

分类号 TQ353.4; Q814

U D C 606; 662

密 级 M M



学位代码 208

学校代码 10298

学 号 2079056

南京林业大学

研 究 生 博 士 学 位 论 文

论文题目：木质纤维原料分段酶水解技术的研究

作 者：杨 静

专 业：林产化学加工工程

研究方向：林产生物化学加工

指导教师：余世袁 教授

二〇一〇年六月

摘 要

在化石资源过度消耗引发石油短缺和气候变暖的形势下,利用木质纤维原料来生产燃料乙醇是一项迫切的、具有重要战略意义的任务。本论文通过固液分离技术解除了酶水解反应过程中的产物抑制作用,把纤维素酶一段水解反应转化为三段水解反应,大大提高了酶水解得率和减少了酶水解时间。以蒸汽爆破玉米秸秆为底物,在底物浓度 30%,第一段纤维素酶用量为 15 FPU/g 纤维素,第二段和第三段添加新鲜纤维素酶(酶用量为 3 FPU/g 纤维素和 2 FPU/g 纤维素),于 50℃、pH 4.8 和 150 r/min 的搅拌速度下进行(9+9+12 h)三段水解,30 h 水解得率为 70.41%,比一段水解 72 h 的水解得率 51.64%提高了 36%,且水解时间缩短了 42 h。在 pH 4.0, 52℃和 150 r/min 的恒温摇床中,以 1 IU/mL 的 β -葡萄糖苷酶水解三段水解上清液中的纤维二糖糖液 1 h,并用 30 kDa 的超滤膜回收 β -葡萄糖苷酶,第一轮纤维二糖水解为葡萄糖的得率为 92.71%,酶回收率为 98.87%;回用至第八轮纤维二糖水解为葡萄糖的得率为 90.87%, β -葡萄糖苷酶回收率为 95.25%。自产纤维素酶的水解效率优于商品酶,以蒸汽爆破玉米秸秆为碳源制备的自产纤维素酶,(9+9+12 h)三段水解得率为 75.8%,比商品纤维素酶的三段水解得率 70.41%提高了 7%。主要是由于真菌纤维素酶为诱导酶,由底物自身诱导的纤维素酶在酶系结构上更适合于纤维素酶组分对底物的协同水解作用;其次自产酶和商品酶来源于不同的碳源,在内切葡聚糖酶、木聚糖酶、 β -葡萄糖苷酶和 β -木糖苷酶的分泌上存在差异。年产乙醇 1 万吨,采用纤维素酶一段水解和三段水解工艺,每吨糖的生产成本分别为 3355 元和 2755 元。成功开发分段酶水解技术,可以解决木质纤维原料生物转化为乙醇的瓶颈,为纤维素乙醇的工业化提供依据。

关键词: 纤维素酶; 三段酶水解; 木质纤维原料; 高底物浓度; 酶吸附;

分类号 Q814
U D C 577.606
密 级 GK



学位代码 208
学校代码 10298
学 号 2099057

南京林业大学

研究生博士学位论文

论文题目： β -葡萄糖苷酶的固定化及应用研究

作 者：韦 策

专 业：林产化学加工工程

研究方向：林产生物化学加工

指导教师：余世袁 教授

二〇一二年六月

摘 要

本实验对多孔陶瓷球、介孔 TiO_2 (M-TiO_2) 和疏丙基官能化介孔 TiO_2 (SH-M-TiO_2) 这三种载体固定化 β -葡萄糖苷酶的技术进行研究, 初步考察了陶瓷球固定化酶填充床反应器的酶解工艺和模型。得出的主要结论如下:

1、以多孔陶瓷球为载体, 采用吸附交联—包封的方法固定化 β -葡萄糖苷酶, I-a 型陶瓷球固定化表观酶活最大约为 1.75 U/g , 从单因素实验还可以看出, 戊二醛交联和胶粘剂包封的步骤在陶瓷球固定化酶的操作过程中起关键作用。固定化酶在酸碱、热、储存稳定性方面较游离酶有明显改善; 且重复测定酶活 30 批后, 残余酶活仍在 80% 以上。在重复分批酶解实验中, 前三批底物的转化率在 90% 以上, 随后转化率逐渐下降, 第九批的转化率降到 50% 左右, 反应 10 批后固定化酶的残余酶活下降到 68.5%。

2、采用连续水解的模式, 将陶瓷球固定化酶装填成单级填充床反应器, 反应器的最佳工作温度和 pH 分别是 60°C 、pH 4.8。底物进料流速低时, 转化率高, 但是体积生产效率低下; 如流速为 3.53 ml/min 时, 转化率可达 97.5%, 而体积生产效率仅为 $6.29 \text{ g/(l}\cdot\text{h)}$, 当流速增大到 11.2 ml/min 时, 转化率仅为 82.1%, 而体积生产效率高达 $15.62 \text{ g/(l}\cdot\text{h)}$ 。进料速度 5.47 ml/min 时, 反应器连续水解十天, 转化率保持在 90% 以上, 平均转化率为 90.7%。建立了描述填充床的一维稳态轴向扩散模型, 以 STATISTICA 软件对保留时间和转化率关系进行拟合, 拟合因子 R 为 0.95, 模型计算结果与实验结果的平均偏差为 9.15%。

3、由陶瓷球固定化酶二级串联反应器的实验可知, 流速为 7.67 ml/min 时, 反应器转化率达 91.4%, 体积生产效率为 $12.69 \text{ g/(l}\cdot\text{h)}$, 对比单级反应器转化率为 91.7% 时的体积生产效率为 $8.98 \text{ g/(l}\cdot\text{h)}$, 二级串联反应器的体积生产效率比单级反应器提高了 41%。

4、 M-TiO_2 吸附法固定 β -葡萄糖苷酶 (BG-M-TiO_2) 的最大表观酶活回收率为 64.14%, 对应的表观酶活为 4.68 U/g ; 当起始给酶量为 0.907 U/ml 时, BG-M-TiO_2 的表观酶活力接近最大值, 约为 7.6 U/g 。 M-TiO_2 固载酶后 N_2 吸附量略有下降, 比表面积 (S_{BET}) 从 $62.04 \text{ m}^2/\text{g}$ 降低到 $47.72 \text{ m}^2/\text{g}$, 孔容 (V_p) 从 $0.37 \text{ cm}^3/\text{g}$ 降低到 $0.29 \text{ cm}^3/\text{g}$ 。 BG-M-TiO_2 重复测定酶活 6 批后, 残余酶活降到 50% 以下。

5、分别以 3-氨丙基三乙氧基硅烷 ($-\text{NH}_2$ 改性) 和 3-疏丙基三甲氧基硅烷 ($-\text{SH}$ 改性) 两种偶联剂, 对 M-TiO_2 进行后嫁接法官能化改性, BG-SH-M-TiO_2 在酶活、酶活回收率和重复分批测定酶活稳定性中的结果均优于 $\text{BG-NH}_2\text{-M-TiO}_2$ 。 $-\text{SH}$ 改性后的 M-TiO_2 S_{BET} 从 $62.04 \text{ m}^2/\text{g}$ 降低到 $53.50 \text{ m}^2/\text{g}$, 孔径 (D_{BJH}) 从 20.3 nm 下降到 18.2 nm , V_p 从 $0.37 \text{ cm}^3/\text{g}$ 降低到 $0.31 \text{ cm}^3/\text{g}$; SH-M-TiO_2 能谱图新增了 Si 和 S 元素的特征吸收峰, 质量分数分别是 1.78% 和 1.81%, 疏丙基占的总质量分数约为 3.6%; SH-M-TiO_2 的热重曲线在 355°C 出现了来自疏丙基官能团的失重峰, 质量损失约为 2%。

6、 BG-SH-M-TiO_2 固定化酶的表观酶活回收率最高为 92.84%, 对应的表观酶

活为 10.99 U/g，当起始给酶量为 18 U/ml 时，BG-SH-M-TiO₂ 的表观酶活接近最大值为 21.3 U/g。BG-SH-M-TiO₂ 重复测定酶活 30 批后，残余酶活仍在 50% 左右。在重复分批酶解实验中，前八批对纤维二糖的转化率都在 90% 以上，反应 10 批后，BG-SH-M-TiO₂ 的残余酶活为反应前的 80.5%。

关键词：β-葡萄糖苷酶、固定化、多孔陶瓷、介孔 TiO₂、巯丙基、填充床反应器

论文题目

分类号 Q819
UDC 620; 678
密 级 GK



学位代码 208
学校代码 10298
学 号 2139055

蚕丝蛋白的纳米纤维的制备与应用

姓 名
郑 可

南京林业大学

南京林业大学
NANJING FORESTRY UNIVERSITY

博士学位论文

论文题目：蚕丝蛋白的纳米纤维的制备与应用

作 者：郑 可

专 业：林产化学加工工程

研究方向：林产生物化学加工

指导教师：范一民

二〇一七 年 六 月

诚 朴 雄 伟
树 木 树 人



摘要

本论文通过甲酸预处理, 利用次氯酸钠 (NaClO) 氧化天然蚕丝纤维获得表面带有负电荷的纳米纤维。当采用 10 mmol/g 蛋白的 NaClO 用量时, 此时反应体系蛋白浓度为 5 g/L, 桑蚕丝羧基浓度从 0.293 mmol/g 蛋白增加至 0.720 mmol/g 蛋白, 此时水不溶部分(固形物)回收率为 79.61 %; 柞蚕丝羧基浓度从 0.347 mmol/g 蛋白增至 0.833 mmol/g 蛋白, 此时水不溶部分回收率为 73.01 %。将氧化后的桑蚕丝和柞蚕丝固形物在水中进行超声分散, 可以分别获得桑蚕丝纳米纤维(直径为 105 ± 27 nm)以及柞蚕丝纳米纤维(直径为 112 ± 33 nm), 两者长度均在 $1 \mu\text{m}$ 以上, 具有较高长径比。蚕丝纳米纤维对环境 pH 具有敏感性, 表现出了随 pH 变化的聚集—再分散现象。在 pH 5 和 pH 3 时, 分别有 80.1 % 和 90.9 % 的桑蚕丝纳米纤维聚集沉淀; 柞蚕丝纤维沉淀质量则分别 85.7 % 和 93.6 %。沉淀出的聚集体中纳米纤维质量分数约为 20 %, 相较于原始的纳米纤维分散液浓度(质量分数约为 0.2 %)提高了 100 倍左右。此外, 将这些聚集体重新置于 $\text{pH} > 7$ 的水溶液中搅拌 10 min 以上, 它们可重新分散成为均一稳定的纳米纤维分散液。

NaClO 对蛋白的氧化作用同样适用于溶解再生后蚕丝蛋白溶液。当 NaClO 用量为 2 mmol/g 蛋白时, 此时蛋白浓度为 50 g/L, 蚕丝蛋白中羧基浓度从 0.34 mmol/g 蛋白增加至 1.09 mmol/g 蛋白, 对应于蛋白中 47 % 的丝氨酸得到氧化; 此时通过透析后, 85 % 以上的丝蛋白得到保留。氧化后再生蚕丝蛋白 (OxSF) 溶液具有明显自组装行为, 其自组装过程在较低温度下遵循动力学过程, 受到表面电荷分布以及强度影响; 更强的表面负电性以及更密集的电荷分布使得 OxSF 溶液更趋向于自组装成单向纳米纤维结构。而在较高温度下, OxSF 自组装过程则更倾向于热力学驱动; 其纳米纤维的组装更趋向于随机分叉生长。OxSF 溶液自组装获得纳米纤维形貌可受到表面电荷分布以及强度控制, 其组装纳米纤维直径为 17 ± 3 nm, D_f 值在 1-2 之间。由于界面间的静电吸附作用, 表面带有负电荷的 OxSF 纳米纤维与壳聚糖层层旋涂复合材料作用具有较高的力学强度。

以 OxSF 溶液冷冻干燥制备的支架孔隙大小为 $200 \pm 40 \mu\text{m}$; 其干态下压缩模量为 53.6 ± 11.8 MPa, 是原始再生蚕丝蛋白 (SF) 溶液所制备同样孔隙率支架的 100 多倍(压缩模量 35.5 ± 12.2 kPa)。矿化后支架孔隙结构无明显变化, 然而矿化后的氧化再生蚕丝蛋白 (M-OxSF) 支架相较于矿化后原始再生蚕丝蛋白 (M-SF) 支架有更为密集的矿物沉积; 此时, M-OxSF 支架在湿态下压缩模量为 758 ± 189 kPa; 而 M-SF 支架压缩模量仅为 21 ± 8 kPa。OxSF 支架可以为人骨髓间充质干细胞 (hMSCs) 提供良好的增殖与分化环境; 而 M-OxSF 支架进一步扩大了这一优势。活体染色, 骨分化前期 (ALP, Col1a1) 以及骨分化后期 (OPN, OC) 基因表达量的测定同时表明, 无论预矿化与否, 氧化后丝蛋白 (OxSF 与 M-OxSF) 所制备支架材料在促进 hMSCs 成骨分化程度上显著强于 ($*p < 0.05$) 未氧化丝蛋白所制备支架 (SF 与 M-SF)。

关键词: 蚕丝蛋白; 次氯酸钠氧化; 纳米纤维; 组装动力学; 骨组织工程;

分类号 TQ353.4;Q814

UDC 606;662

密级 GK



学位代码 208

学校代码 10298

学号 2149062

南京林业大学

NANJING FORESTRY UNIVERSITY

博士学位论文

论文题目：竹材木质纤维素资源化利用的研究

作者：黄曹兴

专业：林产化学加工工程

研究方向：林产生物化学加工

指导教师：勇强 教授

二〇一七年六月

摘 要

我国竹林种植面积大,竹子年产量高,每年产生的竹材加工废弃物达 4600 万吨,这些废弃物多数没有得到合理利用,竹材加工废弃物的清洁、高效利用已成为林产工业亟待解决的课题。因此,本论文以竹材加工剩余物(竹屑)的资源化利用为目标,通过生物炼制和化学改性的工艺分别制备生物乙醇和木质素磺酸钠。同时,本论文针对制约竹材纤维素糖化的物理和化学屏障,开展不同碱性预处理强度对影响纤维素糖化的因子的影响作用以及这些因子与纤维素糖化效率的关系,木质素、木质素-碳水化合物复合物在碱性预处理和基于阿拉伯糖苷酶辅助的纤维素糖化过程中的迁移规律及其机理,主要结果如下:

(1) 竹屑中竹青、竹黄的半纤维素是典型的阿拉伯糖基木聚糖结构,主链为 β -D-吡喃木糖形成的木聚糖,在木糖基的 C-2 位连接着 4-O-甲基- α -D-葡萄糖醛酸, C-3 位连有 α -L-呋喃阿拉伯糖;竹青、竹黄木质素含有紫丁香基单元(S)、愈创木基单元(G)和对羟基苯基单元(H), S:G:H 的比值分别为 40:54:6 和 51:44:5,侧链连接键主要为 β -O-4 醚键结构、树脂醇结构、苯基香豆满结构、螺环二烯酮结构和 α,β -二芳基醚键;木质素-碳水化合物(LCC)主要存在的形式为木质素-木聚糖复合物,其次为木质素-葡聚糖复合物和木质素-阿拉伯聚糖复合物,参与 LCC 中苯基糖苷键形成的碳水化合物主要为木聚糖、葡萄糖和阿拉伯聚糖,参与 LCC 中苄基醚键的形成碳水化合物主要为木聚糖。

(2) 利用稀硫酸预处理竹屑,在最剧烈条件下(160 °C, 4%酸浓度),即使原料中全部半纤维素和 17.4%的木质素被去除,竹屑的糖化效率只有 24.7%,总糖得率仅为 20.4%。常规的硫酸盐法预处理,通过有效碱、硫化度和保温时间条件的优化,当最佳条件为 26%有效碱用量、24%硫化度、60 min 保温时间和 160 °C 温度时,预处理竹屑的葡聚糖和木聚糖回收率分别为 85.7%和 38.0%,木质素脱除率为 94.8%,酶解得率和可发酵性单糖(葡萄糖和木糖)产量分别为 76.8%和 344 g/(1000 g 竹屑),总糖得率为 55.4%。稀酸法处理的竹屑酶水解性能远不及于硫酸盐法预处理物料的原因之一,可能是残留在物料中木质素不同物化性能(表面电荷低、疏水性强和酚羟基含量高)导致其对纤维素酶的无效吸附量大,从而造成酶水解体系中参与纤维素水解的酶减少。

(3) 当低用碱量硫酸盐法预处理条件为 12%有效碱用量、24%硫化度和 60 min 保温时间时,竹屑的木质素脱除率可达 78.4%,物料酶水解得率为 58.9%。该预处理条件下,虽然竹屑原料中部分 LCC 连接键发生断裂,但仍有 1.8/C₉₀₀ 苄基醚键、2.8/C₉₀₀ 苯基糖苷键和 4.0/C₉₀₀ γ -酯键。这些木质素-碳水化合物类型主要为木质素-木聚糖复合物、木质素-葡聚糖复合物和木质素-阿拉伯聚糖复合物。

(4) 根据预处理物料 LCC 的结构特点,将木聚糖酶和阿拉伯糖苷酶辅助纤维素酶水解耦合预处理竹屑的糖化。酶复配优化结果表明,120 IU/g_{葡聚糖}木聚糖酶和 15 IU/g_{葡聚糖}阿拉伯糖苷酶酶辅助纤维素酶水解,预处理物料的葡萄糖得率和木糖得率分别从 58.9%提高到 83.2%和从 68.2%提高到 88.4%。酶水解过程中,预处理物料中 LCC 的苯基糖苷键和 γ -苯酯键降解最多,分别从 2.8/C₉₀₀ 降至 0.5/C₉₀₀ 和从 4.0/C₉₀₀ 降至 1.0/C₉₀₀,降解率分别为 82.1%和 75.0%;而苄基醚键降解率仅为 16.7%。

(5) 基于 1000 g 原料,经过己糖戊糖顺序发酵,酶水解液中葡萄糖可产生 158.7 g

乙醇，木糖可产生 42.7 g 乙醇，生产吨乙醇需要 4.97 吨绝干竹屑。经过磺甲基化反应，预处理过程中产生的 229.8 g 黑液木质素可制备 240.8 g 木质素磺酸钠，酶水解过程中产生的 103.6 g 酶解残渣可制备 49.1 g 木质素磺酸钠。

关键词：竹加工剩余物；木质素-碳水化合物；预处理；纤维素糖化；阿拉伯糖苷酶；木质素磺甲基化

分类号 TQ353.4;Q814

UDC 606;602

密 级 GK



学位代码 208

学校代码 10298

学 号 2139057

南京林业大学

NANJING FORESTRY UNIVERSITY

博士学位论文

论文题目：凝结芽孢杆菌木糖厌氧代谢分子机制的研究

作 者：姜 婷

专 业：林产化学加工工程

研究方向：生物基化学品与材料

指导老师：欧阳嘉 教授

二〇一七年六月

摘 要

凝结芽孢杆菌通过同型厌氧途径发酵生产高光学纯度的 L-乳酸，是一种近年来受到广泛关注的潜在木糖高效利用工业乳酸菌。本论文拟针对凝结芽孢杆菌木糖发酵产乳酸代谢途径中的基础性问题展开研究，考察凝结芽孢杆菌厌氧条件下发酵富含木糖预处理液制备乳酸性能，分析乳酸发酵的关键抑制因素。并采用最新发展起来的第二代高通量测序技术 RNA-Seq 对凝结芽孢杆菌转录组进行解析，揭示其在不同碳源条件下的转录水平差异，挖掘高效木糖代谢途径中的关键基因，引入大肠杆菌体系，借助于合成生物学手段优化大肠杆菌木糖代谢途径，建立具有高效利用木糖产乳酸的大肠杆菌代谢工程菌。研究结果不仅有利于深入解析凝结芽孢杆菌木糖代谢高效运转机制，进一步挖掘和开发优秀的木糖代谢关键基因，也将填补和完善微生物木糖代谢研究领域的空白。对于乳酸生产技术的研发、木质纤维原料的高效生物转化及经济可行性都具有重要的意义：

采用常压室温等离子体（ARTP）诱变育种技术和进化工程对 *B. coagulans* NL01 进行长期驯化，选育出一株抑制物耐受性优良的菌株 *B. coagulans* GKN316。*B. coagulans* GKN316 利用酸爆水洗液（总糖 54.55 g/L，木糖 40.19 g/L）96 h 产生 45.39 g/L 的乳酸，乳酸得率为 83.15%。对 *B. coagulans* 木糖发酵中抑制物耐受性分析显示糠醛、羟甲基糠醛、香草醛和 4-羟基苯甲醛的添加不是很影响最终的乳酸得率，紫丁香醛对 GKN316 的抑制作用最强。首次发现 *B. coagulans* 能够在厌氧发酵条件下有效的将这五种醛类抑制物转化为对应的毒性较低的醇类。

利用 RNA-Seq 技术进行 *B. coagulans* NL01 在木糖或葡萄糖为碳源培养条件时的转录组测序。与葡萄糖条件下相比，木糖条件下共有 793 个基因存在差异表达，209 个转录上调，584 个转录下调。基于基因组和转录组绘制了糖酵解、磷酸戊糖途径、磷酸转酮酶途径、三羧酸循环和乙醛酸途径五个主要的糖代谢模型，该模型揭示了碳源由葡萄糖转成木糖后 *B. coagulans* NL01 的代谢特征，木糖异构酶和木酮糖激酶等木糖代谢相关基因的表达量显著上升，磷酸转酮酶途径和 TCA 循环中的基因几乎全部上调。转录组分析发现 *B. coagulans* NL01 具有一套完整的木糖代谢操纵子；发现 NL01 基因组上同时存在 L-和 D-乳酸脱氢酶基因，但只有 L-乳酸脱氢酶基因（*ldhL*）在乳酸合成中起作用。

对 *B. coagulans* NL01 *ldhL* 基因克隆表达研究其酶学性质显示该酶为 NAD-依赖型 L-乳酸脱氢酶（L-nLDH），受 FDP 激活。重组 L-nLDH 的比酶活为 2323.29 U/mg，最适激活剂 FDP 的浓度为 5 mM。反应最适温度为 55℃，当反应条件为 pH 6.5 时催化反应朝丙酮酸还原方向，反应 pH 为 11.5 时朝乳酸氧化方向； Ca^{2+} 对 L-nLDH 有明显的激活作用， Ni^{2+} ， Zn^{2+} ， Co^{2+} 和 Cu^{2+} 对 L-nLDH 有抑制作用。L-nLDH 具有较为宽泛的底物谱，对 α -酮基羧酸有不同程度的催化活性。

选择氯霉素作为 *B. coagulans* 遗传改造的筛选标记，筛选浓度为 7.5 $\mu\text{g/mL}$ 。探索以温敏型 pMH77（*lox66-cat-lox71*）为基础质粒，将乳酸脱氢酶基因上下同源片段分别连接在抗性标记的上下游，建立了 *B. coagulans* 基因表达体系。考察了不同转化方法并优化了转化条件，发现经 10 g/L 的甘氨酸弱化细胞壁后制备的感受态细胞，进行电转化，可以获得转化子，但转化效率比较低，实验重复性差，成熟的凝结芽孢杆菌遗传操作体系亟待建立。

以 *E. coli* KSJ(K12, $\Delta pflB \Delta ldhA$)为出发菌株, 基于 Red 和 Xer 重组系统删除基因 *ackA-pta*、*frdA*、*adhE*, 同时整合来自于 *B. coagulans* NL01 中的 *ldhL*, 选育获得了 L-乳酸生产菌株 *E. coli* KSJ316。其该重组菌株木糖乳酸转化率可以达到 90%以上, 化学纯度和光学纯度分别为 95.5%和 99%以上。在 KSJ316 中以质粒的形式过表达来自于 *B. coagulans* NL01 中的 *ldhL* 或木糖异构酶-木酮糖激酶基因 (*xylAB*), 乳酸的产量分别提高了 32.9% 和 20.13%。外源添加甲酸钠有效地提高 KSJ316 菌株生物量、木糖利用和 L-乳酸产量。以 20 g/L 木糖为底物, 100 mM 的甲酸钠被该菌株完全利用, 其生物量和 L-乳酸产量分别提高了 35.40%和 233.88%, L-乳酸的化学纯度达到 98.9%。甲酸钠的添加提高了 KSJ316 菌株细胞内的 NADH、NAD⁺和 ATP 的水平。

关键词: 凝结芽孢杆菌; 木糖; 抑制物; 大肠杆菌; L-乳酸