

細菌LCF007所生產蛋白?之純化及其性質之研究

劉錦芳、王三郎；吳芳禎

E-mail: 9300034@mail.dyu.edu.tw

摘要

近年來國內外機能性食品日漸被重視，產值每年迅速增加，發展潛力更被看好。尤其，紅麴菌能夠產生多項具有生理活性物質，因此，視為一種機能性食品素材。日常生活中，我們也可常見到一些紅麴菌發酵的健康食品；目前，紅麴菌有些代謝產物已被開發為商品應用於醫療方面，以及通過健康食品的認證。實驗研究是希望利用LCF007細菌生產水解真菌細胞壁酵素，從水解真菌細胞壁的複合酵素中，針對蛋白水解酵素加以探討，在添加不同碳源、氮源、無機鹽類，及不同pH、溫度、時間培養下，所生產蛋白?活性之最適條件。粗酵素液利用DEAE-Sepharose CL-6B、Sephacryl S-200管柱層析法分離純化酵素之後，進行電泳測定蛋白質分子量大小，並且觀察其酵素之穩定性相關實驗。研究中，LCF007最適培養基為0.3%紅麴粉末、0.1% Sucrose、0.1% Tris-aminomethan、0.1% Cellulose、0.1% K₂HPO₄、0.05% MgSO₄·7H₂O。培養條件為30、pH 8.4，並以130rpm轉速培養60小時。T1 & T2兩個酵素，分子量約30kDa及43kDa之蛋白質。最適溫度及pH值分別在T1 45，pH 9.0；T2 30，pH 8.0。T1的穩定溫度為25-45，pH值穩定範圍pH 9.0~11.0，pI = 5.45；T2的穩定溫度為25-30，pH值穩定範圍pH 8.0，pI = 5.49。

關鍵詞：紅麴菌；蛋白&；#37238

目錄

封面內頁 簽名頁 授權書.....	iii
中文摘要.....	iii
iv 英文摘要.....	v
v 誌謝.....	v
vi 目錄.....	vii
vii 圖目錄.....	vii
xii 表目錄.....	xiv
xiv 第一章 前言.....	1
1 第二章 文獻回顧.....	2
2.1 紅麴.....	2
2.1.1 紅麴的起源.....	2
2.1.2 紅麴的特性與分類.....	3
2.1.3 紅麴的製作.....	8
2.1.4 紅麴代謝產物.....	9
2.2 蛋白?.....	19
2.2.1 蛋白?發現與簡介.....	19
2.2.2 蛋白?命名與其分類依據.....	20
2.2.3 蛋白?的一般性質.....	21
2.2.3.1 熱變性.....	21
2.2.3.2 表面變性.....	22
2.2.3.3 壓力變性.....	22
2.2.3.4 pH變性.....	24
2.2.3.5 有機溶劑變性.....	24
2.2.4 蛋白?在工業上的應用.....	24
2.2.4.1 醫學方面.....	25
2.2.4.2 食品方面.....	25
2.2.4.3 其他方面.....	31
2.2.4.4 其他方面.....	32
3 第三章 研究方法.....	33
3.1 實驗材料.....	33
3.1.1 菌株.....	33
3.1.2 培養基材料.....	33
3.1.3 化學藥品.....	33
3.1.4 膠體材料.....	34
3.1.5 使用設備.....	34
3.2 實驗方法.....	36
3.2.1 生產菌株之分離與篩選.....	36
3.2.1.1 分離菌之初步確認.....	36
3.2.1.2 再次篩選確認.....	36
3.2.1.3 分離菌株的純化及保存.....	37
3.2.2 蛋白?最適生產條件探討.....	37
3.2.2.1 碳源的影響.....	37
3.2.2.2 氮源的影響.....	37
3.2.2.3 金屬離子的影響.....	38
3.2.2.4 基礎培養基酸鹼值.....	38
3.2.2.5 培養溫度.....	38
3.2.2.6 培養液填充體積.....	38
3.2.2.7 時間的影響.....	39
3.2.3 蛋白?之分離純化.....	39
3.2.3.1 大量培養.....	39
3.2.3.2 上清液的製備.....	39
3.2.3.3 硫酸銨沈澱.....	41
3.2.3.4 陰離子交換樹脂(Anion exchange chromatography).....	41
3.2.3.5 膠體過濾層析(Gel filtration chromatography).....	41
3.2.4 蛋白?之生化性質探討.....	42
3.2.4.1 蛋白質濃度測定.....	42
3.2.4.2 SDS-PAGE分析.....	42
3.2.4.3 酵素一般生化特性的測定.....	45
3.2.4.3.1 酵素作用最適溫度測定.....	45
3.2.4.3.2 酵素熱安定性的測定.....	45
3.2.4.3.3 酵素作用最適pH的測定.....	45
3.2.4.3.4 酵素pH安定性的測定.....	46

3.2.4.3.5 蛋白?抑制劑的測定.....	46	3.2.5 等電點之測定.....	47	3.2.6 蛋
白質?活性測定方法.....	47	第四章 結果與討論.....	48	4.1
LCF007 蛋白水解酵素最適培養條件探討.....	48	4.1.1 碳源.....	48	
4.1.2 氮源.....	48	4.1.3 金屬離子.....	49	
4.1.4 基礎培養基酸鹼值.....	49	4.1.5 培養溫度.....	49	
4.1.6 培養液填充體積.....	49	4.1.7 時間的影響.....	50	
4.1.8 綜合結果.....	50	4.2 LCF007 蛋白水解酵素之分離純化.....	61	
4.2.1 大量培養及上清液收集.....	61	4.2.2 硫酸銨沉澱.....	61	
4.2.3 陰離子交換樹脂層析法.....	61	4.2.4 膠體過濾層析法.....	62	
4.2.5 酵素之純化概要表.....	62	4.2.6 酵素一般生化特性的測定.....	66	
4.2.6.1 酵素作用最適反應溫度測定.....	66	4.2.6.2 酵素熱安定性的測定.....	66	4.2.6.3
酵素作用最適反應pH的測定.....	66	4.2.6.4 酵素pH安定性的測定.....	67	4.2.6.5 蛋白?抑
制劑之測定.....	67	4.2.7 酵素之等電點.....	67	4.2.8 蛋白質濃度測
定.....	67	4.2.9 酵素分子量判定.....	68	4.2.10 綜合討論.....
.....	69	第五章 結論.....	84	參考文獻.....
.....	85	圖目錄 圖1.1 紅麴菌屬的品種及其分類的關鍵.....	5	
圖1.2 兩種新種 <i>M. pallens</i> 、 <i>M. sanguineus</i> ，依有性世代之形態加以分類.....	7	圖1.3 <i>Monascus</i> 屬產生之色素.....	11	圖1.4 <i>Monascus</i> 屬產生之 Monacolin 相關產物.....
.....	13	圖1.5 Monacolin 之分子構造與 HMG-CoA 類似，二者發生競爭性抑制作用.....	14	圖1.6 紅麴萃取物之萃取流程.....
.....	14	圖3.1 LCF007 生產蛋白?之純化分離流程圖.....	40	圖4.1 碳源對 LCF007 菌株的蛋白?生產能之影響.....
.....	40	圖4.2 氮源對 LCF007 菌株的蛋白?生產能之影響.....	52	圖4.3 金屬離子對 LCF007 菌株的蛋白?生產能之影響.....
.....	52	圖4.4 起始 pH 值對於 LCF007 菌株的蛋白?生產能之影響.....	54	圖4.5 培養溫度對於 LCF007 菌株的蛋白?生產能之影響.....
.....	54	圖4.6 溶氧量對 LCF007 菌株的蛋白?生產能之影響.....	56	圖4.7 培養時間對 LCF007 菌株的蛋白?生產能之影響.....
.....	56	圖4.8 DEAE-Sepharose CL-6B 之蛋白質?層析圖譜.....	63	圖4.9 Sephacryl S-200 蛋白質?層析圖譜.....
.....	63	圖4.10 酵素 T1 之最適反應溫度 (pH7).....	70	圖4.11 酵素 T2 之最適反應溫度 (pH7).....
.....	70	圖4.12 酵素 T1 之熱安定性 (pH7).....	72	圖4.13 酵素 T2 之熱安定性 (pH7).....
.....	72	圖4.14 酵素 T1 之最適反應 pH 值 (37).....	74	圖4.15 酵素 T2 之最適反應 pH 值 (37).....
.....	74	圖4.16 酵素 T1 之 pH 安定性 (37).....	75	圖4.17 酵素 T2 之 pH 安定性 (37).....
.....	75	圖4.18 LCF007 蛋白?T1 之等電點層析圖譜.....	77	圖4.19 LCF007 蛋白?T2 之等電點層析圖譜.....
.....	77	圖4.20 蛋白質之標準曲線.....	68	圖4.21 12% 之 SDS-PAGE 檢測酵素純化結果.....
.....	68	表目錄 表1.1 紅麴菌叢顏色與其代謝產物之類別.....	6	表1.2 紅麴菌所產生的高價值代謝產物.....
.....	6	表2.1 蛋白?的分類.....	23	表2.2 蛋白?在食品及其他工業上的應用.....
.....	23	表3.1 蛋白質標準品組成之分子量.....	43	表3.2 電泳片配製之組成.....
.....	43	表4.1 本研究酵素與其他微生物蛋白?的培養基之比較.....	58	表4.2 LCF007 蛋白?之純化表.....
.....	58	表4.3 本研究酵素與其他微生物蛋白?的生化活性之比較.....	81	

參考文獻

- 王三郎 (1996) 水產資源利用學，高立圖書出版社。
- 王三郎 (1999) 海洋未利用生物資源之回收再利用-幾丁質及幾丁聚醣，生物資源生物技術1 (1) :1-8。
- 王三郎 (2002) 應用微生物學，高立圖書有限公司。
- 田蔚城主編 (2001) 生物技術的發展與應用，九州圖書文物有限公司。
- 李佩玲 (2002) *Pseudomonas aeruginosa* M-1001 所生產抗菌成分之研究，私立大葉大學食品工程學系研究所碩士論文，台灣彰化縣。
- 呂鋒洲、林仁混 (1987) 基礎酵素學，經聯出版事業公司，臺北。
- 邱麗君 (1994) 蛋白酵素催化酯化反應，私立大葉工學院食品工程學系研究所碩士論文，台灣彰化縣。
- 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，台灣臺北市。
- 林讚峰 (1982) 紅麴研究發展之演進。製酒科技專論彙編，第四期:66-77。
- 林讚峰 (1983) 紅麴菌的鑑定及實用分類法。製酒科技專論彙編，第五期:104-113。
- 林讚峰 (1986) 紅麴菌次級代謝物的經濟性評估及增產策略。製酒科技專論彙編，第八期:81-99。
- 林讚峰 (1992) 紅麴研究發展之演進。科學農業，40 (3-4): 193-198。
- 林讚峰 (1995) 紅麴菌培養工藝及紅麴應用之演進。製酒科技專論彙編，第十七期:156-168。
- 徐茂輝 (1999) 傳統紅麴及功能紅麴的研究開發與進展。食品資訊 No.162:14-19。
- 徐泰浩、曾耀銘編譯 (1993) 生物技術概論，藝軒圖書出版社。
- 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，台灣台北市。
- 張文智 (1996) 蝦蟹殼加工之廢棄物回收與再利用，私立大葉大學食品工程學系研究所碩士論文，台灣彰化縣。
- 陳自珍編譯 (1988) 食品酵素學，復文書局。
- 陳彥霖 (2000) 紅麴與高血壓。科學與技術，第32卷第12期:54-59。
- 黃顯宗 (1985) 紅麴菌研究的回顧與展望。真菌學之最近發展 (曾聰徹、陳瑞青主編)。國科會生物科學研究中心專刊 (臺北)，第十二集:109-124。
- 楊政國 (1999) 利用枯草菌進行蝦蟹殼去蛋白之研究，私立大葉大學食品工程學系研究所碩士

論文, 台灣彰化縣。 22.楊鵬華(1998)紅麴食品素材的機能和利用。烘焙工業, 82:44-46。 23.歐靜枝譯(1988)酵素, 復漢出版社。 24.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, 台灣台中市。 25.賴滋漢、賴業超(1994)食品科技辭典, 富林出版社。 26.蕭維仁(2001)以紅麴發酵蝦蟹殼粉生產抗菌幾丁質?之研究, 私立大葉大學食品工程學系碩士論文, 台灣彰化縣。 27.蘇遠志(2001)紅麴製品介紹及國內研究現況。機能性發酵製品研討會論文集, 台北。 28.山內吉彥、近藤英彥、清水彌生、蓮見惠司、遠藤章, 1986.??????合成阻害劑ML-236B(Compactin)???血中??????低下作用????動物種差。2p-16, 日本農藝化學大會論文報告。 29.玉田英明, 1988.紅麴?各種調味料??應用。食品?科學, July:96-99。 30.田邊伸和(1998)紅麴?食品素材???機能?利用。食品?開發33(2):18。 31.佐藤喜吉(1936)東洋產*Monascus*屬分類?對??-考察。日農化會誌, 12:583-586。 32.野崎絢一(1979)食品加工?利用???天然色素????。New Food Ind., 21(5):2-7。 33.鈴木秀昭(1988)加工食品????????利用????。New Food Ind., 30(4):20-24。 34.遠藤章, 1985.紅麴?紅麴菌???為歷史?最近?動向。發酵?工業, 43(6):544-552。 35.樽井壓一(1993)紅麴素材?開發?利用。食品?開發, 28(1):47-50。 36.?啟介、市川富夫、河村雅子、中川靖枝, 1986.紅??? (*Monascus pilosus*) ?血壓降下作用。2Q-20, 日本農藝化學大會論文報告。 37.?啟介等(1992)紅麴食品?高血壓自然發症????血壓?及??影響。日食工會誌, 39(10):919-924。 38.稻垣長典、大橋晉(1940)果汁製品關研究(第2報)。日本農藝化學會誌16(11):1089-1097。 39.Abdallah A. A. Magboul, Lotte B. Larsen, Paul L.H. McSweeney, Alan L. Kelly. (2001) Cystein protease activity in bovine milk. International Dairy Journal. 11:865-872。 40.A. Dayanandan, J. Kanagaraj, Lesley Sounderraj, R. Govindaraju, G.Suseela Rajkumar. (2003) Application of an alkaline protease in leather processing: an ecofriendly approach. Journal of Cleaner Production. 11:533-536。 41.Barnard, E. L. (1987)A new species of *Monascus* from pine tissues in floride. Mycologia. 79(3):479-484。 42.Boonyaras Sookkheo, Supachok Sinchaikul, Suree Phutrakul, and Shui-Tein Chen. (2000) Purification and characterization of the highly thermostable proteases from *Bacillus stearothermophilus* TLS33. Protein Expression and Purification. 20:143-151。 43.Bruce W. Elliott, Jr. and Carolyn Cohen. (1986) Isolation and characterization of a Lysine-specific protease from *Pseudomonas aeruginosa*. J. of Bio. Chem. 261:11259-11265。 44.Cannon, P. F., Abdullah, S. K., and Abbas, B. A. (1995) Two new species of *Monascus* from Iraq, with a key to know, species of the genus. Mycol. Res. 99(6):659-662。 45.C. G. Kumar, M.P. Tiwari, K.D. Jany. (1999) Novel alkaline serine proteases from alkalophilic *Bacillus* spp.: purification and some properties. Process Biochemistry. 34:441-449。 46.Claudia Toma, Yoshio Ichinose, Masaaki Iwanaga. (1999) Purification and characterization of an *Aeromonas caviae* metalloprotease that is related to the *Vibrio cholerae* henagglutinin/protease. FEMS Microbiology Letters. 170:237-242。 47.David J. Fairbairn and Barry A. Law. (1986) Purification and characterization of the extracellular proteinase of *Pseudomonas fluorescens* NCDO 2085. J. of Dairy Res. 53:457-466。 48.Endo, A. (1979) Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. J. Antibiot. 32:852-854。 49.Endo, A. (1980) Monacolin K, a new Hypocholesterolemic Agent that Sepcifically Inhibits 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase. J. Antibiotics 3:334-337。 50.Eui Ichishima, Makoto Ojima, Youhei Yamagata, Satoshi Hanzawa and Tetsuo Nakamura. (1995) Molecular and enzymatic properties of an aspartic proteinase from *Rhizopus* hangchow. Phytochemistry. 38(1):27-30。 51.Frank Seeber. (2000) An enzyme-release assay for the assessment of the lytic activities of complement or antimicrobial peptides on extracellular *Toxoplasma gondii*. Journal of Microbiological Methods. 39:189-196。 52.Hartley, B. S. 1960. Proteolytic enzymes. Ann. Rev. Biochem, 29:45。 53.Haruto Kumura, Katsuhiko Mikawa and Zenichi Saito (1993) Purification and some properties of proteinase from *Pseudomonas fluorescens* No.33. J. of Dairy Res. 60:229-237。 54.Hawksworth, D. L. and J. I. Pitt. (1983) A new taxonomy of *Monascus* species based on cultural and microscopical characters. Aust. J. Bot. 31:51-61。 55.Hector M. Fernandez Lahore, Maria V. Miranda, Elda R. Fraile, Mirtha J. Biscoglio de Jimknez Boninoh & Osvaldo Cascone. (1995) Partition behaviour and purification of a *Mucor bacilliformis* acid protease in aqueous two-phase systems. Process Biochemistry. 7:615-621。 56.Hee-Jung Kim, Yoshiaki Tamanoue, Gwang-Ho Jeohn, Akihiro Iwamatsu, Akira Yokota, Yong-Tae Kim, Takayuki Takahashi, and Kenji Takahashi. (1997) Purification and characterization of an extracellular metalloprotease from *Pseudomonas fluorescens*. J. Biochem. 121:82-88。 57.Hideto Takami, Teruhiko Akiba, and Koki Horikoshi. (1989) Production of extremely thermostable alkaline protease from *Bacillus* sp. no. AH-101. Appl. Microbiol Biotechnol. 30:120-124。 58.Iizuka, H. and C. F. Lin. (1980) On the genus *Monascus* of Asia and its specific characteristics. Adv. Biotech. 2:555-561。 59.Jean-Pierre Chessa, Ioan Petrescu, Mostafa Bentahir, Jozef Van Beeumen, Charles Gerday. (2000) Purification, physico-chemical characterization and sequence of a heat labile alkaline metalloprotease isolated from a psychrophilic *Pseudomonas* species. Biochimica et Biophysica Acta. 1479:265-274。 60.Jen-Kuo Yang, Ing-Lung Shih, Yew-Min Tzeng, San-Lang Wang. (2000) Production and purification of protease from a *Bacillus subtilis* that can deproteinize crustacean wastes. Enzyme and Microbial Technology. 26:406-413。 61.Johannes P. T. W. van den Homberg, Peter J.I. van de Vondervoort, Laurence Fraissinet-Tachet and J. Visser. (1997) *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. Tibtech July. 15:256-263。 62.Jose Escobar and Stanley Barnett. (1995) Synthesis of Acid Protease from *Mucor miehei*: Integration of Production and Recovery. Process Biochemistry. 8:695-700。 63. Kaustav Aikat and Bimal Chandra Bhattacharyya. (2000) Protease extraction in solid state fermentation of wheat bran by alocal strain of *Rhizopus oryzae* and growth studies by the soft gel technique. Process Biochemistry. 35(9):907-914。 64.Kaustav Aikat, Bimal Chandra Bhattacharyya. (2001) Protease production in solid state fermentation with liquid medium recycling in a stacked plate reactor and in a packed bed reactor by a local strain of *Rhizopus oryzae*. Process Biochemistry. 36:1059-1068。 65.K. L. Kohlmann, S. S. Nielsen, and M. R. Ladisch. (1991) Purification and characterization of an extracellular protease produced by *Pseudomonas fluorescens* M3/6. J. Dairy Sci. 74: 4125-4136。 66.Kono, I. and Himeni, K. (2000) Changes in -aminobutyric acid content during beni-koji making. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64(3):617-619。 67.Laemmli. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature Aug 15. 227(259): 680-685。 68.Lahl, W.J. and Braun, S.D. 1994. Enzymatic production of protein hydrolysates for food use. Food Technol. 48(10): 68-71。 69.L. C. Wu and Y. D. Hang. (2000) Acid protease production from *Neosartorya*

fischeri. *Lebensm-Wiss. u.-Technol.* 33:44-47. 70. Leslie T. Mathaba, Catherine H. Pope, Jason Lenzo, Maria Hartofilis, Helen Peake, Robert L. Moritz, Richard J. Simpson, Andreas Bubert, Philip J. Thompson, Geoffrey A. Stewart. (2002) Isolation and characterization of a 13.8-kDa bacteriolytic enzyme from house dust mite extracts: homology with prokaryotic proteins suggests that the enzyme could be bacterially derived. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 33: 77-88. 71. Lilik Ikasari and David A. Mitchell. (1996) Leaching and characterization of *Rhizopus oligosporus* acid protease from solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 19:171-175. 72. Löffler, A. (1986) Proteolytic enzymes: sources and application. *Food Technol.* 40(12): 63-70. 73. Maria de Fatima Silva Lopes, Ana Lucia Leitao, J.J. Figueiredo Marques, Manuel Jose Teixeira Carrondo, Maria Teresa Barreto Crespo. (1999) Processing of extracellular lipase of *Lactobacillus plantarum*: involvement of a metalloprotease. *FEMS Microbiology Letters*. 00:483-487. 74. Maria Papagianni, Murray Moo-Young. (2002) Protease secretion in glucoamylase producer *Aspergillus niger* cultures: fungal morphology and inoculum effects. *Process Biochemistry*. 37:1271—1278. 75. Marie-Claude Jobin, Daniel Grenier. (2003) Identification and characterization of four proteases produced by *Streptococcus suis*. *FEMS Microbiology Letters*. 220:113-119. 76. Marianna Turkiewicz, Ewa Gromek, Halina Kalinowska, Maria Zielin ' ska. (1999) Biosynthesis and properties of an extracellular metalloprotease from the Antarctic marine bacterium *Sphingomonas paucimobilis*. *Journal of Biotechnology*. 70:53—60. 77. Martha L. Diaz-Torres, Roy R.B. Russell. (2001) HtrA protease and processing of extracellular proteins of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters*. 204:23-28. 78. M.J. Zapelena, I. Astiasaran, J. Bello. (1999) Dry fermented sausages made with a protease from *Aspergillus oryzae* and/or a starter culture. *Meat Science* 52:403-409. 79. Nathalie Durand-Poussereau, Michel Fevre. (1996) Characterization and a protease deficient strain of *Penicillium roqueforti* generated by heterologous plasmid integration: potential us for protein production. *Journal of Biotechnology*. 51:97-105. 80. Nora Muller and Frank Bordusa. (2000) Assay of diverse protease activities on the basis of a small synthetic substrate. *Analytical Biochemistry*. 286:86-90. 81. Pirkko Helisto, Gleb Aktuganov, Nailia Galimzianova, Alexander Melentjev, Timo Korpela. (2001) Lytic enzyme complex of an antagonistic *Bacillus* sp. X-b: isolation and purification of components. *Journal of Chromatography B*. 758:197-205. 82. Price, N. C. and Steven, L. (1999) *Fundamentals of enzymology*, pp. 184-185. Oxford University Press Inc., New York. 83. Rao, M. B., Tankale, A. M., Chatge, M. S. and Deshpande, V. V. (1998) Molecular and Biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62(3): 597-635. 84. R. K. Malik and D. K. Mathur. (1984) Purification and characterization of a heat-stable protease from *Pseudomonas* sp. B-25. *J. Dairy Sci.* 67:522-530. 85. R. Triveni, T. R. Shamala. (1999) Clarification of xanthan gum with extracellular enzymes secreted by *Trichoderma koningii*. *Process Biochemistry*. 34:49-53. 86. Sandro Germano, Ashok Pandey, Clarice A. Osaku, Saul N. Rocha, Carlos R. Socol. (2003) Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 32:246—251. 87. S. E. Jensen, L. Phillippe, J. Teng Tseng, G. W. Stenmke, and J. N. Campbell. (1979) Purification and characterization of exocellular proteases produced by a clinical isolate and a laboratory strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* 26:77-86. 88. Shaoliang Li, Shigemi Norioka, and Fumio Sakiyama. (1997) Purification, staphylolytic activity, and cleavage sites of -Lytic protease from *Achromobacter lyticus*. *J. Biochem.* 122:772-778. 89. Shin-ichi Miyoshi, Sumio Shinoda. (2000) Microbial metalloproteases and pathogenesis. *Microbes and Infection*. 2:91-98. 90. Suresh Shastry, M. S. Prasad. (2002) Extracellular protease from *Pseudomonas* sp. (CL 1457) active against *Xanthomonas campestris*. *Process Biochemistry*. 37:611-621. 91. Su, Y. C. (1976) Purification and some properties of amylase produced by *Monascus anka* V-2. *Memoris of the college of Agriculture, National Taiwan University*. 16 (1) :93-103. 92. S. W. Budi, D. van Tuinen, C. Arnould, E. Dumas-Gaudot, V. Gianinazzi-Pearson, S. Gianinazzi. (2000) Hydrolytic enzyme activity of *paenibacillus* sp. strain B2 and effects of the antagonistic bacterium on cell integrity of two soil-borne pathogenic fungi. *Applied Soil Ecology*. 15:191-199. 93. Thomas Aalbaek, Morten Reeslev, Bo Jensen, Susanne H. Eriksen. (2002) Acid protease and formation of multiple forms of glucoamylase in batch and continuous cultures of *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*. 30:410-415. 94. T. Kobayashi, Y. Hakamade, J. Hitomi, K. Koike, S. Ito. (1996) Purification of alkaline proteases from a *Bacillus* strain and their possible interrelationship. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 45:63-71. 95. Toma, C. (1999) Purification and characterization of an *Aeromonas caviae* metalloprotease that is related to *Vibrio cholerae* hemagglutinin/ protease. *FEMS Microbiol. Lett.* 170: 237-242. 96. T. R. Patel, D. M. Jackman, and F. M. Bartlett. (1983) Heat-stable protease from *Pseudomonas fluorescens* T16: Purification by affinity column chromatography and characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:333-337. 97. Van Tieghem, M. (1884) *Monascus* genre nouveaude I , ondre des Ascomycetes. *Bull. Soc. France* . 31:231-256. 98. Wong, H. C. and Bau, Y. S. (1977) Pigment and antibacterial activity of fast neutron and X-ray induced strains of *Monascus purpureus*. *Plant Physiol.* 60:578. 99. Wong, H. C. and Y. S. Bau (1978) Morphology and photoresponses of fast neutron and X-ray induces strains of *Monascus purpureus*. *Mycologia*. 70 (3) :645-659. 100. Wong, H. C. (1986) *Monascus pilosus* . *Applied and Environ. Microbio.* 52:1147. 101. Young, E. M. (1930) :Physiological studies in relation to the taxonomy of *Monascus* species. *Trans. Wis. Acad. Sci. Arts and Letters*, 227-244.