此時測得澱粉酵素、澱粉糖化酵素活性單位分別為 1.1 U、1.4U，再進行多次批次發酵實驗，顯示發酵培養 24 小時，兩者酵素活性單位已高於第一次批次發酵培養的酵素活性單位，由此顯示大部分菌絲體並未處於衰老期，且圖 4-14 菌體利用蕃薯粉為碳源發酵產乳酸的時間較於第一次批次縮短至 24 小時，係由在第一次批次發酵產生的球狀菌絲體，已啟動菌絲表面活性部位的機制，所以將此菌絲體接入新的培養液，能加速此兩者酵素再活性部位，將基質催化代謝的能力，進而縮短發酵乳酸所需的時間，而加速乳酸生成的速率。

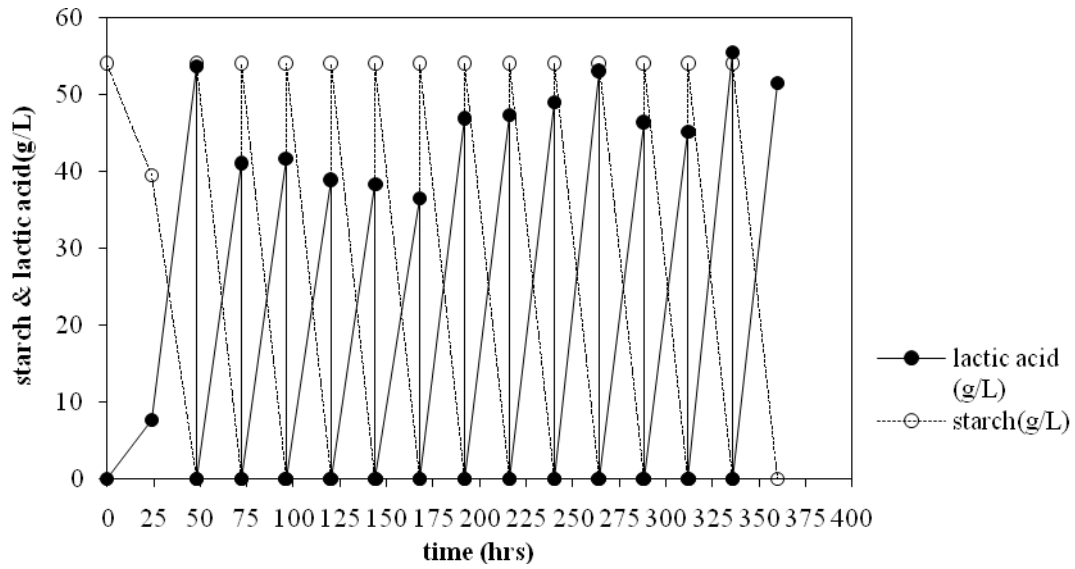


圖 4-13 批次實驗

培養條件：

發酵培養基：起始 pH 6.0、培養 24 小時添加 2 g 碳酸鈣調控 pH 值、

轉速 150 rpm、溫度 30°C、培養時間 374 小時

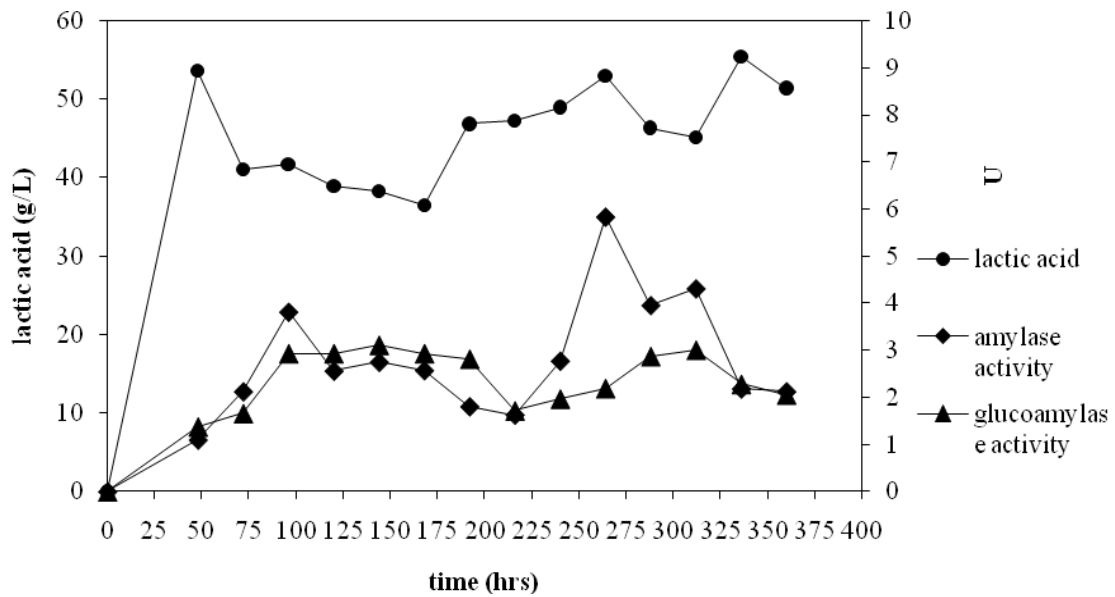


圖 4-14 批次實驗 amylase 與 glucoamylase 酵素活性

Amylase 活性單位
$$U = \frac{\text{blank} - \text{sample}}{\text{blank} \times 10\%}$$

Glucoamylase 活性單位
$$U = (\mu\text{mole}/(\text{ml} \cdot \text{min}))$$

4.9 批次發酵槽實驗

實驗結果圖 4-16，相較於搖瓶的批次實驗 (4.5 節)，在傳統攪拌式發酵槽，發酵培養 24 小時，測得葡萄糖濃度累積量最高為 14.82 g/L，濃度遠小於搖瓶實驗 36 小時所測得的 43.55 g/L，顯示利用同步水解糖化與發酵方法生產乳酸，利用攪拌葉片帶動培養基混合效果，相對比搖瓶混合效果佳，所以乳酸發酵速率高於搖瓶，才不至於葡萄糖濃度累積過高。觀察菌絲型態，不同於批次搖瓶實驗 (4.5 節)，在發酵槽培養 24 小時取樣，如圖 4-15，為菌絲體呈現菌絲狀，菌絲狀的主要缺點是發酵液的黏度提升，且部分菌絲體纏繞在攪拌葉片上，造成攪拌效果不佳，且不利於做重複批次的實驗及後段步驟的清洗，發酵 48 小時，乳酸濃度為 39.43g/L，產率 65.72%，生產速率 0.82 g/L/h。

因此，為改良菌絲狀的缺點，在 4.10~4.12 節，實驗探討不同菌絲型態改變，由菌絲狀可能改變為菌絲球及棉絮團狀，對乳酸發酵的影響，由於文獻指出，影響菌絲球形成的因子包含接菌濃度、攪拌強度與培養機成分，接菌濃度探討上，接菌量 (種類、數量)一般被認為是菌絲球形成的最大影響因素，因此在 4.10 節探討不同型態的接菌的影響；而培養基方面，被探討影響菌絲球的成分很多，包含碳氮源 (碳氮比)、無機鹽類與中和劑種類等 (楊，2001)，由於培養基碳氮源與無機鹽類成分在放大時並無改變，但在搖瓶培養時菌絲型態為小顆粒的菌絲球，因此進一步探討中和劑種類對形成菌絲球的影響，與此實驗利用 3 N NaOH 調控 pH 值比較，所以在 4.11 節探討不同中和劑調控 pH 值對菌絲體形態及乳酸

生成的影響；另外在 4.12 節則改變另一種可能的型態為棉絮狀，比較三種型態

對乳酸發酵的影響。

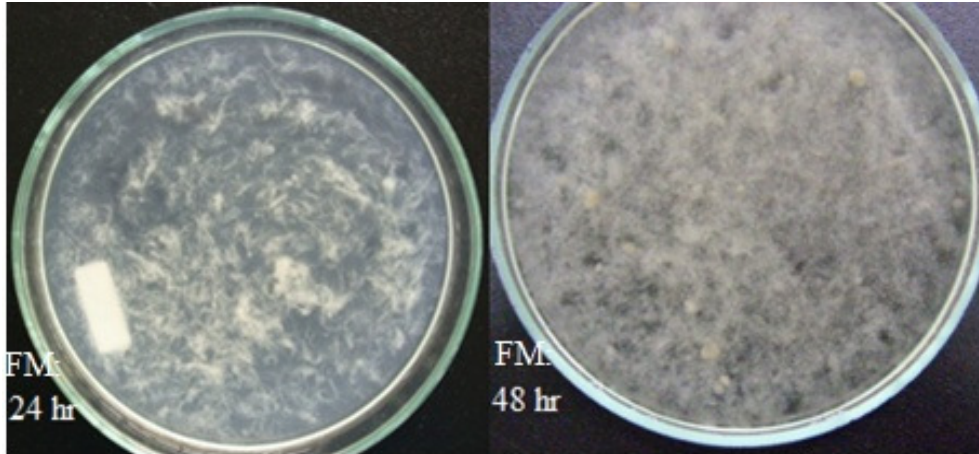


圖 4-15 發酵槽批次實驗菌絲型態

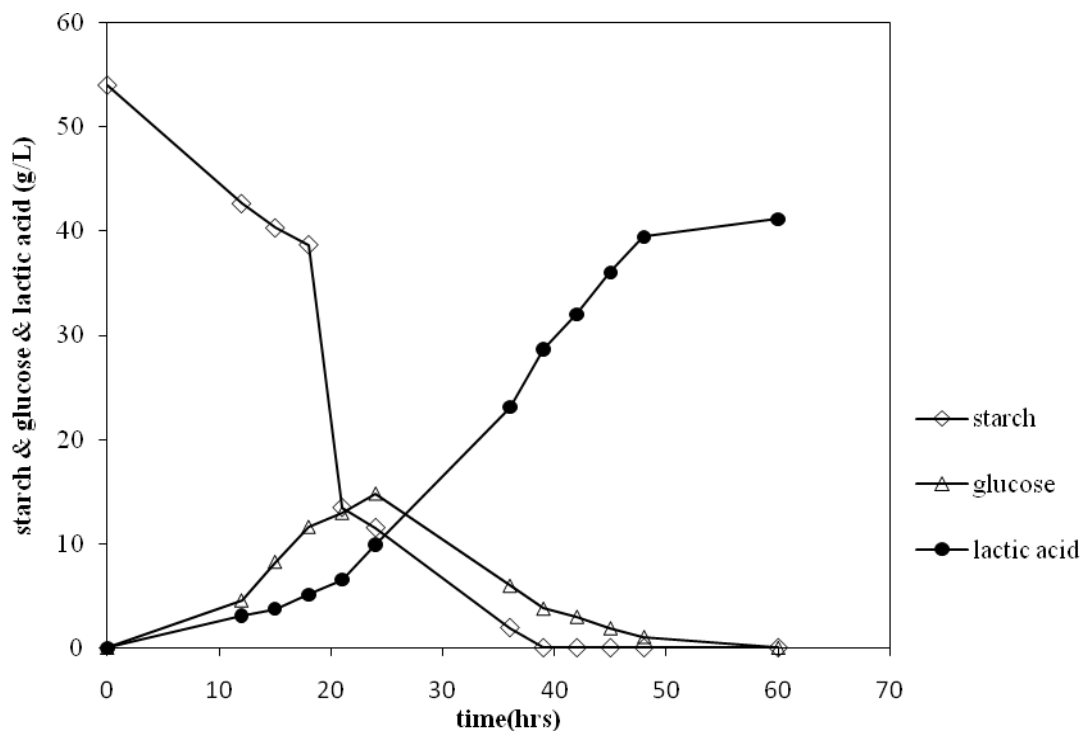


圖 4-16 發酵槽批次實驗

培養條件：

發酵培養基：pH 5.0、轉速 200 rpm、溫度 30°C、培養時間 60 小時

4.10 種瓶不同菌絲型態的探討

與 4.9 節比較，接種菌絲型態的改變，控制組種瓶型態為菌絲狀接入發酵槽，實驗組以菌絲球型態接入發酵槽，發酵培養後觀察菌絲型態 (圖 4.17)，24 小時菌絲球被攪拌葉片的機械力作用，由原本接入的緊密菌絲球，在發酵時間增長，型態成為鬆散且菌絲邊緣還有突出菌絲的菌絲球，而最後 48 小時後，菌絲型態已不同於種瓶接入的菌絲球型態，所以在發酵槽內並未能形成顆粒明顯的球狀，實驗結果圖 4-18，控制組與實驗組在發酵前期 28 小時，乳酸產量並無差別 (濃度約 15 g/L)，在 48 小時，乳酸濃度為 44.48 g/L，產率 74.12%，生產速率為 0.93 g/L/h，控制組生產速率為 0.82 g/L/h，觀察在發酵後期，控制組種瓶為菌絲體接入發酵培養基，由於會殘繞在 DO 電極上，所測得 DO 值一直維持在 0%，而實驗組的 DO 值則維持一定的數值，顯示利用菌絲球接種對後期乳酸生成速率有明顯加快。



圖 4-17 種瓶菌絲球接入發酵槽

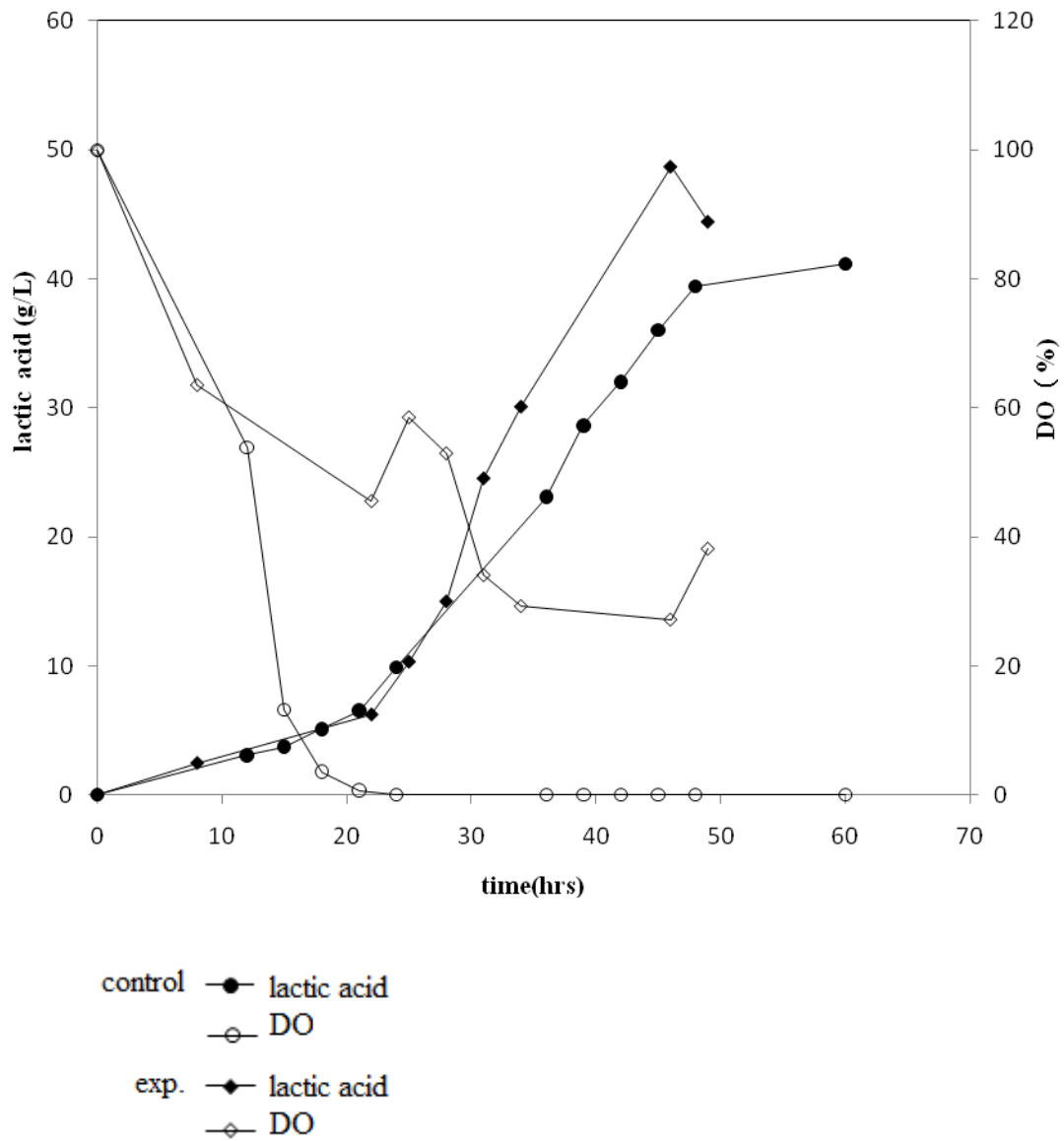


圖 4-18 種瓶不同型態接入發酵槽的影響

培養條件:

發酵培養基： pH 5.0、 轉速 200 rpm、溫度 30°C、培養時間 60 小時

4.11 探討不同中和劑調控 pH 值

在起始 pH 6.0 的條件下，整個發酵產酸過程，利用中和劑調控 pH 5.0，由圖 4-16，菌絲型態因使用不同中和劑而有所變化，以 3 N NaOH 調控 pH，菌絲體大部分為菌絲狀，相較於其他三種中和劑所形成型態為菌絲球，由於菌絲體為菌絲狀，相較為菌絲球型態來看，菌絲狀會使發酵槽整體黏度增加，因此營養傳遞速率則會降低，進一步影響乳酸生成速率，所以比較同樣在發酵培養 36 小時，不同中和劑包括 3 N NaOH、50 % (w/v)CaCO₃、2% (w/v) NH₄CO₃ +10 % (w/v) NH₃、10% (w/v) NaHCO₃，生成速率分別為 0.64 g/L/h、1.15 g/L/h、0.82 g/L/h、0.97 g/L/h。利用 2% (w/v) NH₄CO₃+10 % (w/v) NH₃ 調控 pH 值，同時可持續提供菌體氮源的利用，氮源 (NH₄⁺)濃度維持在 0.28 g/L (圖 4-20)，但由於氨溶液對菌體有毒化作用，菌體利用蕃薯粉代謝能力減緩，所以降低發酵生成乳酸濃度 (30.74 g/L)，為四種中和劑乳酸產量最低，如圖 4-21，以碳酸鈣調控 pH 值，發酵週期為 34.5 小時，乳酸產量以達平緩趨勢，此點乳酸濃度為 41.05 g/L，產率 68.42%，生產速率 1.19 g/L/h，比較四種中和劑，以碳酸鈣調控 pH 值，最後可獲最高的乳酸濃度 (42.51 g/L)，因此，4.13 節發酵槽饋料實驗選擇碳酸鈣調控為中和劑。

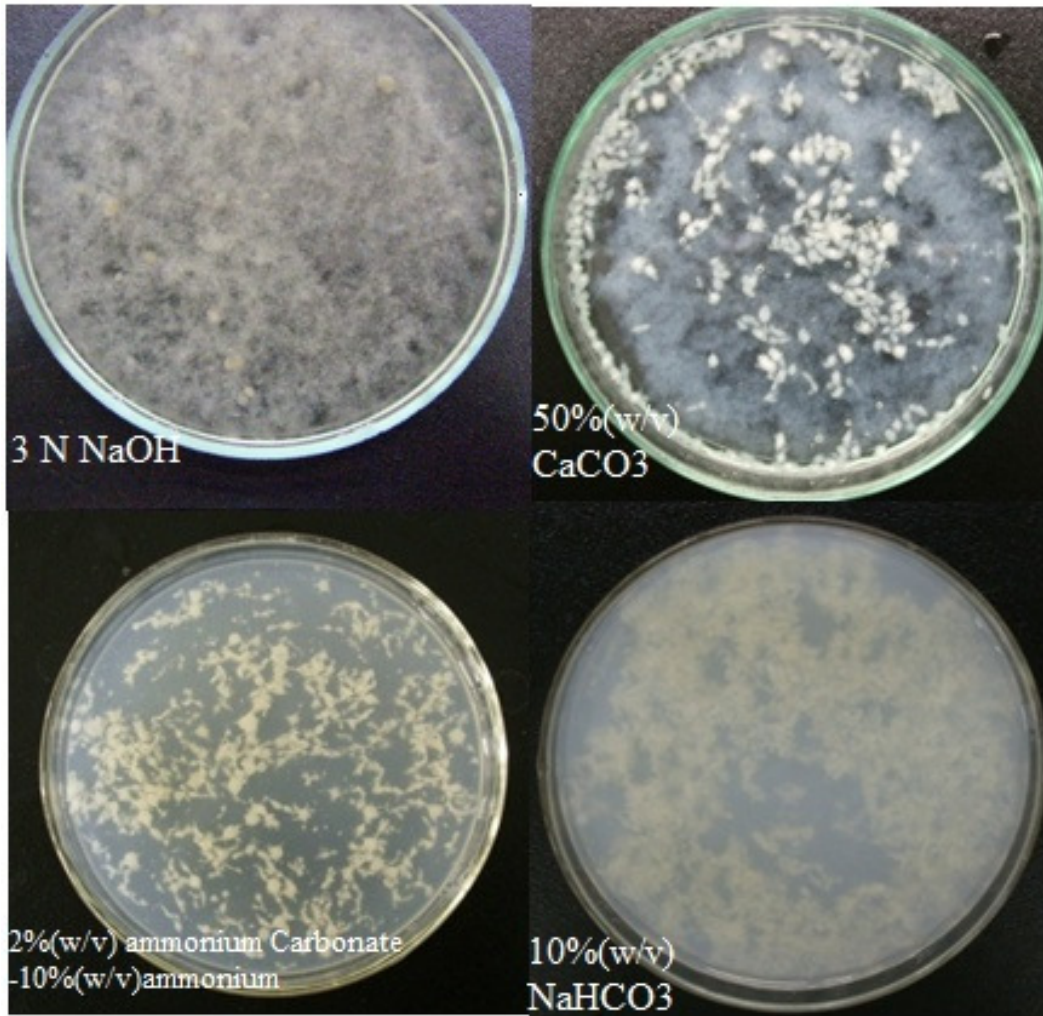


圖 4-19 不同中和劑調控 pH 值的菌絲型態

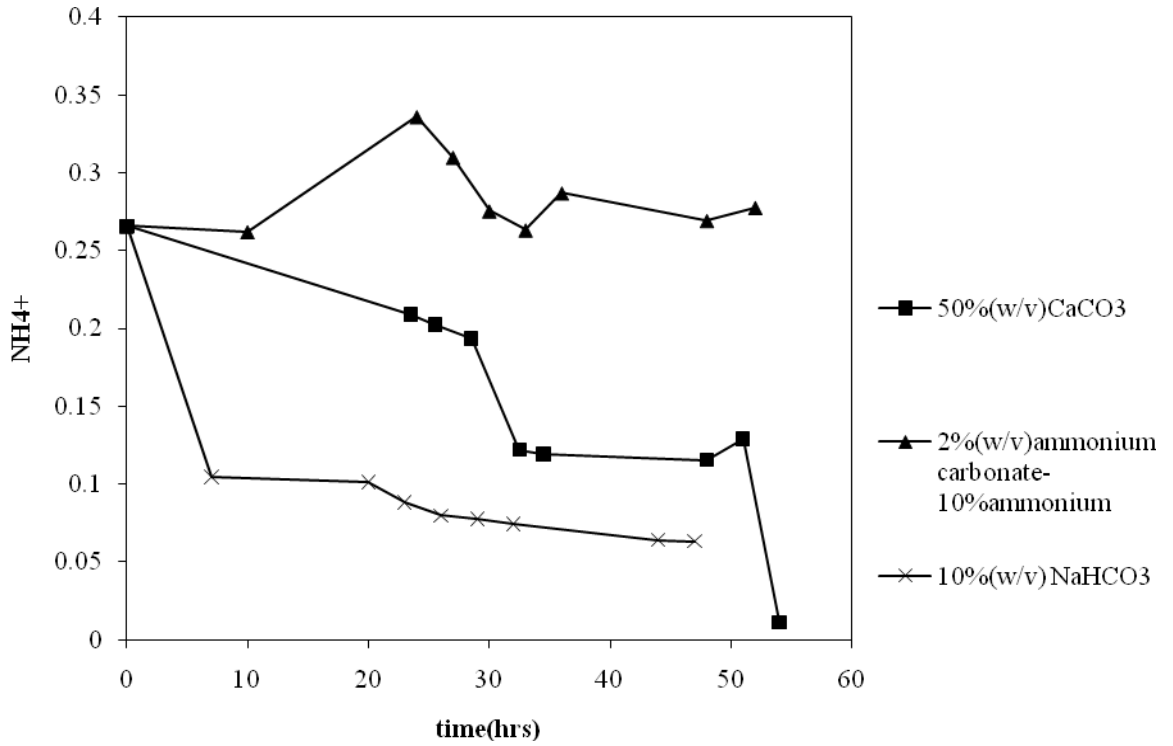


圖 4-20 發酵槽銨離子濃度的變化

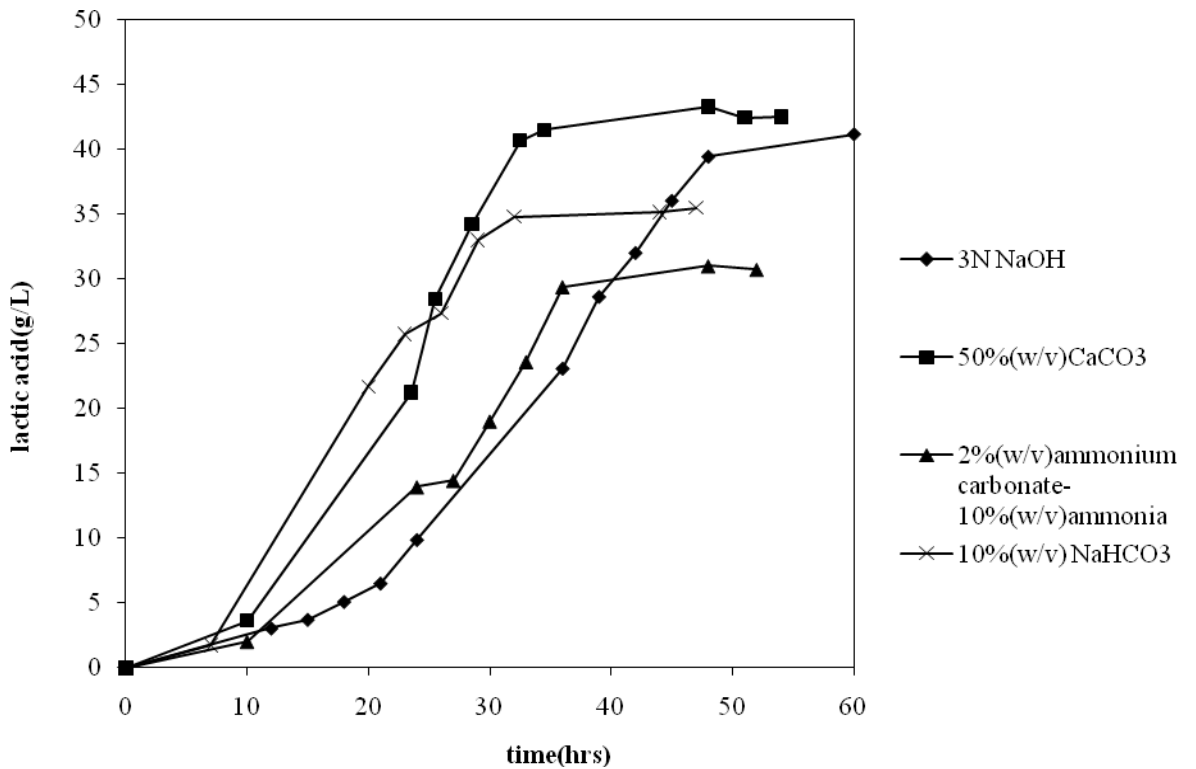


圖 4-21 不同中和劑對生成乳酸的影響

4.12 添加絮凝劑 γ -PGA (food grade) 的探討

利用 3 N NaOH 調控 pH 值，未添加絮凝劑，菌絲體為菌絲狀，發酵培養 16 小時後，在發酵槽內添加 5.0 g/L γ -PGA (food grade)，發酵培養 48 小時後，為顆粒較小且鬆散菌絲球，顆粒與顆粒間聚集成小塊的棉絮狀，有別於 4.10 與 4.11 節菌絲型態為菌絲狀及菌絲球；而利用碳酸鈣調控 pH 值，發酵培養 16 小時後，在發酵槽內添加 5.0 g/L γ -PGA (food grade)，發酵培養 48 小時後，菌絲型態如圖 4-22，同樣可形成小團塊的棉絮。

比較兩種不同中和劑，實驗結果圖 4-24 與 4-25，未添加絮凝劑發酵培養 16 小時，分別利用 3 N NaOH 及 50% (w/v) 碳酸鈣調控 pH 值，殘澱粉含量分別約為 40 g/L 與 10 g/L，利用 NaOH 調控 pH 值的水解速率比較差，而兩者的乳酸濃度分別為 39.19 g/L 與 39.45 g/L，利用 γ -PGA (food grade) 對於發酵生產乳酸濃度的提昇則沒有明顯變化，而對菌絲型態的改變有所幫助。

與同樣為碳酸鈣調控 pH 值的實驗 (4.11 節) 比較，未添加 5.0 g/L γ -PGA 生產乳酸，獲得乳酸濃度為 41.05 g/L，產率 68.42%，而添加 5.0 g/L γ -PGA 獲得乳酸濃度為 39.70 g/L，產率 66.12%，菌絲型態由圖 4-16，在攪拌式發酵槽中添加絮凝劑改變如圖 4-19，對於乳酸產量的影響來說，沒有太大的幫助。

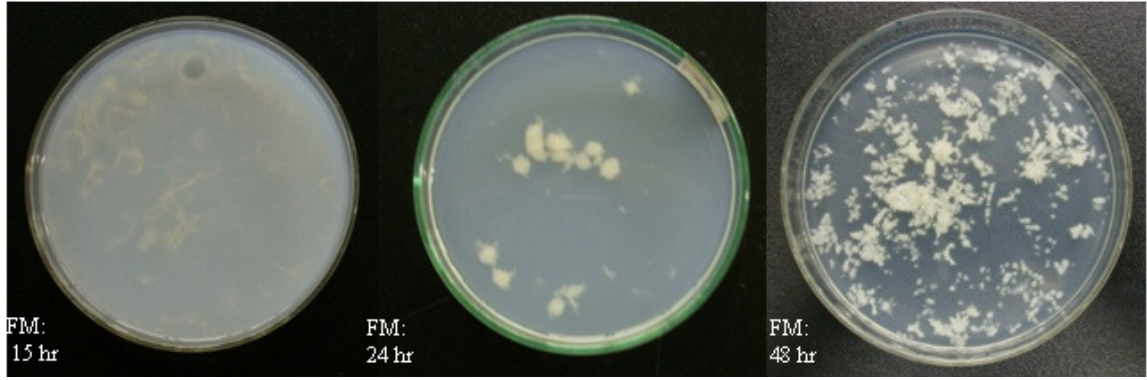


圖 4-22 菌絲型態 (3 N NaOH 調控 pH 值)



圖 4-23 菌絲型態 (50%(w/v)碳酸鈣調控 pH 值)

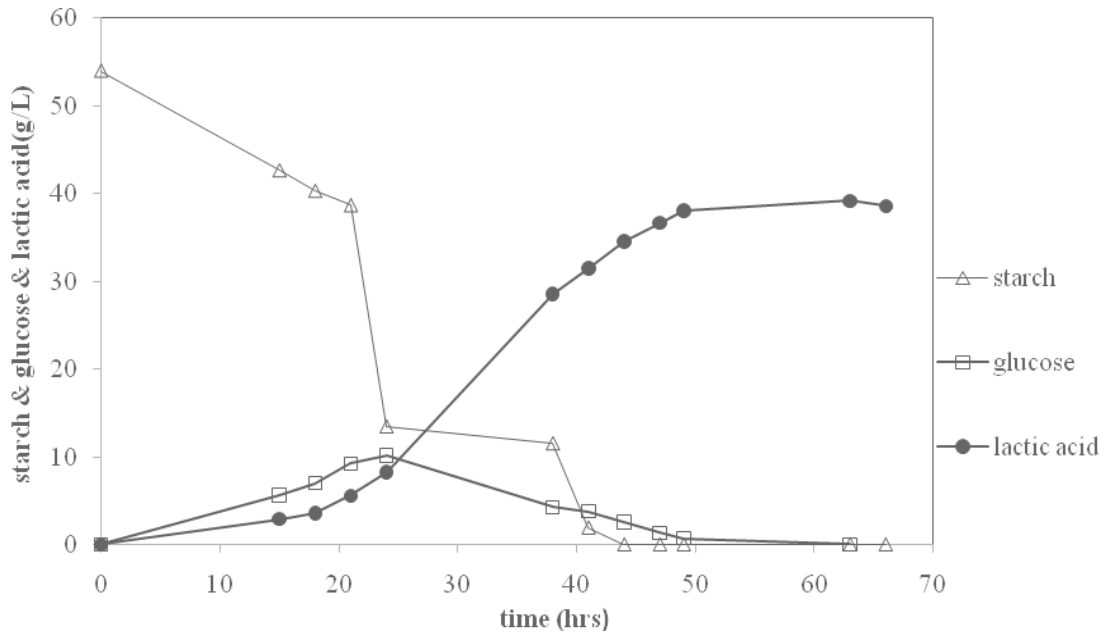


圖 4-24 添加絮凝劑 γ -PGA (5.0 g/L)對乳酸產量的影響

(3 N NaOH 調控 pH 值)

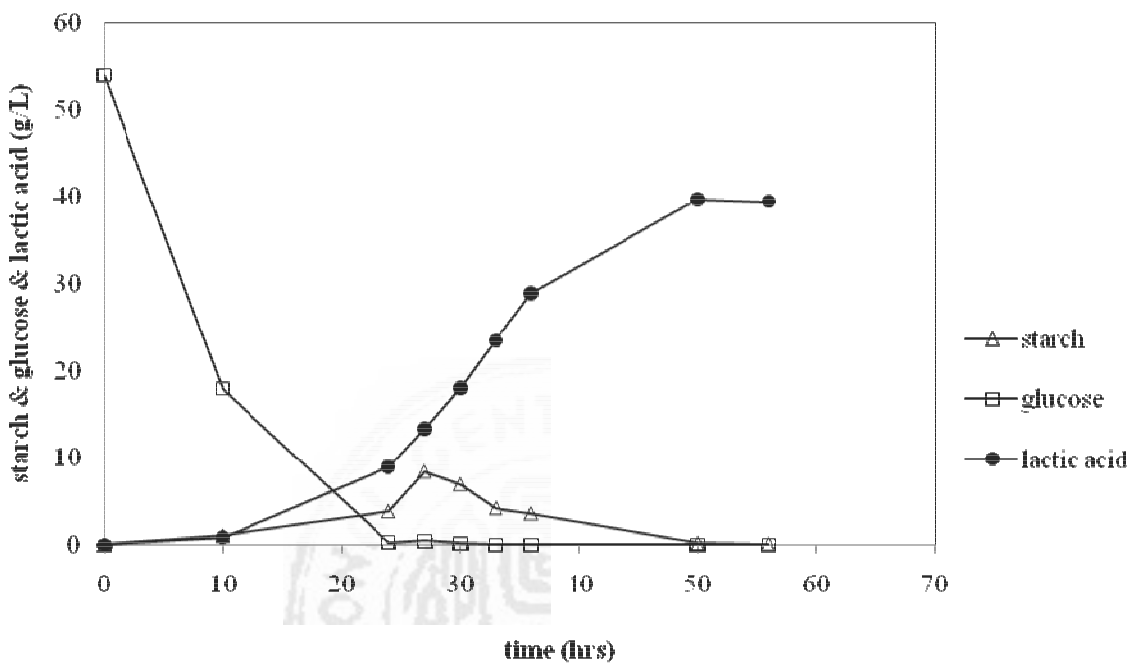


圖 4-25 添加絮凝劑 γ -PGA (5.0 g/L)對乳酸產量的影響

(50%(w/v)碳酸鈣調控 pH 值)

4.13 饋料批次實驗

在 4.9 節批次發酵槽實驗，第 34 小時澱粉及葡萄糖濃度幾乎被菌體利用完，因此選擇此時間進行添加碳源實驗，比較以 180 g 未糊化的蕃薯粉 (饋料體積 1 L)，和 180 g 已糊化的蕃薯粉 (饋料體積 2 L，在發酵期已達 34 小時後，進行第一次 1000 ml 饋料進入發酵槽內，且在第 58 小時後進入第二次 1000 ml 進行第二次饋料)對發酵產乳酸的影響，未糊化蕃薯粉溶液，因滅菌過後的蕃薯粉顆粒與無菌水混合，而已糊化的蕃薯粉是指澱粉含量在水中加熱，澱粉粒吸水膨脹，如果繼續加熱至 60°C~80°C 時，澱粉粒破壞而形成半透明的膠體溶液，糊化後的澱粉，由於多糖分子吸水膨脹以及氫鍵斷裂，使之容易被 amylase 水解，易於菌體代謝消化，實驗結果如圖 4-26 所示，因此，由葡萄糖濃度來看，已糊化的蕃薯粉溶液，饋料發酵 1 小時後，測得葡萄糖濃度累積至 8.42 g/L，澱粉被澱粉酵素利用的速率快，而未糊化的蕃薯粉溶液，澱粉酵素不利於將澱粉轉換成葡萄糖，導致在發酵後期，第 73 小時，乳酸濃度才有所提升，而比較最後獲得乳酸產量，兩者添加不同型態的蕃薯粉溶液，乳酸濃度分別為 58.46 g/L 與 57.49 g/L，整個發酵週期的產率相近，約為 60%。

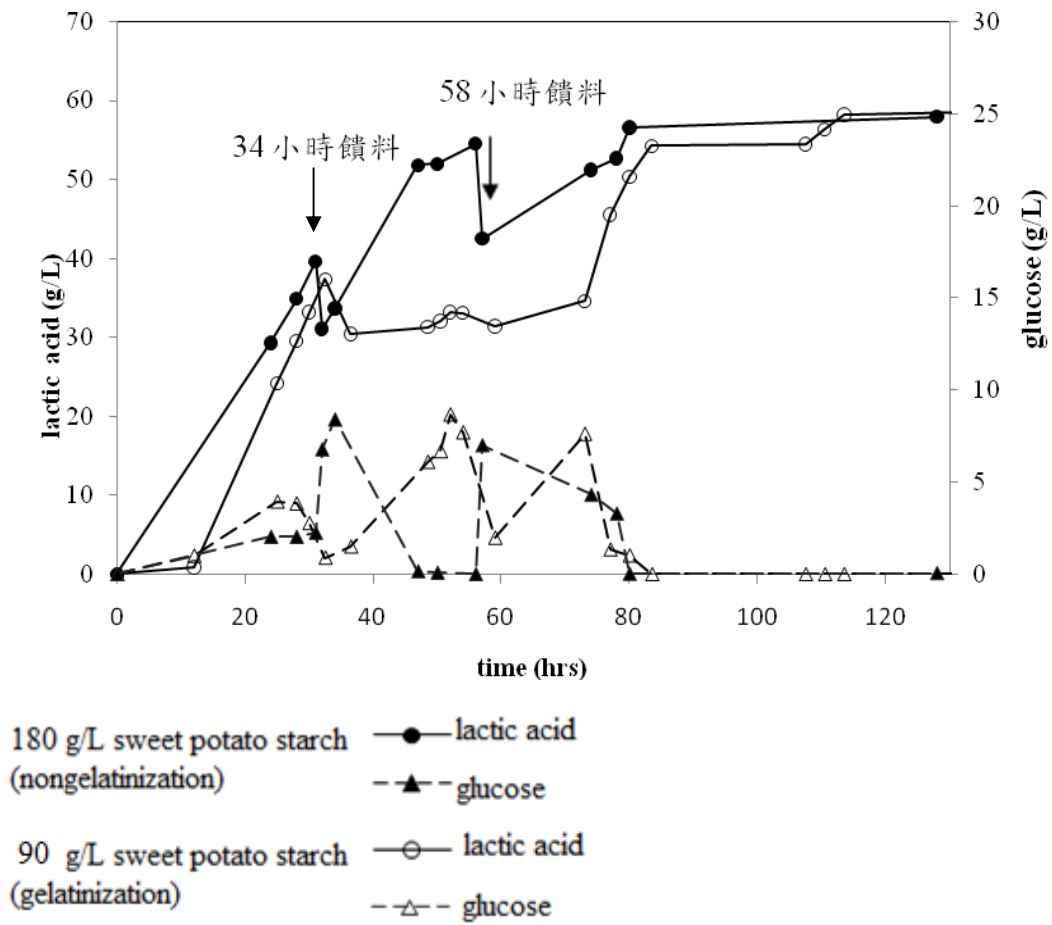


圖 4-26 饋料實驗對乳酸產量的影響

第五章 結果與未來展望

5-1 結論

1. 三角搖瓶實驗之培養基條件的探討，添加碳源濃度為 60 g/L 的玉米粉、在來米粉、低筋麵粉、太白粉、蕃薯粉、傳統豆渣，以碳源 60 g/L 蕃薯粉（氮源為 0.1 g/L(NH₄)₂SO₄+ 10 g/LYE)為適可獲得乳酸最佳乳酸濃度（41.47 g/L）。
2. 不同氮源種類對乳酸生成的探討，氮源包含無機氮源如 (NH₄)₂SO₄、NH₄NO₃，及有機氮源如 YE、Urea (CO(NH₂)₂)、Peptone、黃豆粉。價格較低廉 2 g/L NH₄NO₃（碳源為 60 g/L 蕃薯粉)為最佳的氮源種類，可獲得乳酸濃度 40.82 g/L。
3. 探討起始 pH 值為 5.0~9.0 對乳酸產量的影響，以起始 pH 6.0（碳源為 60 g/L 蕃薯粉，氮源為 2 g/L NH₄NO₃)可獲得乳酸產量最高（51.07 g/L），產率 85.11%，產率定義為 (乳酸濃度 (g/L)/起始蕃薯粉濃度 (g/L))×100%，生產速率 1.06 g/L/h。
4. 批次搖瓶實驗結果，當發酵時間逐漸增加至 36 小時，葡萄糖濃度迅速累積至約 43.55 g/L，而此時的乳酸濃度約為 13.34 g/L，隨著發酵時間繼續增加至 48 小時，葡萄糖濃度快速的下降至零，而乳酸濃度則增加至約 52 g/L 的一個穩定濃度，結果顯示，以蕃薯粉作為乳酸發酵基質時，利用 SSF 生產乳酸，前 36 小時內，澱粉水解速率可能遠大於乳酸發酵速率。
5. 發酵培養 12 小時後添加不同絮凝劑對生成乳酸的影響，絮凝劑添加濃度

分別為 5 g/L 的 PEG 6000、 γ -PGA (food grade)、 γ -PGA (hydrogel)，以添加絮凝劑 5 g/L γ -PGA (food grade) 可生成最佳乳酸濃度 51.22 g/L，所形成之菌絲球顆粒粒徑約為 1 mm，因此進一步探討不同濃度 γ -PGA (food grade) 對生成乳酸的影響。

6. 探討添加不同濃度 γ -PGA (1 g/L、5 g/L、10 g/L) 至發酵培養基，對乳酸產量的影響，以發酵培養 16 小時，添加 1 g/L γ -PGA (food grade) 效果最好，發酵培養 40 小時時乳酸的生產速率為 1.32 g/L/h，乳酸濃度為 52.83 g/L。

7. 進行重覆批次搖瓶實驗中，實驗所測得的 amylase 與 glucoamylase 酵素活性，皆可維持比原本發酵 48 小時所測得的 1.1 U 與 1.4 U 高，因此，進而減短批次發酵周期減短至 24 小時，重複批次達到十三批次，每次 FM 搖瓶體積為 50 ml (乳酸濃度約為 40 g/L~50 g/L)，回收總體積為 650 ml，經由純化與分離步驟可獲得乳酸 32.22 g。

8. 接種菌絲型態的改變，菌絲狀型態的 SM，可得乳酸濃度為 41.17 g/L，產率 68.62%，生產速率 0.68 g/L/h。而利用菌絲球的接種，發酵 48 小時，乳酸濃度為 44.48 g/L，生產速率 0.93 g/L/h。

9. 改變中和劑調控 pH 值對獲得 L-乳酸的影響，觀察中和劑對菌絲型態的影響上，中和劑為 3 N NaOH 所形成的菌絲型態為菌絲狀，而以 50 % (w/v) CaCO_3 、2% (w/v) NH_4CO_3 + 10 % (w/v) NH_3 、10% (w/v) NaHCO_3 調控 pH 值所形成的菌絲型態則為菌絲球，以 L-乳酸濃度來看，其中以 2% (w/v) NH_4CO_3 + 10 % (w/v) NH_3 調控 pH 值，乳酸產量最低 (30.74 g/L)，而以碳酸鈣調控 pH 值生產速率為

最佳，乳酸濃度為 41.05 g/L，產率 68.42%，生產速率 1.19 g/L/h。

10. 添加絮凝劑使菌絲型態為棉絮團的實驗，(在搖瓶實驗額外添加絮凝劑，添加 1 g/L γ -PGA(food grade)效果最好，發酵培養 40 小時時乳酸的生產速率為 1.32 g/L/h，乳酸濃度為 52.83 g/L)，相較於在發酵槽中添加絮凝劑的實驗結果，為發酵培養第 16 小時時添加 5.0 g/L γ -PGA，獲得 L-乳酸濃度為 39.70 g/L，產率 66.12%，生產速率 0.79 g/L/h。

11. 發酵槽饋料實驗之目的是提高乳酸濃度，饋料方式分別包括已糊化及未糊化的蕃薯粉溶液進行實驗，研究兩種不同添加型態的蕃薯粉對生成乳酸的影響，實驗結果以糊化後的澱粉，的確利於菌體代謝消化，但比較兩者最後 L-乳酸濃度為 58.46 g/L 與 57.49 g/L，產率為 60%，說明已糊化和未糊化蕃薯粉最終獲得 L-乳酸濃度沒有太大的影響。

5-2 展望

探討放大在 5-L 攪拌發酵槽中，不同的控制策略包含攪拌速度、通氣量，操作體積及對 *R. oryzae* 發酵生產 L-乳酸的影響，進一步研究重複批次發酵實驗，以增加可回收的乳酸克數。

參考文獻

<http://www.tmmfa.org.tw/%A5X%AA%A9%A5Z%AA%AB/magazine/%B2%C441%B4%C1/%BBE%A8%C5%BB%C4%E0%AD%AA%BA%B5o%AEi%BE%F7%B7%7C.htm>

賴宜涵 (2006)， “ 利用米根黴液態發酵生產L 型乳酸的最適化” ，大同大學生物工程研究所碩士論文。

刑榮慶 (2006)， “ 氮濃度對米根黴生產L 型乳酸的影響” ，大同大學生物工程研究所碩士論文。

楊芳鏘與揚明哲 (2001)， “ 菌絲狀真菌之深層培養技術” 化工期刊第九卷第二期，176-188。

Bai, D.M., M.Z. Jia, X.M. Zhao, R. Ban, F. Shen, X. Li and S. Xu. (2003), L(+)-lactic acid production by pellet-form *Rhizopus oryzae* R1021 in a stirred tank fermentor. Chem Eng Sci, 58: 785-791.

Bulut, S., M. Elibol, and D. Ozar. (2004), Effect of different carbon sources on L(+)-lactic acid production by *Rhizopus oryzae*. Biotechnol Eng, 21:33-37.

Datta, R., S.P. Tsai, P. Bonsignore, S.H. Moon, and J.R. Frank. (1995), Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives. FEMS microbial, rev. 16: 221-231.

- Drauz, K. and H. Waldmann. (2002), Enzyme Catalysis in Organic Synthesis. A Comprehensive Handbook Second, Completely Revised and Enlarged Edition, 655-656.
- Du, J.X., N.J. Cao, S.G. Chen and G.T. Tsao. (1998), Production of L-Lactic acid by *Rhizopus oryzae* in bubble column fermenter. Appl Biochem Biotechnol, 70-72, 323-330.
- Hang, Y.D. (1989) , Direct fermentation of corn to L (+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*. Biotechnol Letters, 11:229-300.
- Hesseltine, C.W., M. Smith, B. Bradle, and K.S. Djien. (1963), Investigations of tempeh, an Indonesian food. Dev. Ind Microbiol, 4:275-287.
- Jin, B., Li P.H. and P. Lant1. (2003), *Rhizopus arrhizus* – a producer for simultaneous saccharification and fermentation of starch waste materials to L(+)-lactic acid. Biotechnol Lett, 25: 1983–1987.
- Kandler. O. (1982), Gärungsmechanismen bei Milchsäurebakterien. Forum mikrobiol, 5:15.
- Keshavarz, T., R. Eglin, E. Walker, C. Bucke. G. Holt, A. T. Bull, and M.D. Lilly. (1990), The large-scale immobilization of *penicillium chrysogenum*: Batch and continuous operation in an air-lift reactor. Biotechnol Bioeng, 36:763-700.
- Kosakai, Y., Y.S. Park, and M. Okabe. (1997), Enhancement of L(+)-lactic acid

- production using mycelia flocs of *Rhizopus oryzae*. *Biotechnol Bioeng*, 55:461-470.
- Lee, S.W., T. Ebata, Y.C. Liu, and H. Tanaka. (1993), Co- immobilization of Three Strains of Microorganisms and Its Application in Ethanol Production from Raw Starch under Unsterile Conditions. *Fermentation Bioeng*, 75:36-42.
- Li P.H., B. Jin, P., Lant, J. Zhou. (2005), Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*. *Biochem Eng*, 1 23: 265–276.
- Lockwood, L. B., G. B. Ward, and O.E. May. (1936), The physiology of *Rhizopus oryzae*. *J Agric Res*, 53:849-857.
- Michelson, T.,K. Kaskb, E. Jogi, E. Talpsep, I. Suitso ,and A. Nurka. (2006), L(+)-Lactic acid producer *Bacillus coagulans* SIM-7 DSM 14043 and its comparison with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* DSM 20073. *Enzyme and Microbial Technol*, 39:861-867.
- Miura, S., T. Arimura, M. Hoshino, M. Kojima, L. Dwiarti, and M. Okabe. (2003), Optimizaiton and scale-up of l-lactic acid fermentation by mutant strain *Rhizopus* sp. MK-96-1196 in airlift bioreactors, *J Biosci Bioeng*, 96: 65–69.
- Narayanan, N., P.K., Roychoudhury, and A. Srivastava. (2004),L(+)-latic acid fermentation and its product polymerization. *J Biotechnol*,

7(2):167-179.

- Narita, J., S. Nakahara, H. Fukuda and A. Kondo. (2004), Efficient Production of L-(α)-Lactic Acid from Raw Starch by *Streptococcus bovis* 148. *Biosci Bioengr*, 6: 423–425.
- Oh, H., Y.J. Wee , J.S. Yun, S.H. Han, S.J., and H.W. Ryu. (2005), Lactic acid production from agricultural resources as cheap raw materials. *Bioresource Technol*, 1492–1498.
- Ohkouchi, Y. and Y. Inoue. (2006). Direct production of L(+)-lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG18011. *Bioresource Technol*, 1554–1562
- Park, E. Y., Y. Kosakai, and M. Okabe. (1998), Efficient Production of L(+)-lactic acid using mycelia cotton-like flocs of *Rhizopus oryzae* in an air-lift bioreactor. *Biotechnol Prog*, 14:699-704.
- Petruccioli, M., M. Fenice, P. Piccioni and F. Federici. (1995), Effect of stirrer speed and buffering agents on the production of glucose oxidase and catalase by *Penicillium variabile* (P16) in benchtop bioreactor. *Enzyme and Microbial Technol*, 17:336-339.
- Philippidis, G. and C. Hatzis. (1997), Biochemical engineering analysis of critical process factors in the biomass-to-ethanol technology, *Biotechnol Prog*,

13 :222–231.

Prescott L.M., J.P. Harley, D.A. Klein. (1996), Metabolism: the use of energy in biosynthesis In : Microbiology, 3rd edn. W.C. Brown, Dubuque, Iowa, London, pp 198-99 (ISBN 0697218651).

Rosenberg, M., L. Kriřtof'ikov' a. (1995), Physiological restriction of the l-lactic acid production by *Rhizopus arrhizus*, Acta Biotechnol, 15:367 –374.

Soccol, C. R., B. Marin, M. Raimbault, and JM. Lebault. (1994a), Potential of solid state fermentation for production of L (+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*. Appl Microbiol Biotechnol, 41:286–290.

Suntornsuk, W. and YD. Hang. (1994), Efficacy of chemicals for controlling colony spread by *Rhizopus* species. Research Note, 7:185-188.

Suntornsuk, W. and YD. Hang. (1994), Strain improvement of *Rhizopus* species for production of L(+)-Lactic acid and glucoamylase. Lett Appl Microbiol, 19:249-252.

Tay, A. and S.T. Yang. (2002), Production of l(+)-lactic acid from glucose and starch by immobilized cells of *Rhizopus oryzae* in a rotating fibrous bed bioreactor, Biotechnol Bioeng, 80: 1–12.

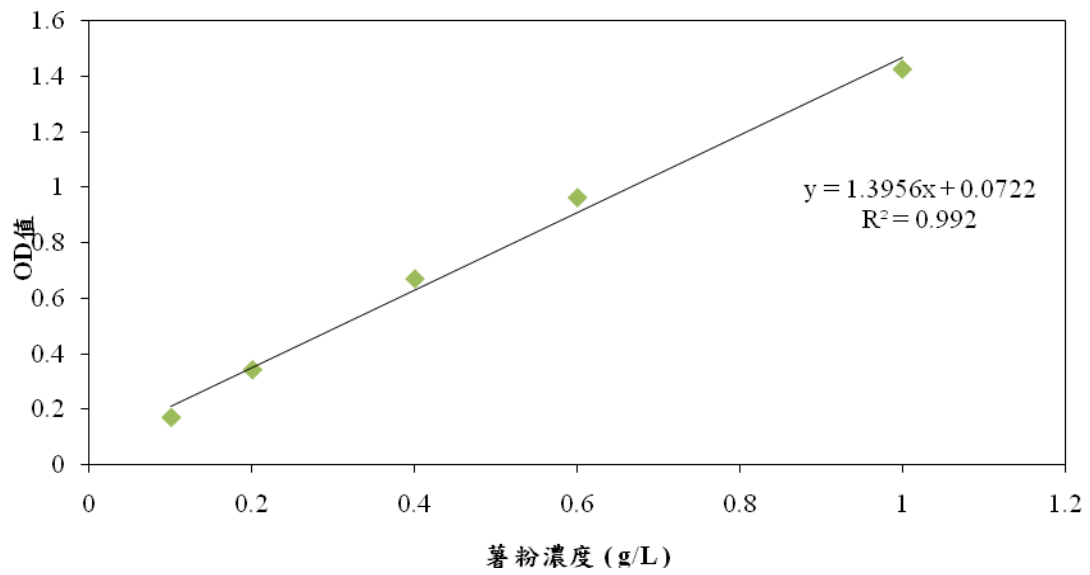
Wright, B.E., A. Longacre, and J. Reimers. (1996), Models of metabolism in *Rhizopus oryzae*. J Theor Boil, 182:453-457.

Zhang Z.Y., B. Jin and J. M. Kelly. (2007), Production of lactic acid and byproducts from waste potato starch by *Rhizopus arrhizus*: role of nitrogen sources, World J Microbiol Biotechnol, 23:229–236.

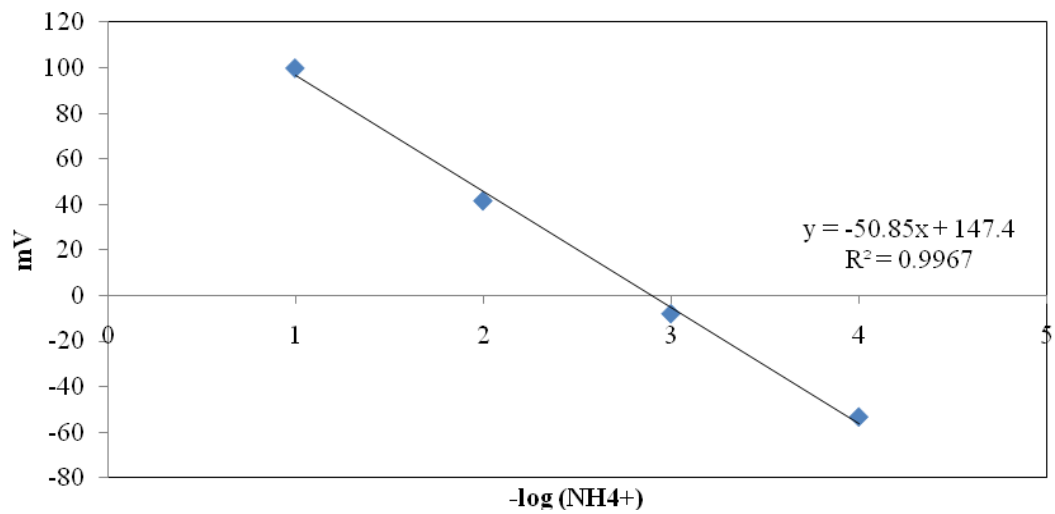
Zhou, Y., J. Du and G.T. Tsao. (2002), Comparison of fumaric acid production by *Rhizopus oryzae* using different neutralizing agents. Biopro Biosyst Eng, 25: 179–181.

附錄

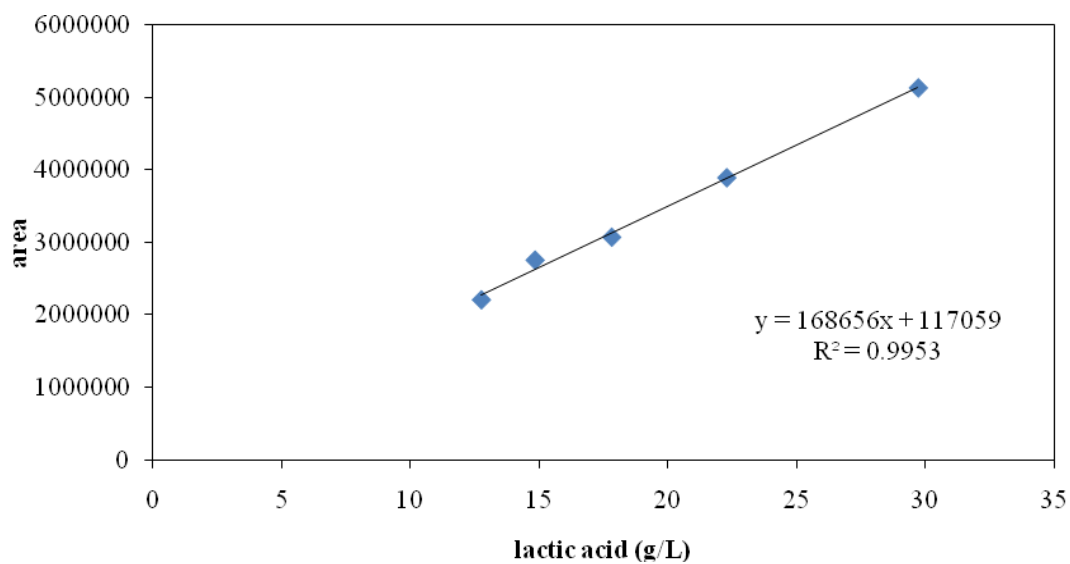
附錄 1



附錄 2



附錄 3



附錄 4

