

聚乙烯醇质量浓度对复合载体固定化热带假丝酵母颗粒强度、形貌与木糖醇发酵的影响

邓立红, 蒋建新, 姚思宇

(北京林业大学材料科学与技术学院, 北京 100083)

摘 要: 以聚乙烯醇(PVA)与海藻酸钠这两种载体复合包埋热带假丝酵母细胞, 制备成固定化细胞颗粒, 研究 PVA 质量浓度对细胞颗粒的磷酸盐耐受性、机械强度与机械稳定性、形貌及木糖醇发酵性能的影响。磷酸盐耐受性实验结果显示, 提高 PVA 质量浓度能有效改善细胞颗粒的磷酸盐耐受性。对细胞颗粒机械强度的分析表明: 发酵前所有的细胞颗粒均有较好的机械强度; 但是 PVA 质量浓度偏低时, 发酵后颗粒的机械强度大幅度下降; PVA 质量浓度提高到 60g/L 时, 细胞颗粒的机械稳定性较好, 发酵后能保持较高的机械强度。扫描电镜分析表明: 发酵后的细胞颗粒表面出现破裂或小孔, 致使产生游离细胞, 但游离细胞的量并非随颗粒机械强度的增加而减少; PVA 质量浓度变化对细胞在颗粒中的分布、形态和木糖醇发酵性能影响很大; PVA 质量浓度较低时, 固定化细胞颗粒外层细胞密布, 颗粒中心也有较多细胞, 细胞呈饱满的卵圆形; 随 PVA 质量浓度增加, 颗粒内部的细胞逐渐减少; PVA 质量浓度达到 60g/L 以上时, 细胞主要分布在颗粒外层, 且呈现聚集生长的现象, 部分细胞发生变形; PVA 质量浓度在 40~60g/L 时, 获得了较高的木糖醇得率, 约 0.6g/g, 但是木糖消耗速率较慢。

关键词: 聚乙烯醇; 海藻酸钠; 热带假丝酵母; 木糖醇

Effect of PVA Concentration on Mechanical Strength, Morphology and Xylitol Production of Immobilized *Candida tropicalis*

DENG Li-hong, JIANG Jian-xin, YAO Si-yu

(College of Materials Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: PVA and sodium alginate were mixed to entrap *Candida tropicalis* cells. The effect of PVA concentration on phosphate tolerance, mechanical strength, morphology and xylitol production of the immobilized cell pellets was discussed. The results indicated that increasing PVA concentration could effectively improve phosphate tolerance of the immobilized cell pellets. All the cell pellets had good mechanical strength before fermentation, which dramatically decreased at lower PVA concentrations but showed good stability at the PVA concentration of 60 g/L, even after fermentation. Transmission scanning microscopic observations showed obvious rupture and holes as well as the resulting free cells on the surface of the immobilized cell pellets. The amount of free cells did not exhibit a decrease with increasing mechanical strength. Instead, the smallest amount of free cells was observed when PVA concentration was 50 g/L. Therefore, PVA concentration could greatly affect the distribution, morphology and xylitol production of *Candida tropicalis* cells. When PVA concentration was lower, mounting cells could be observed on the surface and in the center of the pellets in full round or oval shape. Increasing PVA concentration resulted in a decrease of the cell amount in the center of the pellets. When PVA concentration was higher than 60 g/L, the cells were mainly located in the outer layer with the aggregation and partially deformed cells in the caves. Xylose consumption and xylitol accumulation were also significantly affected by PVA concentration. When PVA concentration was in the range of 40—60 g/L, the yield of xylitol from xylose could reach up to 0.6 g/g in a slow xylose consumption manner.

Key words: polyvinyl alcohol; sodium alginate; *Candida tropicalis*; xylitol

中图分类号: Q815

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)23-0210-05

收稿日期: 2011-04-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31070510); 中央高校基本科研业务费专项基金项目(YX2010-11)

作者简介: 邓立红(1976—), 女, 讲师, 博士, 研究方向为木质纤维的生物转化与利用。E-mail: dlhone@163.com

国际上对微生物发酵法生产木糖醇的研究有约 40 年的历史了,但由于成本过高的问题,发酵法一直难以取代化学法生产木糖醇。近几年来,国内外开始对固定化细胞木糖醇发酵进行研究,因为固定化细胞能重复使用,且能实现高密度细胞发酵,具有改善发酵过程、降低成本的潜力。如 Liu 等^[1]分别采用游离细胞、海藻酸钙固定化细胞和海藻酸钙-壳聚糖固定化细胞发酵白杨木半纤维素水解液,发现固定化细胞消耗木糖比游离细胞快,木糖醇得率更高。Sarote 等^[2]采用乳液膜胶囊包埋细胞,发现限制性供氧条件下木糖醇得率高于好氧条件。da Cunha 等^[3]采用聚乙烯醇包埋细胞发酵木糖醇,包埋时采用冷冻固化的方法,研究了冷冻条件对发酵的影响,结果发现在 PVA 质量浓度为 80g/L,冷冻温度为 -20℃,冻融循环次数为 5 时,获得了最好的发酵效果,木糖醇质量浓度为 28.7g/L,基于消耗木糖的木糖醇得率为 0.49g/g,容积生产速率为 0.24g/(L·h)。Ricardo 等^[4]采用海藻酸钠包埋细胞,在气泡柱式反应器中进行木糖醇发酵,研究了供氧速率与固定化细胞体积分数对发酵的影响,发现二者的影响都很大,当供氧速率为 1.33vvm,固定化细胞体积分数为 40% 时,获得了最高的木糖醇转化率 41%,相应的木糖醇容积生产率为 0.21g/(L·h)。黄炜等^[5-6]对海藻酸钙固定化细胞发酵半纤维素水解液进行了研究,利用固定化细胞重复进行 10 批次共 30d 发酵,木糖醇得率平均为 73.7%,达到了理论值的 80%。

在细胞固定化方法中,包埋法操作简便、细胞活力回收高,是广泛采用的方法。包埋细胞的载体有很多,其中聚乙烯醇(PVA)和海藻酸钙以低毒安全、使用简便、成本低廉^[7]而应用广泛。二者相比较,海藻酸钙凝胶内部空隙大,传质性能好,但机械强度低,PVA 凝胶则正好相反。基于此认识,宋威等^[8]将这二者混合包埋固定橘青霉细胞进行发酵,结果比单用海藻酸钙固定化细胞发酵结果好。王雪梅等^[9]研究了海藻酸钠及其与 PVA 的复配载体对镰孢霉菌细胞的固定,发现在海藻酸钠溶液中加入一定量的 PVA 确实可以提高载体强度。这一类的研究不少,但是在固定化细胞木糖醇发酵的研究中,针对载体浓度这一问题的详细研究还未见报道。本实验采用 PVA 与海藻酸钙复合载体包埋热带假丝酵母(*Candida tropicalis* As2.1776),研究 PVA 质量浓度对固定化细胞颗粒的强度、形貌及木糖醇发酵的影响,为提高固定化细胞木糖醇发酵性能提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌种与试剂

木糖醇发酵菌株为热带假丝酵母(*Candida tropicalis* As2.1776)由中国科学院普通微生物菌种保藏中心提供。

聚乙烯醇(平均聚合度为 1750 ± 50) 北京益利化工有限公司;海藻酸钠 汕头西陇化工有限公司。

1.2 仪器与设备

S-3400N 扫描电子显微镜 日本 Hitachi 公司;ICS-300 型离子色谱仪 美国 Dionex 公司。

1.3 方法

1.3.1 菌种斜面培养

培养基组成:葡萄糖 10g/L、木糖 10g/L、酵母膏 10g/L、KH₂PO₄ 5g/L、MgSO₄·7H₂O 0.2g/L、琼脂 20g/L。试管斜面于 30℃ 培养 36h 后取出置于 4℃ 保藏备用,每两个月转接 1 次。

1.3.2 液体种子培养

培养基组成与去掉琼脂后的斜面培养基相同,250mL 三角瓶中装入 50mL 培养基,接入一环斜面种子,于 30℃、转速 200r/min 的摇床中培养 22h 后取出制备固定化细胞。

1.3.3 固定化细胞颗粒的制备

将一定质量的 PVA 与海藻酸钠配制成复合载体溶液,灭菌,其中海藻酸钠质量浓度为 20g/L。将液体种子在 3000r/min 离心 5min,收集菌泥,加入无菌去离子水,制备成与载体体积比为 1:10 的菌悬液,与载体混合均匀,通过蠕动泵滴入含 20g/L CaCl₂ 的饱和硼酸溶液中,于 4℃ 交联固化 4h,取出,弃去交联剂溶液,用无菌去离子水洗涤细胞颗粒 3 次,加入 5g/L 无菌生理盐水,4℃ 保存待接种用,保存时间不超过 7d。制得的固定化细胞颗粒粒径约 3mm。经检测,载体包埋干细胞量为 5.86g/L。

1.3.4 发酵培养

培养基组成:葡萄糖 10g/L、木糖 100g/L、酵母膏 10g/L、KH₂PO₄ 1g/L、MgSO₄·7H₂O 0.2g/L。250mL 三角瓶中装入 100mL 培养基,接入 5g 固定化细胞颗粒,于 30℃、转速 200r/min 的摇床中培养 96h 后取样检测。

1.3.5 固定化细胞颗粒对磷酸盐耐受力分析

参照文献[10]方法。称取 1g 未发酵过的固定化细胞颗粒,放入 50mL pH7.0、0.1mol/L 磷酸盐缓冲溶液中,于 30℃、转速 150r/min 振荡,记录 10min 后细胞颗粒形态变化情况。

1.3.6 固定化细胞颗粒机械强度与机械稳定性的分析

在两个载玻片之间放 10 个固定化小颗粒,在载玻片上加砝码,加至有一个小球开始破裂时的砝码的总质量表示小球的机械强度^[11]。通过发酵前后细胞颗粒的机械强度的变化来衡量其机械稳定性。

1.3.7 固定化细胞扫描电镜分析

将发酵后的固定化细胞颗粒于生理盐水中浸泡 0.5h,放入 25g/L 与 0.2mol/L 的多聚甲醛溶液中固定

化 2.5h, 乙醇梯度脱水后, 用乙酸异戊酯替换两次, 每次 0.5h, 经超临界 CO₂ 干燥后, 将颗粒剖开, 用扫描电子显微镜观察颗粒结构及其细胞形态与分布情况。

1.3.8 游离细胞质量浓度测定

发酵结束后, 滤去发酵液中的固定化细胞颗粒, 并以无菌去离子水洗涤细胞颗粒两次, 合并滤液于 3000r/min 离心 5min 得菌泥, 于 100℃ 干燥 4h 后称质量, 计算发酵体系中游离细胞的质量浓度。

1.3.9 发酵木糖、木糖醇浓度测定

采用 ICS-3000 型离子色谱仪分析发酵液(进样前过 0.23nm 微孔滤膜)中木糖和木糖醇的质量浓度。Carbopac™ PA20 阴离子色谱柱(4mm × 250mm); 脉冲安培检测器; AS50 自动进样器。实验用水均为电阻率不低于 18.3MΩ·cm 的去离子水。为防止淋洗液吸收空气中的 CO₂, 淋洗液配制完毕后及实验过程中淋洗液瓶采用 42~56kPa 的氮气保护。采用 5mmol/L NaOH 等浓度分离糖分, 分离时间为 20min, 流速为 0.4mL/min, 柱温为 30℃, 然后用 0~75mmol/L NaAc 梯度洗脱, 流速为 0.4mL/min。木糖醇得率为消耗的木糖质量与木糖醇生成质量之比。

2 结果与分析

2.1 PVA 质量浓度对固定化细胞颗粒磷酸盐耐受力的影响

培养基中不可避免地会含有磷酸根离子, 海藻酸钙对磷酸盐的耐受性弱, 如果仅用海藻酸钙包埋细胞, 培养过程中细胞颗粒会受培养基中磷酸盐的侵蚀, 使强度减弱甚至破裂溶解, 这极大地影响了固定化细胞的使用寿命。为此, 有研究采用改性法来增强海藻酸钙对磷酸盐的耐受性, 取得了较好的结果^[10]。考虑到 PVA 不存在对磷酸盐耐受性的问题, 本实验对不同 PVA 质量浓度制备的固定化细胞颗粒进行磷酸盐耐受性检测, 结果如表 1 所示。

表 1 PVA 质量浓度对固定化细胞颗粒耐磷酸盐的影响
Table 1 Effect of PVA concentration on phosphate tolerance of immobilized *Candida tropicalis* cell pellets

PVA 质量浓度/(g/L)	变形程度	PVA 质量浓度/(g/L)	变形程度
0	溶解	40	+++
10	溶解	50	++
20	溶解	60	+
30	++++	70	肉眼观察不到变形

注: +, 变形很轻微, + 越多表示变形越严重。

由表 1 可见, 当细胞颗粒中 PVA 质量浓度很低时, 细胞颗粒的磷酸盐耐受性很差, 很快溶解于其中。提高载体 PVA 的质量浓度能有效提高颗粒的磷酸盐耐

性, 当 PVA 质量浓度提高到大于等于 60g/L 以后, 固定化细胞颗粒的变形程度非常小。

2.2 PVA 质量浓度对固定化细胞颗粒发酵前后机械强度与机械稳定性的影响

固定化细胞颗粒的机械强度直接影响其使用批次, 是制备固定化细胞时需重点考虑的因素之一。本实验对固定化细胞颗粒发酵前后的机械强度进行了测定, 通过二者的变化来体现 PVA 质量浓度对细胞颗粒机械强度与发酵的影响。结果发现发酵前所有配比下的颗粒都能承受 700g 的压力而无破裂, 但是变形程度不一致; 当 PVA 的质量浓度在 50g/L 及以下时, 所有颗粒都被压扁平铺于载玻片上, 撤去压力后完全不能复形; PVA 质量浓度为 60g/L 时, 颗粒也被完全压扁, 但撤去压力后能复形成不规则的颗粒; PVA 质量浓度在 70g/L 以上时, 颗粒不能完全被压扁, 撤去外力后基本能恢复原形。与廖强等^[11]制得的固定化细胞颗粒相比, 本实验所制得的固定化细胞颗粒具有更优良的机械强度。发酵后颗粒的机械强度如表 2 所示。

表 2 不同 PVA 质量浓度制备的固定化细胞颗粒发酵后的机械强度
Table 2 Mechanical strength of immobilized *Candida tropicalis* cell pellets prepared under various PVA concentrations

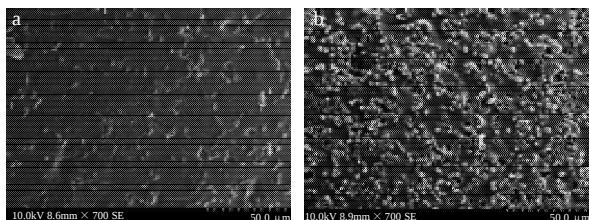
PVA 质量浓度/(g/L)	机械强度/g	PVA 质量浓度/(g/L)	机械强度/g
0	70	40	94
10	85	50	182
20	87	60	不破裂, 但是加砝码 700g 时被压平
30	85	70	不破裂, 但是加砝码 700g 时被压平

由表 2 可见, 当 PVA 质量浓度低于 60g/L 时, 发酵后颗粒的机械强度较发酵前大幅降低; PVA 质量浓度大于 60g/L 以后, 发酵后的颗粒能保持较高的机械强度, 在砝码质量达到 700g 时也没有出现破裂。结合表 1 结果, 可以认为固定化细胞颗粒机械强度的损耗很大程度上是由于海藻酸钙受到腐蚀溶解导致的。发酵前后的机械强度对比表明, PVA 质量浓度大于 60g/L 时, 才能有效抵抗木糖醇发酵过程中细胞颗粒机械强度的损耗。这一点在采用固定化细胞颗粒发酵中显得尤为重要, 只有细胞颗粒能保持较好的机械稳定性而不溶解破裂, 才能够重复使用。

2.3 PVA 质量浓度对固定化细胞颗粒形貌的影响

PVA 质量浓度对颗粒结构、细胞形态与分布影响很大。发酵后的细胞颗粒表面出现破裂或小孔, 导致了细胞的泄漏。当 PVA 质量浓度低时, 表面有很多裂纹。如图 1 所示, PVA 质量浓度提高到 70g/L 时, 表面几乎没有裂纹, 但是出现很多破漏, 破漏之处布满细胞,

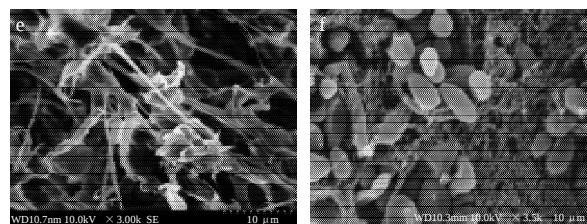
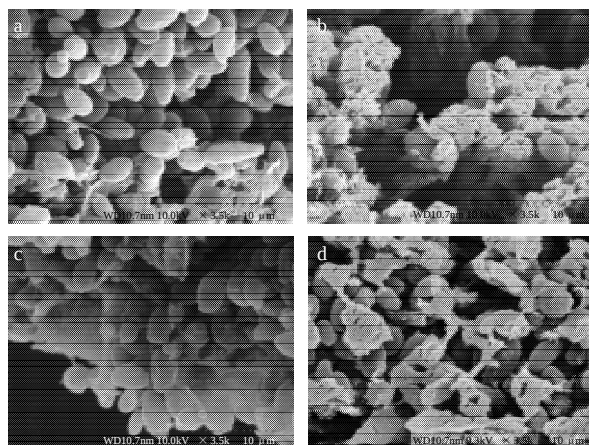
有些细胞还伸出颗粒表面向外生长,说明破漏是由于细胞生长对载体造成压力导致的。颗粒表面除了破裂外,还有与细胞大小一致的孔洞(图1a),这应该是包埋在颗粒表面的细胞脱落下来后留下的。这是发酵液中出现游离细胞的原因。经过培养后,不同PVA质量浓度条件下颗粒中细胞的形态及分布呈现较大差异。当不含PVA或PVA质量浓度很低时,即PVA质量浓度为0g/L与10g/L时,细胞在颗粒表层大量分布,中心密度稍有减少,整个颗粒内细胞绝大部分呈饱满的卵圆形(图2a、b、c、d)。随着PVA质量浓度进一步上升,颗粒表层细胞仍然大量分布,但是颗粒内部细胞密度大量减小,直至PVA质量浓度达到70g/L时,细胞集中分布在颗粒表层,中心几乎找不到细胞(图2e),说明颗粒内部缺乏营养。不仅如此,在PVA质量浓度达到60g/L以上时,细胞在颗粒表层的分布并不均匀,而出现成堆聚集的现象,细胞的形态变得不规则,出现凹陷等异常形态(图2f)。李海波等^[12]采用PVA-海藻酸钙复合包埋*Microbacterium* sp. S-4时也观察到了这种现象,认为是由于菌体的不均匀生长造成固定化细胞颗粒内部传质过程不连续,增加了传质阻力,导致整个传质过程在路线上丧失连贯性,代谢产物不能迅速扩散到颗粒外,从而在菌体表面沉积,诱发菌体形态改变。



a. 发酵前; b. 发酵后; PVA 质量浓度为 70g/L。

图1 固定化细胞颗粒表面发酵前后的破裂与孔洞($\times 700$)

Fig.1 Ruptures and holes on the surface of immobilized *Candida tropicalis* cell pellets ($\times 700$)



a. PVA 质量浓度为 0g/L, 颗粒外层细胞; b. PVA 质量浓度为 0g/L, 颗粒中心细胞; c. PVA 质量浓度为 10g/L, 颗粒外层细胞; d. PVA 质量浓度为 10g/L, 颗粒中心细胞; e. PVA 质量浓度为 70g/L, 颗粒中心细胞; f. PVA 质量浓度为 60g/L, 颗粒外层细胞。

图2 PVA 质量浓度对固定化细胞分布与形态的影响

Fig.2 Effect of PVA concentration on the distribution and morphology of immobilized *Candida tropicalis* cells

2.4 PVA 质量浓度对发酵体系中游离细胞量的影响

采用固定化细胞发酵时,不可避免地会有细胞泄露到培养基中,泄露的细胞经增殖会产生更多游离细胞。游离细胞与包埋于载体中的固定化细胞相比,生存环境不一样,因此游离细胞的存在会使培养体系的不均一性增加,难于使每一个细胞的生产能力都充分体现出来。故采用固定化细胞发酵应尽可能减少游离细胞的量。本实验发酵96h后发酵液中游离细胞的质量浓度随PVA质量浓度的变化如图3所示。

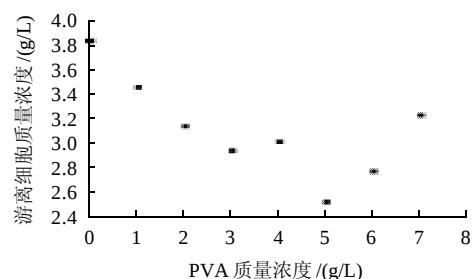


图3 PVA 质量浓度对发酵体系中游离细胞量的影响

Fig.3 Effect of PVA concentration on the amount of free *Candida tropicalis* cells

由图3可见,载体中PVA质量浓度较低时,游离细胞的质量浓度较高。结合细胞颗粒的强度分析结果,可认为此时细胞的泄露主要是由于细胞颗粒强度不够导致的。游离细胞的量在PVA质量浓度为5g/L时达到最小值,而后随PVA质量浓度增加而上升。由前述扫描电镜分析结果可知,PVA质量浓度升高时产生细胞聚集生长现象。因此可推测PVA质量浓度达到一定值时,细胞泄露主要是由于细胞聚集生长对载体造成压力导致破裂而产生的。由此可知,并非细胞颗粒机械强度越高,细胞泄露量就越小。

2.5 PVA 质量浓度对固定化细胞木糖醇发酵的影响

由于发酵体系中同时存在固定化细胞和游离细胞, 受载体传质性能的限制, 包埋于载体中的细胞与游离细胞的生活环境并不一致, 因而 PVA 质量浓度不同时, 固定化细胞木糖醇发酵结果差异较大, 结果如图 4 所示。

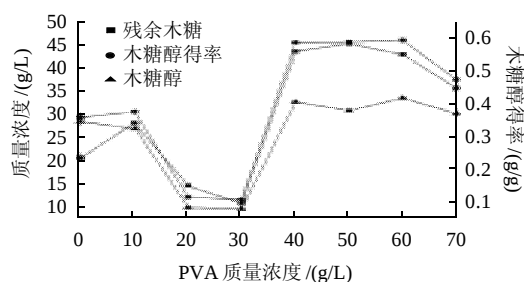


图 4 PVA 质量浓度对固定化细胞木糖醇发酵的影响

Fig.4 Effect of PVV concentration on xylose consumption and xylitol production

由图 4 可见, 固定化细胞发酵时, 糖的消耗速率受细胞量、供氧速率等多方面的影响, 本实验中残余木糖的质量浓度是这些因素综合作用的结果。此外大量研究表明, 木糖醇的积累速率受供氧量影响很大, 有氧或厌氧状态都不利于木糖醇的生产, 而限制性供氧有利于木糖醇得率增加^[2,13-14]。在 PVA 质量浓度为 40、50g/L 与 60g/L 时, 获得了较高的木糖醇得率, 约 0.6g/g。但在这些质量浓度条件下, 与以前采用游离细胞发酵的研究结果相比^[15], 本实验的木糖醇得率偏低, 木糖消耗较慢, 残余木糖质量浓度较大, 还需要通过其他发酵参数的优化, 如改变细胞的包埋量、进行分段控制发酵等, 来改善这些问题。PVA 质量浓度增加到 70g/L 时, 残余木糖与木糖醇得率均下降, 可能是氧气传递速率太慢导致。可以肯定的是, PVA 质量浓度通过影响营养物质的传递速率和细胞的生长, 最终对木糖醇发酵产生影响, 木糖醇发酵所需的溶氧条件可以通过调节 PVA 质量浓度获得。

3 结 论

以 PVA-海藻酸钠复合载体制备热带假丝酵母固定化细胞颗粒时, PVA 的质量浓度极大地影响着细胞颗粒的耐磷酸盐能力和机械强度。PVA 质量浓度增加, 细胞颗粒耐磷酸盐能力和机械强度都增加。PVA 质量浓度较低时, 细胞颗粒的机械稳定性较差, PVA 质量浓度提高到 60g/L 以上时, 才能有效抵抗发酵过程中细胞颗粒机械强度的损耗, 发酵后仍然维持较高的机械强度。

发酵后的细胞颗粒表面出现破裂或小孔, 这导致了细胞泄漏和游离细胞的产生。当 PVA 质量浓度低时, 细胞颗粒表面有很多裂纹, PVA 质量浓度提高到 70g/L 以

后, 细胞颗粒表面几乎没有裂纹, 但是出现很多由于细胞聚集生长所致的破漏。这两种因素综合作用的结果使得在 PVA 质量浓度为 50g/L 时发酵液游离细胞量最少。

PVA 质量浓度的改变使颗粒中细胞的分布、形态及木糖醇发酵结果差异明显。PVA 质量浓度较低时, 固定化细胞颗粒表层细胞密布, 颗粒中心也有较多细胞, 细胞形态正常。PVA 质量浓度达到 60g/L 时, 细胞主要分布在颗粒外层, 而且出现聚集生长的现象, 部分细胞发生变形。PVA 质量浓度为 40、50、60g/L 时能实现木糖醇发酵的微氧条件, 获得了相对高的木糖醇得率, 但此时木糖消耗速率较慢, 还需优化其他发酵参数来改善发酵过程。

参考文献:

- [1] LIU Jing, LIN Lu, PANG Chunsheng, et al. Poplar woodchips as a biorefinery feedstock-prehydrolysis with formic/acetic acid /water system, xylitol production from hydrolysate and kraft pulping of residual woodchips [J]. Journal of Biobased Materials and Bioenergy, 2009, 3(1): 37-45.
- [2] SAROTE S, RITTIKORN C, WIRAT V, et al. Xylitol production by liquid emulsion membrane encapsulated yeast cells[J]. Journals of Chemical Technology and Biotechnology, 2009, 84: 1218-1228.
- [3] da CUNHA M A A, CONVERTI A, SANTOS J C, et al. PVA-hydrogel entrapped *Candida guilliermondii* for xylitol production from sugarcane hemicellulose hydrolysate[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2009, 157: 527-537.
- [4] RICARDO F B, JÚLIO C S, LUCILENE Y M, et al. Xylitol production in a bubble column bioreactor: influence of the aeration rate and immobilized system concentration[J]. Process Biochemistry, 2007, 42: 158-262.
- [5] 黄炜, 方祥年, 夏黎明. 固定化细胞在三相流化床中发酵生产木糖醇[J]. 浙江大学学报, 2004, 38(10): 1366-1370.
- [6] 黄炜, 方祥年, 夏黎明. 固定化细胞发酵半纤维水解液产木糖醇的研究[J]. 林产化学与工业, 2004, 24(1): 29-33.
- [7] 蒋宇红, 黄霞, 俞毓馨. 几种固定化细胞载体的比较[J]. 环境科学, 1993, 14(2): 11-15.
- [8] 宋威, 张芹, 李欢庆, 等. 复合载体固定化细胞发酵生产核酸酶 P1 的对比研究[J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2008, 29(3): 251-254.
- [9] 王雪梅, 于明锐, 谭天伟. 海藻酸钠复合载体固定化细胞拆分 D, L-泛解酸内酯[J]. 北京化工大学学报, 2006, 33(3): 28-32.
- [10] 林海, 王申健, 罗晖, 等. 木糖醇发酵菌株固定化细胞的改性研究[J]. 林产化学与工业, 2006(4): 78-82.
- [11] 廖强, 巴淑丽, 朱陶, 等. 固定化细胞的制备以及性能实验研究[J]. 工程热物理学报, 2007(增刊 2): 115-117.
- [12] 李海波, 杨瑞崧, 李培军, 等. 聚乙烯醇-海藻酸钠固定 *Microbacterium* sp. S2-4 的微环境分析[J]. 生态学杂志, 2007, 26(1): 16-20.
- [13] du PREEZ J C. Process parameters and environmental factors affecting D-xylose fermentation by yeasts[J]. Enzyme Microbiology Technology, 1994, 16(11): 944-956.
- [14] FARIA L F F, GIMENES M A P, NOBREGA R, et al. Influence of oxygen availability on cell growth and xylitol production by *Candida guilliermondii*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2002, 98-100(1/9): 450-458.
- [15] DENG Lihong, WANG Yanhui, ZHANG Yang, et al. The enhancement of ammonia pretreatment on the fermentation of rice straw hydrolysate to xylitol[J]. Journal of Food Biochemistry, 2007, 31(2): 195-205.