

Bacillus cereus YQ-308之固定化應用及蛋白質分析

鄭景文、王三郎、張德明

E-mail: 9301989@mail.dyu.edu.tw

摘要

Bacillus cereus YQ-308能生產抑制植物病原真菌之蛋白質，而菌體本身能將諸如F. solani, F. oxysporum及P. ultimum等真菌細胞加以水解利用，而且所生產之體外酵素亦能水解此類真菌。進一步研究發現，菌體本身對於抑菌之貢獻度最大，至於發酵所得上清液及純化出來之蛋白質，亦有相當程度之抑菌效果。Bacillus cereus YQ-308所生產蛋白質之最適培養條件為4%chitosan、0.3% lactose、0.2% polypeptone、0.1% K₂HPO₄、0.05% MgSO₄，於25℃、pH 7條件進行振盪培養。本研究以幾丁聚醣為固定化的材料，將菌體加以固定化後期能達到實際應用之目的，菌體對於F. oxysporum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。

關鍵詞：Bacillus cereus；幾丁聚醣；蛋白質；固定化

目錄

目錄封面內頁	簽名頁	授權書	iii	中文摘要	v	英文摘要	vi	誌謝	vii	目錄	viii	圖目錄	xii	表目錄	xiii	第一章 緒言	1	第二章 文獻回顧	3	2.1 蛋白質之發現及特性	3	2.1.1 蛋白質之發現及簡介	3	2.1.2 蛋白質的分類	3	2.1.3 蛋白質之一般性質	4	2.2 幾丁質及幾丁聚醣之應用	6	2.2.1 固定化細胞	9	2.3 植物病原真菌-鐮胞菌 (Fusarium sp.)	12	2.3.1 尖鐮胞菌(Fusarium oxysporum)	12	2.3.2 病徵	13	2.3.3 病害發生與病害環境	13	2.4 真菌抑制劑的作用機制	16	2.4.1 抑制孢子發芽與芽管延長	16	2.4.2 藉由菌絲膨大的抑制作用	16	2.4.3 菌絲的溶解作用	16	2.4.4 營養物質的競爭作用	17	2.4.5 誘發植物的生理抗性	17	2.5 桿菌屬(Bacillus sp.)在植物病害防治上之應用	20	第三章 實驗材料與器材	22	3.1 實驗材料	22	3.1.1 菌株	22	3.1.2 培養基材料	22	3.1.3 化學材料	22	3.1.4 膠體材料	23	3.1.5 使用設備	23	3.1.6 試劑及緩衝液	24	第四章 實驗方法	26	4.1 蛋白質之生產	26	4.1.1 菌株的培養	26	4.1.2 酵素的生產	26	4.1.3 初酵素液的製備	26	4.2 酵素的純化	27	4.2.1 蛋白質定量分析	27	4.2.2 硫酸銨沉澱	27	4.2.3 離子交換樹脂層析法	27	4.3 酵素生化性質的分析	27	4.3.1 蛋白質活性之測定	28	4.3.2 酵素之最適反應溫度測定	28	4.3.3 酵素之熱穩定性探討	28	4.3.4 酵素之最適反應pH值測定	29	4.3.5 酵素之pH穩定性探討	29	4.3.6 蛋白質電泳分析及次單元分子量的測定	29	4.4 生物製劑之應用	30	4.4.1 固定化菌體的製作	30	4.4.1.1 幾丁聚醣載體的製備	30	4.4.1.2 以幾丁聚醣固定化細胞	30	4.4.1.3 固定化細胞培養	31	4.4.2 測試菌株孢子液的製備	31	4.4.3 真菌抑制活性之分析	31	第五章 實驗結果與討論	32	5.1 Bacillus cereus YQ-308酵素純化	32	5.1.1 粗酵素液之製備	32	5.1.2 離子交換管柱層析法	32	5.1.3 酵素之純化概要表	33	5.2 酵素生化性質的分析	37	5.2.1 酵素之最適反應溫度測定	37	5.2.2 酵素之最適反應pH值測定	37	5.2.3 酵素之熱穩定性探討	37	5.2.4 酵素之pH穩定性探討	38	5.2.5 蛋白質電泳分析及次單元分子量的測定	38	5.3 生物製劑之應用	45	5.3.1 幾丁聚醣載體的製備	45	5.3.2 固定化菌體的培養	45	5.3.3 真菌抑制劑抑制作用之探討	46	5.4 綜合討論	52	第六章 結論	53	參考文獻	54	附錄一、本研究酵素與其他Bacillus所生產之蛋白質的生化活性之比較	63	表目錄	表2.1、固定化酵素或完整菌體細胞之一般分類	11	表2.2、台灣常見尖鐮胞菌所引起之病害的例子	15	表2.3、抑制孢子發芽與芽管延長的例子	18	表5.1、Bacillus cereus YQ-308之純化表	36	表5.2、以不同的濃度醋酸溶解幾丁聚醣之成型試驗	48	圖目錄	圖2.1 纖維素、幾丁質、幾丁聚醣之結構	8	圖5.1 Bacillus cereus YQ-308蛋白質之純化分離流程圖	34	圖5.2 DEAE Sepharose CL-6B 之蛋白質層析圖譜	35	圖5.3 酵素之最適反應溫度	40	圖5.4 酵素之最適反應pH	41	圖5.5 酵素之熱安定性	42	圖5.6 酵素之pH安定性	43	圖5.7 12%之SDS-PAGE檢測酵素純化效果	44	圖5.8 以不同的濃度醋酸溶解幾丁聚醣之成型試驗	49	圖5.9 固定化菌體與游離菌體生長情況	50	圖5.10 固定化菌體的真菌抑制作用	51
--------	-----	-----	-----	------	---	------	----	----	-----	----	------	-----	-----	-----	------	--------	---	----------	---	---------------	---	-----------------	---	--------------	---	----------------	---	-----------------	---	-------------	---	-------------------------------	----	--------------------------------	----	----------	----	-----------------	----	----------------	----	-------------------	----	-------------------	----	---------------	----	-----------------	----	-----------------	----	----------------------------------	----	-------------	----	----------	----	----------	----	-------------	----	------------	----	------------	----	------------	----	--------------	----	----------	----	------------	----	-------------	----	-------------	----	---------------	----	-----------	----	---------------	----	-------------	----	-----------------	----	---------------	----	----------------	----	-------------------	----	-----------------	----	--------------------	----	------------------	----	-------------------------	----	-------------	----	----------------	----	-------------------	----	--------------------	----	-----------------	----	------------------	----	-----------------	----	-------------	----	--------------------------------	----	---------------	----	-----------------	----	----------------	----	---------------	----	-------------------	----	--------------------	----	-----------------	----	------------------	----	-------------------------	----	-------------	----	-----------------	----	----------------	----	--------------------	----	----------	----	--------	----	------	----	-------------------------------------	----	-----	------------------------	----	------------------------	----	---------------------	----	---------------------------------	----	--------------------------	----	-----	----------------------	---	--	----	------------------------------------	----	----------------	----	----------------	----	--------------	----	---------------	----	---------------------------	----	--------------------------	----	---------------------	----	--------------------	----

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。
3. 江晃榮，林玉媛 (1998) 生物科技的奇蹟-甲殼質的強效，世茂出版社。
4. 杜金池、程永雄、陳敏 (1975) 台灣亞麻萎凋病之抑病土壤，植保會刊17:390-399
5. 杜德一 (1988) 菠菜萎凋病，農之光3:64-65
6. 杜金池、張義璋、羅靜儀 (1979) 鐮胞菌屬所引起之蘆筍立枯病及冠腐病，植保會刊21(4):456-457
7. 李俊興 (1978) 筒蒿及翠菊萎凋病之研究，國立中興大學植物病理學系學士論文
8. 呂鋒洲、林仁混 (1987) 基礎酵素學，聯經出版事業公司。
9. 林益昇、宋曉清 (1992) 苦瓜萎凋病之傳播與寄主範圍，植保會刊34:428
10. 林益昇、沈懷德、汪碧涵 (1984) 台灣豌豆根腐病及萎凋病，中華農業研究33(4):395-405
11. 林益昇 (1980) 胡瓜鐮刀萎凋病之初報，植保會刊22(4):437
12. 林子傑 (2000) 嗜水性產氣單胞桿菌Aeromonas hydrophila絲氨酸蛋白質之特性及基因分析，國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。
13. 周立瓚、孫守恭 (1980) 香瓜蔓割病之生態研究，植保會刊22(4):437-438
14. 莊榮輝 (1985) 水稻蔗糖合成之研究，國立台灣大學農業化學研究所博士論文。
15. 莊榮輝 (1995) 酵素化學，國立台灣大學生物技術研究中心
- 16.

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。 17. 孫守恭、黃振文 (1996) 台灣植物鐮胞菌病害, 世維出版社。 18. 陳國誠 (2000), 生物固定化技術與產業應用, pp. 書有限公司 19. 陳國誠 (1989), 微生物酵素工程學, 藝軒圖書出版社。 20. 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。 21. 黃見發 (1996) 長豇豆萎凋病之鑑定及其初次接種源, 國立中興大學植物病理研究所碩士論文 22. 黃振文 (1978) 土壤添加物防治西瓜蔓割病之研究, 國立中興大學植物病理研究所碩士論文 23. 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. 24. 張文重 (1977) 蛋白質分解酵素, 環球書社。 25. 張文智、游淑玲、陳錦樹、王三郎(2002) *Bacillus cereus* YQ-308發酵幾丁類物質所生產一種抗真菌機丁質?之定性。幾丁質幾丁聚醣研討會論文專輯75-78。 26. 曾紫華 (1983) 芹菜黃葉病之研究, 國立中興大學植物病理研究所碩士論文 27. 楊政國 (1999) 利用枯草菌進行蝦蟹殼去蛋白之研究, 大葉大學食品工程研究所碩士論文。 28. 蔡雲鵬、陳復漢 (1971) 台灣之萎凋病: (1) 生態及藥劑防治初期研究, 植保會刊14:65-73 29. 廖朝暉 (1944) 甘藷蔓割病之研究, 國立中興大學植物病理學系學士論文 30. 潘國祥、莊維仁、謝式垚鈺 (1990) 金線蓮腰折病及其病原菌測試法, 植保會刊32 (4) :344-345 31. 鄭安秀、吳芳容 (1991) 胡麻萎凋之病原菌型態、生理及抗病性檢定, 台南區農業改良場研究彙報第26號:53-60 32. 鄭景文、張文智、涂耀國、張德明、王全祿、王三郎(2002) *Bacillus cereus* YQ-308發酵幾丁類物質所生產蛋白?之特性。幾丁質幾丁聚醣研討會論文專輯115-117。 33. 謝式垚鈺 (1986) 康乃馨萎凋病, 農藥世界36:12 34. 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。 35. 羅朝村 (1983) 蘿藦黃葉病之生理、生態研究及防治試驗, 國立中興大學植物病理研究所碩士論文 36. Amare Gessesse, Rajni Hatti-Kaul, Berhanu A. Gashe, Bo Mattiasson. Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. *Enzyme Microb. Technol* 32,519-524 37. Arun Arya.(1988) Control of Phomopsis fruit-rots of grape and guava. *Indian Phytopathology*. 41:214-219. 38. 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. 39. 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. 40. Basma Ghorbel, Alya Sellami-Kamoun, Moncef Nasri.(2003) Stability studies of protease from *Bacillus cereus* BG1. *Enzyme Microb. Technol* 32.513-518 41. Boyce, C. O. L., 1986. NOVO'S handbook of practical biotechnology. A Publication of NOVO Industry A/S Enzyme Division. Bagsvaerd, Denmark. 42. Chauhan, H. L., Joshi, H. U. (1990) Evaluation of phyto-extracts for control of mango fruit anthracnose. In *Batanical pesticides in integrated pest management :Proceedings of National symposium held on Jan 21 - 22 at Rajahmundry, India*. p.455-459. 43. Chatterjee, D. (1990) Inhibition of fungal growth and infection in maize grains by spice oil. *Letts in Applied Microbiology* 11:148-151. 44. Dubey, R. C.(1991) Fungicidal effect of essential oils three higher plants on sclerotia of *Macrophomina phaseolina*. *Indian Phytopathology* 44:241-244. 45. Dubey, R. C.(1991) Fungicidal effect of essential oils three higher plants on sclerotia of *Macrophomina phaseolina*. *Indian Phytopathology* 44:241-244. 46. Dubey, R. C. Dwivedi (1991) Fungitoxic properties of some plant extracts against vegetative growth and sclerotial viability of *Macrophomina phaseolina* *Indian Phytopathology*. 44:411-413. 47. Groboillot, A., Boadi, D. K., Poncelet, D., and Neuplod, R. J. (1994) Immobilization of cells for application in the food industry, *Critical Review in Biotechnol*. 14 (2) :75-107 48. Garg, S. C., Siddiqui, N. (1992) Antifungal activity of some essential oil isolates. *Pharmaize*. 47:467-468. 49. Hang, J. W., and Sun, S. K. (1982) Tomato wilt, *Fusarium* (Schl.) oxysporum f. sp. lycopersici (Sacc.) Snyder & Hansen, in Taiwan. *Plant Prot. Bull. (Taiwan, R. O. C.)* 24:265-270 50. Hsieh, S. P. Y. (1985) Ecology and control of gladiolus *Fusarium* wilt. *Plant Prot. Bull. (Taiwan)* 27 (3) :247-256 51. Jadwiga K, Sierecka (1998) Purification and partial characterization of a neutral protease from a virulent strain of *Bacillus cereus*. *J. Biochemistry & Cell Biology* 30.579-595 52. 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 53. 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 alkaliphilic *Bacillus* sp. KSM-K16. 54. Knorr, D. (1984) Use of chitinous polymer in food. *Food Technol.*, 1:85-89. 55. Löffler, A. (1986) Proteolytic enzymes: sources and applications. *Food Technol*. 40(12):63-70 56. Leshchinskaya I. B., Shakirov, E. V., Itskovitch, E. L., Balaban, N. P., Mardanova, A. M., Sharipova, M. R., Blagova, E. V., Levnikov, 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. 57. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685 58. 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. 59. 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. 60. Muzzarelli, R. A. A. (1977) Chitin. Pergamon Press. Oxford. O'brine, M. and Colwell, R. R. (1987) A rapid test for chitinase activity that uses 4-methylumbelliferyl-N-acetyl-D-glucosamine. *Appl. and Envir. Microb.*, 53:1718-1724. 61. Maiti, D., Kole, C. R., Sen C. (1985) Antimicrobial efficacy of some essential oils. *Zeitschrift for Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*. 92:64-68. 62. Madhukar, J., Reddy, S. M. (1989) Efficacy of certain oils in the control of fruit-rot of guava. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*. 19:131-132. 63. M. Lorito., A. Di Pietro., C. K. Hayes., S. L. Woo., and G. E. Harman. (1993) Antifungal, synergistic interaction between chitinolytic enzymes from *Trichoderma harzianum* and *Enterobacter cloacae*. *Molecular Plant Pathology*. 83(7):721-728. 64. Marianne B., Sela-Burlage., Anne S. Ponstein, Sandra A. Bres Vloemans., Leo S. Melchers., Peter J. M. van den Elzen., and Ben J. C. Cornelissen. (1993). Only specific Tobacco (*Nicotiana tabacum*) chitinase and -1,3-glucoanase exhibit antifungal activity. *Plant Physiol*. 101:857-863. 65. Nongporn Hutadilok-Towatana, Anongnat Painupong, and Prasert Suntinalert. Purification and characterization of an Extracellular Protease from Alkaliphilic and Thermophilic *Bacillus* sp. PS719. J.

Bioscience and Bioengineering. 87(5). 581-587

66. 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.

67. Qasim Khalil Beg, Rani Gupta.(2003) Purification and characterization of an oxidation-stable, thiol-dependent serine alkaline protease from *Bacillus mojavensis*. *Enzyme Microb. Technol* 32,294-304

68. Rao, M.B., Tanksale, A.M., Chatge, M.S. and Deshpande, V. V. (1998) Molecular and Biotechnological aspects of microbial protease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3):597-635

69. Rao, C. P., Sigh, M., Sigh, H. N. (1992)Fungitoxic evaluation of essential oils extracted from higher plants some sugarcanes in vitro. *Tropical Science.* 32:377-382.

70. Sigh, S. P., Negi, S., Laxmi Chand., Singh, A. K. (1992) Antibacterial and antifungal activities of *Mentha arvensis* essential oil. *Fitoterapia* 63:76-78.

71. Sigh R. K. and Dwivedi R. S. (1987) Effects of oils on *Sclerotium rolfsii* causing foot-rot of barely. *Indiaian Phytopathology.* 40:531-533.

72. 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.*

73. Sezer, A.D. and Akbuga, J. Controlled release of piroxicam from chitosan beads. *Intl. J. Pharm.* 1995 121, 113-116

74. Thierry Niderman, Isabelle Genetet, Thierry Bruyere, Rene Gees, Annick Stintzi, Michel Legrand, Bernard Fritig, and Egon Mo" singer. (1995) Pathogenesis- Related PR-1 proteins are antifungal .: Isolation and characterization of three 14- Kilodalton prote- ins of tomato and of basic PR-1 of Tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*. *Plant Physiol.* 108:17-27.

75. Thompson D.P. (1996) Inhibition of growth of mycotoxigenic *Fusarium* species by butylated hydroxyanisole and/or carvacrol. *J. of Food Protection.* 59(4):412-415.

76. Thomas, L. and F. Loffler. (1994) Improved protein functionalities by enzymatic treatment. *Food Marketing Technol.,* pp. 4-6.

77. Victor Rodov, Shimshon Ben-Yehoshua, De Qiu Fang, Jong Jin Kim, and Rina Ashkenazi. (1995) Preformed antifungal compounds of lemon fruit: citral and its relation to disease resistance. *J. Agric. Food. Chem.* 43:1057-1061.

78. Walter, H, E. (1981) Method with haemoglobin, casein and azocoll as substrate. In : *Methods of Enzymatic Analysis.* (5) pp. 270~275. (ed. H. U. Bergmeyer). Verlag Chemie GmbH:D-6940 Weinbeim.

79. 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.

80. 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.