

七种抑制物对热带假丝酵母木糖醇发酵性能的影响

Influence of Seven Inhibitors on Xylitol Fermentability of *Candida tropicalis*

卫力^{1,2}, 经艳², 林卫军², 蔡爱华², 周玉恒¹, 覃香香¹, 张厚瑞^{1*}

WEI Li^{1,2}, JING Yan², LIN Wei-jun², CAI Ai-hua², ZHOU Yu-heng¹, QIN Xiang-xiang¹, ZHANG Hou-rui^{1*}

(1. 广西植物研究所, 广西桂林 541006; 2. 广西师范大学生命科学学院, 广西桂林 541004)

(1. Guangxi Institute of Botany, Guilin, Guangxi, 541006, China; 2. College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi, 541004, China)

摘要: 在木糖培养基上分别研究七种已知存在于半纤维素水解物中的微生物代谢抑制物(甲酸、乙酸、糠醛、苯甲醛、香草醛、愈创木酚、对羟基苯甲酸)对热带假丝酵母细胞生长及木糖醇发酵性能的影响, 并采用二次正交旋转组合设计研究试验中毒性最强的甲酸与香草醛、苯甲醛这三种代表性抑制物共存条件下的抑制效应。结果表明, 这些抑制物在低浓度条件下虽然对酵母细胞生长有抑制作用, 但是却能使木糖醇比生成速率略有提高。随着抑制物浓度的提高, 它们最终均能完全抑制酵母细胞生长, 使木糖醇发酵完全不能进行。对酵母细胞生长而言, 甲酸与醛类抑制物之间存在毒性相互拮抗作用; 对于木糖转化率和木糖醇比生成速率, 甲酸和苯甲醛之间存在明显的拮抗作用; 对所有考察指标, 醛类化合物之间均无显著的拮抗作用, 它们之间对酵母细胞的抑制作用呈累加效应。

关键词: 热带假丝酵母 抑制物 木糖醇 拮抗作用

中图分类号: TQ923 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2008)04-0424-07

Abstract The influence of seven known inhibitors including formic acid, acetic acid, benzaldehyde, furfural, vanillin, guaiacol and hydroxy acid present in the hemicellulose hydrolysate on the *Candida tropicalis* yeast cell growth and the xylitol fermentability was studied respectively, and the inhibitory action of the three inhibitors which were formic acid, vanillin and benzaldehyde under coexistence condition was studied using two orthogonal revolving combination design. The results indicated, the inhibitory action of these inhibitors with low concentration on yeast cell growth was found, but they increase the specific productivities of xylitol slightly. They finally can suppress the yeast cell growth completely along with concentration increasing, cause the xylitol fermentability not to carry on completely. The results also showed that the anti-function mutually between formic acid and aldehyde class inhibitors regarding yeast cell growth, but only the obvious antagonistic effect mutually between formic acid and benzaldehyde regarding xylitol yield from xylose and the specific productivities of xylitol. To all inspection targets, no antagonistic effect found in the aldehyde class compounds, but the inhibitory action of them assumes the accumulation function.

Key words *Candida tropicalis*, inhibitors, xylitol, antagonistic effect

木糖醇是一种五碳糖醇, 甜度与蔗糖相当, 在人体内代谢无需胰岛素参与, 同时有良好的抗龋齿性

能, 在食品工业中具有特殊的应用价值而倍受人们的关注^[1-3]。目前工业化生产木糖醇仍采用化学法还原木糖的工艺, 由于整个工艺过程包含了一系列复杂的从半纤维素水解物中纯化出木糖的步骤, 所以从木糖到木糖醇的收率仅为 50%~60%^[4-6]。化学法还原木糖生产木糖醇的成本约为蔗糖的 1 倍,

收稿日期: 2008-01-27

作者简介: 卫力 (1982-), 男, 硕士, 主要从事微生物发酵研究工作。

* * 通讯作者。

昂贵的价格限制了它的使用范围。直接利用微生物发酵半纤维素水解物生产木糖醇,是一条可能有效降低生产成本的工艺路线^[4,7-9],因为它无需化学工艺所必不可少的木糖纯化步骤,还可以简化木糖醇的分离。

蔗渣是我国制糖行业的大宗富副产物^[10,11]。利用稀酸水解蔗渣,很容易获得以木糖为主成分的蔗渣半纤维素水解物。发酵蔗渣半纤维素水解物生产木糖醇,被认为是合理利用蔗渣资源的有效途径。但是,蔗渣稀酸水解过程会伴随产生一系列对微生物有毒的副产物,它们能抑制酵母细胞的正常代谢影响其生物转化活性^[16,17-16]。采用适当的工艺从蔗渣半纤维素水解物中除去此类抑制物,有效提高它的发酵性能,发酵法生产木糖醇的工艺才有可能得到应用。本文选择已知存在于蔗渣水解物中 7 种主要抑制物^[11,13,14,16]: 甲酸、乙酸、糠醛、苯甲醛、香草醛、愈创木酚、对羟基苯甲酸,研究它们对酵母木糖醇代谢抑制效应强弱,分析其中 1 种最主要抑制物共存条件对木糖醇发酵的影响,为建立简捷有效的蔗渣半纤维素水解物脱毒方案提供科学的依据。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

供试菌株由本实验室筛选获得,并保藏于中国典型培养物保藏中心的木糖醇高产热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)菌株 CCTCC M 205067^[17],4℃保存于 YM 试管斜面上。

1.2 培养基

每升溶液含盐类: K_2HPO_4 1g, $NH_4H_2PO_4$ 3g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g, 酵母膏 5g。种子培养基: 木糖 20g, 葡萄糖 30g; 木糖醇发酵: 木糖 150g, 并模拟蔗渣水解物中的糖类组成^[14], 再加入葡萄糖 15g, 阿拉伯糖 15g。灭菌条件: 糖、盐分开, 121℃, 20min。所用的材料中, 木糖、阿拉伯糖为化工原料级, 其它均为国产分析纯试剂。

1.3 抑制效应

所用的抑制物包括甲酸、乙酸、香草醛、苯甲醛、糠醛、对羟基苯甲酸、愈创木酚, 按需要浓度用无菌水配制, 并分别用无菌的微滤膜过滤除菌, 然后加入到灭菌后的培养基中, 以空白作为对照。摇瓶发酵后检测发酵液中菌体干重, 木糖醇浓度, 换算出木糖转化率, 木糖醇比生成速率, 并与对照比较, 确定这些抑制物对热带假丝酵母木糖醇发酵性能的影响。在单一抑制物试验的基础上, 选出有代表性的 1 种抑制

物, 研究在它们共存环境条件下对酵母木糖醇发酵的抑制。

1.4 摇瓶条件

种子培养: 250ml 三角瓶装液 60ml, 每瓶接入热带假丝酵母 CCTCC M 20506 斜面种子一环, 旋转式摇床 200r/min, 30℃ 培养 15h。

抑制物效应研究: 250ml 三角瓶装液 30ml, 接入种子液相当于装量的 5%, 32℃, 200r/min 旋转式摇床培养至发酵结束。

1.5 分析方法

1.5.1 糖类检测

木糖、阿拉伯糖和木糖醇标准样品购自 Sigma 公司, 葡萄糖为国产分析纯。发酵液经离心澄清, 0.22μm 微孔滤膜过滤, HPLC 法检测: Waters 510 泵, 410 示差折光检测器; Benson BC-100 Ca^{2+} 碳水化合物色谱柱。流动相为超纯水, 流速 1ml/min; 柱温 90℃。

1.5.2 菌体干重

离心收集发酵液菌体, 蒸馏水洗涤 2 次, 稀释至不同浓度, 用 721 分光光度计测定 620nm 处光密度; 收集测定过光密度的发酵液中的菌体, 60℃ 烘干至恒重, 称重。用光密度与相对应的菌体干重作标准曲线。收集发酵液菌体, 蒸馏水洗涤 2 次后测定 620nm 处光密度, 经标准曲线换算出细胞干重。

1.6 数据分析

根据发酵终点时的菌体密度(细胞干重 Y_1)、木糖醇浓度及剩余木糖, 计算出木糖转化率(木糖醇 g/木糖 g)和木糖醇比生成速率(木糖醇 g/细胞 g·h)、木糖醇比生成速率, 即单位酵母细胞在单位时间内的木糖醇产量(g/g·h), 是衡量酵母细胞生成木糖醇活力受抑制物影响程度的主要指标。

数据统计分析用计算机 SAS8. 软件完成。

2 结果与分析

2.1 单一抑制物的抑制效应

所有的抑制物样品即使在低浓度(0.5g/L)条件下, 也会对热带假丝酵母 CCTCC M 205067 细胞生长产生显著的抑制作用(图 1), 其中对细胞生长抑制作用最强的是甲酸和苯甲醛, 其浓度 1.5g/L 时几乎没有细胞生长。其次是香草醛和糠醛, 它们在 2g/L 条件下可以完全抑制细胞生长。愈创木酚、对羟基苯甲酸的抑制作用相对低于香草醛和糠醛。酵母对乙酸的耐受性显然比较高, 到 4g/L 时才能完全抑制细胞生长。

抑制物对酵母细胞生长的抑制作用越强,发酵体系的木糖醇产量(图2)及相应的木糖转化率(图3)就越低。在试验的抑制物中,仍以甲酸、苯甲醛对木糖醇产量的影响最强烈,它们只需1g/L的浓度,发酵体系中的木糖醇浓度便降至对照的50%以下。

但是,所有的抑制物在浓度较低条件下(0.5g/L),酵母细胞的木糖醇比生成速率皆有增高(图4)的现象,这与它们对细胞生长的抑制现象是不一致的。不过,随抑制物浓度的进一步增大,酵母细胞生成木糖醇的活性仍会急剧降低,并与细胞生长所受的抑制效应增强趋势一致(图4)在所有参试的抑制物中,以乙酸对酵母细胞的木糖醇比生成速率抑制效应最小,只有在乙酸浓度大于1g/L以后,对酵母细胞生成木糖醇的活性才开始缓慢下降。

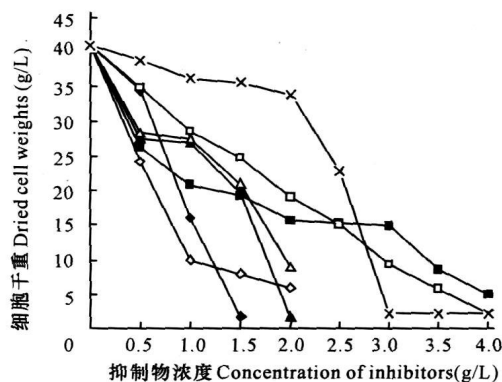


图1 不同抑制物对酵母细胞生长的影响

Fig. 1 The effect of different inhibitors on yeast cell growth

◆: 甲酸; ◇: 苯甲醛; ▲: 香草醛; △: 糠醛; ■: 对羟基苯甲酸; □: 愈创木酚; ×: 乙酸。

◆: Formic acid; ◇: Benzaldehyde; ▲: Vanillin; △: Furfural; ■: Hydroxy acid; □: Guaiacol; ×: Acetic acid.

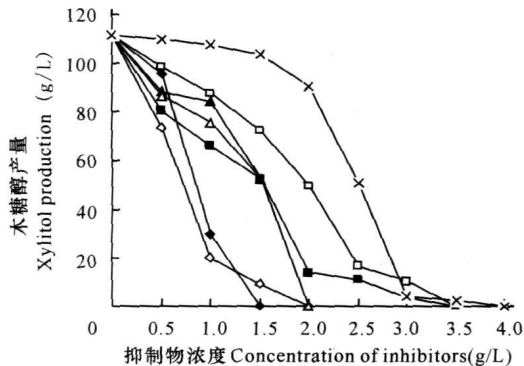


图2 不同抑制物对木糖醇产量的影响

Fig. 2 The effect of different inhibitors on xylitol production

◆: 甲酸; ◇: 苯甲醛; ▲: 香草醛; △: 糠醛; ■: 对羟基苯甲酸; □: 愈创木酚; ×: 乙酸。

◆: Formic acid; ◇: Benzaldehyde; ▲: Vanillin; △: Furfural; ■: Hydroxy acid; □: Guaiacol; ×: Acetic acid.

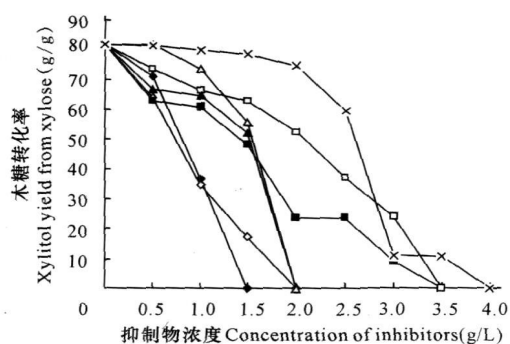


图3 不同抑制物对木糖转化率的影响

Fig. 3 The effect of different inhibitors on xylitol yield from xylose

◆: 甲酸; ◇: 苯甲醛; ▲: 香草醛; △: 糠醛; ■: 对羟基苯甲酸; □: 愈创木酚; ×: 乙酸。

◆: Formic acid; ◇: Benzaldehyde; ▲: Vanillin; △: Furfural; ■: Hydroxy acid; □: Guaiacol; ×: Acetic acid.

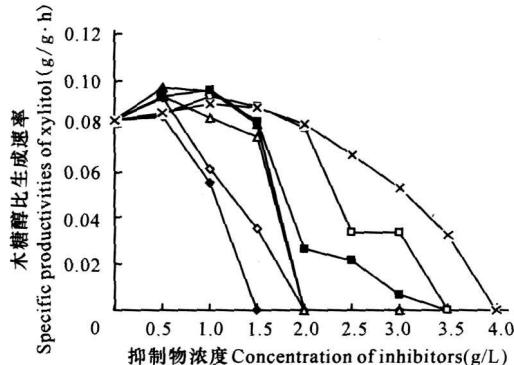


图4 不同抑制物对木糖醇比生成速率的影响

Fig. 4 The effect of different inhibitors on specific productivities of xylitol

◆: 甲酸; ◇: 苯甲醛; ▲: 香草醛; △: 糠醛; ■: 对羟基苯甲酸; □: 愈创木酚; ×: 乙酸。

◆: Formic acid; ◇: Benzaldehyde; ▲: Vanillin; △: Furfural; ■: Hydroxy acid; □: Guaiacol; ×: Acetic acid.

上述结果表明,甲酸、香草醛、苯甲醛和糠醛显然是本试验中对热带假丝酵母毒性最强的抑制物。利用半纤维素水解物发酵生产木糖醇,真空浓缩提高底物木糖的浓度是一个必不可少的步骤,而此过程可以除去90%左右的糠醛^[17]。因此,我们选择甲酸、苯甲醛与香草醛这三种存在于半纤维素水解物中,但又难以通过真空浓缩除去的抑制物,进一步研究在它们共存条件下对热带假丝酵母木糖醇发酵的抑制效应。

2.2 香草醛、苯甲醛和甲酸的共存条件

根据2.1的试验结果,确定3种抑制物的上下水平,按三元二次正交旋转回归组合设计表确定各试验组的编码与取值水平(表1)。试验设计及结果如表2所示。

表1 抑制物对木糖醇发酵影响的试验因素和水平

Table 1 Experimental factors and levels of the influences of inhibitors on xylitol fermentation

编码值 Code value	X ₁ , 苯甲醛 (Benzaldehyde, g/L)	X ₂ , 香草醛 (Vanillin, g/L)	X ₃ , 甲酸 (Formic acid, g/L)
+ r	1	1.2	1
1	0.82	0.998	0.82
0	0.55	0.7	0.55
- 1	0.28	0.402	0.28
- r	0.1	0.2	0.1

表2 抑制物对木糖醇发酵影响的试验设计及试验结果

Table 2 Experimental design and results of the influences of inhibitors on xylitol fermentation

编号 No.	X ₁	X ₂	X ₃	Y ₁	Y ₂	Y ₃
1	1	1	1	0.824	0	0
2	1	1	- 1	9.647	0.444	0.122
3	1	- 1	1	0.941	0	0
4	1	- 1	- 1	15.000	0.457	0.086
5	- 1	1	1	3.294	0	0
6	- 1	1	- 1	16.118	0.742	0.173
7	- 1	- 1	1	1.118	0	0
8	- 1	- 1	- 1	26.471	0.866	0.134
9	1.682	0	0	6.118	0.316	0.065
10	- 1.682	0	0	17.294	0.448	0.1
11	0	1.682	0	15.118	0.396	0.074
12	0	- 1.682	0	18.000	0.460	0.078
13	0	0	1.682	0.882	0	0
14	0	0	- 1.682	17.941	0.795	0.148
15	0	0	0	16.824	0.426	0.082
16	0	0	0	16.647	0.440	0.086
17	0	0	0	16.882	0.436	0.084
18	0	0	0	16.765	0.437	0.084
19	0	0	0	16.706	0.440	0.085
20	0	0	0	16.706	0.441	0.085
21	0	0	0	16.941	0.435	0.083
22	0	0	0	16.882	0.434	0.083
23	0	0	0	17.000	0.431	0.082
CK				26.5	0.864	0.082

Y₁, Y₂, Y₃分别指细胞干重 (g/L), 木糖转化率 (g/g), 木糖醇比生成速率 (g/g·h)

Y₁, Y₂, Y₃ means dried cell weights (g/L), xylitol yield from xylose (g/g), specific productivities of xylitol (g/g·h), respectively.

2.2.1 抑制物共存条件对酵母细胞生长的影响

对回归系数显著性检验 (表3), 并在 $\alpha = 0.10$ 显著水平剔除不显著项, 得到优化后的菌体干重依 3 种抑制物浓度变化的回归方程为:

$$Y_1 = 16.88284 - 2.883211X_1 - 1.354159X_2 - 6.572623X_3 - 2.454598X_1^2 - 1.91125X_1X_3 + 2.21875X_2X_3 - 3.266001X_3^2 \quad (1)$$

F 检验显示 (表3), 3 种抑制物的混合物与菌体干重之间存在极显著的回归关系。从一次项看, 3 个因素对菌体干重的影响大小顺序为甲酸 (X₃) > 苯甲醛 (X₁) > 香草醛 (X₂), 且 X₁ 和 X₃ 达到极显著水平,

X₂ 达到显著水平。这表明改变甲酸和苯甲醛的浓度对菌体干重的影响是极显著的。从表3中二次项和方程 (1) 的二次项系数看, 甲酸分别与苯甲醛、香草醛之间存在显著的拮抗作用, 从图5和图6可以直观地显示出这种拮抗效应的变化趋势。这表明, 甲酸与苯甲醛、香草醛共存条件下, 它们相互之间可以部分抵消对酵母细胞生长的抑制作用。

表3 3种抑制物共存对酵母细胞生长影响的方差分析

Table 3 Variance analysis of the effects of three inhibitors on yeast cell growth

Source	DF	SS	MS	F	Pr > F
X ₁	1	113.5281	113.5281	23.08424	0.000344 *
X ₂	1	25.0432	25.0432	5.092162	0.041895
X ₃	1	589.9672	589.9672	119.9611	0.0001 *
X ₁ ²	1	95.73408	95.73408	19.4661	0.000702 *
X ₁ X ₂	1	0.918013	0.918013	0.186664	0.672787
X ₁ X ₃	1	29.22301	29.22301	5.942066	0.029899
X ₂ ²	1	8.656228	8.656228	1.760115	0.207444
X ₂ X ₃	1	39.38281	39.38281	8.00791	0.014195
X ₃ ²	1	169.4877	169.4877	34.46281	0.0001 *
Model	9	1069.297	118.8108	24.15841	0.0001 *
Error	13	63.93386	4.917989		
Total	22	1133.231			

* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$.

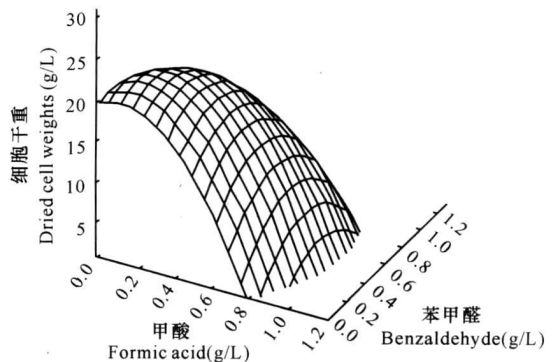


图5 苯甲醛与甲酸对酵母细胞生长的响应曲面

Fig. 5 Response surface of benzaldehyde and formic acid on yeast cell growth

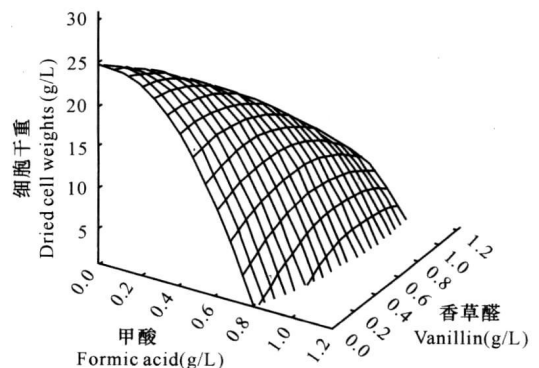


图6 香草醛与甲酸对酵母细胞生长的响应曲面

Fig. 6 Response surface of vanillin and formic acid on yeast cell growth

2.2.2 3种抑制物共存对木糖转化率的影响

对回归系数显著性检验(表4),在 $\alpha = 0.10$ 显著水平剔除不显著项,得到优化后的木糖转化率依抑制物浓度变化的关系方程为:

$$Y_2 = 0.437492 - 0.06812X_1 - 0.28166X_3 - 0.037009X_1^2 + 0.088475X_1X_3 - 0.031458X_3^2 \quad (2)$$

F检验结果显示(表4),木糖转化率与3种抑制物的浓度变化存在极显著的回归关系。从一次项看,3种抑制物对木糖转化率的影响大小顺序为甲酸(X_3) > 苯甲醛(X_1) > 香草醛(X_2),其中 X_1 、 X_3 达到极显著水平,这与单因素试验结果趋势是一致的。从表4中二次项及方程(2)的二次项系数看出,苯甲醛与甲酸之间存在极显著的拮抗作用。从图7可以直观地看出2个因子间的拮抗作用效果。不过,苯甲醛与香草醛、以及香草醛与甲酸之间的拮抗作用均不显著(表4)。显然,多种毒物共存状态对于木糖转化率(木糖醇g/木糖g)而言,其抑制作用主要呈累加效应。

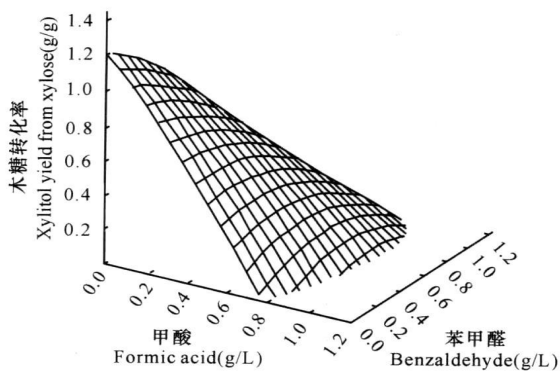


图7 苯甲醛与甲酸对木糖转化率的影响

Fig. 7 The effect of benzaldehyde and formic acid on xylitol yield from xylose

2.2.3 3种抑制物共存对酵母木糖醇比生成速率的影响

对回归系数显著性检验(表5),在 $\alpha = 0.10$ 显著水平剔除不显著项,得到木糖醇比生成速率与各抑制物浓度变化之间的关系方程为:

$$Y_3 = 0.084052 - 0.011559X_1 - 0.055936X_3 + 0.012375X_1X_3 - 0.009375X_2X_3 \quad (3)$$

根据F检验结果(表5),木糖醇比生成速率的变化与3种抑制物浓度变化存在极显著的回归关系。从一次项看,3种抑制物对木糖醇比生成速率的影响,其顺序是:甲酸(X_3) > 苯甲醛(X_1) > 香草醛(X_2),这与它们对细胞生长,对木糖转化率影响的顺序是一样的。其中 X_1 、 X_3 达到极显著水平,甲酸和苯甲醛的浓度变化对木糖醇比生成速率的影响是极显

著的。从表5中二次项和方程(3)的二次项系数看,苯甲醛与甲酸之间存在显著的拮抗作用。从图8可以直观地看出这种拮抗效应的变化。苯甲醛与香草醛,以及香草醛与甲酸之间则不存在拮抗作用,这和它们对木糖转化率影响的效应是一样的。

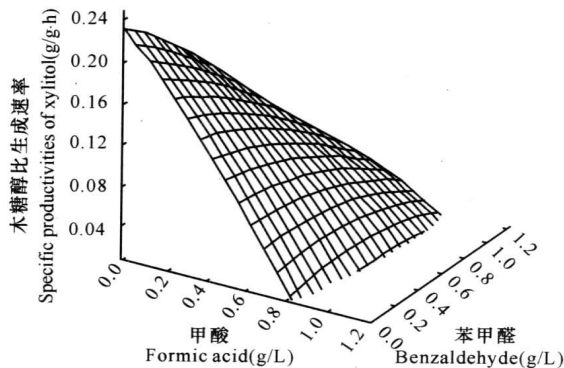


图8 苯甲醛与甲酸对木糖醇比生成速率的响应曲面

Fig. 8 Response surface of benzaldehyde and formic acid on specific productivities of xylitol

表4 3种抑制物共存条件对木糖转化率影响的方差分析

Table 4 Variance analysis of effects of three inhibitors on xylitol yield from xylose

Source	DF	SS	MS	F	Pr > F
X ₁	1	0.063372	0.063372	15.36575	0.001759 *
X ₂	1	0.004373	0.004373	1.06044	0.321894
X ₃	1	1.083432	1.083432	262.6998	0.0001 *
X ₁ ²	1	0.021763	0.021763	5.276989	0.038862
X ₁ X ₂	1	0.001546	0.001546	0.374781	0.550968
X ₁ X ₃	1	0.062623	0.062623	15.1841	0.001838 *
X ₂ ²	1	0.006792	0.006792	1.646884	0.221789
X ₂ X ₃	1	0.002367	0.002367	0.573858	0.462241
X ₃ ²	1	0.015725	0.015725	3.812739	0.072737
Model	9	1.261435	0.140159	33.98444	0.0001 *
Error	13	0.053615	0.004124		
Total	22	1.315049			

* : $P < 0.05$, * * : $P < 0.01$.

表5 3种抑制物共存对木糖醇比生成速率影响的方差分析

Table 5 Variance analysis of the effects of three inhibitors on specific xylitol productivity

Source	DF	SS	MS	F	Pr > F
X ₁	1	0.001825	0.001825	10.34108	0.006759 *
X ₂	1	0.000341	0.000341	1.934214	0.187647
X ₃	1	0.04273	0.04273	242.1508	0.0001 *
X ₁ ²	1	0.000152	0.000152	0.862176	0.370051
X ₁ X ₂	1	1.125E-6	1.125E-6	0.006375	0.937576
X ₁ X ₃	1	0.001225	0.001225	6.942853	0.020594
X ₂ ²	1	0.000462	0.000462	2.618392	0.129626
X ₂ X ₃	1	0.000703	0.000703	3.984649	0.067302
X ₃ ²	1	0.000591	0.000591	3.350055	0.090217
Model	9	0.048016	0.005335	30.23408	0.0001 *
Error	13	0.002294	0.000176		
Total	22	0.050309			

* : $P < 0.05$, * * : $P < 0.01$.

3 讨论

本试验比较 7 种已知存在于半纤维素水解物中的微生物代谢抑制物对热带假丝酵母木糖醇发酵性能的影响,证实其中的甲酸,香草醛,糠醛和苯甲醛毒性最强。由于发酵半纤维素水解物生产木糖醇,必须通过真空浓缩提高底物木糖的浓度,而此过程可以除去 90% 左右的糠醛,所以,甲酸,苯甲醛,香草醛是发酵半纤维素水解物生产木糖醇工艺中最值得注意的抑制物。

虽然 L. C. Duarte 等人^[18]提出,甲酸,乙酸是汉逊德巴利酵母 (*Debaryomyces hansenii*) 木糖醇发酵过程中影响较大的抑制物,不过在本实验中,相对于已知存在于半纤维素水解物中的其它抑制物而言,乙酸对热带假丝酵母的毒性显然是最小的。不同酵母对不同抑制物的耐受性有差异,这种现象是容易理解的。它同时提示我们,利用不同酵母发酵半纤维素水解物生产木糖醇,所选择的水解物脱毒工艺应当各有侧重,达到用简捷的脱毒工艺有效改善水解物发酵性能的目的。

本研究所用的两个醛类抑制物,它们对任何考察指标的毒性基本上都呈累加效应。但是,甲酸与醛类共存对热带酵母细胞生长的毒性有拮抗作用,对于木糖转化率和木糖醇比生成速率,甲酸和苯甲醛的毒性也存在明显的拮抗作用。化学结构类型不同的毒物之间,毒性拮抗效应可能是普遍存在的。例如, L. C. Duarte 等^[18]也曾发现,乙酸与对苯二酚混合时,对苯二酚能减低乙酸对汉逊德巴利酵母木糖醇发酵的影响。

虽然毒性拮抗作用的机理尚不清楚,但是这种现象提示,酵母对多种毒物共存条件有一定的适应性,因此,我们不能用单个抑制物毒性累加的方法,来预测多种毒物共存条件对酵母木糖醇发酵性能的影响。

参考文献:

- [1] Mäkinen K K. Dietary prevention of dental caries by xylitol clinical effectiveness and safety [J]. *Appl Nutr*, 1992, 44: 16-28.
- [2] Uhai M, Kontiokari T, Koskela M, et al. Xylitol chewing gum in prevention of acute otitis media: double blind randomised trial [J]. *Br Med*, 1996, 313: 1180-1184.
- [3] Granström T B, Izumori K, Matti L, et al. A rare sugar xylitol Part I: the biochemistry and biosynthesis

of xylitol [J]. *Applied Microbiol Biotechnol*, 2007, 74: 277-281.

- [4] Paraj J C, Dominguez H, Dominguez J M, et al. Biotechnological production of xylitol Part I: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis [J]. *Bioresource Technology*, 1998, 65: 191-201.
- [5] Mussatto S I, Roberto I C. Kinetic behavior of *Candida guilliermondii* yeast during xylitol production from highly concentrated hydrolysate [J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39: 1433-1439.
- [6] Mussatto S I, Silva C J S M, Roberto I C, et al. Fermentation performance of *Candida guilliermondii* for xylitol production on single and mixed substrate media [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72: 681-686.
- [7] Hahn-Hagerdal B, Jeppson H, Prior B A, et al. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts [J]. *Enzyme Microbial Technology*, 1994, 16: 933-943.
- [8] Nigam P, Singh D. Processes for fermentative production of xylitol—a sugar substitute [J]. *Process Biochemistry*, 1995, 30: 117-124.
- [9] Winkelhausen E, Kuzmanova S. Microbial conversion of D-xylitol to xylitol [J]. *Ferment Bioeng*, 1998, 86(1): 1-14.
- [10] Rodrigues R C L B, Felipe M G A, Silva J B A, et al. Response surface methodology for xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate using controlled vacuum evaporation process variables [J]. *Process Biochemistry*, 2003, 38: 1231-1237.
- [11] Martin B C, Almazan O, Marcet M, et al. A study of three strategies for improving the fermentability of sugarcane bagasse hydrolysates for fuel ethanol production [J]. *International Sugar*, 2007, 109 (1297): 33-39.
- [12] Paraj J C, Dominguez H, Dominguez J M, et al. Improved xylitol production with *Debaryomyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, 21: 18-24.
- [13] Martin C, Galbe M, Wahlbom C F, et al. Ethanol production from enzymatic hydrolysates of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 31: 274-282.
- [14] Rao R S, Jyothi Ch P, Prakasham R S, et al. Xylitol production from corn fiber and sugarcane bagasse hydrolysates by *Candida tropicalis* [J]. *Bioresource Technology*, 2006, 97: 1974-1978.

- [15] Martinez E A, Silva J B A, Giulietti M, et al. Downstream process for xylitol produced from fermented hydrolysate [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40: 1193-1198.
- [16] Sampaio F C, Torre P, Passos F M L, et al. Influence of inhibitory compounds and minor sugars on xylitol production by *Debaryomyces hansenii* [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2007, 136: 165-181.
- [17] Rodrigues R C L B, Felipe M G A, Silva J B A, et al. The influence of pH, temperature and hydrolysate concentration on the removal of volatile and non-volatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation [J]. *Braz J Chemistry Engineering*, 2001, 18: 299-311.
- [18] Duarte L C, Carvalheiro F, Tadeu J, et al. The combined effects of acetic acid, formic acid and hydroquinone on *Debaryomyces hansenii* physiology [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2006, 129-132: 461-475.

(责任编辑: 邓大玉)

(上接第 423 页 Continue from page 423)

- [3] 郑毅, 黄建忠, 施巧琴. 中温碱性脂肪酶的研究 [J]. *工业微生物*, 1996, 26(3): 152-181.
- [4] 陈守文, 徐柔, 章克昌. 微生物的脂肪酶合成调节 [J]. *微生物通报*, 1998, 25(4): 202-204.
- [5] 张树政. 酶制剂工业 (下) [M]. 北京: 科学出版社, 1984: 655-670.
- [6] 张呈平, 杨建明, 吕剑. 生物柴油的合成和使用研究进展 [J]. *工业催化*, 2005, 13(5): 9-13.
- [7] 吴松刚, 施巧琴, 郑毅, 等. 碱性脂肪酶催化特性和安全性的研究 [J]. *化工科技市场*, 2003, 6: 28-30.
- [8] Dharmstithi S, Kuhasuntisuk B. Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* LP602 biochemical properties and application for wastewater treatment [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1998, 21: 75-80.
- [9] Han Soojin, Jung Ho Back, Moon Young Yoon, et al. Expression and characterization of a novel enantioselective lipase from acinetobacter species SY-01 [J]. *Biochimie*, 2003, 85: 501-510.
- [10] Weuster-Botz D. Experimental design for fermentation media development statistical design or global random search [J]. *J Biosci Bioeng*, 2000, 90: 473-483.
- [11] Myers W R. Response surface methodology [M]. *Encyclopedia of Biopharmaceutical Statistics*. New York: Marcel Dekker, 2003: 858-869.
- [12] Plackett R L, Burman J P. The design of optimum multifactorial experiments [J]. *Biometrika*, 1946, 33: 305-325.
- [13] 陈魁. 试验设计与分析 [M]. 北京: 清华大学出版社, 1996: 94-180.
- [14] 唐良华, 苏敏, 薛建平, 等. *Penicillium* sp 脂肪酶的发酵及催化生成生物柴油的研究 [J]. *生物技术*, 2006, 5(16): 67-70.
- [15] Wiyada Mongkoltharuk, Waerawee Probnarong, Sithiwat Lertsiri, et al. Growth and lipase production of a psychrotrophic *Acinetobacter calcoaceticus* in an MSG-containing medium [J]. *J Gen Appl Microbiol*, 2004, 50: 29-33.
- [16] 代文亮, 程龙, 陶文沂. 响应面法在紫杉醇产生菌发酵前体优化中的应用 [J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(11): 66-72.

(责任编辑: 邓大玉)