

財團
法人 食品工業發展研究所

第 74 期

生物資源保存及研究簡訊 第21卷第2期

中華民國97年6月發行

補助單位：經濟部技術處 / 執行單位：財團法人食品工業發展研究所

本期內容

中心新聞 1

- ◎ 本所廖啟成副所長及陳玉芬管理師赴比利時參加「微生物公有領域研討會」暨「歐洲菌種聯盟年會」

研發成果 2

- ◎ 新資源
基因資源之收存與提供
- ◎ 新技術
基因資源之研究與開發
- ◎ 新服務
基因資源相關技術之服務

知識專欄 4

- ◎ 抗真菌蛋白的研發與應用
- ◎ 洋菜酶之簡介與研發

專利微生物 12

本所廖啟成副所長及陳玉芬管理師赴比利時參加「微生物公有領域研討會」暨「歐洲菌種聯盟年會」



microbial commons

"Het Pand", Ghent, Belgium, 12-13 June 2008.

microbial commons

▲ 「微生物公有領域研討會」大會合照

(圖：主辦單位)

本所應比利時魯汶大學Tom Dedeurwaerdere教授之邀請，擔任「微生物公有領域研討會」(Microbial Commons)之國際諮詢委員會委員並參加研討。本所由廖啟成副所長代表以國際諮詢委員會委員身分，及由陳玉芬管理師以參加者身分一同出席與會。此研討會由比利時魯汶大學法哲學中心及根特大學微生物實驗室等單位主辦，於6月12及13日在比利時根特舉行。研討會目標在於建構一個有利自由研究的微生物公有領域；議題分為法制與資訊二大主軸，安排專家演講及討論，內容包括建構規劃構想、經濟社會影響評估，以及可供借鏡之其他類似公有領域介紹，例如植物多邊交換系統、菌種聯盟、Science Commons等。與會者來自20個國家約100人，從科技、法律、資訊、經濟等角度，進行跨領域交流。

藉參加該研討會之機會，並順道參加於6月10及11日同樣在比利時根特舉行，由比利時BCCM菌種中心籌辦，以「邁向歐洲菌種中心—方法的調和與確認 (Harmonization & Validation of Methods, the Way Forward for European Culture Collections)」為主題之歐洲菌種聯盟第27次年會。本次年會目的希望透過有關委託服務、寄存、通用材料移轉契約、保存等領域之調和，以整合目前存在22個歐洲國家內的61個菌種中心，為未來建立一個歐洲菌種中心而準備。此次會議共有由19個國家約60名來自歐洲各菌種中心之專家進行交流，本所人員也從中汲取許多寶貴之資訊，可提供本所生物資源中心未來營運之參考。

(文：生資中心陳玉芬小姐)

新資源

基因資源之收存與提供

生資中心／研究員
廖麗玲

隨著基因工程技術與基因體研究之蓬勃發展，基因相關資源之保存與開發也日益重要，基因資源是食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心(以下簡稱為生資中心)繼微生物及細胞株之後，第三大類的保存資源，由質體、選殖株及宿主之收集與保存，擴展到大規模之基因庫之保存與提供，建立了完善的管理系統以確保基因資源之永續收存安全。

宿主、載體與選殖株之收存與提供

生資中心目前共保存有270株宿主，除了最常用之*Escherichia coli*、*Bacillus subtilis*及*Saccharomyces cerevisiae*等之外，也收集保存了*Neurospora crassa*、*Schwanniomyces occidentalis*、*Streptomyces lividans*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Agrobacterium tumefaciens*及*Corynebacterium glutamicum*等宿主，可提供給國人進行各種基因轉殖實驗宿主之選擇。載體共計保存484株，包括以上宿主之選殖與蛋白質表現可使用之載體，或是在兩種不同宿主均可使用之穿梭載體等。此外，我們也保存了248株的選殖株，包括臺大醫學院寄存之嚴重急性呼吸道症候群(SARS)病毒選殖株28株與陽明大學寄存之SARS病毒選殖株16

株，以及各種國人研發建構的選殖株。以上宿主、載體與選殖株之資源，已可提供給各界進行基因工程之研發與應用，相關資料可上生資中心網站「生物資源資料庫」(<http://strain.bcrc.firdi.org.tw/BSAS/index.jsp>)查詢。

基因庫之收存與提供

生資中心的基因庫收集與保存是以國人基因體研究所需以及

本國基因體計畫所產出之基因庫為主要目標。本中心由美國引進IRAT與IRAU等兩個序列確認之人類全長cDNA基因庫，已可提供給國人進行人類基因體之相關研究之用。此外，我們也積極收存國人所執行基因體計畫產出之基因庫，如中研院水稻基因體計畫產出之兩個台農67號水稻BAC基因庫(OSJTbA與OSJTbB)、成大生物系吳文鑾教授寄存之4個蝴蝶蘭BAC基因庫、臺大于宏燦教授寄存之草蝦fosmid基因庫以及中興大學呂維茗教授寄存之水稻cDNA基因庫等(表一)，除了保存國人之研發成果，也提供給有興趣的研發者進行相關的研究與開發。

除了由外部引進具代表性的基因庫資源之外，本中心也針對具有產業效益之微生物進行其基因庫的建構與收存，如紅麴菌、

表一、食品所生資中心可提供之基因庫資源

BCRC編號	物種來源	名稱
g1001	水稻	<i>Oryza sativa spp. japonica</i> BAC library
g1002	水稻	<i>Oryza sativa spp. japonica</i> BAC library
g1003	蝴蝶蘭	<i>Phalaenopsis equestris</i> BAC library (NCKU-PEB)
g1004	人類	MGC human verified full-length cDNA collection (IRAT)
g1005	人類	MGC human verified full-length cDNA collection (IRAU)
g1006	人類	MGC human verified full-length cDNA collection (IRAT)
g1007	人類	MGC human verified full-length cDNA collection (IRAU)
g1008	土壤環境DNA	Metagenomic DNA sample from the soil in Kaohsiung district agricultural research and extension station fosmid library (enf01)
g1009	土壤環境DNA	Metagenomic DNA sample from the soil in Dafu organic farm fosmid library (enf02)
g1010	土壤環境DNA	Metagenomic DNA sample from the saltern soil in Tainan Chiku fosmid library (enf03)
g1011	土壤環境DNA	Metagenomic DNA sample from the saltern soil near Salt Mountain in Chiku Tainan fosmid library (enf04)
g1014	草蝦	<i>Penaeus monodon</i> fosmid library (shf01)
g1015	草蝦	<i>Penaeus monodon</i> (black tiger shrimp) fosmid library
g1036	蝴蝶蘭	<i>Phalaenopsis equestris</i> BAC library (NCKU-PE-HBAC)
g1037	蝴蝶蘭	<i>Phalaenopsis equestris</i> BAC library (NCKU-w9-HBAC)
g1039	水稻	<i>Oryza sativa</i> cDNA library (Ria01)
g1040	水稻	<i>Oryza sativa</i> cDNA library (Ria02)

樟芝、乳酸菌、放線菌、高溫菌等。此外也針對重要的養殖業病原菌如魚類病原菌，或是特殊環境如溫泉及有機土壤的環境DNA所建構的基因庫進行收存。其中以本中心執行紅麴菌基因體計畫所建構與保存的各種紅麴菌基因庫最完整，包括BAC、fosmid、cDNA、shotgun等基因庫，除了做為紅麴菌全基因體定序與基因註解外，更可以做為紅麴菌特定基因之表現與開發之用。

本中心目前總計保存54個基因庫，共83.4萬個選殖株，保存在-80°C的冰櫃中，已建立電腦系統化管理模式，可確保相關基因資源在最好的狀態下保存。

Genomic DNA之保存與提供

目前美國標準菌種中心(ATCC)、日本國家生物資源中心(NBRC)及德國基因體研究中心(RZPD German Science Centre for Genome Research)等皆有提供genomic DNA資源的業務，這些genomic DNA可以做為基因庫建構、南方雜交、特定基因PCR複製之用，以及物種鑑定的比對參考依據。本中心已有提供genomic DNA抽取的服務，接受委託的菌種包括一般細菌、厭氧菌、病原菌、產業用菌種(如乳酸菌)與真菌等。目前我們已規劃genomic DNA資源的提供業務，以產業用菌種(如乳酸菌、酵母菌、紅麴菌)、標準菌株、基因體定序完成的菌株以及病原菌為主要目標，以提供國人研發利用。

新技術

基因資源之研究與開發

生資中心／研究員
廖麗玲

紅麴菌可以生產monacolin K，此化合物具有降低膽固醇之活性，也是紅麴菌做為健康食品的訴求重點。目前生資中心已選殖出完整的monacolin K生合成基因組，包括兩個polyketide synthase基因(*mkA*與*mkB*)以及其他7個酵素基因，同時也以基因刪除技術，證明*mkA*基因確實是生合成monacolin K的關鍵酵素基因。本中心所選殖的紅麴菌monacolin K的生合成基因組已向多國申請專利，目前已獲得韓國的專利。此外，藉由基因體註解與cDNA表現分析，我們發掘出紅麴菌兩個高表現量基因*acuF*與*gpd1*，分別負責表現出生理代謝中主要酵素phosphoenolpyruvate carboxykinase與glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase。透過選殖出其強起動子(promoter)，以建構紅麴菌的高表現載體，可以應用於紅麴菌基

因的大量表現，該發明已獲得韓國、法國、大陸及本國的專利證書。此外，我們由紅麴菌基因體序列，探勘出抗真菌蛋白，將此蛋白質純化，並證明此蛋白質具有抗真菌的活性，現已提出專利申請。

高溫菌株是開發工業酵素的重要來源，本中心挑選本土分離的高溫菌，建構其fosmid基因庫，並進行端點定序，DNA序列經由組裝與註解，已選殖到lipase、esterase、pullulanase、amylase、protease、glycosyltransferase、short chain dehydrogenase 與 amidase等工業酵素相關的基因。

工業酵素資源庫的建立是未來研發之重點，建立本土物種多樣化之酵素基因資源庫，包括酵素基因與純化的酵素，以能提供國人更多的研發資源，做為國內酵素工業發展的基礎。首先以脂肪酶做為研發的標的，目前已選殖到10個以上的脂肪酵素基因。此外，如洋菜酶、蛋白酶、澱粉枝切酶等相關基因之選殖與表現，也已有初步成果，可提供後續開發之用。

新服務

基因資源相關服務

生資中心／研究員
廖麗玲

生資中心建立了各種基因庫之建構與保存技術，包括shotgun、fosmid、BAC以及cDNA等基因庫之建構技術；同時也建立了高通量質體DNA純化、DNA定序與分析技術。對於大量基因庫之篩選我們

也建立了高密度菌落膜製備與雜交技術；此外，我們也建構紅麴菌之寡核苷酸晶片，建立了生物晶片打點與分析技術，以上這些基因資源相關服務已對外供服務，歡迎有需要的單位與我們連繫。

抗真菌蛋白的研發與應用

生資中心/副研究員
涂景瑜

真菌族群以超強生長適應力於生態系中造就出超過250,000個種類的歧異度，目前已知有200多種動物病原真菌及30多種植物病原真菌，對人畜健康與經濟發展造成鉅大衝擊。現今防治人類病原真菌的藥物以小分子為主如polyenes、azoles、fluconazole、amphotericin B等，但隨著藥物使用的氾濫，菌株抗藥性的加劇，開發新穎的抗真菌藥物已是當務之急，而存在於自然界的抗真菌蛋白即成為新藥標靶的最佳來源之一⁽¹⁾。本文將簡介抗真菌蛋白之特性及其作用標的，並針對目前自微生物或相關基因資源中新穎性抗真菌蛋白之探勘概況作一介紹。

抗真菌蛋白之特性與分類

第一個抗真菌蛋白是從菸草中分離得到，由於具有煙草鑲嵌病毒(tobacco mosaic virus)的高度抗性，因此將其命名為致病性相關蛋白(pathogenesis-related protein)，簡稱PR蛋白。隨後陸續於細菌、真菌、昆蟲、兩棲類、植物、甚至是哺乳類中發現此類抗真菌蛋白的存在(表一)⁽²⁾，這些蛋白雖具有不同的氨基酸序列及四級結構，但都具有分子量小、含高鹼性氨基酸以及大量cysteines等主要分子特徵⁽¹⁾。

抗真菌蛋白主要是依據其酵素活性、結構組成或是與已知種類蛋白的序列相似度來加以分類。植物來源的抗真菌蛋白可分為：PR-1(15~17 kDa且為cysteine-rich蛋白)、PR-2(β-glucanases)、PR-3(幾丁質酶)、PR-4(幾丁質結合蛋白)、PR-5 (thaumatin-like蛋白)等5大群，而其他於不同物種分離出來的抗真菌蛋白也以此5大群(PR-1~5)的分類原則加以命名⁽³⁾。

抗真菌蛋白的主要作用標的物

有關抗真菌蛋白的分子作用機轉目前仍不甚清楚，而依據其主要作用標的物的不同，分成下述幾種來加以探討。

(1) 以細胞壁為作用標的

細胞壁佔真菌細胞乾重的20~30%，其主要功能為保護細胞避免物理傷害與維持細胞形狀。1999年Smits等人發表酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 的細胞壁模型，但此模型並未完整呈現於所有真菌中，例如 *Oomycetes* 菌屬缺乏幾丁質成分；而多數絲狀真菌之幾丁質則佔細胞壁總組成的10%，遠超過酵母菌的2%⁽⁴⁾。若以真菌為感染宿主，其菌絲前端細胞壁主要以幾丁質、β-1,3-glucan與α-1,3-glucan組成，此獨特的細胞壁結構不同於其他成熟

的細胞壁，可提供抗真菌蛋白作用之標的物。抗真菌蛋白如幾丁質結合蛋白、幾丁質酶、glucanases等可藉由干擾真菌細胞壁中幾丁質與glucan的合成以達到抑制真菌生長的效果⁽³⁾。

(a) 幾丁質結合蛋白(Chitin-binding protein)

幾丁質結合蛋白大小為3~20kDa，具鹼性pI值，對極端pH環境與蛋白水解酶具強抗性，主要作用為藉由與初期生成的幾丁質結合以干擾真菌生長，目前在細菌、甲殼類動物與植物中皆可發現此蛋白的蹤跡。植物的幾丁質結合蛋白被分類於PR-4蛋白群，其中一類型為具N端幾丁質結合區域，類似 rubber latex/hevein蛋白，此區域由6~8個與分子內雙硫鍵形成有關的cysteines組成；另一類型則是缺乏 hevein domain。此抗真菌活性具有物種專一性且依賴環境因素如培養基組成、滲透壓張力等的調控，可利用陽離子(如：鈉或鈣離子)加以中和其活性⁽⁵⁾。

(b) 幾丁質酶(chitinases)

幾丁質酶以endochitinases作用方式分解細胞壁上幾丁質多醣體，導致細胞壁變薄弱以提高對滲透壓的敏感性。通常具幾丁質的生物體本身也會產生幾丁質酶，以供細胞壁的型態維持與外骨骼的生成所需。植物所分泌的幾丁質酶被分類成PR-3蛋白；而細菌種類如 *Bacillus*⁽⁶⁾、*Pseudomonas*⁽⁷⁾、*Streptomyces*⁽⁸⁾等可生長在含幾丁質培養基中，除了分泌幾丁質酶以分解幾丁質作為碳源，提供生長營養所需外，其幾丁質酶也參與對抗病原真菌的抵禦機制中。

(c) Glucanases

Glucan是真菌細胞壁第二大組成物質，glucanases可水解不同glucans，被認為是極具潛力的抗真菌酵素。 β -1,3-glucanases除與小孢子生成(microsporogenesis)、授精作用、種子萌發、果實成熟、胚乳破裂(endosperm rupture)等生理發育過程相關外，於宿主防禦機制中也佔重要位置。從植物分離出的 β -1,3-glucanases被歸類為PR-2蛋白質，其可細分為第一型鹼性蛋白，大小為33 kDa，位於植物液泡中，以preprotein形式被合成，需經酵素剪切後方具酵素活性；而第二、三型為36 kDa大小的胞外酸性蛋白。在試管實驗中第一型鹼性蛋白具抗真菌活性，但第二型酸性蛋白須與幾丁質酶或是第一型鹼性蛋白相輔相成，才具抗真菌活性⁽⁹⁾。Glucanases的抗真菌機制可分為直接與間接兩種，分解真菌細胞壁中的 β -1,3-glucan，使細胞壁變薄進而促使細胞水解，此為直接抑菌機制；當glucan與幾丁質的部分被分解，釋放出寡醣作為引誘子(elicitor)，誘導出主動防禦機制反應或增加PR蛋白質的產生，此為間接作用機制⁽¹⁰⁾。真菌中也發現glucanases的存在，例如存在土壤中的木黴菌屬(*Trichoderma* spp.)可分泌具抗酵母菌活性的幾丁質酶、 β -1,6-glucanases與 β -1,3-glucanases⁽¹¹⁾。

(2) 以細胞膜為作用標的

真菌細胞膜是許多抗真菌蛋白的主要作用處，抗真菌蛋白透過與細胞膜上脂質的作用，導致孔洞的形成，促使細胞內成份的流失與膜電位之變化。細胞膜主要功能是提供細胞滲透壓環境

的保衛者，同時作為參與在能量轉換訊號、傳導溶質運送與分泌DNA複製物質等蛋白質群所需的生物基質。真菌細胞膜的脂質雙層主要由sphingolipids、磷脂質(phospholipids)與固醇(sterols)所組成，真菌與高等真核生物的細胞膜差異主要在於固醇種類，高等真核生物為膽固醇(cholesterol)；而真菌為麥角固醇(ergosterol)。因此麥角固醇所牽涉的合成代謝機制或麥角固醇本身已成為臨床抗真菌試劑的主要標的⁽¹²⁾。

與細胞膜作用的抗真菌蛋白分布極廣，涵蓋哺乳類、植物、昆蟲、兩棲類與細菌。這些帶正電的小蛋白縱使種類繁多，以分子結構組成可將其歸納出兩大特徵，第一、在生理環境中為帶正電分子型式，加速與帶負電微生物細胞膜的交互作用；第二、為與微生物細胞膜相結合的兩性結構 β -sheet或 α -helical蛋白所組成，並以雙硫鍵穩定 β -sheet的結構組成，以線性形式組成 α -helical結構⁽¹³⁾。此抗真菌蛋白大多可對抗各類細菌與真菌，當其接觸到具敏感性的微生物時，幾分鐘內即可表現出對細胞膜的分解能力，導致細胞內鉀離子的快速流失⁽¹⁴⁾。

(3) 以細胞內物質為作用標的

(a) 核糖體

核糖體為抗真菌蛋白作用最廣的細胞內標的物，在植物或真菌中皆已發現許多促使核糖體失活的蛋白(ribosome-inactivating proteins, RIPs)，其具有RNA N-glycosidase或磷酸酶活性。真菌的RIPs主要是以磷酸酶活性促使核糖體失活，例如從*Aspergillus giganteus*分離出的 α -sarcin，具

分解28S rRNA上 phosphodiester bond之專一性，利用與負電荷菌膜的交互作用進入細胞內，其前端9個氨基酸大小的勝肽片段已被證實具破壞菌膜的結構。以試管實驗證實RIPs的確可影響多數真核生物的核糖體，但RIPs作用的物種專一性取決於此抗菌蛋白是否能夠順利進入細胞內⁽¹⁵⁾。

(b) 蛋白酶抑制子(protease inhibitors)

蛋白酶常需利用金屬離子或是以aspartic acid, serine, cysteine等胺基酸作為催化中心，活化水分子提供能量以在特殊位置切斷多勝肽序列，藉由水解多勝肽上特殊胺基鍵以控制蛋白合成與降解，達到生理調節之生化機制⁽¹⁶⁾。因此蛋白酶抑制子可作為抗真菌蛋白，藉由抑制蛋白酶活性達到抑菌效果。

抗真菌蛋白資源的探勘

1994年，Wnendt等人曾於絲狀真菌*A. giganteus*培養液中分離到一具抗真菌活性的胞外蛋白(antifungal protein, AFP)，此蛋白前驅物為94個胺基酸，經生物催化後轉變成具51個胺基酸的成熟型，以8個cysteines形成4個雙硫鍵，蛋白序列與*Penicillium chrysogenum*具42%相似性⁽¹⁷⁾。藉由agar diffusion assay發現AFP抗真菌蛋白會抑制*A. niger*與*Fusarium oxysporum*的生長，最低抑制濃度為0.1-200 μ g/ml，但並不會對*A. giganteus*產生任何抑制效果⁽¹⁸⁾。將 AFP 與 *A. niger* 共培養，發現 AFP 聚集於細胞膜或細胞壁中，而細胞內卻不見其蹤影；利用 AFP 抗體定位偵測也證實 AFP 與細胞膜作用，推斷此抗真菌活性

取決與細胞膜或細胞壁的作用，應有接受子做為結合專一性的媒介，以決定AMP是否得以接近細胞膜與之作用達到抑菌效果⁽¹⁹⁾。將AMP基因轉殖到水稻中，發現此轉殖株於型態上並無明顯變化，但可增強水稻對稻熱病病原菌*Magnaporthe grisea*的抵抗力，以提升對稻熱病害的防治效果，並可產生具生殖力的後代⁽²⁰⁾。另外將番茄幼根與AMP共培養，可防

止*F. oxysporum*所產生的維管束枯萎病害⁽²¹⁾；於天竺葵栽培中，AMP可提高植株對*Botrytis cinerea*的抗性，減少灰黴病(gray mold)的發生⁽²²⁾。

紅麴菌為一重要的東方傳統發酵菌種，長期應用於酒類、紅糟、豆腐乳、醬油等食品釀造上，但至今尚未有文獻報導紅麴菌具有抑制真菌生長的能力。食品所生資中心於紅麴菌全基因體定

序中探勘到一胞外分泌型的抗真菌蛋白基因 *map1* (*Monascus Antifungal Protein 1*)，並由紅麴菌液中純化出MAFP1蛋白進行N端蛋白定序及抗真菌活性分析，證明此一新穎的MAFP1蛋白具有獨特的抗真菌活性，對常引起眼內炎及心內膜炎的 *Paecilomyces variotii*⁽²³⁾與植物輪點病(ring spot disease)的病原菌 *Helminthosporium panici* 具抑菌活性⁽²⁴⁾。

表一、抗真菌蛋白總整理 (整理自De Lucca et al., 1999之資料)

	Peptide	Source	Mode of action	Typical target organism
Bacterial and fungal	1901-II and VIII	<i>Penicillium lilacinus</i>	Unknown	<i>Candida tropicalis</i>
	A12-C	<i>Bacillus licheniformis</i>	Hyphal proliferation	<i>Microsporum canis</i>
	Aculeacins	<i>Aspergillus aculeatus</i>	Glucan synthesis	<i>Candida albicans</i>
	Aureobasidin A	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Actin assembly	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	Bacillomycin F	<i>Bacillus subtilis</i>	Lysis	<i>Aspergillus niger</i>
	CB-1	<i>Bacillus licheniformis</i>	Chitin binding	<i>Fusarium oxysporum</i>
	Cepacidine A1 and A2	<i>Burkholderia cepacia</i>	Unknown	<i>Aspergillus niger</i>
	Echinocandin B	<i>Aspergillus nidulans</i>	Glucan synthesis	<i>Candida albicans</i>
	Fungicin M-4	<i>Bacillus licheniformis</i>	Unknown	<i>Mucor sp.</i>
	FR900403	<i>Kernia</i> sp.	Chitin synthesis	<i>Candida albicans</i>
	Helioferin A and B	<i>Mycogone rosea</i>	Unknown	<i>Candida albicans</i>
	Iturin A	<i>Bacillus subtilis</i>	Lysis	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	Leucinostatin A	<i>Penicillium lilacinum</i>	Unknown	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	Leucinostatin H and K	<i>Paecilomyces marquandii</i>	Unknown	<i>Candida albicans</i>
	Mulundocandin	<i>Aspergillus sydowi</i>	Glycan synthesis	<i>Candida albicans, Aspergillus niger</i>
	Nikkomycin X	<i>Streptomyces tendae</i>	Chitin synthesis	<i>Coccidioides immitis</i>
	Nikkomycin Z	<i>Streptomyces tendae</i>	Chitin synthesis	<i>Coccidioides immitis</i>
	Pneumocandin A0	<i>Zalerion arboricola</i>	Glucan synthesis	<i>Candida albicans</i>
	Polyoxin D	<i>Streptomyces cacaoi</i>	Chitin synthesis	<i>Coccidioides immitis</i>
Insect and amphibian	Pseudomycin A	<i>Phyllomedusa syringae</i>	Lysis	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	Schizotrin A	<i>Schizotrix</i> sp.	Unknown	<i>Candida albicans</i>
	Syringomycin E	<i>Phyllomedusa syringae</i>	Lysis	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	Syringostatin A	<i>Phyllomedusa syringae</i>	Lysis (?)	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	Syringotoxin B	<i>Phyllomedusa syringae</i>	Lysis (?)	<i>Candida albicans</i>
	Trichopoly A and B	<i>Trichoderma polysporum</i>	Unknown	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	WF11899 A	<i>Coleophoma empetri</i>	Glucan synthesis	<i>Candida albicans</i>
	WF11899 B and C	<i>Cleopatra empetri</i>	Glucan synthesis	<i>Candida albicans</i>
	Antifungal peptide	<i>Sacrophaga peregrina</i>	Lysis	<i>Candida albicans</i>
	Cecropins A	<i>Hyalopora cecropia</i>	Lysis	<i>Fusarium oxysporum</i>
Plant	Cecropins B	<i>Hyalopora cecropia</i>	Lysis	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	Dermaseptins	<i>Phyllomedusa sauvagii</i>	Lysis	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	Drosomycin	<i>Drosophila melanogaster</i>	Lysis	<i>Fusarium oxysporum</i>
	Magainin 2	<i>Xenopus laevis</i>	Lysis	<i>Candida albicans</i>
	Thanatin	<i>Podisus maculiventris</i>	Unknown	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	ACE-AMP1	<i>Allium cepa</i>	Unknown	<i>Fusarium oxysporum</i>
Mammalian	Hs-AMP1	<i>Heuchera sanguinea</i>	Unknown	<i>Fusarium moniliforme</i>
	Ib-AMP3	<i>Impatiens balsamina</i>	Unknown	<i>Fusarium moniliforme</i>
	Rs-AMP2	<i>Raphanus sativus</i>	Unknown	<i>Fusarium moniliforme</i>
	Zematicin	<i>Zea mays</i>	Lysis (?)	<i>Candida albicans</i>
	NP-1 (defensin)	Rabbit granulocytes	Lysis	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	NP-2~5 (defensin)	Rabbit granulocytes	Lysis	<i>Aspergillus fumigatus</i>
	HNP-1~2 (defensin)	Human neutrophils	Lysis	<i>Candida albicans</i>
	HNP-3 (defensin)	Human neutrophils	Lysis	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	Gallinacin-1	Chicken	Lysis	<i>Candida albicans</i>
	Lactoferricin-B	Human, bovine	Lysis	<i>Candida albicans</i>
	Protegrins 1~3	Human, porcine	Lysis	<i>Candida albicans</i>
	Tracheal antimicrobial peptide	Human, bovine	Lysis	<i>Candida albicans</i>
	Tritrpticin	Human, porcine	Lysis	<i>Aspergillus flavus</i>

抗真菌蛋白之應用與展望

早在1981年，歐盟國家即已接受以*Lactococcus lactis*產生的nisin抑制大部分革蘭氏陽性菌的生長。目前在抗真菌蛋白之應用上已有將RIPs、glucanases或幾丁質酶轉殖到大麥、菸草等植物以增加對土壤中病原真菌的抵抗力⁽²⁵⁻²⁶⁾；或將*Medicago sativa*種子中的植物干擾素alfalfa抗真菌蛋白轉殖到馬鈴薯中以抵抗*Verticillium dahliae*⁽²⁷⁾。但真正利用於食物保存或是臨床治療的例子並不多，其窒礙難行的原因主要為許多抗真菌蛋白，特別是與細胞膜作用的蛋白，其作用機制為陽離子敏感性(cation-sensitive)，此特性讓處在高離子強度環境的蛋白具高敏感性。食物保存幾乎於高鹽環境下進行，此環境將導致抗真菌蛋白的活性下降甚至失活；再者於生理環境下，抗真菌蛋白的活性通常會降低，在生物體內通常要投予更高劑量方能達到抗真菌的活性，但此劑量也幾乎等於致毒劑量。加上許多抗菌蛋白有協同作用的特質，進而可能改變原蛋白活性或宿主的專一性，例如cecropin B對大腸桿菌屬並無效用，但與lysozyme一起作用，即可對大腸桿菌屬具有致死活性⁽²⁸⁾。

抗真菌蛋白可應用層面十分廣泛，如轉殖作物、生物性農藥、食品添加物與臨床新藥開發等方面，現今除了做為植物病原真菌的生物防治藥劑外，未來更具有發展為人類及動物抗真菌藥物的潛力。近年來由於化學藥劑的濫用，使得許多現今已證實具妨礙生殖或致癌效應的人工合成物質(如抗生素及化學農藥等)，得

以進入食物鏈循環裡，對人畜健康與自然環境造成無以彌補的破壞。利用分子生物技術開發對人畜安全與生態環境相容的新型生物藥劑，將可成為新世紀生技產業的發展方向。

參考文獻

- 1.C.P. Selitrennikoff, *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 2883 (2001)
- 2.A.J. De Lucca, T.J. Walsh, *Agents Chemother.* **43**, 1 (1999)
- 3.T. Theis, U. Stahl, *Cell Mol. Life Sci.* **61**, 437 (2004)
- 4.T. Fontaine, C. Simenel, G. Dubreucq, O. Adam, M. Deleperre, J. Lemoine, *J. Biol. Chem.* **275**, 27594 (2000)
- 5.K. K. Nielsen, J. E. Nielsen, S. M. Madrid, J. D. Mikkelsen, *Plant Physiol.* **113**, 83 (1997)
- 6.S. L. Wang, I. L. Shih, T. W. Liang, C. H. Wang, *J. Agric. Food Chem.* **50**, 2241 (2002)
- 7.S. L. Wang, W. T. Chang, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 380 (1997)
- 8.T. Watanabe, R. Kanai, T. Kawase, T. Tanabe, M. Mitsutomi, S. Sakuda, *Microbiology* **145**, 3353 (1999)
- 9.H. J. M. Linthorst, L. S. Melchers, A. Mayer, J. S. C. Van-Roekel, B. J. C. Cornelissen, J. F. Bol, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 8756 (1990)
- 10.J. Grenier, C. Potvin, J. Trudel, A. Asselin, *Plant J.* **19**, 473 (1999)
- 11.H. Ait-Lahsen, A. Soler, M. Rey, J. De la Cruz, E. Monte, A. Llobell, *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 5833 (2001)
- 12.A. H. Groll, A. J. De Lucca, T. Walsh, *J. Trends Microbiol.* **6**, 117 (1998)
- 13.A. Tossi, L. Sandri, A. Giangaspero, *Biopolymers* **55**, 4 (2000)
- 14.K. Matsuzaki, *Biochim. Biophys. Acta.* **1462**, 1 (1999)
- 15.J. M. Mancheno, A. Martinez-Pozo, J. P. Albar, M. Onaderra, J. G. Gavilanes, *J. Peptide Res.* **51**, 142 (1998)
- 16.J. D. A. Tyndall, D. P. Fairlie, *Curr. Med. Chem.* **8**, 893 (2001)
- 17.S. Wnendt, N. Ulbrich, U. Stahl, *Curr. Genet.* **25**, 519 (1994).
- 18.R. S. Liu, H. Huang, Q. Yang, W. Y. Liu, *Protein Expr. Purif.* **25**, 50 (2002)
- 19.T. Theis, M. Wedde, V. Meyer, U. Stahl, *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 588 (2003)
- 20.M. Coca, C. Bortolotti, M. Rufat, G. Penas, R. Eritja, D. Tharreau, A. M. Pozo, J. Messeguer, B. San-Segundo, *Plant Mol. Biol.* **54**, 245 (2004)
- 21.T. Theis, F. Marx, W. Salvenmoser, U. Stahl, V. Meyer, *Res. Microbiol.* **156**, 47 (2005)
- 22.B. M. Ana, P. Álvaro Martínez, B. Marisé and S. S. Blanca, *The American Phytopathological Society* 931343 (2003)
- 23.M. Ortoneda, J. Capilla, F. J. Pastor, I. Pujol, G. Yustes, C. Serena, J. Guarro, *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 2727 (2004)
- 24.涂景瑜與廖麗玲。紅麴菌抗真菌蛋白MAFP1之研究。食品工業發展研究所研究報告第95-3313號(2006)
- 25.G. Jach, B. Görhardt, J. Mundy, J. Logemann, E. Pinsdorf, R. Leah, *Plant J.* **8**, 97 (1995)
- 26.K. H. Oldach, D. Becker, H. Lorz, *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **14**, 832 (2001)
- 27.A. G. Gao, S. M. Hakimi, C. A. Mittanack, Y. Wu, B. M. Woerner, D. M. Stark, *Nat. Biotechnol.* **18**, 1307 (2000)
- 28.P. Casteels, C. Ampe, F. Jacobs, P. Tempst, *J. Biol. Chem.* **268**, 7044 (1993)

洋菜酶之簡介與研發

生資中心/副研究員
梁淑珊

洋菜為人們常食用的膠體性物質，常作為甜品的添加物，近來在低熱量食品中非常熱門；而洋菜酶(agarase)為可水解洋菜的酵素，在近十幾年來，陸續在日本、法國、美國、台灣、大陸等國家分離出具有洋菜水解能力的細菌，且洋菜酶基因序列的鑑定也有所斬獲；由於洋菜酶水解產物在保健食品與化妝品產業利用價值高，因此新型的洋菜酶開發逐漸受到重視，本文將介紹近來洋菜酶研發的概況。

洋菜的簡介

藻類是廣泛存在的水生植物，富含大量的營養成分，包括各種不同的脂肪酸、不飽和脂肪酸、維生素等，其營養組成會隨著季節、產地、藻類種類而有所不同，是人類常用的食品。洋菜是長鏈狀的多醣聚合物，可由藻類細胞壁萃取獲得，是一種古老的膠體來源，在美國藥典對洋菜的定義，認為洋菜是由紅藻綱(*Rhodophyceae*)的某些海藻所萃取出來的膠體性物質；洋菜依據其結構分為中性洋菜(agarose)與酸性洋菜(agaropectins)兩種構造，中性洋菜由3-O-linked β -D-galactopyranose 與4-O-linked 3,6-anhydro- α -L-galactose雙醣單元組成，分別以 β -D-(1→4)與 α

-L-(1→3)交互排列而成(如圖一)⁽¹⁾；酸性洋菜則是以中性洋菜為架構，再加上不同的醣類為分支所組成，其結構尚不清楚。

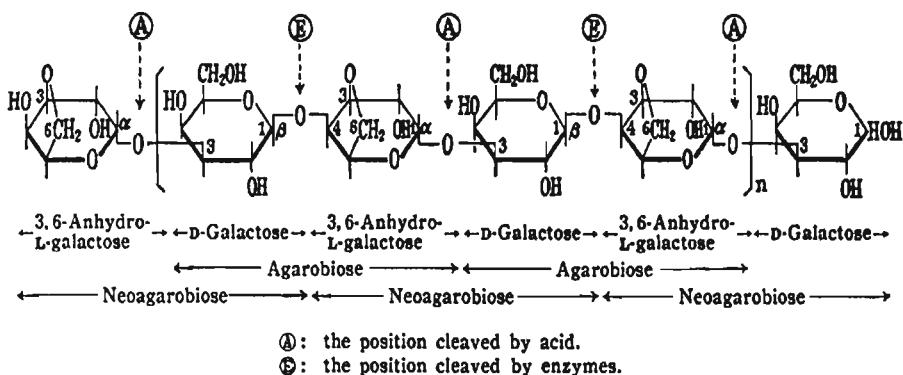
洋菜分解菌的來源

在20世紀初，Gran首度發現可分解洋菜的細菌，此後有多種洋菜水解微生物被發現，而這些微生物的分離源，主要在於海洋環境，包括海岸沉積物或是在海水紅藻中分離出；此外，也有報導指出由半鹹水域、鹽田溼地、新鮮水域或是土壤中分離出具有分解洋菜的細菌。所分離出來的菌種如下，分類屬於*Proteobacteria*門*Gammaproteobacteria*綱的*Pseudomonas*、*Alteromonas*、*Pseudoalteromonas*、*Vibrio*、

Alterococcus、*Microbulbifer*、*Agarivorans*、*Thalassomonas*、*Saccharophagus*等九個屬；另外有三個綱是屬於*Bacteroidetes*門，分別為*Bacteroides*綱的*Marinilabilis*屬，與*Flavobacteria*綱的*Flavobacterium*、*Cellulophaga*、*Zobellia*屬，與*Sphingobacteria*綱的*Cytophaga*、*Persicobacter*、*Microscilla*屬；此外，由土壤中分離出的革蘭式陽性菌洋菜水解微生物大多屬於*Actinobacteria*與*Firmicutes*門⁽²⁾，分離出來的菌種並不多。

洋菜酶的分類與作用特性

由於大分子的洋菜無法直接進入菌體內，因此這分解洋菜的細菌會分泌出可分解洋菜的酵素到環境中，讓洋菜降解為小分子以獲取碳源，而這些可水解洋菜成為寡醣的酵素稱為洋菜酶。洋菜酶依照其酵素切割位置可分為 α -洋菜酶與 β -洋菜酶，前者水解 α -1,3鍵結而後者催化 β -1,4鍵結之分解；洋菜可透過酸或是 α -洋菜酶水解得到具有3,6-anhydro-L-galactose為還原端的洋



(Araki *et al.*, 1956)

圖一、洋菜結構

A：所代表的切位為酸或 α -洋菜酶都可催化水解的 α -1,3鏈結，產物為洋菜二醣(agarobiose)。
E：所代表的切位為只有 β -洋菜酶可催化水解的 β -1,4鏈結，特定洋菜酶水解後產物的最小單位為新洋菜二醣(neoagarobiose)。

菜寡醣(agaro-oligosaccharides)，或是透過 β -洋菜酶將洋菜分解為具有D-galactose還原端的新洋菜寡醣(neoagaro-oligosaccharide)，水解最終產物依照酵素不同可產生新洋菜二醣(neoagarobiose)、新洋菜四醣(neoagarotetraose)、新洋菜六醣(neoagarohexaose)，而新洋菜寡醣類只能以酵素催化

產生，無法以化學方法獲得，不同 β -洋菜酶所水解洋菜的終產物整理如表一；由於新洋菜寡醣的應用廣泛，因此探勘應用價值較高的 β -洋菜酶逐漸受到重視。

β -洋菜酶的水解作用機制類似糖苷水解酶(glycoside hydrolase, GH)，IUPAC編號為EC 3.2.1.81，目前所發表的 β -

agarase基因，雖然催化的位置都在 β -D-(1→4)鍵結上，但是依照胺基酸序列的比對分析，可將 β -洋菜酶分為3個不同家族的醣苷水解酶，包括GH16、GH50及GH86，其分類資料可在醣解酵素資料庫CAZy (Carbohydrate-Active Enzymes database, http://www.cazy.org/fam/acc_GH.html)查詢⁽²⁾，不同基因所比較分析出的GH家族整理歸納如表一。三個家族中，以GH16家族的研究較為透徹，GH16家族作用在洋菜的切位多屬於內切形式，其中屬於GH16由Zobellia galactanivorans菌所分離的 β -洋菜酶3D立體結構已經被鑑定出來，此蛋白質具有2組透過loop互相連結的七個 β -sheet結構組成，酵素作用活化區在七個的loop之間並向外延伸到蛋白質結構表面⁽²⁾。而此蛋白質有兩個基質結合位置，其中一個位於活化區內，可容納八個洋菜多醣，而第二個基質結合區則與第一個區域平行⁽³⁻⁴⁾，推測其功能可能是解開洋菜的雙股螺旋所必需。另外， β -洋菜酶胺基酸序列上具有高度的保留性，在催化糖苷鍵斷裂的活化區中，具有ExDx(x)E的保留序列，2個麩胺酸(glutamate，E)殘基，功能是作為nucleophile與acid/base反應所需，而另一個保留的酸性胺基酸天門冬胺酸(aspartate，D)，則是用來幫助活化區的麩胺酸維持負電荷所需，x則是代表任意的胺基酸。而屬於

表一、 β -洋菜酶的整理

Strain	Gene	Substrate	Product	GH	Reference
Alteromonas sp. E-1	Agarase purify from cell-free extract	Agarose Neoagarotetrose Neoagarohexaose	Neoagarobiose	N.D.	20
Agarivorans sp. Strain JAMB-A11	β -agarase (agaA11 : AB178483)	Agarose	Neoagarobiose (90%)*	GH50	10
Agarivorans albus YKW-34	β -agarase agaA34	Agarose	Neoagarotetraose (25%)* Neoagarobiose (75%)*	GH50	21
Agarivorans sp. JA-1	β -agarase (agaE11)	Agarose	Neoagarotetraose (50%)* Neoagarobiose (50%)*	GH50	7
Pseudomonas atlantica	β -agaraseI	Agarose	Neoagarotetraose (major) Neoagarobiose (minor)	N.D.	22
	β -agaraseII	Agarose	Neoagarobiose (major) Neoagarotetraose (minor)		
Zobellia galactanivorans Dsij	β -agarases A (AX008608)	Neoagarohexaose	Neoagarotetraose	GH16	6
Zobellia galactanivorans Dsij	β -agarases B (AX008610)	Neoagarohexaose	Neoagarotetraose (major) Neoagarobiose (minor)	GH16	
Pseudoalteromonas gracilis B9	β -agarase (aagA : U61972)	Agarose Neoagarohexaose	Neoagarotetraose Neoagarobiose (major) Neoagarobiose (minor)	N.D.	23
Vibrio sp. strain JT0107	agaA(D14721)	Neoagarotetrose	Neoagarobiose	GH50	5
Microbulbifer-like bacterium, strain JAMB-A94	β -agarase (agaO : AB106954)	Agarose	Neoagarotetraose (major) Neoagarohexaose (minor)	GH86	24
Pseudoalteromonas antarctica strain N-1.	β -agarase	Agarose	Neoagarotetraose Neoagarohexaose	N.D.	25
marine bacterium JAMB-A94	β -agarases (agaA : AB124837)	Agarose	Neoagarotetraose	GH16	11
Microbulbifer	β -agarases (agaA7 : AB107974)	Agarose	Neoagarotetraose	GH16	9
Alteromonas sp. SY37-12	β -agarase	Agarose	Neoagarotetraose Neoagarohexaose	N.D.	26
Saccharophagus degradans 2-40	aga50A(ZP_00315251) aga50D(ZP_00315360)		N.D.	GH50	27
	aga16B (AT167062)	Agarose	Neoagarotetraose	GH16	
	aga86E (ZP_00315657)	Agarose	Neoagarobiose	GH86	
	aga86C(ZP_00315652)		N.D.		
Vibrio sp. strain PO-303	β -agarase agaC (AB218419)	Agarose >-Neoagarodecaose (DP10)	Neoagarotetraose Neoagarohexaose Neoagarooctaose(DP8)	New GH	28
Vibrio sp. strain PO-303	β -agarase agaA (AB254407)	Agarose	Neoagarotetraose Neoagarohexaose	GH16	29
Vibrio sp. strain V134	β -agarase agaV (EF157302)	Agarose	Neoagarotetraose Neoagarohexaose	GH16	30
marine Pseudoalteromonas sp. CY24	β -agarase agaB (AY293310)	Agarose	Neoagarooctaose neoagarodecaose	New GH	31

GH : glycoside hydrolase * : molar ratio of hydrolysis end product N.D. : not determined

GH50與GH86兩族的 β -洋菜酶蛋白質結構則尚未被鑑定出，其作用機制仍不明確，其活化區的胺基酸亦不清楚，初步的研究顯示GH50與GH86的蛋白質作用在洋菜的切位包括外切與內切的形式都有，與GH16較不相同。

洋菜酶蛋白質的表現與純化

洋菜酶蛋白質的獲得，可利用表現載體獲得重組蛋白或是純化菌體內生性的蛋白。重組洋菜酶的表現方法，目前可利用大腸桿菌或枯草桿菌為宿主以進行酵素蛋白之大量誘導表現。先將洋菜酶基因之open reading frame (ORF)建構到適當的表現載體上，再轉殖送入大腸桿菌中，透過適當誘導使在胞內產生大量之重組蛋白，破菌之後即可取得蛋白質，此方法具有培養快速與操作方便的優點，利用此方法獲得的蛋白質包括*Vibrio* sp. Strain JT01072的AgaA⁽⁵⁾、*Zobellia galactanivorans*的AgaA 與AgaB⁽⁶⁾、*Agarivorans* sp. JA-1的AgaE1⁽⁷⁾、海洋*Pseudo-alteromonas* sp. CY24的AgaB⁽⁸⁾等。而利用枯草桿菌表現則可在大量誘導後，使蛋白質分泌到胞外，枯草桿菌表現系統的優點是可不需經過破菌的動作，直接收取含有蛋白質培養液即可進行後續的純化，利用枯草桿菌大量純化重組蛋白包括*Microbulbifer-like* AgaO⁽⁹⁾、*Agarivorans* sp. JAMB-A11的AgaA11蛋白⁽¹⁰⁾、marine bacterium JAMB-94的AgaA⁽²²⁾、*Microbulbifer* strain JAMB-A7的AgaA7⁽¹¹⁾等，都是利用此方法表現出大量的洋菜酶。在獲得蛋白粗萃取物之後，可再利用親和性管柱、膠體過濾法、離子交換層

析法、或是疏水作用層析法等方法進行純化以得到純度較佳的重組蛋白。

除了利用基因重組的方法之外，若菌株的洋菜酶基因序列尚未確定，由於 β -洋菜酶大部分為分泌型，可直接由菌株培養液純化由菌體分泌出的內生性蛋白以獲得洋菜酶，在培養的技巧上，有些菌株需要在培養液中加入適量的洋菜當成碳源，才能誘導菌體產生胞外洋菜酶，例如*Pseudo-alteromonas antarctica* strain N-1需要在培養液中加入0.15%的洋菜，才能誘導出洋菜酶⁽¹²⁾；經過大量培養後，收取菌的培養液，利用硫酸氨沉澱法、濃縮過濾法或是冷凍乾燥獲的初步萃取的蛋白，再依照不同洋菜酶的特性，經過膠體過濾法、離子交換層析法、親和性管柱或是疏水作用層析法，約經過2-3個步驟的純化以獲得純的內生性蛋白。

洋菜酶的應用與展望

利用 β -洋菜酶水解所得新洋菜寡醣之功能非常的多元，可應用在食品、化妝品以及醫學產業上。新洋菜寡醣屬於低熱量食品，並且可減緩澱粉的分解、抑制細菌的生長，因此可當作低熱量的食品添加物；而利用 β -agarase分解龍鬚菜 (*Gracilaria verrucosa*)所產生的寡醣類，以腹腔注射或經口餵食飼養的老鼠，具有刺激巨噬細胞活化的能力⁽¹³⁾，因此可作為增強免疫功能的機能性食品；此外，海藻類多醣亦具有降低血清中總膽固醇的功效。而2006年Hu等人發現分子較大的新洋菜八醣、新洋菜十醣、新洋菜十二醣等，具有益生質(probiotic)

的功用，可在體外培養與大鼠體內促進比菲德氏菌(*bifidobacteria*)與乳酸菌(*lactobacillus*)的生長，具有保健食品開發的價值⁽¹⁴⁾。

此外， β -洋菜酶作用後的產物新洋菜二糖同時兼具有保溼與使黑色素細胞美白的功能⁽¹⁵⁾，實驗中利用新洋菜二醣測試其抑制黑色素生合成酵素酪胺酸酶(tyrosinase)的活性，發現新洋菜二醣抑制效果與已知的美白化妝品添加物麴酸(kojic acid)與熊果素(arbutin)效果相當；已知麴酸與熊果素對細胞具有毒殺性，所以其使用濃度受到限制；而新洋菜二醣對細胞幾乎無毒殺性⁽¹⁶⁾，更具有開發的價值，且新洋菜二醣是少數兼具有保溼與美白雙重功效的物質，因此量產後將可作為功能性化妝品添加物。

另外洋菜酶在分解非洋菜類的聚醣上的研究近年來也有所突破，科學家發現有部分的洋菜酶除了可以分解洋菜之外，還具有降解紫菜聚醣(porphyrans)的功能，而紫菜聚醣是由紅藻類的條斑紫菜(*Porphyra yezoensis*)萃取出，組成的結構與洋菜相似，其醣類單體有D-galactose 3,6-anhydro-L-galactose、6-O-methyl-D-galactose與L-galactose-6-sulfate，跟洋菜的結構上相較多出了甲基與硫酸基修飾的醣類，而有研究顯示紫菜聚醣具有抗癌、抗高血脂、做為腸內菌益生質、增加脂類代謝等功能，一般認為紫菜聚醣由於分子量大，在體內吸收不易，若能夠將其聚合物組成降低到10個醣類單元，可有效的獲得紫菜聚醣中的硫酸化寡醣(sulfated oligosaccharides)，其生理可利用性將可提高；因此降解大分子紫菜聚醣的酵素亦是開發的重點。目前發現可分解紫菜聚

醣的菌株種類包含有 *Alteromonas* sp.、*Vibrio* sp. strain JT0107、*Pseudomonas* isolate、*Bacillus cereus* 等，而日本研究人員由 *Vibrio* sp. strain PO-303 所鑑定出的 β -洋菜酶，也具有降解紫菜聚醣的功能⁽¹⁷⁾；另外 2006 年 Hatada 等人也從 *Thalassomonas* sp. strain JAMB-A33 中選殖出一個新型的 α -洋菜酶，此洋菜酶除了可以分解洋菜之外，亦可降解紫菜聚醣，其水解紫菜聚醣的產物與未水解的大分子紫菜聚醣相比較，前者具有較高的自由基與超氧化陰離子清除活性，顯示其抗氧化功效較佳⁽¹⁸⁾。因此洋菜酶可作用在非洋菜類大分子聚醣之分解酵素活性也成為另一個開發的重點。

除此之外，在分子生物實驗室中，洋菜酶常被用來純化以洋菜電泳分離的 DNA，或是海洋藻類原生質體(protoplast)的製作⁽¹⁹⁾。然而目前已開發的洋菜酶由於其活性、穩定度及產率不佳，使其應用受限，因此新型洋菜酶的探勘將有助於其作用特性的改良，以增加其應用性。食品所生資中心目前已收集保存數株具有洋菜酶活性的菌株，包括 *Alterococcus agarolyticus* (BCRC17102)、*Simiduia agarivorans* (BCRC 17597)、*Paenibacillus agaridevorans* (BCRC 17347)、*Pseudoalteromonas agarivorans* (BCRC 17819)、及 *Thalassomonas agarivorans* (BCRC 17492) 等，可提供給各界進行相關研發；未來本所將針對本土分離的菌株進行洋菜酶之活性篩選、基因選殖與表現，期能開發具有產業價值之洋菜酶。

參考文獻

- 1.C. Araki, *Bulletin of the Chemical Society of Japan* **29**, 543(1956).
- 2.M. Gurvan, N. Pi, B. Tristan, C. Mirjam, H. William, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**, 23 (2006).
- 3.J. Allouch, W. Helbert, B. Henrissat, and M. Czjzek, *Structure (Cambridge)* **12**, 623 (2004).
- 4.J. Allouch, M. Jam, W. Helbert, T. Barbeyron, B. Kloareg, B. Henrissat, and M. Czjzek, *J. Biol. Chem.* **278**, 47171 (2003).
- 5.Y. Sugano, T. Matsumoto, H. Kodama, M. Noma, *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 3750 (1993).
- 6.M. Jam, D. Flament, J. Allouch, P. Potin, L. Thion, B. Kloareg, M. Czjzek, W. Helbert, G. Michel, T. Barbeyron, *Biochem. J.* **385**, 703 (2005).
- 7.D.G. Lee, G.T. Park, N.Y. Kim, E.J. Lee, M.K. Jang, Y.G. Shin, G.S. Park, T.M. Kim, J.H. Lee, S.J. Kim, S.H. Lee, *Biotechnol. Lett.* **28**, 1925 (2006).
- 8.C. Ma, X. Lu, C. Shi, J. Li, Y. Gu, Y. Ma, Y. Chu, F. Han, Q. Gong, W. Yu, *J Biol Chem.* **282**, 3747 (2007).
- 9.Y. Ohta, Y. Hatada, Y. Nogi, Z. Li, S. Ito, K. Horikoshi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 266 (2004).
- 10.Y. Ohta, Y. Hatada, S. Ito and K. Horikoshi, *Appl. Biochem.* **41**, 183 (2005).
- 11.Y. Ohta, Y. Hatada, Y. Nogi, M. Miyazaki, Z. Li, M. Akita, Y. Hidaka, S. Goda, S. Ito, K. Horikoshi, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 505 (2004).
- 12.J. Vera, R. Alvarez, E. Murano, J.C. Slebe, O. Leon, *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4378 (1998).
- 13.Y. Yoshizawa, A. Ametani, J. Tsunehiro, K. Nomura, M. Itoh, F. Fukui, and S. Kaminogawa, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **59**, 1933 (1995).
- 14.B. Hu, Q. Gong, Y. Wang, Y. Ma, J. Li, W. G. Yu, *Anaerobe* **12**, 260 (2006).
- 15.R. Kobayashi, M. Takisada, T. Suzuki, K. Kirimura, and S. Usami, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 62 (1997).
- 16.D. G. Lee, M. K. Jang, O. H. Lee, N. Y. Kim, S. Ju, S. H. Lee, *Biotechnol. Lett.* **30**, 911 (2008).
- 17.J. Dong, Y. Tamaru, T. Araki, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 38 (2007).
- 18.Y. Hatada, Y. Ohta, K. Horikoshi, *J. Agric. Food. Chem.* **54**, 9895 (2006).
- 19.T. Araki, Z. Lu, and T. Morishita, *J. Mar. Biotechnol.* **6**, 193 (1998).
- 20.K. Kirimura, N. Masuda, Y. Iwasaki, H. Nakagawa, R. Kobayashi, and S. Usami, *J. Biosci. Bioeng.* **87**, 436 (1999).
- 21.X.T. Fu, H. Lin, S.M. Kim, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **78**, 265 (2007).
- 22.L. M. Morrice, M. W. McLean, W. F. Long, and F. B. Williamson, *Eur. J. Biochem.* **137**, 149 (1983).
- 23.D. C. Schroeder, M. A. Jaffer, V. E. Coyne, *Microbiology* **149**, 2919 (2003).
- 24.O. Yukari, H. Yuji, N. Yuichi, L. Zhijun, I. Susumu, H. Koki, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **66**, 266 (2004).
- 25.J. Vera, R. Alvarez, E. Murano, J.C. Slebe, O. Leon, *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 4378 (1998).
- 26.J. Wang, H. Mou, X. Jiang, H. Guan, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**, 833 (2006).
- 27.N. A. Ekborg, L. E. Taylor, A. G. Longmire, B. Henrissat, R. M. Weiner, S.W. Hutcheson, *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 3396 (2006).
- 28.J. Dong, Y. Tamaru, T. Araki, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 38 (2007).
- 29.J. Dong, Y. Tamaru, T. Araki, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 1248 (2007).
- 30.W.W. Zhang, L. Sun, *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 2825 (2007).
- 31.C. Ma, X. Lu, C. Shi, J. Li, Y. Gu, Y. Ma, Y. Chu, F. Han, Q. Gong, W. Yu, *J. Biol. Chem.* **282**, 3747 (2007).

審定公告之專利寄存生物材料

資料範圍自 97 年 5 月至 97 年 7 月

專利名稱關鍵字/公告號	寄存生物材料名稱	BCRC編號	專利申請人
豬霍亂沙門氏桿菌標的基因缺損突變株及其減毒疫苗之製備/ I298349	豬霍亂沙門氏桿菌phoQ基因缺損株 (<i>Salmonella Choleraesuis</i> phoQ mutant) SCPQ1	910285	國立中興大學
	豬霍亂沙門氏桿菌crp基因缺損株 (<i>Salmonella Choleraesuis</i> crp mutant) SCRP19	910286	
人類抗CD-40抗體及製備及利用方法/ I264467	老鼠B細胞融合瘤#11	960127	麒麟麥酒股份有限公司(日本) 美國拉荷亞過敏及免疫協會(美國)
	老鼠B細胞融合瘤#72	960128	
	老鼠B細胞融合瘤F5-77	960135	
	老鼠B細胞融合瘤F1-102	960136	
	老鼠B細胞融合瘤F4-465	960137	
	老鼠B細胞融合瘤F2-103	960138	
	老鼠B細胞融合瘤F5-152	960139	
	老鼠B細胞融合瘤F5-157	960140	
膽固醇合成抑制劑Monacolin K生合成相關基因/ I297358	pMPF 002(於大腸桿菌 EPI 300)	940471	食品工業發展研究所

說明：1. 上述生物材料為申請專利而依有關專利申請之生物材料寄存辦法寄存於食品所，相關專利已審定公告，其專利名稱之關鍵字、專利公告號及專利申請人資料如上表。

2. 任何人可依有關專利申請之生物材料寄存辦法第十七條向食品所申請提供上述生物材料，作為研究及實驗用。

3. 洽詢專線：(03)5223191 轉 233 或 513。

早期公開之專利寄存生物材料

資料範圍至 97 年 7 月

專利名稱關鍵字/公開號	寄存生物材料名稱	BCRC編號	專利申請人
紫丁香蕈及育成與栽培方法 /200819060	紫丁香蕈(<i>Lepista nuda</i>)ARI-LN1	930083	行政院農業委員會農業試驗所
纖維寡醣之製造方法 /200613559	<i>Trichoderma reesei</i> GL-1	930082	日商旭化成化學股份有限公司(日本)

說明：1. 上述生物材料為申請專利而依有關專利申請之生物材料寄存辦法寄存於食品所，相關專利已公開但尚未審定公告，其專利名稱之關鍵字、專利公開號及專利申請人資料如上表。

2. 上述專利申請案因尚未審定公告，生物材料尚無法依有關專利申請之生物材料寄存辦法第十七條向食品所申請提供。

3. 洽詢專線：(03)5223191 轉 233 或 513。

生物資源保存及研究簡訊 第74期

發行者：財團法人 食品工業發展研究所

發行人：劉廷英所長

主 編：陳倩琪

編 輯：劉桂郁、黃麗娜

王培銘、姚少凌

本著作權依補助契約歸屬財團法人 食品工業發展研究所

地址：新竹市食品路331號

電話：(03)522-3191-6

傳真：(03)522-4171-2

承印：國大打字行

電話：(03)526-4220

ISSN：1021-7932

GPN：2009001214

ISSN 1021-7932

