

东方伊萨酵母降解木糖醇发酵抑制物研究*

Biodegradation of Xylitol Fermentation Inhibitors by *Issatchenkia orientalis*

覃香香,张厚瑞,蔡爱华,周玉恒,陈海珊

QIN Xiang-xiang, ZHANG Hou-rui, CAI Ai-hua, ZHOU Yu-heng, CHEN Hai-shan

(1. 中国科学院广西壮族自治区植物研究所, 广西桂林 541006)

(1. Guangxi Institute of Botany, Guangxi, Zhuangzu Autonomous Region and the Chinese Academy of Sciences, Guilin, Guangxi, 541006, China)

摘要:选择存在于半纤维素水解物中6种主要微生物代谢抑制物,用HPLC-DAD建立检测方法,分析东方伊萨酵母对这些抑制物的降解活性、代谢途径,以及生物脱毒处理对热带假丝酵母木糖醇发酵性能的影响。结果表明,东方伊萨酵母能直接利用醋酸,将芳香醛还原为相应的醇,含有裂解芳香环,最终将其彻底降解的复杂酶系。东方伊萨酵母对抑制物:醋酸 $4000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、糠醛 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、香草醛 $90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、对羟基苯甲酸 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、阿魏酸 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和愈创木酚 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 脱毒发酵80h的降解率分别为100%,100%,100%,14.3%,65.8%,78.6%,木糖醇发酵性能得到显著改善。经生物脱毒处理之后的醋酸、糠醛、愈创木酚、阿魏酸培养基,再用热带假丝酵母进行木糖醇发酵的产物生成速率(木糖醇 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)分别为2.67,2.66,2.72,2.66,基本达到了商品木糖培养基的木糖醇生成速率水平(2.79)。

关键词: 东方伊萨酵母 发酵 生物降解 抑制物 木糖醇

中图分类号: Q591 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-9164(2010)04-0358-05

Abstract: An analytic method of HPLC-DAD for determining six main inhibitors in hemicellulose hydrolysate for microbial metabolism was established. Using this method, we analyzed the degradation activities and metabolic pathway of *Issatchenkia orientalis* utilizing these inhibitors, and measured the effect of biological detoxification on xylitol fermentation ability by *Candida tropicalis*. The results showed that *Issatchenkia orientalis* could directly utilize acetic acid, reduce aromatic aldehydes to its corresponding alcohol, and have a series of enzymes cleaving aromatic ring, and entirely degrading aromatic compounds eventually. After biological detoxification by *Issatchenkia orientalis* fermentation for 80h, the biodegrading percentages of the six inhibitors in each medium were 100, 100, 100, 14.3, 65.8 and 78.6 on each initial concentration ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) of acetic acid at 4000, furfural 400, vanillin 90, hydroxybenzoic acid 40, guaiacol 30, ferulic acid 100, respectively, the fermentation ability of these media were effectively improved. Among these inhibitor media treated by *Issatchenkia orientalis*, the productivity ($\text{xylitol g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) of acetic acid, furfural, guaiacol, ferulic acid media was 2.67, 2.66, 2.72, 2.66, respectively, in xylitol fermentation by *Candida tropicalis*, and almost reach the same productivity ($\text{xylitol } 2.79 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) of commercial xylose medium.

Key words: *Issatchenkia orientalis*, fermentation, biodegradation, inhibitor, xylitol

收稿日期:2010-04-30

修回日期:2010-07-08

作者简介:覃香香(1980-),女,助理研究员,主要从事木质纤维素转化生产功能糖研究。

*国家自然科学基金项目(No. 20666002),广西自然科学基金项目(No. 0731033),广西植物研究所基本科研业务费(桂植业No. 09001)项目资助。

木质纤维素由纤维素,半纤维素与木质素构成,其中半纤维素以木聚糖为主要成分,由于其聚合度低,不具有结晶结构而很容易用稀酸水解生成以木糖为主成分的水解物。酵母发酵半纤维素水解物生产大量用做食品工业甜味剂的木糖醇,一直是半纤维素利用的研究热点,因为发酵工艺省去了化学工艺所必不可少的木糖纯化步骤,简化了木糖醇的分离过程,

是一条可能取代现有化学还原法的木糖醇生产工艺路线。但是,半纤维素水解生成木糖的同时伴随产生一系列对微生物代谢有毒的物质,包括半纤维素脱乙酰基产生的乙酸,木糖降解生成的糠醛,以及由木质素降解生成的含有苯环的一系列化合物^[1]。除去此类抑制物对于改善半纤维水解物的发酵性能是必不可少的。

目前已经尝试过许多理化方法减轻水解物中微生物代谢抑制物的效应,公认最有效的几种方法包括:离子交换^[2],大孔树脂吸附^[3],活性炭吸附^[4],过量石灰沉淀^[5],或者是这些方法组合使用^[6]。理化脱毒方法有其难以克服的缺点:单一方法不能除去不同理化性质的抑制物,联合运用多种理化手段则大幅度提高脱毒成本。即使组合多种脱毒方法,水解物一般也不能达到结晶纯化木糖的发酵性能,一些理化脱毒手段还会产生新的污染物。利用生物方法选择性除去酵母代谢抑制物,是一种经济环保的半纤维素水解物生物脱毒方法。本实验室曾报道一株东方伊萨酵母,它不能利用木糖,但是对半纤维素水解物有明显的脱毒活性,可显著改善水解物的发酵性能^[7]。本文在合成培养基中加入半纤维素水解物中的主要毒物成分^[8~10],用东方伊萨酵母进行降解试验,并借助HPLC-DAD(二极管阵列检测器)的定量与光谱定性功能,研究这些毒物成分的变化规律,分析它们的降解代谢途径,比较生物降解前后对酵母木糖醇发酵性能的影响,以深入揭示东方伊萨酵母的生物脱毒机理,为建立完善的半纤维素水解物生物脱毒工艺提供进一步的科学依据。

1 材料和方法

1.1 菌种

所用菌株均为本实验室筛选,并保藏于中国典型培养物保藏中心。其中包括用于生物脱毒的东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*) S-7(CCTCC NO: M 206098);以及用于木糖醇发酵的热带假丝酵母(*Candida tropicalis*) 1-18(CCTCC NO: M 205067)。普通麦芽汁培养基斜面4℃保存。

1.2 试剂

实验所用试剂、糖类均为国产分析纯,购自上海国药化学试剂公司。

1.3 培养方法

1.3.1 种子培养

培养基:葡萄糖 50 g·L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.2 g·L⁻¹, KH₂PO₄ 5 g·L⁻¹, 酵母膏 10 g·L⁻¹。pH 值自然, 121℃ 灭菌 20 min。250ml 三角瓶装量

50ml,接入一环斜面培养物,200r·min⁻¹,30℃摇床培养15h。

1.3.2 抑制物生物降解

培养基:(NH₄)₂SO₄ 5 g·L⁻¹, KH₂PO₄ 1 g·L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.5 g·L⁻¹, CaCl₂ 0.1 g·L⁻¹, NaCl 0.1 g·L⁻¹, 酵母膏 0.2 g·L⁻¹, 尿素 2 g·L⁻¹, 葡萄糖 30 g·L⁻¹。灭菌方法同种子培养基。灭菌完毕,根据需要分别加入下述抑制物至如下浓度:醋酸 4000 mg·L⁻¹, 糠醛 400 mg·L⁻¹, 羟基苯甲酸 40 mg·L⁻¹, 愈创木酚 30 mg·L⁻¹, 香草醛 90 mg·L⁻¹, 阿魏酸 100 mg·L⁻¹。

250ml 三角瓶装量 50ml,按 10% 接种量(V/V)接入新鲜的东方伊萨酵母 S-7 种子液, 200 r·min⁻¹,30℃摇床培养 80h,离心除去细胞,获得的上清液称为抑制物生物降解液。

1.3.3 木糖醇发酵

木糖醇发酵培养基基本成分:木糖 150 g·L⁻¹, 尿素 5 g·L⁻¹, 酵母膏 5 g·L⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 2 g·L⁻¹, KH₂PO₄ 1 g·L⁻¹, MgSO₄·7H₂O 0.5 g·L⁻¹。抑制物效应组:纯水配制木糖醇发酵培养基,并按 1.3.2 的浓度外加抑制物;生物脱毒效应组:用 1.3.2 的抑制物生物降解液配制木糖醇发酵培养基;对照组:纯水配制木糖醇发酵培养基,不外加抑制物培养基配制完毕,用 0.45μm 微孔滤膜过滤除菌。250ml 三角瓶装量 50ml,接种热带假丝酵母(*Candida tropicalis*) 1-18 的种子液 5ml, 32℃, 200r·min⁻¹摇瓶发酵时间 45h。木糖醇发酵抑制率=(对照组木糖醇产量-效应组木糖醇产量)/对照组木糖醇产量×100%。

1.4 检测方法

抑制物检测:Agilent 1100 HPLC 色谱仪,DAD 检测器(二极管阵列检测器),色谱柱,Symmetry 5μm C₁₈柱。进样量 10μl。流动相:甲醇:0.2%磷酸=25:75(V/V)。

糖、醇检测:Waters 510 液相色谱仪,示差折光检测器。色谱柱,BC-100 碳水化合物 Ca²⁺柱。流动相:超纯水 1 ml/min,柱温 85℃。

2 结果与分析

2.1 抑制物的检测效果

在选定的检测条件下,抑制物各组间达到很好的色谱分离效果,由 DAD 检测器得出的这 6 种抑制物混合物的三维色谱光谱(图 1)可以清晰地看出各自的 HPLC-UV 光谱特征。很明显,利用 DAD 检测器给出的这种时间-波长-L 光吸收三维色谱-L 光谱

图,能很方便地识别色谱峰的光谱特征与物质属性。HPLC-LDAD 检测技术已经成为同时检测样品多个组分的有力工具^[11,12],它为分析存在于半纤维素水解物中复杂的木糖醇发酵抑制物提供了便捷的手段。

根据 HPLC-LDAD 给出的光谱信息(图 1)很容易确定,在本试验条件下各抑制物的最大吸收波长分别为:羟基苯甲酸和愈创木酚,198nm;乙酸和香草醛,206nm;糠醛,278nm;阿魏酸,322nm。各组分最大的吸收波长即为其后续 HPLC 定量分析的检测波长。

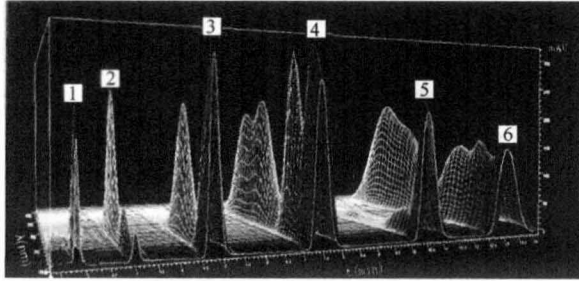


图 1 6 种抑制物标准品混合物的 HPLC-UV 光谱

Fig. 1 HPLC-LUV spectrum of a mixture of six inhibitor standards

1. 乙酸 $1.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 2. 糠醛 $0.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 3. 对羟基苯甲酸 $0.042 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 4. 香草醛 $0.083 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 5. 愈创木酚 $0.025 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 6. 阿魏酸 $0.116 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1. acetic acid $1.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 2. furfural $0.02 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 3. p-hydroxybenzoate $0.042 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 4. vanillin $0.083 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 5. guaiacol $0.025 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 6. ferulic acid, $0.116 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 抑制物的生物可降解性及降解途径

抑制物经东方伊萨酵母降解 80h,用选定的波长定量检测发现,尽管醋酸、糠醛、香草醛的初始浓度较高,但是其降解率达到 100%;虽然羟基苯甲酸、愈创木酚降解、阿魏酸的初始浓度低许多,但是其降解率仍然低(表 1)。

2.3 生物脱毒效应

在本实验所用的浓度条件下,所用的 6 种抑制物均对热带假丝酵母 1-18 的产木糖醇性能产生显著的抑制作用,经东方伊萨酵母生物降解处理之后其抑制作用显著降低(表 2)。醋酸完全降解(表 1)之后,对热带假丝酵母 1-18 产木糖醇发酵的抑制作用也几乎完全消除。这再次表明,东方伊萨酵母不会产生抑制热带假丝酵母木糖醇发酵的物质^[13]。糠醛降解之后虽然有大量的糠醇积累,但它用于发酵与空白对照的木糖醇产量相差不大(表 2),说明糠醇对热带假丝酵母的木糖醇发酵的抑制作用低于糠醛。事实上,Zhao 等人^[14]也曾报道,糠醇对酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*),嗜单宁管囊酵母(*Pachysolen tannophilus*),树干毕赤酵母(*Pichia*

stipitis) 的细胞毒性均低于糠醛。

表 1 东方伊萨酵母对毒物样品的降解活性(发酵时间 80h)

Table 1 Degradation activities of of *Issatchenkia orientalis* on inhibitor samples(fermentation time, 80h)

抑制物 Inhibitors	起始浓度 Initial concentration ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	终点浓度 End concentration ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	降解率 Degradation rate (%)
醋酸 Acetic acid	4000	0	100
糠醛 Furfural	400	0	100
对羟基苯甲酸 Hydroxy acid	40	34.6	14.3
香草醛 Vanillin	90	0	100
愈创木酚 Guaiacol	30	10.1	65.8
阿魏酸 Ferulic acid	100	22	78.6

香草醛 $90 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对热带假丝酵母产木糖醇性能的抑制率为 30.3%,经东方伊萨酵母生物降解处理之后,虽然香草醛被完全降解(表 1),但有大量的香草醇积累,对木糖醇发酵的抑制率只有 8.5%。它表明,香草醇对木糖醇发酵仍有比较强的抑制作用。

对-羟基苯甲酸的初始浓度只有 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,生物降解处理 80h,残余对-羟基苯甲酸仍有 $34.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。与其它几个芳香抑制物相比,东方伊萨酵母降解对-羟基苯甲酸的活性显然比较低,这个抑制物对木糖醇发酵的抑制作用显然又比较强(表 2)。显然,对热带假丝酵母毒性大的抑制物质(表 2),对东方伊萨酵母的毒性也相对强一些。

与降解对-羟基苯甲酸的活性相比,东方伊萨酵母降解愈创木酚的活性显然要大许多。在所用的浓度与脱毒发酵条件下,它的降解率达到 66%,虽然仍有 $10.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的愈创木酚未被降解(表 1),但是对木糖醇发酵的抑制作用几乎完全被解除(表 2)。显然,愈创木酚的浓度 $< 10.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,以及它的生物降解产物均不会对热带假丝酵母的木糖醇发酵性能产生明显的负性影响。

尽管 78.6%的阿魏酸已经被东方伊萨酵母生物降解除去,但是残余浓度仍然有的 $22 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (表 1),HPLC 检测显示有许多中间产物积累,对木糖醇发酵的抑制效应已经不明显(表 2)。可见,阿魏酸的浓度 $< 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 就不会对木糖醇发酵产生明显的抑制作用,它的生物降解产物对木糖醇发酵也不会有明显的负面影响。

表 2 东方伊萨酵母生物降解抑制物对热带假丝酵母木糖醇发酵的影响(发酵时间 45h)

Table 2 Effects of *Issatchenkia orientalis* biodegrading inhibitor on xylitol fermentation by *Candida tropicalis* (fermentation time, 45h)

抑制物 Inhibitors	处理 Dose	木糖 利用 率 Xy- lose used (%)	木糖 醇 Xyli- tol (g/L)	转化 率 Xylitol yield (g/g)	产物 生成 速率 Xylitol volu- metric produ- ctivity (g/L·h)	细胞 生物 量 Cell (g/L)	产物 抑制 率 Inhib- itory rate (%)
CK		100	125.6	0.84	2.79	22.0	—
1	BD	15.3	10.2	0.44	0.23	15.3	91.9
	AD	100	120.0	0.80	2.67	20.6	4.5
2	BD	87.2	82.7	0.63	1.84	17.6	34.2
	AD	100	119.8	0.80	2.66	21.2	4.6
3	BD	77.3	87.6	0.76	1.95	17.7	30.3
	AD	99.8	115.5	0.77	2.57	21.2	8.0
4	BD	75.1	80.4	0.71	1.79	18.3	36.0
	AD	85.2	94.9	0.74	2.11	19.6	24.4
5	BD	91.5	98.5	0.72	2.19	19.7	21.6
	AD	100	122.2	0.81	2.72	21.1	2.7
6	BD	79.2	87.5	0.74	1.94	17.6	30.3
	AD	99.5	119.5	0.80	2.66	21.8	4.9

1. 醋酸, 2. 糠醛, 3. 香草醛, 4. 对-羟基苯甲酸, 5. 愈创木酚, 6. 阿魏酸。BD: 降解前, AD: 降解后。

1. Acetic acid, 2. Furfural, 3. Vanillin, 4. P-hydroxy benzoate, 5. Guaiacol, 6. Ferulic acid. BD: Before degradation, AD: After degradation.

3 讨论

半纤维素水解物中存在的复杂的微生物代谢抑制物, 可利用 HPLC-DAD 法进行分析检测, 与物质属性判断。尤其是, 它用于这些抑制物的生物降解过程的检测, 具有灵敏可靠与直观便捷的特点。

东方伊萨酵母能同时降解半纤维素水解物中的三大代表性抑制物: 醋酸、糠醛与芳香类物质。尽管东方伊萨酵母能对本研究所用的 6 种抑制物均有降解活性, 但是对不同抑制物的降解活性相关甚远。总体而言, 它对芳香化合物的降解活性, 远低于对挥发性小分子抑制物, 如醋酸, 糠醛之类的降解活性。

阿魏酸(3-甲氧基-4-羟基肉桂酸)初始浓度达到 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 东方伊萨酵母发酵 80h 除去 $78 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 降解速率阿魏酸 $0.975 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。用同样的发酵时间, 东方伊萨酵母只降解对-羟基苯甲酸 $5.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 降解速率约为 $0.067 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (表 1)。虽然阿魏酸, 对-羟基苯甲酸都属于单芳香环化合物, 但东方伊萨酵母降解阿魏酸的活性却是降解对-羟基苯甲酸活性约 14.6 倍。显然, 苯环上的取代基是决定抑制物可生物降解性的重要因素。

本实验 HPLC 色谱分离条件下, 培养基成分与外加的木糖醇发酵抑制物之间也能得到良好分离, 并通过 DAD 光谱得以准确识别。生物降解 80h 后的

样品检测证实, 东方伊萨酵母对此六种抑制物均有降解活性, 除乙酸未能检测出降解中间产物外, 其它五种抑制物均能通过 HPLC-DAD 检测出被东方伊萨酵母 S-7 降解生成的中间产物。

东方伊萨酵母降解醋酸过程未能检测到中间产物的现象是很容易理解的。事实上, 许多酵母都能够同化利用醋酸^[15]并且已经证实酵母直接通过醋酸运载系统将其输送到细胞内进行利用^[16,17]。其它五种抑制物均检出降解中间产物, 则表明它们的某些生物降解过程可能在细胞外进行, 或者有某些降解产物分泌到细胞外。总体而言, 其它几个抑制物的结构比醋酸复杂, 它们的生物降解途径也相应复杂一些。

经东方伊萨酵母发酵 80h 之后, 虽然培养基内的糠醛已经降解完全, 但从 HPLC 图谱上可以显著地看出积累了 1 个在 3.49min 处出峰的物质。根据峰形判断此色谱峰是一个单一成分, 通过对比检测证实这个大量积累的降解产物是糠醇。酿酒酵母降解糠醛的途径是首先将其还原为糠醇^[18]。显然, 东方伊萨酵母降解糠醛的途径与酿酒酵母相同。大量积累糠醇而未见糠醇之后的降解产物积累, 表明东方伊萨酵母将糠醛还原为糠醇是一个比较快的过程, 而糠醇的降解则是糠醛整个生物降解过程的限速反应。

真菌可以将香草醛还原为香草醇, 或氧化为香草酸^[19]。东方伊萨酵母降解香草醛的过程生成 1 个在 3.915min 处出峰的物质, 对比香草醇标准品检测证实这个中间产物是香草醇。由此可见, 东方伊萨酵母降解香草醛首先须将其还原为香草醇。香草醇的大量积累则证明香草醇降解是香草醛生物降解过程的限速反应。

相比较而言, 东方伊萨酵母生物降解对-羟基苯甲酸、愈创木酚、阿魏酸过程未见显著积累某一物质, 而是形成一系列中间产物。尤其是, 苯环上连接有碳链取代基的阿魏酸(3-甲氧基-4-羟基苯丙烯酸)的生物降解中间产物, 要比苯环上取代基不含碳链的愈创木酚(邻-甲氧基苯酚)和对-羟基苯甲酸的生物降解中间产物要明显多一些。好氧微生物对芳香物降解的是一个极为复杂的过程, 需要众多的酶系参与, 一般先通过水解侧链的外围酶系除去取代基, 继而打开苯环生成裂解产物, 最后通过裂解产物水解酶进一步水解, 生成一系列复杂的中间产物, 最终进入三羧酸循环而彻底氧化^[20,21]。东方伊萨酵母发酵对-羟基苯甲酸、愈创木酚、阿魏酸之后, 这些抑制物被降解, 并检出一系列复杂的中间产物, 说明它也含有打开芳香物, 并最终将其充分降解的复杂酶系。

含有这些抑制物的培养基经东方伊萨酵母生物

脱毒处理之后,均能有效改善其木糖醇发酵性能。尤其是,它对最主要的两种抑制物-醋酸与糠醛具有很高的降解活性,含醋酸、糠醛的培养基经东方伊萨酵母脱毒发酵之后,醋酸、糠醛被完全降解,发酵性能恢复到商品木糖培养基的水平。

还原是东方伊萨酵母重要的脱毒途径。东方伊萨酵母将糠醛还原为糠醇,将香草醛还原为香草醇,并在培养基中显著积累。但是这两种还原产物对木糖醇发酵的抑制作用均低于相应的醛。

东方伊萨酵母含有打开芳香环,并最终将其充分降解的复杂酶系。东方伊萨酵母分别发酵含香草醛,对一羟基苯甲酸,愈创木酚,阿魏酸的培养基,均能检出一系列复杂的中间产物,并最终将其充分降解。不过,苯环上的取代基可能是决定芳香抑制物可生物降解性的重要因素,因为东方伊萨酵母降解阿魏酸的活性远高于降解对一羟基苯甲酸的活性。

东方伊萨酵母这一种重要的菌种资源值得重视,它用于半纤维素水解物生物脱毒的潜能值得进一步开发。因为生物脱毒不会产生新的污染物,具有经济、简捷,环保的优点。

参考文献:

- [1] Tran A V, Chambers R P. Red oak wood derived inhibitors in the ethanol fermentation of xylose by *Pichia stipitis* CBS 5776[J]. *Biotechnol Lett*, 1985, 7(II): 841-846.
- [2] Canilha L, Batista J, Silva A, et al. Eucalyptus hydrolysate detoxification with activated charcoal adsorption or ion-exchange resins for xylitol production[J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39: 1909-1912.
- [3] 张厚瑞, 曾建智, 何成新, 等. 酵母发酵蔗渣半纤维素水解物生产木糖醇[J]. *生物工程学报*, 2002, 18(6): 724-726.
- [4] Cruz J M, Dominguez H, Parajo J C. Solvent extraction of hemicellulosic wood hydrolysates; a procedure useful for obtaining both detoxified fermentation media and polyphenols with antioxidant activity[J]. *Food chemistry*, 1999, 67(2): 147-153.
- [5] Carvalho F, Duarte LC, Lopes S, et al. Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCM 941[J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40: 1215-1223.
- [6] Rodrigues R C L B, Felipe M G A, Almeida E, 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 Chem Eng*, 2001, 18: 299-311.
- [7] Zhang Hourui, Qin Xiangxiang, Silvio S S, et al. Novel isolates for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysate[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009, 152(2): 199-212.
- [8] Luo C, David LB, Harvey W B. Identification of potential fermentation inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolyzate to ethanol[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2002, 22: 125-138.
- [9] Ranatunga T D, Jervis J, Helm R F, et al. Identification of inhibitory components toxic toward *Zymomonas mobilis* CP4(pZB5) xylose fermentation [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 1997, 67: 185-198.
- [10] Agblevor F A, Hames J F U, Mcmillan J D. Identification of microbial inhibitory functional groups in corn stover hydrolysate by carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy [M]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2004: 97-120.
- [11] De Backer B J, Debrus B J, Lebrun P. Innovative development and validation of an HPLC/DAD method for the qualitative and quantitative determination of major cannabinoids in cannabis plant material[J]. *Journal of Chromatography B*. 2009, 877: 4115-4124.
- [12] Mamani M C V, Reyes F G R, Rath S. Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD[J]. *Food Chemistry*, 2009, 117: 545-552.
- [13] 卫力, 经艳, 林卫军, 等. 7种抑制物对热带假丝酵母木糖醇发酵性能的影响[J]. *广西科学*, 2008, 15(4): 424-429.
- [14] Zhao Jinsheng, Yang Zhengyu, Yang Zhenyu, et al. Measurement of inhibitory effects of furfural and furfural alcohol using coupled redox mediators[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 37(2): 246-253.
- [15] Schneider H. Selective removal of acetic acid from hardwood-spent sulfite liquor using a mutant yeast[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 19: 94-98.
- [16] Sousa M J, Rodrigues F, Corte-Real M, et al. Mechanisms underlying the transport and intracellular metabolism of acetic acid in the presence of glucose in the yeast *Zygosaccharomyces bailii* [J]. *Microbiology*, 1998, 144: 665-670.
- [17] Margarida Casal, Helena Cardoso, Cecilia Leao. Mechanisms regulating the transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Microbiology*, 1996, 142: 1385-1390.
- [18] Taherzadeh MJ, Gustafsson L, Niklasson C, et al. Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 1999, 87(2): 169-174.
- [19] 李永红, 郑璞, 孙志浩. 生物技术方法生产香草醛研究进展[J]. *工业微生物*, 2004, 34(4): 46-57.
- [20] Khajamohiddin S, Repalle E R, Pinjari A B. Biodegradation of aromatic compounds: an overview of meta-fission product hydrolase[J]. *Critical Review in Microbiology*, 2008, 34: 13-31.
- [21] Jothimani P, Kalaichelvan G, Bhaskaran A, et al. Anaerobic biodegradation of aromatic compounds[J]. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2003, 41: 1046-1067.

(责任编辑: 邓大玉)