

研究论文

# 产甘油假丝酵母细胞回用对甘油生产的影响

谢 涛<sup>1,2</sup>, 方慧英<sup>1</sup>, 饶志明<sup>1</sup>, 诸葛健<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036;

<sup>2</sup> 湖南工程学院化学化工系, 湖南 湘潭 411104)

**摘要:** 研究了产甘油假丝酵母细胞回用生产甘油的反复分批发酵。实验结果表明: 第一级发酵培养基  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  浓度为  $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 回用培养基的最适  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  浓度为  $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 当上一批次发酵液中葡萄糖浓度降至  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  以下时, 酵母细胞不经洗涤即可回用; 经过 15 个批次的反复分批发酵过程, 甘油的平均产量、平均得率和平均生产能力分别达到  $138.69 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $60.17\%$  和  $2.31 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , 分别比第一级发酵结果增加了  $15.74\%$ 、 $15.48\%$  和  $39.16\%$ ; 但回用至第 15 次时, 菌体出现严重衰退, 因此回用周期以 12~14 次为宜。

**关键词:** 产甘油假丝酵母; 细胞回用; 甘油; 反复分批发酵

中图分类号: TQ 92

文献标识码: A

文章编号: 0438-1157 (2007) 01-0195-05

## Effect of recycles of *Candida glycerinogenes* cells on glycerol production

XIE Tao<sup>1,2</sup>, FANG Huiying<sup>1</sup>, RAO Zhiming<sup>1</sup>, ZHUGE Jian<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Key Lab of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University,

Wuxi 214036, Jiangsu, China; <sup>2</sup> Department of Chemical Engineering,

Hunan Institute of Engineering, Xiangtan 411104, Hunan, China)

**Abstract:** Glycerol production by reusing free *Candida glycerinogenes* cells in repeated batch fermentation was studied. The results showed that the suitable concentration of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in the re-inoculation medium was  $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , lower than  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  of  $0.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  in the first fermentation medium. When the residual glucose concentration decreased to  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , yeast cells from sterile centrifugation with the activity high enough for the next cycle could be directly recycled for the next batch fermentation. After 15 cycles of re-inoculation, average glycerol concentration, yield and productivity were  $138.69 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $60.17\%$  and  $2.31 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , with an increase of  $15.74\%$ ,  $15.48\%$  and  $39.16\%$ , respectively, compared with these in the first batch fermentation. Although yeast cells decayed severely in the fifteenth cycle, 12—14 cycles of repeated batch fermentation were possible.

**Key words:** *Candida glycerinogenes*; recycle of cells; glycerol; repeated batch fermentation

## 引 言

甘油是一种重要的轻化工原料, 广泛应用于化妆品、牙膏、烟草、香精、水性油墨、印染纺织、涂料、合成树脂、皮革、造纸、制药、食品和国防等各个领域的 1700 多种产品<sup>[1]</sup>。在我国, 由于受

合成洗涤剂的冲击, 肥皂行业日渐萎缩, 甘油产量大幅下降。因此, 利用耐高渗透压酵母发酵生产甘油的产业化前景看好<sup>[2-3]</sup>。耐高渗透压酵母 *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>[3-4]</sup>。但是, 耐高渗透压酵母生产甘油的方法主

2005-11-30 收到初稿, 2006-03-20 收到修改稿。

联系人: 诸葛健。第一作者: 谢涛 (1970—), 男, 讲师, 博士研究生。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30570142); 江苏省青年科技创新人才 (学术带头人) 基金项目 (BK2006504)。

Received date: 2005-11-30.

Corresponding author: Prof. ZHUGE Jian. E-mail: jzhuge@sohu.com

Foundation item: supported by the National Natural Science Foundation of China (30570142); Jiangsu Provincial Youth Scientific and Technological Innovation Foundation (Academic Leaders) (BK2006504).

要集中在传统的分批发酵法。为了提高甘油的生产能力,降低生产成本,国内外一些研究者对反复分批发酵工艺<sup>[5]</sup>、连续发酵工艺<sup>[6-7]</sup>和固定化发酵工艺<sup>[8-9]</sup>生产甘油进行了深入研究,但结果都并不十分理想。作者在研究贫磷、适磷和富磷培养基中相互转接对 *C. glycerinogenes* 胞内甘油和磷代谢的影响时发现,当在富磷培养基中培养一定时间后再离心收集菌体转接入新鲜的贫磷培养基中继续发酵,结果胞外甘油和胞内甘油的浓度均显著增加,而且发酵时间有所缩短。因此,本文提出了酵母细胞回用的反复分批发酵策略,并对其回用时机的选择、回用培养基中磷浓度的确定、回用细胞的处理方式及其多次回用的反复分批发酵过程进行了详细研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株和培养基

菌株: *Candida glycerinogenes* 由江南大学发酵甘油研究设计中心提供。

种子培养基 ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ): 葡萄糖 100, 尿素 2, 玉米浆 8; 自然 pH 值。

合成发酵培养基 ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ): 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  $1 \text{ ml} \cdot \text{L}^{-1}$ ; pH 值不调。贫磷、适磷和富磷培养基分别记作 (-P)、(±P) 和 (+P), 对应的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  浓度分别为 0.1、0.4 和  $1.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

微量元素溶液 ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ): KI 0.2,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.9,  $\text{Na}_2\text{S}$  0.3,  $\text{SnCl}_2$  0.1, NiCl 0.05, NaBr 0.05,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  2.5,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.15,  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.01,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$  0.6,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  0.02,  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  0.1,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5.56,  $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  7.46。

### 1.2 发酵方法

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  $32^\circ\text{C}$  振荡培养 19 h (振幅 10 cm, 振动频率  $110 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$ )。

分批发酵: 按 5% (体积) 的接种量将种子液接入装有 60 ml (±P) 培养基的 500 ml 摇瓶中进行第一级发酵, 发酵条件同种子培养。

酵母细胞回用: 当上一次发酵结束时, 将发酵液在  $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  下无菌离心 15 min 后倒出上清

液, 菌体用无菌生理盐水洗涤后离心或不经洗涤全部转接入新鲜的回用发酵培养基中, 再按种子培养条件于摇床上发酵。

### 1.3 测定方法

甘油的测定: 采用高碘酸钠-变色酸法<sup>[10]</sup>, 细胞经超声破壁后测定胞内甘油含量。

葡萄糖测定: 采用安装固定化葡萄糖氧化酶酶膜的生物传感仪<sup>[3]</sup>。

生物量的测定: 取等量的两份发酵液, 一份由烘干法测得菌体干重 (DCW), 另一份稀释成一定的浓度于 630 nm 下测定吸光值 (OD 值), 得到标准曲线为  $\text{DCW} = 3.8748\text{OD}$  ( $R = 0.996$ )。再以相同方法测得样品的 OD 值, 按标准曲线计算出菌体干重。

## 2 结果与讨论

### 2.1 *C. glycerinogenes* 细胞回用策略的提出

本研究室研究表明, 磷浓度对 *C. glycerinogenes* 发酵生产甘油影响极大<sup>[3,11]</sup>, 本文对此将做进一步的研究。将分别在贫磷 (-P)、适磷 (±P) 和富磷 (+P) 3 种限磷培养基中发酵 14、38 h 的 *C. glycerinogenes* 细胞经无菌离心处理后, 全部细胞相应地转接入新鲜的上述 3 种限磷培养基中继续发酵, 发酵结果见表 1 (表中从上到下依次编号为 1~12 个实验组)。由表 1 可以看出: (1) 在第 14 h 进行转接时, 转接后的发酵时间相应要长些, 这是因为第 14 h 时细胞正处于对数生长期中期, 菌体量相对较少; (2) 转接后培养基中磷浓度越高, 发酵时间也越短, 这是由于过量的磷酸盐可以强化 EMP 途径, 从而促进菌体生长、加速葡萄糖消耗和缩短发酵时间; (3) 当转接前培养基相同时, 转接后培养基中磷浓度越低, 则甘油产量和得率越高, 其中以第 7 组和第 8 组实验的结果最好, 甘油得率高达 60.92% 和 61.38%, 比 (±P) 培养基分批发酵结果 (甘油得率为 50.62%) 分别提高 17.15% 和 18.04%, 生产强度分别为  $2.03$  和  $2.23 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , 这为酵母细胞回用提供了重要依据, 本文将对此进行深入研究; (4) 在 12 组实验中, 第 9 组和第 10 组实验特殊, 前者甘油产量显著高于后者, 这是由于第 38 h 转接时菌体量多, 胞内积累的磷富余, 从而转接后磷过量不利于甘油的合成; (5) 由于胞外甘油缘于胞内甘油的渗出, 因此两者之间表现为正相关性。

表 1 不同转接方式下的胞外甘油产量和胞内甘油含量

Table 1 Extracellular and intracellular glycerol of *Candida glycerinogenes* at different conditions of re-inoculation

Fermentation time of the first fermentation/h	Medium of the first fermentation	Re-inoculation medium	Parameters of re-inoculation				
			Fermentation time <sup>①</sup> /h	DCW /g · L <sup>-1</sup>	Extracellular glycerol/g · L <sup>-1</sup>	Yield <sup>②</sup> /%	Intracellular glycerol /mg · (g DCW) <sup>-1</sup>
14	(-P)	(+P)	74	16.94	95.55	42.47	70.77
38	(-P)	(+P)	58	16.82	96.96	43.10	73.75
14	(-P)	(±P)	82	16.89	115.80	50.35	80.45
38	(-P)	(±P)	74	15.94	114.82	52.19	78.53
14	(±P)	(+P)	42	23.51	70.19	33.42	43.27
38	(±P)	(+P)	34	20.93	60.92	29.96	38.43
14	(±P)	(-P)	72	18.28	146.20	60.92	125.27
38	(±P)	(-P)	66	18.65	147.32	61.38	129.30
14	(+P)	(-P)	66	19.45	123.81	53.83	107.33
38	(+P)	(-P)	42	20.58	77.71	33.79	89.56
14	(+P)	(±P)	42	21.82	65.48	32.74	76.87
38	(+P)	(±P)	34	19.65	65.55	32.77	74.96

① culture time after re-inoculation;

② extracellular glycerol on initial glucose.

Note: The data represent the mean of three replicated experiments.

## 2.2 酵母细胞回用时机的选择

从表 1 可知，当 *C. glycerinogenes* 细胞由 (±P) 培养基经无菌离心回用至 (-P) 培养基中继续发酵时，甘油的产量和得率显著增加。为了保证上一批次发酵液中甘油的后处理和下一批次回用细胞具有较高的发酵活力，必须选择细胞回用的适宜时机。为此，分别在 (±P) 培养基中的第一级发酵进行至 14、38、56 和 70 h 时离心收集菌体，再转接入 (-P) 培养基中继续发酵，实验结果见表 2。由表 2 可知，当酵母细胞回用到 (-P) 培养基中，并继续发酵至葡萄糖含量少于 10 g · L<sup>-1</sup> (70 h) 时，4 个实验组甘油的产量和得率基本没有发生变化，这说明当第一次发酵进行至第 70 h 时生产菌株仍能维持很高的发酵活力，而此时发酵液中葡萄糖浓度仅为 7 g · L<sup>-1</sup>。因此，确定当上一批

表 2 酵母回用时机的选择

Table 2 Choice of re-inoculated opportunity

Reuse opportunity	Parameters	Fermentation time/h			
		48	56	64	70
the 14th hour	glycerol/g · L <sup>-1</sup>	93.53	108.90	132.75	139.15
	yield/%	40.66	47.35	57.72	60.50
the 38th hour	glycerol/g · L <sup>-1</sup>	93.02	114.03	136.44	141.05
	yield/%	40.44	49.58	59.32	61.33
the 56th hour	glycerol/g · L <sup>-1</sup>	100.13	117.42	137.92	142.41
	yield/%	43.54	51.05	59.96	61.92
the 70th hour	glycerol/g · L <sup>-1</sup>	110.22	120.81	141.65	144.61
	yield/%	47.92	52.52	61.58	62.84

次发酵液中残余葡萄糖浓度低于 10 g · L<sup>-1</sup> 时，离心收集菌体，再进行下一批次发酵。

## 2.3 回用培养基中磷浓度的确定

由表 1 可知，酵母细胞回用培养基的磷浓度对反复分批发酵法生产甘油的影响很大。那么，进一步改变回用培养基中 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 的含量，是否仍能提高酵母细胞反复分批发酵的甘油产量呢？本研究仍以 (±P) 培养基进行第一级发酵，选用 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 浓度分别为 0、0.1、0.2、0.4 和 0.8 g · L<sup>-1</sup> 的限磷培养基进行反复分批发酵（细胞只回用 1 次），实验结果见表 3。从表 3 可以看出，随着回用培养基中磷浓度增加，酵母细胞回用后的发酵时间逐渐缩短；当回用培养基中初始 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 浓度高于 0.1 g · L<sup>-1</sup> 时，甘油的产量呈下降趋势。考虑到酵母细胞在多次回用的反复分批发酵过程中，细胞的动态更新需要限量补充各种营养因子，因此选用 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 浓度为 0.1 g · L<sup>-1</sup> 的贫磷 (-P) 培养基用于 *C. glycerinogenes* 反复分批发酵的研究。

## 2.4 回用细胞处理方式对发酵结果的影响

已有的研究认为<sup>[12]</sup>，由于反复分批发酵过程中代谢副产物的积累对细胞生长和甘油生成均有抑制作用，如果回用的细胞不经洗涤，则反复分批发酵的发酵性能与普通分批发酵没有差别。因此，本文进一步探讨了在酵母细胞多次回用的反复分批发酵过程中菌体洗涤与否对甘油生产的影响，结果见

表 3 酵母细胞回用培养基中磷酸二氢钾浓度的确定

Table 3 Determination of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  concentration at re-inoculation medium

Parameters	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ concentration in re-inoculation medium/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$				
	0	0.1	0.2	0.4	0.8
initial glucose/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	245	245	245	245	245
fermentation time/h	72	66	60	54	48
residual glucose/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	2.5	2.0	2.0	1.5	2.5
DCW/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	16.07	16.51	18.42	22.99	27.8
glycerol/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	147.13	150.32	130.98	91.34	77.93
yield/%	60.05	61.35	53.46	37.28	31.81
productivity/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	2.04	2.28	2.18	1.69	1.62

表 4。由表 4 可以看出, 菌体洗涤与否对细胞回用 6 次的反复分批发酵结果影响不大, 甚至回用细胞不经洗涤时甘油的产量指标要略高些。由于在

*C. glycerinogenes* 的分批发酵过程中, 甘油生成与菌体生长是部分耦联的关系, 尽管在发酵后期代谢副产物的形成极少, 但对数生长期形成的副产物在发酵后期仍有较高的积累量, 而发酵后期甘油却呈缓慢增加趋势<sup>[11]</sup>, 这说明代谢副产物的积累对甘油合成没有产生明显的抑制作用。而且, 菌体不经洗涤回用有利于保持酵母细胞在上一批次发酵中甘油合成微环境的相对稳定; 相反, 菌体经多次反复洗涤和离心后再回用, 势必增加细胞的损伤程度和污染机会, 破坏细胞原有甘油合成的微环境。

2.5 酵母细胞多次回用的发酵过程

在上述确定的酵母细胞回用条件的基础上, 以相同条件对 *C. glycerinogenes* 细胞回用 15 个周期, 发酵结果见图 1。由图 1 可看出, 当酵母细胞回用至第 6 次时, 菌体干重达到最大为  $21.49 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,

表 4 回用细胞处理方式对发酵结果的影响

Table 4 Effect of recycle method on fermentation results

Parameters		Cycles of reused cells						
		0	1	2	3	4	5	6
washed	glycerol/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	115.22	135.05	134.54	133.85	132.68	135.05	133.44
	yield/%	52.37	61.38	61.16	60.84	60.31	61.38	60.65
	$\Delta Y^{\text{①}}$ /%		17.21	16.77	16.16	15.15	17.21	15.81
	productivity/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	1.65	2.25	2.24	2.23	2.21	2.25	2.22
unwashed	glycerol/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	116.48	136.31	139.83	140.16	141.11	141.87	140.63
	yield/%	52.95	61.96	63.42	63.71	64.14	64.48	63.92
	$\Delta Y^{\text{①}}$ /%		17.17	19.96	20.51	21.14	21.79	20.73
	productivity/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	1.66	2.27	2.33	2.34	2.35	2.36	2.34

① It is the rate of glycerol improvement as compared with the first batch fermentation.

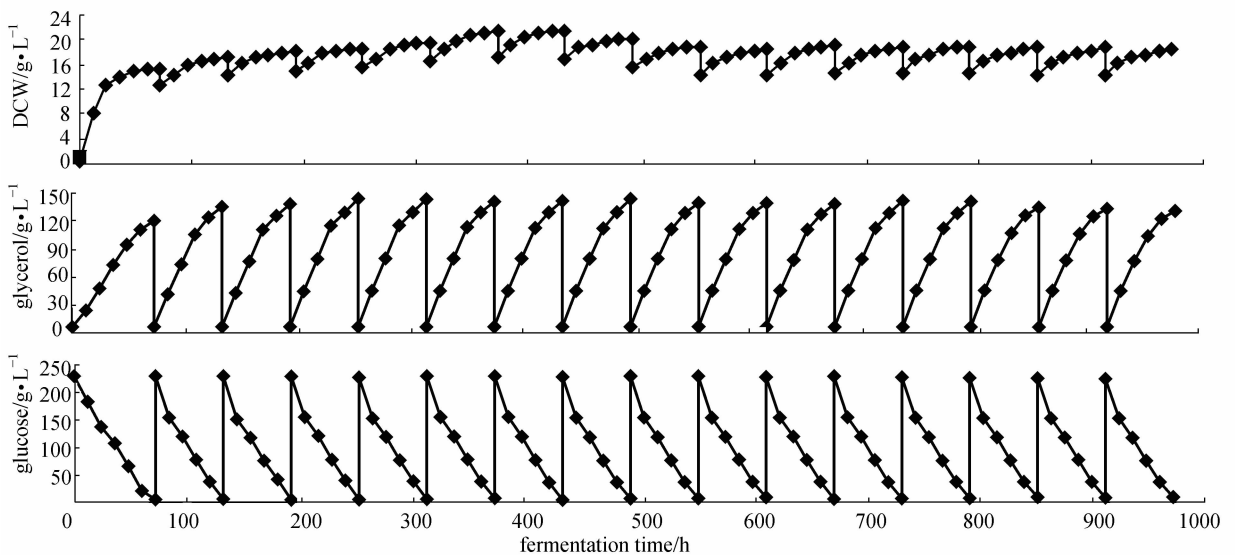


图 1 产甘油假丝酵母反复分批发酵过程

Fig. 1 Time courses of fermentation by reusing cells of *Candida glycerinogenes*

比回用前提高了41.01%，然后有所下降并维持在 $19\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右；在每个反复分批发酵周期中，葡萄糖消耗速率在回用后的前12 h内迅速增加；甘油的产量、得率和生产能力从第1个回用周期开始增加，并稳定在较高的水平；与第一级发酵结果（甘油产量和得率分别为 $119.83\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、52.10%）相比，当回用周期达到15次时，甘油的平均产量、平均得率和平均增长率分别为 $138.69\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、60.17%和15.48%，平均生产能力为 $2.31\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ，增加了39.16%。因此，这15个周期的反复分批发酵结果证明，所确定的酵母细胞回用条件是比较合理的。但是，在实验中也发现，当细胞回用至第13次时，菌体开始出现衰退现象，到第15次时逐渐凝聚成黄色土样小菌团，从而导致其甘油合成能力减弱，最后3次回用的甘油产量仅增加了11.79%、10.73%和8.64%。综合以上因素，*C. glycerinogenes*反复分批发酵的细胞回用周期以12~14次为好。

### 3 结 论

本文研究了贫磷、适磷和富磷培养基中相互对接对*C. glycerinogenes*甘油生产的影响，当酵母细胞在适磷（±P）培养基中发酵一定时间后，经无菌离心转接入贫磷（-P）培养基中继续发酵，甘油产量显著提高。在此基础上，提出了酵母细胞回用的反复分批发酵策略，并确定了反复分批发酵过程中细胞回用的条件，即：第一批发酵的培养基为适磷培养基（ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 浓度为 $0.4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ），反复分批发酵阶段的回用培养基为贫磷培养基（ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 浓度为 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ）；当上一批次发酵液中葡萄糖浓度降至 $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下时，将酵母细胞无菌离心后不经洗涤全部转接入贫磷培养基中继续下一批次的发酵。经过15个细胞回用周期的反复分批发酵过程，甘油的平均产量、平均得率和平均生产能力分别达到 $138.69\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、60.17%和 $2.31\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ，分别增加了15.74%、15.48%和39.16%。当酵母细胞回用到第15个周期时，菌体出现严重衰退，因此*C. glycerinogenes*反复分批发酵的细胞回用周期以12~14次为好。

### References

- [1] Mohammad J, Taherzadeh, Lennart A, Gunnar L. Strategies for enhancing fermentative production of glycerol: a review. *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, **31**: 53-66
- [2] Zhuge Jian (诸葛健), Fang Huiying (方慧英), Zhuge Bin (诸葛斌). The past and present of glycerol production by fermentation. *Industrial Microbiology (工业微生物)*, 1997, **27** (3): 34-36
- [3] Zhuge J, Fang H Y, Wang Z X. Glycerol production by a novel osmotolerant yeast *Candida glycerinogenes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, **55**: 686-692
- [4] Wang Z X, Zhuge J, Prior B A. Glycerol producing by microbial fermentation: a review. *Biotechnol. Adv.*, 2001, **19**: 210-223
- [5] Liu Y Q, Liu D H. Kinetic study on glycerol production by repeated batch fermentation using free *Candida krusei*. *Process Biochemistry*, 2004, **39**: 1507-1510
- [6] Bemito G G, Ozores M, Pena M. Continuous glycerol production in a packed-bed bioreactor with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 1994, **49**: 209-212
- [7] Mostafa N A, Magdy Y H. Utilization of molasses and akalona hydrolyzate for continuous glycerol production in a packed-bed bioreactor. *Energy Convers. Mgmt.*, 1998, **39**: 671-677
- [8] Bisping B, Rehm H J. Production of glycerol by immobilized *Pichia farinosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1990, **32**: 380-383
- [9] Vijaikishore P, Karanth N G. Glycerol production by immobilized cells of *Pichia farinosa*. *Biotechnology Letters*, 1986, **8** (4): 257-260
- [10] Lambert M, Neish A C. Ropic method for estimation of glycerol in fermentation solutions. *Can. J. Res.*, 1956, **28**: 83-89
- [11] Xie Tao (谢涛), Fang Huiying (方慧英), Zhuge Jian (诸葛健). Effect of phosphorous sources on glycerol production and kinetic analysis of glycerol fermentation by *Candida glycerinogenes*. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China) (化工学报)*, 2005, **56** (12): 2404-2409
- [12] Liu Yongqiang (刘永强), Liu Dehua (刘德华), Ma Zhiguo (马志国). Main factors affecting preparation of glycerol in repeated batch fermentation. *Journal of Chemical Industry and Engineering (China) (化工学报)*, 2002, **53** (11): 1139-1142