

【11】證書號數：I415938

【45】公告日：中華民國 102 (2013) 年 11 月 21 日

【51】Int. Cl.： C12N15/53 (2006.01) C12N15/70 (2006.01)

發明

全 12 頁

【54】名稱：褐腐型真菌之漆氧化酶及其製造方法

LACCASE OF BROWN-ROT FUNGI AND METHOD OF PRODUCING OF THE SAME

【21】申請案號：099126959

【22】申請日：中華民國 99 (2010) 年 08 月 12 日

【11】公開編號：201207106

【43】公開日期：中華民國 101 (2012) 年 02 月 16 日

【72】發明人：呂尚謙 (TW) LUE, SHANGCHIAN；劉坤湘 (TW) LIU, KUNHSIANG

【71】申請人：嘉南藥理科技大學

CHIA NAN UNIVERSITY OF
PHARMACY AND SCIENCY

臺南市仁德區二仁路 1 段 60 號

【74】代理人：蔡坤財；李世章

【56】參考文獻：

TREVOR M. D'SOUZA et al., "Isolation of Laccase Gene-Specific Sequences from White Rot and Brown Rot Fungi by PCR." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Vol. 62, No. 10, Page 3739-3744, Oct. 1996.

劉坤湘, "熱逆境誘導樟芝漆氧化酶基因表現及其啟動子之分析。" 嘉南藥理科技大學 98 年度教師專題研究計畫成果報告, 網路電子檔公開時間 2010 年 3 月 4 日。

賽逸昕, "探討白腐真菌之漆氧化酶的最佳生產條件。" 東吳大學微生物學系碩士論文, 網路電子檔公開時間 2006 年 03 月 16 日。

吳孟璇, "樟芝漆氧化酶基因之分子生物學研究。" 嘉南藥理科技大學生物科技系碩士論文, 2010/2/23

審查人員：黃教威

[57]申請專利範圍

1. 一種漆氧化酶之製造方法, 至少包含: 利用一固態培養基或一液態培養液, 於一誘導環境下培養一褐腐型真菌之一菌絲體, 其中該褐腐型真菌為牛樟芝(*Antrodia cinnamomea* T.T.Chang & W.N.Chou; 寄存編號 BCRC 35398), 該誘導環境為一含有金屬離子環境或一葡萄糖缺乏環境, 且該含有金屬離子環境為於該固態培養基或該液態培養液中添加 250 μ M 之鈷離子; 分離並純化該菌絲體之總 RNA, 並由該總 RNA 反轉錄出一互補 DNA (cDNA); 利用一引子對該 cDNA 進行一聚合酶鏈反應(polymerase chain reaction; PCR), 以由該 cDNA 擴增出一核酸片段, 其中該引子對包括一第一引子對或一第二引子對, 該第一引子對包括如序列辨識編號 3 所示序列之一第一上游引子與如序列辨識編號 4 所示序列之一第一下游引子, 該第二引子對包括如序列辨識編號 5 所示序列之一第二上游引子與如序列辨識編號 6 所示序列之一第二下游引子, 且該核酸片段包括如序列辨識編號 2 所示之核苷酸序列; 構築一重組表現載體, 其中該重組表現質體包含該核酸片段; 以及將該重組表現載體轉型至一異源生物表現系統內而形成一轉型株, 以藉由該轉型株大量表現該漆氧化酶, 其中該漆氧化酶為一可溶性蛋白且包括如序列辨識編號 1 所示之胺基酸序列。

(2)

2. 根據申請專利範圍第 1 項所述之漆氧化酶之製造方法，其中該葡萄糖缺乏環境為該固態培養基或該液態培養液之葡萄糖濃度為 0%(w/v)至 1.5%(w/v)。
3. 根據申請專利範圍第 1 項所述之漆氧化酶之製造方法，其中該異源生物表現系統為大腸桿菌(*E.coli*)表現系統 BL-21(DE3)。

圖式簡單說明

為讓本發明之上述和其他目的、特徵、優點與實施例能更明顯易懂，所附圖式之詳細說明如下：第 1 圖係繪示根據本發明一實施例之褐腐型真菌經誘導產生之漆氧化酶的親緣分析樹狀圖。

第 2A 圖以及第 2B 圖係顯示根據本發明一實施例之牛樟芝菌絲體之胞外漆氧化酶活性的呈色照片。

第 3A 圖至第 3C 圖係繪示根據本發明另一實施例之牛樟芝菌絲體之胞外漆氧化酶活性曲線圖。

第 4A 圖以及第 4B 圖係顯示根據本發明又一實施例之牛樟芝菌絲體之胞外漆氧化酶活性的呈色照片。

第 5A 圖至第 5B 圖係顯示根據本發明又一實施例之牛樟芝菌絲體之胞外漆氧化酶之原態 SDS-PAGE 圖。

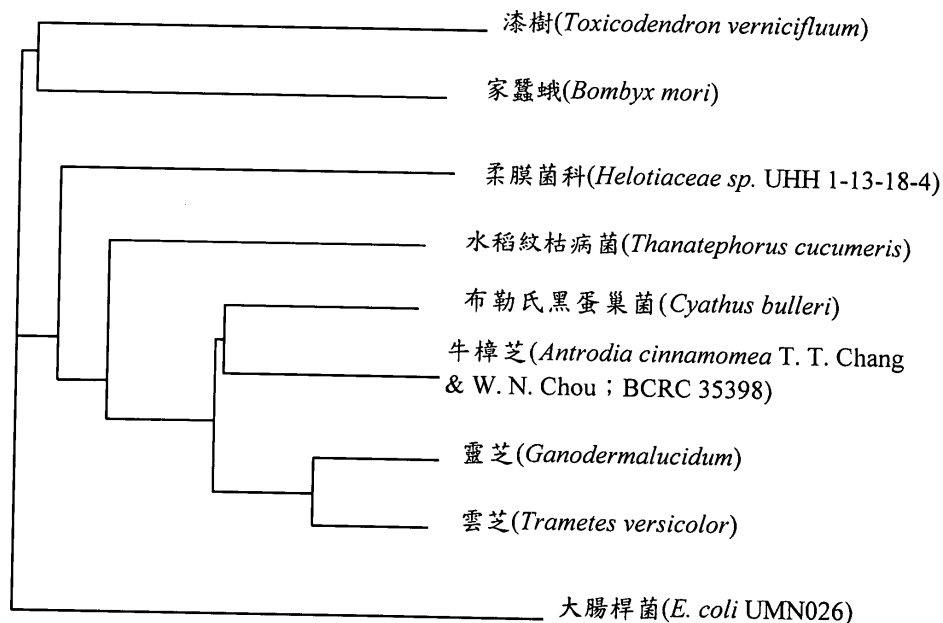
第 6A 圖係繪示根據本發明又另一實施例之牛樟芝菌絲體之胞外漆氧化酶活性曲線圖。

第 6B 圖係繪示根據本發明再另一實施例之牛樟芝菌絲體之液態培養液的碳源濃度曲線圖。

第 7 圖係顯示根據本發明一實施例之含有漆氧化酶的全長基因片段的瓊膠電泳分析圖。

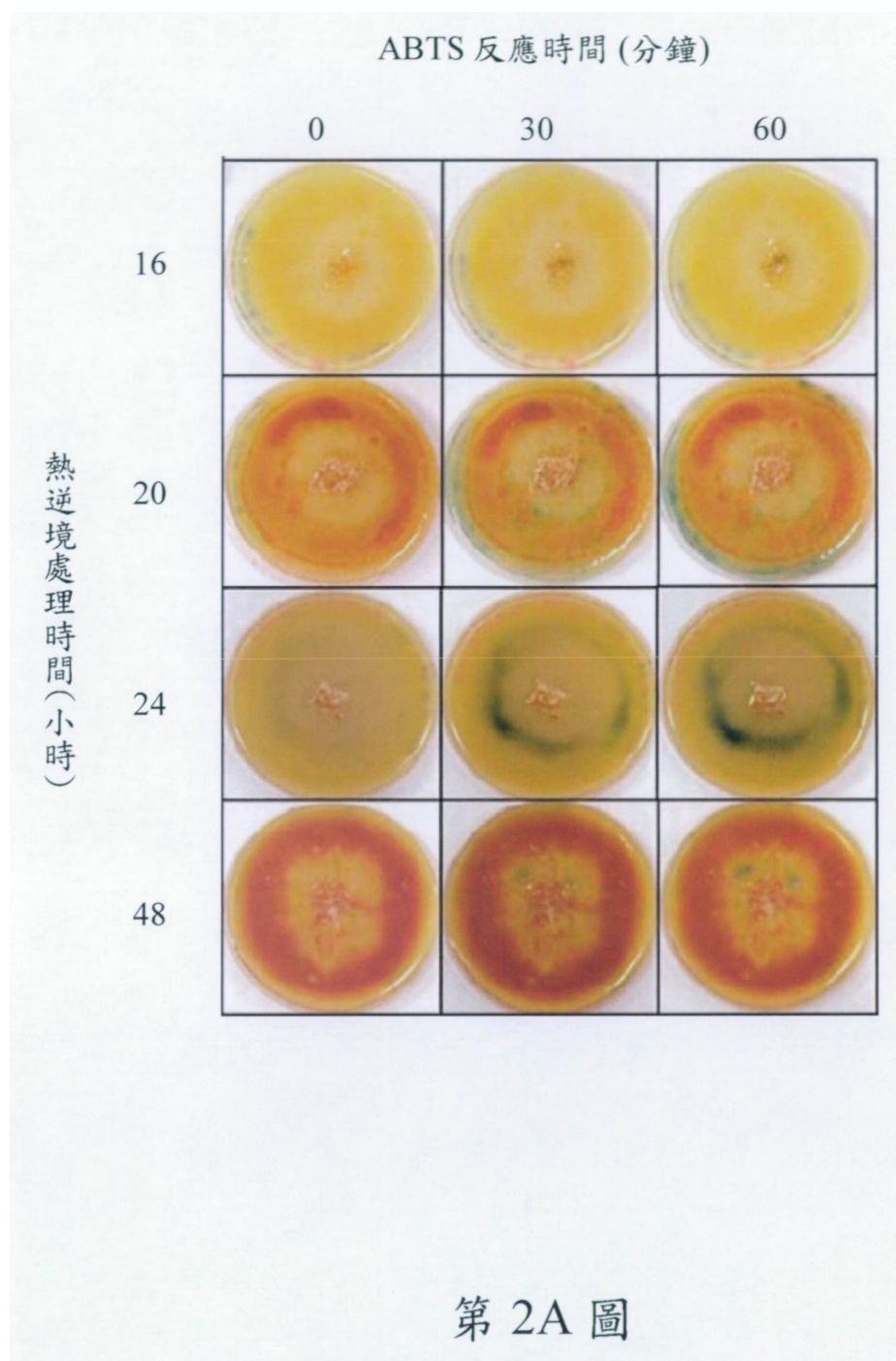
第 8 圖係根據本發明一實施例之轉型株所含之重組表現質體經限制酶截切的瓊膠電泳分析圖。

第 9A 圖至第 9C 圖係繪示根據本發明一實施例之轉型株之胞外漆氧化酶活性曲線圖。

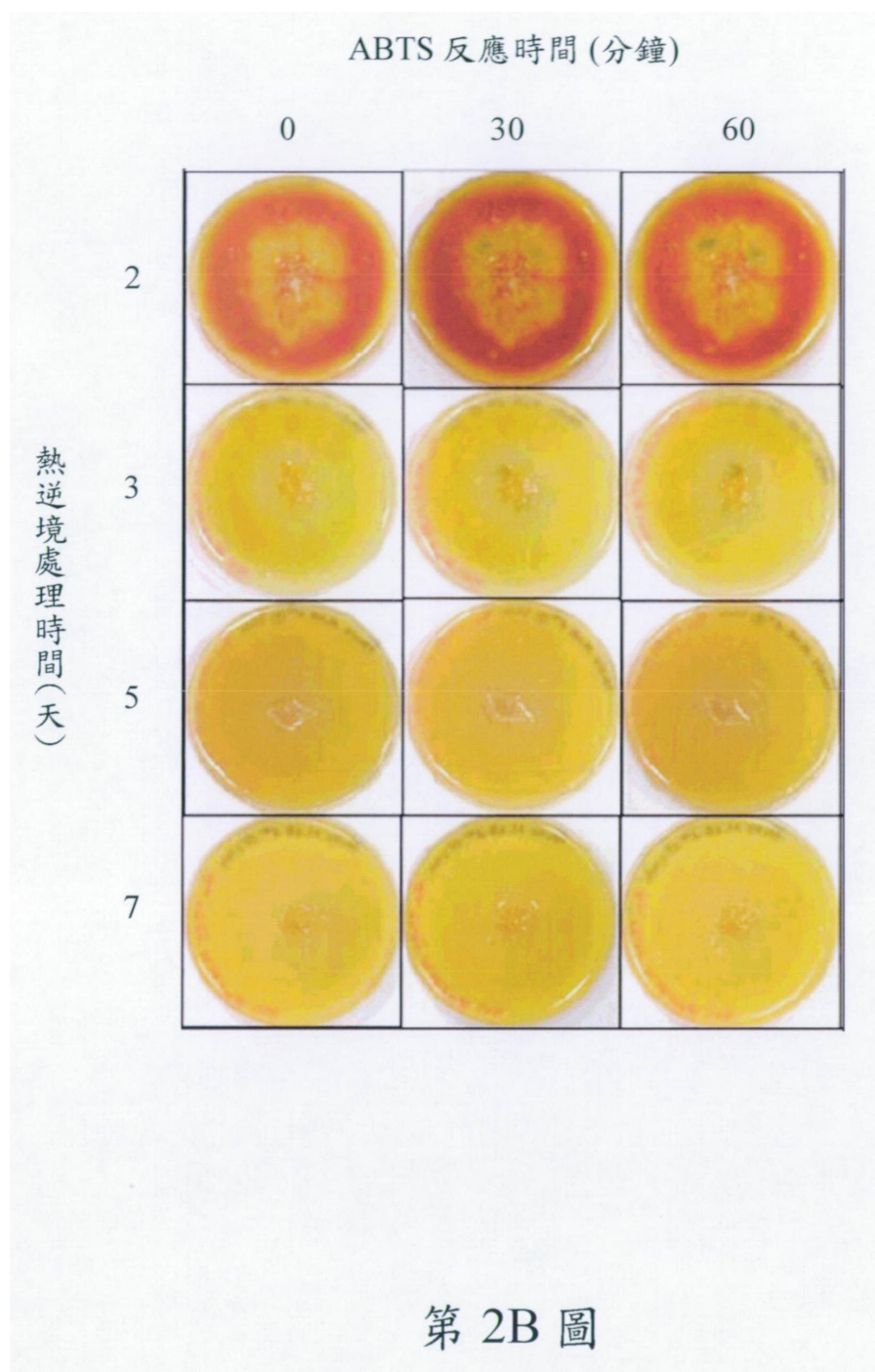


第 1 圖

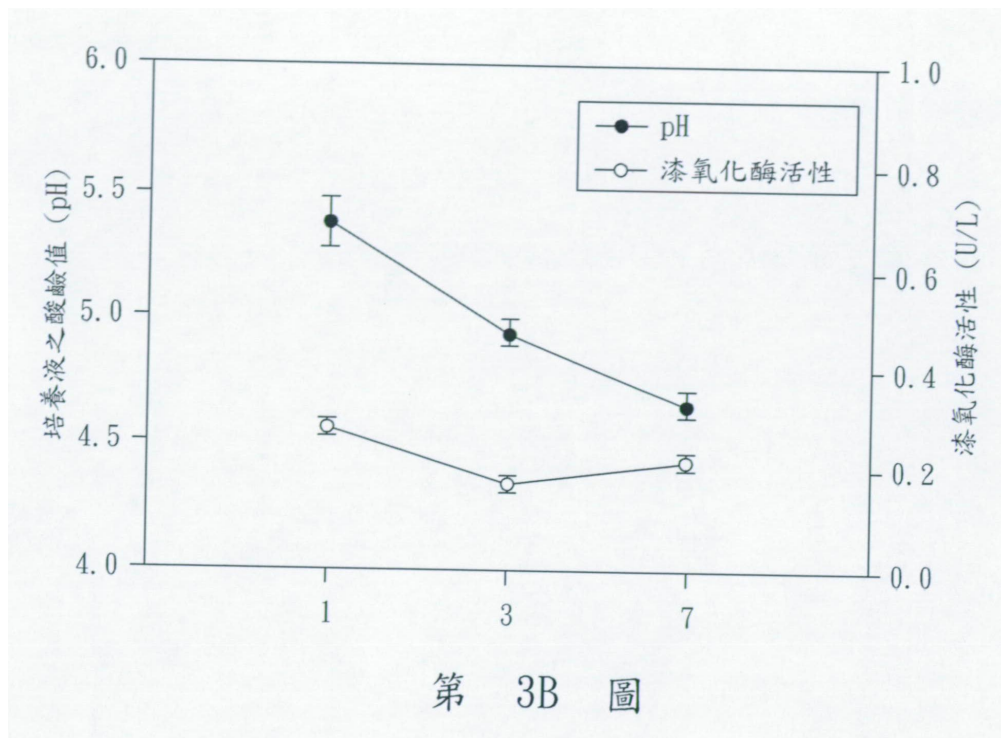
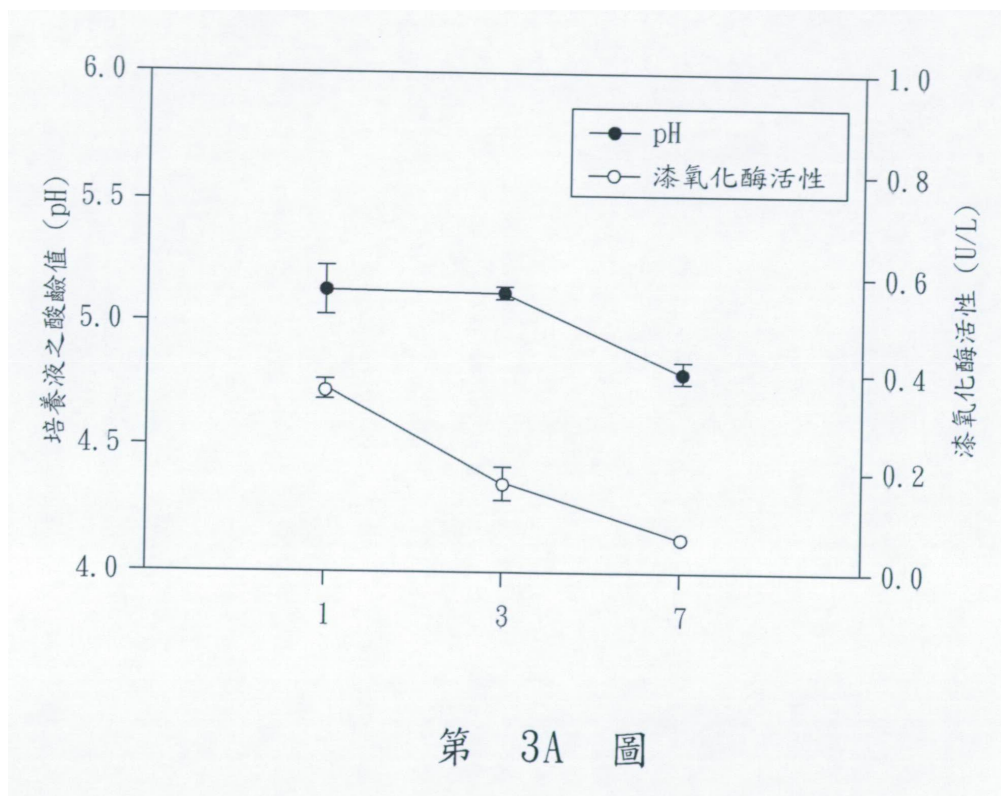
(3)



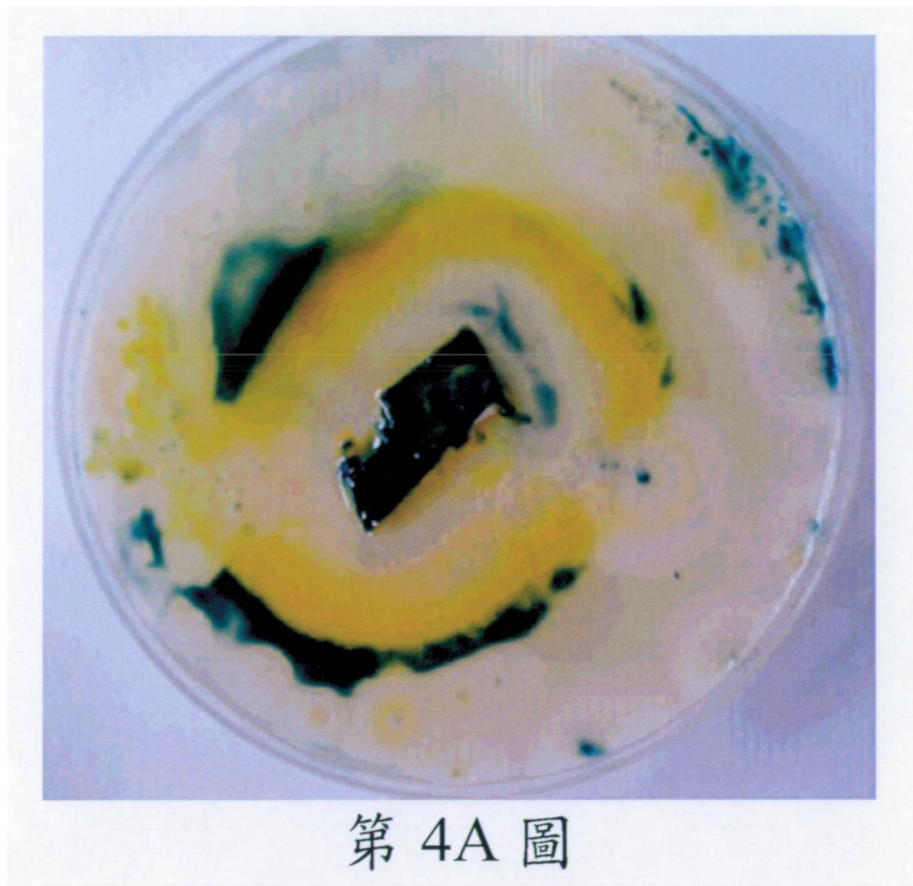
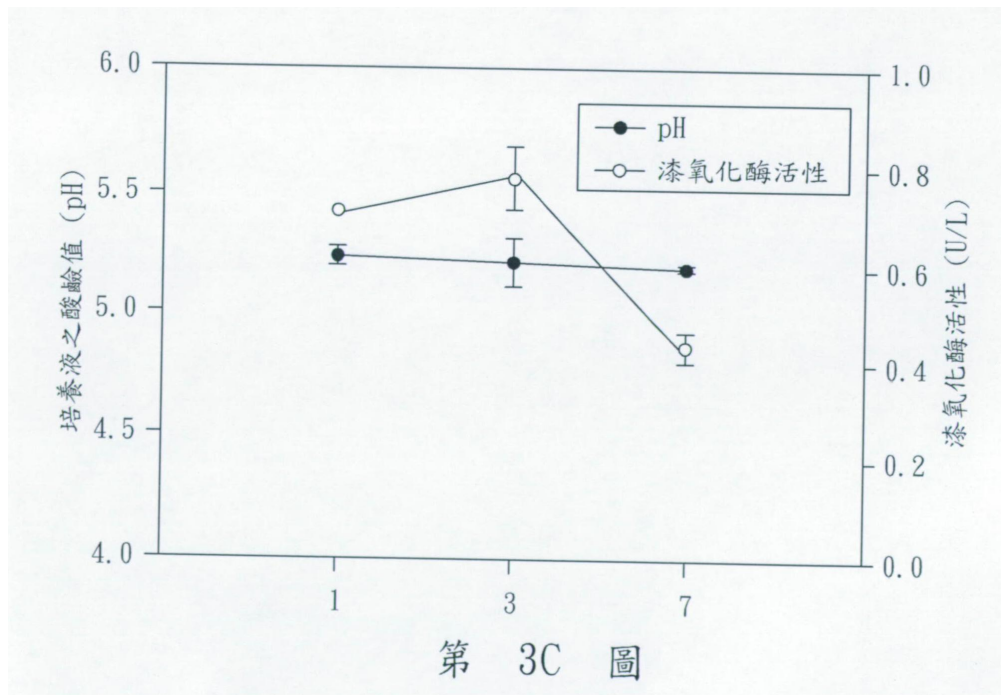
(4)



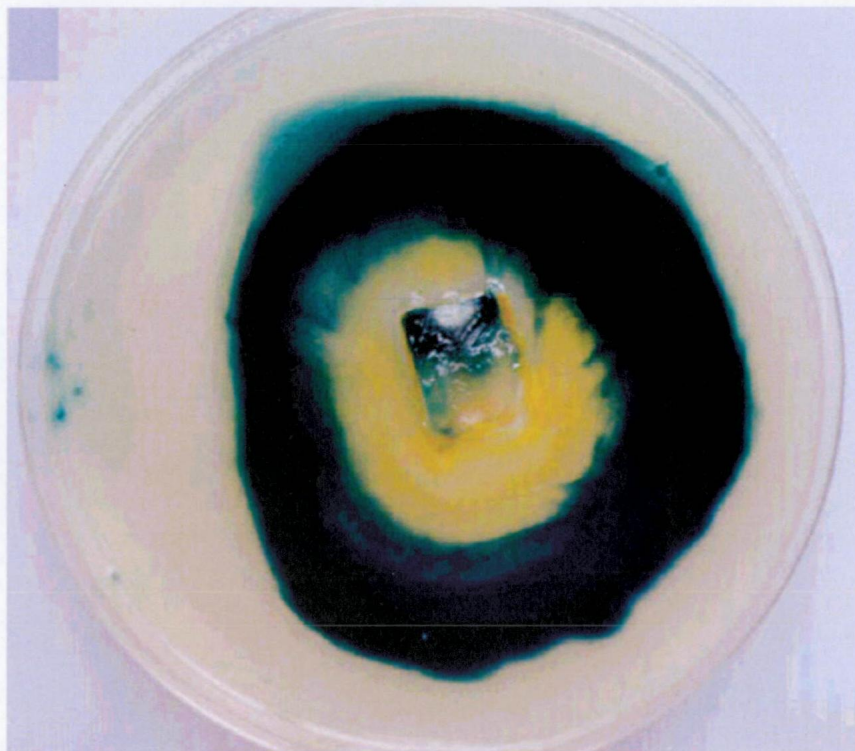
(5)



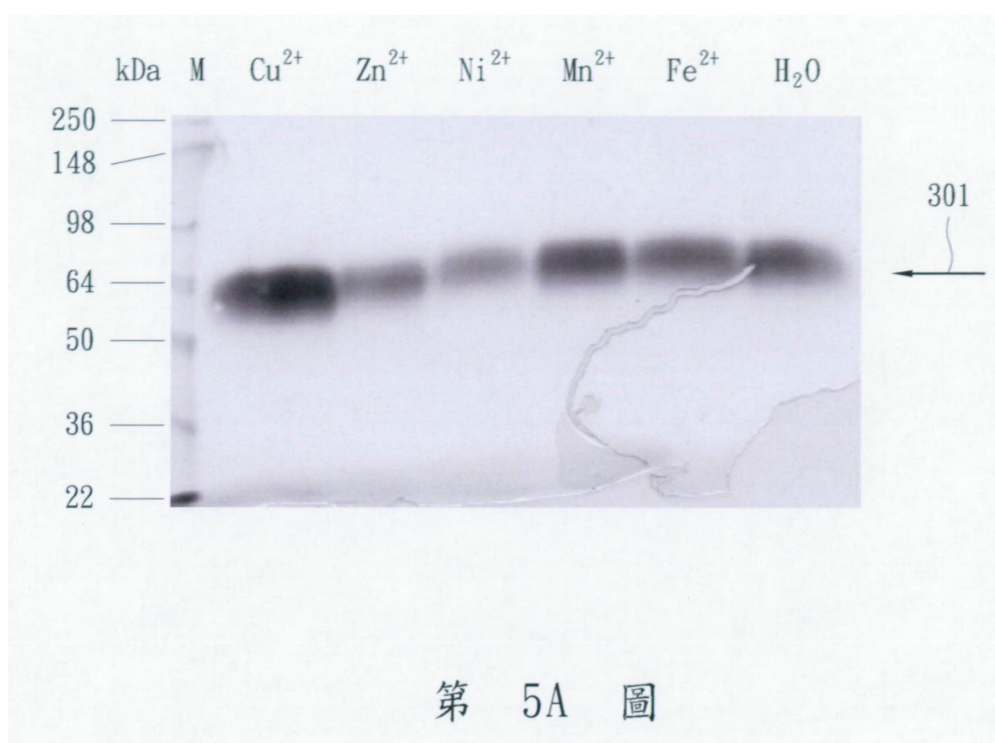
(6)



(7)

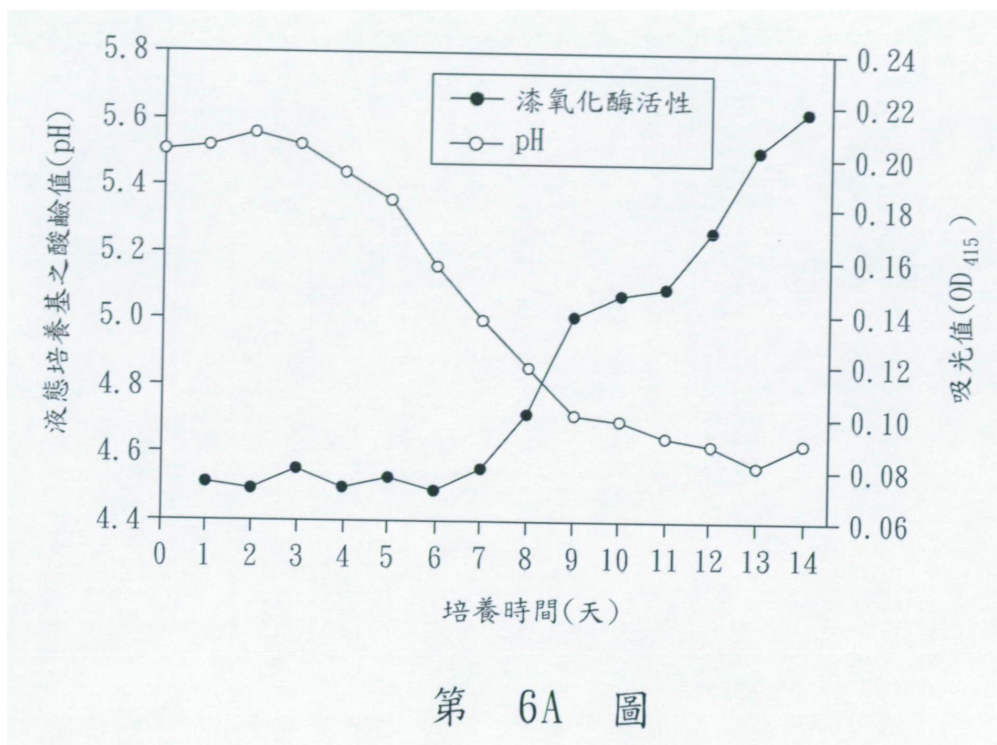
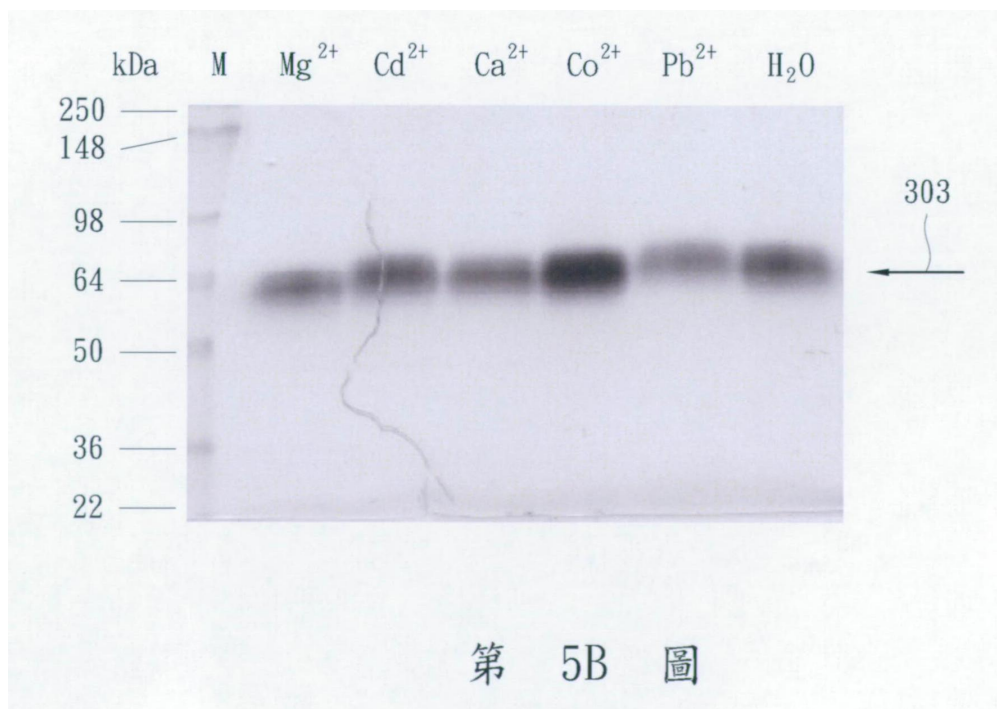


第 4B 圖

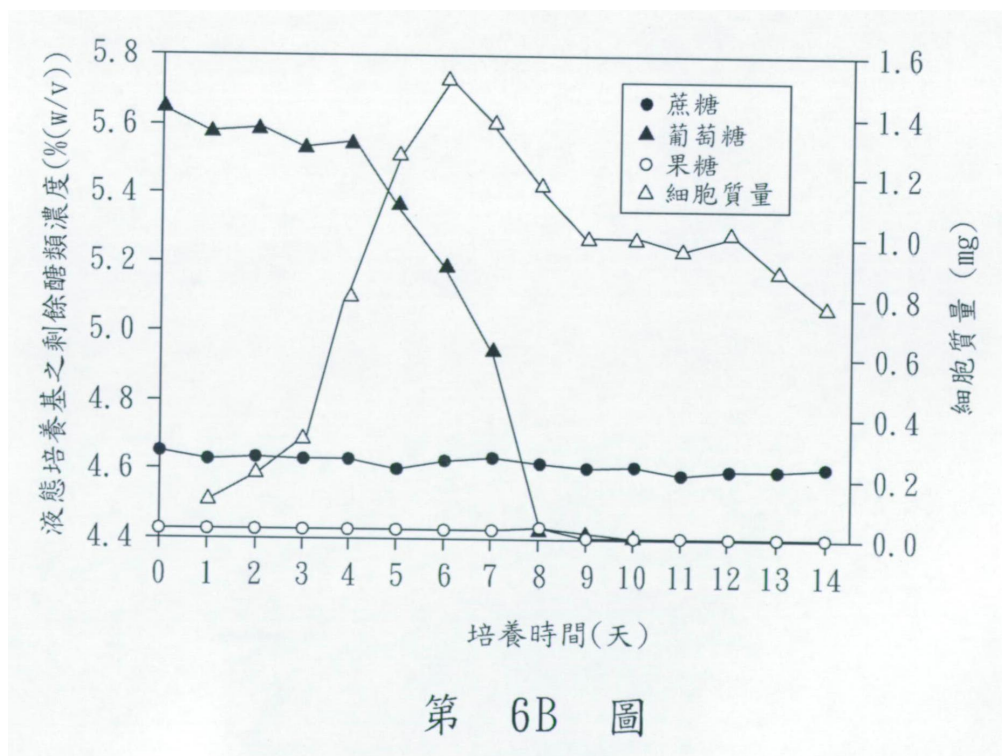


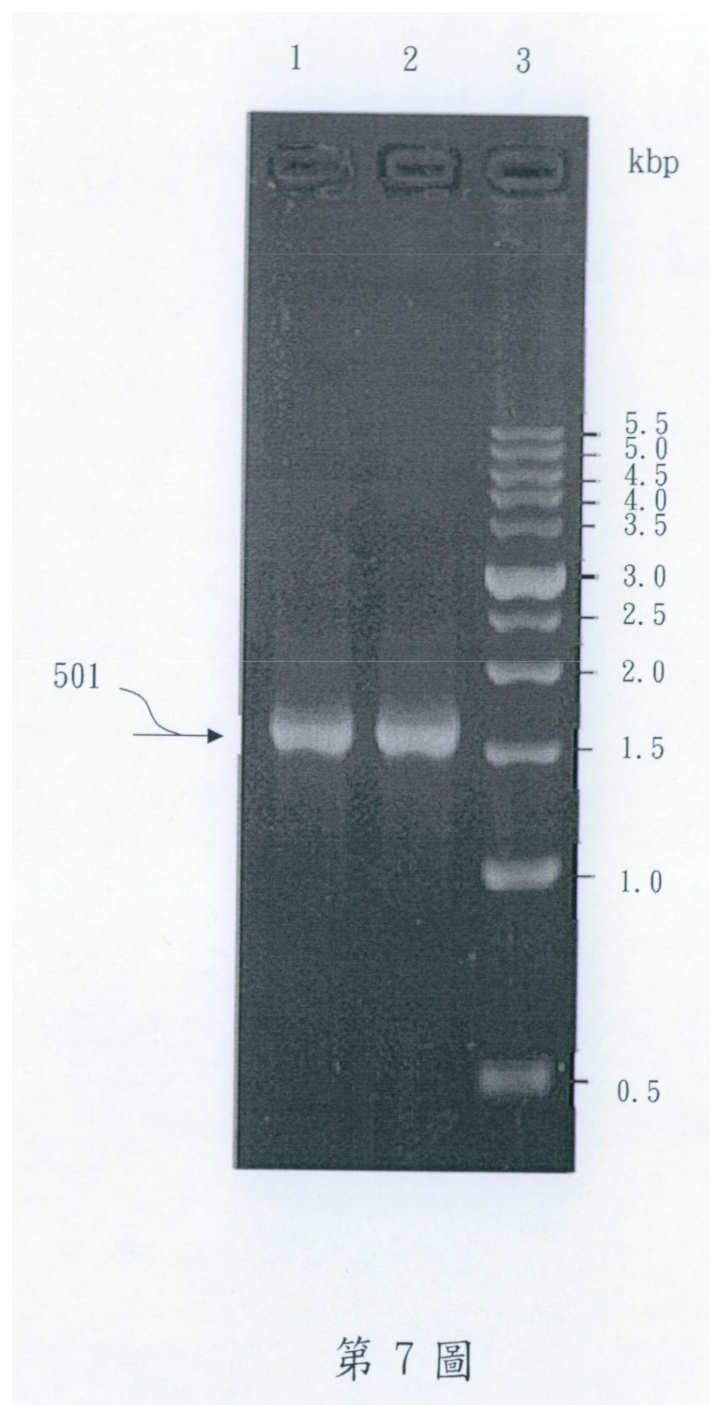
第 5A 圖

(8)

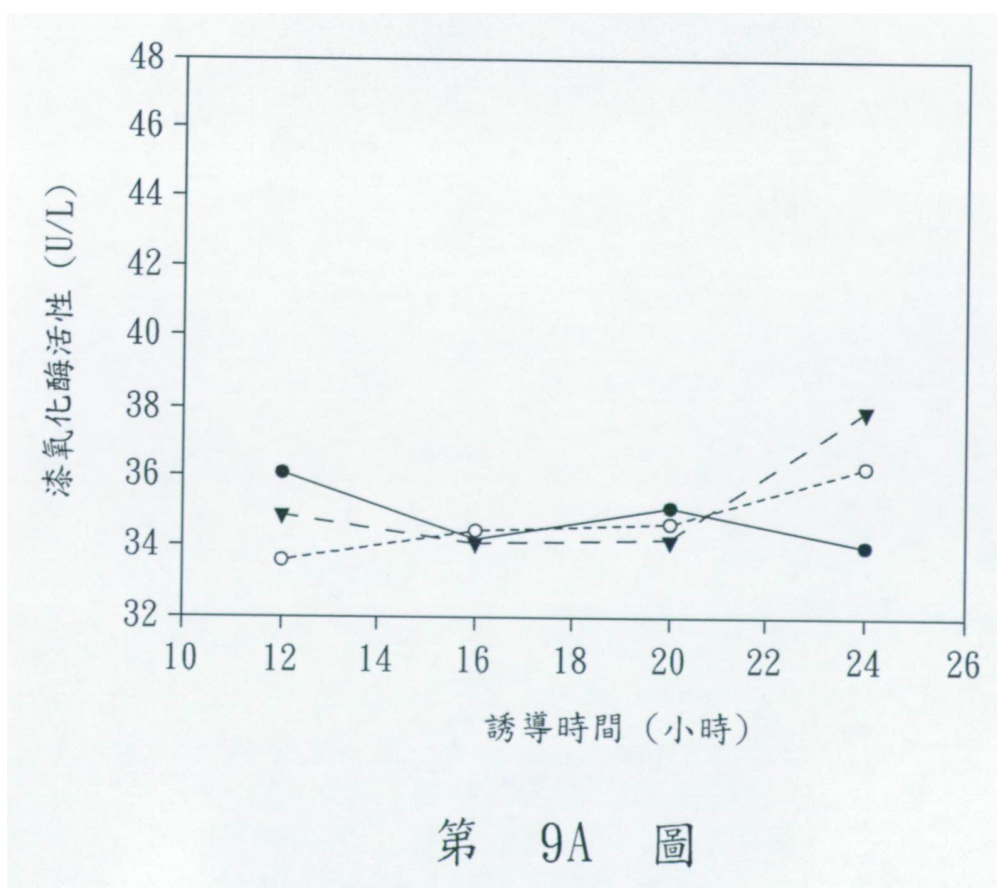
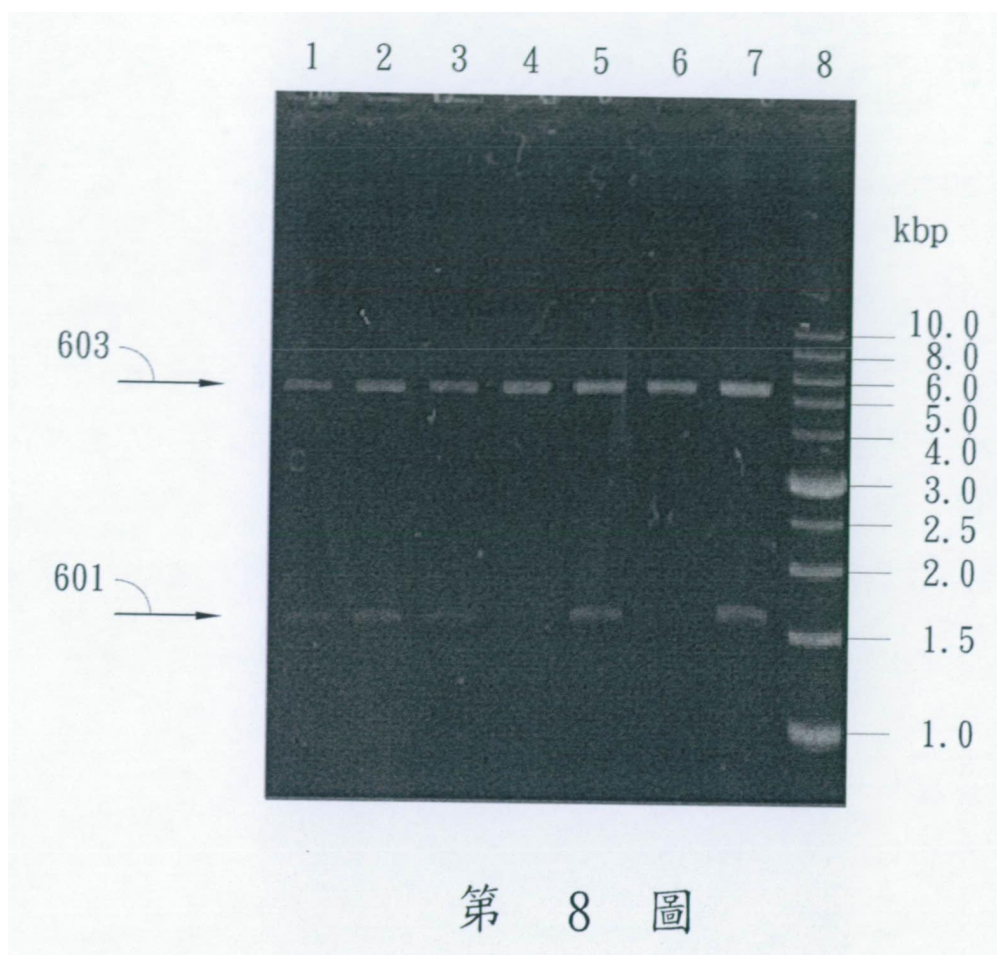


(9)

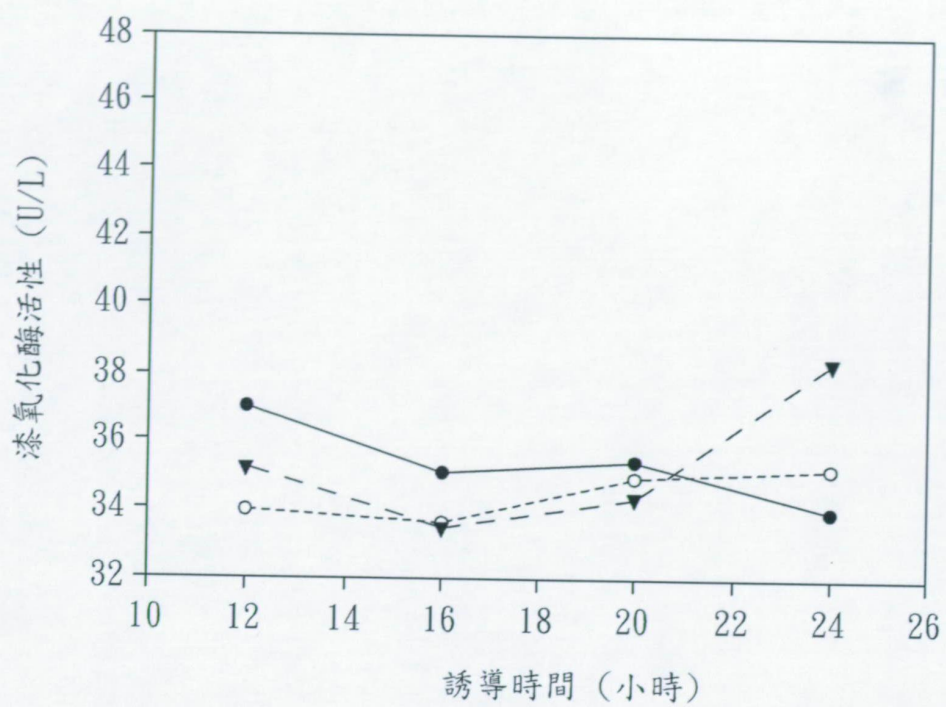




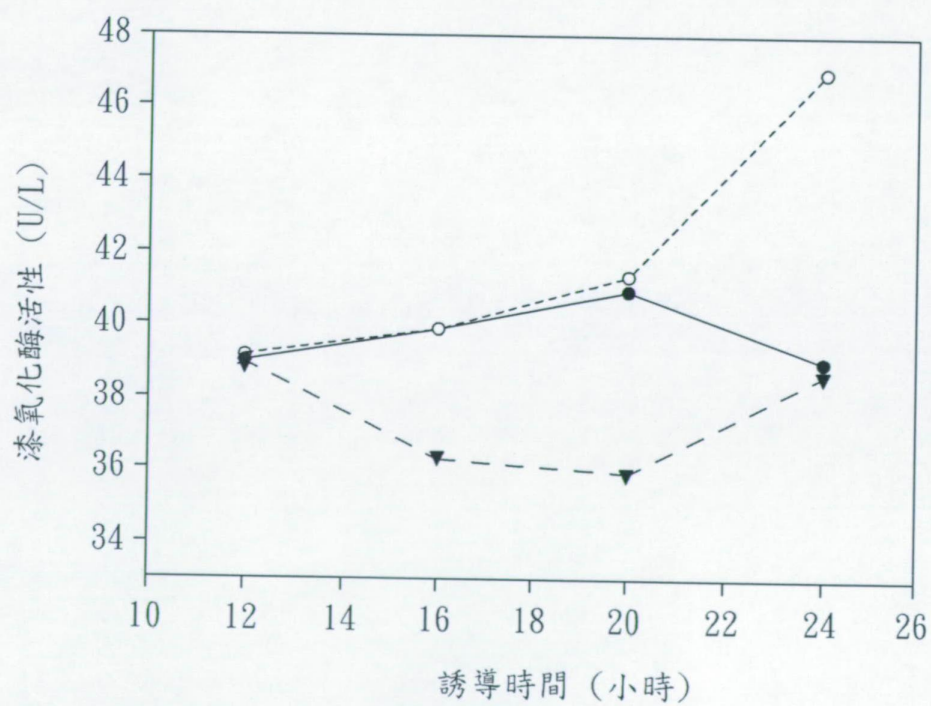
(11)



(12)



第 9B 圖



第 9C 圖