

一些氨基酸对产甘油假丝酵母甘油生产的促进作用

Stimulatory Effects of Some Amino Acids on Glycerol Production by *Candida glycerinogenes*

谢 涛, 方慧英, 诸葛健*

XIE Tao, FANG Hui-Ying and ZHUGE Jian*

江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214036

The Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China

摘 要 以 EMP 途径与 TCA 循环中间代谢物的添加为对照, 研究在尿素为氮源的产甘油假丝酵母发酵过程中添加氨基酸对甘油产量的影响。结果表明: 对甘油产量有强促进作用的氨基酸有谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺、甘氨酸、赖氨酸、酪氨酸、脯氨酸、组氨酸和丝氨酸, 其最适添加浓度在 0.26 ~ 0.45 g/L 之间; 丙酮酸、 α -酮戊二酸、草酰乙酸、柠檬酸和琥珀酸的最适添加浓度在 0.24 ~ 0.42 g/L 之间; 赖氨酸最适于在 0h 添加, 丙酮酸和草酰乙酸在第 14h, 谷氨酸、谷氨酰胺、组氨酸、脯氨酸、天冬氨酸、酪氨酸、甘氨酸、 α -酮戊二酸和琥珀酸在第 30h, 天冬酰胺、丝氨酸和柠檬酸在第 48h; 在最适条件下添加这些促进剂, 甘油产量均呈显著增加趋势, 转化率和增加率分别达到 60% 和 16% 以上。氨基酸的作用机理为其脱氨形成的碳骨架经特定的分解代谢途径进入 TCA 循环, 使其强化, 导致碳代谢流在 3-磷酸甘油醛节点处发生转移, 使甘油合成途径的代谢流增加。

关键词 氨基酸, 产甘油假丝酵母, 甘油生产, EMP 途径, TCA 循环, 中间代谢物

中图分类号 TQ92 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2006)01-0138-06

Abstract By using some intermediate metabolites in EMP pathway and TCA cycle as the control, the effects of amino acid supplements on glycerol production by *Candida glycerinogenes* in shake-flask fermentations with urea as nitrogen resource were investigated. The results showed that ten kinds of amino acids, including L-glutamic acid, L-glutamine, L-aspartic acid, L-asparagine, L-glycin, L-lysine, L-tyrosine, L-proline, L-histidine, and L-serine, had strong promotional effects on glycerol production; The optimal concentrations of these amino acids were 0.40, 0.45, 0.36, 0.35, 0.39, 0.36, 0.35, 0.45, 0.26, and 0.45 g/L, respectively. Accordingly the optimum contents of pyruvic acid, α -oxoglutarate, oxaloacetic acid, citrate, and succinate were 0.24, 0.42, 0.40, 0.37, and 0.38 g/L, respectively. The advantageous opportunities of supplement were as follows: L-lysine at the beginning of fermentation; pyruvic acid and oxaloacetic acid at the fourteenth hour; L-glutamic acid, L-glutamine, L-histidine, L-proline, L-aspartic acid, L-tyrosine, L-glycin, α -oxoglutarate, and succinate at the thirtieth hour; and L-asparagine, L-serine, and citrate at the forty-eighth hour. The addition of each stimulant at the optimal conditions could significantly promote glycerol production, with the glycerol yield on initial glucose and its increased speed exceeding 60% and 16%, respectively. The possible stimulatory mechanism due to the amino acid supplements is that the increased intermediate metabolites levels from amino acids degradation may have enhanced the flux through TCA cycle, which improve cell energetics. Meanwhile, the shift of carbon metabolism flux at the glyceraldehyde-3-phosphate node can result in the incremental flux through glycerol biosynthesis pathway.

Key words amino acid, *Candida glycerinogenes*, glycerol production, Embden-Meyerhof-Parnas pathway, tricarboxylic acid cycle, intermediate metabolites

Received: August 29, 2005; Accepted: November 2, 2005.

* Corresponding author. Tel: 86-510-5874341; E-mail: jzhuge@sohu.com

氨基酸是一类很重要的生长限制因子,可以促进微生物生长和代谢产物合成,在酶制剂、抗生素、生化药物等众多发酵产品的生产过程得到普遍应用^[1-8]。甘油是一种重要的轻化工原料,已广泛应用于化妆品、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 多种产品中^[9]。耐高渗透压酵母 *Candida glycerinogenes* 发酵生产甘油具有高产量、高转化率和高回收率等优点,在我国已得到了较好的工业化应用^[10-12]。但是,在氨基酸、EMP 途径与 TCA 循环的中间代谢产物影响 *C. glycerinogenes* 产甘油发酵过程及其作用机理方面的研究,目前尚为空白。本文将依据 20 种氨基酸对 *C. glycerinogenes* 甘油产量的影响程度对其进行分类,确定具有强促进作用的氨基酸的最适作用浓度与添加时机,研究其对 *C. glycerinogenes* 发酵过程的影响。由于 EMP 途径和 TCA 循环的某些中间代谢产物,如丙酮酸、草酰乙酸和 α -酮戊二酸等,既是某些氨基酸合成的前体,又是氨基酸脱氨基后形成的碳骨架进入 TCA 循环的终端产物。因此,研究 EMP 途径和 TCA 循环中的某些关键中间代谢产物对 *C. glycerinogenes* 产甘油发酵的影响也是十分必要的,有助于阐明氨基酸的作用机理。

1 材料和方法

1.1 菌株和培养基

菌株: *Candida glycerinogenes* 由江南大学工业微生物研究中心提供。

种子培养基(g/L): 葡萄糖 100, 尿素 2, 玉米浆 8, 自然 pH 值。

合成发酵培养基(g/L): 葡萄糖 210~230, 尿素 2, KH_2PO_4 0.4, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, CaCl_2 0.1, NaCl 0.1, 微量元素溶液 1 mL/L, pH 值不调。

微量元素溶液(g/L): KI 0.2, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.9, Na_2S 0.3, 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

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),于往复摇床上 30℃ 振荡培养 19 h (振幅 10 cm, 振动

频率 110 次/min)。再按 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 摇瓶中进行发酵,发酵条件同种子培养。

1.3 测定方法

甘油的测定采用高碘酸钠-变色酸法^[10];葡萄糖的测定采用生物传感仪。

2 结果

2.1 氨基酸的作用类型及其添加量的确定

为了研究氨基酸对 *C. glycerinogenes* 产甘油发酵结果的影响,采用合成培养基,并在发酵开始时分别添加不同浓度梯度的单个氨基酸,然后进行发酵。根据甘油产量提高的程度,将 20 种氨基酸的作用类型分为以下三类:第一类,甘油产量提高 10% 以上,如谷氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、天冬酰胺、甘氨酸、赖氨酸、酪氨酸、脯氨酸、组氨酸和丝氨酸等,它们的最适添加量及其发酵结果见表 1,甘油对葡萄糖的转化率达到 60% 左右;第二类,甘油产量提高 5%~10%,如丙氨酸和精氨酸等;第三类,导致甘油产量下降,如苏氨酸、苯丙氨酸、半胱氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、蛋氨酸、缬氨酸和色氨酸等。实验结果还表明,随着氨基酸添加量的增加,第一类和第二类氨基酸对生物量的形成和葡萄糖的消耗基本没有影响(数据未列出);第三类氨基酸对生物量的影响也不显著,但葡萄糖的消耗速率和利用率明显下降,从而导致甘油产量减少、副产物增加(数据未列出)。与第一类氨基酸类似,在最适添加浓度下,丙酮酸、 α -酮戊二酸、草酰乙酸、柠檬酸和琥珀酸均能显著增加甘油的产量和转化率,甘油产量的提高达到 15% 以上(见表 1),这说明两者之间可能存在某种特殊的关系。

2.2 氨基酸添加时机的确定

为了考察不同发酵时期添加氨基酸对甘油发酵结果的影响,在发酵开始(0 h)、对数生长早期(14 h)、对数生长晚期(30 h)和稳定期中期(48 h)四个时刻,分别添加第一类氨基酸、丙酮酸、 α -酮戊二酸、草酰乙酸、柠檬酸和琥珀酸至其最适浓度,以确定其适宜的添加时机(见表 2):由表 2 可知,最适于 0 h 添加的只有赖氨酸,甘油产量提高了 17.61%;第 14 h 添加的有丙酮酸和草酰乙酸,甘油产量分别提高 19.07% 和 18.51%;第 30 h 添加的有谷氨酸、谷氨酰胺、组氨酸、脯氨酸、天冬氨酸、酪氨酸、甘氨酸、 α -酮戊二酸和琥珀酸,甘油产量的提高分别为 22.75%、23.17%、17.10%、16.74%、16.05%、18.08%、

21.37%、24.70% 和 17.30%；第 48h 添加的有天冬酰胺、丝氨酸和柠檬酸，甘油产量分别增加 18.35%、16.91% 和 21.95%；在适宜时机添加上述各种物质后，甘油产量的提高均超过 16%，甘油对葡萄糖的转化率达到 60% 以上。

表 1 氨基酸、EMP 途径与 TCA 循环中间代谢物最适添加量下的发酵结果
Table 1 Fermentation results at the optimal concentration of amino acids and intermediate metabolites in EMP pathway and TCA cycle

Stimulant	Control		Fermentation results			
	Glycerol/(g/L)	Yield ^b /%	Optimal content/(g/L)	Glycerol/(g/L)	Yield/%	△ Y ^c /%
L-glycin	117.55 ^a	53.41	0.39	133.81	60.82	13.87
L-serine	114.10	51.84	0.45	130.64	59.38	14.54
L-glutamic acid	118.53	53.85	0.40	137.28	62.45	15.97
L-glutamine	120.04	51.08	0.45	139.78	59.48	16.44
L-histidine	112.70	51.23	0.26	128.19	58.27	13.74
L-proline	119.35	51.89	0.45	135.65	58.98	13.66
L-tyrosine	112.00	50.90	0.35	127.75	58.07	14.09
L-lysine	115.90	51.52	0.36	132.57	58.92	14.36
L-aspartic acid	117.61	51.13	0.36	133.98	58.25	13.93
L-asparagine	114.17	51.84	0.35	128.19	58.27	12.40
Pyruvic acid	107.90	51.39	0.24	124.53	59.30	15.41
α-oxoglutarate	110.73	52.73	0.42	130.47	62.13	17.83
Oxaloacetic acid	123.49	51.45	0.40	143.12	59.63	15.90
Citrate	115.20	50.09	0.37	136.52	59.36	18.51
Succinate	115.67	52.58	0.38	134.96	61.35	16.68

Note: a—data represent the mean values of three independent experiments, b—the glycerol yield on initial glucose, c—the glycerol increased rate as compared with the control, the following is all the same.

表 2 氨基酸、EMP 途径与 TCA 循环中间代谢产物添加时机的确定
Table 2 Determination on the supplement time of amino acids and intermediate metabolites in EMP pathway and TCA cycle

Stimulant	Control		Supplement opportunity							
			0h		14h		30h		48h	
	Glycerol/(g/L)	Yield/%	Glycerol/(g/L)	Yield/%	Glycerol/(g/L)	Yield/%	Glycerol/(g/L)	Yield/%	Glycerol/(g/L)	Yield/%
L-glutamic acid	102.32	49.91	114.39	55.80	115.43	56.31	125.60	61.27	124.36	60.66
L-glutamine	102.32	49.91	120.18	58.63	116.43	56.80	126.03	61.48	122.23	59.62
L-histidine	113.49	51.58	128.20	58.27	129.03	58.65	132.90	60.41	125.72	57.14
L-proline	114.34	51.97	126.96	57.71	126.12	57.33	133.48	60.67	127.40	57.91
L-aspartic acid	118.19	53.72	129.55	58.89	129.96	59.07	137.16	62.35	124.58	57.33
L-asparagine	114.64	52.11	125.31	56.96	120.40	54.73	124.06	56.39	135.68	61.67
L-tyrosine	113.49	51.58	130.12	59.15	129.55	58.89	134.01	60.91	127.48	57.94
L-lysine	114.64	52.11	134.83	61.29	127.17	57.80	120.31	54.68	125.11	56.87
L-glycin	112.86	51.30	134.11	60.96	125.40	57.00	136.98	62.26	136.60	62.09
L-serine	114.64	52.11	128.68	58.49	116.74	53.06	127.63	58.01	134.03	60.92
Pyruvic acid	106.65	52.02	113.06	55.15	126.99	61.95	119.42	58.25	115.34	56.26
Oxaloacetic acid	120.56	51.30	138.58	58.97	142.87	60.80	134.48	57.23	129.35	55.04
α-oxoglutarate	102.32	49.91	116.48	56.82	108.69	53.02	127.59	62.24	120.66	58.86
Succinate	112.86	51.30	129.80	59.00	123.58	56.17	132.38	60.17	130.66	59.39
Citrate	115.93	52.70	132.38	60.17	127.31	57.87	129.32	58.78	141.38	64.26

2.3 适宜条件下添加氨基酸的摇瓶发酵过程

根据上述确定的最适添加浓度和适宜添加时机,分别考察第一类氨基酸、丙酮酸、α-酮戊二酸、草酰乙酸、柠檬酸和琥珀酸等对 *C. glycerinogenes* 摇瓶发酵过程的影响。在摇瓶发酵过程中,生物量的增

加和葡萄糖的消耗趋势基本不受第一类氨基酸、丙酮酸、α-酮戊二酸、草酰乙酸、柠檬酸和琥珀酸添加的影响(数据未列出),而对甘油的生成过程则影响较大(见图 1)。由图 1 可看出,随着第一类氨基酸、丙酮酸、α-酮戊二酸、草酰乙酸、柠檬酸和琥珀酸等

的添加,甘油产量呈显著增加趋势;而且,添加时机越晚甘油产量在其添加后即急剧增加(如天冬酰胺、丝氨酸和柠檬酸等),添加时机越早甘油的产量则缓慢增加(如草酰乙酸、丙酮酸和赖氨酸等)。表 3 为图 1 所示四组发酵过程结束时,甘油的产量、转化率和增加率等参数的比较。再将表 3 与表 2 中的实验结果进行比较可以看出,发酵培养基中初始葡萄糖

浓度对甘油产量的增加存在一定的影响。在同一种氨基酸添加量不变时,随着初始葡萄糖浓度的升高,甘油产量的增加率出现三种情况:(1)提高,如组氨酸、脯氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺和琥珀酸等;(2)下降,如谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、酪氨酸、丙酮酸和柠檬酸等;(3)基本不变,如丝氨酸、赖氨酸和 α -酮戊二酸等。

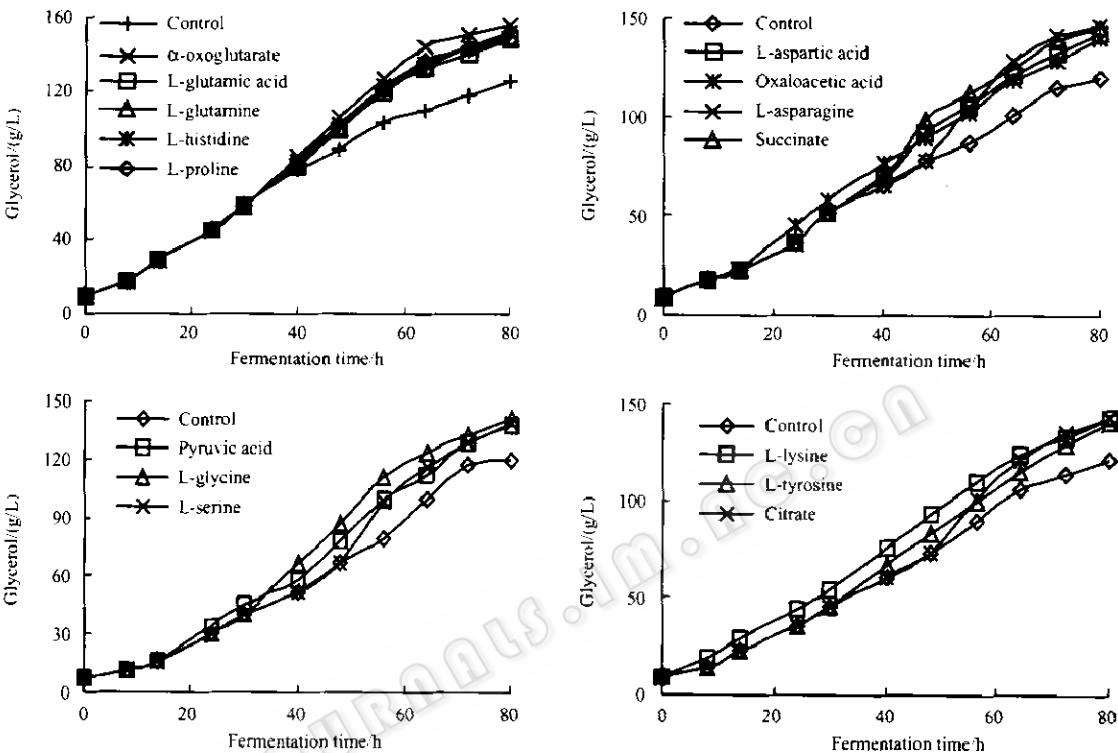


图 1 添加氨基酸、EMP 途径与 TCA 循环中间代谢物的摇瓶发酵过程

Fig. 1 Time courses of fermentation in shake-flask after adding amino acids and intermediate metabolites in EMP pathway and TCA cycle

表 3 添加氨基酸、EMP 途径与 TCA 循环中间代谢物后发酵结束时各项参数的比较
Table 3 Comparison of fermentation parameters after adding amino acids and intermediate metabolites in EMP pathway and TCA cycle at the end of fermentation

Stimulant	Control		Fermentation parameters		
	Glycerol/(g/L)	Yield/%	Glycerol/(g/L)	Yield/%	△ Y/%
L-glutamic acid	125.04	52.10	148.74	61.98	18.96
L-glutamine			149.88	62.45	19.87
L-histidine			151.46	63.11	21.13
L-proline			148.20	61.75	18.52
α-oxoglutarate			155.92	64.97	24.70
L-aspartic acid	120.15	52.24	143.52	62.40	19.45
L-asparagine			146.62	63.75	22.03
Oxaloacetic acid			142.95	62.15	18.98
Succinate			145.34	63.19	20.96
L-glycin	119.92	52.14	142.71	62.05	19.01
L-serine			140.68	61.17	17.31
Pyruvic acid			139.94	60.84	16.69
L-tyrosine	120.61	52.44	140.37	61.03	16.38
L-lysine			141.94	61.71	17.69
Citrate			143.69	62.48	19.14

3 讨论

本研究目的是要确定在以尿素作为氮源的条件添加少量氨基酸对 *C. glycerinogenes* 发酵生产甘油的影响,并对其作用机理进行初步分析。但是,在众多发酵产品的生产中,添加氨基酸后其作用机理是不同的,可归纳为四种类型:第一种类型,氨基酸脱去氨基后形成的碳骨架通过特定的代谢途径进入 TCA 循环,增加 TCA 循环的代谢通量,从而提高细胞的能量水平,维持细胞生长或代谢产物合成^[2, 3];第二种类型,由于氨基酸是一种两性离子,具有调节胞内生理 pH 值的功能^[13, 14];第三种类型,抑制或解除相关代谢途径中关键酶的活性,从而促进目的代谢产物产量的提高^[1, 15, 16];第四种类型,氨基酸通过特定代谢途径产生目的代谢途径中所需的辅酶或中间代谢物(含前体)^[4, 17]。

在酵母细胞中,由磷酸二羟丙酮至甘油的生物合成过程非常简单,先由磷酸二羟丙酮在 3-磷酸脱氢酶作用下还原为 3-磷酸甘油,再在 3-磷酸甘油酯酶作用下脱去磷酸基变成甘油,其中第一步反应需要消耗 NADH^[18]。Radler 等^[7]研究认为,某些氨基酸生物合成过程中可以产生大量 NADH,当以谷氨酸或氨基酸混合液作为 *S. cerevisiae* 厌氧发酵的氮源时,细胞可直接吸收外源游离氨基酸满足蛋白质等物质的生物合成,这样胞内 NADH 水平很低,导致甘油合成过程中 NADH 缺乏,因而甘油产量下降。Omori 等^[8]研究发现,若以氨基酸作为 *S. cerevisiae* 氨基酸类似物抗性突变株发酵的氮源时,可以提高甘油产量,这是因为某些氨基酸(如丙氨酸)可抑制乙醇脱氢酶的活性,减少乙醇、乙酸等副产物的生成。本文则以尿素为氮源、葡萄糖为碳源的优化合成培养基进行发酵,在发酵过程中添加氨基酸、EMP 途径与 TCA 循环的中间代谢物。结果发现,在适宜时机添加最适浓度的第一类氨基酸、丙酮酸、 α -酮戊二酸、草酰乙酸、柠檬酸和琥珀酸等,都能使 *C. glycerinogenes* 发酵过程中甘油产量大大增加(见图 1),甘油的转化率和增加率分别达到 60% 和 16% 以上(见表 2 和表 3)。然而,已有研究发现,氨基酸并不能作为 *C. glycerinogenes* 发酵生产甘油的氮源^[10-12, 18]。本研究还发现,是否添加氨基酸对发酵过程中 pH 值的变化没有影响(数据未列出)。因此,添加的氨基酸既非作为氮源被利用,也非充当胞内生理 pH 值的调节剂,丙酮酸、 α -酮戊二酸、草酰乙酸、柠檬酸和琥珀酸等的添加直接导致了 TCA 循环

代谢流的增加,而第一类氨基酸的促进作用也极有可能与 TCA 循环的强化有关。

综合以上分析,在 *C. glycerinogenes* 发酵过程中,添加第一类氨基酸可以促进甘油产量的显著提高,其作用机理应属于第一种类型,即:氨基酸首先通过脱氨作用形成碳骨架(酮酸),再经特定的分解代谢途径进入 TCA 循环(见图 2),增加 TCA 循环的代谢通量,维持细胞生长和合成代谢所需的能量水

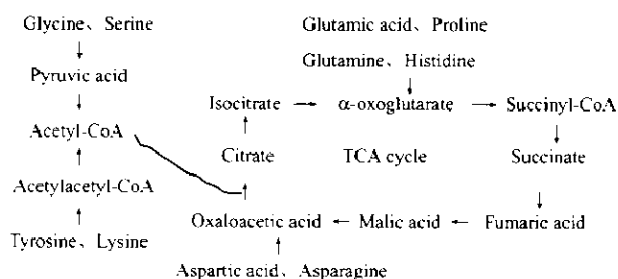


图 2 氨基酸碳骨架的代谢去向

Fig. 2 Metabolic direction of carbon skeleton from amino acid after disintegrating its amido

平;相应地,3-磷酸甘油醛(代谢节点)上游的代谢流在该节点处发生转移,由 3-磷酸甘油醛至丙酮酸的代谢通量减少,而由磷酸二羟丙酮至甘油合成途径的代谢流增加,甘油产量提高。当然,这种作用机理还有待于从酶学和代谢副产物分析两方面进一步加以确证。

REFERENCES(参考文献)

- [1] da Cruz SH, Batistote M, Ermandes JR. Effect of sugar catabolite repression in correlation with the structural complexity of the nitrogen source on yeast growth and fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 2003, **109** (4): 349 - 355
- [2] Chen PF, Harcum SW. Effects of amino acid additions on ammonium stressed CHO cells. *Journal of Biotechnology*, 2005, **117**: 277 - 286
- [3] Mahishi LH, Rawai SK. Effect of amino acid supplementation on the synthesis of poly(3-hydroxybutyrate) by recombinant *pha₅₀*⁺ *Escherichia coli*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2002, **18**: 805 - 810
- [4] Kumar D, Subramanian K, Bisaria VS et al. Effect of cysteine on methionine production by a regulatory mutant of *Corynebacterium lilium*. *Bioresources Technology*, 2005, **96**: 287 - 294
- [5] Beg QK, Bhushan B, Kapoor M et al. Effect of amino acids on production of xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2000, **16**: 211 - 213
- [6] Wen SH, Zhang T, Tan TW. Utilization of amino acids to enhance glutathione production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, **35**: 501 - 507

- [7] Albers E, Larsson C, Lid n G *et al.* Influence of the nitrogen source on *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Applied Environmental Microbiology*, 1996, **62**: 3187 - 3195
- [8] Omori T, Takashita H, Omori N *et al.* High glycerol production amino acid analogue-resistant *Saccharomyces cerevisiae* mutant. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1995, **80**: 218 - 222
- [9] Mohammad J, Taberzadeh, Lennart A *et al.* Strategies for enhancing fermentative production of glycerol: a review. *Enzyme Microb Technol*, 2002, **31**: 53 - 66
- [10] Zhuge J, Fang HY, Wang ZX. Glycerol production by a novel osmotolerant yeast *Candida glycerinogenes*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2001, **55**: 686 - 692
- [11] Jin HR, Fang HY, Zhuge J. By-product formation by a novel glycerol-producing yeast, *Candida glycerinogenes*, with different O₂ supplies. *Biotechnology Letters*, 2003, **25**: 311 - 314
- [12] Wang ZX, Zhuge J, Prior BA. Glycerol producing by microbial fermentation: a review. *Biotechnol Adv*, 2001, **19**: 210 - 223
- [13] Edwards LJ, Williams DA, Gardner DK. Intracellular pH of the mouse preimplantation embryo: amino acids act as buffers of intracellular pH. *Hum Reprod*, 1998, **13**: 3441 - 3448
- [14] deZengotita VM, Abston LR, Schmelzer AE *et al.* Selected amino acids protect hybridoma and CHO cells from elevated carbon dioxide and osmolality. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, **78**: 741 - 752
- [15] Ikura Y, Horikoshi K. Stimulatory effect of certain amino acids on xylanase production by alkalophilic *Bacillus* sp. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1987, **51**: 3143 - 3145
- [16] Balakrishnan H, Srinivasan MC, Rele MV. Extracellular protease activities in relation to xylanase secretion in an alkalophilic *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters*, 1997, **19**: 599 - 601
- [17] Peoples OP, Sinskey AJ. Poly-beta-hydroxybutyrate biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Characterization of the genes encoding beta-ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase. *Journal of Biological Chemistry*, 1989, **264**: 15293 - 15297
- [18] Wang ZX (王正祥). The mechanisms of *Candida glycerinogenes* over-producing large amount glycerol (Ph. D. thesis). Wuxi University of Light Industry, 1998