

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 200426031

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

纤 维 素 高 效 降 解 菌 株 的 选 育

Screening of high-efficiency strain for degradation

cellulose material

刘清锋

指导教师姓名: 龙敏南 教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2007年 4 月

论文答辩时间: 2007年 5 月

学位授予日期: 2007年 6 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2007 年 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，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的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：刘清锋  
07年2月27日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1. 保密（ ），在        年解密后适用本授权书。
2. 不保密（    ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：                      日期：        年        月        日

导师签名：                      日期：        年        月        日

# 目录

摘要	1
Abstract	2
第一章 绪论	4
1 纤维素生物物质	4
1.1 纤维素生物物质的组成	4
1.2 纤维素生物物质的预处理	6
2 纤维素酶	8
2.1 纤维素酶的来源	8
2.2 纤维素酶的组成及性质	8
2.3 纤维素酶的作用机理	10
2.4 纤维素酶活力测定	11
2.5 纤维素酶的生产	12
2.6 纤维素酶的应用	13
2.7 纤维素酶的研究趋势	14
3 纤维素降解菌的选育	15
3.1 降解纤维素的微生物	15
3.2 从自然界筛选纤维素降解菌	17
3.3 人工诱变选育纤维素降解菌	18
4 纤维素的酶解糖化	20
5 纤维素生物降解研究中存在问题及本论文研究的主要内容	22
第二章 纤维素降解菌青霉 T24-2 的分离鉴定及产酶特性	24
1 材料与方法	24
1.1 实验材料	24
1.2 主要仪器	25
1.3 实验方法	25
1.3.1 稻草粉(蔗渣)的预处理	25
1.3.2 滤纸预处理	25
1.3.3 琼脂的预处理	25
1.3.4 菌株的分离筛选	26
1.3.5 刚果红染色	26
1.3.6 菌株的鉴定	26
1.3.7 粗纤维素酶液的制备	26
1.3.8 葡萄糖标准曲线	27
1.3.9 纤维素酶活力测定	28
2 结果与分析	28
2.1 菌株筛选与鉴定	28
2.1.1 产纤维素酶菌株的筛选	28
2.1.2 产纤维素酶菌株的鉴定	29
2.2 青霉 T24-2 产酶条件的优化	30
2.2.1 氮源对产酶的影响	30

2.2.2 碳源对产酶的影响.....	31
2.2.3 发酵时间对产酶的影响.....	32
2.2.4 发酵温度对产酶的影响.....	32
2.2.5 影响青霉 T24-2 产酶的其他因素.....	33
2.2.6 青霉 T24-2 最佳培养条件的确定.....	33
2.3 青霉 T24-2 酶解稻草粉产糖研究.....	34
2.3.1 酶量与反应时间对酶解产糖的影响.....	34
2.3.2 pH 对酶解产糖的影响.....	35
2.3.3 温度对酶解产糖的影响.....	36
3 讨论.....	37
第三章 纤维素高效降解菌 EZ30 的诱变选育.....	40
1 材料和方法.....	40
1.1 实验材料.....	40
1.2 主要试剂.....	40
1.3 主要仪器.....	40
1.4 实验方法.....	40
1.4.1 孢子液的制备.....	40
1.4.2 诱变处理方法.....	40
1.4.3 诱变致死率的确定.....	40
1.4.4 突变菌株的分离和筛选.....	41
2 结果与分析.....	42
2.1 诱变因子致死率和最佳处理剂量的确定.....	42
2.2 突变株的初筛与复筛.....	42
2.3 突变株 EZ30 遗传稳定性分析.....	43
2.4 突变株 EZ30 与出发菌株 T24-2 的特性对比.....	43
2.4.1 形态比较.....	43
2.4.2 产纤维素酶能力及蔗渣糖化率比较.....	43
2.4.3 蔗渣糖化液产酒精能力比较.....	44
3 讨论.....	45
结论与展望.....	46
参考文献.....	48
致谢.....	52

## Catalogue

Chinese abstract.....	1
English abstract.....	2
Chaper 1 Introduction.....	4
1 cellulose material.....	4
1.1 Compose of cellulose material.....	4
1.2 Pretreatment of cellulose material.....	6
2 Cellulase.....	8
2.1 The source of cellulase.....	8
2.2 Constitute and property of cellulase.....	8
2.3 Mechanism of cellulase.....	10
2.4 Mensuration to activity of cellulase.....	11
2.5 Production of cellulase.....	12
2.6 Application to the cellulase.....	13
2.7 The trend of research about cellulase.....	14
3 Screening of strain for degradation cellulose material.....	15
3.1 The microorganism for degradation cellulose material.....	15
3.2 Screening of microorganism for degradation cellulose material from nature.....	17
3.3 Screening of microorganism for degradation cellulose material in use of mutation.....	18
4 Saccharification of cellulose material.....	20
5 Problem of degradation cellulose material in lastly research and the prime content of this paper.....	22
Chaper 2 Screening and characterization of cellulase-producing <i>penicillium</i> sp. T24-2.....	24
1 Materials and methods.....	24
1.1 Materials.....	24
1.2 Instruments.....	25
1.3 Methods.....	25
1.3.1 Pretreatment of straw.....	25
1.3.2 Pretreatment of filter paper.....	25
1.3.3 pretreatment of agar.....	25
1.3.4 Screening of microorganism for degradation cellulose material .....	26
1.3.5 Dye with congo-red medium.....	26
1.3.6 Identify strain.....	26
1.3.7 Prepare for the cellulase.....	26
1.3.8 The normal curve of glucose.....	27
1.3.9 Mensuration to activity of cellulase.....	28
2 Results and analysis.....	28

2.1 Screening and identify of microorganism for degradation cellulose material.....	28
2.1.1 Screening for cellulase-producing strain.....	28
2.1.2 Identify of cellulase-producing strain.....	29
2.2 Optimize the condition of cellulase-producing for <i>penicillium</i> sp. T24-2.....	30
2.2.1 Effect of nitrogen to cellulase-producing.....	30
2.2.2 Effect of carbon to cellulase-producing.....	31
2.2.3 Effect of time to cellulase-producing.....	32
2.2.4 Effect of temperature to cellulase-producing.....	32
2.2.5 Effect of other factor to cellulase-producing.....	33
2.2.6 The prime condition of cellulase-producing for <i>penicillium</i> sp. T24-2.....	33
2.3 Saccharification of <i>penicillium</i> sp. T24-2.....	34
2.3.1 Effect of quantity and time to saccharification.....	34
2.3.2 Effect of pH to saccharification.....	35
2.3.3 Effect of temperature to saccharification.....	36
3 Discussion.....	37
Chaper 3 Screening and mutant of high-efficient strain for degradation cellulose material.....	40
1 Materials and Methods.....	40
1.1 Materials.....	40
1.2 Reagent.....	40
1.3 Instruments.....	40
1.4 Methods.....	40
1.4.1 Prepare for spore.....	40
1.4.2 Method of mutant.....	40
1.4.3 Ascertain the death rate of mutant.....	40
1.4.4 Screening of the mutant strain.....	41
2 Results and analysis.....	42
2.1 Ascertain the death rate of mutant and the best of dosage.....	42
2.2 The first screening and second screening of mutant strain.....	42
2.3 Analysis the stabilization of mutant strain.....	43
2.4 Contrast with the initial strain and mutant strain.....	43
2.4.1 Compare the modality.....	43
2.4.2 Compare the ability of cellulase-producing and saccharification .....	43
2.4.3 Compare the ability of ethanol-producing.....	44
3 Discussion.....	45
Results and expectation.....	46
References.....	48
Acknowledgements.....	52

## 摘 要

纤维素资源的开发与利用一直是国内外研究的热点，而纤维素的高效降解与糖化是制约纤维素生物质应用的关键。

本研究从腐烂稻草、朽木条、土壤和牛粪等样品中分离到 6 株纤维素降解菌株。通过滤纸崩解试验、刚果红纤维素平板识别以及液体发酵产酶鉴定，筛选到一株分解纤维素能力较强的真菌。经形态观察和 18S rDNA 基因片断分析，鉴定该菌株为青霉 T24-2。

对青霉 T24-2 的液态发酵条件进行研究。菌株在含 3% 稻草粉、0.25% 尿素和无机盐营养液的培养基中发酵 4 d, 自然 pH, 30 °C, 130 r/min, 菌株的 CMC 酶活（羧甲基纤维素酶活）和滤纸酶活分别达到 45.01 IU/mL 和 6.89 IU/mL。采用液态发酵法对该菌酶解稻草粉产糖进行研究，糖化率达到 40.2%。

青霉 T24-2 经过 EMS 和紫外线复合诱变，结合纤维素平板选择培养基筛选技术，获得纤维素酶高产诱变株 EZ30。与出发菌株青霉 T24-2 相比，诱变株 EZ30 的菌落形态变化不大，但在固态发酵条件下，诱变株 EZ30 纤维素酶产量和酶解蔗渣的糖化率明显提高，CMC 酶活提高约 32.7%，蔗渣糖化率从 33.3% 提高到 40%，但比活力都是 15.85 IU/μg 左右，表明诱变株 EZ30 纤维素酶活力的增高只是酶量表达的增加，纤维素酶结构可能没有发生变化。

在相同条件下，利用出发菌株 T24-2 与诱变株 EZ30 同时降解 16 g 的蔗渣，以酿酒酵母将糖化液转变成酒精，酒精产量由 0.72 g 提高到 1.10 g。表明变株糖化过程增加的还原糖是可以被酿酒酵母转化为酒精。诱变株 EZ30 经过五代传代后，其产酶活性保持稳定。

研究表明，诱变株 EZ30 具有较强分解纤维素的能力，采用 EMS 和紫外线复合诱变的方法能有效提高出发菌株青霉 T24-2 降解纤维素的能力，从而提高纤维素的利用效率，它为农作物秸秆等纤维素资源的开发和利用提供了一条途径。

关键词：青霉 T24-2；纤维素酶；诱变；秸秆糖化



## Abstract

The search and exploitation of efficient cellulolytic strains is the key step for the exploitation and utilization of cellulose resources. In order to obtain efficient cellulose decomposing microbes, the author isolated 6 cellulose producing strains from putrid straw, wood, soil, and cattle feces etc. On the basis of these strains, a high cellulase-producing strain was isolated through the experiments of decomposition of filter paper, identifying of cellulose-Congo red medium and liquid fermentation. The strain was identified as *Penicillium* sp. by its biological property and analysis of 18S rDNA sequences.

The liquid fermentation conditions for cellulase-producing were studied extensively. The optimum conditions for cellulase production were obtained as: 3% straw powder as carbon source, 0.25% urea as nitrogen source, fermentation at 30 °C and natural pH for 4d. The maximum activities of CMCase and FPA were obtained as 45.01 IU/mL and 6.89 IU/mL, respectively. The reduce sugar yield of saccharification reached 40.2%(w/w).

A mutant strain EZ30 was isolated after several steps of EMS and UV mutagenesis. Its stability of producing cellulase is excellent compared to the original strain under the same culture condition. No difference was observed between the colonies of strain EZ30 and strain *Penicillium* sp. T24-2 on the plate compared to the original strain, the CMCase produced by mutant strain increased from 158.52 IU/g to 210 IU/g and the reduce sugar yield of saccharification from 33.3% to 40%(w/w). The two cellulases exhibited similar specific activity(15.85 IU/ $\mu$ g). It hints that the mutant strain could express more enzyme under same culture condition. The research results suggested that mutant strain EZ30 is an effective cellulose-decomposing strain, and it is a potential candidater for the future industrial utilization .

Key words: *Penicillium* sp.T24-2; cellulase; mutant; saccharification

厦门大学博硕士论文摘要库

## 第一章 绪论

天然纤维素原料是地球上最丰富的可再生有机物质。全世界通过光合作用产生的植物物质每年高达 2000 亿吨，其中 89% 目前未被人类利用，只有 11% 用作饲草、造纸和建筑原料<sup>[1]</sup>。绝大部分的天然纤维素原料在自然环境中被各种微生物分解转化，最终形成 CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub>O。虽然这是生态系统中碳循环的一个重要环节，但从人类利用自然资源的角度看，无疑是巨大的浪费。

中国的天然纤维素原料也很丰富，每年产量是 11.45 亿吨，仅农作物秸秆、皮壳一项，每年就达 7 亿多吨，其中玉米秸秆占 35%，小麦秸秆占 21%，稻草占 19%，大麦秸秆占 10%，高粱秸秆占 5%，谷草占 5%，燕麦秸秆占 3%，黑麦秸秆占 2%。可见，玉米秸秆、小麦秸秆和稻草是中国最主要的三大秸秆<sup>[2]</sup>。此外，来自林业副产品、城市垃圾和工业废物中的天然纤维素原料量也很可观。

天然纤维素原料具有许多优点，如来源丰富，数量巨大，具有可再生性；原料形态多种多样，不同原料其纤维素、半纤维素和木质素组成和结构有一定的差别；原料的比容大，价格低廉，大多作为废弃物<sup>[3]</sup>。这些说明天然纤维素原料具有解决当前世界面临的粮食短缺、能源危机和环境污染等问题的巨大潜力。

在我国，大部分秸秆和林副产品被用作燃料或在田间被直接烧掉，不但破坏了生态平衡，而且污染环境，还存在火灾隐患。同时，由于秸秆燃烧热能利用率较低（10% 以下），直接燃烧秸秆是一种的浪费。发展和利用生物技术分解转化天然纤维素原料既是资源利用的有效途径，对于解决环境污染、粮食短缺和能源危机也具有重大的现实意义。

### 1 纤维素生物质

#### 1.1 纤维素生物质的组成

秸秆的干物质一般由灰分和含氮化合物与非含氮化合物组成。含氮化合物包括蛋白质和其他含氮物；非含氮化合物包括纤维素、半纤维素和木质素等（图 1-1）。其中非含氮化合物约占秸秆干重 80%。水稻、小麦及玉米等农作物秸秆的纤维素含量约为 30%-35%，半纤维素含量约为 25%-30%，木质素含量约为 20%-25%<sup>[4]</sup>。

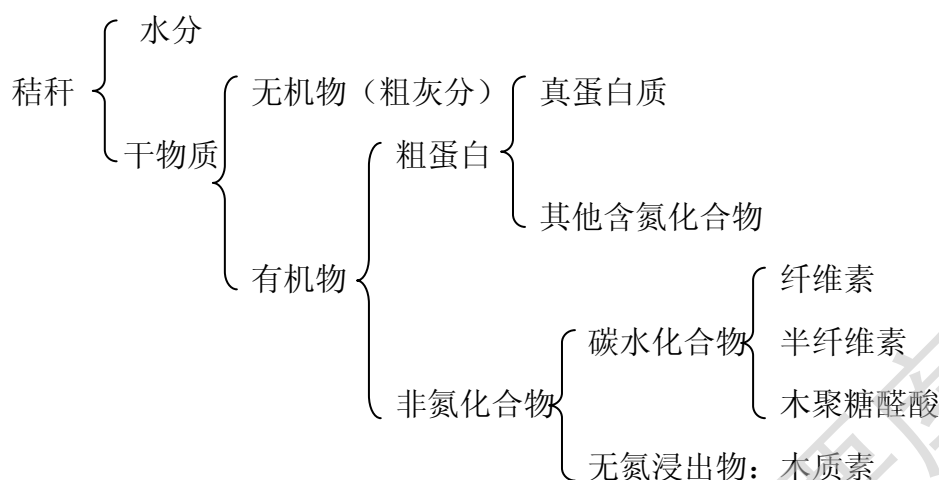


图 1-1 农作物秸秆的主要组成

Fig.1-1 The component of straw

纤维素是 D-葡萄糖以  $\beta$ -1, 4-糖苷键结合起来的链状高分子化合物，在常温下不溶于水、不溶于稀酸和不溶于稀碱。纤维素分子含碳、氢、氧三种元素，其中碳含量为 44.44%，氢含量为 6.17%，氧含量为 49.39%，其化学式为  $C_6H_{10}O_5$ ，化学结构的实验分子式为  $(C_6H_{10}O_5)_n$ ，(n 为聚合度)。一般认为纤维素分子约由 8000-12000 个葡萄糖残基构成。

天然的纤维素由排列整齐而规则的结晶区和相对不规则、松散的无定型区组成<sup>[5]</sup>。通过 X 射线衍射可以发现，纤维素大分子的聚集体中，结晶区部分分子排列比较整齐，有规则，而且密度较大，约  $1.588g/cm^3$ 。无定形区部分的分子链排列不整齐，较疏松，分子间距离较大，密度较低，约  $1.500g/cm^3$ 。在纤维物质中，除了纤维素链之间存在氢键外，在分子内也存在氢键。不管是分子间还是分子内氢键，它们的存在，给纤维素水解带来很大的困难。

纤维物质多是以木质纤维素的形式存在于自然界中。木质纤维素主要由纤维素、半纤维素、木质素组成，三者按一定比例紧密地结合在一起。纤维素是由许多个葡萄糖分子通过  $\beta$ -1, 4-糖苷键连接而成的直链高聚糖，经预处理后聚合度会下降，完全水解后得到葡萄糖；半纤维素是带有支链的多聚糖的总称，其结构单元包括戊糖基、己糖基、糖酸基和己酞基，其中戊糖主要为木糖和阿拉伯糖；木质素是植物界中仅次于纤维素的最丰富的有机高分子化合物，由苯丙烷单元以非线性的、随机方式连接组成的复合体，在酸的作用下难以水解的高分子无定形物质。在秸秆中纤维素被半纤维素及木质素包围，而且纤维素的结晶结构及其与

半纤维素、木质素的紧密结合,使得木质纤维素水解速度与糖化率受到很大影响,因而除去木质素,尽量使纤维素结晶度降低的预处理,对于秸秆中纤维素的降解是非常重要的<sup>[6]</sup>。

### 1.2 纤维素生物质的预处理

在微生物降解纤维素物质过程中,酶与纤维素底物直接接触是酶水解的先决条件。任何限制纤维素接近酶的结构特征,都会减少纤维素对酶降解的敏感性。在天然纤维素原料中,木质素和半纤维素形成牢固结合层,包围着纤维素,使得木质纤维素水解速度与糖得率受到很大影响。在目前的研究中,原料预处理的目 的主要表现在几个方面<sup>[7]</sup>: (1)除去木质素; (2)减小结晶度; (3)增大孔隙体积并相应增大吸附纤维素酶的有效表面积。因此,木质纤维素原料只有通过一定的预处理才能获得较高的水解速度和酶解得率。

天然纤维素原料预处理有多种方法,可分为物理预处理、化学预处理和生物预处理。

#### 1.2.1 物理预处理法

常用的物理方法有:机械微粒粉碎、蒸汽爆破、微波处理、冷冻粉碎等。

机械微粒粉碎能使木质纤维原料物理性能发生明显的变化,物料尺寸明显变小,结晶度降低,平均聚合度变小,物料的水溶性组分增加。李稳宏等<sup>[8]</sup>研究了麦秸粉碎预处理对酶解的影响,结果表明:随着秸秆粉碎程度加深,表面积也增大,裸露在表面的结合点增加,酶解速度加大。近年来,许多学者发现,如将纤维素酶水解和缓和的湿磨结合起来同时进行,则纤维素酶解率将成倍增加。另外,一些学者也发现,在用溶剂预处理纤维素原料时,如给予一些轻微的研磨,将能大大提高糖的产率<sup>[7]</sup>。

蒸汽爆破处理是目前国内外研究较多的有效预处理方法之一。该方法是用蒸汽将原料加热至160~260℃,维持20s~30 min高温高压下造成木质纤维软化,然后迅速使原料减压造成纤维素晶体和纤维素的破裂,木质素和纤维素分离,而半纤维素在高温下发生自水解作用而溶化,木质素也发生部分降解。影响蒸汽爆破预处理的因素有停留时间、温度、压力、原材料的大小及水分含量等。利用我国北京林业大学赖文衡教授研制的间歇蒸汽爆破器对玉米秸秆进行爆破处理,纤维素水解转化率达70%以上,而且对环境影响较小,汽爆废气中只含有少量可回

收的糠醛<sup>[9]</sup>。汽爆过程中加入稀硫酸或二氧化碳可以有效促进酶水解，减少抑制物的形成，使半纤维素去除量增多。

微波处理能使纤维素的分子间氢键发生变化，处理后的粉末纤维素类物质没有胀润性，能提高纤维素的反应活性，可以提高基质浓度，得到较高浓度的糖化液，处理时间短，操作简单，但由于处理费用较高而难以得到工业化应用。

将天然纤维素原料在水中反复进行冷冻(-75℃)或用液化气在-100℃下粉碎，可以破坏木质素和半纤维素的结合层，降低纤维素的聚合度，增加反应活性。但是冷冻处理成本太高，不适合工业化生产<sup>[10]</sup>。

### 1.2.2 化学预处理法

化学预处理已广泛用于化学制剂溶解木质素和半纤维素，降低纤维素的结晶度或溶解纤维素，但是化学预处理必须使用耐腐蚀的设备，需要冲洗排除大量化学药品，较难回收木质素和半纤维素而造成环境污染。目前化学预处理的方法主要有酸处理、碱处理、有机溶剂处理等。

稀酸水解已经成功地用于木质纤维原料预处理。稀硫酸预处理可以获得较高的得率，显著促进纤维素水解<sup>[11]</sup>。在较高温度下酸处理所需时间短，处理后半纤维素水解成单糖进入水解液，木质素含量不变，纤维素的聚合度下降，反应能力增大。浓酸也可用来处理木质纤维原料，但强酸有毒，有腐蚀性，需要耐酸设备。浓酸预处理后必须对酸进行回收利用以最大限度地减轻对环境的污染，这样就增加了生产成本。酸预处理后必须中和剩余的酸以便后续水解和发酵。

某些碱可以用来预处理木质纤维原料，处理效果主要取决于原料中的木质素含量。碱水解的机理是基于木聚糖半纤维素和其它组分内部分子之间酯键的皂化作用，随着酯键的减少木质纤维原料的空隙率增加。NaOH 有较强的脱木质素作用，原料除去木质素后，酶水解糖化率将明显提高。鲁杰等<sup>[12]</sup>研究表明：NaOH 预处理对纤维素原料化学组成比例有很大影响，预处理后的物料中纤维素明显得到润胀，纤维素结晶指数降低，纤维素结晶区受到破坏，物料更易于酶解。尽管碱处理对原料的可降解性效果较好，但在处理过程中有部分半纤维素被分解，致使损失太多。同时还存在试剂的回收、中和、洗涤等问题。

有机溶剂处理可以采用单一溶剂，也可以采用多种溶剂相结合，在所研究的溶剂中有醇类（甲醇、乙醇、丁醇等）、酮类、酚类、二甲基亚砷、胺类等。一

一般在160-200℃处理1-2h，都能去除80%左右的木质素，同时半纤维素几乎完全被溶解，而处理后残渣的纤维素酶解率在80%以上，但上述溶剂体系对天然纤维素原料的作用不同或难易程度不同，并且有的回收后再利用不够经济，实际操作很难。

### 1.2.3 生物预处理法

生物处理是利用分解木质素的微生物除去木质素，以解除其对纤维素的包裹作用。虽然很多微生物都能产生木质素分解酶，但酶活性较低，很难应用于工业生产。在生物预处理中，白腐菌、褐腐菌和软腐菌等微生物常被用来降解木质素和半纤维素，其中最有效的白腐菌是担子菌类<sup>[13]</sup>。从成本和设备角度出发，生物预处理显示了独特的优势，可用专一的木质酶处理原料，分解木质素和提高木质素消化率，但是生物预处理后水解得率很低，此种方法虽然取得了一定的成功，但多停留在试验阶段，采用基因工程技术对白腐菌进行改良，将有助于拓展生物预处理的应用。

综上所述，机械处理方法耗能巨大，受设备限制，纤维素结晶度降低较小；酸碱浸泡处理后的纤维素易被酶降解，但由于需要大量水来冲洗处理过的纤维素，造成严重的环境污染，成本高。生物法水解得率低，大多还停留在试验阶段。因此目前还未找到更为有效合理的纤维素预处理法。

## 2 纤维素酶

### 2.1 纤维素酶的来源

纤维素酶分布非常广泛。原生动物、节肢动物、软体动物和昆虫等都能产生纤维素酶<sup>[12]</sup>，动物的瘤胃中有共生的纤维分解菌和原生动物。在高等植物中也有纤维素酶，其作用是使细胞壁松弛，与种子发芽、细胞生长有关。在微生物方面，真菌、放线菌及细菌等在一定条件下均可产生纤维素酶<sup>[13,14]</sup>。真菌中活力较高的是木霉、黑曲、青霉和根霉等，细菌中有纤维杆菌、球形生孢纤维粘菌等。目前研究较多的是绿色木霉和纤维杆菌<sup>[15,16]</sup>。

### 2.2 纤维素酶的组成及性质

纤维素结构的复杂性，决定了任何一种单一的酶都难以高效地水解它，能水解天然纤维素的纤维素酶都是一个复杂的多酶体系。纤维素酶是由许多具有高协同作用的水解酶组成的，主要来自于真菌和细菌。根据各纤维素酶功能的不同，

可分为三大类<sup>[17]</sup>：

(1) 外切- $\beta$ -1,4-葡萄糖酶 (exo- $\beta$ -1,4-glucanase)：此酶主要为 $\beta$ -1,4-葡聚糖纤维二糖酶 (CBH 或C1酶)，它是从纤维素的非还原糖端水解 $\beta$ -1,4-葡萄糖苷键，产生纤维二糖。此类外切酶单独作用于天然纤维素时，几乎检测不出还原糖的生成，对取代基纤维素如 CMC 也只是微弱作用，但与内切葡聚糖酶协同作用则可有效地分解天然纤维素；

(2) 内切- $\beta$ -1,4-葡聚糖酶 (endo- $\beta$ -1,4-glucanase, EG) (EC 3. 2. 1. 4)：它是随机内切纤维素分子内的 $\beta$ -1,4-葡萄糖苷键，产生纤维寡糖、纤维二糖和葡萄糖，由于它并不是单一组分，而是包括多个组分，组分数又随菌株而异，又称 C<sub>x</sub>。又因大都用羧甲基纤维素 (CMC) 为底物测试其活力，故称 CMC 酶。EG 可水解 CMC、膨胀纤维素以及纤维降解中间产物纤维糊精，对纤维素的降解能力随还原末端及键长度增加而下降。EG 专一性不强，对水溶性纤维素都有作用，取代基对酶活性影响不大。EG 占酶制剂的蛋白质含量为 20%~30%。

(3)  $\beta$ -1,4-葡萄糖苷酶 ( $\beta$ -1,4- glucosidase, BG) (EC3. 2. 1. 21)：它可水解纤维二糖、纤维寡糖及其他 $\beta$ -葡萄糖苷，产生葡萄糖，故又称纤维二糖酶 (cellobiase, CB)。但由于该酶对其底物特异性并不是很高，特别是很多非纤维素微生物也能产生大量这类组分的个数随菌种的不同而异。BG 在酶制剂中，酶蛋白含量最少，只占 1% 左右。

不同来源的纤维素酶的理化特性和催化活性都不尽相同，酶分子大小范围很广。内切型酶的分子量介于 23~146 KDa 之间，如真菌的 EG 有两种异构酶 EG I 和 EG III，EG I 分子量约为 54 KDa，EG III 约为 49.8 KDa。外切型酶的分子量介于 38~118 KDa 之间，如木霉的 CBH 有两种异构酶 CBH I 和 CBH II，CBH I 分子量约为 66 KDa，CBH II 约为 53 KDa<sup>[18,19]</sup>。

多数真菌和少数细菌的纤维素酶都会糖基化。糖基与蛋白之间以共价键结合，或呈可解离的络合状态。糖基化作用在一定程度上保护酶免受蛋白酶的水解，同时纤维素酶由于糖基化，使其所含碳水化合物的比率在不同酶之间发生差异，导致酶的多形式和分子量的差别。

研究人员通过对纤维素酶一级结构和三级结构的研究发现，纤维素酶分子普遍具有类似的结构，由球状的催化结构域 (catalytic domains, CD)、连接桥



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](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库