

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 200326029

UDC _____

厦 门 大 学

_____ 硕 士 _____ 学 位 论 文

灰绿曲霉高产纤维素酶突变株的选育及特
性研究

The Screening and Characterization of a High-yield
Cellulase Mutant of *Aspergillus glaucus*

杜娟

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: 2006 年 4 月 28 日

论文答辩时间: 2006 年 6 月 5 日

学位授予日期: 2006 年 月 日

答辩委员会主席: 邵宗泽

评 阅 人: _____

2006 年 6 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）：

年 月 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

厦门大学博硕士学位论文摘要库

摘 要

纤维素类物质是地球上最为丰富的可再生资源. 将纤维素物质转化为酒精和氢等生物能源, 对解决人类目前所面临的能源短缺与环境污染等问题有重要意义. 纤维素物质高效利用的关键是纤维素的降解, 而生物降解是一种重要的降解途径. 目前在纤维素物质利用中存在的突出问题是产纤维素酶菌株的活性不高, 因此, 选育具有高产纤维素酶活的菌株是高效利用纤维素类物质的关键.

本研究以灰绿曲霉 XC9 为出发菌株, 采用 EMS、紫外线与 LiCl 复合诱变处理, 获得了几株产酶活性明显提高的突变株. 突变株表现了一定的抗葡萄糖阻遏的特性, 外部形态相对于出发菌株, 也发生了较大的变化. 其中突变株 EU7-22 活性最高, CMC 酶活为出发菌株的 2 倍.

突变株 EU7-22 液体发酵的单因子实验表明, 其产酶最佳条件分别为稻草粉含量 2%, 蛋白胨含量 0.1%, 温度 35 °C, 起始 pH 值 6~7、接种龄 3~5 d. 通过 L₉(3⁴) 正交实验确定了液体发酵的优化组合条件为: 稻草粉 3%、蛋白胨 0.5%、温度 35 °C、起始 pH 5. 在优化条件下培养 4~5 d 后, CMC_{Case} 和滤纸酶活力分别达 110 IU/mL 和 2.8 IU/mL.

对突变株 EU7-22 纤维素酶性质的研究表明, 该酶最适反应温度为 60°C, CMC_{Case} 和 FPA 的最适反应 pH 值分别为 4.2 和 4.8. 在 pH5~6 之间, 纤维素酶可以维持较高的稳定性. 当大于 60°C 时, 纤维素酶的热稳定性急剧下降. 多种金属离子对 EU7-22 纤维素酶活力都会产生一定影响. 在 EU7-22 酶液水解稻草粉产糖的实验中, 最佳酶液用量为 8% (V/V), 稻草粉糖化的最适温度为 50°C, pH 值为 5. 在该条件下, 3 g 稻草粉在 100 mL 降解系统中酶解反应 24 h 后, 产糖量可达 1.47 g, 此时糖化率为 44.1%. 利用稻草粉做底物, 变株 EU7-22 和产氢克雷伯氏菌 HP1 分期联合发酵, 1 克稻草粉可产氢 23.7 mL.

突变株 EU7-22 产酶性能良好, 有较高的利用价值, 纤维素酶解后产生的还原糖可以直接用于制取氢和燃料酒精等生物能源.

关键词: 灰绿曲霉; 纤维素酶; 诱变育种; 发酵条件; 糖化

厦门大学博硕士学位论文摘要库

Abstract

Cellulose is the most abundant and renewable resource in the world. The conversion of cellulosic biomass into bio-energy, such as ethanol and hydrogen, will decrease the requirement of fossil energy and improve the environment. During the utilization of cellulosic biomass, bio-degradation is regarded as the perfect choice. A present limitation is the low activity of cellulase producing strain. So, it's the key step to obtain high-yield and high activity cellulase producing strains for an industrial development in the future.

Cellulase producing strain *Aspergillus glaucus* XC9 was selected as the initial strain for mutation. Several mutant strains with high cellulase activities were obtained after being treated multiplicatively with UV-ray, ethyl methane sulphonate (EMS) and LiCl. The mutants exhibited distinct differences in physical properties and anti-suppress to glucose compared to the initial strain. Among the mutants, strain EU7-22 expressed the highest cellulase activities, its CMC activity was as two times as the initial strain.

Several single factors on liquid fermentation of strain EU7-22 were studied in this research. The appropriate conditions for cellulase production were achieved as: straw powder quantity 2%, peptone quantity 0.1%, culture volume 60mL/300 mL, loading strain age 3~5 d、pH6~7, and 35°C, respectively. The orthogonal experiments showed the preferable conditions for cellulase production as: straw powder quantity 3%、peptone quantity 0.5%、original pH 5, and temperature 35°C. Under such conditions, the CMCase and FPA activities of EU7-22 were obtained as 110 IU/mL and 2.8 IU/mL, respectively, after 4~5 d fermentation.

The enzymatic properties of cellulase from mutant strain EU7-22 were studied in this research. The optimum pH for CMCase and FPA activity were 4.2 and 4.8, respectively. The cellulase exhibited the highest activity at the temperature of 60°C. However, the enzyme turned to less stability with the increasing of temperature. The CMCase and FPA activity of cellulase decreased to 38.5% and 30%, respectively, after being incubated at 60°C for 4 h.

The saccharification was carried out in a system containing 3% straw powder, using 8% (v/v) crude cellulase solution. The maximal reducing sugar was obtained as

14.7mg/mL after 24h hydrolysis, and the yield of saccharification was 44.1%. The saccharification product was further applied for hydrogen production using *Klebsiella oxytaca* HP1 as the hydrogen producer. The hydrogen production yield was obtained as 23.7mL/g straw powder.

This study showed that mutant strain EU7-22 was a perfect cellulase producer. It owned nice potential in the bioconversion of cellulosic biomass into bio-energy such as ethanol and hydrogen in the future.

Key words: *Aspergillus glaucus*; Cellulase; Mutation breeding; fermentation condition; saccharification

目录

1. 前言	1
1.1 纤维素资源	1
1.1.1 纤维素的分布	1
1.1.2 纤维素的基本结构	2
1.1.3 纤维素的理化性质	3
1.1.4 降解纤维素的微生物类群	5
1.2 原纤维材料的预处理	5
1.3 纤维素酶	7
1.3.1 纤维素酶酶系组成	7
1.3.2 纤维素酶的分子结构	8
1.3.3 纤维素酶的酶解机制	9
1.3.4 纤维素酶的理化性质	10
1.4 纤维素酶的生产与合成	11
1.4.1 产纤维素酶菌株的筛选	11
1.4.2 纤维素酶的发酶生产条件	12
1.4.3 纤维素酶合成的调节与控制	12
1.5 纤维素酶应用前景及研究意义	13
2. 灰绿曲霉 XC9 高效产酶突变株的选育	15
2.1 实验材料	15
2.1.1 菌株	15
2.1.2 培养基	15
2.2 实验试剂及配制	15
2.2.1 实验常用试剂溶液	15
2.2.2 实验材料	16
2.3 实验仪器	16
2.4 实验方法	17
2.4.1 还原糖的测定	17
2.4.2 酶活的测定	17

2.4.3 斜面种子培养.....	18
2.4.4 液体发酵产酶培养.....	18
2.4.5 出发菌株的诱变.....	18
2.4.6 突变株的筛选.....	19
2.4.7 出发菌株与突变株形态特征的比较.....	19
2.5 实验结果与分析	20
2.5.1 液体发酵条件对出发菌株灰绿曲霉 XC9 产酶的影响.....	20
2.5.2 菌株的诱变选育.....	23
2.5.3 突变株与出发菌株的比较.....	25
2.6 小结.....	28
3. 突变株产酶条件的优化及酶学性质的研究.....	29
3.1 实验材料	29
3.1.1 菌株.....	29
3.1.2 培养基.....	29
3.1.3 常用实验试剂.....	29
3.2 实验仪器	30
3.3 实验方法	30
3.3.1 还原糖和酶活的测定.....	30
3.3.2 稻草粉的预处理.....	30
3.3.3 基础液体发酵产酶培养.....	30
3.3.4 液体发酵条件对突变株 EU7-22 产酶影响.....	30
3.3.5 温度和 pH 值对突变株 EU7-22 纤维素酶活性的影响.....	31
3.3.6 温度对突变株 EU7-22 纤维素酶稳定性的影响.....	31
3.3.7 pH 值对突变株 EU7-22 纤维素酶稳定性的影响.....	31
3.3.8 金属离子对突变株 EU7-22 纤维素酶活性的影响.....	31
3.3.9 突变株 EU7-22 粗酶制剂水解秸秆产糖实验.....	31
3.4 实验结果与分析	33
3.4.1 突变株 EU7-22 液体发酵产酶条件的优化.....	33
3.4.2 突变株 EU7-22 纤维素酶的酶学性质.....	40

3.4.3 EU7-22 纤维素酶水解产糖的研究.....	44
3.4.4 突变株 EU7-22 与克雷伯氏菌联合发酵产氢.....	46
3.5 小结.....	47
4.讨论.....	48
4.1 纤维素酶高产菌株的诱变选育	48
4.2 突变株 EU7-22 发酵产酶的研究	48
4.3 纤维素酶在稻草粉糖化及产氢上的应用	49
参考文献.....	51

厦门大学博硕士学位论文摘要

厦门大学博硕士学位论文摘要库

1. 前言

能源是人类赖以生存的物质基础和社会发展的基本保障. 进入 20 世纪以后, 地球上的人口增长了 4 倍, 而能源消耗却增加了 16 倍^[1]. 人口负担的增大和能源消耗的迅猛增长, 逐渐成为困扰着国家和世界经济难题. 为了寻求能源的扩大利用, 缓解能源危机, 生物能源的开发越来越为人们所重视.

天然纤维素原料是地球上最丰富的可再生资源. 植物通过光合作用使光能以生物能的形式固定下来, 其生成量每年高达 1 000 亿 t 以上, 这些能量相当于全球人类每年能源消耗量的 20 倍, 食物中所含能量的 200 倍. 这些生物能可以年复一年通过自然界的物质循环生成, 是永远不会枯竭的可再生资源^[2]. 除了部分的纤维素原料在自然环境中被各种微生物分解转化和用作动物饲料外, 绝大部分农林废弃物和农作物秸秆都被焚烧掉, 不仅对环境造成一定程度的污染、形成巨大的浪费, 也是农业安全存在的隐患.

怎样变废为宝, 充分利用上述纤维素资源来应对人类所面临的危机, 已经成为世界各国科学家普遍关注的课题. 其中利用纤维素酶的水解作用将纤维素转化为能源、可利用食物和化工原料是比较理想的“绿色”途径. 纤维素酶有着专一、高效、彻底、无污染的优点, 在工业、农业、医学方面都有广阔的利用前景. 但是, 由于酶生产成本较高, 产率较低, 产酶菌株活性不高, 制约着纤维素酶大规模工业化应用^[3].

选育高效产酶的菌株, 发展高效的纤维素酶制备和水解技术是纤维素资源得以转化, 纤维素酶充分利用的关键瓶颈. 随着生物技术的飞速发展, 纤维素酶会更加展现其重要的社会价值和意义, 为人类社会的发展创造奇迹.

1.1 纤维素资源

1.1.1 纤维素的分布

纤维素是生物界最重要的碳源物质, 在每年由光合作用产生的植物干质量中, 纤维素占了 50%^[4]. 我国的纤维素资源也极为丰富, 每年仅农作物秸秆的产量达

5.7×10^8 t^[5], 森林面积达 15894.09 万公顷, 森林蓄积量为 1126659.14 万立方米^[6].

自然界存在的纤维素资源有: 木浆(纤维素 93.8%)、糠醛渣、木屑、青干草粉、稻草(蔗渣、麦秆、稻壳、玉米穗轴、花生壳粉等)等农副产品、滤纸(其他纸类)、木纸浆、洋麻、啤酒滤饼、制糖工业甜菜废丝等。^[7]

由于各种植物的纤维素含量参差不齐, 种类繁多, 可将其分为纯纤维素, 木质纤维素和果胶质纤维素。其中棉花被认为是自然界中最纯的纤维素纤维, 强度大、韧性好, 棉纤维的结晶度为 80~90%, 聚合度为 3500~10 000, 高于木质纤维素; 亚麻、大麻、马尼刺麻、竹、甘蔗、稿、西班牙草、猴面包树等含有的纤维为果胶质纤维; 木材、黄麻等的纤维, 为木质纤维素^[8,9]。此外, 某些种类海洋动物和细菌也能产纤维素。

下表为几种原材料中纤维素的含量^[10]。

表 1-1 几种原材料的纤维素、半纤维素、木质素含量

Tab.1-1 The contents of cellulose, hemicellulose and lignin in some materials

原材料	木质素(%)	纤维素(%)	半纤维素(%)
松木 (Pine wood)	27.8	44.0	26.0
桦木 (Birch wood)	19.5	40.0	39.0
甘蔗渣 (Sugar cane bagasse)	18.9	33.4	30.0
稻草 (Rice straw)	12.5	32.1	24.0
棉花 (Cotton)	0	80~95	5~20

1.1.2 纤维素的基本结构

纤维素、半纤维素和木质素共同构成了植物体的支持骨架, 其中纤维素为植物细胞壁最主要的化学成分, 广泛地存在于自然界中。它占植物干重的 30~50%^[11], 是由 D-葡萄糖通过 β -1,4 糖苷键连接而成的链状高分子化合物。纤维素分子链在同一平面内折叠, 在 D-葡萄糖环上有反应性强的侧基, 使得链之间通过氢键的缔合作用顺向聚集形成严密的原纤维结构。在纤维素的连续结构中包括结晶区和无定型区域。结晶区由于一定数量氢键的存在, 纤维素分子排列规则致密, 结构非常稳定, 降解十分困难; 而无定型区纤维素结构相对松散, 易于

被酶解。

作为天然的高分子化合物纤维素含有碳、氢、氧三种元素。其中碳含量 44.44%，氢含量 6.17%，氧含量 49.39%，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)。纤维二糖是纤维素的重复单元 (如图 1-1)，经纤维素晶体的 X 射线衍射研究发现，在晶体学上两个葡萄糖酐以二次螺旋轴维系在一起，重复距离为 1.03×10^{-9} m 左右，为了充分利用这个重复距离，两个葡萄糖酐彼此绕螺旋轴旋转 180° 。这样，整条纤维素分子链的构象是一条螺旋，在分子链的一端， C_1 上有一个自由的半缩醛羟基，在另一端， C_4 原子上有一个自由的仲羟基，分子链因此而具有极性^[12]。

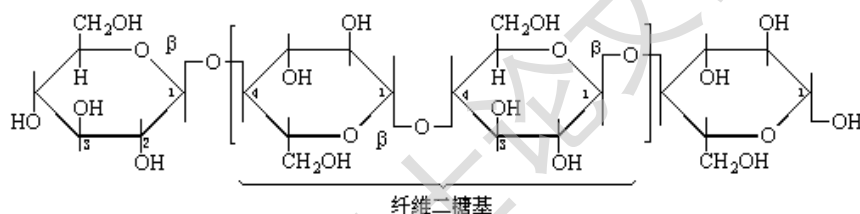


图 1-1 纤维素分子链结构

Fig.1-1 The structure of cellulose molecular chain

纤维素分子的分子量是不均一或多分散的，其大小及分布直接影响到纤维素的物理机械性能、纤维素溶液的性质以及纤维素原料的降解等化学性质。纤维素分子的大小常用聚合度 (DP) 来定义，即葡萄糖残基的含量。一般认为植物纤维素 DP 约为 14000 以上，微生物纤维素 DP 约为 3500，商品纤维素 DP 为 50~5000^[13]，植物纤维素中，木材类纤维的聚合度要大于草类等禾本科植物纤维素。

1.1.3 纤维素的理化性质

纤维素本身为白色粉末，这是由于纤维素结构具有不均一性，其内形成多孔体系，对光产生漫反射的结果。其晶体结构属于单斜晶系，并具有双折射性质，从而纤维素及其衍生物的溶液显旋光性。聚合的大分子之间存在着有序结构形成氢键，导致纤维素既不溶于水也不溶于一般的有机溶剂。能直接溶解纤维素的溶剂只有有限的几类，主要分为：水溶剂和非水溶剂两大类。一般水溶剂有无机酸碱、铜氨溶液、金属乙二胺络合物、EWNN 配合物等；某些氨、酰胺、内酯、

亚砷等有机化合物与 N_2O_4 、 $NOCl$ 和醛等组成的复合溶剂，它们属于非水溶剂，例如：DMSO/PF 溶剂、DMF/ N_2O_4 。 [14]

由于纤维素本身含有糖醛酸基、极性羟基，使纤维素在水中时，表面带负电荷，在水中形成双电层。改变电解质的浓度，对电极电位（纤维素表面的电位）无影响，但对动电电位（纤维素吸附层外界面）影响很大。纤维素表面电化学性质和制浆造纸、纤维素酶解发酵的过程关系很大。 [15]

下表为纤维素几个常见的物理常数 [16]：

表 1-2 纤维素的物理常数

Tab.1-2 Several physics characters of cellulose

纤维素物理常数			
密度（在氦中）/g.cm ⁻³	1.54~1.58	燃烧热值/kJ.mol ⁻¹	17.58
折射率（轴向）	1.599	介电常数	5.7
折射率（横向）	1.532	电击穿/kV.cm ⁻¹	500
比热容	0.37		

纤维素的降解是纤维素最重要的化学反应，在各种不同的环境条件下都有发生降解的可能。纤维素降解作用主要有以下几种类型：（1）酸降解；（2）碱性降解；（3）氧化降解；（4）微生物降解。

（1）纤维素的酸水解降解：纤维大分子中的 β -1,4糖苷键是一种缩醛键，对酸特别敏感，在适当的氢离子浓度、温度和时间作用下，糖苷键断裂、聚合度下降、还原能力提高，这类反应称为纤维素的酸性水解 [17]。随无机酸的种类和浓度的不同，水解产物也不同。由于工业成本较高、腐蚀性大、转化率低等缺点，酸降解的应用受到了一定程度的限制。

（2）碱性降解：纤维素分子在碱溶液浸泡或蒸煮等条件下可以分子链断裂，发生碱性降解作用，主要包括碱性水解和剥皮反应。剥皮反应在温和的条件下就可以发生，进行到一定程度达到稳定平衡；而碱性水解在高温下才能反应，温度越高反应越剧烈。适当控制剥皮反应的时间和程度，在造纸和纤维素化学工业上有重要的意义。

（3）氧化降解：纤维素的葡萄糖环在 C2、C3、C6 位上含有游离羟基，因而很容易被一些氧化剂氧化，形成醛基、酮基或羧基，聚合度也会有所降低 [16]。

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