

pseudomonas aeruginosa m-1001所生產抗菌成分之研究

李佩玲、王三郎

E-mail: 9125245@mail.dyu.edu.tw

摘要

由台灣中部土壤所篩選出之菌株*Pseudomonas aeruginosa* M-1001，其發酵液具有抑制真菌生長之效果。以該菌進行真菌抑制劑生產條件探討，得到其最適培養條件以含有1% 蝦蟹殼粉、0.1% K₂HPO₄、0.05% MgSO₄·7H₂O，填充75 mL於250 mL三角錐瓶，於pH 7、37℃下，振盪培養24小時後，針對抑制植物病原真菌*Fusarium solani*而言，可得最大之抑制活性，但不具有良好的100℃熱穩定性。取最適培養條件之培養上清液，經硫酸銨沉澱濃縮，再以DEAE Sepharose CL-6B等步驟分離，純化出分子量(SDS-PAGE)為38 kDa具有抑制真菌活性之蛋白質，並發現此蛋白質亦具有蛋白酶活性。純化後酵素之最適反應pH為7，最適反應溫度為37℃、pH值安定性為5~8、100℃熱安定性能維持3分鐘，以及其等電點為5.7。其發酵液與分離純化後蛋白質對於*F. solani*作用機制經顯微鏡觀察後發現會抑制其孢子之生長，且抑制其發芽管延長。菌株M-1001利用水產廢棄物為碳源所生產之真菌抑制劑，期日後能產，應用於我國之農業上。

關鍵詞：綠膿桿菌；真菌抑制劑；蛋白質分解酵素；蝦蟹殼粉

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 xii 表目錄 xiv 第一章 緒論 1 第二章 文獻回顧 3
2.1 水產廢棄物 3 2.1.1 水產廢棄物之來源 3 2.1.2 水產廢棄物之回收再利用 3 2.1.3 蝦蟹殼類廢棄物之應用 4 2.2 植物病害 4
2.2.1 茄形镰胞菌 <i>Fusarium solani</i> 5 2.2.1.1 分類 5 2.2.1.2 外觀 6 2.2.1.3 生活史 6 2.2.1.4 發生生態 6 2.2.1.5 病徵 7 2.2.1.6 镰胞菌病害的傳播 7 2.3 生物防治 9 2.3.1 生物防治在病害上之應用 10 2.3.2 植物病原真菌抑制劑 11 2.3.3 真菌抑制劑的作用機制 11
2.3.4 <i>Pseudomonas</i> 屬細菌對生物防治之應用 12 第三章 材料與方法 16 3.1 實驗材料 16 3.1.1 菌株 16 3.1.2 培養基材料 16 3.1.3 化學材料 16 3.1.4 膠體材料 17 3.1.5 使用設備 17 3.2 實驗方法 18 3.2.1 真菌抑制劑生產菌之活化及保存 18 3.2.2 抗菌活性測試 18 3.2.3 真菌抑制劑最適培養條件探討 21 3.2.3.1 碳源 21 3.2.3.2 碳源濃度 21 3.2.3.3 培養時間 21 3.2.3.4 培養液填充體積 22
3.2.3.5 培養溫度 22 3.2.3.6 基礎培養基酸鹼值 22 3.2.4 真菌抑制劑所生產抗菌成分之性質探討 22 3.2.4.1 菌株生長對抑制活性之探討 22 3.2.4.2 100℃之熱穩定性探討 23 3.2.4.3 針對不同基質之活性測定 23 3.2.4.4 最小抑制濃度 24 3.2.4.5 真菌抑制劑抑制作用之探討 24 3.2.5 抗菌物質之純化分離 25 3.2.5.1 大量培養 25 3.2.5.2 硫酸銨沉澱 25 3.2.5.3 離子交換樹脂 25 3.2.6 抗菌成分之生化性質探討 26 3.2.6.1 蛋白質濃度測定 26 3.2.6.2 SDS-PAGE分析 26 3.2.6.3 作用最適溫度的測定 27 3.2.6.4 酵素熱安定性的測定 27 3.2.6.5 酵素作用最適pH的測定 28 3.2.6.6 酵素pH安定性的測定 28 第四章 結果與討論 29 4.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> M-1001真菌抑制劑最適培養條件探討 29 4.1.1 碳源 29 4.1.2 碳源濃度 30 4.1.3 培養時間 30 4.1.4 培養液填充體積 30 4.1.5 培養溫度 30 4.1.6 初始培養基酸鹼值 31 4.1.7 綜合結果 31 4.2 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> M-1001所生產真菌抑制劑性質、基質特異性及生物活性探討 41 4.2.1 菌株生長對抑制活性之探討 41 4.2.2 100℃之熱穩定性探討 41 4.2.3 針對不同基質之活性測定 42 4.2.4 真菌抑制劑抑制作用之探討 42 4.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> M-1001真菌抑制劑之分離純化 46 4.3.1 粗酵素液之製備 46 4.3.2 離子交換管柱層析法 46 4.3.3 酵素對不同基質之活性測定 48 4.3.4 酵素之純化概要表 50 4.3.5 酵素之最適反應溫度測定 50 4.3.6 酵素之最適反應pH值測定 50 4.3.7 酵素之熱穩定性 51 4.3.8 酵素之pH安定性 51 4.3.9 酵素之等電點 51 4.3.10 酵素之分子量判定 52 4.3.11 真菌抑制劑純化前後之100℃熱安定性 52 4.3.12 綜合討論 53 第五章 結論 64 參考文獻 65
圖目錄 圖一、實驗設計流程圖 20 圖二、碳源對 <i>P. aeruginosa</i> M-1001生產真菌抑制劑之影響 32 圖三、碳源添加量對於 <i>P. aeruginosa</i> M-1001生產真菌抑制劑之影響 33 圖四、培養時間對於 <i>P. aeruginosa</i> M-1001生產真菌抑制劑之影響 34 圖五、培養液填充體積對 <i>P. aeruginosa</i> M-1001生產菌抑制劑之影響 35 圖六、培養溫度對 <i>P. aeruginosa</i> M-1001生產真菌抑制劑之影響 36 圖七、培養基初始酸鹼值對 <i>P. aeruginosa</i> M-1001生產真菌抑制劑之影響 37 圖八、 <i>P. aeruginosa</i> M-1001生長情況對真菌抑制劑抑制活性之影響 44 圖九、 <i>P. aeruginosa</i> M-1001真菌抑制劑於100℃之熱穩定性探討 45 圖十、 <i>P. aeruginosa</i> M-1001所生產之真菌抑制劑之純化分離流程圖 47 圖十一、DEAE Sepharose CL-6B之真菌抑制劑層析圖譜 49 圖十二、酵素之最適反應溫度 55 圖十三、酵素之最適反應pH 56 圖十四、酵素之熱安定性 57 圖十五、酵素之pH安定性 58 圖十六、酵素之等電點層析圖譜 59 圖十七、12%之SDS-PAGE檢測酵素純化效果 60 圖十八、真菌抑制劑純化前後之100℃熱安定性 61 表目錄 表一、拮抗微生物之種類與其防治機制 14 表二、生物性農藥與化學性農藥之比較 15 表三、 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> M-1001與其他真菌抑制劑比較 38 表四、細菌應用於植物病原真菌之生物防治實例 39 表五、 <i>P. aeruginosa</i> M-1001真菌抑制劑之基質特異性 43 表六、酵素基質特異性 48 表七、 <i>P. aeruginosa</i> M-1001真菌抑制劑之純化表 54 表八、本研究酵素與其他細菌蛋白的生化活性之比較 62

參考文獻

- 參考文獻 1. 王三郎 (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) 生物工程入門, 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. 江晃榮 (1995) 生物性殺菌劑市場調查與現況, 財團法人生物技術開發中心。 6. 呂鋒洲、林仁混 (1987) 基礎酵素學, 聯經出版事業公司, 台北。 7. 李敏郎 (1999) 百合鏽菌萎凋病, 台灣省農業藥物試驗所台南區農業改良場技術專刊 88-3 (No.89)。 8. 林子傑 (2000) 嗜水性產氣單胞桿菌 *Aeromonas hydrophila* 絲氨酸蛋白? 之特性及基因分析, 國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。 9. 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。 10. 孫守恭、黃振文 (1996) 台灣植物鏽菌病害, 世維出版社。 11. 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。 12. 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。 13. 陳敏瑞 (1997) 應用螢光假單胞菌 *Pseudomonas putida* YLFP14 防治甜椒細菌性斑點病, 國立中興大學植物病理研究所碩士論文。 14. 梁慈雯 (2000) *Bacillus subtilis* V656 所生產微生物抑制物質之研究, 私立大葉大學食品工程研究所碩士論文。 15. 黃秀華 (1999) 生物技術在植物病害生物防治之應用, 台中區農業專訊 26:22-25。 16. 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。 17. 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。 18. 楊政國、王三郎 (1998) 工業減廢暨永續發展研討會論文集 353-366。 19. 羅朝村 (1999) 作物病害生物防治的應用與展望, 臺灣農業 35(1)11-22。 20. 賴威安 (2000) *Bacillus* sp. P-6 中蛋白? 的生產與性質分析, 國立中興大學食品科學研究所碩士論文。 21. 劉英俊、汪金追 (1987) 酵素工程, 中央圖書出版社。 22. 謝順堂 (1994) *Pseudomonas aeruginosa* M-1001 所產溶菌酵素抑制劑之研究, 私立大葉工學院食品工程研究所碩士論文。 23. 鄭安秀、陳紹崇、李敏郎 (2000) 應用蒸氣消毒防治植物病害, 台南區農業改良場技術專刊 88-3。 24. Babe, L. M. and Schmidt, B. (1998) Purification and biochemical analysis of WprA, a 52-kDa serine protease secreted by *B. subtilis* as an active complex with its 23-kDa propeptide. *Biochim. Biophys. Acta.* 1386: 211-219。 25. Boonyaras Sookkheo, Supachok Sinchaikul, Suree Phutrakul, and Shei-Tein Chen. (2000) Purification and Characterization of the Highly Thermostable Proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. *Protein Expression and Purification* 20,145-151。 26. Bough, W. A. and Landes, D. R. (1997) Recovery and Nutritional evaluation of proteinaceous solid separation from whey by coagulation with chitosan. *J. Dairy Sci.*, 59:1874-1876。 27. Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* May 7; 72:248-54。 28. Caldas C, Cherqui A, Pereira A, Simoes N. (2002) Purification and characterization of an extracellular protease from *Xenorhabdus nematophila* involved in insect immunosuppression. *Appl Environ Microbiol* Mar; 68(3): 1297-304。 29. 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。 30. 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。 31. 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。 32. Deshpande, M. V. (1986) Enzymatic degradation of chitin & its biological application. *J. Sci. & Ind. Res.*, 45:273-277。 33. Dominique L, Markus K, Jean W (1997) The alkaline protease (AP) from *Pseudomonas aeruginosa* (EC 3.4.24.40) is one of the extra-cellular molecules that are secreted by the bacterium and considered as virulence factors. *Analytica Chimica Acta* 345:219-225。 34. Dunne C, Moenne-Loccoz Y, de Bruijn FJ, O'Gara F. (2000) Overproduction of an inducible extracellular serine protease improves biological control of *Pythium ultimum* by *Stenotrophomonas maltophilia* strain W81. *Microbiology* 146 (8): 2069-78。 35. Gupta CP, Sharma A, Dubey RC, Maheshwari DK. (1999) *Pseudomonas aeruginosa* (GRC1) as a strong antagonist of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium oxysporum* *Cytobios*, 99(392): 183-9。 36. Jensen, S. E., L. Phillippe, J. Teng Tseng, G.W. Stemke, and J. N. Campbell (1979) Purification and characterization of exocellulose protease produced by a clinical isolate and a laboratory strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* 26: 77-86。 37. John M. Whipps (2001) Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *Journal of Experiment Botany*, Vol.52, Roots Special Issue, pp.487-511。 38. Jo Handelsman, Sandra Raffel, Ellen H. Mester, Lynn Wunderlich, and Craig R. Grau (1990) Biological control of damping-off of alfalfa seedlings with *Bacillus cereus* UW85. *Applied and environmental microbiology*, 56:713-718。 39. Kim SS, Kim YJ, Rhee IK (2001) Purification and characterization of a novel extracellular protease from *Bacillus cereus* KCTC 3674. *Arch Microbiol Jun*; 175(6): 458-61。 40. Knorr, D. (1984) Use of chitinous polymer in food. *Food Technol.*, 1:85-89。 41. Kobayashi, T., Hakamada, Y., Adachi, S., Hitomi, J., Yoshimatsu, T., Koike, K., Kawai, S., Ito, S. (1995) Purification and properties of an alkaline protease from alkalophilic *Bacillus* sp. KSM-K16. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43(3): 473-481。 42. Leshchinskaya I. B., Shakirov, E. V., Itskovitch, E. L., Balaban, N. P., Mardanova, A. M., Sharipova, M. R., Blagova, E. V., Levdivkov, V. M., Kuranova, I. P., Rudenskaya G. N., Stepanov, V. M. (1997) Glutamyl endopeptidase of *Bacillus intermedius* strain 3-19. Purification, properties, and crystallization. *Biochemistry (Mosc)* 62(8): 903-908。 43. Logrieco A., Moretti A., Castella G., Kostecki M., Golinski P., Ritieni A., and Chelkowski J. (1998) Beauvericin production by *Fusarium* species. *Applied and environmental microbiology*. 64:3084-3088。 44. Matta, H. and Punj, V. (1998) Isolation and partial characterization of a thermostable extracellular protease of *Bacillus polymyxa* B-17. *Int. J. Food. Microbiol.* 42: 139-145。 45. Masahiro Samejima, Junji Sugiyama, Kiyohiko Igarashi (1998) Enzymatic hydrolysis of bacterial cellulose. *Carbohydrate research* 305:281-288。 46. Mette Neiendam 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。 47. Morozova, I. P., Chestukhina, G. G., Bormatova, M. E., Gololobov, M. I., Ivanova, N. M., Lysogorskaia, E. N., Filippova, I. I., Khodova, O. M., Timokhina, E. A. and Stepanov, V. M. (1993) Isolation and characteristics of *Bacillus*

megaterium metalloproteinase. *Biokhimiia*. 58(6): 896-907. 48. Nagano, H. and To, K. A. (2000) Purification of collagenase and specificity of its related enzyme from *Bacillus subtilis* FS-2. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64(1): 181-183. 49. Ogino, H., Watanabe, F., Yamada, M., Nakagawa, S., Hirose, T., Noguchi, A., Yasuda, M. and Ishikawa, H. (1999) Purification and characterization of organic solvent-stable protease from organic solvent-tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PST-01, *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 87(1): 61-68. 50. Oh, Y.-S., Shih, I.-L., Tzeng, Y.-M., and Wang, San-Lang (2000) Protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 and its application in the deproteinization of shrimp and crab shell wastes. *Enzyme Microb. Technol.*, 27:3-10. 51. Palmieri G, Bianco C, Cennamo G, Giardina P, Marino G, Monti M, Sannia G. (2001) Purification, characterization, and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. *Appl Environ Microbiol Jun*, 67(6): 2754-9. 52. Price, N. C. and Steven, L. (1999) *Fundamentals of enzymology*, pp. 184-185. Oxford University Press Inc., New York. 53. 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. 54. Scher, Fran M. and Baker, Ralph (1982) Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium wilt* pathogens. *Phytopathology*. 72(12): 1567-1573. 55. Shimahara, K. and Takiguchi, Y., (1998) Preparation of crustacean chitin. *Methods in enzymology*. , 161:417-423. 56. 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. 57. Sun F, Liu E, Zhang Y. Wei Sheng Wu Xue Bao (1997) The properties of protease from *Bacillus sphaericus* C3-41. *Oct*, 37(5): 397-400. 58. Vazquez, M. Mar., Cesar, Sonia., Azcon, Rosario., and Barea Jose M. (2000) Interactions between arbuscular mycorrhizal fungi and other microbial inoculants (*Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*) in the rhizosphere of maize plants. *Applied Soil Ecology* 15:261-272. 59. Wang, San-Lang, hi-Sun Pai, Sun-Tung Shieh (1995) Production of Lytic Enzyme from *Pseudomonas aeruginosa* M-1001. *Proceedings of the National Science Council* 19 (4) 216-224. 60. Wang, San-Lang, Sun-Tung Shieh, and Chyi-Sheng Pai (1995) Production, Purification and Characterization of Two Proteinaceous Hen-Egg-White Lysozyme Inhibitors from *Pseudomonas aeruginosa* M-1001. *Proceedings of the National Science Council* .19 (3) 166-175. 61. Wang, San-Lang, Yieh, T.-C., and Shih, I.-L. (1999) Purification and characterization of a new compound produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. *Enzyme Microb. Technol.*, 25:439-446. 62. Wang, San-Lang, Yieh, T.-C., and Shih, I.-L. (1999) Production of antifungal compound by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 using shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Enzyme Microb. Technol.*, 25:142-148. 63. Wang, San-Lang and Chio, S.-H. (1998) Deproteinization of shrimp and crab shell with the protease of *Pseudomonas aeruginosa* K-187. *Enzyme Microb. Technol.*, 22: 629-633. 64. Wang, San-Lang, Yieh, J.-C., Wang, C.-H., Shih, I.-L., Lin, L.-P., Lin, Y.-C., and Li, Y.-C. (1998) Purification and characterization of a new antifungal compound produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium. *Adv. Chitin Sci.*, 3:436-442. 65. Wang, San-Lang and Yieh, J.-C. (1998) Microbial reclamation of shellfish wastes for the production of antifungal compound. *Adv. Chitin Sci.*, 3:439-442. 66. Wang, San-Lang and Chang, W.-T. (1997) Purification and characterization of two bifunctional chitinases / lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab powder medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 380-386. 67. Wang, San-Lang, Chio, S.-H. and Chang, W.-T. (1997) Production of chitinase from shellfish waste by *Pseudomonas aeruginosa* K-187. *Proc. Natl. Sci. Council.*, 21: 71-78. 68. Wang, San-Lang., Hsiao, Wei-Jen., and Chung, Wen-Teish. (2002) Purification and Characterization of an Antimicrobial Chitinase Extracellularly Produced by *Monascus purpureus* CCRC31499 in a Shrimp and Crab Shell Powder Medium. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2249-2255. 69. Wang, San-Lang., Shih, I.-L. Liang, Tze-Wun, and Wang, Chi-Hau (2002) Purification and Characterization of Two Antifungal Chitinases Extracellularly Produced by *Bacillus amyloliquefaciens* V656 in a Shrimp and Crab Shell Powder Medium. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2241-2248. 70. 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. 71. Yang, J., Shih, I., Tzeng, Y., Wang, S. (2000) Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. *Enzyme Microb. Technol.* 26(5-6): 406-413. 72. Yasuda, M., Aoyama, M., Sakaguchi, M., Nakachi, K. and Kobamoto, N (1999) Purification and characterization of a soybean-milk-coagulating enzyme from *Bacillus pumilus* TYO-67. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 474-479.