

pseudomonas fluorescens k-188 所生產微生物抑制物質之研究

曾國權、王三郎

E-mail: 9125214@mail.dyu.edu.tw

摘要

本研究乃係探討自土壤中篩選出可利用蝦蟹殼廢棄物為營養源，生產植物病原菌抑制物，同時不會抑制黑殭菌生長之細菌 *Pseudomonas fluorescens* K-188。最適生產條件為：1% 蝦蟹殼粉、0.1% K_2HPO_4 、0.05% $MgSO_4 \times 7H_2O$ 在 250mL 錐形瓶中填充 200mL 體積之培養基，於 pH 7、37 振盪培養 4 天，針對抑制 *Fusarium oxysporum*，可得最大之抑制活性，同時對 *Fusarium solani*、*Trichoderma harzianum*、*Pythium ultimum* 等亦具抑菌活性。蝦蟹殼粉經酸鹼處理後的廢水或固形物亦可用來作為營養源。抑菌成分之萃取係以酒精沉澱較硫酸銨佳。所得抗菌物質於 100 加熱 10 分鐘後仍可保留近七成活性，於 pH 值 7~9 之間活性最佳，然 pH 若低於 6 則其抗菌活性降至三成以下。同時分析其抑菌活性來源發現可由菌體本身與其發酵生成物同時提供，因此可將菌體以幾丁聚醣包覆的方式，製成固定化顆粒，以方便發酵利用。固定後之顆粒可於低溫下保存超過一個月以上，而其重複發酵使用次數亦可達十次以上。在其經酒精濃縮後的物質中也同時分析出蛋白質活性，此一活性對熱穩定性不佳，在 pH 值 6~9 的環境中穩定，最適作用 pH 值為 7~9。

關鍵詞：真菌抑制劑；蝦蟹殼粉；蛋白質；#37238

目錄

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|------|----|------|---|----|----|----|-----|-----|------|-----|----|--------|---|----------|---|--------|---|-----------------|---|---------------|---|--------------------------------------|---|----------|----|-----------------|----|----------------|----|-------------------|----|-------------------|----|---------------|----|-----------------|----|-----------------|----|------------------|----|------------------|----|-----------------|----|--------|----|-----------|----|----------|----|-----------|----|------------|----|------------|----|-------------|----|--------|----|---|----|--------|----|-------------|----|----------|----|----------|----|----------|----|------------|----|-------------|----|---|----|----------|----|----------|----|------------|----|-------------|----|------------|----|----------------|----|-----------|----|---------------------|----|---------------|----|---------------|----|------------------------------|----|---------------|----|--------------|----|--------|----|---|----|--------|----|--------|----|--------|----|----------------|----|--------------------|----|--------------------------|----|--------------------------|----|----------------------|----|-----------------|----|-------------------|----|----------------|----|------------------|----|----------------|----|----------------|----|-----------------|----|------------|----|------------------|----|---|----|---|----|-----------|----|--------------------|----|--------------------------|----|--------------------------|----|---------------|----|---|----|--------|----|-------------------------|----|--------|----|-------------|----|------------|----|-------------|----|--------------|----|---------------|----|-------------|----|------------|----|------------|----|----------------|----|--------------------------------|----|-----------|----|------------|----|---------------------|----|-----------------------|----|--------------------|----|--------|----|--|----|--------|----|--------|----|--------|----|--------------|----|----------------|----|--------------|----|----------------|----|-----------|----|----------------|----|--------------|----|----------------|----|--------|----|------|----|-----|--------------------|----|--------------------|----|--------------------------|----|---|----|--|----|---|----|---|----|--|----|---|----|-------------------|----|---|----|-------|--|
| 封面內頁 | 簽名頁 | 授權書 | iii | 中文摘要 | iv | 英文摘要 | v | 誌謝 | vi | 目錄 | vii | 圖目錄 | xiii | 表目錄 | xv | 第一章 緒言 | 1 | 第二章 文獻回顧 | 3 | 2.1 前言 | 3 | 2.2 水產廢棄物之回收再利用 | 5 | 2.3 化學性與生物性農藥 | 8 | 2.4 植物病原真菌 <i>Fusarium oxysporum</i> | 9 | 2.4.1 病徵 | 10 | 2.4.2 病害發生與病害環境 | 11 | 2.5 真菌抑制劑的作用機制 | 12 | 2.5.1 抑制孢子發芽與芽管延長 | 12 | 2.5.2 藉由菌絲膨大的抑制作用 | 14 | 2.5.3 菌絲的溶解作用 | 15 | 2.5.4 營養物質的競爭作用 | 16 | 2.5.5 誘發植物的生理抗性 | 16 | 2.6 生物防治在植物病害之應用 | 17 | 2.6.1 生物防治之微生物應用 | 19 | 第三章 真菌抑制劑生產菌之選定 | 30 | 3.1 前言 | 30 | 3.2 材料與藥品 | 31 | 3.3 實驗方式 | 31 | 3.4 結果與討論 | 31 | 3.4.1 對置培養 | 32 | 3.4.2 混合培養 | 32 | 3.4.3 產孢量比較 | 33 | 3.5 結論 | 35 | 第四章 <i>Pseudomonas fluorescens</i> K-188 真菌抑制劑生產條件之探討 | 36 | 4.1 前言 | 36 | 4.2 實驗材料與方法 | 36 | 4.2.1 材料 | 36 | 4.2.2 藥品 | 36 | 4.3 實驗方法 | 36 | 4.3.1 樣品製備 | 37 | 4.3.2 生物分析法 | 37 | 4.4 <i>Pseudomonas fluorescens</i> K-188 之真菌抑制劑生產條件探討 | 38 | 4.4.1 前言 | 38 | 4.4.2 碳源 | 38 | 4.4.3 培養時間 | 39 | 4.4.4 培養液體積 | 39 | 4.4.5 培養溫度 | 39 | 4.4.6 基礎培養基酸鹼值 | 39 | 4.5 結果與討論 | 39 | 4.5.1 不同碳源種類與不同碳源濃度 | 39 | 4.5.2 不同培養液體積 | 40 | 4.5.3 蝦蟹殼粉添加量 | 41 | 4.5.4 不同濃度及不同處理方式的 SCSP 及上清液 | 42 | 4.5.5 培養溫度及時間 | 43 | 4.5.6 培養基酸鹼值 | 44 | 4.6 結論 | 46 | 第五章 <i>Pseudomonas fluorescens</i> K-188 所生產真菌抑制劑性質、基質特異性及生物活性之探討 | 50 | 5.1 前言 | 50 | 5.2 藥品 | 50 | 5.3 材料 | 51 | 5.4 真菌抑制劑性質之探討 | 51 | 5.4.1 菌株生長對抑制活性之探討 | 51 | 5.4.2 真菌抑制劑於不同 pH 之穩定性探討 | 51 | 5.4.3 真菌抑制劑於 100 之熱穩定性探討 | 52 | 5.5 真菌抑制劑針對不同基質之活性測定 | 52 | 5.5.1 懸浮態幾丁質之製備 | 52 | 5.5.2 幾丁質活性測定之呈色劑 | 53 | 5.5.3 幾丁質活性之測定 | 53 | 5.5.4 乙二醇幾丁質活性測定 | 53 | 5.5.5 幾丁聚醣活性測定 | 54 | 5.5.6 蛋白質活性之測定 | 54 | 5.6 真菌抑制劑生物活性測定 | 55 | 5.6.1 樣品製備 | 55 | 5.6.2 測試菌株孢子液的製備 | 55 | 5.6.3 <i>Pseudomonas fluorescens</i> K-188 真菌抑制劑之抑制實驗 | 56 | 5.6.4 <i>Pseudomonas fluorescens</i> K-188 真菌抑制劑抑制作用之探討 | 56 | 5.7 結果與討論 | 57 | 5.7.1 菌株生長對抑制活性之探討 | 57 | 5.7.2 真菌抑制劑於不同 pH 之穩定性探討 | 58 | 5.7.3 真菌抑制劑於 100 之熱穩定性探討 | 59 | 5.7.4 酵素活性之測定 | 60 | 5.7.5 <i>Pseudomonas fluorescens</i> K-188 真菌抑制劑之作用機制 | 60 | 5.8 結論 | 63 | 第六章 K-188 真菌抑制劑之濃縮與性質探討 | 64 | 6.1 前言 | 64 | 6.2 實驗材料與方法 | 64 | 6.2.1 化學材料 | 64 | 6.2.2 微生物材料 | 64 | 6.3 真菌抑制劑之濃縮 | 65 | 6.3.1 大量培養及離心 | 65 | 6.3.2 硫酸銨沉澱 | 65 | 6.3.3 酒精沉澱 | 65 | 6.3.4 抑菌實驗 | 66 | 6.4 濃縮後酵素活性之測定 | 66 | 6.5 濃縮後酵素活性對熱及酸鹼值之穩定性及其最適作用酸鹼值 | 67 | 6.6 結果與討論 | 67 | 6.6.1 濃縮方式 | 67 | 6.6.2 濃縮後酵素活性對熱之穩定性 | 68 | 6.6.3 濃縮後酵素活性對酸鹼值之穩定性 | 68 | 6.6.4 濃縮後酵素最適作用酸鹼值 | 68 | 6.7 結論 | 72 | 第七章 幾丁聚醣擔體進行 <i>Pseudomonas fluorescens</i> K-188 固定化之探討 | 73 | 7.1 前言 | 73 | 7.2 藥品 | 73 | 7.3 材料 | 73 | 7.4 固定化菌體之探討 | 74 | 7.4.1 固定擔體成分比較 | 74 | 7.4.2 保存方式比較 | 74 | 7.4.3 批次重複發酵實驗 | 74 | 7.5 結果與討論 | 74 | 7.5.1 固定擔體成分比較 | 74 | 7.5.2 保存方式比較 | 75 | 7.5.3 批次重複發酵實驗 | 76 | 第八章 結論 | 78 | 參考文獻 | 80 | 圖目錄 | 圖 3.1 不同菌株與黑殭菌對置培養 | 32 | 圖 3.2 不同菌株與黑殭菌混合培養 | 33 | 圖 3.3 混合培養與黑殭菌單獨培養產孢量比較圖 | 34 | 圖 4.1 不同碳源及不同濃度下對 <i>Pseudomonas fluorescens</i> K-188 生產真菌抑制劑之影響 | 40 | 圖 4.2 培養液體積對 <i>Pseudomonas fluorescens</i> K-188 生產真菌抑制劑之影響 | 41 | 圖 4.3 蝦蟹殼粉添加量對於 <i>Pseudomonas fluorescens</i> K-188 生產真菌抑制劑之影響 | 42 | 圖 4.4 分別以不同濃度及不同處理方式的 SCSP 及上清液作為碳源比較對於 <i>Pseudomonas fluorescens</i> K-188 生產真菌抑制劑之影響 | 43 | 圖 4.5 培養溫度及培養時間對 <i>Pseudomonas fluorescens</i> K-188 生產真菌抑制劑之影響 | 44 | 圖 4.6 培養基酸鹼值對 <i>Pseudomonas fluorescens</i> K-188 生產真菌抑制劑之影響 | 45 | 圖 4.7 培養前後培養基的酸鹼度 | 46 | 圖 5.1 <i>Pseudomonas fluorescens</i> K-188 生長情況 | 57 | 圖 5.2 | |
|------|-----|-----|-----|------|----|------|---|----|----|----|-----|-----|------|-----|----|--------|---|----------|---|--------|---|-----------------|---|---------------|---|--------------------------------------|---|----------|----|-----------------|----|----------------|----|-------------------|----|-------------------|----|---------------|----|-----------------|----|-----------------|----|------------------|----|------------------|----|-----------------|----|--------|----|-----------|----|----------|----|-----------|----|------------|----|------------|----|-------------|----|--------|----|---|----|--------|----|-------------|----|----------|----|----------|----|----------|----|------------|----|-------------|----|---|----|----------|----|----------|----|------------|----|-------------|----|------------|----|----------------|----|-----------|----|---------------------|----|---------------|----|---------------|----|------------------------------|----|---------------|----|--------------|----|--------|----|---|----|--------|----|--------|----|--------|----|----------------|----|--------------------|----|--------------------------|----|--------------------------|----|----------------------|----|-----------------|----|-------------------|----|----------------|----|------------------|----|----------------|----|----------------|----|-----------------|----|------------|----|------------------|----|---|----|---|----|-----------|----|--------------------|----|--------------------------|----|--------------------------|----|---------------|----|---|----|--------|----|-------------------------|----|--------|----|-------------|----|------------|----|-------------|----|--------------|----|---------------|----|-------------|----|------------|----|------------|----|----------------|----|--------------------------------|----|-----------|----|------------|----|---------------------|----|-----------------------|----|--------------------|----|--------|----|--|----|--------|----|--------|----|--------|----|--------------|----|----------------|----|--------------|----|----------------|----|-----------|----|----------------|----|--------------|----|----------------|----|--------|----|------|----|-----|--------------------|----|--------------------|----|--------------------------|----|---|----|--|----|---|----|---|----|--|----|---|----|-------------------|----|---|----|-------|--|

Pseudomonas fluorescens K-188生產真菌抑制劑之變化 58 圖5.3 *Pseudomonas fluorescens* K-188真菌抑制劑於不同pH之穩定性探討(25) 59 圖5.4 *Pseudomonas fluorescens* K-188真菌抑制劑於 100 之熱穩定性探討(pH 7) 60 圖5.5 *Pseudomonas fluorescens* K-188所生產之粗真菌抑制劑對*F. oxysporum*.在型態上的影響 62 圖6.1蛋白質?活性之100 熱穩定性(pH7) 69 圖6.2蛋白質?活性對酸鹼值之穩定性(37) 70 圖6.3酵素最適作用酸鹼值(37) 71 圖7.1擔體成分與菌圈生長之比較 75 圖7.2保存方式對抑菌活性的影響 76 圖7.3可使用次數 77 表 目錄 表2.1水產廢棄物所含高附加價值物之回收 6 表2.2拮抗微生物之種類與其防治機制 20 表2.3 *Pseudomonas fluorescens*之相關文獻 25 表2.4 植物真菌性病害之特徵 27 表4.1不同微生物所產真菌抑制劑培養條件之比較 47 表6.1 *Pseudomonas fluorescens* K-188真菌抑制劑濃縮概要 67

參考文獻

1. 王一雄(1997) 土壤環境污染與農藥, 明文書局。
2. 王三郎 (1996) 水產資源利用學, 高立圖書出版社。
3. 王三郎 (2000) 生物技術, 高立圖書出版社。
4. 王三郎 (2002) 應用微生物學, 高立圖書出版社。
5. 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, 大葉大學食品工程研究所碩士論文。
6. 王啟浩、王三郎(1998) 林產資源有用成分回收再利用, 工業減廢暨永續發展研討會, 379。
7. 方繼、楊媛綸 (1995) 由*Streptococcus lactis* 所分泌類細菌素之初步純化及其抑菌機制探討, 中國農業化學會誌, 33(6):782-792。
8. 林志森(1995) 環境工程會刊, 2(4):29。
9. 邱少華(1997)利用綠膿桿菌K-187發酵蝦蟹殼廢物生產幾丁質?之應用及量產條件之研究, 大葉工學院食品工程研究所碩士論文。
10. 施英隆(1999) 生物資源、生物技術1(1):23。
11. 張圓笙、周正俊 (1981) 荖藤對於 *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus niger*、*Mucor mucedo* 孢子發芽之影響, 中國農業化學會誌, 19(1/2):99-107。
12. 梁慈雯(2000)*Bacillus subtilis* V656所生產微生物抑制物質之研究, 大葉工學院食品工程研究所碩士論文。
13. 陳俊位 (2000) 生物農藥枯草桿菌在植物病害防治上之應用, 台中區農業改良場。
14. 陳昱初(1996) 談作物病蟲害之生物防治, 高雄區農業專訊。
15. 陳能敏 (1996) 永續農業過去、現在、未來, 農資中心資訊科學叢書(3):88-100,144-147。
16. 陳能敏(1996) 永續農業過去、現在、未來, 農資中心資訊科學叢書。
17. 黃文瑛(1994)*Geotrichum candidum* 菌株生物乳化劑之回收與特性之探討, 中國農業化學會誌, 32(4):439-448。
18. 黃秀華 (2000) 生物技術在植物病害生物防治之應用, 台中區農業改良場。
19. 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, 大葉工學院食品工程研究所碩士論文。
20. Christakopoulos P.; B. Tzalas; D. Mamma; H. Stamatis; G. N. Liadakis ; C. Tzia ; D. Kekos ; F. N. Kolisis ; B. J. Macris (1998) Production of an esterase from *Fusarium oxysporum* catalysing transesterification reaction in organic solvents. *Process Biochemistry* 33:729-733.
21. 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.
22. Deshpande, M. V. (1986) Enzymatic degradation of chitin & its biological application. *J. Sci. & Ind. Res.* 45: 273-277.
23. Greenberg, A. E., J. J. Conners, and D. Jenkins. (1982) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Page 543~558. 15th ed., al. Pub. Health Assoc., Washington D.C.
24. Hoffman, C. and Evans, A.C. (1971) Use of spices as preservatives. *J. Ind. Eng. Chem.* 3:835-841.
25. Hoitink, H.A.J. and P.C. Fahy. (1986) Basis for the control of soil-borne plant pathogen with composts. *Ann. Rev. Phyto-pathol* 24:93~114.
26. Kato, N. and Shibasaki, I. (1975) Comparison of antimicrobial activities of fatty acids and their esters. *J. Ferment. Technol.* 53:793-785.
27. Leeper, S.A., Ward, T.E., and Andrews, G.F. (1991) Report No. EGG-2645 ; U.S. Department of Energy; Washington D.C.
28. Martin A.M. (1999) A low-energy process for the conversion of fisheries waste biomass. *Renewable Energy* 16, 1102-1105.
29. Min chu et al. (1998) Microstation System Release 3.5. (1995) *Biolog, Inc. U.S.A* A new potent antifungal agent from *Actinoplanes* sp.. *Tetrahedron letters* 39:7649-7652.
30. Pietro, A. Di, M. Gut-Rella., J. P. Pachlatko., and F. J. Schwinn (1992) Role of antibiotics produced by *Chaetomium globosum* in biocontrol of *Pythium ultimum*, a causal agent damping-off . *Physiol and Biotech.* 82(2):131-135.
31. Qamar, S., Chaudhary, F. M. (1991) Antifungal activity of some essential oils from local plants. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research.* 34:30-31.
32. Reetarani S. Patil, Vandana ghormade, Mukund V. Deshpande (2000) Chitinolytic enzymes: an exploration. *Enzyme and microbial technology.* 26:473-483.
33. Ruiz, M. C.; Pietro, A. D.; G. Roncero, M. I. (1997) Purification and characterization of an acidic endo-B-1,4-xylanase from the tomato vascular pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *FEMS Microbiology Letters* 148:75-82.
34. San. L. Wang, Chio, S, H, (1998) *Enzyme. Microb. Technol* , 22:629.
35. Sigh R. K. and Dwivedi R. S. (1987) Effects of oils on *Sclerotium rolfsii* causing foot-rot of barely. *Indian Phytopathology.* 40:531-533.
36. Stanley, 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.
37. Steven F. Vaughn and Gayland F. Spencer. (1994) Antifungal activity of natural compounds against Thiabendazole- Resistant *Fusarium sambucinum* Starin. *J. Agric. Food. Chem.* 42:200-203.
38. Thompson, D.P. (1991) Effect of butylated hydroxyanisole on conidial germination of toxigenic species of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *J. Food Protect.* 54:375-384.
39. Yang, T. and Zall, R. R. (1984) Chitosan membranes for reverse osmosis application. *J. Food Sci.*, 49:91-96.