学校编码：10384　　分类号_____密级 ____

学　　号：20620071150889　　UDC_____

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

纤维素酶高产菌株选育与发酵条件优化

Screening and Mutation of Wild Fungi for Enhanced Cellulase's Production and Optimization of Culture Condition by RSM

江新德

新加坡义安理工学院资助

指导教师姓名：耿 安 利　高级讲师

何　宁　副 教 授

专 业 名 称：生　物　化　工

论文提交日期：2010 年 09 月

论文答辩日期：2010 年 09 月

学位授予日期：2010 年　　月

答辩委员会主席：_____

评　　阅　　人：_____

2010 年 9 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（　　）课题（组）的研究成果，获得（　　）课题（组）经费或实验室的资助，在（　　）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

纤维素是植物细胞壁的主要成分，广泛存在于自然界中，是世界上最丰富、最廉价的可再生资源，纤维素被彻底分解而无污染的一条有效途径便是利用纤维素酶将它水解为可发酵糖类。纤维素酶的生产主要是利用微生物发酵法，但一直以来，由于菌种选育和生产技术进展不大、酶活力低、成本高等原因，没有形成大规模生产。

本文采用甲基磺酸乙酯（Ethyl Methyl Sulfonate, EMS）与 UV-irradation 结合的方法，对野生菌进行诱变，两轮诱变后，筛选到菌株 EU2-77，其产生的胞外蛋白浓度、滤纸酶活（FPase）、β-葡萄糖苷酶活（BG）及内切葡聚糖酶活（CMCase）比野生菌产生的分别提高了 67.3 %、149 %、161 %和 116 %；该突变株 EU2-77 产生的滤纸酶活高于商业菌 JU-A10 和 EMS-UV-8，但产酶效率低于 JU-A10，基于 JU-A10 发酵只用四天，因此缩短 EU2-77 的发酵周期，可以较大程度地提高其产酶效率。

在辅助碳源和氮源的单因素优化后，采用 Plackett-Burman 实验设计和 Box-Behnken 实验设计进行优化，发现菌株 EU2-77 产纤维素酶的最佳培养基配方及发酵条件为：微晶纤维素 24.04 g/L、麦麸 30 g/L、$(NH4)_2SO_4$ 4.0 g/L、KH_2PO_4 5.38 g/L、$MgSO_4·7H_2O$ 0.9 g/L、酵母膏 0.6 g/L、蛋白胨 2.0 g/L、$CaCl_2$ 0.9 g/L、接种量为 10 %、培养时间为 118 小时、培养温度为 30 ℃及摇床转速为 150 rpm。在此优化条件下经三批摇瓶培养实验验证，预测值与验证实验平均值接近。与原始培养条件相比，纤维素酶产量提高了 97.07 %，FPase 活力达到 4.71 IU/mL。

以溶剂萃取法对园林废弃物进行预处理，利用绿色木霉 EU2-77 产生的纤维素酶对预处理前后的园林废弃物进行酶解，结果表明，经预处理过的园林废弃物的酶解产物总还原糖收率为未处理的 24.69 倍。EU2-77 纤维素酶分别与商业菌株 RUT C30 产生酶和商业酶进行酶解性能比较，发现该酶酶解总还原糖收率（316.4 mg/g）高于商业菌株 RUT C30 产生酶（232.4 mg/g）和商业酶 Celluclast 1.5L（239.6 mg/g）；而与商业酶 Celluclast 1.5L +Novozym 188 混合液酶解能力（331.6 mg/g）以及 Celic CTec 酶解能力（303.2 mg/g）相差不大。绿色木霉 EU2-77 产生的纤维素酶可望在木质纤维素能源转化利用方面得到推广应用。

关键词：纤维素酶 绿色木霉 诱变育种 条件优化 木质纤维素转换

Abstract

Cellulose, the main composition of the vegetal cell wall, exists widely in the nature and is the most abundant reproducible bio-polymer in the earth. The degradation catalysed with cellulase is the most effective way to hydrolyze cellulose to sugars thoroughly and causes no pollution. In the production of cellulase by micro-organism, owing to low productivity of strains, low hydrolysis efficiency of obtained cellulase and high price of production, large scale of production was not applicable yet. This research was mainly aimed at the improvement of the cellulase production with liquid state fermentation by *Trichoderma viride* using mutagenesis method and culture condition optimization, and analysis of the enzymatic hydrolysis of obtained cellulase against natural biomass.

Firstly, *Trichoderma viride* mutants were developed by using Ethyl Methyl Sulfonate (EMS) treatment and UV-irradiation followed by a semi-quantitative plate clearing assay on phosphoric-acid-swollen cellulose plates. Mutant EU2-77 proved to be the most promising extracellular cellulase producer among 20 mutants in a screening program performed in shake flask fermentation after plate screening. Soluble protein content, filter paper cellulase (FPase) activity, β-glucosidase activity and endoglucanase (CMCase) activity of the fermentation broths of the mutant strain were increased by 67.3%, 149%, 161%, and 116%, respectively, compared with the parent strain. This enzyme complex produced by mutant EU2-77 contained FPase (2.19 IU/ml), CMCase (16.46 IU/ml), β-glucosidase (4.04 IU/ml), xylanase (42.37 IU/ml), and β-xylosidase (0.12 IU/ml). The soluble protein concentration in the enzyme complex was 1.69 mg/ml.

Secondly, the medium composition was optimized using response surface methodology (RSM) after one-factor-one-factor optimization of co-carbon source and nitrogen source. A Plackett-Burman design was applied to elucidate the medium components that significantly affect cellulase production. The concentration of Cellulose and KH_2PO_4 in the medium and Culture time were significant factors. The

steepest ascent method was used to locate the optimal domain and a Box-Behnken design was used to estimate the quadratic response surface from which the factor levels for maximum production of cellulase were determined. The composition of fermentation condition optimized with response surface methodology was (in g/L): Cellulose 24.04; Wheat bran 30; $(NH4)_2SO_4$ 4.0; KH_2PO_4 5.38; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; Yeast extract 0.6; Peptone 2.0; $CaCl_2$ 0.9; Inoculate size 10 %; Culture time 118 hour、Culture temperature 30 ℃ and Shake speed of incubator 150 rpm. Compared to the original medium, the filter paper activity increased by 97.07 % and reached to 4.71 IU/mL.

Finally, in order to enhance the biomass hydrolysis efficiency, horticultural waste collected from Singapore was pre-treated by organosolv method. The pre-treated and the non-pre-treated horticultural waste were hydrolyzed using the cellulolytic enzyme complex from *T. viride* EU2-77. After pretreatment, the reducing sugar yield was increased by 23.69 times due to the high β-glucosidase and xylanase contents in the enzyme samples. Biomass hydrolysis performances of the cellulolytic enzyme complex from the commercial strain RUT C30, commercial cellulase Celic CTec, celluclast 1.5L, and the mixture of celluclast 1.5L and Novozym 188 were compared. It was demonstrated that cellulolytic enzyme complex derived from strain EU2-77 yielded more reducing sugar (316.4 mg/g horticultural waste) than RUT C30 cellulases (232.4 mg/g horticultural waste) and Celluclast 1.5L (239.6 mg/g horticultural waste). However, its performance is close to that of Celic CTec (303.2 mg/g horticultural waste) and the mixture of celluclast 1.5L and Novozym 188 (331.6 mg/g horticultural waste), rendering the need for β-glucosidase supplementation in biomass hydrolysis unnecessary.

Key words: Cellulase; *Trichoderma viride*; Mutation; Optimization; Bio-conversion of lignocelluloses

目 录

Table of contents

第一章 文献综述

纤维素是一种高分子量的碳水化合物，是由葡萄糖通过 β-1,4-糖苷键连结而成的直链聚合物。纤维素是植物细胞壁的主要成分，广泛存在于自然界中，是世界上最丰富、最廉价的可再生资源，通过植物的光合作用，地球上每年合成的植物总量约为 10^{10} t，其中纤维素占 40 %[1]，超过其他碳水化合物的总和。由于纤维素不溶于水，在环境中比较稳定，要把它水解成可利用的葡萄糖是相当困难的。所以到目前为止仍没有得到很好地利用，绝大多数纤维素不仅被白白浪费，还造成了环境污染。随着世界人口增长，为解决日益加剧的食品和能源危机，纤维素资源的利用已引起了世界各国的极大关注和高度重视。当前，新能源、新食品资源的开发利用是世界各国都在研究的重大课题。利用纤维素酶对纤维素生物质进行转化对解决世界能源危机、粮食短缺、环境污染等问题具有重大意义[2],[3]。

1.1 纤维素酶简介

1.1.1 纤维素酶的组成

纤维素酶是指所有参与降解纤维素并将其转化为葡萄糖的各种酶的总称。它是一类复杂的复合物，故而又被称为纤维素酶系（Cellulase System），一般将其分为三类，如图 1-1[4]：①内切葡聚糖酶（CMCase, Endo-1,4-β-D-glucanase; EC 3.2.1.4），来自于真菌简称为 EG，来自于细菌简称为 Len），这类酶一般作用于纤维素内部的非结晶区，随机水解 β-1,4 糖苷键，将长链纤维素分子截短，产生大量带非还原性末端的小分子纤维素；②外切葡聚糖酶(Cellobiohydrolase; EC 1.2.1.91)，来自于真菌简称为 CBH；来自于细菌简称为 Cex），这类酶作用于纤维素线状分子非还原性末端，水解 β-1,4 糖苷键，每次切下一个纤维二糖分子；③β-葡萄糖苷酶(β-glucosidase; EC 3.2.1.21)，简称 BG，这类酶将纤维二糖水解成葡萄糖分子。