

# 限磷对产甘油假丝酵母甘油合成与胞内磷积累的影响

谢涛<sup>1\*</sup> 方慧英<sup>2</sup> 诸葛斌<sup>2</sup> 诸葛健<sup>2</sup>

(1. 湖南工程学院化学化工系 湖南 湘潭 411104)

(2. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214036)

**摘要:** 研究了磷酸盐限量对产甘油假丝酵母甘油合成与胞内磷积累的影响。结果表明,当酵母细胞从适磷或富磷培养基转接入低磷培养基时,发酵过程中胞内积累的磷逐渐减少;而当菌体从低磷培养基转接入适磷或富磷培养基时,发酵过程中胞内聚磷酸盐的积累量迅速增加。当细胞在第14小时和第38小时从适磷培养基转接入低磷培养基时甘油得率分别高达60.9%和61.4%,而甘油产率则分别为2.03 g/(L·h)和2.23 g/(L·h)。这些现象说明限制发酵培养基中的磷浓度是产甘油假丝酵母高产甘油的必要条件,并为其反复分批发酵法生产甘油提供了重要依据。

**关键词:** 限磷, 产甘油假丝酵母, 甘油合成, 聚磷酸盐

## Effects of Phosphate-limitation on Glycerol Biosynthesis and Intracellular Phosphorus Accumulation of *Candida glycerinogenes*

XIE Tao<sup>1\*</sup> FANG Hui-Ying<sup>2</sup> ZHUGE Bin<sup>2</sup> ZHUGE Jian<sup>2</sup>

(1. Department of Chemical Engineering, Hunan Institute of Engineering, Xiangtan, Hunan 411104, China)

(2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214036, China)

**Abstract:** Effects of phosphate limitation on glycerol biosynthesis and intracellular phosphorus accumulation of *Candida glycerinogenes* were studied by recycling yeast cells. The results demonstrated that, throughout the fermentation of yeast cells recycled, intracellular phosphorus accumulation gradually decreased when yeast cells were re-inoculated from the suitable phosphate or rich phosphate medium to the low phosphate medium; while intracellular polyphosphate accumulation rapidly increased after yeast cells were re-inoculated from the low phosphate medium to the suitable phosphate or rich phosphate medium. When yeast cells were re-inoculated from the suitable phosphate medium to the low phosphate medium at the fourteenth or thirty-eighth hour, glycerol yields on glucose of 60.9% or 61.4% could be achieved with a productivity of 2.03 g/(L·h) or 2.23 g/(L·h). These phenomena proved that it is necessary for glycerol overproduction by *C. glycerinogenes* to limit phosphorus concentration in fermentative medium, which provides an important basis for its glycerol production by repeated fed-batch fermentation.

**Keywords:** Phosphate limitation, *Candida glycerinogenes*, Glycerol biosynthesis, polyPhosphate (polyP)

耐高渗透酵母 *Candida glycerinogenes* 发酵生产甘油具有高产量、高得率和高回收率等优点,在我国得到了较好的工业化应用<sup>[1]</sup>。前期研究表明,培养基中的磷浓度对 *C. glycerinogenes* 发酵生产甘油影响极大<sup>[1,2]</sup>。本文将进一步研究在低磷、适磷和富磷培养基中菌体相互转接对 *C. glycerinogenes* 胞外甘油、胞内甘油与胞内磷积累的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

产甘油假丝酵母(*C. glycerinogenes* CN1082608)由江南大学发酵甘油研究设计中心提供。

### 1.2 培养基

种子培养基(g/L): 葡萄糖 100, 尿素 2, 玉米浆(由无锡江阴酶制剂厂提供) 8, 自然 pH 值。

合成发酵培养基(g/L): 葡萄糖 220~250, 尿素 2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0~1.6,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{CaCl}_2$  0.1, 微量元素溶液 1 mL/L; 自然 pH。低磷、适磷和富磷培养基中  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  浓度分别为 0.1 g/L、0.4 g/L 和 1.6 g/L。

### 1.3 发酵方法

**1.3.1 种子培养:** 从刚转接培养好的新鲜斜面上挑取一环菌株, 接入 500 mL 摇瓶中(种子培养基装液量为 50 mL), 于往复式摇床上 110 次/min、30°C 振荡培养 19 h。

**1.3.2 第一次发酵:** 按 5%(V/V)的接种量将种子液接入装有 60 mL 合成发酵培养基的 500 mL 摇瓶中进行第一次发酵, 发酵条件同种子培养。

**1.3.3 转接发酵:** 当第一次发酵至对数生长中期(第 14 小时)或稳定生长初期(第 38 小时)时, 将发酵液在 3000 r/min 下无菌离心 15 min 后倾出上清液, 菌体用无菌生理盐水洗涤后离心, 全部转接入另一相同体积的合成发酵培养基中, 再按种子培养条件于摇床上发酵。

### 1.4 甘油测定

采用高碘酸钠-变色酸法<sup>[1]</sup>。

### 1.5 细胞生物量测定

按参考文献[3]的方法测定。

### 1.6 胞内甘油与 polyP 含量测定

胞内 polyP 与甘油的提取: 按 Shi 等<sup>[4]</sup>和 Mcgrath 等<sup>[5]</sup>的方法, 并略做改动。取一定量的发酵液离心, 菌体用去离子水反复洗涤、离心 2 次, 湿菌

体与 0.15%(活性氯浓度)的次氯酸钠溶液按 1:5(W/V)的比例混合均匀, 于 25°C 下反应 45 min 后离心, 菌体用去离子水反复洗涤、离心 2 次; 然后, 用适量去离子水萃取 2 次(每次的萃取时间为 2 h, 且每隔 30 min 振荡混匀 1 次), 并于 4000 r/min 离心 5 min, 萃取液合并入 50 mL 容量瓶中, 用去离子水定容、摇匀; 取萃取液用于测定胞内甘油和 polyP 的含量。

游离磷(Pi)和 polyP 的测定: 按参考文献[6]的方法测定。

## 2 结果

### 2.1 *C. glycerinogenes* 由低磷培养基转入适磷培养基发酵

*C. glycerinogenes* 细胞在低磷培养基中分别发酵 14 h、38 h 后, 不经洗涤转接入适磷培养基中继续发酵的结果, 如表 1 所示。由表 1 可知, 在第 14 小时和第 38 小时转接时, 胞外甘油的产量和得率与在适磷培养基中的发酵结果一致, 同时胞内 polyP 积累增加。另外, 在第 14 小时进行转接时, 转接后的发酵时间相应要长些, 这是因为第 14 小时时细胞正处于对数生长期中期, 菌体量相对较少。

### 2.2 *C. glycerinogenes* 由低磷培养基转入富磷培养基发酵

*C. glycerinogenes* 细胞在低磷培养基中分别发酵 14 h、38 h 后不经洗涤转接入富磷培养基中发酵的结果, 见表 2。由表 2 看出, 无论在第 14 小时还是在第 38 小时转接时, 胞外甘油的产量和得率都较低, 而胞内磷积累显著增加, 这说明胞内磷积累超过一定的限值后不利于甘油的合成。

### 2.3 *C. glycerinogenes* 由适磷培养基转入低磷培养基发酵

*C. glycerinogenes* 由适磷培养基转入低磷培养基的发酵结果见表 3。由表 3 可知, 在第 14 小时和第 38 小时转接时, 甘油得率分别高达 60.9% 和 61.4%, 比适磷培养基中的分批发酵结果(甘油得率为 50.6%)分别提高了 17.15% 和 18.04%, 而且甘油产率也分别高达 2.03 g/(L·h) 和 2.23 g/(L·h)。这种现象说明限制转接后发酵培养基中的磷含量有利于甘油的合成, 从而为酵母细胞回用的反复分批发酵法生产甘油提供了重要依据, 对此文献[3]已进行了深入研究。

表 1 由低磷转入适磷发酵后胞外甘油产量和胞内甘油、游离磷与聚磷酸盐的含量  
Table 1 Extracellular glycerol production and intracellular glycerol, free Pi, and polyP accumulation by re-inoculating from low phosphate medium to suitable phosphate medium

| 转接时间<br>Re-inoculation time   | 发酵时间<br>Fermentation time (h) | 甘油产量<br>Glycerol concentration (g/L) | 甘油得率<br>Glycerol yields on glucose (g/g) | 胞内甘油<br>Intracellular glycerol (mg/g DCW) | 胞内游离磷<br>Intracellular free Pi (mg/g DCW) | 胞内聚磷<br>Intracellular polyP (mg/g DCW) |
|---|-------------------------------|--------------------------------------|--|---|---|--|
| 第 1 次发酵的第 14 小时<br>The fourteenth hour of first batch fermentation    | 0                             | 20.3                                 | 0.092                                    | 47.8                                      | 2.13                                      | 0.64                                   |
|   | 24                            | 52.5                                 | 0.230                                    | 57.3                                      | 1.76                                      | 1.63                                   |
|   | 50                            | 80.8                                 | 0.351                                    | 74.4                                      | 1.33                                      | 1.35                                   |
|   | 82                            | 115.8                                | 0.504                                    | 70.5                                      | 1.00                                      | 1.59                                   |
| 第 1 次发酵的第 38 小时<br>The thirty-eighth hour of first batch fermentation | 0                             | 29.2                                 | 0.133                                    | 70.0                                      | 1.50                                      | 0.97                                   |
|   | 26                            | 65.7                                 | 0.299                                    | 64.5                                      | 1.72                                      | 1.69                                   |
|   | 42                            | 89.3                                 | 0.406                                    | 75.7                                      | 1.54                                      | 1.87                                   |
|   | 70                            | 114.8                                | 0.522                                    | 78.5                                      | 1.40                                      | 2.19                                   |

表 2 由低磷转入富磷发酵胞外甘油产量和胞内甘油、游离磷与聚磷酸盐的含量  
Table 2 Extracellular glycerol production and intracellular glycerol, free Pi, and polyP accumulation by re-inoculating from low phosphate medium to rich phosphate medium

| 转接时间<br>Re-inoculation time   | 发酵时间<br>Fermentation time (h) | 甘油产量<br>Glycerol concentration (g/L) | 甘油得率<br>Glycerol yields on glucose (g/g) | 胞内甘油<br>Intracellular glycerol (mg/g DCW) | 胞内游离磷<br>Intracellular free Pi (mg/g DCW) | 胞内聚磷<br>Intracellular polyP (mg/g DCW) |
|---|-------------------------------|--------------------------------------|--|---|---|--|
| 第 1 次发酵的第 14 小时<br>The fourteenth hour of first batch fermentation    | 0                             | 28.3                                 | 0.126                                    | 47.4                                      | 1.83                                      | 0.98                                   |
|   | 24                            | 48.1                                 | 0.214                                    | 48.8                                      | 3.70                                      | 2.14                                   |
|   | 58                            | 84.2                                 | 0.374                                    | 67.6                                      | 3.03                                      | 3.28                                   |
|   | 74                            | 95.6                                 | 0.425                                    | 70.8                                      | 2.89                                      | 4.52                                   |
| 第 1 次发酵的第 38 小时<br>The thirty-eighth hour of first batch fermentation | 0                             | 42.8                                 | 0.190                                    | 62.3                                      | 1.38                                      | 1.84                                   |
|   | 18                            | 62.6                                 | 0.278                                    | 75.8                                      | 3.07                                      | 2.48                                   |
|   | 58                            | 97.0                                 | 0.431                                    | 83.8                                      | 2.75                                      | 3.50                                   |

#### 2.4 *C. glycerinogenes* 由适磷培养基转入富磷培养基发酵

*C. glycerinogenes* 由适磷培养基转入富磷培养基的发酵结果, 如表 4 所示。从表 4 可看出, 在第 14 小时和第 38 小时转接时, 发酵时间大大缩短, 细胞生物量显著增加, 但胞外甘油产量更低, 甘油得率不及其最大理论得率的 50%。这是由于过量的磷酸盐可以强化 EMP 途径, 促进菌体生长、加速葡萄糖消耗和缩短发酵时间, 相反不利于甘油的合成<sup>[7]</sup>。

#### 2.5 *C. glycerinogenes* 由富磷培养基转入低磷培养基发酵

*C. glycerinogenes* 由富磷培养基转入低磷培养基的发酵结果见表 5。当 *C. glycerinogenes* 细胞在第 14 小时转接时, 其甘油产量显著高于在第 38 小时转接时的甘油产量, 这是由于第 38 小时转接时菌体量大, 胞内积累的磷富余, 转接后有利于促进葡萄糖的利用而不利于甘油合成。

#### 2.6 *C. glycerinogenes* 由富磷培养基转入适磷培养基发酵

*C. glycerinogenes* 由富磷培养基转入适磷培养基的发酵结果, 如表 6。由表 6 可看出, 无论在第 14 小时还是在第 38 小时转接时, 胞外甘油的产量、得率与胞内磷积累的变化规律, 与 *C. glycerinogenes* 细胞由适磷培养基转入富磷培养基的发酵结果基本一致。

### 3 讨论

为了提高甘油的生产能力, 国内外研究者对限磷补糖工艺进行了深入研究。Button 等<sup>[8]</sup>研究发现, 利用木兰球拟酵母(*Torulopsis magnoliae*), 经 6 次限磷补糖获得了甘油的高产, 发酵 240 h 后甘油产量达到 170 g/L, 但甘油得率和产率仍相对较低, 分别为 40.6%、0.71 g/(L·h)。Vijaikishore 等<sup>[9]</sup>在粉状毕赤酵母(*Pichia farinosa*)多次补料分批发酵生产甘油

表3 由适磷转入低磷发酵胞外甘油产量和胞内甘油、游离磷与聚磷酸盐的含量  
Table 3 Extracellular glycerol production and intracellular glycerol, free Pi, and polyP accumulation by re-inoculating from suitable phosphate medium to low phosphate medium

| 转接时间<br>Re-inoculation time                                       | 发酵时间<br>Fermentation time (h) | 甘油产量<br>Glycerol concentration (g/L) | 甘油得率<br>Glycerol yields on glucose (g/g) | 胞内甘油<br>Intracellular glycerol (mg/g DCW) | 胞内游离磷<br>Intracellular free Pi (mg/g DCW) | 胞内聚磷<br>Intracellular polyP (mg/g DCW) |
|---|-------------------------------|--------------------------------------|--|---|---|--|
| 第1次发酵的第14小时<br>The fourteenth hour of first batch fermentation    | 0                             | 22.3                                 | 0.093                                    | 60.0                                      | 2.04                                      | 1.74                                   |
|   | 24                            | 64.4                                 | 0.269                                    | 57.1                                      | 0.96                                      | 1.24                                   |
|   | 42                            | 102.0                                | 0.425                                    | 88.3                                      | 0.79                                      | 1.03                                   |
|   | 66                            | 146.2                                | 0.609                                    | 115.3                                     | 0.80                                      | 0.82                                   |
| 第1次发酵的第38小时<br>The thirty-eighth hour of first batch fermentation | 0                             | 61.4                                 | 0.256                                    | 57.8                                      | 1.46                                      | 1.99                                   |
|   | 10                            | 53.2                                 | 0.222                                    | 51.8                                      | 1.22                                      | 0.79                                   |
|   | 34                            | 92.0                                 | 0.383                                    | 102.6                                     | 0.76                                      | 0.82                                   |
|   | 66                            | 147.3                                | 0.614                                    | 129.3                                     | 0.63                                      | 0.68                                   |

表4 由适磷转入富磷发酵胞外甘油产量和胞内甘油、游离磷与聚磷酸盐的含量  
Table 4 Extracellular glycerol production and intracellular glycerol, free Pi, and polyP accumulation by re-inoculating from suitable phosphate medium to rich phosphate medium

| 转接时间<br>Re-inoculation time                                       | 发酵时间<br>Fermentation time (h) | 甘油产量<br>Glycerol concentration (g/L) | 甘油得率<br>Glycerol yields on glucose (g/g) | 胞内甘油<br>Intracellular glycerol (mg/g DCW) | 胞内游离磷<br>Intracellular free Pi (mg/g DCW) | 胞内聚磷<br>Intracellular polyP (mg/g DCW) |
|---|-------------------------------|--------------------------------------|--|---|---|--|
| 第1次发酵的第14小时<br>The fourteenth hour of first batch fermentation    | 0                             | 14.2                                 | 0.069                                    | 55.9                                      | 2.56                                      | 1.28                                   |
|   | 24                            | 48.0                                 | 0.229                                    | 101.3                                     | 3.05                                      | 2.46                                   |
|   | 42                            | 70.2                                 | 0.334                                    | 53.3                                      | 3.19                                      | 3.48                                   |
| 第1次发酵的第38小时<br>The thirty-eighth hour of first batch fermentation | 0                             | 49.7                                 | 0.243                                    | 60.5                                      | 3.07                                      | 1.75                                   |
|   | 10                            | 33.4                                 | 0.159                                    | 145.6                                     | 3.68                                      | 2.86                                   |
|   | 34                            | 60.9                                 | 0.300                                    | 38.4                                      | 3.74                                      | 2.97                                   |

表5 由富磷转入低磷发酵胞外甘油产量和胞内甘油、游离磷与聚磷酸盐的含量  
Table 5 Extracellular glycerol production and intracellular glycerol, free Pi, and polyP accumulation by re-inoculating from rich phosphate medium to low phosphate medium

| 转接时间<br>Re-inoculation time                                       | 发酵时间<br>Fermentation time (h) | 甘油产量<br>Glycerol concentration (g/L) | 甘油得率<br>Glycerol yields on glucose (g/g) | 胞内甘油<br>Intracellular glycerol (mg/g DCW) | 胞内游离磷<br>Intracellular free Pi (mg/g DCW) | 胞内聚磷<br>Intracellular polyP (mg/g DCW) |
|---|-------------------------------|--------------------------------------|--|---|---|--|
| 第1次发酵的第14小时<br>The fourteenth hour of first batch fermentation    | 0                             | 18.1                                 | 0.076                                    | 69.1                                      | 4.10                                      | 2.34                                   |
|   | 24                            | 61.9                                 | 0.269                                    | 95.6                                      | 1.82                                      | 1.33                                   |
|   | 66                            | 123.8                                | 0.538                                    | 107.3                                     | 1.26                                      | 0.94                                   |
| 第1次发酵的第38小时<br>The thirty-eighth hour of first batch fermentation | 0                             | 53.3                                 | 0.222                                    | 50.6                                      | 3.81                                      | 2.46                                   |
|   | 22                            | 72.3                                 | 0.314                                    | 81.2                                      | 1.91                                      | 1.18                                   |
|   | 42                            | 77.7                                 | 0.338                                    | 89.6                                      | 1.17                                      | 0.96                                   |

表6 由富磷转入适磷发酵胞外甘油产量和胞内甘油、游离磷与聚磷酸盐的含量  
Table 6 Extracellular glycerol production and intracellular glycerol, free Pi, and polyPhosphate accumulation by re-inoculating from rich phosphate medium to suitable phosphate medium

| 转接时间<br>Re-inoculation time                                       | 发酵时间<br>Fermentation time (h) | 甘油产量<br>Glycerol concentration (g/L) | 甘油得率<br>Glycerol yields on glucose (g/g) | 胞内甘油<br>Intracellular glycerol (mg/g DCW) | 胞内游离磷<br>Intracellular free Pi (mg/g DCW) | 胞内聚磷<br>Intracellular polyP (mg/g DCW) |
|---|-------------------------------|--------------------------------------|--|---|---|--|
| 第1次发酵的第14小时<br>The fourteenth hour of first batch fermentation    | 0                             | 17.6                                 | 0.088                                    | 63.1                                      | 4.38                                      | 0.97                                   |
|   | 10                            | 36.3                                 | 0.182                                    | 77.5                                      | 4.20                                      | 1.87                                   |
|   | 42                            | 65.5                                 | 0.327                                    | 96.9                                      | 3.40                                      | 2.86                                   |
| 第1次发酵的第38小时<br>The thirty-eighth hour of first batch fermentation | 0                             | 53.4                                 | 0.267                                    | 54.9                                      | 3.27                                      | 2.53                                   |
|   | 10                            | 35.9                                 | 0.179                                    | 61.9                                      | 4.56                                      | 2.26                                   |
|   | 34                            | 65.6                                 | 0.328                                    | 75.0                                      | 3.12                                      | 3.63                                   |

过程中, 通过限磷补糖, 发酵 192 h 甘油产量高达 300 g/L, 甘油产率为 1.56 g/(L·h), 而甘油得率仅为 34.5%。这 2 种限磷补糖工艺实际上都是以消耗大量葡萄糖为代价以换取甘油产量的提高, 没有将提高甘油产量、得率和产率作为一个整体优化目标来考虑。刘永强等<sup>[10]</sup>对克鲁氏假丝酵母(*C. krusei*)限磷、限氮的连续发酵进行了研究, 发现甘油综合生产能力均有不同程度的改善。本研究发现, *C. glycerinogenes* 由适磷培养基转入低磷培养基, 在第 14 小时和第 38 小时转接时, 甘油得率分别高达 60.9% 和 61.4%, 比适磷培养基中的分批发酵结果(甘油得率为 50.6%)分别提高了 17.15% 和 18.04%, 而且发酵时间大大缩短, 甘油产率则分别提高到 2.03 g/(L·h) 和 2.23 g/(L·h)。若以此为基础, 研究开发 *C. glycerinogenes* 的反复分批发酵工艺, 将可实现甘油高产、高得率和高产率的相对统一。由上述限磷工艺可推知, 限制发酵培养基中磷酸盐含量是 *T. magnoliae*、*P. farinosa*、*C. krusei* 和 *C. glycerinogenes* 高产甘油的关键之一。Kulaev 等<sup>[11]</sup>研究认为微生物细胞内“磷酸盐泵”在其生理代谢中具有非常重要的作用, 它通过磷酸化与去磷酸化在胞内实现动态平衡; 当细胞处于低磷环境时, 主要通过胞内大量磷酸化化合物的去磷酸化而维持“磷酸盐泵”的动态平衡。由于酵母细胞处于低磷环境, 大大加速了由 3-磷酸甘油酯酶催化 3-磷酸甘油生成甘油的脱磷酸化过程, 这样既适应了维持胞内“磷酸盐泵”动态平衡的需要, 又显著提高了甘油的合成能力。

## 4 结论

1) 当菌体从适磷或富磷培养基转接入低磷培养基继续发酵时, 发酵过程中胞内积累的磷逐渐减少, 这是由于在前期培养中胞内积累的磷可以作为磷源和能源(polyP)用于低磷培养基中的发酵过程; 反之, 当菌体从低磷培养基转接入适磷或富磷培养基时, 发酵过程中胞内 polyP 和总磷的积累量迅速增加, 特别是第 14 小时由低磷培养基向富磷培养基转接时 polyP 积累量高达 4.52 mg/g DCW。

2) 在转接前培养基相同时, 若转接后培养基中磷浓度越低, 则甘油产量和得率越高。特别地, 当细胞从适磷培养基转接入低磷培养基时甘油的产量最高, 这为 *C. glycerinogenes* 反复分批发酵法生产甘油提供了重要依据, 同时也说明限制发酵培养基中的磷浓度是其高产甘油的必要条件。

## 参 考 文 献

- [1] Zhuge J, Fang HY, Wang ZX. Glycerol production by a novel osmotolerant yeast *Candida glycerinogenes*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **55**: 686–692.
- [2] 谢 涛, 方慧英, 诸葛健. 磷源对 *Candida glycerinogenes* 产甘油发酵的影响及动力学分析. *化工学报*, 2005, **56**(12): 2404–2409.
- [3] 谢 涛, 方慧英, 诸葛健. *Candida glycerinogenes* 细胞回用对甘油生产的影响. *化工学报*, 2007, **58**(1): 195–199.
- [4] Shi XL, Yang LY, Niu XJ, *et al.* Intracellular phosphorus metabolism of *Microcystis aeruginosa* under various redox potential in darkness. *Microbiol Res*, 2003, **158**: 345–351.
- [5] Mcgrath JW, Quinn JP. Intracellular accumulation of polyphosphate by the yeast *Candida humicola* G-1 in response to acid pH. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(9): 4068–4073.
- [6] Nikata T, Natsui M, Sato K, *et al.* Photometric estimation of intracellular polyphosphate content by staining with basic dye. *Analytical Sciences*, 2001, **17**: 11675–11678.
- [7] 谢 涛, 方慧英, 诸葛健. 玉米浆在 *Candida glycerinogenes* 甘油发酵中的作用机理. *微生物学通报*, 2006, **33**(4): 80–84.
- [8] Button DK, Graver JC, Hajny GJ. Pilot plant glycerol production with a slow-feed osmophilic yeast fermentation. *Appl Microbiol*, 1966, **14**: 292–294.
- [9] Vijaikishore P, Karanth NG. Glycerol production by fermentation: a fed-batch approach. *Biotechnol Bioeng*, 1987, **30**: 325–328.
- [10] Liu YQ, Liu DH, Su Q, *et al.* Effects of phosphorus and nitrogen limitations on continuous production of glycerol in a multistage cascade bioreactor by *Candida krusei*. *Biochem Eng J*, 2003, **15**: 101–106.
- [11] Kulaev IS, Kulakovskaya TV. Polyphosphate and phosphate pump. *A Rev Microbiol*, 2000, **54**: 709–734.