

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620071151916

UDC_____

厦 门 大 学
硕 士 学 位 论 文

两株红树林链霉菌中甘露聚糖酶和木聚糖酶的分离纯化及酶学
性质研究

**Purification and characterization of mannanase and xylanase from
two *Streptomyces* isolated from mangrove**

康 磊

指导教师姓名: 肖湘 教授

徐俊 教授

专业名称: 微生物学

论文提交日期: 2009年 月

论文答辩时间: 2009年 月

学位授予日期: 2009年 月

答辩委员会主席: 教授

评 阅 人:

2009 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）：

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

目录	
摘要	I
Abstract	II
第一部分 红树林链霉 S6-204 甘露聚糖酶的分离纯化及酶学性质研究	1
第一章 前言	2
1.1 甘露聚糖	2
1.2 甘露聚糖酶研究现状	2
1.2.1 β -甘露聚糖酶的来源.....	3
1.2.2 β -甘露聚糖酶的理化性质.....	4
1.2.3 β -甘露聚糖酶的分离纯化.....	6
1.2.4 β -甘露聚糖酶的结构研究.....	7
1.2.5 β -甘露聚糖酶的分子生物学.....	8
1.2.6 β -甘露聚糖酶鉴定和测定方法.....	9
1.3 β-甘露聚糖酶的应用	9
1.3.1 β -甘露聚糖酶在测定多糖结构上的应用.....	9
1.3.2 β -甘露聚糖酶在造纸行业的应用.....	9
1.3.3 β -甘露聚糖酶在饲料行业的应用.....	9
1.3.4 β -甘露聚糖酶在食品和保健品行业的应用.....	10
1.3.5 β -甘露聚糖酶的其他应用.....	10
1.4 研究意义和内容	10
第二章 甘露聚糖酶的纯化	12
2.1 引言	12
2.2 材料	12
2.3 方法	16
2.4 结果与分析	20
2.4.1 硫酸铵盐析.....	20

2.4.2 DEAE-纤维素弱阴离子交换层析.....	21
2.4.3 凝胶过滤层析.....	22
2.4.4 Q-Sepharose 离子交换层析.....	23
2.4.5 SDS-PAGE 鉴定酶的纯度及测定酶的分子量.....	23
2.5 小结与讨论.....	26
第三章 甘露聚糖酶的性质研究.....	28
3.1 引言.....	28
3.2 材料.....	28
3.3 方法.....	28
3.4 结果与分析.....	29
3.4.1 甘露聚糖酶 1 和 2 的最适 pH 和 pH 稳定性.....	29
3.4.2 甘露聚糖酶 1 和 2 的最适温度和温度稳定性.....	30
3.5 小结与讨论.....	32
第二部分 红树林链霉菌 zxy19 木聚糖酶的分离纯化及酶学性质研究	34
第一章 前言.....	35
1.1 木聚糖.....	35
1.2 木聚糖酶研究现状.....	36
1.2.1 木聚糖的酶的分类.....	36
1.2.2 木聚糖酶的来源.....	37
1.2.3 木聚糖酶的理化性质.....	37
1.2.4 木聚糖酶的结构研究.....	38
1.2.5 木聚糖酶的分离纯化.....	39
1.2.6 木聚糖酶的测定.....	40
1.3 木聚糖酶的应用.....	41
1.3.1 木聚糖酶在纸浆造纸工业中的应用.....	41
1.3.2 木聚糖酶在食品行业中的应用.....	41
1.3.3 在饲料行业中的应用.....	42

1.4 研究意义和内容	42
第二章 木聚糖酶的纯化	43
2.1 引言	43
2.2 材料	43
2.3 方法	46
2.4 结果与分析	50
2.4.1 硫酸铵盐析	50
2.4.2 DEAE-纤维素弱阴离子交换层析	50
2.4.3 凝胶过滤层析	51
2.4.4 SDS-PAGE 鉴定酶的纯度及测定酶的分子量	52
2.5 小结与讨论	53
第三章 木聚糖酶的性质研究	54
3.1 引言	54
3.2 材料	54
3.3 方法	54
3.4 结果与分析	55
3.4.1 木聚糖酶的最适 pH 和 pH 稳定性	55
3.4.2 木聚糖酶的最适温度和温度稳定性	56
3.5 小结与讨论	57
参考文献	59
致谢	67

Contents

Chinese abstract	I
Abstract	II
Part1 purification and characterization of beta-mannases from <i>streptomyces S6-204</i> isolated from mangrove	1
1 Introduction	2
1.1 Mannan	2
1.2 Research situation of mannase	2
1.2.1 Sources of β -mannase	3
1.2.2 Physicochemical properties of β -mannase	4
1.2.3 Purification of β -mannase	6
1.2.4 Structure of β -mannase	7
1.2.5 Molecular biology of β -mannase	8
1.2.6 Method of identification and determination of β -mannase	9
1.3 Application of β-mannase	9
1.3.1 Application of β -mannase in measuring the structure of polysaccharide.....	9
1.3.2 Application of β -mannase in paper industry	9
1.3.3 Application of β -mannase in feed industry.....	9
1.3.4 Application of β -mannase in food and health products	10
1.3.5 Application of β -mannase in other industry	10
1.4 Significance and content of this thesis	10
2 Purification of mannase	12
2.1 Forward	12
2.2 Materials	12
2.3 Methods	16
2.4 Results and discussion	20
2.4.1 Ammonium sulfate precipitation	20

2.4.2 DEAE-cellulose ion exchange chromatography	21
2.4.3 Gel filtration chromatography.....	22
2.4.4 Q-Sepharose ion exchange chromatography.....	23
2.4.5 SDS-PAGE	23
2.5 Summary and discussion	26
3 Characterization of mannase.....	28
3.1 Forword	28
3.2 Materials.....	28
3.3 Methods.....	28
3.4 Results and discussion	29
3.4.1 Optimum pH and pH stability of mannase1 and mannase2.....	29
3.4.2 Optimum temperature and temperature stability of mannase1 and mannase2	30
3.5 Summary and discussion	32
Part2 Purification and characterization of a xylanase from streptomyces Zxy19 isolated from mangrove.....	34
1 Introduction.....	35
1.1 Xylanase.....	35
1.2 Research situation of Xylanase.....	36
1.2.1 Classification of xylanase	36
1.2.2 Sources of xylanase.....	37
1.2.3 Physicochemical properties of xylanase	37
1.2.4 Structure of xylanase.....	38
1.2.5 Purification of xylanase.....	39
1.2.5 Method of determination of xylanase.....	40
1.3 Application of xylanase	41
1.3.1 Xylanase application in paper industry.....	41
1.3.2 Xylanase application in food industry.....	41

1.3.3 Xylanase application in feed industry.....	42
1.4 Significance and content of this thesis.....	42
2 Purification of xylanase	43
2.1 Forword	43
2.2 Materials	43
2.3 Methods	46
2.4 Results and discussion	50
2.4.1 Ammonium sulfate precipitation	50
2.4.2 DEAE-cellulose ion exchange chromatography	50
2.4.3 Gel filtration chromatography.....	51
2.4.4 SDS-PAGE.....	52
2.5 Summary and discussion	53
3 Characterization of xylanase	54
3.1 Forword	54
3.2 Materials	54
3.3 Methods	54
3.4 Results and discussion	55
3.4.1 Results and discussion	55
3.4.2 Optimum temperature and temperature stability of xylanase.....	56
3.5 Summary and discussion	57
References	59
Acknowledgement	67

摘要

β -甘露聚糖酶是一类能够水解含有 β -1,4-D-甘露糖苷键的甘露寡糖、甘露多糖的水解内酯酶，木聚糖酶是一类能够特异降解木聚糖的酶类。目前甘露聚糖酶和木聚糖酶已被广泛应用于食品、医药、饲料、造纸、印染、纺织等领域。链霉菌S6-204和Zxy19是从红树林土壤中筛选到的，分别具有较好甘露聚糖酶活性和木聚糖酶活性的链霉菌。本文对链霉菌S6-204中甘露聚糖酶和链霉菌Zxy19中木聚糖酶进行了分离纯化并对纯酶组分的酶学性质进行了初步研究。

链霉菌S6-204发酵液离心去菌体，上清用硫酸铵盐析沉淀，重溶透析超滤浓缩，经DEAE-纤维素柱离子交换层析后，再分别经sephadex G75凝胶层析和Q-Sepharose离子交换层析，得到了SDS-PAGE电泳纯的甘露聚糖酶1和甘露聚糖酶2，用SDS-PAGE电泳测得其分子量分别为52.3KDa和54.3KDa。甘露聚糖酶1的最适PH为9.0，在pH4.5-10.5的范围内比较稳定，酶的相对活力残留都在85%以上；甘露聚糖酶1的最适应反应温度为55℃，在50℃以下的温度比较稳定。甘露聚糖酶2的最适pH为7.0，在pH6.0-9.6比较稳定，酶的相对活力残留都在94%以上；甘露聚糖酶2的最适反应温度为55℃，在45℃以下温度比较稳定。

链霉菌Zxy19发酵液离心去菌体，上清用硫酸铵盐析沉淀，重溶透析超滤浓缩，经DEAE-纤维素离子交换层析和sephadex G75凝胶层析后，得到了SDS-PAGE电泳纯的木聚糖酶，用SDS-PAGE电泳测得其分子量为21.2KDa。木聚糖酶的最适PH为8.0，在pH4-9的范围内，酶的相对活力都在90%以上，比较稳定；木聚糖酶1的最适反应温度为60℃，在60℃以下的温度比较稳定。

关键词： β -甘露聚糖酶，木聚糖酶，分离纯化，性质研究

Abstract

β -mannase is an enzyme that can hydrolyze β -1,4-D-manno-pyranosyl linkage of mannan oligosaccharide and mannan, xylanase is a kind of enzyme that is capable of hydrolyzing xylan. Now, mannase and xylanase have been apply in food industry , medicine industry, feed industry, paper industry, printing and dyeing industry, spin industry and other industry . *Streptomyces S6-204* and *Streptomyces Zxy19* were isolated from soil of mangrove, which can produce activity of extracellular β -mannase and activity of extracellular xylanase respectively. The main research contents of this thesis are about the purification and characterization of β -mannase of *Streptomyces S6-204* and xylanase of *Streptomyces Zxy19*.

The β -mannase was purified to SDS-PAGE homogeneity by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation , DEAE-cellulose ion exchange chromatography , sephadex G75 superfine gel filtration chromatography and Q-sepharose ion exchange chromatography. As a result we got two mannase,we call them as mannase1 and mannase2, each of two mannase was a single protein strip after SDS-PAGE. The molecular weight of the purified mannase1 was 52.3KDa, mannase2 was 54.3KDa.

The maximum enzyme activity of mannase1 existed at 55 $^{\circ}\text{C}$, the optimized pH of mannase1 was 9.0 ,and it was stable at pH4.6-10.6, below 50 $^{\circ}\text{C}$. The maximum enzyme activity of mannase2 existed at 55 $^{\circ}\text{C}$, the optimized pH of mannase2 was 7.0 , and it was stable at pH6.0-9.6,below 45 $^{\circ}\text{C}$.

The xylanase was purified to SDS-PAGE homogeneity by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ precipitation ,DEAE-cellulose ion exchange chromatography , sephadex G75 superfine gel filtration chromatography. As a result we got a xylanase which was a single protein strip after SDS-PAGE. The molecular weight of the purified xylanase was 21.2KDa.

The maximum enzyme activity of xylanase existed at 60 $^{\circ}\text{C}$, the optimized pH of xylanase was 8.0 , and it was stable at pH 4.0-9.0, below 60 $^{\circ}\text{C}$.

Keyword: β -mannase, xylanase, purification , characterization

第一部分 红树林链霉菌 S6-204 甘露聚糖酶的分离纯化及酶学性质研究

厦门大学博硕士论文摘要库

第一章 前言

1.1 甘露聚糖

甘露聚糖(Mannan)是一类通过 β -1,4-D-吡喃甘露糖苷键连结的线状多糖。如果主链的某些残基被葡萄糖取代,或半乳糖通过 α -1,6-糖苷键与甘露糖残基相连形成分枝,则称之为异甘露聚,主要有半乳甘露聚糖(galactomannan)、葡萄甘露聚糖(glucomannan)和半乳葡萄甘露聚糖(galactoglucommannan)^[1]。

甘露聚糖作为植物半纤维素的第二大组分,分布广泛,豆科植物种子的胚乳、一些植物胶(如瓜儿胶、角豆胶、田菁胶等)、椰肉粉、咖啡豆、凤凰木、银合欢等在其中都含有丰富的半乳甘露聚糖,在魔芋的球茎、澳大利亚蒲葵和独尾草等中含有大量的葡萄甘露聚糖。

甘露聚糖和异甘露聚糖由于来源和种类的不同,其单糖组成、糖苷链的连接和排步列方式、糖残基上的羟基取代情况都有差异,导致他们在溶解度、粘度等性质上有着明显的差异。表1是常见的高等植物来源的异甘露聚糖的主要糖基比例:

表1 几种常见甘露聚糖的结构特点^[2]

Tab. 1 Characteristics of the structure of mannans from different sources

主要成分	平均糖残基之比	连接方式
瓜胶多糖	Gal:Mna=1:2	
槐豆胶多糖	Gal:Mna=1:4	主链: β -1, 4-D-甘露糖链
刺云豆胶多糖	半乳甘露聚糖 Gal:Mna=1:3	
田菁胶多糖	聚糖 Gal:Mna=1:2	支链: β -1, 6-D-半乳糖
咖啡多糖	Gal:Mna=1:45	
香豆胶多糖	Gal:Mna=1:1	
椰子多糖	葡甘露聚糖 Gl:uMna=1:3.5	主链 β -1, 4-D-甘露糖链与 β -1, 4-D-葡萄
魔芋多糖	糖 Gl:uMna=1:1.6	糖链混连

1.2 甘露聚糖酶研究现状

β -1, 4-D-甘露聚糖酶 (β -1,4-D-mannan mannanohydrolase, EC.3.2.1.78) 又简

称为 β -D-甘露聚糖酶或 β -甘露聚糖酶(β -D-mannanase, β -mannanase),是一类能够水解含有 β -1,4-D-甘露糖苷键的甘露寡糖、甘露多糖(包括甘露聚糖、半乳甘露聚糖、葡甘聚糖等)的水解内酯酶,它属于半纤维素酶类^[3]。

根据底物的特异性和甘露聚糖酶对底物作用的特点,可将甘露聚糖酶和异甘露聚糖酶的 β -甘露聚糖酶分为三类:内切- β -甘露聚糖酶(β -mannanase;endo-1,4- β -D-mannanase;mannhydrolase;EC3.2.1.78),外切- β -甘露聚糖酶(Exo- β -D-mannanase)和 β -甘露聚糖苷酶(β -mannosidase;Ee3.2.1.25)^[4-6]。但是想要彻底降解甘露聚糖,还需要其它酶像甘露糖苷酶、半乳糖苷酶、葡萄糖苷酶、乙酰甘露聚糖脂酶等支链酶的协同作用^[7]。

1.2.1 β -甘露聚糖酶的来源

β -甘露聚糖酶广泛存在于自然界中,在一些低等动物的肠道分泌液中,豆类植物如四棱豆,瓜尔豆等萌发的种子中,魔芋的萌发球茎中都发现存在 β -甘露聚糖酶活性^[8,9]。而微生物,则更是产生 β -甘露聚糖酶的主要来源,表2列举了部分产生甘露聚糖酶的微生物。细菌^[10]、真菌^[11]、放线菌^[12]中都已经有了甘露聚糖酶的分离,微生物来源的 β -甘露聚糖酶具有活力高、成本低、来源稳定、提取方便等明显优点,已在实际生产和基础研究中得到广泛应用。

表2 一些产生 β -甘露聚糖酶的微生物

Table 2 Some microbes that can produce mannanase

中文名拉丁名	中文名拉丁名
产气杆菌 <i>Aeromonas sp.</i>	索孢壳菌 <i>Thielavia terrestris</i>
溜曲霉 <i>Aspergillus tamarii</i>	棘孢曲霉 <i>Aspergillus acuseatus</i>
蜡状芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i>	黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>
芽孢杆菌 <i>Bacillus sp.</i>	地衣芽孢杆菌 <i>Bacillus licheniformis</i>
短小芽孢杆菌 <i>Bacillus pnmilus</i>	嗜热脂肪芽孢杆菌 <i>Bacillus sterothermophilus</i>
多粘芽孢杆菌 <i>Bacillus polymyxa</i>	枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i>
卵型拟杆菌 <i>Bacteroides ovatus</i>	短芽孢杆菌 <i>Bacillus brevis</i>
肠球菌 <i>Enterococcus carseliflarus</i>	变色多孔菌 <i>Polyporus ressicolor</i>
齐整小核菌 <i>Sclerotium rolfsii</i>	栖热孢菌 <i>Thermotoga heapolitae</i>

雪白根霉 *Rhizopus niveus*浅青紫链霉菌 *Streptomyces lividans*

1.2.2 β -甘露聚糖酶的理化性质

来源的不同 β -甘露聚糖酶的理化性质会有很大差异。不同来源的 β -甘露聚糖酶的分子量、等电点、pH和温度作用范围、酶动力学常数、底物专一性等都有一定的差异。微生物在自然界中是 β -甘露聚糖酶的主要来源，表3列举了部分微生物来源的甘露聚糖酶的性质。

表 3 一些微生物来源的 β -甘露聚糖酶性质

Tab. 3 Properties of some microbial mannase

strain	MW(kD)	Temperature	pH	pI	Reference
<i>Aeromonas</i> sp.F-25	64	45	6.0	5.9	[13]
<i>Bacillus</i> sp. M50	--	50	6.0	--	[14]
<i>Streptomyces ipomoea</i> CECT 3341	40	55	7.5	4	[15]
<i>Aspergillus aculeatus</i> MRC11624	45	50	4.0-6.0	--	[16]
<i>Thermotoga neapolitna</i> 506888	92	90	7.0	--	[17]
<i>Thermotoga maritime</i>	76	90	7.0	--	[17]
<i>Flavobacterium</i> sp		35	--	--	[18]
<i>Dictyogolmus themophilum</i> Rt46B.1	40	80	5.0	--	[19]
<i>Aspergillus oryzae</i> NRRL3488	--	55	6.0	--	[20]
<i>Nocardioform actinomycetes</i> NA3-540	41	75	8.0	4.8	[21]
<i>Rhodothermus marimus</i> ATCC43812	113	85	5.4	--	[22]
<i>Bacillus subtilis</i> BM9602	35	50	5.8	4.5	[23]
<i>Bacillus stearothermophilus</i>	73	70	6.5	--	[24]
<i>Vibrio</i> sp.Srtain MA-138	49	40	6.5	3.8	[25]
<i>Aspergillus aculeatus</i>	45	60-70	4.5	4.5	[26]
<i>Bacillus</i> sp.AM001	42-58	60	7.0-9.0	5.1-5.9	[27]
<i>Bacillus</i> sp.N16-5	70	70	9.5	4.3	[28]

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.

厦门大学博硕士论文摘要库