

# Monascus purpureus CCRC31499發酵蝦蟹廢棄物所生產蛋白 之純化與應用

林珍君、王三郎；顏裕鴻

E-mail: 9300045@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

本研究主要係以Monascus purpureus CCRC31499發酵蝦蟹廢棄物，生產多用途之蛋白。M. purpureus CCRC31499所生產蛋白之最適培養條件為2% 蝦蟹殼粉、0.15% 聚蛋白月東、0.1% 酵母抽出物、0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>於pH7、100mL、37 條件下，進行振盪培養4天後，可得最大之蛋白活性19.1U/mL。M. purpureus CCRC31499發酵蝦蟹廢棄物所生產蛋白，經硫酸銨沉澱、透析後，進行DEAE-Sepharose陰離子交換層析、Sephacryl S-200膠體過濾層析及一連串純化分離的步驟。所純化分離出之蛋白純度約為未純化分離前的25倍左右。經純化分離出來之蛋白在pH 5~11之內酵素都能保持穩定狀態，而最適反應溫度及最適反應pH值分別為50 及pH 9。進行SDS-PAGE電泳分析及Sephacryl S-200膠體層析可知其分子量約為40 kDa左右。此蛋白受PMSF（絲胺酸蛋白酶抑制劑）極強的抑制作用，可得知本研究酵素為絲胺酸蛋白酶。M. purpureus CCRC31499可以經酸處理及以鹼處理的蝦蟹殼粉為碳源來生產蛋白，其產量比未處理蝦蟹殼粉為碳源的還要高。當使用酸處理蝦蟹殼粉的時候其最大的蛋白產量由未處理過的19.1U/mL增加到21.8U/mL。將M. purpureus CCRC31499發酵後生產之植物生長促進劑，進行田間試驗，並將其成分特性及實際效果作一比較。結果顯示以M. purpureus CCRC31499效果最佳，其與對照組比較可增加全株長155%，全株重521%。經田間實驗所得到之良好植物生長促進劑，期日後能產，應用於我國之農業上。

關鍵詞：Monascus purpureus；蛋白；蝦蟹殼粉；植物生長促進劑

## 目錄

|   |
|---|
| 目錄封面內頁 簽名頁 授權書 iii 中文摘要 v 英文摘要 vii 誌謝 ix 目錄 x 圖目錄 xv 表目錄 xvii |
| 第一章 緒言 1  |
| 第二章 文獻回顧 3  |
| 2.1 紅麴 3  |
| 2.1.1 紅麴的起源 3   |
| 2.1.2 紅麴的特性與分類 4  |
| 2.1.3 紅麴的特性 5   |
| 2.1.4 紅麴的代謝產物 6   |
| 2.2 水產廢棄物 7   |
| 2.2.1 水產廢棄物之來源 7  |
| 2.2.2 蝦蟹殼粉、幾丁質之利用 7   |
| 2.3 蛋白 10   |
| 2.3.1 蛋白的簡介 10  |
| 2.3.2 蛋白的分類依據與其命名 11  |
| 2.3.3 蛋白的作用機制 13  |
| 2.3.4 蛋白的一般性質 16  |
| 2.3.5 蛋白的應用 19  |
| 2.3.5.1 醫學方面 19   |
| 2.3.5.2 食品方面 22   |
| 2.3.5.3 其它方面 23   |
| 2.4 植物生長促進劑--生物技術於有機肥料的應用 23                                  |
| 2.4.1 有機肥料之種類 24  |
| 2.4.2 有機肥料的配製 25  |
| 2.4.3 有機質肥料之發展 25   |
| 2.4.4 有機堆肥製作的重要性 26   |
| 2.4.5 有機廢棄物直接施用之弊端 27   |
| 第三章 材料與方法 28  |
| 3.1 實驗材料 28   |
| 3.1.1 菌株來源 28   |
| 3.1.2 培養基材料 28  |
| 3.1.3 化學材料 28   |
| 3.1.4 膠體材料 29   |
| 3.1.5 實驗器材 30   |
| 3.2 實驗方法 31   |
| 3.2.1 蛋白生產菌之活化與保存 31  |
| 3.2.1.1 材料來源 31   |
| 3.2.1.2 菌株之活化及保存 31   |
| 3.2.2 蛋白生產條件之探討 33  |
| 3.2.2.1 蛋白活性之測定 33  |
| 3.2.2.2 最適發酵條件之探討 33  |
| 3.2.2.2.1 最適培養時間的測定 33  |
| 3.2.2.2.2 最適培養溫度的測定 34  |
| 3.2.2.2.3 最適培養體積的探討 34  |
| 3.2.2.2.4 主要碳源蝦蟹殼粉含量之測定 34                                    |
| 3.2.2.2.5 最適氮源種類的測定 34  |
| 3.2.2.2.6 最適氮源濃度的測定 35  |
| 3.2.2.2.7 初始培養基酸鹼值的測定 35                                      |
| 3.2.2.2.8 蛋白儲藏時間之影響 35  |
| 3.2.3 蛋白之分離純化 36  |
| 3.2.3.1 大量培養 36   |
| 3.2.3.2 硫酸銨沈澱及透析 36   |
| 3.2.3.3 離子交換樹脂層析法 37  |
| 3.2.3.4 分子量標定與膠體過濾層析法 37                                      |
| 3.2.3.5 蛋白質濃度測定 38  |
| 3.2.4 蛋白之生化性質探討 38  |
| 3.2.4.1 電泳分析 38   |
| 3.2.4.2 等電點之測定 40   |
| 3.2.4.3 作用最適溫度的測定 40  |
| 3.2.4.4 蛋白於100 之熱穩定性探討 40                                     |
| 3.2.4.5 酵素作用最適pH的測定 41  |
| 3.2.4.6 酵素pH安定性的測定 41   |
| 3.2.4.7 蛋白抑制劑的測定 42   |
| 3.2.5 Monascus purpureus CCRC31499發酵蝦蟹廢棄物生產蛋白之應用 43           |
| 3.2.5.1 利用Monascus purpureus CCRC31499發酵各種蝦蟹廢棄物 生產蛋白 43       |
| 3.2.5.1.1 蝦蟹殼之前處理 43  |
| 3.2.5.1.2 酵素液之製備 45   |
| 3.2.5.1.3 以不同方式處理蝦蟹殼粉為碳源對蛋白生產的影響 45                           |
| 3.2.5.2 植物生長促進劑之田間試驗 45                                       |
| 3.2.5.2.1 植物生長促進劑之製備 45                                       |
| 3.2.5.2.2 小白菜及莧菜芽苗之預培養 46                                     |
| 3.2.5.2.3 小白菜及莧菜之栽培 46  |
| 第四章 結果與討論 48  |
| 4.1 Monascus purpureus CCRC31499所生產蛋白最適培養條件探討 48              |
| 4.1.1 培養時間 48   |
| 4.1.2 培養溫度 48   |
| 4.1.3 培養體積 49   |
| 4.1.4 主要碳源蝦蟹殼粉之含量 49  |
| 4.1.5 不同濃度poly-peptone對蛋白生產之影響 49                             |
| 4.1.6 不同濃度yeast extract對蛋白生產之影響 49                            |
| 4.1.7 初始培養基酸鹼值 50   |
| 4.1.8 蛋白儲藏時間之影響 50  |
| 4.1.9 綜合結果 51   |
| 4.2 Monascus purpureus CCRC31499所生產蛋白之分離純化 60                 |
| 4.2.1 粗酵素液之製備 60  |
| 4.2.2 離子交換管柱層析法 60  |
| 4.2.3 膠體過濾層析法 61  |
| 4.2.4 蛋白質濃度測定 61  |
| 4.2.5 酵素之純化概要表 62   |
| 4.3 Monascus purpureus CCRC31499所生產蛋白之生化性質分析 68               |
| 4.3.1 酵素之分子量判定 68   |
| 4.3.2 酵素之等電點 68   |
| 4.3.3 酵素之最適反應溫度測定 69  |
| 4.3.4 蛋白於100 之熱穩定性 69   |
| 4.3.5 酵素之最適反應pH值測定 69   |
| 4.3.6 酵素之pH安定性 70   |
| 4.3.7 蛋白抑制劑 70  |
| 4.4 Monascus purpureus CCRC31499發酵蝦蟹廢棄物生產蛋白之應用 80             |
| 4.4.1 以不同方式處理SCSP為碳源對蛋白生產的影響 80                               |
| 4.4.2 植物生長促進劑之田間試驗 87   |
| 第五章 結論 90   |
| 參考文獻 92   |
| 圖目錄 圖3.1 實驗設計流程圖 47   |
| 圖4.1 不同培養時間對蛋白生產之影響 52  |
| 圖4.2 不同培養溫度對蛋白生產之影響 53  |
| 圖4.3 不同培養體積對蛋白生產之影響 54  |
| 圖4.4 不同SCSP含量對蛋白生產之影響 55                                      |
| 圖4.5 不同濃度poly-peptone   |

對蛋白?生產之影響 56 圖4.6 不同濃度yeast extract對蛋白?生產之影響 57 圖4.7 不同pH值對蛋白?生產之影響 58 圖4.8 M. purpureus CCRC31499 蛋白?儲藏時間之影響 59 圖4.9 M. purpureus CCRC31499所生產蛋白?之分離純化流程圖 63 圖4.10 DEAD Sepharose CL-6B之蛋白?層析圖譜 64 圖4.11 Sephacryl S-200之蛋白?層析圖譜 65 圖4.12 BSA之標準檢量線 66 圖4.13 12% 之SDS-PAGE檢測酵素純化效果 71 圖4.14 酵素之等電點層析圖譜 72 圖4.15 酵素之最適反應溫度 73 圖4.16 M. purpureus CCRC31499 所生產蛋白?於100 °C之熱 穩定性探討 74 圖4.17 酵素之最適反應PH 75 圖4.18 酵素之 PH安定性 76 圖4.19 分別以2% 不同處理方式的SCSP為碳源, 其蛋白?產量之比較82 圖4.20 分別以2% 不同處理方式SCSP的上清液為碳源, 在 不同天數下之蛋白?產量之比較 83 圖4.21 分別以不同濃度且不同處理方式SCSP的為碳源, 其蛋白?產量之比較 84 圖4.22 分別以不同濃度且不同處理方式的SCSP上清液為碳 源, 其蛋白?產量之比較 85 表目錄 表2.1 水產加工廢棄物資源化之實施例 9 表2.2 列出一些工業上常見蛋白?及一些特性 15 表2.3 一些工業上重要的鹼性蛋白? 20 表2.4 各種蛋白?在醫學上之治療概況 21 表3.1 紅麴菌株最適培養條件一覽表 32 表3.2 蛋白質標準品組成之分子量 39 表4.1 M. purpureus CCRC31499 所生產蛋白?之純化表 67 表4.2 數種蛋白?抑制劑對於M. purpureus CCRC31499蛋白 ?活性的影響 77 表4.3 本研究酵素與其他蛋白?的生化活性之比較 78 表4.4 M. purpureus CCRC31499以7種處理的蝦蟹殼粉為碳 源生產蛋白?的最適條件整理 86 表4.5 植物生長促進劑對小白菜生長之重量及長度的影響 88 表 4.6 植物生長促進劑對莧菜生長之重量及長度的影響 89

## 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, 台北。 2.王三郎 (1997) 應用微生物學。高立圖書出版社, 台北。 3.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, 彰化。 4.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, 彰化。 5.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研究所碩士論文, 彰化。 6.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, 台北。 7.吳孟娟 (1997) 豬肝之酵素水解與功能特性探討。私立大葉工學院食品工程研究所碩士論文, 彰化。 8.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, 彰化。 9.陳自珍編譯 (1978) 食品酵素學。復文書局。 10.陳國誠 (1989) 微生物酵素工程學。藝軒圖書出版社。 11.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, 彰化。 12.張文重 (1977) 蛋白質分解酵素。環球書社, 台北。 13.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, 彰化。 14.楊秋忠 (1991) 土壤有機質的地力維持。土壤管理手冊, 60~170。 15.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研究所碩士論文, 彰化。 16.蔡永峰 (1996) 農水產廢棄物堆肥化之開發及應用( )瓜類育苗介質之研製及其理化性質。高雄場研究彙報, 8(1):43~54。 17.蔡永纂 (1994) 有機質添加物在防治作物線蟲病害之永續作為。農藥世界, 126(2):56~65。 18.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, 台中。 19.蕭惟仁 (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研究所碩士論文, 彰化。 20.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。 21.Adil Anwar and Mohammed Saleemuddin (1998) Alkaline protease :a review, Biores. Technol. 64:175~183. 22.Amare Gessesse, Rajni Hatti-Kaul, Berhanu A. Gashe, Bo Mattiasson. (2003) Novel alkaline proteases from alkaliphilic bacteria grown on chicken feather. Enzyme Microb. Technol. 32:519~524. 23.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. 24.Baccanti, M., and B. Colombo. (1991) A New method for the Automatic and Selective Determination of Total Organic Carbon in Sediments. Soil. Compost. Particles in Air, etc., Elemental Analyzer 研討會論文。 25.Basma Ghorbel, Alya Sellami-Kamoun, Moncef Nasri. (2003) Stability studies of protease from Bacillus cereus BG1, Enzyme Microb. Technol. 32:513~518. 26.Boonyaras Sookkheo, Supachok Sinchaikul, Suree Phutrakul, and Shei-Tein Chen. (2000) Purification and Characterization of the Highly Thermostable Proteases from Bacillus stearothermophilus TLS33, Protein Expr. Purif. 20:145~151. 27.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. 68: 1297~1304. 28.Carroad, D. A., and Tom, R. A. (1978) Bioconversion of shellfish chitin waste:process conception and selection of microorganism, J. Food Sci. 43:1158~1164. 29.Cataldo, D. A., M. Haroon., L. E. Schrader, and V. L. Youngs. (1975) Determination of nitrate in plant tissue, Soil Sci. Plant Anal., 6:71~80. 30.Cosio, I. G., Fisher, R. A. and Carroad, D. A. (1982) Bioconversion of shellfish chitin waste:waste pretreatment, enzyme production, process design, and economic analysis, J. Food Sci., 47:901~905. 31.Greenberg, A. E., J. J. Conners, and D. Jenkins. (1982) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, :543~558. 15th et., al. Pub. Health Assoc., Washington D.C. 32.Hartley, B. S. (1960) Proteolytic enzymes, Ann. Rev. Biochem. 29:45. 33.Jadwiga K, Sierecka (1998) Purification and partial characterization of a neutral protease from a virulent strain of Bacillus cerues. J. Biochem. Cell Biol. 30:579~595. 34.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. Microbial. 26: 77~86. 35.J., Yang, I., Shih, Y., Tzeng, and S., Wang (2000) Production and purification of protease from a Bacillus subtilis that can deproteinize crustacean wastes, Enzyme Microb. Technol. 26: 406~413. 36.Kim SS, Kim YJ, Rhee IK (2001) Purification and characterization of a novel extracellular protease from Bacillus cereus KCTC 3674. Arch. Microbiol. 175: 458~461. 37.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. 38.Leshchinskaya I. B., Shakirov, E. V.,

Itskovitch, E. L., Balaban, N. P., Mardanova, A. M., Sharipova, M. R., Blagova, E. V., Levdkov, V. M., Kuranova, I. P., Rudenskaya G. N., Stepanov, V. M. (1997) Glutamyl endopeptidase of *Bacillus intermedius* strain 3-19. Purification, properties, and crystallization, *Biochem. (Mosc)*. 62: 903~908. 39.Loffler, A. ( 1986 ) Proteolytic enzymes:sources and applications, *Food Technol.* 40:63~67. 40.Mathur, S. P., J. Y. Daigle, M. LEVESQUE, and H. Dinel. (1986) The feasibility of preparing high quality composts from fish scrap and peat with seaweeds or crab scrap, *Biol. Agric. Horticult.* 4:27~38. 41.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. 42.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: 896~907. 43.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: 181~183. 44.Norwitz, G., and P. N. Keliher. (1986) Study of Interferences in the Spectrophotometric Determination of Nitrite Using Composite Diazotisation-Coupling reagents, *Analyst.* 111:1033~1037. 45.Nongporn Hutadilok-Towatana, Anongnat Painupong, and Prasert Suntinalert. ( 1999 ) Purification and characterization of an Extracellular Protease from Alkaliphilic and Thermophilic *Bacillus* sp. PS719, *J. Biosci. Bioeng.* 87:581~587. 46.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, *J. Biosci. Bioeng.* 87: 61~68. 47.Palmieri G, Bianco C, Cennamo G, Giardina P, Marino G, Monti M, Sanna G. (2001) Purification, characterization, and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*, *Appl Environ Microbiol.* 67: 2754~2759. 48.Price, N. C. and Steven, L. (1999) *Fundamentals of enzymology*, pp:184~185. Oxford University Press Inc., New York. 49.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. 50.Rao, M. B., Tanisale, A. M., Chatge, M. S. and Deshpande, V. V. ( 1998 ) Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases, *Microbiol. Mol. Rev.* 62:597~635. 51.R. S. Patil, V. G., and M. V. Deshpande\* ( 2000 ) Chitinolytic enzyme:an exploration, *Enzyme Microb. Technol.* 26:473~483. 52.S. L. Wang, W. T. Chang and M. C. LU ( 1994 ) Production of Chitinase by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 Using Shrimp and Crab Shell Powder as a Carbon Source, *Life Sciences.* 21:71~78. 53.S. L. Wang, Y. H. Yen, W. J. Tsiao, W. T. Chang, and C. L. Wang ( 2002 ) Production of antimicrobial compounds by *Monascus purpureus* CCRC31499 using shrimp and crab shell powder as a carbon source, *Enzyme Microb. Technol.* 6113:1~8. 54.S. L. Wang, W. J. Hsiao, and W. T. Chang ( 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. 55.S. L. Wang, S. H. Chiou, and W. T. Chang ( 1997 ) Production of Chitinase from Shellfish Waste by *Pseudomonas aeruginosa* K-187, *Life Sciences.* 21:71~78. 56.Sun F, Liu E, Zhang Y. Wei Sheng Wu Xue Bao (1997) The properties of protease from *Bacillus sphaericus* C3-41. 37: 397~400. 57.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.