

学校编码: 10384
学号: 20620111151501

厦门大学

硕士学位论文

纤维素多酶复合体于农业废弃物的资源化应用

Applications of cellulase multi-complex in agricultural waste

吴小敏

指导教师姓名:

姚传义 副教授

吴意珣 副教授

专业名称:

工业催化

论文提交日期:

2014 年 5 月

论文答辩时间:

2014 年 5 月

学位授予日期:

答辩委员会主席: __

评阅人: __

2014 年 05 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（ 卢英华教授 ）课题（组）的研究成果，获得（ 卢英华教授 ）课题（组）经费或实验室的资助，在（ 华山楼 ）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

- () 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。
() 2. 不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人（签名）：

年 月 日

摘要

生物质资源是可再生资源，在可持续发展中具有不可替代的作用。工业应用主要聚焦在农业废弃物的生物质资源再利用上，但是目前利用率较低，因而寻找简洁、高效的转化手段对降低环境污染、及能源危机的时代具有重大意义。

本文利用里氏木霉菌纤维素酶(TR)和茶叶渣农业废弃物的协同作用吸收重金属铬 Cr(VI)，并建立其动力学模型。实验表明里氏木霉菌纤维素水解酶对茶叶去除铬有协同效应，不仅能产具有高价值的茶多糖，而且经由里氏木霉菌纤维素酶水解后的茶叶粒径更小、曝露更多吸附表面，提供更多碳原子攻击位点，结构更有利于吸附 Cr(VI)。未处理茶叶(UN-TW)和酶处理茶叶(TRCEL-TW)吸附 Cr(VI)的最佳条件都是 67 °C、pH 1.5 及 200 mg/L 的 Cr(VI)。针对 pH、温度、浓度等因素建立模型 $-d[Cr(VI)]/dt = A[H^+]^n e^{-Ea/RT} [Cr(VI)]_0^m$ ，能成功地预测 Cr(VI) 的生物吸附特性曲线。本文为去除液相中重金属 Cr(VI) 的相关研究提供了一种新的尝试。

此外，对柚子皮和橙子皮农业废弃物进行简单的前处理，得到柚子内皮(GFIP)、柚子全皮(GFWP)、橙子内皮(OIP)及橙子全皮(OWP)四种生物材料。然后用里氏木霉菌纤维素酶进行水解实验，完成酶及底物的表征分析，得出最佳水解条件为：55°C 时，在 pH 5 的醋酸盐缓冲液中加入 0.075 U/mL 的 TR。经还原糖分析得到 GFIP、OIP 比 GFWP、OWP 产糖（还原糖）高出 30-35%。本文为果皮农业废弃物的加值利用、减轻环境污染具有指导意义与经济效益！

关键词：农业废弃物，茶叶，柚子皮，橙子皮，里氏木霉菌纤维素水解酶，Cr(VI)，还原糖

Abstract

Biomass resources are the renewable resources, which has an irreplaceable role in the sustainable development. The abundant agricultural wastes are the critical focus in the industrial application. Due to the low utilization of agricultural wastes, to explore the simple and efficient approaches to reduce the impact of environmental pollution and crisis of fossil fuel are with significant importance.

This first attempt study the synergistic effect between *Trichoderma reesei* (TR) cellulases and the abundant agricultural tea waste in absorption of heavy metal Cr(VI) as well as a kinetic model development. The demonstration suggested that cellulosic tea wastes after *T. reesei* hydrolysis could provide more attacked carbon sites and gave a fine structure, intensive change in the composition, and more accessibility area for absorption of heavy metal. As a result, it is benefit to remove Cr (VI) as well as produce the high-value polysaccharide from tea. The optimal conditions for untreated tea waste (UN-TW) and TR treated tea waste (TRCEL-TW) in adsorption of Cr (VI) are 67°C, pH 1.5, and 200 mg/L of Cr (VI). Then, we developed an advanced kinetic model in the form of $-d[Cr(VI)]/dt = A[H^+]^n e^{-E_a/RT} [Cr(VI)]_0^m$, which can successfully predict the time-dependent Cr(VI) concentration of various pHs, initial Cr(VI) concentrations and temperatures. This study provides an alternative approach to remove heavy metals Cr (VI) from the aqueous.

Furthermore, by applied a simple pretreatment on agricultural wastes of grapefruit peel and orange peel, we obtained four kinds of biomaterials: grapefruit inner peel (GFIP), grapefruit whole peel (GFWP), orange inner peel (OIP) and orange whole peel (OWP). The optimal hydrolytic conditions for four materials are 55°C at pH 5 in 50 mM acetic acid buffer with 0.075 U/mL of TR. GFIP and OIP could produce 30-35% of reducing sugar (RS) more than GFWP and OWP, respectively. This study also provides an intact approach to utilize agricultural waste of peel for food and energy application.

Abstract

Key Words : Agricultural waste, tea waste, grapefruit peel, orange peel,
Trichoderma reesei cellulases, Cr(VI), reducing sugars

厦门大学博硕士论文摘要库

目录

第1章 前言	1
1.1 环境污染概况	1
1.1.1 能源与环境面临的挑战.....	1
1.1.2 水污染对环境的影响.....	2
1.1.3 工业废水重金属污染对环境的影响.....	2
1.2 生物质能源利用概况	7
1.2.1 生物炼制简介.....	7
1.2.2 生物质能简介.....	8
1.2.3 纤维素在生物能源发展中的战略意义.....	9
1.3 农业废弃物生物质能概况	10
1.3.1 废茶叶的应用.....	11
1.3.2 废橙子皮柚子皮的应用.....	12
1.4 纤维素酶水解纤维素研究	13
1.4.1 纤维素的水解.....	13
1.4.2 纤维素酶的简介.....	15
1.5 本课题的研究内容及意义	22
第2章 实验材料与方法	24
2.1 材料	24
2.1.1 纤维素酶.....	24
2.1.2 实验试剂.....	24
2.1.3 主要仪器.....	24
2.1.4 溶液配制.....	24
2.2 实验分析方法	26
2.2.1 还原糖的测定—3, 5 二硝基水杨酸 (DNS) 法	26
2.2.2 液相色谱分析法.....	27
2.2.3 蛋白含量测定.....	28
2.2.4 Cr(VI)和总 Cr 的检测.....	29
2.2.5 带有能量色散 X 射线光谱(EDX)场发射扫描电子显微镜 (SEM) 分析法.....	32
2.2.6 激光粒度仪 (PSD) 检测茶叶粒径分布.....	32
2.2.7 近红外光谱技术 (NIR) 分析法.....	32
2.2.8 X-射线光电子能谱 (XPS) 分析.....	32
2.2.9 傅氏转换红外线光谱(FTIR)分析法	33
2.2.10 元素分析.....	33
2.2.11 纤维素含量测定 ^[86]	33
2.2.12 半纤维素含量测定 ^[87]	34
2.2.13 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析.....	34

2.2.14 酶活分析.....	34
第3章 里氏木霉菌纤维素水解酶对茶叶渣吸附Cr(VI)的协同效应与模型建立.....	36
3.1 茶叶的预处理	36
3.2 茶叶去除 Cr(VI)批试验.....	36
3.2.1 pH 对吸附的影响.....	37
3.2.2 温度对吸附的影响.....	40
3.2.3 Cr(VI) 初始浓度对吸附的影响.....	43
3.2.4 茶叶去除 Cr(VI)和总 Cr 的能力测定.....	46
3.2.5 茶叶的铬吸附特性曲线.....	47
3.3 生物材料的表征	48
3.3.1 里氏木霉菌纤维素酶处理茶叶后上清液糖含量测定.....	48
3.3.2 粒径分布检测.....	48
3.3.3 近红外光谱检测法(NIR)分析茶叶光谱特性	50
3.3.4 扫描式电子显微镜(SEM)检测茶叶颗粒表面特性.....	52
3.3.5 X-射线光电子能谱(XPS)分析检测金属价态	54
3.4 茶叶废弃物吸附 Cr(VI)的动力学模型.....	55
3.4.1 动力学模型建立.....	55
3.4.2 回归方程得到去除速率 k 以及常数项 C.....	56
3.4.3 关于常数项 C 的模型以及参数.....	59
3.4.4 关于去除速率 k 的模型以及参数.....	59
3.5 本章小结	62
第4章 里氏木霉菌纤维素水解酶复合体对柚子皮和橙子皮农业废弃物的水解.....	64
4.1 橙子皮柚子皮的预处理	64
4.2 底物的相关表征	65
4.2.1 组分分析.....	65
4.2.2 傅氏转换红外线光谱分析.....	66
4.3 里氏木霉菌纤维素酶的相关表征	67
4.3.1 里氏木霉菌纤维素酶蛋白分析.....	67
4.3.2 里氏木霉菌纤维素酶最佳水解 pH 及温度.....	70
4.4 里氏木霉菌纤维素酶对果皮的水解效益探讨	73
4.4.1 反应时间的影响.....	73
4.4.2 固液比的影响.....	76
4.4.3 酶用量的影响.....	76
4.5 本章小结	79
第5章 结论与展望.....	80
5.1 结论	80
5.2 展望	80

目录

参考文献.....	81
附录	90
附录一：实验试剂	90
附录二：主要仪器	92
在读期间发表论文	93
致谢.....	94

厦门大学博硕士论文摘要库

Content

Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 Overview of environmental contamination	1
1.1.1 Challenges of energy and environment.....	1
1.1.2 Impact of water pollution on the environment.....	2
1.1.3 Impact of heavy metal pollution on the environment	2
1.2 Overview of biomass energy	7
1.2.1 Introduction of biorefinery.....	7
1.2.2 Introduction of biomass	8
1.2.3 Significance of cellulose in bioenergy	9
1.3 Overview of agricultural waste.....	10
1.3.1 Application of tea waste.....	11
1.3.2 Application of orange peel grapefruit peel waste	12
1.4 Overview of enzymatic hydrolysis of cellulose	13
1.4.1 Hydrolysis of cellulose	13
1.4.2 Introduction of cellulase	15
1.5 Contents and purpose of the thesis.....	22
Chapter 2 Materials and methods	24
2.1 Materials	24
2.1.1 Cellulase.....	24
2.1.2 Reagents.....	24
2.1.3 Instruments.....	24
2.1.4 Solutions	24
2.2 Methods.....	26
2.2.1 Determination of reducing sugars	26
2.2.2 HPLC analysis	27
2.2.3 Determination of protein content	28
2.2.4 Determination of Cr(VI) and total Cr	29
2.2.5 SEM with EDX.....	32
2.2.6 PSD analysis	32
2.2.7 NIR analysis.....	32
2.2.8 XPS analysis	32
2.2.9 FTIR analysis	33
2.2.10 Elemental analysis	33
2.2.11 Determination of cellulose content	33
2.2.12 Determination of hemicellulose content	34
2.2.13 SDS-PAGE analysis	34
2.2.14 Activity of cellulase	34

Chapter 3 Synergistic effect of Trichoderma reesei cellulases on agricultural tea waste for adsorption of heavy metal Cr(VI)	36
3.1 Pretreatment of tea waste.....	36
3.2 Batch experiments for Cr(VI) removal.....	36
3.2.1 Effects of pH on the Cr(VI) removal	37
3.2.2 Effects of temperature on the Cr(VI) removal.....	40
3.2.3 Effects of Cr concentrations on the Cr(VI) removal.....	43
3.2.4 The capabilities of tea waste to remove Cr (VI) and total Cr	46
3.2.5 Curve of adsorption.....	47
3.3 Characterization of biomaterials.....	48
3.3.1 Sugar content	48
3.3.2 Distribution of particle size.....	48
3.3.3 NIR analysis.....	50
3.3.4 SEM-EDX analysis	52
3.3.5 XPS analysis	54
3.4 Kinetics model	55
3.4.1 Model development	55
3.4.2 Calculate of k and C.....	56
3.4.3 Constant C models and parameters.....	59
3.4.4 Removal rate k and parameters	59
3.5 Summary.....	62
Chapter 4 Trichoderma reesei cellulases complex in hydrolysis of agricultural waste of grapefruit peel and orange peel.....	64
4.1 Pretreatment of peels	64
4.2 Characterization of substrate (GFIP, OIP, GFWP, OWP).....	65
4.2.1 Composition analysis of substrate	65
4.2.2 FTIR analysis	66
4.3 Characterization of Trichoderma reesei	67
4.3.1 Protein analysis	67
4.3.2 Optimal pH and temperature.....	70
4.4 Hydrolysis	73
4.4.1 Effect of reaction time.....	73
4.4.2 Effect of solid-liquid ratio.....	76
4.4.3 Effect of enzyme loading	76
4.5 Summary.....	79
Chapter 5 Conclusion and prospect	80
5.1 Conclusion	80
5.2 Prospect.....	80
References	81

Appendix.....	90
Appendix 1: Reagents	90
Appendix 2: Instruments.....	92
Publications during graduate study	93
Acknowledgements	94

厦门大学博硕士论文摘要库

第1章 前言

1.1 环境污染概况

1.1.1 能源与环境面临的挑战

能源短缺及环境污染是全球现代化国家持续发展面临的两大主要挑战，日益成为制约人类社会发展的主要问题。自 19 世纪开始，以化石资源为经济基础的近代工业文明创造了空前的社会繁荣，但随着近年来能源资源短缺、生态环境恶化等一系列问题的日渐突出，现代工业化经济进程与石化资源日渐枯竭的现实形成了剧烈冲突，人类社会的可持续发展面临着前所未有的挑战。根据国际能源机构的统计，若按目前的水平开采世界已探明的能源，人类使用的主要能源—石油、天然气和煤炭供人类开采的年限分别只有 40 年、50 年和 240 年。中国是一个化石能源严重短缺的国家，已探明石油可开采储量约 62 亿，t 现已累计开采 34.6 亿吨，仅剩余 27.4 亿吨，可供开采 17 年^[1]。此外，1975 年的世界人口比 1925 年增加一倍，但世界能源的总消耗却增长了 4.5 倍，研究表明，每十年人类消耗的能源总量将翻一倍，而且在未来十年能源消耗的总量将等同于自古至今人类消耗的能源总量。随着社会经济不断发展，对能源的大量消耗导致环境严重恶化，特别是二氧化碳排放增加引起的温室效应已经对全球气候造成了长期的影响。自工业革命以来，二氧化碳浓度不断增加，全球每年由燃烧矿石燃料而释放的温室气体占全球每年释放的全部温室气体的 82%^[2]。工业革命后，全球燃烧矿石燃料向大气中释放了约 2700 吨的碳，大气中的 CO₂ 水平由 2.75×10^{-4} 上升到 3.80×10^{-4} ，地球近地表温度升高了大约 0.6°C^[3]。科学家预测若不采取任何防治措施，如果不采取防止措施，预计在本世纪中期大气 CO₂ 水平将会增加到 5.50×10^{-4} 。于 2100 年，地球表面温度将较目前增加 1°C 至 3.5°C，海平面也上升 35-95 公分，导致低洼地区海水倒灌，全世界三分之一居住于海岸边缘的人口将遭受威胁，而且就美国能源信息管理局的数据分析，我国预计在未来 20 年，二氧化碳排放量相较于其他国家会有显着的增长，对全球环境及生态具有指标性的影响^[4]。

1.1.2 水污染对环境的影响

能源危机日益突出，环境污染也日趋严重，特别是在中国已成为不容忽视的重大环境问题的水污染。大量的湖泊、河流被污染，特别是流经城镇的河段污染更加严重。据统计，流经中小城镇的河段有 36.2% 为 I-III 类水质，达到 IV 至 V 类水质的河段则有 63.8% 之多。

中国水资源总量居世界第 6 位，但人均水量约为世界人均水量的 1/4，是水资源严重不足的国家之一，如果中国水资源得不到有效监管，那么 2030 年中国的用水需求将达到 8180 亿立方米，供水缺口 2010 亿立方米。在水资源短缺的同时，水资源浪费和被污染的现象非常严重。根据有关资料统计^[5]，目前我国工业用水的重复利用率不足 60%，单位 GDP 用水量大概是世界平均水平的 3 倍。我国在 2010 年的工业和城镇生活废水排放总量为 572 亿吨，排放达标率约为 72%，其中工业废水排放达标率约为 92%，城镇生活污水排放达标率约为 57%，废水中化学需氧量(COD) 排放量 1277. 5 万吨，比上年减少 3. 3% 2010 年长江流域废污水排放总量为 339. 0 亿吨，比上一年度增加 5. 9 亿吨，增幅 1. 8%，增幅有所趋缓。环境中的水污染问题是当前我国面临的最严重的问题之一，随着石油化工塑料及纤维等重工业的发展，废水治理已是当前工作的重中之重，鉴于建设人与自然和谐共处的需要和来自日益严格的环保法规的压力，废水处理技术近些年来在全世界范围内得到了积极研发和应用，并取得了良好的经济和社会效益。

源水的净化和废水的处理利用是工业水处理技术的重要研究课题。水处理技术自 20 世纪 20 年代开始起步，其水平随生产和环境的要求，在水处理的工艺和水处理剂的研制等方面得到了迅速发展。废水处理的方法很多，按照原理归纳起来可分为物理法化学法和生物法，但是单一的处理方法往往不能处理成分复杂种类繁多的废水，很多时候采用联合使用的方法。

1.1.3 工业废水重金属污染对环境的影响

工业废水的排放量日益增加导致大量有毒有害重金属离子废水的排放对生态环境及人类健康造成极大的危害。工业废水中重金属镉、镍、汞、铬污染危害

尤为严重。

1.1.3.1 镉污染对环境的影响

镉的毒性较大，主要应用于电镀行业、化工行业、电子行业和核工业等领域。目前，镉污染源主要有炼锌工厂、有色金属冶炼厂以及电镀厂等等。当镉污染源通过废水、废气、废渣排入环境时，它比其它重金属更容易被农作物所吸附，非常容易进入食物链，从而在人体中积累，产生毒害作用。

镉并不是人体的必需元素，人体内的镉是从外界环境中吸取的，通过消化系统和呼吸系统进入体内沉积下来。对植物而言，当镉被植物吸收后，大部分聚集在根部，通常让植物生长迟缓，枯黄，甚至死亡。镉不是植物的必须元素，但是镉作为锌的化学相似物，往往能代替植物所需要的锌，从而破坏植物的碳酸酶、磷酸酶和各种脱氢酶，以及在葡萄糖磷酸化和碳水化合物代谢重要酶系统中偷换锌的角色，使植株生长受到抑制而死亡。对人类而言，镉也不是人体的必需元素。

镉进入人体后，能在体内形成镉硫蛋白，通过血液循环蓄积于肾和肝中。肾脏可蓄积体内镉总量的 1/3，容易成为镉中毒的靶器官。镉与含羟基、巯基、氨基的蛋白质分子结合，致使许多酶系统功能瘫痪，从而影响肝和肾的正常功能。肾功能不全则会影响到维生素 D3 的活性，使骨骼的生长代谢受到抑制，造成骨骼疏松、萎缩、变形等，进而导致骨软化症，浑身疼痛。例如，日本历史上著名的公害病—痛痛病^[6]。镉还能损伤肾小管，使人患上糖尿、蛋白尿和氨基酸尿等疾病，此外，镉也能蓄积在人体脾、胰、甲状腺、睾丸等器官中，对人体造成危害。若长期食用遭到镉污染的食品，可能导致“痛痛病”，造成蛋白质从尿中流失，容易引发软骨症和自发性骨折。慢性镉中毒能引起贫血，也能严重影响人体生育能力；急性镉中毒则能引发肺炎、肺水肿、呼吸困难等，若不慎食用一定的含镉化合物，则可能出现上吐下泻和胃肠痉挛等症状，甚至导致肝肾综合症死亡。

1.1.3.2 镍污染对环境的影响

自然界中，最主要的镍矿是红镍矿与辉砷镍矿，还有镍黄铁矿和针硫镍矿。镍及其化合物能引起环境污染。环境中镍的污染主要来自镍矿石冶炼及钢铁冶炼，

造成含镍矿粉随气流进入大气，而且在焙烧过程中排出不溶于水的硫化镍，氧化镍、金属镍粉尘等，这些颗粒物若不经过严格处理将严重污染大气。另外，煤、石油化工也是产生镍污染的重要来源，其燃烧排放的烟尘中往往含有大量的镍粉尘，当镍粉尘遇到热的一氧化碳的时候，会生成剧毒易挥发的致癌物羰基镍[Ni(CO)₄]。镍能在土壤中富集，含镍的大气颗粒物易沉降沉降在土壤中，镍污染也容易通过地表径流造成水体污染，造成含镍废水灌溉，威胁人类生活安全。

镍是人体必需的微量元素，正常情况下，人体血液中的镍浓度为 0.11 mg/L，但是每天摄入可溶性镍 250 mg 则会引起中毒，敏感人群摄入 600 μg 即可引起中毒。镍能引发炎症，镍引发的接触性皮炎称为“镍痒症”，导致皮肤瘙痒，出现红斑、疙瘩，严重时候脓化溃烂。若不慎吸入大量含镍粉尘时，可对呼吸道黏膜造成严重损害，可引发肺炎。如果长期饮用含镍高的水，会增加癌症发病率，在放化疗期间的癌症患者必须杜绝与镍产品接触。长期从事精炼镍的工作人员，患鼻腔癌和肺癌的发病率较高。镍能影响遗传物质的合成、影响体内多种酶和内分泌腺的正常作用，产生“镍指”，引起基因丢失、基因点突变、基因扩增，形成 Ni-肽复合物。国家规定车间空气中羟基镍的最高容许浓度为 0.001 mg/mL，地面水中镍的最高容许浓度为 0.5 mg/L。

1.1.3.3 汞污染对环境的影响

汞是在常温下唯一呈液态的金属元素。汞矿的过度开采，容易产生废水，不断渗透到周围的环境中。水体汞污染来源，主要是由于氯碱、电子、电池、塑料等工业排放的废水。据保守估计，上世纪七十年代，人类直接向水体排放汞的总量为 1.6 万吨左右^[7];向大气排放的总汞量约为 10 万吨;向土壤排入的总汞超过 10 万吨，而排向大气和土壤中的汞，最终随着水循环回归入水体。

汞能够在大气、土壤和水体之间发生迁移转化。气态和颗粒态的汞能进入大气之中，也能沉降到土壤中，或者进入水体中。土壤中的汞可以挥发，然后可以进入大气，通过降水渗透入地下水中。水中的汞一部分可以挥发进入大气，大部分则沉淀于土壤中。汞在微生物的酶作用下转化为甲基汞或二甲基汞，二甲基汞亦可以分解为甲基汞。甲基汞可以在生物体内积累，通过食物链不断传递。我国

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库