

## 毕赤酵母发酵甘露醇产乙醇的条件研究\*

Study on Conditions of Ethanol Fermentation of Mannitol by *Pichia angophorae*潘诗翰<sup>1,2</sup>,陈姗姗<sup>1,3</sup>,黄庶冰<sup>2</sup>,龙明华<sup>2</sup>,黄庶识<sup>1\*\*</sup>PAN Shi-han<sup>1,2</sup>, CHEN Shan-shan<sup>1,3</sup>, HUANG Shu-bing<sup>2</sup>, LONG Ming-hua<sup>2</sup>, HUANG Shu-shi<sup>1</sup>

(1. 广西科学院,广西南宁 530007;2. 广西大学,广西南宁 530004;3. 广西师范大学生命科学院,广西桂林 541004)

(1. Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China; 3. The College of life and Science, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi, 541004, China)

**摘要:**在 250ml 三角瓶中进行毕赤酵母(*Pichia angophorae*)发酵不同浓度的甘露醇生产乙醇的试验。试验先以浓度为 20g/L、40g/L、60g/L、80g/L 的甘露醇进行发酵试验确定出最适培养基组分,然后以正交试验确定菌株的最优发酵条件。结果确定出最适的发酵培养基组分为:甘露醇 20g/L,酵母浸粉 0.3g/L,麦芽浸粉 0.3g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4g/L。最佳发酵条件为:温度 32℃,摇床转速 150rpm,初始 pH 值 4.5,发酵液体积 150ml,乙醇最大产量为 0.45g ethanol/g mannitol。

**关键词:**毕赤酵母 甘露醇 发酵 乙醇

中图分类号:TQ920.6 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2011)02-0164-05

**Abstract:** Ethanol fermentation of different concentration of mannitol by *Pichia angophorae* was carried out in 250ml Erlenmeyer flasks. The optimum composition of fermentation medium was determined by the tests with concentration of 20g/L, 40g/L, 60g/L and 80g/L of mannitol. Then an orthogonal test was designed and performed, searching for the best fermentation condition. The results indicated that the optimum medium composition for ethanol fermentation was 20g/L mannitol, 0.3g/L yeast extract, 0.3g/L malt extract, 5g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and 0.4g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Besides, the optimal fermentation condition was 32℃, 150rpm, initial pH value 4.5 and 150ml fermentation liquor with a yield of 0.45 g ethanol (g mannitol)<sup>-1</sup>.

**Key words:** *Pichia angophorae*, mannitol, fermentation, ethanol

海洋藻类根据所含色素差异可大致分为褐藻、绿藻和红藻三大类,按形态和大小不同可划分为海洋微藻和大型海藻。大型海藻生长快速,光合作用效率 6%~8%,高于陆生植物的 1.8%~2.2%<sup>[1]</sup>,生长过程中不会和陆地上的粮食、饲料等农作物抢耕地、淡

水、肥料等生产资源,而且富含各类碳水化合物,不含木质素,纤维素含量远少于陆地植物,藻体柔软、机械强度不高,容易破碎和消化。与陆生植物相比,大型海藻作为生物质能的生产原料具备成本优势。因此,开发大型海藻生物质能源具有相当潜力,是未来解决地球资源短缺最有可能的途径之一<sup>[2]</sup>。

甘露醇(mannitol)是一种己六糖醇,是海带、马尾藻等大型褐藻的主要成分,约占干重 10%~20%<sup>[3]</sup>。大型褐藻经物理、化学方法及生物酶法处理后能得到含甘露醇及褐藻多糖浓度较高的提取液,可以被某些菌株利用从而发酵生产燃料乙醇。在工业生产褐藻酸的过程中,副产物甘露醇往往随工业废水

收稿日期:2011-02-24

修回日期:2011-03-30

作者简介:潘诗翰(1985-)男,硕士研究生,主要从事生物质能源研究。

\* 广西自然科学基金重点项目(2010GXNSFD013029),广西科学院基本科研业务费项目(10YJ25WL01),人力资源和社会保障部留学人员科技活动项目择优经费项目(人社厅函[2010]412号)资助。

\*\* 通讯作者, hshushi@gxas.cn; hshushi@yahoo.com.cn.

排出,没有得到有效利用。若能利用富含甘露醇的褐藻酸工业废水生产乙醇,将带来可观的经济与环境效益<sup>[4]</sup>。所以寻找适宜的大型褐藻前处理方法及高效的乙醇发酵菌株将是未来褐藻燃料乙醇生物质能研究的主要方向。

目前利用甘露醇发酵生产乙醇的研究国内外报道较少。当前广泛应用于乙醇厌氧发酵的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)由于缺少转氢酶,在严格厌氧条件下不能生长在以甘露醇为底物的培养基上<sup>[5,6]</sup>。因此利用酵母发酵糖醇需提供氧气以满足菌株生长需要,但是矛盾的是,在有氧条件下酵母不能将糖醇转化为乙醇。1993年,Okamoto<sup>[7]</sup>从海洋藻类中分离出海洋细菌 *Zymobacter palmae*,它能够将褐藻主要成分之一的甘露醇转化为酒精;在适当低氧浓度下,也能够发酵北方海带 (*Laminaria hyperborea*) 的提取物产生乙醇。毕赤酵母 (*Pichia angophorae*) 是一株分离自澳大利亚赤桉树<sup>[8]</sup>的毕赤酵母菌株,该菌兼性厌氧,在适当低氧的条件下,能够以葡萄糖和甘露醇等单糖为底物进行发酵产生乙醇。Svein Jarle Horn<sup>[9]</sup>的研究表明,毕赤酵母可以同时利用北方海带叶子提取液里的甘露醇和其它海带多糖产生乙醇,毕赤酵母菌株偏好甘露醇作为底物,是一种更适合利用褐藻提取物来生产酒精的微生物。本文设计进行了不同甘露醇浓度发酵试验及正交试验,研究在批次试验条件下毕赤酵母菌株发酵甘露醇产乙醇的最优条件,为进一步优化菌株发酵褐藻提取液制取乙醇提供技术依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

毕赤酵母 (*P. angophorae*, ATCC22304)复苏活化后转接于含有甘露醇、蛋白胨、麦芽浸粉、酵母浸粉的琼脂斜面培养基上,4℃保藏。

### 1.2 培养基

斜面培养基:甘露醇 10g/L,酵母浸粉 3g/L,麦芽浸粉 0.3g/L,蛋白胨 5g/L,琼脂 25g/L。

活化培养基:甘露醇 10g/L,酵母浸粉 3g/L,麦芽浸粉 0.3g/L,蛋白胨 5g/L。

### 1.3 发酵条件及方法

#### 1.3.1 不同甘露醇浓度发酵试验

发酵培养基:甘露醇 20 g/L、40 g/L、60 g/L、80g/L,酵母浸粉 0.3g/L,麦芽浸粉 0.3g/L,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5g/L,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g/L,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4g/L,pH值 4.5。

培养条件:从斜面培养基中将菌种接入装有

20ml活化培养基的50ml三角瓶中,把摇床参数设置为28℃,180rpm活化培养18h。再将1ml活化培养物接种到装有100ml发酵培养基的250ml三角瓶中,把摇床参数设置为28℃,180rpm培养72h。

#### 1.3.2 正交试验

以不同甘露醇浓度发酵试验确定的合适发酵培养基组分为基础,设计进行L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交实验。发酵培养基:甘露醇 20g/L,酵母浸粉 0.3g/L,麦芽浸粉 0.3g/L,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5g/L,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g/L,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.4g/L。

培养条件:从斜面培养基中将菌种接入装有20ml活化培养基的50ml三角瓶中,把摇床参数设置为28℃,180rpm活化培养18h。以1%接种量将活化培养物接种至装有发酵培养基的250ml三角瓶中,按L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交实验条件(表1),发酵培养72h。

表1 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交设计因子水平

Table 1 Factors and levels of L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) orthogonal design

水平 Levels	因子 Factors			
	温度 Temperature (°C)	摇床转速 Rotation speed (rpm)	初始 pH 值 Initial pH value	发酵液体积 Fermentation liquor vol- ume(ml)
1	24	120	4.5	50
2	28	150	6.0	100
3	32	180	7.5	150

### 1.4 取样及分析方法

无菌条件下取样,将样品12000rpm离心10min,取上清液于4℃冰箱保存以备分析。

#### 1.4.1 乙醇含量测定

乙醇含量测定按李自达等<sup>[10]</sup>方法。将待测样品溶液与10%(V/V)乙腈溶液等体积充分混合后进行气相色谱检测。气相色谱仪型号为安捷伦6890N,色谱柱型号为52# ZB-WAX PLUS<sup>TM</sup>。检测条件为:柱温100℃,检测器温度325℃,进样器温度250℃;载气:高纯氮28.7ml/min,氢气40ml/min,空气450ml/min,尾气30.0ml/min;进样量:0.2μl。每个样品重复检测3次。

#### 1.4.2 甘露醇含量测定

甘露醇含量测定按杨晓东等<sup>[11]</sup>方法。(1)标准曲线绘制。用蒸馏水将1mg/ml的甘露醇标准品稀释成0μg/ml、10μg/ml、20μg/ml、30μg/ml、40μg/ml、50μg/ml 6个浓度,分别加入0.015mol/L高碘酸钠1ml,混合均匀,室温放置10min,每个试管加0.1%L-鼠李糖2ml,充分混匀后,加入Nash试剂4ml,53℃水浴15min后即刻冷却,紫外分光光度计测其412nm处的吸光值,以甘露醇浓度为横坐标,OD<sub>412</sub>吸光值为纵坐标绘制标准曲线。(2)样品甘露

醇含量测定。取 1ml 样品或不同浓度甘露醇对照品溶液加入试管中,空白对照管加蒸馏水 1ml,然后按标准曲线实验方法操作,将测得的  $OD_{412}$  值代入标准曲线求出样品甘露醇含量。每个样品 3 个重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同甘露醇浓度发酵试验

毕赤酵母在初始甘露醇浓度分别为 20g/L、40g/L、60g/L、80g/L 的发酵培养基中培养 72h 后,不同时间的乙醇产量如表 2 所示。

由表 2 可知,在发酵 24~48h 内,乙醇产量均呈上升趋势,当初始甘露醇浓度为 40g/L、60g/L、80g/L 时,在发酵 48h 后,乙醇产量达到最大值,随后逐渐下降;而初始甘露醇浓度为 20g/L 时,在发酵 48h 后,乙醇产量达到一个高峰,之后缓慢升高,至 60h 时,产量达到最大,接着在 60~72h 内产量迅速减少。

初始甘露醇浓度为 20g/L、40g/L、60g/L、80g/L 时,乙醇最大产量分别为 0.666% (V/V)、0.782% (V/V)、0.791% (V/V)、0.888% (V/V),折合每克甘露醇相应转化为 0.26g、0.15g、0.10g、0.09g。可见在氮源及其他营养成分固定的条件下,随着甘露醇浓度的增大,乙醇总产量有升高的趋势,但是单位甘露醇转化为乙醇的产量却在下降。

当初始甘露醇浓度为 20g/L 时,单位甘露醇转化为乙醇的产量最高,为 0.26g ethanol / g mannitol。表明超过一定浓度后,随着甘露醇浓度的升高,培养基中碳氮比增大,渗透压提高,降低了酵母菌细胞生理活性,抑制了毕赤酵母的乙醇代谢,从而使单位甘

表 2 不同甘露醇浓度发酵试验乙醇产量

Table 2 Yields of ethanol of fermentation tests in different mannitol concentrations

甘露醇浓度 Concentration of mannitol(g/L)	乙醇产量 Yields of ethanol(% ,V/V)				
	24h	36h	48h	60h	72h
20	0.301±0.010	0.586±0.006	0.654±0.009	0.666±0.013	0.364±0.009
40	0.255±0.020	0.541±0.002	0.782±0.009	0.463±0.005	0.376±0.002
60	0.257±0.002	0.633±0.014	0.791±0.024	0.777±0.020	0.666±0.001
80	0.192±0.010	0.576±0.031	0.888±0.020	0.885±0.028	0.749±0.036

表 3 毕赤酵母正交实验乙醇产量

Table 3 Yields of ethanol by *P. angophorae* in the orthogonal test

试验号 Test No.	乙醇产量 Yields of ethanol(% ,V/V)				
	24h	36h	48h	60h	72h
1	0.104±0.007	0.270±0.006	0.102±0.006	0	0
2	0.167±0.011	0.485±0.016	0.684±0.010	0.655±0.006	0.425±0.008
3	0.153±0.015	0.497±0.014	0.778±0.004	0.996±0.012	1.010±0.010
4	0.174±0.019	0.315±0.019	0.510±0.025	0.647±0.044	0.732±0.025
5	0	0.339±0.016	0.502±0.008	0.580±0.033	0.378±0.022
6	0.301±0.010	0.586±0.006	0.654±0.009	0.666±0.013	0.364±0.009
7	0.128±0.013	0.416±0.007	0.737±0.022	0.871±0.033	0.906±0.015
8	0.190±0.015	0.408±0.008	0.680±0.007	0.857±0.003	1.067±0.012
9	0.222±0.007	0.147±0.003	0	0	0

露醇转化为乙醇的产量呈下降趋势。所以,当发酵培养基组成为甘露醇 20g/L,酵母浸粉 0.3g/L,麦芽浸粉 0.3g/L,  $(NH_4)_2SO_4$  5g/L,  $KH_2PO_4$  2g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.4g/L 时,在适合条件下接种毕赤酵母发酵,有较高的乙醇产量。以此培养基为基础设计后面的正交实验。

### 2.2 正交实验

#### 2.2.1 乙醇产量分析

从表 3 可以看出,各实验组的乙醇产量随时间呈不同的变化趋势,实验组 1 和实验组 9 分别在发酵的 36h 和 24h 乙醇产量达到最大,随后在 24h 内,产量减少为 0;实验组 2、实验组 5 和实验组 6 在发酵的 24~48h 里乙醇产量逐渐升高,其中实验组 2 在 48h 时产量达最大值,之后缓慢减少,而实验组 5 和实验组 6 在 60h 时产量达到最大,随后以较快速度减少;实验组 3 和实验组 7 在发酵的 24~60h 里乙醇产量逐渐升高,之后的 12h 产量增速明显放缓;实验组 4 和实验组 8 在发酵的 24~72h 内乙醇产量以较稳定的速率逐步提高。在 72h 内,实验组 3 和实验组 8 的乙醇产量最高,分别为 1.010% (V/V, 72h) 和 1.067% (V/V, 72h)。而实验组 1 和实验组 9 的乙醇产量最低,分别为 0.270% (V/V, 36h) 和 0.222% (V/V, 24h)。

表 4 结果显示,在温度、摇床转速、初始 pH 值、发酵液体积 4 个因素中,对乙醇产量影响程度由大到小依序排列为:发酵液体积 ( $R = 0.579$ )、初始 pH 值 ( $R = 0.286$ )、摇床转速 ( $R = 0.144$ )、温度 ( $R = 0.077$ )。

表 4 毕赤酵母正交实验各处理组乙醇最大产量的极差分析  
Table 4 Range analysis of the best yields of ethanol by *P. angophorae* in different groups of the orthogonal test

试验号 Test No.	因子 Factors				乙醇最大产量 The best yields of ethanol (% V/V)
	温度 Temperature (°C)	摇床转速 Rotation speed (rpm)	初始 pH 值 Initial pH value	发酵液体积 Fermentation liquor volume (ml)	
1	(1)24	(1)120	(1)4.5	(1)50	0.270±0.006
2	(1)24	(2)150	(2)6.0	(2)100	0.684±0.010
3	(1)24	(3)180	(3)7.5	(3)150	1.010±0.010
4	(2)28	(1)120	(2)6.0	(3)150	0.732±0.025
5	(2)28	(2)150	(3)7.5	(1)50	0.580±0.033
6	(2)28	(3)180	(1)4.5	(2)100	0.666±0.013
7	(3)32	(1)120	(3)7.5	(2)100	0.906±0.015
8	(3)32	(2)150	(1)4.5	(3)150	1.067±0.012
9	(3)32	(3)180	(2)6.0	(1)50	0.222±0.007
T <sub>1</sub>	1.964	1.908	2.003	1.072	
T <sub>2</sub>	1.978	2.331	1.638	2.256	
T <sub>3</sub>	2.195	1.898	2.496	2.809	
K <sub>1</sub>	0.655	0.636	0.668	0.357	
K <sub>2</sub>	0.659	0.777	0.546	0.752	
K <sub>3</sub>	0.732	0.633	0.832	0.936	
R	0.077	0.144	0.286	0.579	

由于本试验中 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交表的设计(表 1)已饱和,温度对乙醇产量的影响作为误差项参与方差分析。方差分析结果(表 5)显示,在显著性水平为 0.05 时,发酵液体积对乙醇产量的影响显著,而摇床转速和初始 pH 值对乙醇产量的影响并不显著。

当发酵液体积为 150ml 时,实验组 3、实验组 4、实验组 8 的乙醇产量都较高,其中实验组 8 的乙醇产量达到 1.067%(V/V,72h),是各实验组中最高的。而当发酵液体积为 50ml 时,实验组 1、实验组 5、实验组 9 的乙醇产量均较低,其中实验组 9 的乙醇产量仅为 0.222%(V/V,24h),为各实验组中最低。这说明当发酵液体积为 50ml 时,通氧量偏高,促进了毕赤酵母的有氧代谢,消耗大量甘露醇用于合成细胞干物质并进行有氧呼吸,阻碍了厌氧条件下的乙醇代谢,导致乙醇产量下降。可见,当发酵液体积为 150ml 时,通氧量适中,乙醇产量较高。

当初始 pH 值为 7.5 时,实验组 3 和实验组 7 的乙醇产量较高,这可能是由于呈弱碱性的发酵液中和了发酵过程中毕赤酵母产生的部分有机酸,使 pH 值不致偏低,有利于维持酵母菌的活性,促进了乙醇产生。而初始 pH 值为 7.5 的实验组 5 因发酵液体积为 50ml,通氧量较大,影响了乙醇产量。当初始 pH 值为 4.5 时,实验组 1 发酵液体积与实验组 5 同为 50ml,但是乙醇产量仅为实验组 5 的一半,可能是因为实验组 1 和实验组 5 相比,发酵温度、摇床转速及初始 pH 值都较低,在一定程度上降低了毕赤酵母的

生理活性,使乙醇产量下降。实验组 8 的初始 pH 值也为 4.5,而乙醇产量却是所有实验组中最高的。究其原因,可能是发酵液体积较初始 pH 值对批次发酵影响更大,实验组 8 的发酵液体积为 150ml,通氧量适中;另外,较高的发酵温度和摇床转速(32°C, 150rpm)也可能促进了乙醇产量的提高。

表 5 毕赤酵母正交实验方差分析  
Table 5 Analysis of variance table of the orthogonal test for *P. angophorae*

方差来源 Source of variance	偏差平方和 Sum of squares	自由度 Degrees of freedom	方差估计值 Estimator of variance	F 值 F value
摇床转速 Rotation speed	0.0407	2	0.0204	3.6417
初始 pH 值 Initial pH value	0.1236	2	0.0618	11.0530
发酵液体积 Fermentation liquor volume	0.5250	2	0.2625	46.9451
误差 Error	0.0112	2	0.0056	
总和 Sum	0.7005	8		

$$F_{0.05}(2,2) = 19.00, F_{0.01}(2,2) = 99.00.$$

### 2.2.2 甘露醇浓度变化分析

以甘露醇标准品的浓度为横坐标 X,吸光度为纵坐标 Y,计算得标准曲线方程  $Y = 0.01035X - 0.01033$ ,  $R = 0.99879$ ,甘露醇测定的线性范围为 10~50μg/ml。

对乙醇产量最高的实验组 3 和实验组 8 进行甘露醇浓度变化测定的结果(图 1)显示,实验组 3 和实验组 8 在发酵 24h 时,甘露醇浓度分别为 11.2 g/L、11.8 g/L,较初始甘露醇浓度(20g/L)各下降了 8.8 g/L、8.2g/L。说明在发酵初期的 24h 里,毕赤酵母消耗了近一半的甘露醇用于生长,并产生少量的乙醇。在发酵 24~72h 中,两个实验组的甘露醇浓度均呈逐渐下降趋势,实验组 3 下降的幅度稍高于实验组 8。在发酵 72h 时,实验组 3 和实验组 8 甘露醇浓度分别为 0.06 g/L、1.16g/L。这说明随着细胞数量的增多,发酵液中的氧气逐渐被消耗,毕赤酵母转入厌氧条件下的乙醇代谢,将发酵液中的剩余甘露醇及自身营养物质转化为乙醇,获得生存所需的能量。当发酵 72h 时,实验组 3 和实验组 8 中的甘露醇基本被消耗完全,乙醇产量已接近最高值。

在发酵 72h 时,实验组 3 和实验组 8 的乙醇浓度分别为 1.010%(V/V)、1.067%(V/V),约合 7.97g/L、8.42g/L,则单位甘露醇转化为乙醇的产量分别为 0.40 g ethanol/g mannitol、0.45g ethanol/g mannitol。可见实验组 8 是所有 9 个实验组中乙醇产量及

单位甘露醇转化率最高的。

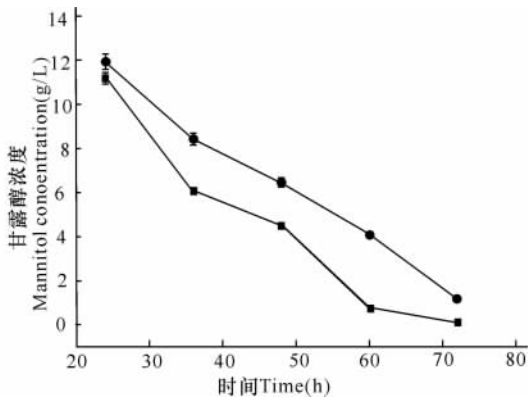


图1 实验组3和实验组8甘露醇浓度变化曲线

Fig. 1 Variation curves of mannitol concentrations in test 3 and test 8

■: 实验3; ●: 实验8。 ■: Test 3; ●: Test 8.

### 3 结论

毕赤酵母在 250ml 三角瓶中发酵甘露醇产生乙醇的最适培养基组成为: 甘露醇 20g/L, 酵母浸粉 0.3g/L, 麦芽浸粉 0.3g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4g/L。

毕赤酵母在 250ml 三角瓶中发酵甘露醇产生乙醇的发酵过程中, 发酵液体积对乙醇产量影响程度最大。当显著性水平为 0.05 时, 发酵液体积对乙醇产量的影响显著, 而初始 pH 值、摇床转速及温度对乙醇产量无显著影响。最优发酵条件为温度 32℃, 摇床转速 150rpm, 初始 pH 值 4.5, 发酵液体积 150 ml。在最优发酵条件下, 乙醇最大产量为 0.45g ethanol/g mannitol。

参考文献:

[1] 陆振冈, 吴金冽. 台湾海洋生物科技的发展与人才培养

[C]. 海洋教育国际研讨会论文集, 基隆: 台湾海洋大学, 2009.

- [2] Rojan P, John G S, Anisha K, et al. Micro and macro algal biomass: A renewable source for bioethanol [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102 (1): 186-193.
- [3] 黄知清, 严兴洪. 海藻研究开发的发展概述[J]. *海洋技术*, 2002, 21(3): 22-25.
- [4] Horn S J. Bioenergy from brown seaweeds[D]. Trondheim: Norwegian University of Science and Technology NTNU, 2000.
- [5] Van Dijken J P, Scheffers W A. Redox balances in metabolism of sugar by yeasts[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 1986, 32: 199-224.
- [6] Quain D E, Boulton C A. Growth and metabolism of mannitol by strains of *S. cerevisiae* [J]. *J Gen Microbiol*, 1987, 133: 1675-1684.
- [7] Okamoto T, Taguchi H, Nakamura K, et al. *Zymobacter palmae* gen nov, sp nov, a new ethanol-fermenting peritrichous bacterium isolated from palm sap[J]. *Arch Microbiol*, 1993, 160(5): 333-337.
- [8] Miller M W, Barker E R. *Pichia angophorae*, sp. n. from the exudate of an Australian red gum tree[J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1968, 34(2): 183-187.
- [9] Horn S J, Aasen I M, Ostgaard K. Ethanol production from seaweed extract[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2000, 25(5): 249-254.
- [10] 李自达, 申乃坤, 赖钧灼, 等. 基于 96 孔板与拉曼光谱的发酵乙醇高通量快速检测[J]. *分析化学*, 2010, 38(9): 1267-1271.
- [11] 杨晓东, 崔勤敏, 朱妙琴, 等. 发酵虫草菌粉中甘露醇含量的比色法测定[J]. *中国现代应用药学杂志*, 2006, 23(6): 504-506.

(责任编辑: 陈小玲 邓大玉)

(上接第 160 页 Continue from page 160)

- [8] Carlini C, Patrono P, Calletti A M R, et al. Heterogeneous catalysts based on vanadyl phosphate for fructose dehydration to 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde [J]. *Applied Catalysis A: General*, 2004(275): 111-118.
- [9] Moreau C, Finiels A, Vanoye L. Dehydration of fructose and sucrose into 5-hydroxymethylfurfural in the presence of 1-H-3-methyl imidazolium chloride acting both as solvent and catalyst [J]. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 2006(253): 165-169.
- [10] Moreau C, Durand R, Razigade S, et al. Dehydration of fructose to 5-hydroxymethylfurfural over H-mordenites [J]. *Applied Catalysis A: General*, 1996(145): 211-224.
- [11] Román-leshkov Y, Chheda J N, Dumesic J A. Phase modifiers promote efficient production of hydroxymethylfurfural from fructose [J]. *Science*, 2006 (312):

1933-1937.

- [12] Bicker M, Hirth J, Vogel H. Dehydration of fructose to 5-hydroxymethylfurfural in sub- and supercritical acetone [J]. *Green Chemistry*, 2003(5): 280-284.
- [13] Qi X, Watanabe M, Aida T M, et al. Catalytic dehydration of fructose into 5-hydroxymethylfurfural by ion-exchange resin in mixed-aqueous system by microwave heating [J]. *Green Chemistry*, 2008(10): 799-805.
- [14] Bricker M, Kaiser D, Vogel O H. Dehydration of D-fructose to hydroxymethylfurfural in sub- and supercritical fluids [J]. *Journal of Supercritical Fluids*, 2005 (36): 118-126.
- [15] Seri K, Inoue Y, Ishida H. Catalytic activity of lanthanide (III) ions for the dehydration of hexose to 5-Hydroxymethyl-2-furaldehyde in water [J]. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 2001(74): 1145-1150.

(责任编辑: 邓大玉)