

# 代谢甘油高产乳酸的菌种选育及培养基优化

洪安安<sup>1,2</sup> 程可可<sup>3</sup> 孙燕<sup>2</sup> 陈珍<sup>1</sup> 彭枫<sup>1</sup> 刘灿明<sup>1\*</sup> 刘德华<sup>2\*</sup>

(1. 湖南农业大学理学院 湖南 长沙 410128)

(2. 清华大学化学工程系 北京 100084)

(3. 清华大学核能与新能源技术研究院 北京 100084)

**摘要:** 分离出一株可高效利用甘油生产乳酸的菌株, 经过生理生化和 16S rDNA 分子鉴定, 确定其属于大肠埃希氏菌, 命名为 *Escherichia coli* AC-521。通过五因素四水平正交试验, 优化了其最佳发酵培养基成分为初始甘油 70 g/L, 酵母粉 4 g/L, 蛋白胨 7 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.5 g/L。利用该最佳条件的 5 L 发酵罐批式补料发酵实验表明: 该菌株发酵 80 h 后, 乳酸产量可达到 74.5 g/L, 得率为 0.87 mol/mol 甘油。

**关键词:** 乳酸, 甘油, 筛选, 鉴定, 优化

## Strain Screening for Bioconversion of Glycerol to Lactic Acid and Optimization of Culture Medium

HONG An-An<sup>1,2</sup> CHENG Ke-Ke<sup>3</sup> SUN Yan<sup>2</sup> CHEN Zhen<sup>1</sup>  
PENG Feng<sup>1</sup> LIU Can-Ming<sup>1\*</sup> LIU De-Hua<sup>2\*</sup>

(1. College of Science, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128, China)

(2. Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

(3. Institute of Nuclear and New Energy Technology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**Abstract:** A strain, *Escherichia coli* AC-521, which could efficiently convert glycerol to lactic acid, was isolated from soil samples. A series of morphological and biochemical characteristics and sequence analysis of 16S rDNA reveal that it belongs to *Escherichia coli*. Through orthogonal experiment of L16(4<sup>5</sup>), the optimum medium compositions were determined as initial glycerol 70 g/L, yeast extract 4 g/L, peptone 7 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 g/L, and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.5 g/L. The 5L fermenter fed-batch fermentation was performed under optimal conditions, giving 74.5 g/L lactic acid with a yield of 0.87 mol/mol glycerol after 80 hours.

**Keywords:** Lactic acid, Glycerol, Isolation, Identification, Optimization

乳酸(Lactic acid)是 21 世纪最具有发展前景的有机酸之一,广泛地应用于制药、食品、皮革、纺织等工业中<sup>[1,2]</sup>。近年来,随着乳酸及其衍生物应用领域的不断扩大和消费量的增加,乳酸的需求量也不

断增加。特别是由乳酸聚合成的聚乳酸(PLA),作为无毒、可降解、具有生物相容性的高分子材料,已广泛应用于制造生物可降解塑料、绿色包装材料和药用修复材料<sup>[3]</sup>。预计 2011 年世界乳酸需求量将突

破 200 万吨<sup>[4]</sup>。迄今为止,国内外对微生物生产乳酸的研究主要集中在利用可再生的农业原料(如大麦,淀粉,玉米,土豆等)作为原料生产乳酸上,然而,乳酸的市场的进一步扩大将有可能受其生产原材料的限制<sup>[5]</sup>。

全球能源危机加快了生物柴油的产业化进程,而生物柴油的规模化发展带来了大量的副产物甘油(每生产 1 吨生物柴油将副产 0.1 吨粗甘油)。粗甘油可以通过各种工艺路线转化为 1,3-丙二醇、环氧氯丙烷、聚羟基脂肪酸酯、氢等高附加值产品<sup>[6-8]</sup>。而利用甘油为原料发酵生产乳酸的研究还未见文献报道。因此,如果能够利用粗甘油为原料生产乳酸,不仅能为乳酸的生产提供一条新的途径,而且为市场上过剩的粗甘油提供出路。

目前可以应用到工业上的乳酸生产菌株主要以葡萄糖为底物,最大乳酸产量可达 195.5 g/L<sup>[9]</sup>。而文献报道中可利用甘油为唯一碳源且其代谢产物中含有乳酸的微生物有克雷伯氏菌属(*Klebsiella*),梭状芽孢杆菌属(*Clostridia*)和乳酸菌属(*Lactobacillus*)等<sup>[10-12]</sup>,但在这些研究中,乳酸仅仅作为发酵副产物出现,其产量、生产强度和得率都极低,乳酸产量最高仅为 19 g/L,得率低于 0.15 mol/mol 甘油<sup>[13]</sup>。本研究目的为筛选到一株能够高效代谢甘油并高产乳酸的菌株,并对其发酵条件进行优化。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

从土壤和污泥中采集样品共 10 余份,从中分离微生物菌种。

### 1.2 培养条件

**1.2.1 培养基:** 富集培养基: 蛋白胨 5.0 g, 牛肉膏 2.0 g, 酵母粉 3.0 g, NaCl 3.0 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0 g, 甘油 60.0 g, 乳酸钙 15.0 g, 0.4% 溴甲酚紫 (pH 5.2 黄-pH 6.8 紫) 2 mL, 定容至 1 L, pH 7.0。

分离培养基: 蛋白胨 5.0 g, 牛肉膏 2.0 g, 酵母粉 3.0 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0 g, 甘油 60.0 g, 乳酸钙 15.0 g, 1% 溴甲酚紫 2 mL, 琼脂粉 18 g, 定容至 1 L, pH 7.5。

种子培养基: 蛋白胨 5.0 g, 牛肉膏 2.0 g, 酵母粉 3.0 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0 g, 甘油 30.0 g, 定容至 1 L, pH 7.0。

发酵培养基: 蛋白胨 5.0 g, 牛肉膏 2.0 g, 酵母

粉 3.0 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0 g, 甘油 60.0 g, 定容至 1 L。

斜面保藏培养基: 蛋白胨 5.0 g, 牛肉膏 2.0 g, 酵母粉 3.0 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0 g, NaCl 3.0 g, 甘油 20.0 g, 琼脂粉 18.0 g, 定容至 1 L, pH 7.0。

以上培养基,均于 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 20 min 后备用。

**1.2.2 复筛发酵培养:** 发酵培养基 100 mL 盛于 250 mL 三角瓶中,并添加 2% (W/W) 已灭菌的 CaCO<sub>3</sub>, 接种后在旋转式摇床上, 40°C, 转速 150 r/min, 发酵培养 48 h。

**1.2.3 斜面及平板培养:** 37°C 培养 24 h。

### 1.3 乳酸产生菌的筛选方法

取 1 g 土样或泥样到加有溴甲酚紫的富集培养基中,增殖培养 48 h 后,转接于新的富集培养基培养 48 h,如此重复 3 代。选取变浑浊且颜色由紫色变黄的样品,稀释涂布于固体分离培养基平板形成单菌落,倒平板前加入 2% (W/W) 的 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 30 min 的 CaCO<sub>3</sub>,根据产生颜色的深浅程度及透明圈的大小进行初筛。挑选长势良好、菌落周围黄色明显、透明圈大的菌落进行摇瓶发酵复筛,测定发酵液中乳酸的浓度,选出乳酸产量较高的菌株<sup>[14]</sup>。

### 1.4 菌种鉴定

**1.4.1 生理生化实验:** 使用凤凰微生物自动分类系统(美国 BD 公司)和 API 20 E 鉴定系统(法国梅里埃公司),鉴定方法参照文献<sup>[15]</sup>。

**1.4.2 细菌染色体 DNA 的提取:** 参照文献<sup>[16]</sup>。

**1.4.3 引物:** 细菌 16S rDNA 通用引物,序列如下:

正向引物 A: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 反向引物 B: 5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3'。

**1.4.4 16S rDNA 基因的 PCR 扩增和测序:** PCR 反应体系为: 50 μL 反应体系中加入 ddH<sub>2</sub>O 22 μL, 10×PCR 缓冲液 15 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 5 μL, 0.5 pmol/μL 引物 A 和 B 各 0.5 μL, 模板 DNA 2 μL, Taq DNA 聚合酶 5 μL。扩增实验 PCR 按下述反应条件进行: 94°C 5 min; 94°C 60 s, 50°C 2 min, 72°C 3 min, 循环 30 次; 72°C 10 min。扩增产物用琼脂糖电泳鉴定,证明已扩增到一条 1.4 kb 左右的扩增片段,扩增片段用小量回收纯化试剂盒进行纯化回收,送北京三博远志生物技术有限责任公司进行测序。

**1.4.5 16S rDNA 基因序列比较分析:** 将获得的菌株 521<sup>#</sup>的 16S rDNA 基因序列,在 NCBI 网站与已经收录的核酸序列进行搜索比对,比较该菌株与已知细菌相应序列的相似程度。

## 1.5 分析方法

生物量: 采用比浊法测定。波长 600 nm 下的细胞光密度(OD), 根据标准曲线计算生物量。细胞干重(CDW)测量: 取 20 mL 发酵液, 将发酵液离心后(12000 r/min, 10 min), 用去离子水充分洗涤, 在 80°C 下干燥至恒重。高效液相色谱(HPLC)分析用于测量发酵液中的各种有机酸和醇类等组分。采用(岛津)高效液相色谱仪: 色谱柱为 HPX-87H 柱, 柱温 65°C; 流动相为 0.005 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 流速 0.8 mL/min; 检测器为 RID-10A 型折光示差检测器, 进样量为 20 μL。

## 1.6 发酵罐实验

将于甘油管保藏的菌种转接至斜面保藏培养基, 37°C 下活化 12 h。种子培养采用有氧培养, 使用 500 mL 三角瓶, 装液量 100 mL。培养温度 37°C, 摇床转速 200 r/min。批式补料发酵实验在 5 L 全自动发酵罐(B. Braun Bplus 5 L)中进行, 装液量 4 L, 接种量 2%。发酵温度 40°C, 转速 300 r/min, 通入 0.5 vvm 的空气保持微氧环境。发酵过程中 pH 值控制在 6.5。甘油补料时间为 20 h~60 h, 发酵过程中控制甘油浓度不低于 20 g/L。

## 2 结果与讨论

### 2.1 菌株筛选

从土壤和污泥样品 10 余份, 通过初筛挑取菌落周围黄色明显、透明圈大的 33 个菌株进行摇瓶发酵复筛。经反复复筛得到 9 株产酸较稳定的菌株。以 HPLC 法测定乳酸及其它杂酸的含量, 其中 521<sup>#</sup>菌株产乳酸最高且稳定, 该菌株发酵培养 72 h 后, 乳酸产量达 34.2 g/L, 甘油摩尔得率为 0.84。选取 521<sup>#</sup>菌株作为下一步研究的菌株, 命名为 AC-521。

### 2.2 菌株 AC-521 的鉴定

**2.2.1 菌株 AC-521 的形态特征:** 菌落形态为圆形, 边缘光滑, 白色不透明, 菌落直径 0.8 mm~1.2 mm (37°C, 24 h)。镜检观察为短杆状, 单个或成对出现, 少数成链状, 有鞭毛, 无孢子, 革兰氏染色阴性。

**2.2.2 菌株 AC-521 的生理生化实验结果:** 菌株 AC-521 为兼性厌氧菌, 革兰氏阴性, 能利用醋酸盐但不能利用柠檬酸盐作为唯一碳源。能消耗硝酸盐, 且能发酵葡萄糖和其他碳水化合物产酸。在 TSI 上不产生 H<sub>2</sub>S, 吲哚反应阳性, 多数生理生化特性与大肠埃希氏菌(ATCC 25922)相似。将该菌株的生理生

化实验结果和大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)的生理生化特征进行比较, 结果如表 1 所示, 系统分析结果显示菌株 AC-521 为 *E. coli* 的可能性为 99%。但菌株 AC-521 可以发酵蔗糖产酸, 对鸟氨酸脱羧酶测定的结果为阴性, 与 ATCC 25922 有所不同。

**2.2.3 菌株 AC-521 的 16S rDNA 基因序列比较分析:** 提取细胞总 DNA, 以引物 A 和 B 扩增菌株 AC-521 的 16S rDNA 基因, 获得长度为 1463 bp 的 16S rDNA 序列。将测定的 16S rDNA 基因序列在

表 1 生理生化鉴定结果  
Table 1 Results of morphological and biochemical identification

生理生化特性 Characteristics	AC-521	生理生化特性 Characteristics	AC-521
精氨酸双水解酶 Arginine Dihydrolase	-	葡萄糖 Glucose	+
赖氨酸脱羧酶 Lysine Decarboxylase	-	甲基红 Methyl Red	+
柠檬酸盐 Citrate	-	蔗糖 Sucrose	+
粘菌素 Colistin	-	脲素 Urea	-
山梨醇 Sorbitol	+	苦杏仁苷 Amygdalin	-
半乳糖苷 Galactoside	-	VP 试验 VP-Experiment	-
吲哚试验 Indole Test	+	D-果糖 D-Fructose	+
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine Decarboxylase	-	明胶水解 Gelatin Hydrolysis	-
甘氨酸-脯氨酸 Glycine-Proline	-	肌醇 Inositol	-
β-半乳糖苷酶 β-Galactosidase	+	阿拉伯糖 Arabinose	+
苯丙氨酸 Phenylalanine	-	硝酸盐还原试验 Nitrate Reduction Test	+
色氨酸脱羧酶 Tryptophan Decarboxylase	-	鼠李糖 Rhamnose	+
甘露醇 Mannitol	+	乳糖 Lactose	+
H <sub>2</sub> S Hydrogen Sulfide	-	醋酸盐 Acetate	+
蜜二糖 Melibiose	+	氧化酶 Oxidase	-
谷氨酸 Glutamate	-	麦芽糖 Maltose	+

注: +: 阳性; -: 阴性。

Note: +: Positive reaction; -: Negative reaction.

NCBI(National Center for Biotechnology Information) 网站进行序列对比(已提交 GenBank, No. FJ178002), 并利用 Clustal X 软件进行多重序列比对并绘制进化树, 图 1 表明, AC-521 与 *E. coli* 位于同一分支, 且 AC-521 与 *E. coli* 的同源性最高, 为 99%, 因此根据 16S rDNA 序列分析和生理生化实验结果, 确定菌株 AC-521 属于埃希氏菌属中的 *E. coli*, 拟命名为 *E. coli* AC-521。

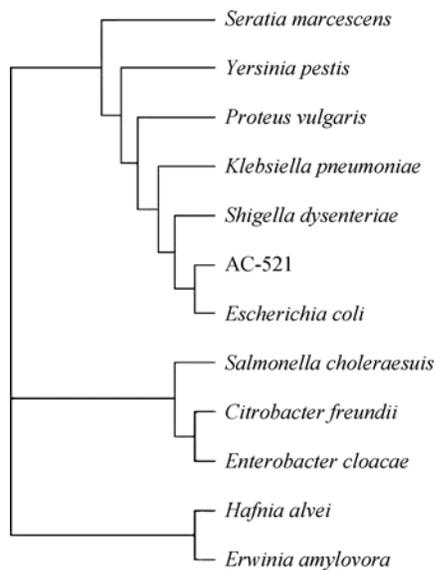


图 1 菌株 AC-521 在肠杆菌科中的系统发育地位  
Fig. 1 Phylogenetic position of strain AC-521 in Enterobacteriaceae

### 2.3 菌株 AC-521 发酵乳酸的培养基优化

为了优化 *E. coli* AC-521 培养基成分, 选择对乳酸发酵有较大影响的甘油、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、蛋白胨、酵母粉、 $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 进行  $\text{L16}(4^5)$  的正交实验以确定培养基各组分最佳组合<sup>[17,18]</sup>。其因素与水平见表 2, 试验结果及相应的极差分析见表 3。

由表 3 可看出, 5 个因素的最佳组合为  $\text{A}_4\text{B}_3\text{C}_2\text{D}_4\text{E}_3$ , 由于这个条件不在这 16 次试验中, 补充验证试验  $\text{A}_4\text{B}_3\text{C}_2\text{D}_4\text{E}_3$ , 乳酸产量为 42.2 g/L, 高

水平 Level	(A) 酵母粉 Yeast extract (g/L)	(B) 蛋白胨 Peptone (g/L)	(C) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ammonium sulfate (g/L)	(D) $\text{K}_2\text{HPO}_4$ potassium phosphate dibasic (g/L)	(E) 甘油 Glycerol (g/L)
1	1	3	8	1	50
2	2	5	10	1.5	60
3	3	7	12	2	70
4	4	9	14	2.5	80

表 3 正交试验结果及极差分析结果  
Table 3 Results of orthogonal experiment and range analysis

	A	B	C	D	E	乳酸浓度 The concentration of lactic acid (g/L)
1	1	1	1	1	1	27.8
2	1	2	2	2	2	30.5
3	1	3	3	3	3	32.1
4	1	4	4	4	4	32.0
5	2	1	2	3	4	37.1
6	2	2	1	4	3	37.5
7	2	3	4	1	2	32.7
8	2	4	3	2	1	30.5
9	3	1	3	4	2	36.3
10	3	2	4	3	1	33.8
11	3	3	1	2	4	36.4
12	3	4	2	1	3	35.8
13	4	1	4	2	3	37.5
14	4	2	3	1	4	33.2
15	4	3	2	4	1	40.5
16	4	4	1	3	2	38.4
$K_1$	30.600	34.675	35.025	32.375	33.150	
$K_2$	34.450	33.750	35.975	33.725	34.475	
$K_3$	35.575	35.425	33.025	35.350	35.725	
$K_4$	37.400	34.175	34.000	36.575	34.675	
R	6.800	1.675	2.950	4.200	2.575	

于最好的 15 号试验, 因此以  $\text{A}_4\text{B}_3\text{C}_2\text{D}_4\text{E}_3$  为最佳培养基组成。

### 2.4 菌株 AC-521 发酵甘油生产乳酸的批式补料发酵实验

为进一步提高发酵液中的乳酸浓度, 根据以上实验得出的培养基的最佳配方, 在 5 L 全自控搅拌发酵罐中进行批式补料发酵实验, 如图 2 所示, 乳酸浓度在发酵 6 h~44 h 时快速增长, 乳酸的生产强度达到 1.09 g/L·h, 甘油的消耗速率为 1.67 g/L·h, 但发酵 44 h 后菌体的浓度逐渐降低, 乳酸生产强度也逐渐下降, 可能的原因是随着乳酸浓度的增加, 菌体生长受到了一定程度的抑制。菌株 AC-521 代谢甘油的主要副产物是乙酸, 其次为丁二酸, 乙醇和 1,3-丙二醇。与其他副产物相比, 乙醇的快速增长期最早, 但在发酵后期, 乙醇的浓度逐渐降低, 可能是由于发酵过程中乙醇有一定程度的挥发。发酵 80 h 后, 乳酸最终浓度为 74.5 g/L, 乳酸摩尔得率为 0.87, 平均生产强度约 0.93 g/L·h。乙酸在发酵 60 h 后大量产生, 最终浓度为 7.2 g/L。其他副产物丁二

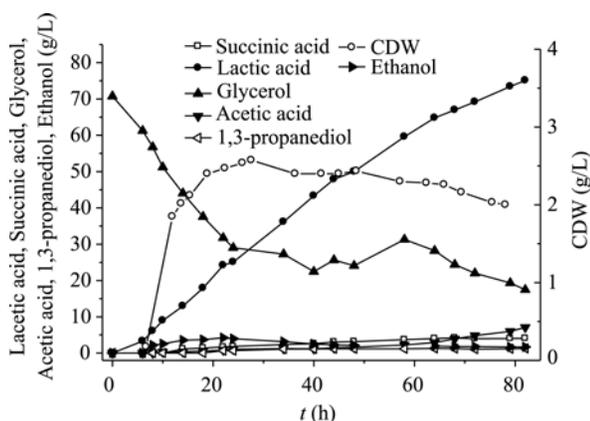


图 2 菌株 AC-521 的甘油批次补料发酵过程

Fig. 2 Time course of glycerol fed-batch fermentation by *E. coli* AC-521

酸, 1,3-丙二醇的最终浓度分别为 4.2 g/L, 2.1 g/L。

在 *E. coli* 中, 经过甘油激酶及 3-磷酸甘油脱氢酶两步催化反应, 甘油被转化为磷酸二羟基丙酮 (DHAP), 再进入糖酵解代谢途径, 在厌氧条件下, 丙酮酸被 D-/L-乳酸脱氢酶催化生成乳酸<sup>[19]</sup>。甘油为原料发酵乳酸的代谢过程中, 胞内较高的还原状态 (即高浓度的 NADH) 有利于乳酸合成; 甘油比葡萄糖处在更高的还原状态, 故从此角度分析甘油为原料有利于乳酸的合成<sup>[20]</sup>。

### 3 结论

本实验从自然界中分离得到 33 株可代谢甘油生产乳酸的菌株, 其中一株菌发酵 72 h 后, 乳酸产量可达 34.2 g/L, 甘油摩尔得率为 0.84, 经过生理生化及 16S rDNA 分子鉴定, 确定为大肠埃希氏菌 (*E. coli*), 命名为 *E. coli* AC-521。通过正交实验设计对该菌的发酵培养基进行优化, 得到的最佳培养基组合为: 初始甘油 70 g/L, 酵母粉 4 g/L, 蛋白胨 7 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  10 g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2.5 g/L。为进一步提高发酵液中的乳酸浓度, 在最佳培养基条件下, 进行 5 L 发酵罐批次补料发酵实验, 该菌株发酵 80 h 后, 乳酸产量可达 74.5 g/L, 甘油摩尔得率为 0.87, 平均生产强度约 0.93 g/L·h, 表明 *E. coli* AC-521 能高效代谢甘油并生产乳酸。

### 参考文献

[1] Datta R, Tsai SP, Bonsignore P, *et al.* Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiol Rev*, 1995, **16**(2): 221–231.  
 [2] 王博彦, 金其荣. 发酵有机酸生产与应用手册. 北京: 中国轻工业出版社, 2000, pp. 337–389.

[3] Reddy G, Altaf Md, Naveena BJ, *et al.* Amylolytic bacterial lactic acid fermentation-a review. *Biotechnol Advances*, 2008, **26**(1): 22–34.  
 [4] Ramesh MV. A wonder chemical that help make biodegradable plastic, why India need to milk the full potential of lactic acid. *India Mkt Empowering Business*, 2001, **4**.  
 [5] Mirasol F. Lactic acid prices falter as competition toughens. *Chemical market reporter*, 1999, **3**.  
 [6] Cameron DC, Altaras NE, Hoffman ML, *et al.* Metabolic engineering of propanediol pathways. *Biotechnol Prog*, 1998, **14**(1): 116–125.  
 [7] Freddy G. Solvay will make epichlorohydrin from glycerol. *Industrial Bioprocessing*, 2006, **28**(3): 8–9.  
 [8] Koller M, Bona R, Braunegg G, *et al.* Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. *Biomacro molecules*, 2005, **6**(2): 561–565.  
 [9] Bai DM, Zhao XM, Li XG, *et al.* Strain improvement and metabolic flux analysis in the wild-type and a mutant *Lactobacillus lactis* strain for L(+)-lactic acid production. *Biotechnol Bioeng*, 2004, **88**(6): 681–689.  
 [10] Cheng KK, Zhang JA, Liu DH, *et al.* Production of 1, 3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* from glycerol broth. *Biotechnol Lett*, 2006, **28**: 1817–1821.  
 [11] Biebl H. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum*-batch and continuous culture studies. *Ind Microbiol Biotechnol*, 2001, **27**(1): 18–26.  
 [12] El-Ziney MG, Arneborg N, Uyttendaele M, *et al.* Characterization of growth and metabolite production of *Lactobacillus reuteri* during glucose/glycerol cofermentation in batch and continuous cultures. *Biotechnol Lett*, 1998, **20**(10): 913–916.  
 [13] Hao J, Lin RH, Zheng ZM, *et al.* Isolation and characterization of microorganisms able to produce 1,3-propanediol under aerobic conditions. *World J Microbiol Biotechnol*, 2008, **24**(9): 1731–1740.  
 [14] 仇俊鹏, 徐岩, 阮文权, 等. L-乳酸发酵的代谢调控育种及发酵影响因素的研究. *微生物学通报*, 2007, **34**(5): 929–933.  
 [15] 布坎南 RE, 吉本斯 NE. 伯杰氏细菌鉴定手册. 北京: 科学出版社, 1984, pp. 385–400.  
 [16] 黄培堂. 分子克隆. 北京: 北京科学技术出版社, 2002, pp. 45–50.  
 [17] 黄谷亮, 秦菊霞, 等. 干酪乳杆菌产 L-乳酸发酵条件的研究. *广西大学学报(自然科学版)*. 2007, **32**(4): 376–379.  
 [18] 高年发, 孙晓雯, 许俊艳, 等. 细菌 L-乳酸发酵培养基的优化. *中国酿造*. 2008, **7**: 30–32.  
 [19] Lemieux MJ, Huang YF, Wang DN. Glycerol-3-phosphate transporter of *Escherichia coli*: Structure, function and regulation. *Research in Microbiology*. 2004, **155**: 623–629.  
 [20] 许贇珍, 欧先金, 郭妮妮, 等. 生物柴油副产物甘油的高附加值利用. *过程工程学报*. 2008, **8**(4): 695–702.