

【11】證書號數：I344992

【45】公告日：中華民國 100(2011)年 07 月 11 日

【51】Int. Cl. : C12P1/04 (2006.01) C12P19/08 (2006.01)

發明

全 11 頁

【54】名稱：生產改質幾丁質之方法及應用該改質幾丁質純化幾丁質酵素之方法

【21】申請案號：094136849 【22】申請日：中華民國 94(2005)年 10 月 21 日

【11】公開編號：200716754 【43】公開日期：中華民國 96(2007)年 05 月 01 日

【72】發明人：劉永銓(TW)；黃振文(TW)；林鎧民(TW)

【71】申請人：國立中興大學 NATIONAL CHUNGHSING
UNIVERSITY

臺中市南區國光路 250 號

【74】代理人：桂齊恆；閻啟泰

[57]申請專利範圍

1. 一種純化幾丁質酵素之方法，其係包括：提供 BCRC 910300 類芽孢桿菌(*Paenibacillus sp.*)；將該類芽孢桿菌加入含有幾丁質的培養基進行發酵；自發酵液中分離經發酵改質的幾丁質；提供待純化的幾丁質酵素組成物；使該改質的幾丁質與待純化的幾丁質酵素組成物接觸，其中該改質幾丁質能夠與幾丁質酵素結合形成複合物，且該待純化的幾丁質酵素組成物的提供，係包括：提供寄存於財團法人食品工業發展研究所、寄存編號 BCRC 910300 之類芽孢桿菌(*Paenibacillus sp.*)；將該類芽孢桿菌培養於含有幾丁質的培養基進行發酵；取發酵後之培養基上清液與硫酸銨接觸；獲取該待純化的幾丁質酵素組成物；及分離幾丁質酵素。
2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中 BCRC 910300 類芽孢桿菌(*Paenibacillus sp.*)於含有幾丁質的培養基中發酵係於約 25 至 35 °C、轉速約 100 至 300rpm 下進行。
3. 如申請專利範圍第 2 項之方法，其中 BCRC 910300 類芽孢桿菌(*Paenibacillus sp.*)於含有幾丁質的培養基中發酵係於轉速約 200rpm 下進行。
4. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該經改質幾丁質係以過濾方式自發酵液中分離。
5. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中經改質幾丁質的提供進一步包含，在將 BCRC 910300 類芽孢桿菌(*Paenibacillus sp.*)加入含有幾丁質的培養基進行發酵前，先將 BCRC 910300 類芽孢桿菌(*Paenibacillus sp.*)培養於含有幾丁質之接種培養基進行擴大培養。
6. 如申請專利範圍第 5 項之方法，其中該擴大培養所使用的接種培養基包含 1%(w/w)幾丁質粉末(chitin powder)、0.1%(w/w)蛋白朊(peptone)及 0.1%(w/w)水合硫酸鎂(MgSO₄ · 7H₂O)。
7. 如申請專利範圍第 6 項之方法，其中該擴大培養係於約 25 至 35 °C、轉速約 100 至 300rpm，進行約 20 至 30 小時。
8. 如申請專利範圍第 6 項之方法，其中該擴大培養係於約 28 °C 進行。
9. 如申請專利範圍第 6 項之方法，其中該擴大培養係於轉速約 200rpm 下進行。
10. 如申請專利範圍第 6 項之方法，其中該擴大培養係進行約 24 小時。
11. 如申請專利範圍第 10 項之方法，其中發酵後之培養基上清液係與 0.01 至 80%(w/w)硫酸銨接觸。

(2)

12. 如申請專利範圍第 11 項之方法，其中幾丁質酵素於經改質幾丁質上的吸附係於約 5 至 25 、pH 值為約 4 至 8 下進行約 1 至 300 分鐘。
13. 如申請專利範圍第 11 項之方法，其中幾丁質酵素於經改質幾丁質上的吸附係於約 15 下進行。
14. 如申請專利範圍第 11 項之方法，其中幾丁質酵素於經改質幾丁質上的吸附係於 pH 值約 5 時進行。
15. 如申請專利範圍第 11 項之方法，其中幾丁質酵素於經改質幾丁質上的吸附係進行約 240 分鐘。
16. 如申請專利範圍第 10 項之方法，其中幾丁質酵素的分離包括使用脫附液將經改質的幾丁質脫附。
17. 如申請專利範圍第 16 項之方法，其中脫附液係選自包括去離子水、磷酸緩衝液、醋酸緩衝液、檸檬酸緩衝液、醋酸水溶液及添加 0.1M 氯化鈉之磷酸緩衝液之群組。
18. 如申請專利範圍第 17 項之方法，其中脫附液係 0.01M 醋酸水溶液作為脫附液。
19. 一種生產經改質之幾丁質的方法，包括：提供可產生幾丁質酵素之 BCRC 910300 類芽孢桿菌(*Paenibacillus sp.*)；將該 BCRC 910300 類芽孢桿菌加入含有幾丁質的培養基進行發酵；及自發酵液中分離經改質的幾丁質。
20. 如申請專利範圍第 19 項之方法，其中 BCRC 910300 類芽孢桿菌(*Paenibacillus sp.*)於含有幾丁質的培養基中發酵係於約 25 至 35 、轉速約 100 至 300rpm 下進行。
21. 如申請專利範圍第 20 項之方法，其中 BCRC 910300 類芽孢桿菌(*Paenibacillus sp.*)於含有幾丁質的培養基中發酵係於轉速約 200rpm 下進行。
22. 如申請專利範圍第 21 項之方法，其中該經改質幾丁質係以過濾方式自發酵液中分離。
23. 如申請專利範圍第 19 項之方法，其中經改質幾丁質的提供進一步包含，在將 BCRC 910300 類芽孢桿菌(*Paenibacillus sp.*)加入含有幾丁質的培養基進行發酵前，先將 BCRC 910300 類芽孢桿菌(*Paenibacillus sp.*)培養於含有幾丁質之接種培養基進行擴大培養。
24. 如申請專利範圍第 23 項之方法，其中該擴大培養所使用的接種培養基包含 1%(w/w)幾丁質粉末(chitin powder)、0.1%(w/w)蛋白朊(peptone)及 0.1%(w/w)水合硫酸鎂(MgSO₄ · 7H₂O)。
25. 如申請專利範圍第 24 項之方法，其中該擴大培養係於約 25 至 35 、轉速約 100 至 300rpm，進行約 20 至 30 小時。
26. 如申請專利範圍第 25 項之方法，其中該擴大培養係於約 28 進行。
27. 如申請專利範圍第 24 項之方法，其中該擴大培養係於轉速約 200rpm 下進行。
28. 如申請專利範圍第 27 項之方法，其中該擴大培養係進行約 24 小時。
29. 一種 BCRC 910300 類芽孢桿菌(*Paenibacillus sp.*)。

圖式簡單說明

第一圖係應用發酵改質幾丁質吸附幾丁質酵素之流程圖第二圖係添加不同濃度硫酸銨於粗發酵液中測得之酵素活性及蛋白質濃度。

第三圖係不同幾丁質的活性吸附量。

第四圖係不同溫度下的活性吸附量。

第五圖係不同 pH 值下的活性吸附量。

第六圖係不同顆粒大小幾丁質的活性吸附量。

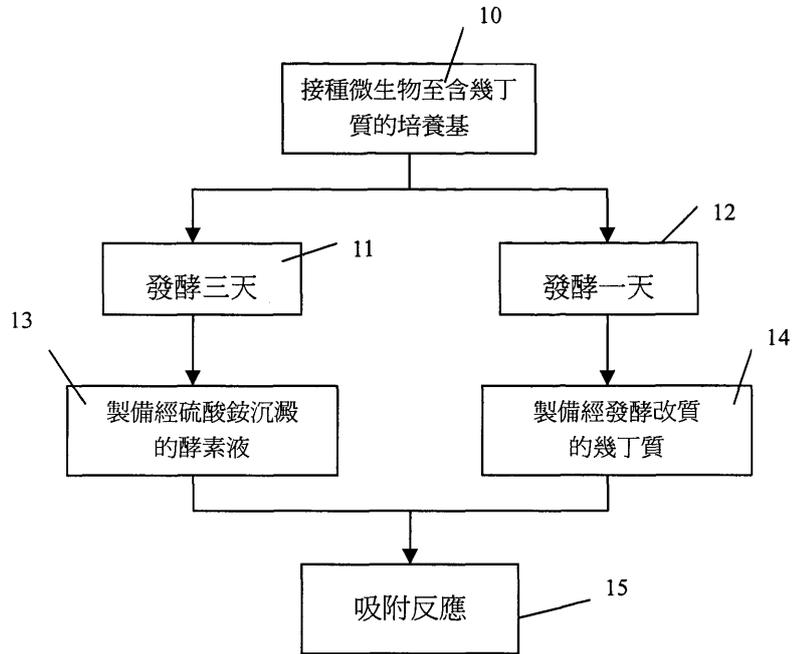
第七圖係比較不同酵素液處理時間及經發酵改質幾丁質的活性吸附量。

(3)

第八圖係幾丁質的電子顯微鏡圖。

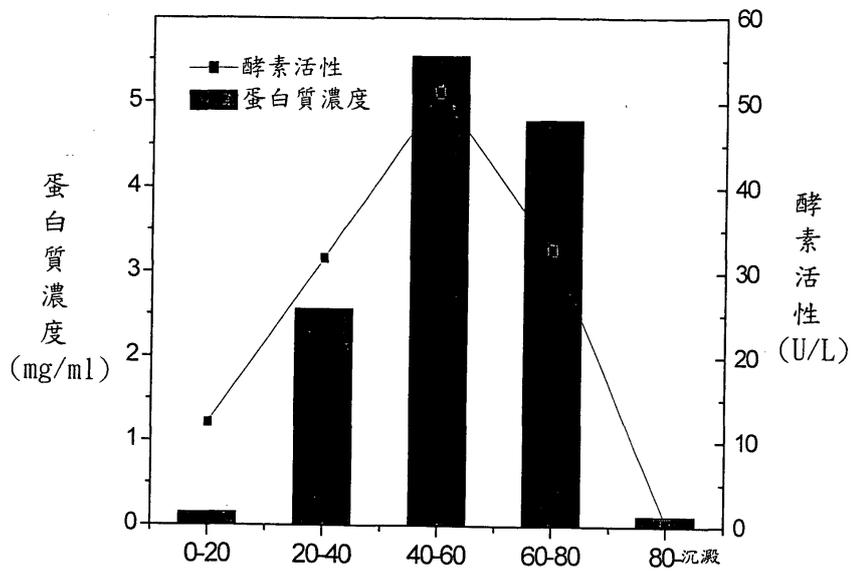
第九圖係經酵素處理 2 小時幾丁質的電子顯微鏡圖。

第十圖係經發酵改質幾丁質的電子顯微鏡圖。



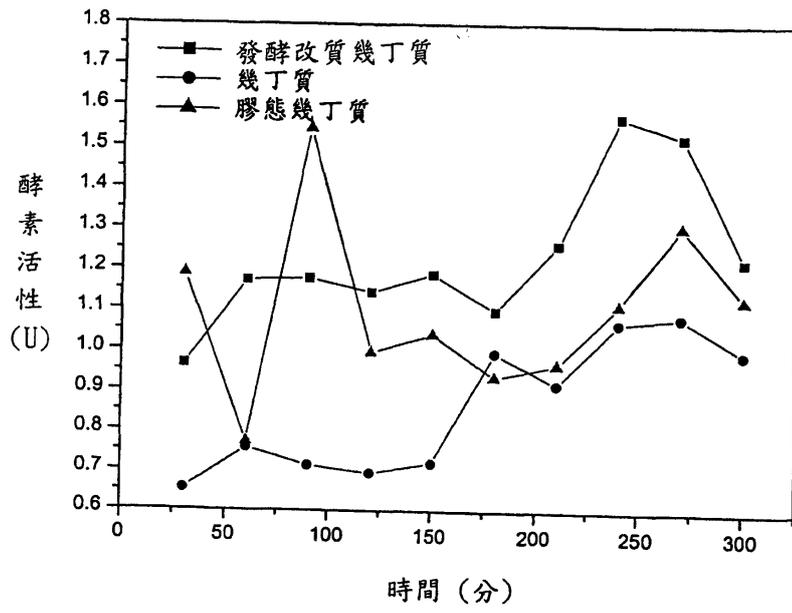
第一圖

(4)



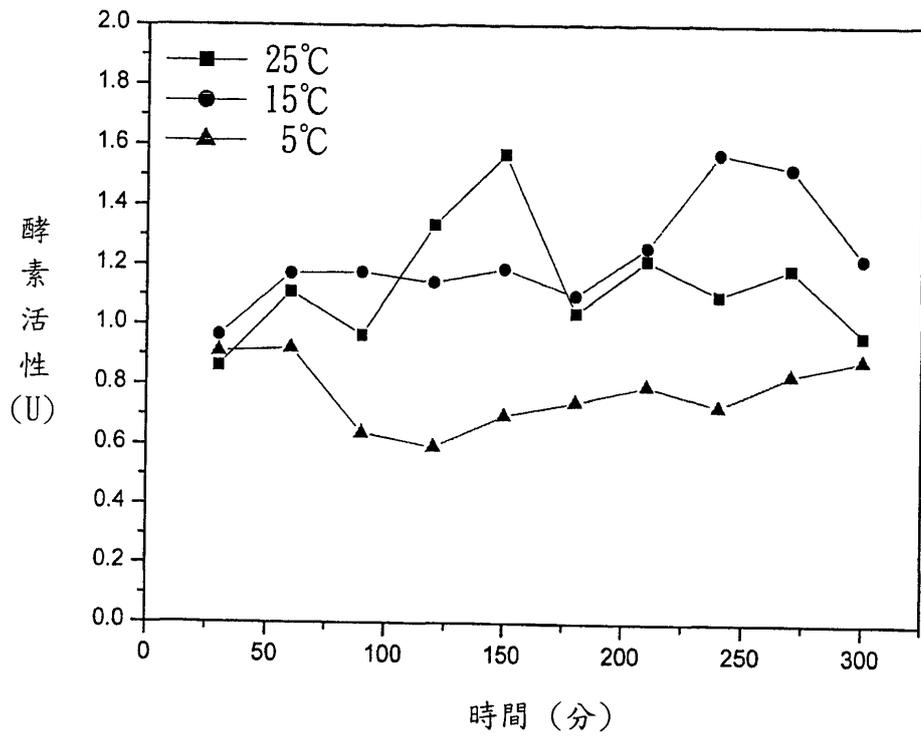
第二圖

(5)



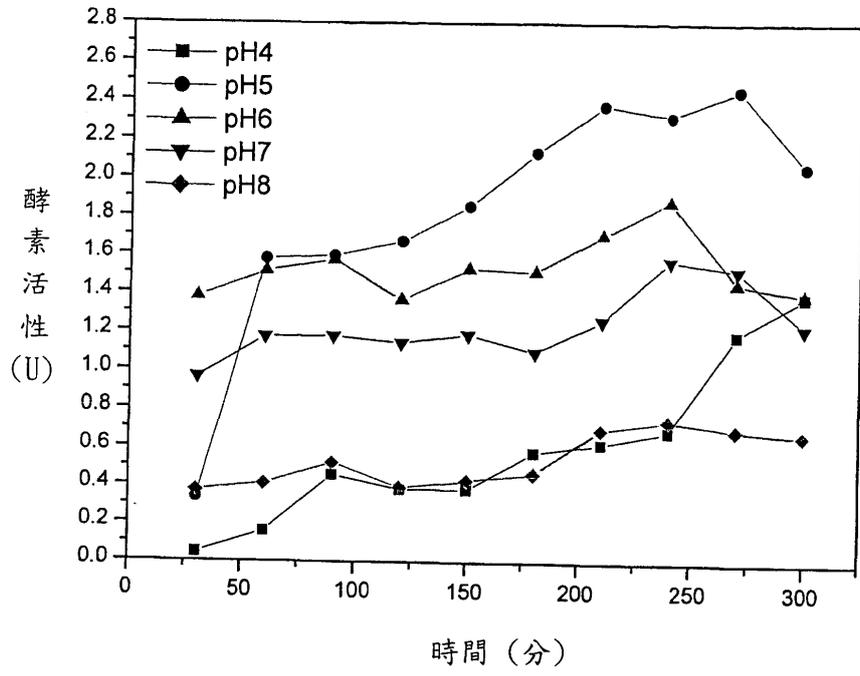
第三圖

(6)



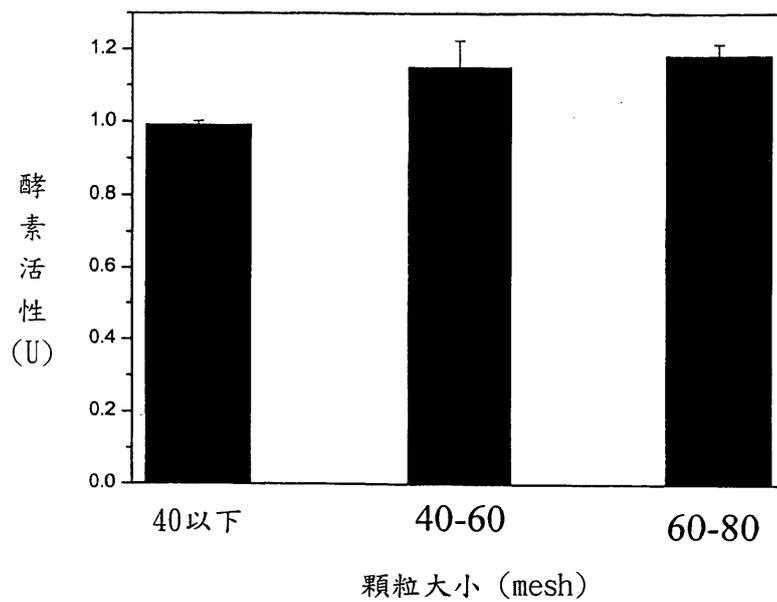
第四圖

(7)



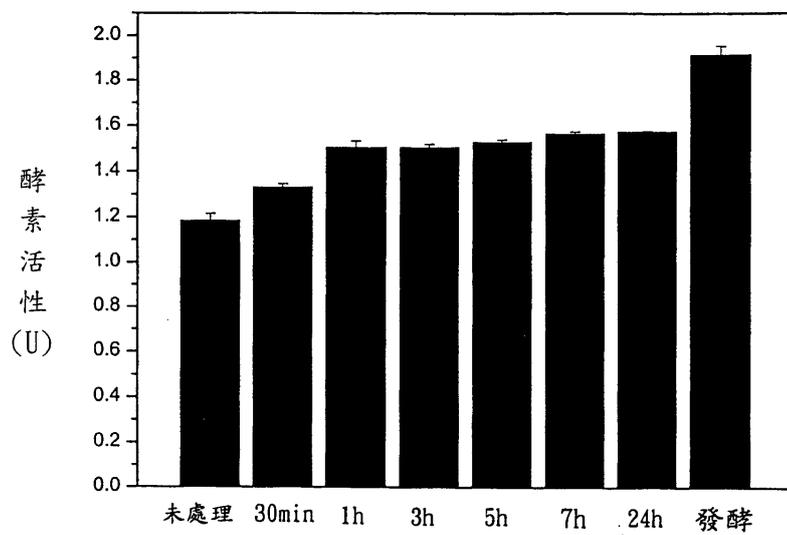
第五圖

(8)



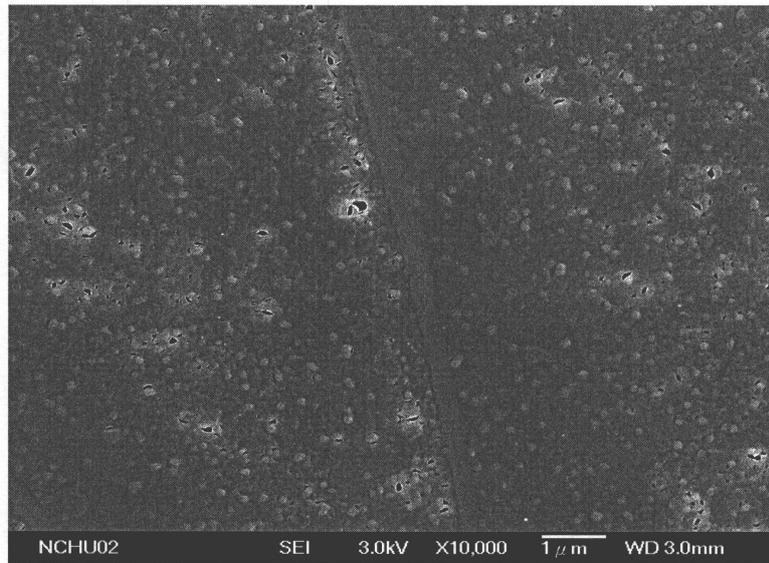
第六圖

(9)

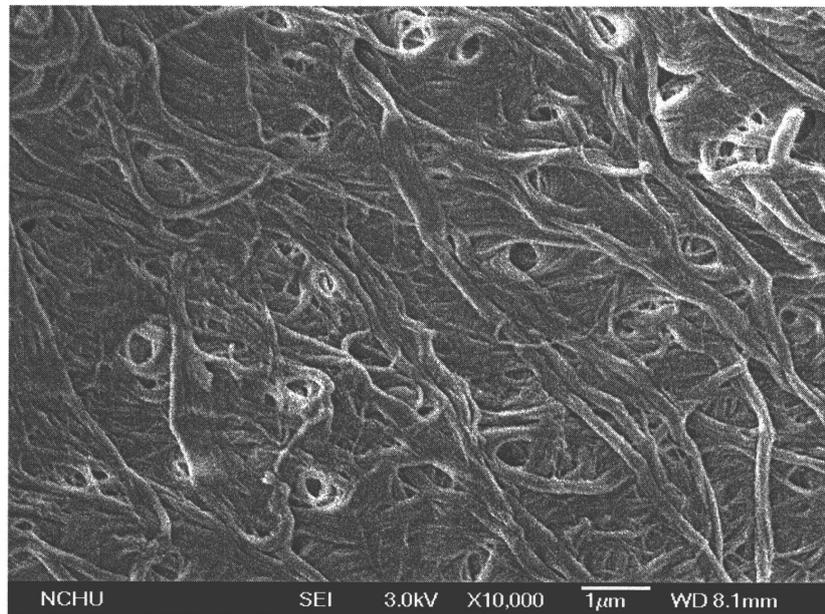


第七圖

(10)

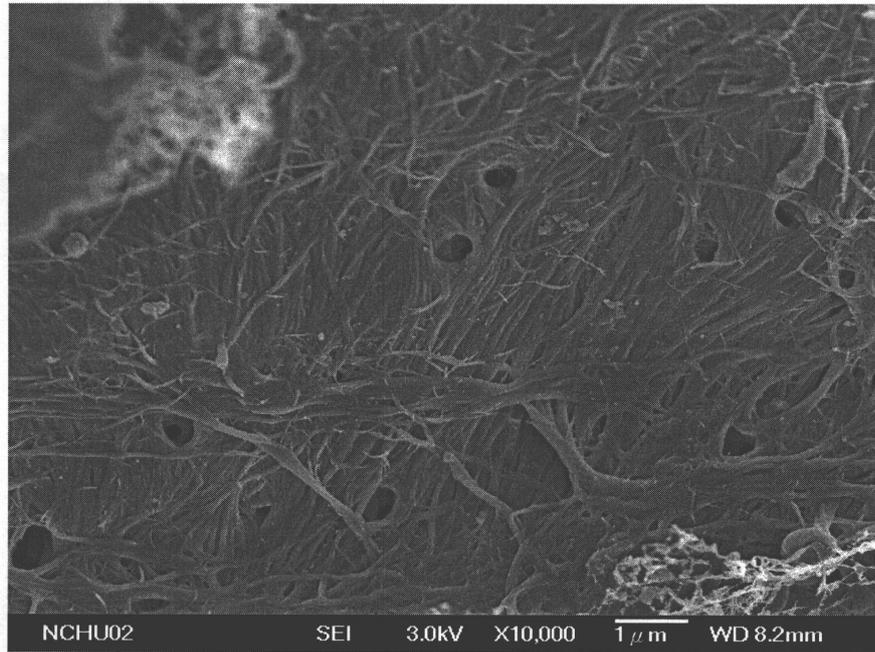


第八圖



第九圖

(11)



第十圖

