

厦门大学硕士毕业论文：纤维素及淀粉类物质高效生物降解糖化系统的研究

学校编码：10384

分类号_____密

级_____

学号：200126039

UDC _____

学 位 论 文

纤维素及淀粉类物质高效生物降解系统的研究

Study on system of high-efficient microbial degradation of lignocellulosic and amylaceous materials

徐昶

指导教师姓名：龙敏南 副教授

钱晓鸣 副教授

申请学位级别：硕士

专业名称：微生物学

论文提交日期：2004年7月

论文答辩时间：2004年7月

学位授予单位：厦 门 大 学

学位授予日期：

答辩委员会主席：许良树 教 授

评 阅 人：许良树 教 授

邵宗泽 研究员

2004年 月

目录

1 前言	1
1.1 纤维素和淀粉的化学结构	2
1.1.1 纤维素的结构	2
1.1.2 淀粉的结构	2
1.2 天然纤维素类物质和淀粉类物质的化学成分	3
1.3 淀粉和纤维素糖化研究进展	7
1.4 产糖原料的预处理	9
1.5 纤维素和淀粉糖化相关的酶及酶解机理	11
2 材料与方法	17
2.1 实验材料与试剂	17
2.1.1 菌株	17
2.1.2 培养基及配方	17
2.1.3 实验材料	18
2.1.4 主要试剂	18
2.2 主要仪器	18
2.3 实验方法	18
2.3.1 还原糖测定方法	18
2.3.2 纤维素酶活力测定方法	19
2.3.3 总纤维含量的测定	20
2.3.4 淀粉含量测定	21
2.3.5 菌体蛋白含量测定	21
2.3.6 稻草粉(蔗渣)的处理方法	22
2.3.7 固体曲霉制备与管理	22
2.3.8 粗纤维素酶液的制备	23
2.3.9 菌株的分离筛选方法	23
2.3.10 菌株的鉴定方法	23
3 结果与分析	26
3.1 菌株筛选与鉴定结果	26
3.1.1 淀粉分解菌筛选	26
3.1.2 纤维素分解菌筛选	28
3.2 灰绿曲霉 XC9 产酶条件	30
3.2.1 不同底料对灰绿曲霉 XC9 产酶的影响	30
3.2.2 培养时间与灰绿曲霉 XC9 酶活的关系	31
3.2.3 接种量对灰绿曲霉 XC9 酶活力的影响	32
3.2.4 不同底料/麸皮比对灰绿曲霉 XC9 酶活力的影响	32
3.2.5 不同氮源对灰绿曲霉 XC9 酶活力的影响	33
3.2.6 培养温度对灰绿曲霉 XC9 酶活力的影响	34

3.2.7 培养基起始 pH 值对灰绿曲霉 XC9 酶活力的影响.....	35
3.2.8 表面活性剂对灰绿曲霉 XC9 酶活力的影响.....	35
3.2.9 灰绿曲霉 XC9 最佳培养条件的确定.....	36
3.3 灰绿曲霉 XC9 的纤维素酶粗酶液的反应特性.....	37
3.3.1 pH 对纤维素酶活力影响.....	37
3.3.2 pH 对灰绿曲霉 XC9 酶活力的稳定性的影响.....	38
3.3.3 温度对纤维素酶活力的影响.....	39
3.3.4 温度对酶活力的稳定性影响.....	39
3.4 纤维素原料产糖研究.....	40
3.4.1 酶解过程中产糖量和 FPA 活力的变化.....	40
3.4.2 培养基起始 pH 对曲酶产糖的影响.....	41
3.4.3 温度对曲酶产糖的影响.....	42
3.4.4 不同曲酶底料比例对糖化的影响.....	42
3.4.5 蔗渣含量与产糖量的关系.....	43
3.4.6 底物处理方式对酶解产糖的影响.....	44
3.4.7 蔗渣的批式糖化过程.....	45
3.5 淀粉分解菌株的特性.....	47
3.5.1 pH 值对类黄假单胞菌 ST-j ₂ 酶解淀粉产糖的影响.....	47
3.5.2 温度对类黄假单胞菌 ST-j ₂ 酶解淀粉产糖的影响.....	47
3.5.3 类黄假单胞菌 ST-j ₂ 对不同淀粉原料的分解比较.....	48
3.5.4 类黄假单胞菌 ST-j ₂ 与其它菌株协同降解淀粉产糖的研究.....	49
4 问题与讨论.....	51
4.1 淀粉原料的酶解产糖.....	51
4.2 纤维素原料的酶解产糖.....	52
4.3 淀粉 - 纤维素共发酵技术的探讨.....	54
4.4 纤维素曲酶生产放大中存在的问题与讨论.....	55
4.5 曲酶产糖及产氢试验效果.....	56
参考文献.....	58
致谢.....	62

摘 要

利用微生物将自然界中极为丰富的纤维素类和淀粉类物质降解为单糖，再合成或转化为菌体蛋白等食物和乙醇或氢等能源物质，对缓解人类目前所面临的粮食短缺与能源危机，降低环境污染，实现经济的可持续发展战略等有重要的意义。

从自然环境中筛选到具有较高分解淀粉能力的菌株 ST-j₂，经 16S rRNA 序列分析，确定该菌株为类黄假单胞菌。该菌株对淀粉分解和产糖的合适条件为：pH 5.0，40℃。在好氧条件下，1 mg 的菌体能够在 48 h 内将 10g 可溶性淀粉（10%，W/V）分解 90% 以上，糖化率达 25%。在以地瓜粉和玉米粉为分解底物时，获得了与可溶性淀粉相近的分解率和糖化率。类黄假单胞菌 ST-j₂ 降解淀粉的能力比日本根霉和米根霉要强，但日本根霉产糖能力显著高于类黄假单胞菌 ST-j₂ 和米根霉。该菌株分别和日本根霉及米根霉混合培养，则对淀粉的降解能力大大增强，糖化率大幅度提高，可达 70%。

从玉米芯中筛选到具有较高分解纤维素活力的菌株 XC9，经 18S rRNA 序列分析和对菌株的形态及生理特性分析，确定该菌株为灰绿曲霉。采用固体纤曲培养制备纤维素酶，最适产酶条件为：起始 pH 5.5~6.0，培养温度 30℃，接种量为 6%，蛋白胨为氮源，稻草粉与麸皮比例为 5:5。在最适条件下培养 72h 后，CMC(羧甲基纤维素)酶活最高达 6812U/g，FPA(滤纸酶)达 172 U/g。利用曲霉对蔗渣进行糖化的最适条件为：湿曲酶/蔗渣比为 1:1，反应温度为 50℃，初始 pH 值为 4.8。在最适条件下酶解 16~20 h，培养液中的糖浓度达到最高值，平均糖化率为理论值的 80.49%。利用曲霉直接糖化纤维素类物质，周期短、工艺简单、成本低廉、不易污染，是一条有效利用纤维素产糖的途径。

关键词：纤维素；淀粉；酶解；糖化

Abstract

The natural lignocellulose and starch can be degraded by microbe into glucose which can subsequently be synthesized into food such as SCP(single cell protein) or converted into energy source such as ethanol or hydrogen gas. Such a process is significant when applied to ease up food supplies shortage, put off energy source crisis, debate environmental pollution and realize the strategy of sustainable economy.

The bacterial strain ST-j₂ with high amylolytic capacity was isolated from nature. It was identified as *Pseudomonas synxantha* by the analysis of its 16S rRNA gene sequences. The conditions of degrading starch and producing sugar were at pH 5.0 and 50 °C. In these conditions, the strain ST-j₂ degraded 90% soluble starch (10g) in 24 hours and the final yield of saccharification was about 25%. When pachyrhizus and corn flour were broke up, the yield of degradation and saccharification is similar to soluble starch. When *Pseudomonas synxantha*, *Rhizopus japonicus*, and *Rhizopus oryzae* were incubated respectively, the amylolytic capability of *P. synxantha* was the highest, while the saccharification yield of *R. japonica*'s was higher than the others. But when *P. synxantha* was mixed with *R. japonicus* or *R. oryzae*, the amylolytic capability and the overall produced sugar increased in the comparison with that of the strains incubated solely.

A mildew strain XC9 with high cellulase activity was isolated from the mildewing maize cob. It was identified as *Aspergillus glaucus* by the analysis of its morphology and 18S rRNA gene sequences. The optimal conditions of producing cellulase by solid state fermentation on straw powder was at pH 5.5~6 and 30 °C, with inoculation quantities 6%. Nitrogen source was peptone and the ratio of straw to wheat bran was 5:5. Its CMCase and FPA activity were as high as 6812U/g and 172 U/g respectively after 72h incubated. The optimal enzymatic hydrolysis conditions were as following: initial pH of 5.0, temperature of 50 °C and the mass ratio of enzyme to substrate (bagasse) is 1:1. After enzymatic hydrolysis of 16~20 h at optimum experimental conditions, the sugar concentration in liquid medium reached the highest level, and the average saccharification yield was about 80.49%. The whole process using mouldy bran is

contamination-resistant with a short period, simple operation and low cost, which would be a convenient and effective way for saccharifying cellulosic materials in the future.

KEY WORDS: cellulose, starch, degradation, saccharification

厦门大学博硕士论文摘要库

一 前言

地球上储藏的不可再生能源（石油、天然气等）将在数十年内消耗殆尽。为了保持社会和经济的可持续发展，人们越来越关注地球上可再生资源的开发和利用。可再生资源具有可再生、可生物降解、价格低廉、污染小等优点，因此日益引起人们的兴趣^[1]。

纤维素和淀粉是自然界中存在最丰富、应用最广泛的可再生资源。纤维素产量最大、分布最广，每年通过光合作用的生成量为 1000 亿吨以上；其次为淀粉，年产量为 800 亿吨以上。这两种多糖的量已超过地球上已探明的石油储量。纤维素和淀粉是人类生活必需物质之一，随着科学技术的进步，对其利用正向深度和广度发展^[2]。

淀粉和纤维素的用途之一是将其水解为葡萄糖。这种单糖在食品、医药、化工等领域有着广泛的利用。尤其在发酵工业，如生产乙醇、乙酸、乙烯、丁二烯、山梨醇、甘露醇、维生素 C、葡萄糖酸、醋酸、乳酸、柠檬酸等小分子化工产品，都需要葡萄糖作发酵底物。淀粉制糖工艺简单，原料丰富。20 世纪 90 年代以来，各种淀粉糖品年总产量达 900 万吨以上，远远超过甘蔗和甜菜生产的蔗糖^[3]。但目前糖品的主要原料是小麦、玉米、马铃薯、甘薯、木薯等农产品，潜在的粮食危机使得原材料的价格一直居高不下，因此葡萄糖的生产价格仍然昂贵。

比较而言，纤维素质原料获得容易，价格低廉。据不完全统计，全球每年通过光合作用产生的生物质有 89% 尚未被利用或未被合理利用（如直接焚烧）。目前全世界被开发利用的农林纤维副产物不足 2%，我国约有 50% 以上的农林废弃物在田间地头被白白烧掉，全世界每年因农林废弃物焚烧不仅造成直接的经济损失达数十亿元，而且由于焚烧而产生的浓烟及排放的大量有害气体严重影响了公路、航空的安全，污染了环境，对气候、生态等也造成了严重的影响^[4]。利用微生物将纤维素类原料（蔗渣、稻草、麦秆、玉米秸杆和其他作物皮壳等）和不宜食用但富含淀粉的野生植物^[5]器官

中的多糖降解为单糖，再由其他微生物利用这些单糖合成或转化为菌体蛋白、乙醇、氢气等食物或能源物质，对缓解粮食短缺和能源危机、降低环境污染等有重要的意义。

1.1 纤维素和淀粉的化学结构

纤维素和淀粉都是由脱水葡萄糖单元($C_6H_{10}O_5$)经糖苷键连接成高分子，称为葡聚多糖，化学结构的实验分子式为 $(C_6H_{10}O_5)_n$ (n 为聚合度)，然而淀粉和纤维素在物理性质和化学性质上存在着较大的差异。

1.1.1 纤维素的结构^[6]

纤维素是天然高分子化合物，其化学结构是由很多 D-吡喃葡萄糖苷彼此以 $-1,4-$ 糖苷键连接而成的巨型线性分子。纤维素的重复单元是纤维二糖，纤维二糖的 C_1 位上保持着半缩醛的形式，有还原性。纤维素的结构式可用下图表示(图 1-1)。

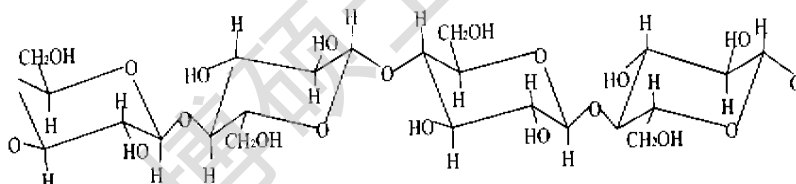


图 1-1 纤维素结构的重复单元

Fig. 1-1 The structural repeating units of cellulose

1.1.2 淀粉的结构

淀粉可以分为直链淀粉和支链淀粉两类。不同植物的淀粉颗粒中，支链淀粉和直链淀粉的含量是不同的。直链淀粉和支链淀粉的分子大小不是均一的，分子之间大小相差很大，并且结构也不同。因此，它们的性质也有差别。

直链淀粉含 1000 个以上 D-吡喃葡萄糖结构单位，即以 $-1,4-$ 糖苷键连接成不分支的线状螺旋型。直链淀粉易溶于温水，溶解后粘度较低，水

解比较完全。

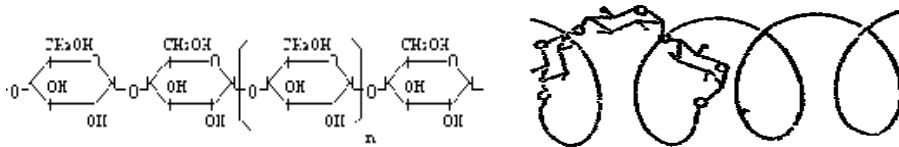


图 1-2 直链淀粉分子及其结构

Fig.1-2 The structural formula of amylose

与直链淀粉不同，支链淀粉在葡萄糖结构单位的 C₆ 有分支：它通过 -1, 4-糖苷键连接成主轴，同时葡萄糖又以 -1, 6-糖苷键构成支链，两个分支之间有 20 ~ 25 个葡萄糖结构单位。支链淀粉要加热后才开始溶解，形成的溶液粘度较大，糖化过程中容易生成具有分支的小分子糊精，糖化的速度较慢。

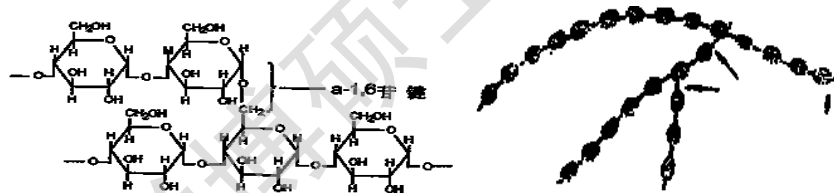


图 1-3 支链淀粉结构的重复单元

Fig.1-3 The structural repeating units of amylopectin

1.2 天然纤维素类物质和淀粉类物质的化学成分

纤维素类物质是自然界中极为丰富的资源，但自然界中并不存在纯粹的纤维素。天然状态下的纤维素类物质由纤维素、半纤维素、木质素及部分蛋白质、氨基酸、单宁等组成^[7]。在纤维素细胞的次生壁中，微细纤维、木质素、半纤维素 3 种组分均呈不连续的层状结构，彼此粘结又互相间断，微细纤维是构成细胞壁的骨架，木质素、半纤维素则是微细纤维之间的填

充剂和粘结剂。

纤维素为植物细胞壁的主要组成物质，以原纤结构存在，大部分分子规律性排列形成结晶结构，称为结晶区，小部分分子规律性差，称为无定形区。纤维素的结晶区一般约 85%，其余约 15% 左右为无定形区，酶易与无定形区的纤维素分子结合，产生催化水解作用，但难于渗入结晶区。反应最初几小时，纤维素的无定形区被水解，速度快，糖浓度增加快，随后的水解在纤维素结晶区中进行，速度慢，糖浓度增加也慢^[8]。但高培基等^[9]发现，纤维素酶对结晶区和无定形区的降解是同时进行的。

半纤维素的分子量较小，聚合度低，且分子中往往带有支链。组成半纤维素分子的结构单元有多种，包括戊糖基(木糖基、阿拉伯糖基等)、己糖基(葡萄糖基、甘露糖基、半乳糖基、鼠李糖基等)、糖酸基和乙酰基，木聚糖是许多生物材料中半纤维素的主要成分。虽然木聚糖的结构比纤维素更复杂，完全水解所需的酶类也比纤维素多，但木糖的结构没有纤维素那样紧密，各种酶容易与木聚糖结合，所以水解速度并不慢^[10]，分解后的单糖可以被相关微生物利用。

木质素是苯丙烷单元(即 C_6-C_3 单元)通过醚键和碳-碳键联接而成，具有三维结构的芳香族高分子化合物。由于木质素分子量大(相对分子量 $>1.0 \times 10^5$)，溶解性差，没有任何规则的重复单元或易被水解的键，且对酶的水解有抗性，因而微生物及其分泌的胞外酶不易与之结合，是目前公认的微生物难降解的芳香族化合物之一^[11]。木质素的存在对纤维素的酶解非常不利，一方面，它的屏蔽作用使纤维素酶难以侵入材料内部，影响纤维素酶的酶解作用；另一方面，它吸附部分纤维素酶，使纤维素酶用量增加^[12]。

天然纤维素物质随生长地带不同，其组分与含量亦有所不同。以下是几种纤维材质的化学成分^[6]。

表 1-1 几种纤维素质材的化学成分

Tab.1-1 The chemical component of some cellulose materials

成分 材质种类	灰份 (%)	纤维素 (%)	木质素 (%)	戊聚糖 (%)
臭冷杉(<i>A. nephrolepis</i>)	0.58	49.92	30.85	11.57
沙冷杉(<i>A. holophylla</i>)	0.47	49.72	30.06	10.18
紫果云杉(<i>P. purpurea</i>)	0.72	45.87	28.58	12.12
鱼鳞云杉(<i>P. jezoensis</i>)	0.31	48.45	29.12	11.45
红松(<i>P. koraiensis</i>)	0.42	53.12*	27.69	10.46
马尾松(<i>P. massoniana</i>)	0.33	51.86*	28.42	8.54
铁杉(<i>T. chinensis</i>)	0.20	53.00**	36.00****	38.00
长苞铁杉(<i>T. longibracteata</i>)	0.18	80.58***	31.13****	7.65
龙须草(<i>E. binata</i>)	6.09	>40	12.62	
稻草(<i>O. sativa</i>)	14.13	36.94	11.61	
麦草(<i>T. aestivum</i>)	6.04	>40	18.38~22.52	
斑苦竹(<i>P. maculatus</i>)	1.36	70.80	25.45****	23.38

*测定方法为索格氯化法，**为 Sieber 和 Walter 法，***采用 Cross 和 Bevan 法，****为 Klason 木质素，其余纤维素采用硝酸乙醇法，木质素为硫酸法测定

天然淀粉质原料，一般可分成下列几类：(1) 薯类，甘薯、马铃薯、木薯、山药等。(2) 谷类，高粱、玉米、大米、谷子、大麦、小麦、燕麦、黍和稷等。(3) 野生植物，橡子仁、葛根、土茯苓、蕨根、石蒜、金刚头、香符子等。(4) 农产品加工副产物，米粞、米糠饼、麸皮、高粱糠、淀粉渣等。原料所含的化学成分，不仅关系到糖化率的高低，同时也影响糖生产的工艺过程。常用原料中主要的化学成分如下^[13]：

1、糖类 原料中所含的淀粉、菊糖等多糖越多，生成葡萄糖和寡糖也就越多，所以它的含量和糖产量有着密切的关系。五碳糖多存在于原料的皮层，如麸皮、高粱糠，谷糠、花生壳等中，发酵中也易生成有害的糠醛。纤维素不被淀粉酶水解，对发酵没有什么直接影响。

2、蛋白质 原料含有的蛋白质，在酶解糖化过程中，可作为微生物生长繁殖的重要营养成分。

3、脂肪 对发酵有影响，如高粱糠、米糠等含油脂多，则产酸较快，产酸幅度也较大。

4、灰分 灰分中的磷、硫、镁、钾、钙等是构成菌体细胞的和辅酶的重要成分，还有调节渗透压的作用，是微生物生长不可却少的，在一般原料中，灰分的含量足够。

5、果胶 块根或块茎作物的原料（如甘薯、马铃薯、木薯等），果胶质的含量比谷类多好几倍，它是生成对人体有害的甲醇的主要来源，并对醪液的粘度也有影响。

6、单宁 橡子、高粱等原料中，都含有大量的单宁。单宁带有涩味，遇铁就成蓝黑色，能把蛋白质凝固。而淀粉酶的主要成分是蛋白质，遇到单宁就凝固硬化，失去它应有的作用能力，不能进行正常的糖化发酵，所以，单宁的存在是有害的。

表 1-2 几种淀粉质原料的化学成分

Tab. 1-2 The chemical component of some starch materials

种类	水分 (%)	粗蛋白质 (%)	灰份 (%)	粗脂肪 (%)	粗纤维 (%)	碳水化合物 (%)
华南甘薯	74.9	0.6	0.6	0.5	0.2	20.21
华东马铃薯	81.3	1.8	0.75	0.02	-	15.83
新鲜木薯	70.3	1.1	0.54	-	1.1	26.58
玉米	6~12	8.5	1.7	4.3	1.3	73.02
高粱	12.0	8.2	0.4	2.2	0.3	78.11
大米	14.0	7.7	0.5	0.4	2.2	75.51
小米(粟)	11.0	7.7	1.4	0.4	0.1	77.02
大麦	11.9	10.5	2.6	2.2	6.5	66.33
小麦	12.8	10.3	1.3	2.1	1.2	71.81
橡实	13~22	4~7.5	8~14	1.5~5	1.3~3	50~60
红色土茯苓	11.8	2.63	13.4	-	2.1	59.88
鲜蕨根	56.1	3.3	1.3~3	1.5~5	8~14	20.44
麸皮	13.5	15.4	4.7	3.9	9.5	52.94
脱脂米糠	11.0	19.0	16.5	7.9	10.1	37.52

部分原料中还含有一些有碍发酵作用的成分，如木薯中的氰酸，发芽马铃薯中的紫色龙葵素，野生植物中的各种生物碱等，这些物质的存在会

影响原料的产糖率。但是绝大多数的有害物质，经蒸煮和发酵作用，可被分解或破坏，可以消除其危害性。

1.3 淀粉和纤维素糖化研究进展

根据古书记载，早在公元前一千年左右，我国劳动人民已经采用酶水解法制造饴糖。《诗经》、《大雅》、《绵篇》都是歌颂周文王的著作，其中有“周原膋膋，萑茶如饴”的歌词。《齐民要术》和《天工开物》都有制饴方法的记载。利用酸法水解淀粉制造糖品始于欧洲，发展比较晚。1811年，德国化学家 Kirchoff 用硫酸处理马铃薯淀粉，想制造替代阿拉伯树胶的胶粘剂，却意外得到黏度很低、清澄、有甜味的液体，于是 Kirchoff 开始研究制造糖品并取得成功。1940年，美国开始采用酸酶合并糖化工艺生产糖浆。1960年日本使用 α -淀粉酶液化和葡萄糖淀粉酶糖化的双酶法生产结晶葡萄糖工艺，这种双酶法所得糖化液的纯度高、不需结晶工艺、生产成本低廉，被各国普遍采用^[14]。现代淀粉糖化两大工艺技术路线是酸法和酶法。酸法工艺比较成熟，水解淀粉比较快，但无机酸随机水解淀粉分子糖苷键，难以控制糖浆产品的糖分组成；酸还将淀粉原料中的蛋白质、脂肪等物质水解成小分子，发生分解和复合反应，产生色素、脂肪皂等许多杂质，精制量大；酸对水解釜、管道、阀门的腐蚀较严重，含酸蒸汽还会污染工厂环境，影响工人的身体健康。淀粉糖的酶法生产工艺克服了酸法工艺的多种缺点，具先进性，主要表现为：一，酶法水解工艺对原料的适应性广，除各种淀粉外，能够直接以木薯片、番薯片和玉米等粗原料发酵。二，生产条件相对温和，生产过程的 pH 值一般控制在 4.0-6.4 之间，比酸法工艺高；反应温度较低，糖化液颜色浅、易脱色、精制量小。三，利用多酶协同糖化较易控制产品的糖组分，一条设备线可以生产许多糖品，如麦芽糊精、液体葡萄糖、麦芽糖浆等产品。四，在生产结晶葡萄糖时，糖液质量高，能够直接用于煮制无水 α -葡萄糖，剩余的母液经冷却结晶出含水 α -葡萄糖，再分离后的母液甜味依然纯正，可食用。故淀粉干物的转化率、

回收率高，副产物少，生产成本低。因此，除生产 38-42DE(转化程度)值的液体葡萄糖外，其它糖品的生产工艺很快被酶法所取代，新建的大中型淀粉糖发酵品厂往往采用酶法水解淀粉的生产工艺^[15]。尤其近 20 年来，酶制剂的商品化促进了淀粉水解工业的快速发展，淀粉的酸水解工艺逐渐被较好的高温酶喷射液化的双酶法所代替^[16]。

与淀粉相比，纤维素的糖化研究历史较短。1819 年，Braconnot 发现用浓硫酸可以使纤维素降解成葡萄糖。1894 年，Si monson 首次用稀硫酸使木料糖化^[17]。20 世纪 20 年代，前苏联开始研究用酸解法糖化纤维素，并于 30 年代建立木材酸水解工厂^[17]。70 年代的石油危机将木质纤维素的开发研究推向高潮。美国、加拿大、印度、前苏联都进行过工业试验，大多采用酸水解流程^[18]，但技术经济指标均未获得决定性突破。80 年代随着石油价格的下降，研究转入低潮。其间开发相对成熟的几种酸解工艺是：渗滤水解法、栓流式高温稀酸法、低温浓酸法。酸解法有高能耗、高污染、高成本、副产物多、对反应器要求高等缺点，其开发研究一直未获得突破性进展，以后纤维素的糖化研究重心逐渐转移到酶法或生物直接转化法^[17]。对纤维素微生物的研究始于 1912 年，到现在大致经历了 3 个高峰发展时期^[19]：十九世纪 50 年代以前主要是研究微生物对天然纤维的破坏作用；60 年代到 70 年代针对世界人口的巨增，主要研究利用纤维素资源生产单细胞蛋白；70 年代以后，随着能源危机和环境污染日趋严重，研究的重点又逐步转移到开辟新能源和防止环境污染上来。对纤维素酶水解纤维素的研究，始于 20 世纪 60 年代。1969 年，有人对一种树木纤维素加热磨细后，用纤维素酶和纤维二糖酶联合水解 15 天，得到 30% 的葡萄糖，达到淀粉水解率的水平，这是第一次在小范围内突破纤维素酶解难关的可喜尝试^[20]。近二、三十年来，在纤维素酶菌株的选育、纤维素酶组分及降解机制、纤维素酶合成的调节和控制以及纤维素酶应用等许多方面都取得了很大的进展。例如，微生物纤维素酶的生产效率显著提高，容积生产率已达到 100IU/L·h 以上；

已开发出蒸汽爆碎等多种新的原料预处理技术，使纤维素酶解率达到 90% 以上；已开发出多种工艺流程，纤维素生产酒精或丙酮丁醇的中间生产试验已扩大到数十立方米发酵罐的小型生产规模，中试生产成本已接近工业化的要求^[21]。但迄今为止，主要由于经济上的原因，这些新开发的技术都还未能在商业上大规模实施，工业技术改进的研究仍在进行中。已经开发的用废纤维生产糖的方式有分批酶解糖化、连续酶解糖化、吸附酶解糖化、固定化酶连续酶解糖化和固定化菌丝体连续酶解糖化等几种主要工艺^[22]。

1.4 产糖原料的预处理

无论是淀粉原料还是纤维素质原料，对它们的酶解制糖，都要进行预处理。淀粉原料蒸煮前，必须先将原料中混杂的小铁钉、杂草、泥块和石头等杂质除去，以维护设备和防止杂质对生产中的反应过程产生不良影响。此外，原料还必须粉碎，其目的是要增加原料受热面积，有利于淀粉颗粒的吸水膨涨、糊化，提高热处理效率，缩短热处理时间。由于淀粉颗粒外层包被以网络状的粗纤维和粗蛋白，结构极为致密，水分子难以进入淀粉分子中，不利于淀粉酶的作用。传统生产工艺中，解决的方法是糊化。糊化就是利用温度破坏淀粉分子间的氢键和颗粒表层坚硬的粗纤维组织，切断淀粉链；同时，每个淀粉分子链上借氢键维系的螺旋型空间结构也被破坏，链被拉长。这就更利于淀粉酶能充分与淀粉分子接触，从而水解淀粉。因此，淀粉是否经过糊化和糊化程度是否彻底，直接影响其水解速度^[23]。

从微生物学的角度看，木质纤维素不难降解为小分子^[18]。纤维素无定型区的酶解速率与淀粉相近，由 β -1,4-糖苷键构成的纤维寡糖，比 α -1,4-糖苷键构成的麦芽糖更容易被水解。然而纤维素酶的分子转换率要比淀粉酶低约两个数量级，主要是纤维素内部的结晶区难以被酶解^[24]；另外，在纤维素的微小构成单位周围是被半纤维素、木质素层的鞘所包围，阻止纤维素分解物对纤维素的进攻。可见，影响木质纤维素降解的两个主要障碍是结晶性和木质化^[25]。为提高纤维素的酶解率及产糖率，必须对木质纤维

素进行预处理，以去除木质素，或破坏木质素层；尽量使纤维素结晶度降低。常用的预处理方法有 4 种^[26]：1、物理法，包括球磨、压缩球磨、爆破粉碎、冷冻粉碎、声波、电子射线等，均可使纤维素粉化、软化，提高纤维素的酶解转化率。该方法有如下特点：a) 在一般条件下，作用不明显，如球磨粉碎纤维后，酶解率随纤维素的颗粒变小而略有上升；对于电子辐射，只有大于 100Mrad 后，半纤维素和木质素的结合层才受影响，而且羟基和羰基受破坏最大，结晶度下降；b) 预处理成本较高，应用球磨 48h，才能达到 270 目左右的细度，电子射线需要高能射流发生仪，设备成本高，能耗大；c) 处理后的粉末纤维素类物质没有涨润性，且体积小，可以提高基质浓度，得到较高糖浓度的糖化液；d) 将原料粉碎成极细的颗粒，一方面使其表面积大大增加，另一方面破坏其结晶性，以便在随后的糖化阶段中易于反应。2、化学预处理方法有无机酸、碱和有机溶剂等方法。其机理主要是使纤维素、半纤维素和木质素吸胀并破坏其结晶性，使其溶解并降解，从而增加其可消化性。它有以下特点：a) 无机酸碱法使纤维素和半纤维素损失较大，且强酸、强碱预处理后，存在着试剂的回收、中和、洗涤等问题；b) 有机溶剂可以完全地溶解木质素，对木质纤维素预处理效果好，且易回收，但又存在腐蚀和毒性等问题的限制，造成环境污染，难以大规模应用；c) 形成的产物多种多样，如纤维糊精、纤维二糖、葡萄糖、葡聚糖等，产品得率低。3、物理化学法。主要综合物理法和化学法的长处，弥补其不足。4、生物法。常用于降解木质素的是白腐菌、褐腐菌、软腐菌和其它细菌。从成本和设备的角度出发，生物法的预处理显示了独特的优势。用专一性的木质酶处理原料，分解木质素和提高木质素的消化率，虽然在试验中取得了一定的成功，但多停留在实验阶段。目前，蒸爆法是纤维素原料水解前的有效的预处理手段^[27]，爆破粉碎主要使 α -和 β -烯丙醚键断裂，使纤维素物质结合层受到破坏，提高酶作用的敏感性，在 200 的高温下，半纤维素发生自水解作用而融化，木质素也发生部分降解，变得易被有机溶

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.

厦门大学博硕士学位论文摘要库