200940710

發明專利說明書

（本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※ 申請案號：97109902　C12P 21/00 (2006.01)

※ 申請日期：97.3.20　※IPC 分類：C12R 1/38 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

一、發明名稱：（中文/英文）

假單胞菌屬新種菌株及使用該新種菌株生產幾丁質酶、幾丁聚醣酶及納豆激酶之製造方法

二、申請人：（共 1 人）

姓名或名稱：（中文/英文）

淡江大學/Tamkang University

代表人：（中文/英文）張家宜/ CHANG, CHIA-I

住居所或營業所地址：（中文/英文）

台北縣淡水鎮英專路 151 號/No. 151, Ying-Chuan Road, Tamsui, Taipei County, Taiwan.

國　籍：（中文/英文）　中華民國/TW

三、發明人：（共 2 人）

姓　名：（中文/英文）

1. 王三郎
2. 陳馨仁

國　籍：（中文/英文）

1. 中華民國/TW
2. 中華民國/TW

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為：　年　月　日。

☐ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號　順序註記】

☐ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號　順序註記】

☑ 主張專利法第三十條生物材料：

☑ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼　順序註記】

寄存機構：食品工業發展研究所生物資源保存中心

寄存日期：2007 年 7 月 24 日

寄存編號：BCRC17752

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼　順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種假單胞菌屬新種菌株及使用該新種菌株生產幾丁質酶、幾丁聚醣酶及納豆激酶之製造方法。

【先前技術】

大豆本身並未含有纖維蛋白溶酶(plasmin)，必需經由接種納豆菌(*Bacillus natto*)或枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)於蒸煮過之大豆，進行納豆之發酵生產，這種激酶主要分佈在納豆表面之黏性物質中，並且被命名為納豆激酶(nattokinase)。納豆激酶為血栓之溶解酵素，不只對於防止或改善腦中風、心肌梗塞等心血管疾病有效，對於因腦內細小血管阻塞而引起之老人性癡呆症亦具效用。

人體內可直接溶解纖維蛋白的酵素只有纖維蛋白溶酶(plasmin)。通常血液中含有稱之為纖維蛋白溶酶原(plasminogen)的纖維蛋白溶酶前驅物(plasmin precursor)。所謂的纖溶系統酵素，則指可將纖維蛋白溶酶原活化成纖維蛋白溶酶的一種纖維蛋白溶酶原活化劑(plasminogen activator)。然而納豆激酶的性質類似纖維蛋白溶酶，可溶解血清中的纖維蛋白，間接的與尿激酶前驅物的活化因子(pro-urokinase activator)作用於尿激酶的前驅物(prourokinase)，產生尿激酶(urokinase)，尿激酶再作用於纖維蛋白溶酶原，形成纖維蛋白溶酶，纖維蛋白溶酶進一步溶解血栓，形成血栓降解物；透過增加纖維蛋白溶酶來減少血栓的形成。

納豆激酶除了由發酵納豆而獲得外，亦有由細菌、放線菌、真菌與藻類中發現此類酵素之存在。惟目前尚未有以假單胞菌屬(*Pseudomonas* sp.)或桿菌屬(*Bacillus* sp.)以外細菌生產納豆激酶之習知技術。

蝦蟹殼廢棄物富含蛋白質及幾丁質，若能利用微生物將其發酵，生產具高附加價值之生理活性物質，不僅可解決處理此類水產加工廢棄物之環保問題，亦可藉由納豆激酶的生產而提高其利用價值。

【發明內容】

本發明之目的即在於提供一種被命名為TKU015的假單胞菌屬(*Pseudomonas* sp.)新種菌株(基因庫編號EU103629，我國食品工業發展研究所生物資源保存中心寄存編號BCRC17752)，其可作為幾丁質酶、幾丁聚醣酶及納豆激酶的生產菌。

本發明之另一目的係在於提供一種納豆激酶之之生產方法，其係利用該新種菌株TKU015發酵含幾丁質之水產加工廢棄物生產，不僅可解決處理此類水產加工廢棄物之環保問題，亦可藉由納豆激酶的生產而提高其利用價值。

其中，被命名為TKU015的新種菌株(以下簡稱為TKU015)係以蝦殼粉為唯一碳/氮源，篩選自台灣北部土壤之一株幾丁質酶及幾丁聚醣酶生產菌，經鑑定為假單胞菌屬(*Pseudomonas* sp.)。

利用該假單胞菌屬(*Pseudomonas* sp.)新種菌株TKU015，發酵含幾丁質之水產加工廢棄物，可生產製成一

種納豆激酶。該含幾丁質之水產加工廢棄物包括蝦蟹殼、烏賊軟骨、菇蕈類及粗製之幾丁質；該幾丁質之水產加工廢棄物濃度範圍在0.1-3%之間，較佳之範圍在0.2-1.5%。

TKU015生產幾丁質酶及幾丁聚醣酶之較適培養條件為含有0.5%蝦殼粉、0.1% K_2HPO_4及0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$之液態培養基(pH 8)在30℃搖瓶培養3天。所得發酵上清液，經硫酸銨沉澱、DEAE-Sepharose、Phenyl-Sepharose及Sephacryl S-100等層析步驟，純化出一種幾丁質酶及一種幾丁聚醣酶，經SDS-PAGE測其分子量分別為68 kDa及30 kDa。於最適反應pH、最適反應溫度、pH安定、熱安定性方面，幾丁質酶的為pH 5、50℃、pH 5-7及<60℃；幾丁聚醣酶的為pH 4、50℃、pH 3-9及<50℃。幾丁質酶活性受Mn^{2+}、Fe^{2+}所抑制，幾丁聚醣酶活性則受Mn^{2+}、Cu^{2+}、PMSF所抑制。

TKU015生產納豆激酶之較適生產條件為含有1% 蝦殼粉、0.1% K_2HPO_4及0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 之液態培養基(pH 7)於30℃搖瓶培養2天。所得發酵上清液，經硫酸銨沉澱、DEAE-Sepharose及Phenyl-Sepharose等層析分離步驟，純化出一種納豆激酶。經SDS-PAGE測其分子量為21 kDa，其最適反應pH、最適反應溫度、pH安定、熱安定性則分別為pH 7、50℃、pH 4-11及<37℃。納豆激酶活性受PMSF完全抑制，Fe^{2+}則會提高其活性。

【實施方式】

【TKU015新種菌株之篩選】

將採集之土壤，以無菌水稀釋至適當濃度後塗抹於含1% 蝦殼粉(SSP)、0.1% K_2HPO_4、0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$及1.5% 瓊脂(agar)之固態培養基，於30℃培養2天，觀察菌落生長情形，再將單一菌落分別接種至NA培養基於30℃培養1天後，保存於4℃備用。針對篩選所得之單一菌株，以液態培養基(1% SSP、0.1% K_2HPO_4、0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$)進行搖瓶培養，100 mL液態培養基於250 mL錐形瓶中，30℃搖瓶培養2天，取其離心上清液，測試所含幾丁質酶及幾丁聚醣酶之活性。

【TKU015菌株之特性】

如圖1所示的顯微鏡照片，該TKU015為革蘭氏陰性桿菌，具觸酶、氧化酶及運動性，於好氧及厭氧環境下均會生長，不會產生孢子。

又如圖2所示的16S rDNA部分核酸序列分析，TKU015最接近假單胞菌屬(*Pseudomonas* sp.)，相似度達97 %以上。

根據葡萄糖代謝型式結果顯示，TKU015為氧化型，符合*Pseudomonas*屬之描述。

根據脂肪酸組成份分析，TKU015之主要脂肪酸為$C_{16:0}$及$H_{18:1\omega7c}$，並且含有hydroxylated fatty acids $C_{10:0\ 3OH}$、$C_{12:0\ 2OH}$及$C_{12:0\ 3OH}$，缺乏$C_{16:0\ 2OH}$及$C_{16:0\ 3OH}$，符合*Pseudomonas*屬之描述。

【幾丁質之製備】

a.將烏賊軟骨粉與2N氫氧化鈉溶液以3:40 (w/v)之比例混合，於100℃水浴30分鐘，經過濾可得殘渣與濾液，殘渣

於60℃烘乾並秤重。將烘乾所得殘渣，以1:8 (w/v)之比例與2N鹽酸溶液混合，於室溫下浸漬2天，經過濾可得殘渣與濾液，殘渣於60℃烘乾並秤重。

b.取5g上述之烏賊軟骨粉末，緩慢加入50mL之12N鹽酸溶液，均勻攪拌1小時後，將之倒入蒸餾水中，沉澱後除去上清液，再以50mL、pH 7磷酸緩衝溶液清洗，重複步驟直至上清液pH為7，除去上清液所得之沉澱物即為懸浮態幾丁質，儲存於4℃備用，作為幾丁質酶活性測定之基質。

TKU015生產幾丁質酶及幾丁聚醣酶之較適培養條件為含有0.5%蝦殼粉、0.1% K_2HPO_4及0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$之液態培養基(pH 8)在30℃搖瓶培養3天。所得發酵上清液，經硫酸銨沉澱、DEAE-Sepharose、Phenyl-Sepharose及Sephacryl S-100等層析步驟，純化出一種幾丁質酶及一種幾丁聚醣酶，經SDS-PAGE測其分子量分別為68 kDa及30 kDa。於最適反應pH、最適反應溫度、pH安定、熱安定性方面，幾丁質酶的為pH 5、50℃、pH 5-7及<60℃；幾丁聚醣酶的為pH 4、50℃、pH 3-9及<50℃。幾丁質酶活性受Mn^{2+}、Fe^{2+}所抑制，幾丁聚醣酶活性則受Mn^{2+}、Cu^{2+}、PMSF所抑制。

【納豆激酶之活性測定】

以生產幾丁質酶之較適培養條件(0.5%蝦殼粉(SSP)、0.1% K_2HPO_4、0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、pH 8、100mL/250 mL，於30℃下培養3天)獲得之上清液，分別以casein及*N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-pNa作為基質，測其蛋白酶活性。

當以casein為基質時，並未測得活性，但以*N*-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*Na為基質時，則有活性表現，代表酵素含有納豆激酶活性(0.02 FU/mL)。綜合前述結果，TKU015以SSP培養所得之上清液同時存在幾丁質酶、幾丁聚醣酶及納豆激酶。

【碳/氮源之選擇】

因以生產幾丁質酶之較適生產條件所得之上清液，亦同時存在幾丁聚醣酶及納豆激酶活性，為求於培養上清液中獲得較大效益，所以納豆激酶之碳源便以SSP為主，再探討其不同之條件。而生產納豆激酶較佳之濃度為1%之SSP (3.8 FU/mL) (請參照圖3)。

【納豆激酶較適生長條件】

如上所述TKU015生產納豆激酶的較適碳/氮源為1% SSP。於不同溫度(25℃、30℃、37℃)分別培養1-4天，結果如圖4所示，於30℃培養2天可得較佳之納豆激酶(4 FU/mL)，30℃亦為培養幾丁質酶之最適溫度。

較適培養pH方面，於含1% SSP之不同pH (5-10)培養基，於30℃培養1-4天，結果如圖5所示，以pH 7之培養基可得較高之納豆激酶活性(5 FU/mL)。

不同培養液體積方面，以250 mL之三角錐形瓶，分裝不同體積之培養基(50 mL、100 mL、150 mL、200 mL)，於含1% SSP之pH 8培養基，於30℃培養1-4天，結果如圖6所示，以培養體積為100 mL時，可得較佳之納豆激酶活性(5.5 FU/mL)。

綜合上述實驗結果，納豆激酶之較適生產條件為：於100 mL含1% SSP、0.1% K_2HPO_4、0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$之液體培養基(pH 7)，於30℃搖瓶培養2天，可獲得較佳之納豆激酶活性。

圖7為於100 mL含0.5% SSP、0.1% K_2HPO_4、0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$之液體培養基(pH 8)，於30℃搖瓶培養*Pseudomonas* sp. TKU015所得之生長曲線圖，由圖7得知，納豆激酶於第二天時可得較佳活性，隨著培養時間增加，其活性亦明顯下降，而幾丁質酶與幾丁聚醣酶則皆於第三天得較佳活性。

【納豆激酶之分離純化】

粗酵素液製備：將TKU015於較適培養條件所得發酵液經離心及硫酸銨沉澱，所得離心沉澱物經以少量50 mM磷酸緩衝液(pH 7)回溶及於4℃透析之後，所得透析內液即為粗酵素液(50 mL)。

陰離子交換層析：將粗酵素液注入管柱，進行DEAE-Sepharose CL-6B管柱層析，流速為4 mL/min，每6 mL收集為一管，收集未吸附之蛋白質，之後再以含有1 M NaCl之50 mM磷酸緩衝液(pH 7)由0-1 M之梯度沖提，沖提出被吸附之蛋白質，發現納豆激酶出現於未吸附區，將之收集為納豆激酶溶液(100 mL)。

疏水性層析：將80 mL納豆激酶溶液(酵素液含有1 M硫酸銨)，注入Phenyl Sepharose 6 Fast Flow管柱中，流速為4 mL/min，每6 mL收集為一管，首先以含1M硫酸銨之50 mM

磷酸緩衝液(pH 7)沖提，後以含有1-0 M硫酸銨之50 mM磷酸緩衝液(pH 7)拉梯度沖提，改變管柱內疏水程度，依照不同疏水程度達到分離目的，最後再以50 mM磷酸緩衝液(pH 7)沖提出疏水性之蛋白質。收集具有納豆激酶活性之區間(70 mL)，進行酵素特性分析及SDS-PAGE分析其分子量。

綜合結果：納豆激酶純化過程中，納豆激酶存於DEAE-Sepharose管柱中未被吸附區，經後續之Phenyl-Sepharose疏水性層析分離，可純化出TKU015納豆激酶(45 mg)。由DEAE-Sepharose於pH 7之分離結果顯示，幾丁聚醣酶及納豆激酶皆出現於未被吸附區，其兩者之等電點應該屬於鹼性pH。

由Phenyl-Sepharose之分離結果顯示，幾丁聚醣酶出現於拉梯度之後，因而推測其為疏水性蛋白質，納豆激酶出現於拉梯度之前，因而推測其為親水性蛋白質。納豆激酶之純化倍率為5.1。

【納豆激酶之分子量測定】

SDS-PAGE：以12.5 %之SDS-PAGE分析分子量(如圖8所示)，Lane 1為粗酵素液，Lane 4為TKU015納豆激酶，分子量約為21 kDa。

綜合結果：TKU015納豆激酶分子量約為21 kDa，如表1所示，微生物源之納豆激酶分子量大都介於20-45 kDa，目前並未發現*Pseudomonas*納豆激酶之相關研究，TKU015納豆激酶分子量(21 kDa)與來自於細菌屬之納豆激酶分子量來的小，而其分子量則較相近來自於真菌屬之納豆激酶，例

如*Armillaria mellea* AMMP (21 kDa)；*Rhizopus chinensis*. 12(18 kDa)。如表1所示，納豆激酶大都被發現於細菌與真菌，來自於細菌之分子量通常介於30 kDa之間，而此*Pseudomonas* sp. TKU015生產之納豆激酶分子量，則較相近於真菌。

表1：微生物來源之納豆激酶特性比較

微生物來源	分子量 (kDa)	最適酸鹼值(pH)	最適溫度 (℃)	蛋白酶種類	引用文獻
Pseudomonas sp.TKU015	21	7	50	Serine	
Streptomyces spp. SW-1	30	8		Serine and Metallo	Wang *et al.*, 1999
Rhizopus chinensis. 12	18	10.5	45		Xiao-Lan *et al.*, 2005
Bacillus natto Nattokinase	27.7			Serine	Fujita *et al.*, 1993
Bacillus amyloliquefaciens DC-4	28	9	48	Serine	Peng *et al.*, 2003
Bacillus subtilis CK	28.2	10	70	Serine	Kim *et al.*, 1996
Bacillus sp. subtilisin DJ-4	29	10	40	Serine	Kim and Choi, 2000
Bacillus sp. subtilisin QK-2	28	8.5	55	Serine	Ko *et al.*, 2004
Bacillus subtilis BK-17	31			Metallo	Jeong *et al.*, 2001
Bacillus subtilis KCK-7	44	8	50	Serine	Paik *et al.*, 2004
Bacillus sp. KA38	41	7	40	Metallo	Kim *et al.*, 1997
Bacillus subtilis strain A1	31.4	7	50	Metallo	Jeong *et al.*, 2004
Armillaria mellea AMMP	21	6	33	Metallo	Lee *et al.*, 2005
Bacillus sp. KDO-13	45	7	60	Metallo	Lee *et al.*, 2001

表一中所述引用文獻註明如下：

1. Wang *et al.*, 1999: Wang J, Wang M, Wang Y (1999) Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Streptomyces* spp. Chin.

J. Biotechnol. 15: 83-89.

2. Xiao-Lan *et al.*, 2005: Liu XL, Du LX, Lu FP, Zheng XQ, Xiao J. (2005) Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Rhizopus chinensis* 12, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67: 209–214.

3. Fujita *et al.*, 1993: Fujita M, Nomura K, Hong K, Ito Y, Asada A, Nishimuro S (1993) Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 197: 1340-1347.

4. Peng *et al.*, 2003: Peng Y, Huang Q, Zhang RH, Zhang YZ (2003) Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 screened from douchi, a traditional Chinese soybean food. *Comp. Biochem. Physiol. Biochem. Mol. Biol.* 134: 45-52.

5. Kim *et al.*, 1996: Kim W, Choi K, Kim Y, Park H, Choi J, Lee Y, Oh H, Kwon I, Lee S (1996) Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1488-2482.

6. Kim and Choi, 2000: Kim SH, Choi NS (2000) Purification and characterization of subtilisin DJ-4 secreted by *Bacillus* sp. strain DJ-4 screened from Doen-Jang. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 1722–1725.

7. Ko *et al.*, 2004: Ko JH, Yan JP, Zhu L, Qi YP (2004) Identification of two novel fibrinolytic enzymes from *Bacillus subtilis* QK02. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol.* Pharmacol. 137: 65-74.

8. Jeong *et al.*, 2001: Jeong YK, Park JU, BaekH, Park SH, Kong IS, Kim DW, Joo WH (2001) Purification and biochemical characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* BK-17. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 89-92.

9. Paik *et al.*, 2004: Paik HD, Lee SK, Heo S, Kim SY, Lee H, Kwon TJ (2004) Purification and characterization of the fibrinolytic enzyme produced by *Bacillus subtilis* KCK-7 from Chungkookjang. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 829-835.

10. Kim *et al.*, 1997: Kim HK, Kim GT, Kim DK, Choi WA, Park SH, Jeong YK, Kong IS (1997) Purification and characterization of a novel fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KA38 originated from fermented fish. *J. Ferment. Bioeng.* 84: 307-312.

11. Jeong *et al.*, 2004: Jeong YK, Kim JH, Gal SW, Kim JE, Park SS, Chung

KT, Kim YH, Kim BW, Joo WH (2004) Molecular cloning and characterization of the gene encoding a fibrinolytic enzyme from *Bacillus subtilis* Strain A1. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 711-717.

12. Lee *et al.*, 2005: Lee SY, Kim JS, Kim JE, Sapkota K, Shen MH, Kim S, Chun HS, Yoo JC, Choi HS, Kim MK, Kim SJ (2005) Purification and characterization of fibrinolytic enzyme from cultured mycelia of *Armillaria mellea*. Protein *Expr. Purif.* 43: 10-17.

13. Lee *et al.*, 2001: Lee SK, Bae DH, Kwon TJ, Lee SB, Lee HH, Park JH, Heo S, Johnson MG (2001) Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme from *Bacillus* sp. KDO-13 isolated from soybean paste. *J. Microbiol. Biotechnol.* 11: 845-852.

【納豆激酶之特性分析】

TKU015納豆激酶之最適溫度及熱安定性分別為50℃及< 37℃。如表1所示，納豆激酶之最適溫度及熱安定性大部分皆為37-50℃及< 50℃，最適溫度方面，其他細菌屬納豆激酶與TKU015納豆激酶相近的有，*Bacillus subtilis* KCK-7 (50℃)；*Bacillus subtilis* Strain A1 (50℃)；*Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 (48℃)。熱安定性方面，TKU015納豆激酶對熱較不安定，與其相似者亦為來自於真菌之*Rhizopus chinensis*.12 (< 37℃)；*Fomitella fraxinea* FFP2 (< 40℃), (Park *et al.*, 2005)，依上述比較結果推測，*Pseudomonas* sp. TKU015納豆激酶分子量及溫度特性與來自於真菌之納豆激酶相似。

TKU015納豆激酶之最適pH及pH安定性分別為pH 7及pH 4-11。如表1所示，納豆激酶之最適pH多介於中性偏鹼之範圍，pH安定性大部分皆為pH 7-10，最適溫度方面，其他細菌屬納豆激酶與TKU015納豆激酶相近的有，*Bacillus*

sp. KA38 (pH 7)；*Bacillus* sp. KDO-13 (pH 7)；*Bacillus subtilis* Strain A1 (pH 7)，pH安定性方面，TKU015納豆激酶於微酸至微鹼皆安定，而於pH 11還殘餘80 %之活性，與TKU015納豆激酶相似者有，*Bacillus amyloliquefaciens* DC-4 (pH 4-11)；*Bacillus* sp. subtilisin QK-2 (pH 3-12)。

表2可得知純化出之TKU015納豆激酶受PMSF完全抑制，屬於絲胺酸型蛋白酶(serine-type protease)，而Fe^{2+}可提高其活性。如表1所示，其他細菌屬納豆激酶受PMSF抑制的有，*Bacillus amyloliquefaciens* DC-4；*Bacillus* sp. strain DJ-4；*Bacillus subtilis* QK-2；*Bacillus subtilis* KCK-7；*Bacillus natto* NK (Fujita *et al.*, 1993)；*Bacillus subtilis* DC33 (Wang *et al.*, 2006)。當Fe^{2+}於5 mM時，納豆激酶活性提高為原活性之232 %，納豆激酶其活性受Ca^{2+}、Cu^{2+}及Mg^{2+}影響而提高活性(Peng *et al.*, 2005)，而TKU015納豆激酶為Fe^{2+}，而Ca^{2+}、Cu^{2+}及Mg^{2+}並不影響酵素活性。

表 2　金屬離子對TKU015納豆激酶活性之影響

金屬離子	濃度 (mM)	相對活性(%) TKU015納豆激酶
None(無)	0	100
Mg^{2+}	5	104
Cu^{2+}	5	95
Fe^{2+}	5	232
	10	156
Mn^{2+}	5	102
Zn^{2+}	5	94
Ba^{2+}	5	109
Ca^{2+}	5	108
Al^{3+}	5	101
EDTA	5	117
PMSF	5	45
	10	0

相對活性 100 %為19 FU/mL

表3為不同界面活性劑與不同濃度對TKU015納豆激酶之影響，結果顯示，酵素於0.5、1、2 mM SDS存在下，還殘餘50 %之活性，當酵素於0.5、1、2 % (v/v)不同濃度之Triton X-100存在下，其活性亦隨之提高為原活性之160 %、206 %、344 %。至於同屬之*Pseudomonas aeruginosa* PseA蛋白酶於SDS (0.1 %)存在下，還殘餘61 %之活性，於

Triton X-100 (0.1 %、0.5 %)存在下，PseA蛋白酶活性不受影響(Khare *et al.*, 2005)。

表 3　界面活性劑對TKU015納豆激酶活性之影響

界面活性劑	濃度	相對活性(%)
		TKU015納豆激酶
None(無)	0	100
SDS	0.5(mM)	66
	1	56
	2	56
Tween 20	0.5(%)	76
	1	70
	2	85
Tween 40	0.5(%)	94
	1	70
	2	82
Triton X-100	0.5(%)	160
	1	206
	2	344

相對活性 100 %為18 FU/mL

表4為不同有機溶劑對TKU015納豆激酶之影響，結果顯示，TKU015納豆激酶於丙酮存在下提高活性為150 %，而甲醇、甲苯及二甲苯對酵素活性不影響，其餘則維持70 %之活性，乙醚則會抑制50 %之活性，至於同屬之

*Pseudomonas*蛋白酶方面，*Pseudomonas aeruginosa* PseA, (Khare *et al.*, 2005)於甲苯、二甲基甲醯胺(*N*, *N*-dimethylformamide，以下簡稱DMF)及存在下不影響活性；*Pseudomonas aeruginosa* PST-01, (Ogino *et al.*, 1999)於甲苯、DMF、丙酮存在下則不影響活性；*Pseudomonas aeruginosa* san-ai strain, (Lee *et al.*, 2006)於DMF存在下不影響活性，TKU015納豆激酶與PseA、PST-01及san-ai蛋白酶同樣於DMF存在下還殘餘80 %之活性，此外，TKU015納豆激酶與PST-01蛋白酶於丙酮存在下活性分別提高為150 %及200 %。安定性方面，TKU015納豆激酶與有機溶劑混合後，於25℃及4℃下分別放置10天。結果如表5所示，於25℃及4℃條件下，各種有機溶劑對納豆激酶活性皆不影響，此現象亦發現同樣來自於*Pseudomonas*屬之PseA及san-ai蛋白酶(Khare *et al.*, 2005), (Lee *et al.*, 2006)。

表 4　有機溶劑對TKU015納豆激酶活性之影響

有機溶劑	相對活性(%)
	TKU015納豆激酶
None(無)	100
甲醇(methanol)	96
乙醇(ethanol)	65
乙醚(ethyl ether)	43
甲苯(toluene)	106
乙基醋酸鹽(ethyl acetate)	70
乙氰(acetonitrile)	88
丙酮(acetone)	150
丁醇(butanol)	70
異戊醇(isoamylalcohol)	60
異丙醇(isopropylalcohol)	68
己烷(hexane)	66
二甲苯(xylene)	96
二甲亞楓(DMSO)	80
二甲基甲醯胺(DMF)	64

相對活性 100 %為20 FU/mL

將*Pseudomonas* sp. TKU015培養於以蝦殼粉為碳/氮原之液態培養基(100 mL/250 mL)，於30℃分別培養2、3天可得幾丁質酶、幾丁聚醣酶及納豆激酶活性，發酵上清液經硫酸銨沉澱、DEAE-Sepharose、Phenyl-Sepharose、Sephacryl S-100等層析步驟，可得純度較高之三種酵素(幾丁質酶、幾丁聚醣酶及納豆激酶)，經SDS-PAGE測其分子量分別為68、30及21 kDa。酵素最適反應pH、最適反應溫度、pH安定、熱安定性方面，幾丁質酶的為pH 5、50℃、pH 5-7及<60℃；幾丁聚醣酶的為pH 4、50℃、pH 3-9及<50℃；納豆激酶的為pH 7、50℃、pH 4-11及<37℃。幾丁質酶活性受Mn^{2+}、Fe^{2+}所抑制，幾丁聚醣酶活性則受Mn^{2+}、Cu^{2+}、PMSF所抑制，納豆激酶活性受PMSF完全抑制，屬於絲胺酸型蛋白酶(serine-type protease)，Fe^{2+}則會提高其活性。有機溶劑方面，幾丁質酶受丙酮所影響，幾丁聚醣酶受乙氰所影響，納豆激酶則受所乙醚影響，耐有機溶劑方面，於25℃及4℃下分別放置10天，對幾丁質酶而言，於25℃不影響者有甲苯、二甲苯及DMF，其餘皆降低活性，於4℃影響酵素活性者有乙醚、乙氰及丙酮，對幾丁聚醣酶而言，於25℃不影響者有甲苯、二甲苯及DMF，其餘皆降低活性，於4℃影響酵素活性者有乙醚及丙酮，對納豆激酶而言，25℃及4℃對活性皆不影響。

蝦蟹殼廢棄物富含蛋白質及幾丁質，若能利用微生物將其發酵，生產具高附加價值之生理活性物質，不僅可解決理此類水產加工廢棄物之環保問題，亦可藉由納豆激酶

的生產而提高其利用價值。

上列詳細說明係針對本發明之一可行實施例之具體說明，惟該實施例並非用以限制本發明之專利範圍，凡未脫離本發明技藝精神所為之等效實施或變更，均應包含於本案之專利範圍中。

【圖式簡單說明】

圖1為本發明所提供假單胞菌屬(*Pseudomonas* sp.)新種菌株TKU015之顯微鏡照片；

圖2為該新種菌株TKU015之16S rDNA部份核酸序列分析圖；

圖3為SSP濃度對TKU015納豆激酶生產之影響的曲線圖；

圖4為培養溫度對TKU015納豆激酶活性生產之影響的曲線圖；

圖5為酸鹼值對TKU015納豆激酶活性生產之影響的曲線圖；

圖6為培養液體積對TKU015納豆激酶活性生產之影響的曲線圖；

圖7為該新種菌株TKU015培養於SSP培養基所生產幾丁質酶、幾丁聚醣酶及納豆激酶之生長曲線圖；以及

圖8為使用該新種菌株TKU015所生產各種酵素之SDS-PAGE電泳分析圖。

五、中文發明摘要：

一種假單胞菌屬(*Pseudomonas* sp.)新種菌株TKU015(基因庫編號EU103629，食品工業發展研究所生物資源保存中心的寄存編號BCRC17752)，並利用該新種細菌，發酵以蝦殼廢棄物為唯一碳/氮源之液體培養基，可自所得上清液純化出一種幾丁質酶、幾丁聚醣酶及納豆激酶。此菌生產納豆激酶之較適條件為：於1%蝦殼粉、0.1%磷酸氫鉀、0.05%硫酸鎂之100毫升液體培養基(pH 7)，於30℃搖瓶培養2天者。

六、英文發明摘要：

（略）

十、申請專利範圍：

1. 一種假單胞菌屬(*Pseudomonas* sp.)新種菌株TKU015，其寄存編號為BCRC17752，可作為幾丁質酶、幾丁聚醣酶及納豆激酶的生產菌。

2. 如申請專利範圍第1項所述之假單胞菌屬(*Pseudomonas* sp.)新種菌株TKU015，係以蝦殼粉為唯一碳/氮源，篩選自土壤所培養而成者。

3. 如申請專利範圍第2項所述之假單胞菌屬(*Pseudomonas* sp.)新種菌株TKU015，其係將採集之土壤，以無菌水稀釋至適當濃度後塗抹於含0.2-1.5% 蝦殼粉(SSP)、0.05-0.2% K_2HPO_4、0.02-0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$及0.5-3% 瓊脂(agar)之固態培養基，培養一段時間所得者。

4. 一種同時具有幾丁質酶、幾丁聚醣酶及納豆激酶活性的上清液，其係得自申請專利範圍第1項之假單胞菌屬(*Pseudomonas* sp.)新種菌株TKU015之培養物。

5. 如申請專利範圍第4項所述之的上清液，其係將篩選所得之假單胞菌屬(*Pseudomonas* sp.)新種菌株TKU015，以液態培養基(0.2-1.5% 蝦殼粉(SSP)、0.05-0.2% K_2HPO_4、0.02-0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$)進行搖瓶培養所取得的離心上清液。

6. 如申請專利範圍第5項所述之上清液，其用以生產幾丁質酶及幾丁聚醣酶之較適培養條件為含有0.5%蝦殼粉、0.1% K_2HPO_4及0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$之液態培養基(pH 8)在30℃搖瓶培養3天；所得發酵上清液，經硫酸銨沉澱及層析步驟，予以分離純化出一種幾丁質酶及一種幾丁聚醣酶者。

7. 一種納豆激酶之製造方法，其係利用申請專利範圍第1項之假單胞菌屬(*Pseudomonas* sp.)新種菌株TKU015，發酵含幾丁質之水產加工廢棄物，生產製成如申請專利範圍第3項的上清液，並由該上清液經由分離純化處理製成者。

8. 如申請專利範圍第7項所述之納豆激酶之製造方法，其中該含幾丁質之水產加工廢棄物包括蝦蟹殼、烏賊軟骨、菇蕈類及粗製之幾丁質。

9. 如申請專利範圍第7項所述之納豆激酶之製造方法，其中該幾丁質之水產加工廢棄物濃度範圍在0.1-3%之間，較佳之範圍在0.2-1.5%。

10. 如申請專利範圍第7項所述之納豆激酶之製造方法，係將篩選所得之假單胞菌屬(*Pseudomonas* sp.)新種菌株TKU015，以含有0.2-1.5% 蝦殼粉、0.05-0.2% K_2HPO_4及0.02-0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 之液態培養基進行搖瓶培養所製成者。

11. 如申請專利範圍第10項所述之納豆激酶之製造方法，其中該納豆激酶之較適生產條件為：於100 mL含1%蝦殼粉、0.1% K_2HPO_4、0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$之液體培養基(pH 7)，於30℃搖瓶培養2天所製成者。

12. 如申請專利範圍第7項所述之納豆激酶之製造方法，其中該分離純化處理，包括有下列步驟：

a. 粗酵素液製備：將該上清液經離心及硫酸銨沉澱，所得離心沉澱物經以少量磷酸緩衝液回溶及透析得一粗酵素液；

b. 陰離子交換層析：將粗酵素液注入管柱進行管柱層析，

收集未吸附之蛋白質，之後再以磷酸緩衝液由0-1 M之梯度沖提，沖提出被吸附之蛋白質，並於未吸附蛋白質區收集為一納豆激酶溶液；以及

c. 疏水性層析：將納豆激酶溶液，注入管柱中以含硫酸銨之磷酸緩衝液沖提，並改變管柱內疏水程度，依照不同疏水程度達到分離目的，藉以純化出納豆激酶者。

GATCCCCGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGA
TGACGGGAGCTTNCTCCTTGATTCAGCGGCGGACGGTGAGTAATGCCTAGGAATCT
GCCTGGTAGTGGGGGACAACGTTCCGAAAGGAGCGCTAATACCGCATACGTCCTAC
GGGAGAAAGTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGTCGGATTA
GCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAACTGGTCTGAGAGG
ATGATCAGTCACACTGGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT
GGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGA
AGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACC
TTGCTGTTTTGACGTTCCGACAGAATAACACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGC
GGTAATACAGAGGTGCAAGCGTTATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCGTAGTG
GTTCGTTAAGTTGG

圖 2

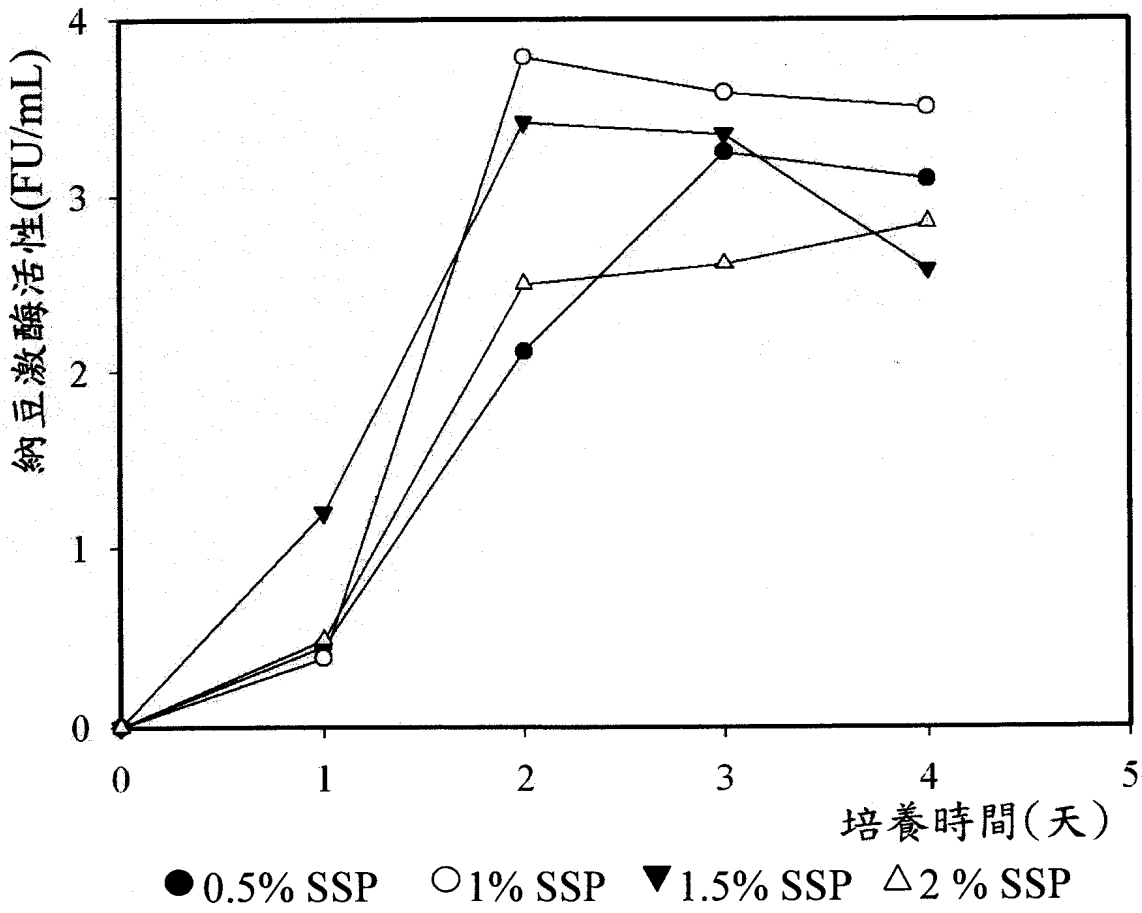

圖 3

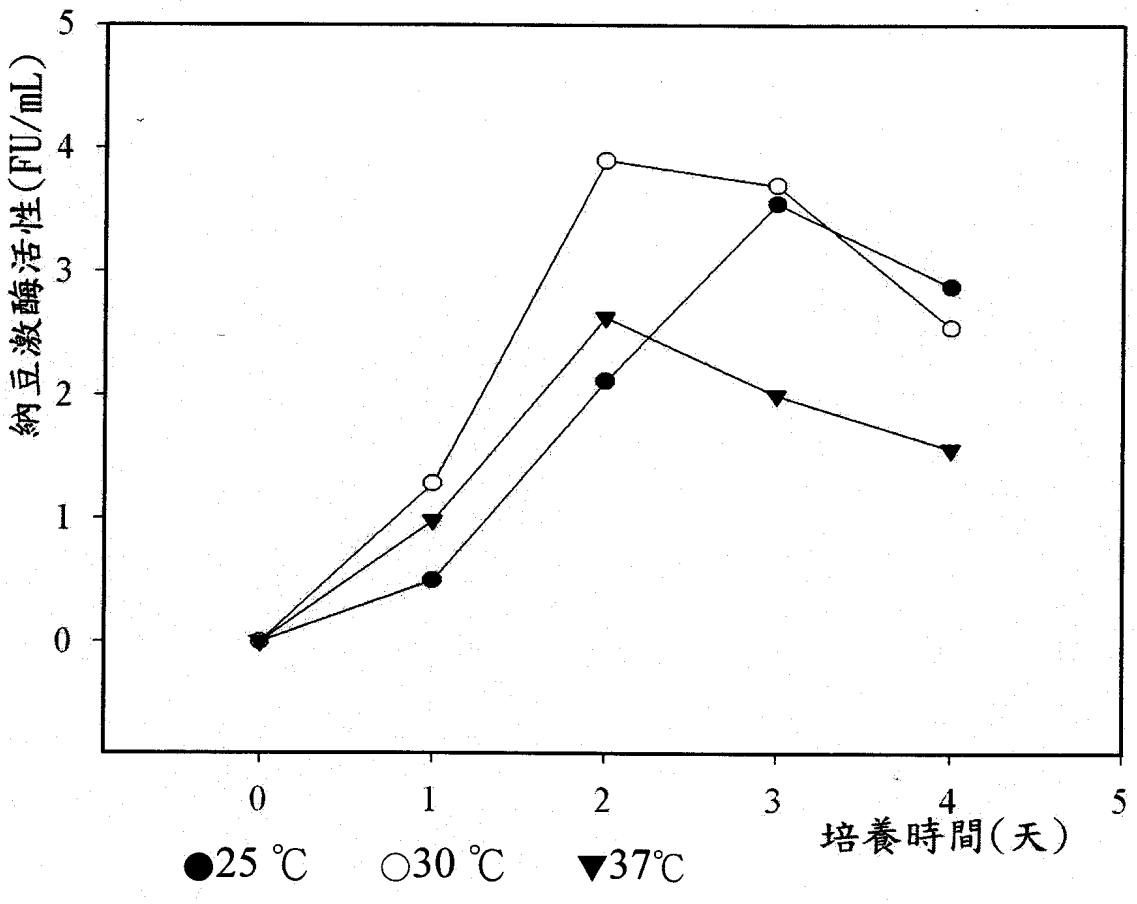

圖 4

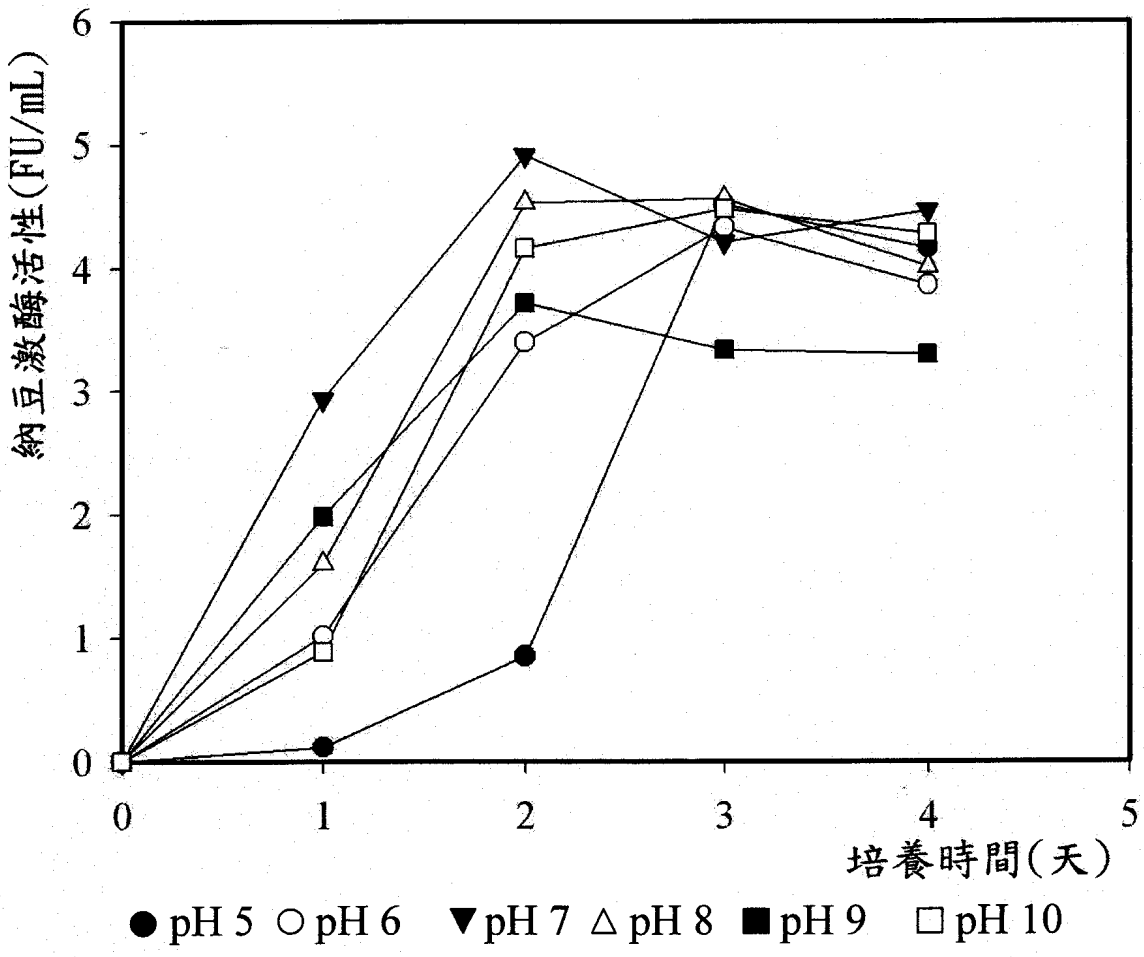

圖 5

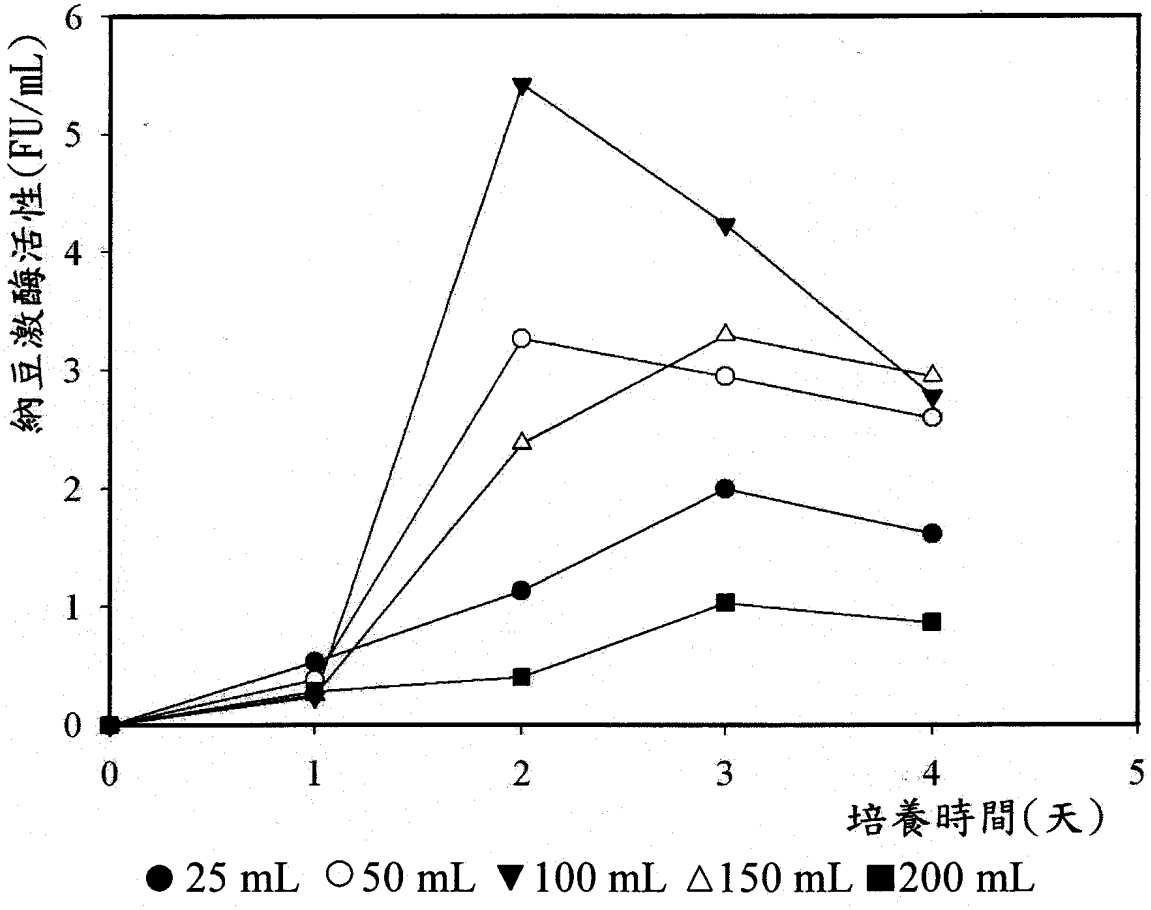

圖 6

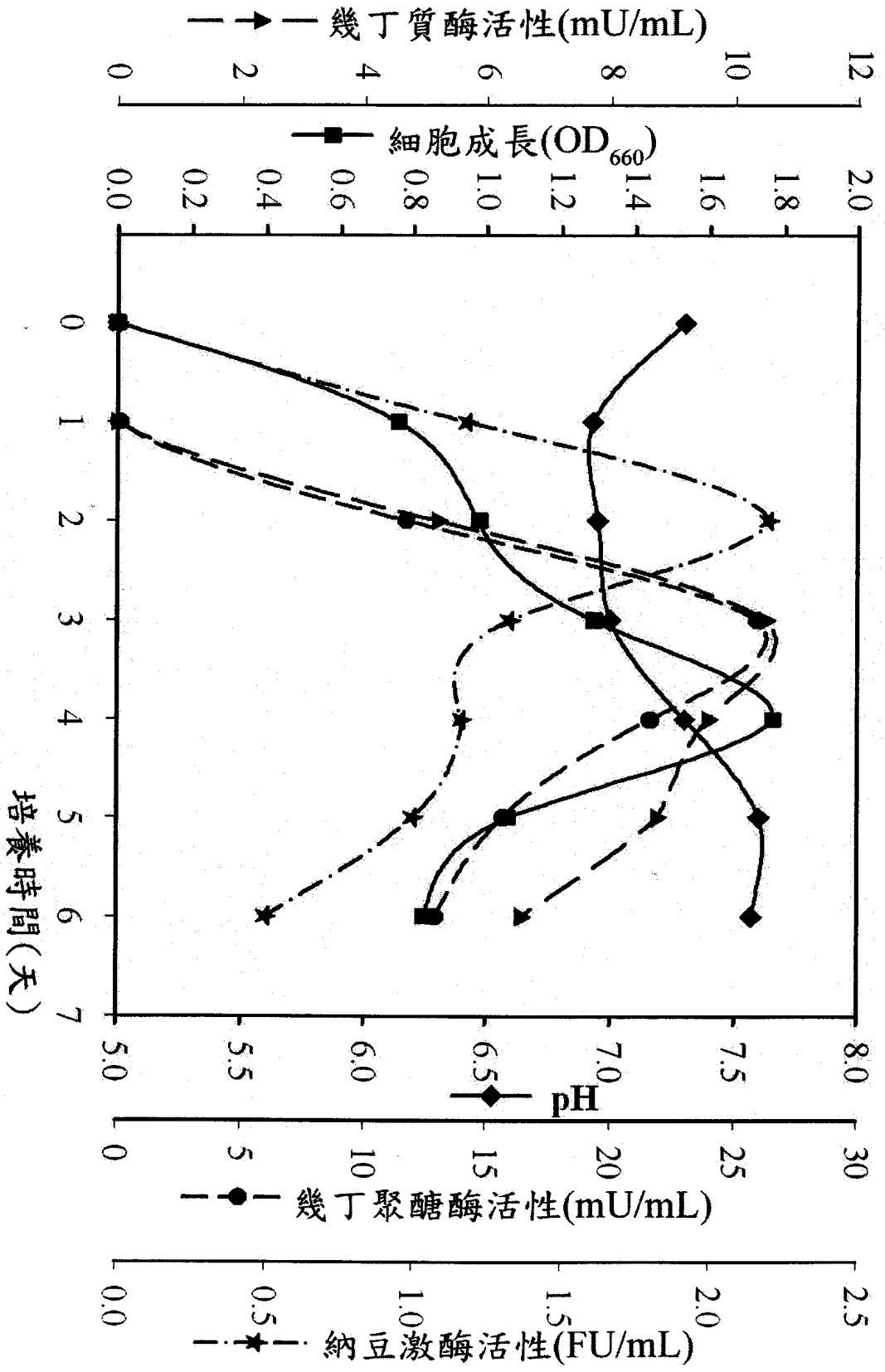

圖 7

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 1 ）圖。

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

200940710

97 7 23

發明專利說明書

（本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※ 申請案號： 97109902

※ 申請日期： **※IPC 分類：**

一、發明名稱：（中文/英文）

假單胞菌屬新種菌株及使用該新種菌株生產幾丁質酶、幾丁聚醣酶及納豆激酶之製造方法

二、申請人：（共 1 人）

姓名或名稱：（中文/英文）

私立淡江大學/Tamkang University

代表人：（中文/英文）張家宜/ CHANG, CHIA-I

住居所或營業所地址：（中文/英文）

台北縣淡水鎮英專路 151 號/No. 151, Ying-Chuan Road, Tamsui, Taipei County, Taiwan.

國　籍：（中文/英文）　中華民國/TW

三、發明人：（共 2 人）

姓　名：（中文/英文）

1. 王三郎
2. 陳馨仁

國　籍：（中文/英文）

1. 中華民國/TW
2. 中華民國/TW