

# The Studies on the Production of Antimicrobial Chitinase by *Monascus* sp. Using Shrimp and Crab shell as a Carbon source

蕭惟仁、王三郎

E-mail: 9020254@mail.dyu.edu.tw

## ABSTRACT

This thesis is a study of the utilization of shrimp shell wastes by *Monascus* spp. to produce antifungal substance. The purification and characterization of fungicides were described. By resulting, we choose *Monascus* 31499 as the fungicide producer. That inhibitory activity (0.35U/ml) for *Fusarium oxysporum* was obtained when the strain was grown aerobically in a medium consisting of 1% shrimp shell wastes, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.001% FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.3% NaNO<sub>3</sub>, 0.05% KCl, 0.1% yeast extract and 0.1% poly-peptone in 100ml medium at 25 °C (pH 7) for 4 days. Besides *Fusarium oxysporum*, it can also to fight the *Lactobacillus acidophilus* CCRC 10695, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* CCRC 10699, *Pseudomonas aeruginosa* M1001 and *Bacillus subtilis* W113. The fungicide was stable at pH from 6 to 8, but was not stable at 100 °C. The culture supernatant was tested for hyphal growth, it caused abnormal hyphal swelling on the tip of *Fusarium oxysporum*. However, the optimum pH was 7 and optimum temperature was 40 degree C. The fungicide was purified from the culture supernatant of *Monascus* 31499 by ammonium sulfate fractionation and DEAE Sepharose CL-6B column chromatography. The purified enzyme was estimated to be 81kDa by SDS-PAGE have molecular weight. It showed chitinase activity and antifungal activity. It 's found to be an acidic protein with pI at 5.4. The optimum pH for enzymatic activity was approx.7 and the optimum temperature was 40 degree C. The enzyme was stable at pH from 6 to 9 and 100 °C thermal stability for inhibition times less than 3 min. The activity of chitinase and protease was activated by Fe<sup>2+</sup>, but strongly inhibited by Hg<sup>2+</sup> and Acetone.

Keywords : fungicide ; chitinase ; protease ; shrimp and crab shell powder ; *Monascus* spp.

## Table of Contents

目錄封面內頁簽名頁授權書 iii	中文摘要 iv	英文摘要 vi	誌謝.....viii	目錄
ix	圖目錄 xvi	表目錄.....xviii	第一章 緒言 1	第二章 文獻回顧 3
2.1 紅麴的分類 3	2.1.1 紅麴的應用 3	2.1.2 紅麴抗菌之相關文獻 7	2.2 水產廢棄物；蝦蟹殼廢棄物之利用 10	2.3 幾丁質? 13
2.4 植物病原真菌 - 鐮孢菌屬 ( <i>Fusarium</i> spp.) 14	2.5 生物製劑-植物病原真菌抑制劑 16	第三章 <i>Monascus</i> sp. 真菌抑制劑生產條件之探討及應用 20	3.1 實驗材料與方法 20	3.1.1 材料 20
3.1.2 藥品 20	3.2 實驗方法 21	3.2.1 材料來源 21	3.2.2 菌株之活化及保存 21	3.2.3 樣品製備 22
3.2.4 生物分析法 (Bioassay) 22	3.3 真菌抑制劑生產條件之探討 23	3.3.1 前言 23	3.3.2 Sucrose 的影響 23	3.3.3 Sucrose 添加碳源的影響 24
3.3.4 咖啡渣的影響 24	3.3.5 培養時間 24	3.3.6 培養液體積 25	3.3.7 培養溫度 25	3.3.8 基礎培養基酸鹼值 25
3.4 抗菌活性之測定 25	3.4.1 測試菌株 25	3.4.2 樣品製備 26	3.4.3 細菌之抑制活性分析-血清盤空白紙錠之抑制測定 27	3.4.4 真菌之抑制活性分析 27
3.5 油菜芽苗疾病分析 27	3.5.1 油菜芽苗之預培養 27	3.5.2 樣品製備 28	3.5.3 測試菌株孢子液的製備 28	3.5.4 油菜芽苗疾病之分析 28
3.6 應用實驗-空心菜及小白菜之生長情形 29	3.6.1 空心菜及小白菜芽苗之預培養 29	3.6.2 樣品製備 29	3.6.3 空心菜及小白菜之栽培 29	3.7 結果與討論 31
3.7.1 Sucrose、Sucrose 添加碳源以及咖啡渣的影響 31	3.7.2 培養時間的影響 36	3.7.3 培養液的體積影響 36	3.7.4 培養溫度的影響 37	3.7.5 基礎培養基酸鹼值的影響 37
3.8 <i>Monascus</i> 31499 真菌抑制劑之較適生產條件 43	3.9 <i>Monascus</i> 31499 真菌抑制劑對各種微生物之抑制活性.43	3.10 油菜芽苗疾病分析 44	3.11 應用實驗-空心菜之生長情形及小白菜 47	3.12 綜合討論 54
第四章 <i>Monascus</i> sp. 之真菌抑制劑性質之探討 56	4.1 藥品 56	4.2 材料 56	4.3 粗真菌抑制劑性質之探討 56	4.3.1 粗真菌抑制劑於不同 pH 之穩定性探討 56
4.3.2 粗真菌抑制劑於 100 °C 之熱穩定性探討 57	4.4 粗真菌抑制劑針對不同基質活性之探討 57	4.4.1 懸浮態幾丁質 (Colloidal chitin) 之製備 57	4.4.2 幾丁質分解? (chitinase) 活性測定之呈色劑 58	4.4.3 幾丁質分解? (chitinase) 活性之測定 58
4.4.4 溶菌??(lysozyme) 活性測定之基質 59	4.4.5 溶菌??(lysozyme) 活性之測定 59	4.4.6 乙二醇幾丁質? (ethylene glycol chitinase, EGCase) 活性之測定 60	4.4.7 蛋白質? 活性之測定 60	4.4.8 纖維素分解酵素活性之測定 60
4.4.9 木聚醣分解酵素活性之測定 61	4.4.10 -N-乙醯葡萄糖胺酵素活性之測 61	4.5 真菌抑制劑生物活性測定 62	4.5.1 樣品製備 62	4.5.2 測試菌株孢子液的製備 62
4.5.3 <i>Monascus</i> 31499 真菌抑制劑之抑制實驗 62	4.5.4 <i>Monascus</i> 31499 真菌抑制劑之最小抑制濃度實驗 62	4.5.5 <i>Monascus</i> 31499 真菌抑制劑之抑制作用探討 63	4.5.6 <i>Monascus</i> 31499 真菌抑制劑儲藏溫度與時間之影響 63	4.5.7 <i>Monascus</i> 31499 不同培養天數產生之抑制活性與酵素 活性之影響 63
4.5.8 <i>Monascus</i> 31499 之最適反應溫度測定 64	4.5.9 <i>Monascus</i> 31499 之最適反應 pH 測定 64	4.6 結果與討論 64	4.6.1 粗真菌抑制劑於不同 pH 之穩定性探討 64	4.6.2 粗真菌抑制劑於 100 °C 之熱穩定性探討 65
4.6.3 酵素活性之測定 65	4.6.4 <i>Monascus</i> 真菌抑制劑之最小抑制濃度實驗 66	4.6.5 <i>Monascus</i> 真菌抑制劑之抑制作用機制探討 67	4.6.6	

Monascus真菌抑制劑儲藏溫度與時間之影響 68 4.6.7 Monascus 31499不同培養天數產生之抑制活性與酵素活性之影響 68  
4.6.8 Monascus 31499之最適反應溫度測定 68 4.6.9 Monascus 31499之最適反應pH測定 68 4.6.7 綜合討論 76 第五章  
Monascus purpureus 31499真菌抑制劑之純與分離.78 5.1 實驗材料與方法 78 5.1.1 藥品 78 5.1.2 材料 78 5.2 真菌抑制劑之純  
化分離 79 5.2.1 大量培養、離心 79 5.2.2 硫酸銨沈澱 79 5.2.3 DEAE Sepharose CL-6B 陰離子層析法 79 5.2.4 分子量標定與  
膠體 (Sephacryl S-200) 過濾層析法.80 5.3 酵素對不同基質之活性測定 80 5.3.1 幾丁質分解? (chitinase) 活性之測定 80 5.3.2  
溶菌??(lysozyme) 活性之測定 80 5.3.3 乙二醇幾丁質? (EGCase)活性之測定 80 5.3.4 蛋白質?活性之測定 81 5.3.5 纖維素分解  
酵素活性之測定 81 5.3.6木聚醣分解酵素活性之測定 81 5.3.7 -N-乙醯葡萄糖胺酵素活性之測定 81 5.3.8酵素對Fusarium  
oxysporum之最小抑制濃度實驗 81 5.3.9 金屬離子及抑制劑對酵素活性之影響 81 5.3.10 酵素之最適反應溫度測定 82 5.3.11  
酵素之最適反應pH測定 82 5.4 酵素生化性質之探討 82 5.4.1 胺基酸分析 82 5.4.2 電泳分析 (SDS--PAGE) 測定分子量 83  
5.4.3 蛋白質順序之測定 83 5.4.4 等電點之測定 83 5.4.5 分離後真菌抑制劑於100 之熱穩定性測試 84 5.4.6 分離後真菌抑制  
劑於不同pH 之穩定性測試 84 5.4.7 H2SO4 - Phenol 法 -- 測總糖量 84 5.4.8 載玻片發芽法 84 5.5結果與討論 85 5.5.1粗酵素液  
的製備 85 5.5.2 離子交換管柱層析法 85 5.5.3 分子量標定與膠體 (Sephacryl S-200) 過濾層析法.86 5.5.4 酵素對不同基質之  
活性測定 86 5.5.5 酵素之純化概要 91 5.5.6 金屬離子及抑制劑對酵素活性之影響 91 5.5.7 酵素之最適反應溫度測定 91 5.5.8  
酵素之最適反應pH值測定 91 5.5.9 胺基酸分析 92 5.5.10 酵素之分子量分析 92 5.5.11 蛋白質順序之測定 92 5.5.12 等電點分  
析 92 5.5.13分離後真菌抑制劑於100 之熱穩定性探討 92 5.5.14分離後真菌抑制劑於不同pH值之穩定性探討 93 5.5.15  
H2SO4 - Phenol 法 -- 測總糖量 102 5.5.16載玻片發芽法 102 5.5.17 綜合討論 103 第六章 結論 105 參考文獻 108 圖目錄 第三  
章 Monascus sp.真菌抑制劑生產條件之探討及應用 圖3.1 添加不同含量sucrose對抑制率的影響 33 圖3.2 3g sucroe+1g 碳源對  
抑制率的影響 33 圖3.3 1.5g sucroe+1g 碳源對抑制率的影響 34 圖3.4 不含sucrose只添加1g 碳源對抑制率的影響 34 圖3.5 咖  
啡渣1g與咖啡渣0.5g+SCSP0.5g對抑制率的影響 35 圖3.6 不同培養天數對抑制率的影響 39 圖3.7 不同培養體積對抑制率的  
影響 40 圖3.8 不同培養溫度對抑制率的影響 41 圖3.9 不同基礎培養基酸鹼值對抑制率的影響 42 圖3.10 Monascus 31499真菌  
抑制劑對油菜苗重量影響 49 圖3.11 Monascus 31499真菌抑制劑對油菜苗長度影響 50 圖3.12 Monascus 31499真菌抑制劑對  
空心菜苗長度影響 52 圖3.13 Monascus 31499真菌抑制劑對小白菜苗長度影響 52 圖3.14 Monascus 31499真菌抑制劑對空心  
菜苗重量影響 53 圖3.15 Monascus 31499真菌抑制劑對小白菜苗重量影響 53 第四章 Monascus sp.之真菌抑制劑性質之探討  
圖4.1 Monascus所生產之真菌抑制劑不同pH之穩定性探討 69 圖4.2 Monascus所生產之真菌抑制劑不同時間加熱100 之穩  
定性探討 69 圖4.3 Monascus所生產之真菌抑制劑之最小抑制濃度探討.70 圖4.4 液態培養時對照組Fusarium oxysporum生長  
情形 ( - 1  $\mu$ m ; 400倍) 71 圖4.5 液態培養時添加真菌劑對Fusarium oxysporum影響 ..71 圖4.6 液態培養時添加真菌劑  
對Fusarium oxysporum影響 ..72 圖4.7 Monascus sp.所生產之真菌抑制劑儲藏溫度 (25 ) 與 時間之影響 73 圖4.8 Monascus  
sp.所生產之真菌抑制劑儲藏溫度 (4 ) 與 時間之影響 73 圖4.9 Monascus 31499不同培養天數產生之抑制活性與酵素活  
性之影響 74 圖4.10 酵素之最適反應溫度 75 圖4.11 酵素之最適反應pH 7 75 第五章 Monascus purpureus 31499真菌抑制劑之純  
化分離 圖5.1 Monascus purpureus 31499真菌抑制劑之純化圖 88 圖5.2 DEAE-Sepharose CL-6B之 真菌抑制劑層析圖 89 圖5.3  
Sephacryl (S-200)過濾層析圖 90 圖5.4 酵素之最適反應溫度 (pH 7) 97 圖5.5 酵素之最適反應pH值 (37 ) 97 圖5.6酵素  
之SDS-PAGE 98 圖5.7 純化後之真菌抑制劑等電點層析圖 99 圖5.8 真菌抑制劑純化前後之100 熱安定性 (pH 7) 100  
圖5.9 真菌抑制劑純化前後之pH安定性 (37 ) 101 表目錄 第二章 文獻回顧 表2.1 Monascus spp.高附加價值之應用實施例  
9 表2.2 蝦蟹殼廢棄物所含高附加價值之應用之實施例 12 表2.3 拮抗微生物之種類與其防治機制 19 第三章 Monascus sp.真  
菌抑制劑生產條件之探討及應用 表3.1 紅麴菌株最適培養條件一覽表 30 表3.2 Monascus 31499真菌抑制劑對各種微生物抗  
菌活性.45 表3.3 真菌抑制劑對油菜苗生長之重量及長度的影響 51 第四章 Monascus sp.之真菌抑制劑性質之探討 表4.1  
Monascus 31499生產之真菌抑制劑於不同基質活性 66 第五章 Monascus purpureus 31499真菌抑制劑之純與分離 表5.1  
Monascus 31499所生產酵素於不同基質之活性 87 表5.2 Monascus purpureus 31499真菌抑制劑之純化概要.94 表5.3 各種基質  
對酵素活性之影響 95 表5.4 酵素之胺基酸組成 96 表5.5 稀釋不同濃度之分離純化後真菌劑對孢子之影響 102

## REFERENCES

1. 王三郎著 (1996) 水產資源利用學, 高立圖書出版社.
2. 王三郎 (1994) 應用微生物學, 高立圖書出版社.
3. 王三郎 (1991) 生物工學入門, 藝軒圖書出版社.
4. 王啟浩 (1999) 利用細菌發酵農水產廢棄物生產生物製劑之研究, 私立大葉大學食品工程研究所碩士論文.
5. 呂明洲 (1994) Pseudomonas aeruginosa K-187所生產幾丁質分解酵素之探討, 私立大葉工學院食品工程研究所碩士論文.
6. 阮進惠, 林翰良, 羅淑珍 (1997) 幾丁聚醣水解物之連續式生產及其抑菌作用, 中國農業化學會誌. 35(6):596-611.
7. 邱少華 (1997) 利用綠膿桿菌K-187發酵蝦蟹殼廢棄物生產幾丁質西每之應用及量產條件之研究, 私立大葉工學院食品工程研究所碩士論文.
8. 林茂勇 (1996) 黴菌毒素學. 淑馨出版社.
9. 陳勁初 (1995) 抗真菌之食品添加物, 食品工業. 28 (9) : 24-30.
10. 陳幸臣 許嘉珍 (1997) 以微生物分解蝦蟹殼製取幾丁質與其部分去乙醯化, 中國農業化學會誌. 35 (3):342-353.
11. 黃秀文 (1995) 黴菌快速檢測之發展及其在食品工業上之應用. 食品工業. 28(5):23-31
12. 張文智 (1996) 蝦蟹加工廢棄物回收與再利用, 私立大葉工學院食品工程研究所碩士論文.
13. 梁瑞麟 (1994) 放線菌Strptomyces actuosus A-151及霉菌Aspergillus fumigatus G-393所產纖維素酵素和木聚醣酵素之研究, 私立大葉工學院食品工程研究所碩士論文.
14. 葉志超 (1996) 利用綠膿桿菌發酵蝦蟹殼廢棄物生產真菌抑制劑之研究, 私立大葉工學院食品工程研究所碩士論文.
15. 劉英俊, 汪金追 (1987) 酵素工程, 中央圖書出版社.
16. 蘇文慧 (1998) 幾丁聚醣之抑菌作用及其在食品保存上的應用. 國立臺灣海洋大學水產食品科學系碩士學位論文.
17. 戴佛

香著 (1984) 微生物學, 臺灣商務印書館 18. Long-chain fatty acids from *Monascus purpureus*. 1996 Juzlova-P; Rezanka-T; Martinkova-L; Kren-V 19. Purification and partial characterization of an antigen specific to *Lactobacillus brevis* strains with beer spoilage activity. 1997. Yasui-T; Yoda-K 20. Bough, W. A. and Landes, D. R. ( 1977 ) Recovery and Nutritional evaluation of proteinaceous solid separation from whey by coagulation with chitosan. *J. Dairy Sci.* , 59:1874-1876. 21. Bassler, B. L. , Yu, C. , Lee, A. M. and Roseman, S. ( 1991 ) Chitin utilization by marine bacteria, degradation and catabolism of chitin oligosacchides by *Vibrio funisii*. *J. Bio. Chem.* , 266:24276-24281. 22. Carroad, D. A. and Tom, R. A. ( 1978 ) Bioconversion of shell- fish chitin waste: process conception and selection of microorganism. *J. Food Sci.* , 43:1158-1164. 23. Chung-Saint Lin, Hsing-Chen Chen, and Fu-Pang Lin (1997) Expression and characterization of the recombinant gene encoding chitinase from *Aeromonas caviae*. *Enzyme and microbial technology.*, 21:472-478. 24. Cosio, I. G. , Fisher, R. A. and Carroad, D. A. ( 1982 ) Bio-conversion of shellfish chitin waste:waste pretreatment, enzyme production, process design, and economic analysis. *J. Food Sci.* , 47:901-905. 25. Deshpande, M. V. ( 1986 ) Enzymatic degradation of chitin & its biological application. *J. Sci. & Ind. Res.* , 45:273-277. 26. Fenton, D.M. and Eveleigh, D. E. ( 1981 ) Purification and mode of action of a chitosanase from *Penicillium I*. 27. Antagonistic bacteria associated with the fruit skin of banana in controlling its postharvest diseases. 1998. Costa-DM-de; Subasinghe-SSNS 28. Knorr, D. ( 1984 ) Use of chitinous polymer in food. *Food Technol.* , 1:85-89. 29. Logrieco A., Moretti A., Castella G., Kosteci M., Golinski P., Ritiene A., and Chelkowski J. (1998) Beauvericin production by *Fusarium* species. *Applied and environmental microbiology.*, 64:3084-3088. 30. Mette Neienham Nielsen, Johannes Fels, and Hans Christian Pedersen (1998) Secondary metabolite and endochitinase dependent antagonism toward plant-pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* from sugar beet rhizosphere. *Applied and environmental microbiology.*, 64:3563-3569. 31. Sensitivity to thiabendazole in *Fusarium* species associated with dry rot of potato. 1996 . Hanson-LE; Schwager-SJ; Loria-R 32. Masahiro Samejima, Junji Sugiyama, Kiyohiko Igarashi. (1998) Enzymatic hydrolysis of bacterial cellulose. *Carbohydrate research* 305:281-288. 33. S. L. Wang, L. G. Chen, C. S. Chen, and L. F. Chen (1994) Cellulase and xylanase production by *Aspergillus* sp. G-393. *Applied biochemistry and biotechnology.* 45:655-662. 34. Shimahara, K. and Takiguchi, Y. ( 1988 ) Preparation of crustacean chitin. *Methods in enzymology.* , 161:417-423. 35. Tanley, W. L. , Watters, G. G. , Chan, B. G. and Marcer, J. M. ( 1975 ) Lactose and other enzymes bound to chitin with glut-aldehyde. *Biotech. and Bioeng.* , 17:315-319. 36. Yedidia I., Benhamou N., and Chet I. (1999) Induction of defense responses in cucumber plants(*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied and environmental microbiology.*, 65:1061-1070. 37. Purification, characterization and antifungal properties of a lipid-transfer protein from sunflower (*Helianthus annuus*) seeds. 2000 .Regente-MC; Canal-L-de-la 38. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. 1996. Zambonelli-A; Zechini-D''''Aulerio-A; Bianchi-A; Albasini-A 39. Production of antifungal substance by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CHD-28.3. 1996 .Utpal-Roy; Batish-VK; Grover-S; Neelakantan-S 40. Effect of spice extract on fungal inhibition. 1996. Thyagaraja-N; Hosono-A 41. Molecular cloning, structural analysis, and expression in *Escherichia coli* of a chitinase gene from *Enterobacter agglomerans*. 1997. Chernin-LS; Fuente-L-de-la; Sobolev-V; Haran-S; Vorgias-CE; Oppenheim-AB; Chet-I 42. Antimicrobial activity of *Pseudomonas* spp. against food poisoning bacteria and moulds. 1996. Laine-MH; Karwoski-MT; Raaska-LB; Mattila-Sandholm-TM 43. Structures of antafumicins A and B, novel antifungal substances produced by the fungus *Aspergillus niger* NH-401. 1993. Fujimoto-Y; Miyagawa-H; Tsurushima-T; Irie-H; Okamura-K; Ueno-T 44. Antifungal proteins from plants. Purification, molecular cloning, and antifungal properties of chitinases from maize seed. 1992 .Huynh-QK; Hironaka-CM; Levine-EB; Smith-CE; Borgmeyer-JR; Shah-DM 45. Chitinases of *Streptomyces olivaceoviridis* and significance of processing for multiplicity. 1992 , Romaguera-A; Menge-U; Breves-R; Diekmann-H