

申請日期	86 年 11 月 5 日
案 號	86116481
類 別	

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書		
一、發明 名稱	中 文	
	英 文	
二、發明 創作人	姓 名	(4) 三宅俊雄
	國 籍	(4) 日本
		(4) 日本國岡山縣岡山市伊島町一丁目三番二三號
	住、居所	
三、申請人	姓 名 (名稱)	
	國 籍	
	住、居所 (事務所)	
	代 表 人 姓 名	

裝

訂

線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6

B6

本案已向：

國 (地區)	申請專利，申請日期：	案號：	， ☐ 有 ☐ 無主張優先權
日本	1996 年 11 月 8 日	8-311232	☒ 有主張優先權
日本	1997 年 3 月 3 日	9-061716	☒ 有主張優先權

有關微生物已寄存於：，寄存日期：，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

五、發明說明(1)

發明背景

發明領域

本發明關於一種新穎海藻糖磷酸化酶、其製法和用途。更詳而言之，關於一種新穎海藻糖磷酸化酶，其於無機磷酸及/或其鹽（若沒有引起任何不便，則以下本發明說明書中縮寫成"無機磷酸"）之存在下將海藻糖水解形成D-葡萄糖和 β -D-葡萄糖-1-磷酸及/或其鹽（若沒有引起任何不便，則以下本發明說明書中縮寫成" β -D-葡萄糖-1-磷酸"），且反之亦然地由 β -D-葡萄糖-1-磷酸和D-葡萄糖形成海藻糖和無機磷酸，及關於海藻糖磷酸化酶之製法，用海藻糖磷酸化酶製造的含葡萄糖基轉移醣之醣組成物，及含醣組成物的組成物。

先前技藝之說明

近來，寡醣如麥芽糖和海藻糖及其功能已經成為焦點，且已經對它們的獨特及不同製法就各種不同觀點作研究。已知磷酸化酶如麥芽糖、海藻糖、蔗糖、海藻糖和纖維二糖磷酸化酶可用當作製造上述寡醣的方法。

L. R. Marechal 等人在"生物化學雜誌"，第247冊，第10號，第3223-3228頁(1972)中報告說細眼蟲藻(Euglenagracilis)在細胞內製造海藻糖磷酸化酶。S. Murao 等人在"農業及生物化學"，第49冊，第7號，第2113-2118(1985)中報告酶的性質。K. Aisaka 等人在日本專利公開第59,584

五、發明說明(2)

／ 9 5 號中揭示一種細菌海藻糖磷酸化酶，其係由 *Catellatospora ferruginea* 屬的微生物及橙色動孢囊菌 (*Kineosporia aurantiaca*) 屬之一製得。H. Kizawa 等人在 "生物科學、生物科技及生物化學"，第 5 9 冊，第 1 0 號，第 1 9 0 8 - 1 9 1 2 頁 (1 9 9 5) 中報告變易微球菌 (*Micrococcus varians*) 種製造該酶，及 M. Yoshida 等人在 "Oyo-Toshitsu-Kagaku"，第 4 2 冊，第 1 號，第 1 9 - 2 5 頁 (1 9 9 5) 報告單胞菌 (*Plesiomaonas* sp. SH-35) 種的微生物製造海藻糖磷酸化酶。在這些海藻糖磷酸化酶中，來自變易微球菌 (*Micrococcus varians*)、細眼蟲藻 (*Euglena gracilis*) 及單胞菌 (*Plesiomaonas* sp.) 種的酶分別具有低於 3 0、4 0 和 4 5 °C 的較低熱穩定性，而導致在工業製造上相當低的反應速率以及酵催反應期間細菌的污染。

發明概述

本發明提供一種具工業上有利之熱穩定性的新穎海藻糖磷酸化酶，其製法，用該酶製備的含葡萄糖基轉移醣之醣組成物，及其用途。

爲了達成以上目的及獲得一種具有令人滿意的熱穩定性的海藻糖磷酸化酶，本案發明人廣泛地篩選製造該酶用的微生物。結果，它們發現歸屬於熱厭氧菌屬的熱厭氧菌 *brockii*，A T C C 3 5 0 4 7，製造一種新穎的海藻糖磷酸化酶並建立製法。它們亦建立一種含 β -D-

五、發明說明 (3)

葡萄糖 - 1 - 磷酸轉移醣的醣組成物，其係藉於醣之存在中讓酶接觸當作醣供體的 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸而製得，及含醣組成物的組成物。因此，它們達成本發明。

附圖之詳細說明

圖 1 顯示溫度對依本發明的海藻糖磷酸化酶之活性的影響。

圖 2 顯示 pH 值對依本發明的海藻糖磷酸化酶之活性的影響。

圖 3 顯示溫度對依本發明的海藻糖磷酸化酶之穩定性的影響。

圖 4 顯示 pH 值對依本發明的海藻糖磷酸化酶之穩定性的影響。

圖 5 顯示重組體 DNA 之限制圖。圖中，箭頭顯示 DNA 編碼本海藻糖磷酸化酶。

發明之詳細說明

本發明的海藻糖磷酸化酶包括酶類，其可由熱厭氧菌屬之微生物獲得且其於無機磷酸之存在中將海藻糖水解形成 D - 葡萄糖及 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸。海藻糖磷酸化酶可具有以下作用及物理化學特性：

(1) 作用

(a) 於無機磷酸之存在下將海藻糖水解形成 D - 葡萄糖及 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸；

五、發明說明(4)

(b) 由葡萄糖及 β -D-葡萄糖-1-磷酸形成海藻糖及無機酸，及使用 β -D-葡萄糖-1-磷酸當作醣供體將葡萄糖基之轉移反應催化至其它醣；

(2) 分子量

88,000 $\pm$ 5,000 道爾吞(daltons)，
根據 SDS-PAGE；

(3) 等電點

pI 5.4 $\pm$ 0.5，根據使用兩性電解質的電泳；

(4) 最適宜溫度

約 70 $^{\circ}\text{C}$ ，當於 pH 7.0 培養 30 分鐘時；

(5) 最適宜 pH

約 7.0 - 7.5，當於 60 $^{\circ}\text{C}$ 培養 30 分鐘時；

(6) 熱穩定性

穩定至溫度高及於約 60 $^{\circ}\text{C}$ ，當於 pH 7.0 $^{\circ}\text{C}$ 培養一小時；

(7) pH 穩定性

穩定於 pH s 約 6.0 至 9.0，當於 4 $^{\circ}\text{C}$ 培養 24 小時；

(8) 活化作用及穩定作用

被 1 mM 二硫蘇糖醇所活化；及

(9) 活性抑制

五、發明說明 (5)

被 $1 \text{ m M } \text{Cu}^{++}$ 、 Pb^{++} 、 Zn^{++} 、 Hg^{++} 、 Mg^{++} 或 Mn^{++} 所抑制。

海藻糖磷酸化酶可具有 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3 的胺基酸序列當作部分胺基酸序列，及或當作全部，可具有 SEQ ID NO: 4 的胺基酸序列。此藝中，若存在會製造所欲蛋白質的隔離微生物，則藉適當的突變劑來處理微生物可容易獲得蛋白質的功能均等物，若存在有 DNA 編碼所欲的蛋白質，則應用普遍於 DNA 的重組體 DNA 技術可容易獲得蛋白質的功能均等物。本海藻糖磷酸化酶當然包括這樣的功能均等物。措辭"功能均等物"意為蛋白質其仍具有實質上與海藻糖磷酸化酶相同的活性，及具有酶的胺基酸序列，其中一或多個胺基酸被不同者所替換，一或多個胺基酸加到 N- 及 / 或 C- 端或插入於內胺基酸序列內，在 N- 及 / 或 C- 端區域的一或多個胺基酸被刪除，及在內胺基酸序列中的一或多個胺基被刪除。可令人滿意地獲得上述本海藻糖磷酸化酶，藉由天然來源中分離出，如由會製造酶的微生物培養物，藉突變劑處理而獲得的其突變種，及藉應用重組 DNA 和肽合成技術來人工合成的酶。

依本發明的 DNA 係包括所有上述的 DNA s，其將本海藻糖磷酸化酶編碼。該 DNA s 之例子是那些含有 SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列及編碼 SEQ ID

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (6)

N O : 5 之核苷序列者，及其功能均等物。措辭"功能均等物"意味 D N A s (其編碼蛋白質) 實質上具有與海藻糖磷酸化酶相同的活性，及具有 S E Q I D N O : 5 之核苷序列，其中一或多個鹼基被不同者所替換。除了上述的 D N A s 外，本 D N A 尚包括另一 D N A s，其中 5'- 及 / 或 3'- 端係連接至一或多個上述 D N A s 以外的 D N A s，如開始密碼子起始者、停子密碼子、Shine - Dalgarno 序列、編碼訊息肽的核苷序列、啟動子、增強者、及終止者。

本發明未特定限制這些 D N A s 的來源和製備。例如，含熱厭氧菌 *brockii*，A T C C 3 5 0 4 7 的熱厭氧菌屬的微生物當作 D N A s 的天然來源可被提及。可藉由培養之微生物的細胞碎屑收集 D N A 部分而獲得含本 D N A 的 D N A s。所收集的 D N A s 本身可用於本發明中，且它們可被製備成極有利的重組體 D N A，此係藉將一含本 D N A 的片段引入一自身可複製性載體中。重組體 D N A 之獲得可通常應用普遍於上述 D N A 的重組 D N A 技術以獲得基因庫，及施用一選擇法如雜交法來由基於核苷序列的基因庫選擇所欲的重組體 D N A，其編碼本海藻糖磷酸化酶，如 S E Q I D N O : 5。所獲得的重組體 D N A 可被放大，當藉引入適當的宿主如埃希氏菌 (*Escherichia*) 屬微生物而獲得培養的轉形體時，接著應用普遍於培養的鹼 - S D S 法而容易獲得所欲量的本 D N A。可容易獲得本 D N A，藉依習用方式應用 P C R

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (7)

法使用當作模板的上述微生物之毀壞細胞或由細胞所收集的 D N A , 及使用當作引體的基於 S E Q I D N O :

5 化學合成的 D N A , 或藉化學合成一種含 S E Q I D N O : 5 的 D N A 。可獲得本 D N A 的上述功能均等物, 例如藉應用位置指向之突變於上述重組體 D N A , 或應用上述使用重組體 D N A 當作模板和一種含核苷序列的化學合成 D N A 的 P C R 法, 其被轉化成所欲的核苷序列, 當作引體。

本 D N A 包括那些重組體 D N A 形式者, 其被引入自身可複製性載體中。如上述, 這些重組體 D N A s 係極有用於製備本 D N A , 且亦有用於製造本海藻糖磷酸化酶。一旦如上述獲得所欲的 D N A 後, 應用普遍於將 D N A 插入適當載體內的重組 D N A 技術而可相當容易獲得那些重組體 D N A s 。該載體之例子為那些在適當宿主中具有複製性者。本發明中可任意地使用以下載體; p U C 1 8 , Bluescript[®] II SK (+) , p k k 2 2 3 - 3 , 及 λ g t . λ C , 其需要埃希氏菌 (Escherichia) 屬微生物當作宿主; p U B 1 0 , p T Z 4 , p C 1 9 4 , ρ 1 1 , ϕ 1 , 及 ϕ 1 0 5 , 其需要桿菌 (Bacillus) 當作宿主, 及 p H Y 3 0 0 P L K , p H V 1 4 , T R p 7 , Y E p 7 , 及 p B S 7 , 其需要至少兩種宿主。關於將本 D N A 插入載體的方法之例子, 用限制酶來裂斷適當的載體及所得本 D N A 或一含本 D N A 的 D N A , 及連接所形成的 D N A 片段和載體片段。所適當選用的該限制酶之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(8)

例子是 A c c I , A l u I , B a m H I , B g l I I , B s t X i , E c o R I , H i n d I I I , N o t I , P s t I , S a c I , S a l I , S m a I , S p e I , X b a I , 及 X h o I 。

在連接 D N A 和載體片段的情況中，例如，可用對限制酶有適當識別順序的化學合成 D N A s 。爲了連結 D N A s 與其它者，在緩冷後它們以內細胞地或外細胞地接觸 D N A 連接酶。

本 D N A 包括那些轉形體形式者，其內引入有 D N A 。該轉形體係極度可用於獲得本海藻糖磷酸化酶及 D N A 。例如，埃希氏菌 (Escherichia) 及桿菌 (Bacillus) 屬、放線菌、酵母之微生物可任意用當作轉形體之宿主微生物。通常將上述重組體 D N A 引入一適當的宿主內可獲得轉形體；當使用埃希氏菌屬微生物時，微生物和重組體 D N A 係於鈣離子之存在中培養，當使用桿菌屬微生物時，則應用競爭細胞及原生質體法。上述製備本 D N A 的方法本身係屬技藝中所習用者，例如敘述於 J. Sumbruck 等人的 "Molecular Cloning A Laboratory Manual" ，第二版，由 Cold Spring Harbor Laboratory Press 出版 (1 9 8 9) 。

製造海藻糖磷酸化酶的本方法之特徵在於其包括培養會製造本酶的微生物，及由培養物中收集所製得的酶。本發明並未特別限制所用的該微生物之屬和種以及培養方法。該微生物之例子包括那些屬於熱厭氧菌 (

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(9)

Thermoanaer-obium) 屬的微生物，較佳為熱厭氧菌 brockii, A T C C 3 5 0 4 7, 及藉將本 D N A 引入適當的宿主微生物而獲得的轉形體。

任何天然及合成的營養培養基可用於培養本發明中所用的微生物，只要微生可在其中生長及製造本酶。本發明中所用的碳源係那些微生物可利用者；例如可用糖類，如麥芽糖、海藻糖、糊精、及澱粉，及含有糖類的天然物質如糖蜜及酵母萃取物。這些碳源係視它們的種類而定來選擇在培養基中的濃度。例如，較佳的糖類濃度係不高過 2 0 w / v %，及就微生物之生長和繁殖而言係不高過 5 w / v %。本發明中所用的氮源，例如是無機含氮化合物如銨鹽及硝酸鹽，及有機含氮化合物如尿素、玉米漿、酪蛋白、朊、酵母萃取物及肉萃取物。若需要，無機化合物，例如鈣、鎂、鉀、鈉、磷酸、錳、鋅、鐵、銅、鋁及鈷之鹽可用於本發明中。

微生物係厭氧式地培養，條件選擇為溫度 5 0 - 8 0 °C，較佳 6 0 至 7 0 °C，及於 p H s 5 - 8，較佳 6 . 5 - 7 . 5。本發明中可用任何的培養時間，只要足夠微生物之生長，較佳為 1 0 - 5 0 小時。關於上述轉形體之培養，通常藉通氣攪拌法於好氧狀態下溫度 2 0 - 6 5 °C 及 p H s 2 - 9 培養約 1 - 6 天。

培養微生物後，可從培養物中收集本酶。因為酶活性通常可能出現於細胞內，可獲得完整及經處理的細胞當無粗酶。全部培養物亦可用當作粗酶。可用習用的固-液

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (10)

分離法來分離細胞與營養培養基；例如可用直接離心培養物的方法，在加助濾劑入培養物後或預覆後過濾培養物的方法，及薄膜如普通濾材和中空纖維來過濾培養物的方法。完整及經處理的細胞本身可用當作粗酶，且若需要，它們可被製成部分純化的酶。

經處理的細胞之形態包括細胞之蛋白質片段，完整及經處理的之細胞之固定化製劑，經乾燥、冷凍乾燥及經界面活性劑、酶、超音波、機械碾磨和機械壓力處理的細胞。本酶可用為粗或純化形式，而經處理的細胞可通常更經習用於將酶純化的方法所處理，例如，用硫酸銨作鹽析，用丙酮及乙醇作沉降，及用普通濾材和中空纖維的薄膜濃縮/透析。

粗酶可用為原封完整的或可經習用純化方法所純化。例如，用硫酸銨將經處理的細胞鹽析成粗酶，接著將酶透析及接續用陰離子交換管析層析術使用 "DEAT-TOYOPEARL[®]"（一種 Tosoh 公司販售的樹脂），陽離子交換管柱層析術使用 "CM-TOYOPEARL[®]"（一種日本東京 Tosoh 公司販售的樹脂），疏水管柱層析術使用 "BUTYL-TOYOPEARL[®]"（一種日本東京 Tosoh 公司販售的樹脂），及凝膠過濾管柱層析術使用 "ULTROGEL[®] AcA44 RESIN"（一種凝膠過濾管柱層析術用的凝膠，由 Sepracor/IBF s. a. 販售，Villeneuve-la Garenne，法國），以獲得酶之電泳單蛋白質帶。

如下分析本發明的海藻糖磷酸化酶：將 0.2 毫升

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

五、發明說明 (11)

酶溶液加到 2 毫升的 20 mM 含有 1.0 w / v % 海藻糖當作受質的磷酸鹽緩衝液 (pH 7.0)，於 60 °C 培養溶液 30 分鐘，對反應混合物取樣 0.5 毫升，及於 100 °C 培養 10 分鐘以中止酵催反應。將 0.5 毫升 D - 葡萄糖氧化酶 / 過氧化酶試劑加到該加熱的樣品，攪拌混合物，保持混合物於 40 °C 歷 30 分鐘，及添加 2.5 毫升 5 N 鹽酸，攪拌所產生的混合物，及測量混合物在 525 nm 波長的吸收度。酶活性的 1 單位係定義為酶每分鐘形成 1 微莫耳 D - 葡萄糖。以類似於上述的分析可分析麥芽糖 - 及麴二糖 - 磷酸化酶，例外的是分別以麥芽糖及麴二糖代替海藻糖當作受質。

在使用海藻糖磷酸化酶製造含葡萄糖基轉移酶的醣組成物之本酵催反應中，通常讓酶接觸當作醣供體的 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸以及當作受體其它適當醣，例如，單醣如 D - 木糖、D - 半乳糖、G - 葡萄糖、D - 岩藻糖及 L - 岩藻糖，以將葡萄糖基轉形成成上述還原醣，結果分別地形成葡萄糖基 - D - 木糖苷、葡萄糖基 - D - 半乳糖苷、海藻糖、葡萄糖基 - D - 岩藻糖苷及葡萄糖基 - L - 岩藻糖苷。

市售當作試劑的 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸可原封完整地用當作本發明中的醣供體，且其之製備可藉於無機磷酸及 / 或它的鹽之存在中使一適當的磷酸化酶接觸當作受質的醣；例如，其之製備可藉於無機磷酸及 / 或它的鹽之存在中使海藻糖磷酸化酶接觸海藻糖，使麥芽糖接觸麥芽

五、發明說明 (12)

糖磷酸化酶，或使麴二糖接觸麴二糖磷酸化酶。當上述以磷酸化酶形成 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸的任一反應係在使用本海藻糖磷酸化酶形成葡萄糖基轉移醣的相同反應系統中進行時，可將 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸直接供應給系統，結果有利特徵為製造成本降低且製造步驟簡化。上述無機磷酸包括正磷酸及濃縮磷酸，且通常，較宜使用正磷酸。無機磷酸鹽包括磷酸離子之化合物，通常衍生自上述無機磷酸，且通常較宜使用高水溶性磷酸鈉鹽及鉀鹽。

例如，本酶可用當作上述海藻糖磷酸化酶，而市售的細菌麥芽糖磷酸化酶亦可如此用。就麴二糖磷酸化酶而言，可用日本專利申請號 3 1 1, 2 3 5 / 9 6 中所揭示的酶，該專利係由本發明相同的申請人所申請，標題為“麴二糖磷酸化酶，其製法及用途”。詳細說明係於說明書中；例如將熱厭氧菌 *brockii*，A T C C 3 5 0 4 7 的種菌接種入“細菌及噬菌體之 A T C C 編目”，第 1 8 版，第 4 5 2 - 4 5 6 頁 (1 9 9 2) 中所述的微生物之營養培養基內，及於厭氧狀態下於 6 5 °C 培養基中培養，接著將培養物離心，用超音波破壞細胞，及收集所產生的上清液以獲得所要的具有麴二糖磷酸化酶活性之部分。

對於利用本海藻糖磷酸化酶的葡萄糖基轉移醣形成反應中所用的受質濃度係不特別限制。通常，較宜使用者係含有 1 - 2 0 w / w % (措辭 "w / w %" 在說明書中將縮寫成 %，除非另有指明) 的 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸當

五、發明說明 (13)

作醣供體及 1 - 2 0 % 的受體之溶液。如上述，當在相同於上述葡萄糖基轉移醣形成反應的反應系統中進行藉適當磷酸化酶之作用所作的 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸形成反應時，可推薦以下者：當海藻糖磷酸化酶接觸它的受質時，約 1 - 2 0 % 海藻糖溶液用於代替 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸當作葡萄糖基轉移反應的受質，於約 0 . 5 - 2 0 m M 的磷酸鹽如磷酸二氫鈉之存在中。當其它磷酸化酶與它們的受質接觸時，約 1 - 2 0 % 麥芽糖或麴二糖可與約 0 . 5 - 2 0 m M 的磷酸鹽如磷酸二氫鈉共存以代替 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸當作葡萄糖基轉移反應的受質。視所用的醣之種類而定，以乾燥固體基準 (d . s . b) 計，麥芽糖 - 或麴二糖 - 磷酸化酶的較佳共存量約 0 . 1 - 5 0 單位 / 克醣。

上述反應可在不會將受質之存在中所用的酶鈍化之溫度進行，即高及於約 7 0 °C，較佳約 1 5 - 6 5 °C。通常可將反應之 p H 調整至 p H 值約 4 . 0 - 9 . 0，較佳約 5 . 0 - 7 . 5。可適當選擇反應時間，視酵催反應速率而定，通常其約 0 . 1 - 1 0 0 小時，當酶的一般用量約 0 . 1 - 5 0 單位 / 克受質 (d . s . b) 時。如上述，當在相同於葡萄糖基轉移醣形成反應的反應系統中進行藉不同的磷酸化酶之作用所作的 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸形成反應時，反應溫度及 p H 值係設定在不會鈍化所用的磷酸化酶者，視它們的熱穩定性而定。

因此，所得的反應混合物含有葡萄糖基轉移醣，其

五、發明說明 (14)

對應於用當作受質的醣。葡萄糖基轉移醣的產率係依酵催反應中所用的受質濃度、受質種類及反應條件而變化。例如，在於無機磷酸之存在中使用 10 % 海藻糖及 5 % D - 半乳糖當作受質的情況中，所形成的葡萄糖基半乳糖苷之產率係約 30 %。本說明書中，葡萄糖基轉移醣的產率係意味反應混合物中所形成的該轉移醣相對於全部醣的百分率 (%)，d . s . b .。

爲了使反應混合物中葡萄糖基轉移醣的含量達到最高可能程度，酶源（其將反應混合物中所形成的 D - 葡萄糖分解及去除）可有利上共存於混合物中以促進醣轉移反應。該技術可令人滿意地用於分解及去除 D - 葡萄糖，當作反應過程中所形成的副產品，及促進醣轉移反應—當於葡萄糖基轉移反應以直接供應醣供體的相同反應系統中進行上述使用適當的磷酸化酶之 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸形成反應時。

酶源係具有 D - 葡萄糖分解活性的微生物、該微生物之培養物、它們完整和經處理的細胞、及具有 D - 葡萄糖分解活性的酶。可用任何微生物，只要它們具有相當高的 D - 葡萄糖分解活性但是不具有或實質上無分解所形成的轉移醣之活性；較佳者係酵母。可用任何酶，如葡萄糖氧化酶、過氧化氫酶、吡喃氧化酶、葡萄糖脫氫酶、葡萄糖激酶、及己糖激酶。在這些酶中，較佳可用葡萄糖氧化酶及過氧化氫酶。

可依習用方式過濾及離心所製造的含葡萄糖基轉移

五、發明說明 (15)

醣之反應混合物以去除雜質，然後經純化步驟如用活性炭脫色，及用 H - 和 O H - 型離子交換劑除鹽，及濃縮成糖漿產品。若需要，可藉噴霧乾燥來任意乾燥糖漿產品成為粉狀產品。

含葡萄糖轉基移醣的本醣組成物可被加工成富有醣的產品，其係藉由反應混合物中分離出醣及將所得混合物純化。該分離方法之例子為分離及去除雜質者；使用酵母去除單醣的發酵法或酵母發酵法，及去除併存的醣之方法如薄膜過濾，管柱層析，及方法包括調整反應混合物至鹼性 p H 值，及將混合物加熱以分解還原醣。更尤其地，有利用於工業規模者之方法係將併存的醣去除以收集富有所要的葡萄糖基轉移醣，其係藉使用強酸陽離子交換樹脂的管柱層析術來去除併存的醣，如於日本專利公開號 2 3 , 7 9 9 / 8 3 及 7 2 , 5 9 8 / 8 3 中所揭示的。此案中，可任意使用習知的固定床、移動床及半移動方法。

溶液與雜質的分離可依習用方式過濾及離心以去除不溶性物質，使經過純化步驟如用活性炭脫色，及用 H - 和 O H - 型離子交換劑除鹽，及濃縮成糖漿產品。若需要，可用方法如噴霧乾燥來將糖漿產品乾燥成為粉狀產品。

所得含葡萄糖轉基移醣的本醣組成物通常含有至少 5 %，較佳至少 1 0 % 的葡萄糖轉基移醣，d . s . b . 。

含葡萄糖轉基移醣的本醣組成物具有令人滿意的味

五、發明說明 (16)

道、甜味、滲透控制能力、保濕性、光澤給予能力、防止結晶能力、及防止回凝能力、抗蛀性、雙叉乳酸桿菌 (bifid) 之生長促進活性、及礦物吸收促進活性。因為這些令人滿意的特性和功能，本醣組成物可任意廣泛地用於組成物中，如食品、菸草、香煙、飼料、寵物食物、化粧品、藥物、成形體、日常食物及產品、林業及農業產品、試劑、及化學工業產品。

含葡萄糖轉基移醣的本醣組成物可完整地用當作甜味調味品。若需要，本醣組成物可與適當量的一或多種其它甜味料一起使用，例如粉末糖漿、葡萄糖、麥芽糖、海藻糖、蔗糖、異構化糖、蜂蜜、楓糖、山梨糖醇、麥芽糖醇、乳糖醇、二氫查耳酮、甜菊苷、 α -葡萄糖基甜菊苷、里巴迪苷 (rebaudioside)、甘草苷、L-天冬胺醣-L-苯基丙胺酸甲酯、糖精、甘胺酸及丙胺酸，以及填充劑如糊精、澱粉及乳糖。

本醣組成物具有甜味能調和具有酸味、酸度、鹽味、苦味、澀味及美味的物質，以及令人滿意的耐酸性及耐熱性。因此，它們可任意用於食品中，通常當作甜味料、味道改良劑及品質改良劑。

本醣組成物可用於調味料中、如豆醬、粉末豆醬、"味噌"、"funmmatsu-味噌" (一種粉末味噌)、"moromi" (一種精製清酒)、"hishio" (一種精製豆醬)、"furikake" (一種調味魚粉)、美乃滋、調味醬、食醋、"sanbai-zu" (一種糖醬、豆醬及食醋)、"funmatsu-

五、發明說明 (17)

sushi-su" (壽司用的粉末食醋)、"chuka-no-moto" (一種中國菜用的速食混合物)、"tentsuyu" (一種日本熱炸食物)、"mentsuyu" (一種日本細麵條醬)、調味醬、番茄醬、醃菜及醃漬品之預混物如 "takuan-zuke-no-moto" (一種醃漬蘿蔔之預混物)、及 "hakusai-zuki-no-moto" (一種新鮮白油菜醃漬品之預混物)、"yakniku-no-tare" (一種日本烤肉醬)、咖哩油脂麵糊、速食燉菜混合物、速食湯混合物、"dashi-no-moto" (一種速食濃煮湯混合物)、混合的調味料、"mirin" (一種甜酒)、"shin-mirin" (一種合成味醃)、餐用糖漿及咖啡糖漿。

本醃組成物可自由使用於加甜 "wagashi" (日本餅) 如 "senbei" (一種米菓)、"arare-mochi" (一種米餅方塊)、"okoshi" (一種粟和米之餅)、"mochi" (一種米漿)、"manju" (一種具有菜豆醬的小甜麵包)、"uiro" (一種甜米凍)、"an" (一種菜豆醬)、"yokan" (一種甜菜豆凍)、"mizu-yokan" (一種軟紅豆凍)、"kinggoku" (一種羊羹)、果凍、pao de Castellas 及 "amedama" (一種日本太妃糖)；糖果糕餅類如小甜麵包、餅乾、脆餅乾、小西餅、派、布丁、奶油、卡士達糊、奶油泡夫、軟餅、海綿蛋糕、甜甜圈、巧克力、口香糖、牛奶糖及糖果、冷凍甜點、如冰淇淋、雪果霜，糖漿如 "kajitsu-no-syrup-zuke" (一種保藏水果) 及 "korimitsu" (一種刨冰用糖漿)；糊如麵糊花生糊、水果

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (18)

糊及塗抹品；經加工的水果及蔬菜的果醬、果糕、"syrup - zake"（水果醃漬品）及"toka"（蜜餞）；醃菜及醃漬品如"fukujin - zake"（紅蘿蔔醃漬品）、"bettara - zuke"（一種完全新鮮的紅蘿蔔醃漬品）、"senmai - zuke"（一種切片的新鮮紅蘿蔔醃漬品）及"rakkyo - zuke"（醃漬的大頭蔥；肉品如火腿及香腸；魚肉製品如魚肉火腿、魚肉香腸、"kamaboko"（一種經蒸煮的魚糊）、"chikuwa"（一種魚糊）及"tempura"（一種日本熱油炸魚糊）；"chinmi"（一佐料）如"uni - no - shiokara"（鹹海膽內臟）、"ika - no - shiokara"（鹹烏賊內臟）、"su - konbu"（經加工的海帶）、"saki - surume"（乾烏賊條）及"fugu - no - mirin - boshi"（一種經味醂調味的乾河豚）；"tsukudani"（一種在豆醬中煮過的食物）如紫菜、可食的野生植物、烏賊乾、魚及貝類；日常食物如"nimame"（熟豆類）、馬鈴薯沙拉及"konbu - maki"（一種海帶捲）；乳品；罐裝及瓶裝產品如肉品、魚肉、水果及蔬菜者；酒精性飲料如清酒、合成清酒、水果酒及烈酒；不含酒精的飲料如咖啡、茶、可可、果汁、碳酸飲料、酸乳飲料、及含乳酸菌的飲料；速食食品如速食泡夫混合物、速食熱餅混合物、及"sokuseki - shiruko"（一種紅豆湯與米糕的混合物）、及速食湯混合物；及食物如嬰兒食物、治療用食物、補充營養的飲料、熟米製品、麵條、及冷凍食物；以及供改善上述食品之味道和品質。

五、發明說明 (19)

本醣組成物亦可用於動物如家畜、家禽及魚類的飼料和寵物食物中以改善它們的味覺喜好。本醣組成物可當作甜味料、味道改良劑及品質改良劑以糊狀或液狀用任意地用於其它組成物中，如菸草、香煙、牙膏、唇膏、腮紅、唇霜、內服藥、錠劑、片劑、液滴形式的魚肝油、口香片、口腔清涼劑、含漱劑、化粧品及藥物。

本醣組成物可當作品質改良劑及穩定劑用於易損失有效成分及活性的生物活性物質中，以及用於含有上述生物活性物質的健康食品 and 藥物中。該生物活性物質之例子是胞質溶液，如 α -、 β - 及 γ - 干擾素，腫瘤壞死因子 - α (TNF - α)、腫瘤壞死因子 - β (TNF - β)、巨噬細胞遷移抑制因子、菌落刺激因子、間白血球溶菌素 1、2、6、12、15 及 18；激素如胰島素、生長激素、催乳激素、促紅素、組織纖維蛋白溶酶原活化劑、促卵泡成熟激素、及胎盤激素；生物製劑如 BGG 疫苗、日本腦炎疫苗、麻疹疫苗、活脊髓灰質炎疫苗、牛痘疫苗、破傷風類毒素、Trimeresurus 抗毒素及人類免疫球蛋白；抗生素如青黴素、紅黴素、氯黴素、四環黴素、鏈黴素及卡那黴素硫酸鹽；維生素如硫胺素、核黃素、L - 抗壞血酸、魚肝油、類胡蘿蔔素、麥角甾醇及生育酚；酶如脂酶、彈性蛋白酶、尿激酶、胰酶、 β - 澱粉酶、異澱粉酶、葡聚糖酶及乳糖酶；萃取物如人參萃取物、鼈肉萃取物、綠藻萃取物、蘆薈萃取物及蜂膠萃取物；存活的微生物如病毒、乳酸菌及酵母；及其它生物活性物質如蜂王漿。

五、發明說明 (20)

利用本醣組成物，可將上述生物活性物質製入健康食品及藥物內，具有令人滿意的高穩定性及品質而不怕損失或鈍化它們的有效成分及活性。

如上述，本發明中所用的措辭"組成物"係包括口服－或非經腸－可用的食品，化粧品及藥物，以及日常產品，農業和漁業產品、試劑、及化學工業產品。

將本醣組成物混入上述組成物內所用的方法係包括習用方法，例如混合、捏合、溶解、熔化、浸泡、滲透、噴灑、塗覆、包衣、噴霧、注射及固化。本醣組成物混入組成物中的量通常為 0 . 1 % 或較多，較佳 0 . 5 % 或較多。

以下實驗更詳細說明本發明：

實驗 1

海藻糖磷酸化酶之製備

依照"細菌及噬菌體之 A T C C 編目"，第 1 8 版，第 4 5 2 - 4 5 6 頁 (1 9 9 2) 中所揭示的 *Thermoanaerobium* < 熱厭氧菌 > *brockii* 之培養基的製法但是用 0 . 5 w / v % 海藻糖代替 0 . 5 w / v % 葡萄糖當作碳源，而製備得培養基，將 1 0 0 毫升整份的培養基置於 1 0 0 毫升加壓瓶內，接著接種 *Thermoanaerobium brockii*，A T C C 3 5 0 4 7 的種菌，及讓其停駐於 6 0 °C 歷 4 8 小時以供種菌培養。

將 1 0 升整份的新鮮營養培養基 (與種菌培養所用的

五、發明說明 (21)

相同) 置於四個 1 1 升不銹鋼瓶內，加熱滅菌，冷卻至 6 0 °C，將一 v / v % 的種菌接種至培養基，接著於 6 0 °C 靜置培養約 4 0 小時。

將約 4 0 升所得集結的培養物離心以獲得 9 2 克濕細胞，然後懸浮於 1 0 m M 磷酸鹽緩衝液中，超音波破碎，及離心以獲得毀壞的細胞的懸浮液之上清液。上清液具有活性為 0 . 3 單位 / 毫升的海藻糖磷酸化酶。

實驗 2

海藻糖磷酸化酶之純化

用 U F 薄膜將實驗 1 中的上清液濃縮成約 3 6 0 毫升的酶濃縮物，其具有活性約 3 0 單位 / 毫升的海藻糖磷酸化酶。

將 3 0 0 毫升酶濃縮物對著 1 0 m M 磷酸鹽緩衝液 (p H 7 . 0) 作透析 2 4 小時，及離心以去除不溶性物質。使 3 8 0 毫升所得之上清液經過 3 8 0 毫升 "DEAE-TOYOPEARL[®] 6 5 0 G E L" 作離子交換管柱層析，離子交換管柱層析所用的凝膠係為日本東京 Tosoh 公司的商品。

讓本海藻糖磷酸化酶吸附在凝膠上，及藉送入線性梯度的氯化鈉 (由 0 M 增加至 0 . 5 M) 以由管柱溶析出。具有酶活性的部分 (在約 0 . 1 M 溶析出的) 被收集及集結，然後如下將集結溶液中的酶純化；對著新鮮製備的含有 1 . 5 M 硫酸銨的同樣緩衝液將溶液透析，將透

五、發明說明 (22)

析後的溶液離心以去除不溶性物質，及使上清液經使用 1 0 0 毫升 "BUTYL - TOYOPEARL[®] 6 5 0 G E L" 疏水性管柱作層析。用線性梯度的硫酸銨（由 1 . 5 M 減少至 0 . 5 M）以溶析吸附在凝膠上的海藻糖磷酸化酶，及收集具有酶活性的部分。

集結該部分及用 3 0 0 毫升 "ULTROGEL[®] AcA44 RESIN" 作凝膠過濾層析，凝膠過濾層析所用的凝膠為 Sepracor/IBFs. a. Villeneuve la Garenne，法國，的商品，接著收集具有酶活性的部分。

由上述純化步驟所獲得純化酶樣品之產率係約 2 5 %，此係相對於毀壞細胞的上清液之酶活性而言。酶樣品具有比活性為 7 8 . 2 單位 / 毫克蛋白質。依照 Lowry 法使用牛血清蛋白當作標準蛋白質對蛋白質作定量。

在使用 7 . 5 w / v % 聚丙烯醯胺的凝膠電泳上檢驗樣品的純度，透露樣品是一種相當高純度的蛋白質，被檢驗為單蛋白質帶。

實驗 3

海藻糖磷酸化酶之特性

使實驗 2 中的海藻糖磷酸化酶經過使用 1 0 w / v % 凝膠的 S D S - P A G E。與標記蛋白質作比較，其係日本東京的日本 B i o - R a d 實驗室的商品，它們平行電泳，測量酶的分子量，透露其分子量為 8 8 , 0 0 0 ±

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

五、發明說明 (23)

5,000 道耳吞，且根據填充有 " T S K g e l G 4 0 0 S W " 的 7.5 mm 直徑和 600 mm 長度的管柱之凝膠過濾係給予分子量為 $190,000 \pm 10,000$ 道耳吞，該凝膠過濾用的凝膠係東京 Tosoh 公司的商品。

使純化後的海藻糖磷酸化酶經過使用 2 w / v % " AMPHOLINE " (一種兩性電解質，為瑞典 Uppsala 的 Pharmacia LKB Biotechnology AB 的商品) 的聚丙烯醯胺凝膠電泳，接著測量蛋白質帶及凝膠的 pH 值，透露酶具有 p I 為 5.4 ± 0.5 。

依酶活性的分析來研究溫度和 pH 值對本海藻糖磷酸化酶活性的影響。為了研究溫度的影響，使酶於約 50 - 85 °C 之溫度反應以代替酶分析中所用的 60 °C。若要研究 pH 值的影響，則使酶於 pH 值約 4 - 9 反應以代替酶活性之分析中所用的緩衝液之 pH。這兩種情況中，類似於酶分析者中止酵催反應，接著對所形成的葡萄糖作定量。這些結果係於圖 1 及 2 中，其分別為溫度和 pH 值之影響數據，且以相對於最大值的數值來表示。當在 pH 7.0 培養 30 分鐘時酶之最適宜溫度約 70 °C，當在 60 °C 培養 30 分鐘時最適宜 pH 約 7.0 - 7.5。酶之熱穩定性的測量係藉由：將酶溶解於 10 mM 磷酸鹽緩衝液 (pH 7.0) 於溫度約 40 - 85 °C 培養一小時，將所培養的酶冷卻，及依照酶分析法來分析剩餘的酶活性。酶之 pH 穩定性的測量係藉：將酶溶解於具有不同 pH 值 (約 4 - 10) 的緩衝液內，保持各酶溶液於 4 °C

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (24)

24 小時，調整各溶液以給予 pH 7.0，及依照酶分析法來分析殘存的酶活性。這些結果係於圖 3 及 4 中，其分別為酶的熱及 pH 穩定性的數據且以相對於最大值的數值來表示。酶具有熱穩定性高至於約 60 °C 及 pH 穩定性約 6.0 - 9.0。酶活性被 1 mM Cu^{++} 、 Pb^{++} 、 Zn^{++} 、 Hg^{++} 、 Mg^{++} 或 Mn^{++} 所抑制。

實驗 4

海藻糖磷酸化酶之部分胺基酸序列

實驗 4 - (1)

N-端胺基酸序列

將實驗 2 方法所獲得的純化酶樣品之一部分對著蒸餾水作透析，及將以蛋白質計約 40 μg 的經透析酶當作樣品用於分析 N-端胺基酸序列。"PROTEIN SEQUENCER MODEL 473A"，一種美國 Foster 市 Applied Biosystems 公司所販售的裝置，被用於分析 N-端之高到五個的胺基酸殘基。分析過的部分胺基酸序列為 S E Q I D N O : 1。使用相同酶樣品之新鮮製劑作更精確的分析，透露酶在 N-端具有 S E Q I D N O : 6 的胺基酸序列。

實驗 4 - (2)

內部分胺基酸序列

將實驗 2 方法所獲得的純化酶樣品之一部分對 10

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (25)

毫升 T r i s - H C l 緩衝液 (p H 9 . 0) 作透析，及用相同緩衝液的新鮮製劑來稀釋經透析的溶液以給予一毫克／毫升的蛋白質濃度。使一毫升所得溶液混合 1 0 μ g 賴胺醯肽鏈內切酶，一種日本東京 Wako 純化學工業公司販售的酶樣品，及於 3 0 $^{\circ}$ C 使經過酵催反應 2 2 小時以形成肽。進行逆相 H P L C (高效液體層析) 以分離肽，分離條件為使用 " μ BONDASPHERE C - 18 COLUMN (2 . 1 毫米直徑及 1 5 0 毫米長度) "，一種美國麻州 Milford 的 Waters Chromatograph, Div., MILLIPORE 公司所販售的逆相 H P L C 管柱，流速為 0 . 9 毫升／分鐘，周圍溫度，及線性梯度丙腈由 0 v / v % 增加至 4 8 v / v % 於 0 . 1 v / v % 三氟醋酸中歷 1 2 0 分鐘。藉測量 2 1 0 n m 的吸收度來檢測由管柱溶析出的肽。兩種肽，即具有滯時間 6 6 分鐘的 T P 1 0 及具有滯留時間 8 6 分鐘的 T P 1 4，它們明顯地互相分離，被分開收集，於真空乾燥，及溶於 0 . 1 v / v % 三氟醋酸和 5 0 v / v % 乙腈的 2 0 0 μ l 溶液內。在蛋白質序列器上分析各肽，透露 N - 端之高至五個的胺基酸殘基。T P 1 0 及 T P 1 4 分別給予 S E Q I D N O : 2 及 S E Q I D N O : 3 的胺基酸序列。使用相同分析之相同酶樣品的新鮮製劑作更精確的分析，透露 T P 1 4 具有 S E Q I D N O : 7 在 N - 端。

實驗 5

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (26)

海藻糖磷酸化酶的醣水解反應之受質專一性

一種選自 D - 葡萄糖、麥芽糖、蔗糖、乳糖、海藻糖、新海藻糖、纖維二糖、蜜二糖、麴二糖、異麥芽糖、槐糖、龍膽二糖、尼加糖、昆布二糖、麥芽五糖及 4 - 鄰 - α - D - 葡萄糖基海藻糖的醣之水溶液與 10 單位 / 克 (d . s . b .) 實驗 2 之方法所得的純化海藻糖磷酸化酶之醣混合，及於 5 m M 磷酸氫二鈉的存在中 60 °C 及 p H 7 . 0 培養 24 小時。各反應溶液的醣濃度為 2 w / v %。預 - 反應溶液及後 - 反應混合物經薄層層析 (以下縮寫成 "T L C")，其使用 "KIESELGEL60 (20 × 20 公分)"，一種美國 Rahway 的 Merck & Co. 公司所販售的 T L C 用鋁板。樣品在周圍溫度於使用 1 - 丁醇 / 吡啶 / 水 (= 7 : 3 : 1 體積比) 當作展開溶劑系統之板上展開一次，及用 20 v / v % 硫酸 / 甲醇溶液噴灑該板，及於 110 °C 加熱約 10 分鐘以著色。比較板上所檢測到的溶液和混合物之點，查核酶是否作用於醣。結果於表 1 中：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (27)

表 1

受 質	分 解
D - 葡 萄 糖	—
麥 芽 糖	—
蔗 糖	—
乳 糖	—
海 藻 糖	+
新 海 藻 糖	—
蜜 二 糖	
纖 維 二 糖	—
麴 二 糖	—
異 麥 芽 糖	—
槐 糖	—
龍 膽 二 糖	—
尼 加 糖	—
昆 布 二 糖	—
麥 芽 五 糖	—
及 4 - 鄰 - α - D - 葡 萄 糖 基 海 藻 糖	—

註) + : 被本海藻糖磷酸化酶之作用所水解。
 — : 不被本海藻糖磷酸化酶之作用所水解。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (28)

如表 1 中所示，發現本海藻糖磷酸化酶對於海藻糖表現強的受質專一性及對其作用形成 D - 葡萄糖及 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸，但是不會作用其它的醣。

實驗 6

海藻糖磷酸化酶在葡萄糖基轉移醣形成反應中對受體的專一性

一水溶液，其溶於等量以重量計的當作醣供體的 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸及表 2 中當作受體的單醣、寡醣及糖醇之一中，係與 10 單位／克實驗 2 之方法所得的純化海藻糖磷酸化酶之 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸混合，及於 60 °C 和 pH 7.0 酵催反應 24 小時。類似於實驗 5，預 - 反應溶液及後 - 反應混合物經 TLC，接將板著色。比較板上所檢測到的溶液和混合物樣品之點，根據後反應的新檢測到點判斷是否形成轉移醣。藉肉眼觀察新檢測到點之色度，相對評估轉移醣的產率。結果於表 2 中：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (29)

表 2

受 體		葡萄糖基轉移 醣的形成
分 類	名 稱	
醛 戊 醣	D - 木 糖	+++
	L - 木 糖	-
	D - 核 糖	-
醛 己 醣	D - 半 乳 糖	++
	D - 葡 萄 糖	+++
	D - 甘 露 糖	+
酮 己 醣	L - 山 梨 糖	-
	D - 果 糖	-
去 氧 糖	2 - 去 氧 葡 萄 糖	++
	D - 岩 藻 糖	+++
	L - 岩 藻 糖	+++
葡 萄 糖 苷	α - 甲 基 葡 萄 糖 苷	-
	β - 甲 基 葡 萄 糖 苷	-
糖 醇	山 梨 糖 醇	-
胺 糖	葡 萄 糖 胺	++
	N - 乙 醯 基 葡 萄 糖 胺	++
雙 醣	麥 芽 糖	-
	乳 糖	-
	異 麥 芽 糖	-
	纖 維 二 糖	-
	山 梨 糖	-

註) - : 沒有形成葡萄糖基轉移醣。

+: 相當小量形成葡萄糖基轉移醣

++ : 相當大量形成葡萄糖基轉移醣

+++ : 非常大量形成葡萄糖基轉移醣

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (30)

如表 2 中所示，其透露本海藻糖磷酸化酶形成葡萄糖基轉移醣，其係藉有效地由當作醣供體的 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸轉移葡萄糖基給當作受體的還原醛糖如單醣如 D - 木糖、D - 半乳糖、D - 葡萄糖、2 - 去氧 - D - 葡萄糖、D - 岩藻糖、L - 岩藻糖、葡萄糖胺及 N - 乙酰基葡萄糖胺的。考慮本酶之受質專一性，判斷這些葡萄糖基轉移醣係非還原醣。當使用 α - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸當作醣供體代替 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸時，沒有獲得葡萄糖基轉移醣。

參照以下實驗 7 和 8 將說明部分實驗 6 中所透露的葡萄糖基轉移醣之詳細結構，該醣係藉本海藻糖磷酸化酶之醣轉移反應而形成的。

實驗 7

來自 D - 葡萄糖及 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸的
葡萄糖基轉移醣

一部分反應混合物，其係由實驗 6 中用 D - 葡萄糖及 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸當作受質而獲得者，被 10 m M 磷酸鹽緩衝液 (p H 7 . 0) 稀釋而給予 1 % 的濃度，與 0 . 5 毫升美國 St. Louis 的 Sigma 化學公司所販售的海藻糖樣品混合，及於 40 °C 酵催反應 20 小時。對經處理及未經處理的反應混合物之各部分作乾燥，溶於吡啶中，及經三甲基矽烷化。用氣相層析術 (以下稱作 ”

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (31)

G L C ") 來分析所得產品，條件為使用不銹鋼管柱，3 毫米直徑及 2 公尺長度，裝填有 2 % "SILICONEOV-17 / CHROMOSOLB W"，一種日本東京 G L 科學公司所販售的 G L C 用樹脂，氮氣當作載體，流速為 40 毫升 / 分鐘，管柱烘箱溫度為 160 - 320 °C，加熱速率為 7.5 °C / 分鐘。藉氫火焰離子化檢測器偵檢醣成分。

結果，透露藉本海藻糖磷酸化酶之作用而由 D - 葡萄糖及 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸形成的葡萄糖基轉移醣之峰的滯留時間係與真實海藻糖者一致，並透露海藻糖處理將峰減消及形成 D - 葡萄糖。考慮海藻糖的受質專一性，推測葡萄糖基轉移醣係海藻糖。

實驗 8

葡萄糖基 - D - 半乳糖苷

為了鑑定藉本海藻糖磷酸化酶經醣轉移反應至 D - 半乳糖所形成的葡萄糖基轉移醣，製備葡萄糖基轉移醣，分離，及檢驗結構。程序如下：提供一種含有 5 % 海藻糖、2.5 % D - 半乳糖及 5 mM 磷酸二氫鈉的水溶液，調整水溶液之 pH 值至 5.0，加到 15 單元 / 克實驗 2 方法所得之純化的海藻糖磷酸化酶之 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸溶液，於 60 °C 對溶液作酵催反應 72 小時，加熱反應混合物 100 °C 歷 10 分鐘以鈍化殘存的酶，及依實驗 7 方法用 G L C 分析所得之混合物的樣品。結果，證實反應混合物含有相當大量的物質具有滯留時間不同於海藻糖

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (32)

、D - 半乳糖、D - 葡萄糖和 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸者，估計其是葡萄糖基轉移醣。根據 G L C 的數據，醣之產率約 30 %。將殘存的反應混合物調到 p H 7 . 0，與 25 單位 / 克殘存的海藻糖混合，及於 45 °C 酵催 20 小時以分解殘存於反應混合物內的海藻糖。將生成物加熱 100 °C 歷 10 分鐘以鈍化殘存的海藻糖，用活性炭脫色，過濾，用 H - 和 O H - 型離子交換樹脂除鹽及純化，濃縮成約 50 % 的濃度，及經以下管柱層析，接著收集富含葡萄糖基轉移醣的部分。

分餾所用的樹脂係 "X T - 1016"，一種鹼金屬強酸陽離子交換樹脂，Na - 型，聚合度為 4 %，由日本東京的 Tokyo 有機化學工業公司所販售，及將樹脂懸浮於水中，填充於四個套層不銹鋼管柱內，各為 3 公分直徑及一公尺長度，它們串級串聯以給予總凝膠床約 4 公尺深。保持內管柱溫度為 40 °C，將醣溶液以對樹脂的 5 v / v % 體積送入管柱，接著將熱到 40 °C 的水以對分餾醣溶液的 S V (空間速度) 0 . 15 流速送入管柱，及收集富含葡萄糖基轉移醣的部分。

集結該部分，脫鹽，純化，及濃縮成約 40 % 濃縮物，其然後在填充有 "Y M C - P a c k O S D" 的管柱上層析，一種日本京都的 Y M C 公司所販售的十八基矽石凝膠，以收集含有葡萄糖基轉移醣的部分。集結該部分及濃縮成約 40 % 濃縮物，其然後再用於上述管柱層析。所產生富含含有葡萄糖基轉移醣的溶液被脫鹽，純化，濃縮

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (33)

，及於真空中乾燥以獲得粉狀產品，含有醣產率約 20 %
， d . s . b . ，相對於酵催反應中所用的材料醣。依實驗 7 之方法，用 G L C 分析該粉狀產品，透露其含有約 98 % 的葡萄糖基轉移醣， d . s . b . 。

在用酸分解後，富含葡萄糖基轉移醣的粉狀產品經 G L C 分析，透露醣以莫耳比約 1 : 1 製造 D - 葡萄糖及 D - 半乳糖，當用酸分解時。將粉狀產品甲基化，用酸水解，還原，及乙醯化以獲得一部分甲基己醇醋酸酯，其然後經 G L C 分析以檢測 2 , 3 , 4 , 6 - 四 - 鄰 - 甲基 - 1 , 5 - 二 - 鄰 - 乙醯葡萄糖醇及 2 , 3 , 4 , 6 - 四 - 鄰 - 甲基 - 1 , 5 - 二 - 鄰 - 乙醯半乳糖醇。資料指出葡萄糖基轉移醣係由莫耳比 1 : 1 的 D - 葡萄糖及 D - 半乳糖所構成，其中 D - 葡萄糖之 C - 1 的 O H - 基以及 D - 半乳糖之 C - 1 的 O H - 基皆與這些醣間的鍵結有關聯。

爲了更詳細檢驗葡萄糖基半乳糖苷之結構，測量醣的比旋光度及 ^{13}C - NMR 光譜。結果，其給予 $[\alpha]_{\text{D}_{20}} = +223^\circ$ ((c = 0 . 97 , H_2O) 及 ^{13}C - NMR 光譜 (100 MHz , D_2O) : T S P 的 σ_{ppm} 爲 96 . 16 、 95 . 97 、 75 . 37 、 74 . 94 、 74 . 14 、 73 . 90 、 72 . 53 、 72 . 11 、 71 . 80 、 70 . 76 、 64 . 03 及 63 . 37 。這些數據幾乎與化學合成的化合物即 α - D - 半乳糖吡喃糖基 α - D - 葡萄糖吡喃糖的真實數據一致，而此證實葡萄

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (34)

糖基半乳糖苷為葡萄糖基-D-半乳糖苷，即 α -D-半乳糖吡喃糖基 α -D-葡萄糖吡喃糖，一種由D-葡萄糖及D-半乳糖以 α -1, 1連結所構成的雙糖。

實驗 9

急毒性試驗

分別口服投予七週大之 dd - 型老鼠一由實驗 8 方法所得之富含葡萄糖基-D-半乳糖苷的粉狀產品、一由實例 A - 1 2 方法所得之富含葡萄糖基-D-木糖苷的粉狀產品、一由實例 A - 1 4 方法所得之富含葡萄糖基-D-岩藻糖苷的粉狀產品及一由實例 A - 1 5 方法所得之富含葡萄糖基-L-岩藻糖苷的粉狀產品以作急毒性試驗。結果，即使投予最大劑量即是 50 克/公斤老鼠以重量計也沒有老鼠死亡。此數據顯示這些糖是極低毒性的。

實例 A 解釋本海藻糖磷酸化酶，編碼酶的 DNA，及使用酶製備含葡萄糖基轉移糖之糖的製法，當然這些實施例非用以限制本發明。

實例 A - 1

酶溶液

於新鮮的相同於實驗 1 所用的培養基中培養 Thermoanaerobium < 熱厭氧菌 > brockii, ATCC 35047 約 30 小時，但是溫度設定成 65℃，使用發酵器於依實驗 1 方法的厭氧狀態下。離心所產生的培養物

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (35)

以獲得細胞，其然後經超音波破壞及離心。將上清液餵入一填充有 "DEAE-TOYOPEARL® GEL" 的管柱以便吸附在其上，及藉餵入線性梯度氯化鈉水溶液由 0M 增加至 0.5 M 以由管柱溶析，接著收集具有海藻糖磷酸化酶活性的部分，其在約 0.1 M 氯化鈉時溶析出的。集結該部分及用超濾膜濃縮以獲得具有約 20 單位／毫升海藻糖磷酸化酶的酶溶液，相對於材料培養物的總活性而言產率約 40 %。

實例 A - 2

D N A 之製備

依照實驗 1 之方法，將 *Thermoanaerobium brockii*，A T C C 35047 之種菌接種於 1 l 升新鮮的相同於實驗 1 所用的營養培養基中內，及於 60 °C 培養 24 小時。藉離心由培養物中分離出所繁殖的細胞，懸浮於適量的 T r i s - E D T A - 食鹽緩衝液（以下縮寫成 "T E S 緩衝液"）（p H 8.0）中，使細胞懸浮液混合 0.05 w / v % 的溶菌酶，及於 37 °C 培養 30 分鐘。之後，於 -80 °C 將經處理過的酶混合物冷凍一小時，及接續混合 T E S 緩衝液（p H 9.0）和熱到 60 °C 的 T E S 緩衝液 - 酚混合物溶液，接著充分攪拌及冷卻混合物，離心生成物，及收集所形成的上層。將兩倍體積的冷乙醇加到該層，及收集所形成的沈積物，溶解於適量的 S S C 緩衝液（p H 7.1）內，與 7.5 μ g 核糖核

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

五、發明說明 (36)

酸酶及 $125 \mu\text{g}$ 蛋白酶混合，及於 37°C 培養一小時。於所產生的混合物中加入氯仿與異戊醇的混合物，接著攪拌及讓混合物停置，及收集上層。在將冷乙醇加到該層後，收集所形成的沈積物，用 $70\text{v} / \text{v} \%$ 冷乙醇沖洗，及於真空中乾燥以獲得一種 DNA。將 DNA 溶解於 SSC 緩衝液 ($\text{pH } 7.1$) 內以獲得約一毫克 / 毫升的濃度，及於 -80°C 冷凍。

實例 A - 3

轉形體及重組體 DNA 之製備

將一毫升實例 A - 2 的 DNA 溶液置於一容器內，與約 20 單位的限制酶 Alu I 混合，及於 37°C 培養 30 分鐘以部分分解 DNA。所產生的混合物經蔗糖蜜度超濾以收集約 $2,000 - 5,000$ 鹼基對的 DNA 片段。並行地，"Bluescript[®] II SK (+)"，一種美國加州的 Stratagene Cloning Systems 所販售的血漿載體，係完全被限制酶 Sma I 所裂解，及用日本滋賀縣 Otsu 的 Takara Shuzo 公司的 "DNA LIGATION KIT<套件>" 依套件中所附的手續來連結 $0.3 \mu\text{g}$ 裂斷的載體與約 $3 \mu\text{g}$ DNA 片段。利用所得的重組體 DNA, $100 \mu\text{g}$ "EPICURIAN COLI[®] XL1-BLUE"，一種美國加州的 Stratagene Cloning Systems 所販售的大腸桿菌種之微生物，被習用競爭細胞法轉形而獲得基因庫。

將所產生的當作基因庫的轉形體接種於瓊脂培養皿

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (37)

(p H 7 . 0) 內，該皿係以常見方式製備得，含有 1 0 克 / 升胰 腺、 5 克 / 升酵母萃取物、 5 克 / 升氯化鈉、 7 5 毫克 / 升安比西林 (ampicillin) 和 5 0 毫克 / 升 5 - 溴 - 4 - 氯 - 3 - 吡啶基 - β - 半乳糖苷，及於 3 7 ° C 培養 1 8 小時，接著將形成在皿上的約 5 , 0 0 0 白菌落固定於 "HYBOND - N+" 上，一種美國 Arlington , Heights , 的 Amersham Corp. , Div. Amersham International 所販售的耐綸薄膜。基於實驗 4 中所揭露的 S E Q I D N O : 6 之 N - 端區域中的胺基酸 9 - 1 5 , 一種寡核苷酸具有核苷序列由 5' - TAYCCNTTYGARGAYTGGGT - 3' 所表示者被化學合成，及標識 [γ - ^{32} P] A T P 及 T 4 多核苷酸激酶以獲得一種合成 D N A 當作第一探測物。在固定於耐綸薄膜上的菌落中，與第一探測物所強度雜交的三個菌落係應用習知菌落雜交法來選擇。這三個菌落固定於類似上述的耐綸薄膜上。基於實驗 4 中所揭露的 S E Q I D N O : 7 之胺基酸 1 - 7 , 一種寡核苷酸具有核苷序列由 5' - AAYTAYGAYTAYTAYGARCC - 3' 所表示者被化學合成，及標識 [γ - ^{32} P] A T P 及 T 4 多核苷酸激酶以獲得一種合成 D N A 當作第二探測物。在固定於耐綸薄膜上的上述三個菌落中，與第二探測物所強度雜交的一個菌落係應用習知菌落雜交法來選擇，及命名為 T T P 4 " 當作轉形體。

以習用方式將轉形體 T T P 4 接種於一含 1 0 0 μ g / m l 安比西林之鈉鹽的 L - 肉汁培養液 (p H

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (38)

7 . 0) 內，及於 3 7 °C 旋轉搖動狀態下培養 2 4 小時。完成培養後，將培養物離心以獲得細胞，其然後經習用的鹼 - S D S 法處理以萃取重組體 D N A 。重組體 D N A 的習用雙脫氧分析透露其含有一種 D N A 具有 S E Q

I D N O : 8 的核苷序列，由 3 , 3 4 5 個衍生自 *Thermoanaerobium brockii* , ATCC 35047 的鹼基對所構成。如 S E Q I D N O : 8 中所示，其透露一種由 S E Q I D N O : 8 中 5 9 6 - 2 , 9 1 7 個鹼基對所構成的核苷序列將一由 7 7 4 個胺基酸所構成的胺基酸序列編碼。比較衍生自核苷序列的胺基酸序列與實驗 4 中所確認的本海藻糖磷酸化酶的 N - 端及內胺基酸序列 - 即

S E Q I D N O s : 1 - 3 和 S E Q I D N O s : 6 - 7 , S E Q I D N O s : 1 - 3 係分別與 S E Q I D N O : 8 中的胺基酸 2 - 6 、 3 0 8 - 3 1 2 及 6 3 3 - 6 3 7 一致，而 S E Q I D N O s : 6 - 7 係分別與 S E Q I D N O : 8 中的胺基酸 2 - 3 1 及 6 3 3 - 6 4 7 一致。

這些資料顯示本海藻糖磷酸化酶具有 S E Q I D N O : 4 的胺基酸序列，及 *Thermoanaerobium brockii* , A T C C 3 5 0 4 7 之酶係被具有 S E Q I D N O : 5 的核苷序列的 D N A 所編碼。重組體 D N A ，其藉上述方法所獲得及透露其核苷序列者，係被命名為 " p T T P 4 " 。如圖 5 中所示，重組體 D N A 係位於限制酶 P S T I 之識別處的下流。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (39)

實例 A - 4

藉轉形體製造海藻糖磷酸化酶

將 1 0 0 毫升含有 1 6 克 / 升多腺、1 0 克 / 升酵母萃取物及 5 克 / 升氯化鈉的水溶液置於 5 0 0 毫升的錐形瓶內，於 1 2 1 °C 殺菌 1 5 分鐘，冷卻，無菌調整至 p H 7 . 0 ，及無菌地與 1 0 毫克安比西林的鈉鹽混合入液體營養培養基內。將實例 A - 3 的轉形體 T T P 4 接種入培養基，及於 3 7 °C 通氣攪拌狀態下培養約 2 0 小時以獲得種菌。依照種菌的製法，將 7 升新鮮相同於種菌培養所用的營養培養基置於 1 0 升發酵器內，用 7 0 毫升種菌接種，及於通氣攪拌狀態下培養約 2 0 小時。所產生的培養物經習用方式離心以收集細胞，其然後懸浮於 1 0 m M 磷酸鹽緩衝液 (p H 7 . 0) 中，超音波破壞細胞，及離心以去除不溶性物質，接著收集上清液。上清液對著 1 0 m M 磷酸鹽緩衝液作透析，及分析上清液中的海藻糖磷酸化酶活性，透露製得約 7 0 0 單位 / 升酶培養物。

作為第一對照組，將 *Escherichia coli* < 大腸桿菌 > X L 1 - B l u e 株之種菌接種於一類似於上述轉形體之培養中所用的營養培養基，及培養，但是培養基內沒有加安比西林。破壞所繁殖的細胞，接著收集及透析上清液。作為第二對照組，依照實驗 1 的的方法，於相同於轉形體之培養中所用的營養培養基內但是不用安比西林及於 6 0 °C 靜置培養 *Thermoanaerobium brockii*，A T C C

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (40)

3 5 0 4 7 之種菌，類似於轉形體之情況，破壞培養物中的細胞，接著收集及透析上清液。作為第一對照組的透析溶液中沒有檢測到本酶之酶活性。作為第二對照組的透析溶液係具有酶活性約 2 單位／升培養物，其係低於轉形體 T T P 4 者。

依照實驗 2 的方法，在用 DEAE-TOYOPEARL[®] 650 GEL"及 ULTROGEL[®] AcA44 RESIN"的管析層析上純化實例 A-4 的透析溶液，及依照實驗 3 的方法來分析經純化的酶，透露其分子量為 $88,000 \pm 5,000$ 道耳吞（根據 SDS-PAGE），及分子量為 $190,000 \pm 10,000$ 道耳吞（根據凝膠過濾層析），等電點為 5.4 ± 0.5 （根據使用聚丙烯醯胺凝膠的電焦），最適宜溫度約 70°C ，最適宜 pH 約 7.0 - 7.5，熱穩定性高至 60°C ，及 pH 穩定性約 6.0 - 9.0，它們皆實質上與實驗 1 及 2 中所製備的酶者相同。這些結果顯示藉重組 DNA 技術可充分製造本海藻糖磷酸化酶，且可明顯增加酶產率。

實例 A - 5

酶溶液

依實例 A-4 之方法於營養培養基內培養實例 A-3 的轉形體 T T P 4。離心培養物所獲得的細胞被超音波所破壞，測量破壞後的細胞懸浮液之上清液的海藻糖磷酸化酶活性。活性約 0.7 單位／毫升培養物。用超濾膜來

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

五、發明說明 (41)

濃縮上清液，及將濃縮物透析以獲得一種酶溶液，具有約 10 單位／毫升海藻糖磷酸化酶的活性，產率約 70%，相對於培養物之總酶活性而言

實例 A - 6

含海藻糖的醣溶液

於 25 mM 含有 5% 麥芽糖的磷酸氫二鉀－檸檬酸緩衝液 (pH 6.0) 中，加入 5 單位／克市售細菌麥芽糖磷酸化酶之麥芽糖，及 50 單位／克實例 A - 1 方法所獲得的海藻糖磷酸化酶之麥芽糖，接著於 30℃ 培養 120 小時。於 100℃ 加熱反應混合物 30 分鐘以鈍化殘存的酶，冷卻，以習用方式用活性炭脫色，過濾，用 H⁺ 和 OH⁻ 型離子交換劑除鹽及純化，及更進一步濃縮成約 75% 的含海藻糖之糖漿醣溶液，產率約 95%，相對於材料 d . s . b . 而言。

產品含有約 45% 海藻糖，d . s . b .，且具有令人滿意的甜度和適當的黏度及保濕度，可任意地用於食品、化粧品、藥物和成形品中當作甜味料、味道改良劑、穩定劑、雙叉乳酸桿菌的生長促進劑、及礦物質吸收促進劑。

實例 A - 7

富含海藻酶的粉末

一種含有約 45% 海藻糖 (d . s . b .) 的醣溶

五、發明說明 (42)

液，當作材料，由實例 A - 6 的反應及純化而獲得的，被調整到濃度約 20 %，d . s . b .，其然後與 5 單位／克葡萄糖澱粉酶乾燥固體混合，及於 pH 4 . 5 及 40 °C 培養 16 小時以分解殘存的麥芽糖。將反應混合物加熱 100 °C 30 分鐘以中止酵催反應，然後濃縮成約 40 % 溶液。爲了增加海藻糖含量，藉四支套層不銹鋼管柱來分餾該濃縮的溶液，該管柱之直徑爲 3 公分且長度爲一公尺，填充有 "X T - 1016" 的水懸浮液，其爲一種鹼金屬強酸陽離子交換樹脂，Na - 型，聚合度爲 4 %，由日本東京的 Tokyo 有機化學工業公司所販售，它們串級串聯以給予總凝膠床約 4 公尺深，將溶液以對樹脂的 5 v / v % 送入，接著將熱到 40 °C 的水以 S V 0 . 15 送入以便將溶液分餾，及收集富含海藻糖的餾份。集結餾份，濃縮，於真空中乾燥，及粉碎以獲得富含海藻糖的粉末，產率約 40 %，相對於材料 d . s . b . 而言。

產品含有約 95 % 海藻糖，d . s . b .，且具有令人滿意的可口甜度和適當的保濕度，其可任意地用於食品、化粧品、藥物和成形品中當作甜味料、味道改良劑、穩定劑、雙叉乳酸桿菌用的生長促進劑、及礦物質吸收促進劑。

實例 A - 8

含葡萄糖基 - D - 半乳糖苷的醕溶液

一含有 5 % 海藻糖、5 % D - 半乳糖及 5 m M 磷酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (43)

二氫鈉的水溶液之 pH 值被調整到 5 . 0 , 與 1 0 單位 / 克實例 A - 1 之方法所獲得的海藻糖磷酸化酶之海藻糖混合, 及於 6 0 °C 酵催反應 7 2 小時。於 9 0 °C 加熱反應混合物 3 0 分鐘以鈍化殘存的酶, 冷卻, 以習用方式用活性炭脫色, 過濾, 用 H - 和 O H - 型離子交換樹脂除鹽及純化, 及更進一步濃縮成約 7 5 % 的含山梨糖之糖漿醴溶液, 產率約 9 5 % , 相對於材料 d . s . b . 而言。

產品含有約 2 2 % 葡萄糖基 - D - 半乳糖苷, d . s . b . , 且具有高品質的甜度和適當的黏度及保濕度, 可任意地用於食品、化粧品、藥物和成形品中當作甜味料、味道改良劑、穩定劑、雙叉乳酸桿菌的生長促進劑、及礦物質吸收促進劑。

實例 A - 9

含葡萄糖基 - D - 半乳糖苷的醴溶液

一含有 1 0 % 海藻糖、5 % D - 半乳糖及 5 m M 磷酸二氫鈉的水溶液之 pH 值被調整到 6 . 0 , 與 3 0 單位 / 克實例 A - 1 之方法所獲得的海藻糖磷酸化酶之海藻糖混合, 及於 6 0 °C 酵催反應 9 6 小時。於 9 0 °C 加熱反應混合物 3 0 分鐘以鈍化殘存的酶及冷卻。之後, 將 5 % 以濕重計的市售麵包酵母加到所得之混合以同化反應混合物中的 D - 葡萄糖, 並藉添加 1 - N 氯化鈉溶液來控制 pH 值為 5 - 6 , 及保持反應溫度於 2 7 °C 歷 6 小時。將反應混合物離心以移除酵母, 及以習用方式用活性炭將所產生

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (44)

上清液脫色，過濾，用 H - 和 O H - 型離子交換劑除鹽及純化，及濃縮而獲得約 75 % 糖漿，d . s . b . ，產率約 65 % ，相對於材料 d . s . b . 而言。

產品含有約 40 % 葡萄糖基 - D - 半乳糖苷，d . s . b . ，且具有高品質的甜度和適當的黏度及保濕度，其可任意地用於食品、化粧品、藥物和成形品中當作甜味料、味道改良劑、穩定劑、雙叉乳酸桿菌的生長促進劑、及礦物質吸收促進劑。

實例 A - 10

富含葡萄糖基 - D - 半乳糖苷的粉末

一種含有約 22 % 葡萄糖基 - D - 半乳糖苷 (d . s . b .) 的醕溶液，當作材料，由實例 A - 8 的反應及純化而獲得的，被調整到濃度約 45 % ， d . s . b . 。爲了增加葡萄糖基 - D - 半乳糖苷的含量，藉四支套層不銹鋼管柱來分餾所得之溶液，該管柱之直徑爲 3 公分且長度爲一公尺，填充有 " X T - 1016 " 的水懸浮液，其爲一種鹼金屬強酸陽離子交換樹脂，N a - 型，聚合度爲 4 % ，由日本東京的 Tokyo 有機化學工業公司所販售，它們串級串聯以給予總凝膠床約 4 公尺深，將 5 v / v % 溶液餵給樹脂，接著將熱到 40 °C 的水以 S V 0 . 15 送入管柱以便將溶液分餾，並保持內管柱溫度爲 40 °C ，及收集所產生的富含葡萄糖基 - D - 半乳糖苷的餾份。集結餾份，濃縮，於真空中乾燥，及粉碎以獲得富

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (45)

含葡萄糖基 - D - 半乳糖苷的粉末，產率約 25 %，相對於材料 d . s . b . 而言。

產品含有約 70 % 葡萄糖基 - D - 半乳糖苷，
d . s . b . ，且具有高品質的甜度和適當的黏度及保濕度，其可任意地用於食品、化粧品、藥物和成形品中當作甜味料、味道改良劑、穩定劑、雙叉乳酸桿菌的生長促進劑、及礦物質吸收促進劑。

實例 A - 1 1

含葡萄糖基 - D - 木糖苷的醣溶液

一含有 5 % 海藻糖、2.5 % D - 木糖及 5 m M 磷酸二氫鈉的水溶液之 pH 值被調整到 5.0，與 15 單位 / 克實例 A - 1 之方法所獲得的海藻糖磷酸化酶之海藻糖混合，及於 60 °C 酵催反應 72 小時。於 90 °C 加熱反應混合物 30 分鐘以鈍化殘存的酶，冷卻，以習用方式用活性炭脫色，過濾，用 H - 和 OH - 型離子交換劑除鹽及純化，及更進一步濃縮而獲得約 75 % 糖漿，產率約 95 %，相對於材料的 d . s . b . 而言。

產品含有約 20 % 葡萄糖基 - D - 木糖苷，
d . s . b . ，且具有高品質的甜度和適當的黏度及保濕度，其可任意地用於食品、化粧品、藥物和成形品中。

實例 A - 1 2

富含葡萄糖基 - D - 木糖苷的粉末

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (46)

一種含有約 20 % 葡萄糖基 - D - 木糖苷 (d . s . b .) 的醣溶液，當作材料，由實例 A - 11 的反應及純化而獲得的，被調整到濃度約 45 % ， d . s . b . 。爲了增加葡萄糖基 - D - 木糖苷的含量，依實例 A - 10 的方法對所得溶液作管柱層析，但是使用 " D O W E X 50 W X 4 (鈣型) ，其爲一種鹼土金屬強酸陽離子交換樹脂，由美國密西根 Midland 的 D O W 化學公司所販售，以收集富含葡萄糖基 - D - 木糖苷的餾份。集結餾份，濃縮，於真空中乾燥，及粉碎以獲得富含葡萄糖基 - D - 木糖苷的粉末，產率約 25 % ， d . s . b . 。

產品含有約 60 % 葡萄糖基 - D - 木糖苷， d . s . b . ，且具有高品質的甜度和適當的黏度及保濕度，其可任意地用於食品、化粧品、藥物和成形品中。

實例 A - 13

含葡萄糖基 - D - 岩藻糖苷的醣溶液

一含有 5 % 海藻糖、2.5 % 海藻糖及 5 m M 磷酸氫二鈉的水溶液之 p H 值被調整到 5.0 ，與 20 單位 / 克實例 A - 1 之方法所獲得的海藻糖磷酸化酶之海藻糖混合，及於 60 °C 酵催反應 72 小時。於 90 °C 加熱反應混合物 30 分鐘以鈍化殘存的酶，冷卻，以習用方式用活性炭脫色，過濾，用 H - 和 O H - 型離子交換樹脂除鹽及純化，及更進一步濃縮而獲得約 75 % 糖漿，產率約 95

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (47)

%，相對於材料的 d . s . b . 而言。

產品含有約 20 % 葡萄糖基 - D - 岩藻糖苷，
d . s . b .，且具有高品質的甜度和適當的黏度及保濕
度，其可任意地用於食品、化粧品、藥物和成形品中。

實例 A - 14

富含葡萄糖基 - D - 岩藻糖苷的醣粉

一含有 5 % 海藻糖、2.5 % D - 岩藻糖及 5 mM
磷酸二氫鈉的水溶液之 pH 值被調整到 5.0，與 20 單
位 / 克實例 A - 1 之方法所獲得的海藻糖磷酸化酶之海藻
糖混合，及於 60 °C 酵催反應 72 小時。於 100 °C 加熱
反應混合物並保持 pH 值在鹼性超過 10，冷卻，及以習
用方式用活性炭脫色，過濾，用 H - 和 OH - 型離子交換
樹脂除鹽及純化，及更進一步濃縮而獲得一種含葡萄糖基
- D - 岩藻糖苷的粉末，產率約 60 %，相對於材料
d . s . b . 而言。

產品含有約 50 % 葡萄糖基 - D - 岩藻糖苷，
d . s . b .，且具有高品質的甜度和適當的黏度及保濕
度，其可任意地用於食品、化粧品、藥物及成形品中。

實例 A - 15

含葡萄糖基 - L - 岩藻糖苷的醣粉

一含有 5 % 海藻糖、2.5 % L - 岩藻糖及 5 mM
磷酸二氫鈉的水溶液之 pH 值被調整到 6.0，與 15 單

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (48)

位／克實例 A - 1 之方法所獲得的海藻糖磷酸化酶之海藻糖混合，及於 60℃ 酵催反應 72 小時。於 90℃ 加熱反應混合物 30 分鐘以鈍化殘存的酶，冷卻，以習用方式用活性炭脫色，過濾，用 H - 和 OH - 型離子交換樹脂除鹽及純化，及更進一步濃縮而獲得一種含葡萄糖基 - L - 岩藻糖苷的粉末，產率約 95%，相對於材料 d . s . b . 而言。

產品含有約 20% 葡萄糖基 - L - 岩藻糖苷，d . s . b .，且具有高品質的甜度和適當的保濕度，其可任意地用於食品、化粧品、藥物及成形品中。

實例 A - 16

含海藻糖的醣溶液

於 25 mM 含有 5% 麥芽糖的磷酸氫二鉀 - 檸檬酸緩衝液 (pH 6 . 0) 中，加入 5 單位／克市售細菌麥芽糖磷酸化酶之麥芽糖，及 50 單位／克實例 A - 5 之方法所獲得的海藻糖磷酸化酶之麥芽糖，及於 30℃ 酵催反應 120 小時。於 100℃ 加熱反應混合物 30 分鐘以鈍化殘存的酶，冷卻，以習用方式用活性炭脫色，過濾，用 H - 和 OH - 型離子交換樹脂除鹽及純化，及更進一步濃縮而獲得約 75% 糖漿 d . s . b .，產率約 95%，相對於材料 d . s . b . 而言。

產品含有約 45% 海藻糖，d . s . b .，且具有高品質的甜度和適當的黏度及保濕度，其可任意地用於

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (49)

食品、化粧品，藥物和成形品中當作甜味料、味道改良劑、穩定劑、雙叉乳酸桿菌用的生長促進劑、及礦物質吸收促進劑。

實例 A - 17

含葡萄糖基 - D - 岩藻糖苷的醣溶液

一含有 5 % 海藻糖、2 . 5 % D - 岩藻糖及 5 m M 磷酸二氫鈉的水溶液之 pH 值被調整到 5 . 0，與 20 單位 / 克實例 A - 5 之方法所獲得的海藻糖磷酸化酶之海藻糖混合，及於 60 °C 酵催反應 72 小時。於 90 °C 加熱反應混合物 30 分鐘以鈍化殘存的酶，冷卻，以習用方式用活性炭脫色，過濾，用 H - 和 OH - 型離子交換樹脂除鹽及純化，及更進一步濃縮而獲得約 75 % 糖漿，產率約 95 %，相對於材料 d . s . b . 而言。

產品含有約 20 % 葡萄糖基 - D - 岩藻糖苷，d . s . b .，且具有高品質的甜度和適當的黏度及保濕度，其可任意地用於食品、化粧品、藥物及成形品中。

以下實例 B 說明含葡萄糖基轉移醣的本醣組成物：

實例 B - 1

甜味料

於一重量份的由實例 A - 10 方法所得之富含葡萄糖基 - D - 半乳糖苷之粉末中，加入 0 . 05 重量份的 "α G SWEET"，其為一種 Toyo 糖精製公司所販售的 α -

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (50)

葡萄糖基甜菊苷，及將混合物混合均勻成爲一種粉狀甜味料。產品爲一種高品質甜味料，甜度爲蔗糖的兩倍高，而卡值於爲蔗糖的一半。因此，產品能用當作低卡甜味料來使一些人的低卡食物變甜，該些人被限制攝取較低卡路里，如肥胖人及糖尿病人。因爲產品較少產生葡聚糖及酸（由誘導蛀牙的微生物而產生者），所以其可適用於使蛀牙禁止的食品變甜。

實例 B - 2

硬糖果

將三十重量份的由實例 A - 9 方法所得之含葡萄糖基 - D - 半乳糖苷的醣溶液加到及混合溶解於 80 重量份的具有 25 % 含水率的氫化麥芽糖漿中，及於減壓下將所得溶液濃縮至含水率低於 2 %，與一重量份的檸檬酸及適量檸檬香料和著色劑捏合，接著將混合物捏合及成形爲硬糖果。產品具有高品質的甜度、低保濕性及令人滿意的嚼性不會引起熔化。

實例 B - 3

口香糖

使四重量份的由實例 A - 12 方法所得之富含葡萄糖基 - D - 木糖苷的粉末混合 3 重量份的葡萄糖及 2 重量份的樹膠基質，該樹膠基質已經先被加熱熔化直到軟化，及更進一步混合適量的薄荷調味料，接著用輥子捏揉將混

五、發明說明 (51)

合物成形為口香糖。產品具有令人滿意的口感及風味。

實例 B - 4

巧克力

使十五重量份的由實例 A - 1 4 方法所得之富含葡萄糖基 - D - 岩藻糖苷的粉末混合 4 0 重量份的可可糊、1 0 重量份的可可脂、1 0 重量份的蔗糖及 1 5 重量份的脫脂牛奶，及使混合物通經一精製器以降低粒子大小。之後，將所產生的混合物置於柯奇 (conche) 內，與 0 . 5 重量份的卵磷脂混合，及於 5 0 °C 捏揉兩天兩夜。將捏揉後的混合物倒入模製機內，成形及固化成巧克力。產品沒有脂肪 - 及糖 - 白粉花現象，而具有令人滿意的味道、風味及在您舌上的可熔化性。

實例 B - 5

卡士達糊

於 4 0 0 重量份的由實例 A - 1 5 方法所得之富含葡萄糖基 - L - 岩藻糖苷的粉末中，加入 5 0 0 重量份的玉米澱粉、5 0 0 重量份的麥芽糖及 5 重量份的鹽，及使混合物通經一篩子而充分混合，與 1 , 4 0 0 重量份的新鮮蛋混點，攪拌，徐徐混合 5 , 0 0 0 重量份的煮沸牛乳，及經慢火加熱和攪拌。當玉米澱粉完全膠化而呈現半透明時則中止加熱，然後冷卻，混合少量的香草調味料以獲得卡士達糊。產品具有平滑表面及令人滿意的味道，而無

五、發明說明 (52)

強烈甜度。

實例 B - 6

Uiro (澱粉糊)

於 90 重量份的由實例 A - 13 方法所得之含葡萄糖基 - D - 岩藻糖苷的醣溶液中，加入 90 重量份的稻米粉末、20 重量份的玉米澱粉、20 重量份的糖、一重量份的 matcha (綠茶) 粉及適量的水，及將混合物捏揉，置於容器內，及蒸 60 分鐘而成 matcha uiro。產品具有令人滿意的光澤、嚼性、風味及味道。澱粉的回凝被良好地防止，產生相當長的保存期限。

實例 B - 7

Bettara - zuke (新鮮蘿蔔醃漬品)

藉混合均勻一重量份的由實例 A - 8 方法所得之含葡萄糖基 - D - 半乳糖苷的醣溶液、0.05 重量份的甘草料、0.008 重量份的蘋果酸、0.07 重量份的麩胺酸鈉、0.03 重量份的山梨酸鉀及 0.2 重量份的聚三葡萄糖而製備得 Bettara - zuke 之預混物。30 公斤蘿蔔依習用方式首先經鹽醃漬，經糖醃漬，及浸泡於調味溶液中，與 4 公斤預混物製備成所要的產品。產品具有令人滿意的顏色、光澤及香味，以及適當的甜度，及令人滿意的嚼性。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (53)

實例 B - 8

具有乳酸菌的飲料

一百三十重量份的由實例 A - 1 1 方法所得之含葡萄糖基 - D - 木糖苷的醣溶液、175 重量份的脫脂牛奶及 50 重量份的 "NYUKAOLIGO[®]" (其為一種日本大阪的 Hayashibara Shoji 公司所販售的高乳糖蔗糖含量的粉末) 溶解於 1,150 重量份的水中，於 65℃ 30 分鐘對溶液殺菌，冷卻至 40℃，及依習用方式接種 30 重量份當作接種菌的乳酸菌，接著於 37℃ 培養 8 小時以獲得所要的產品。產品係一種含有乳酸菌的飲料，具有令人滿意的風味和味道。產品含有寡醣，其穩定該菌及促進生長。

實例 B - 9

皮膚乳霜

於 4 重量份的由實例 A - 7 方法所得之富含海藻糖的粉末中，加入 2 重量份的聚氧乙烯乙二醇單硬脂酸酯、5 重量份的半乳化的甘油單硬脂酸酯、2 重量份的 α - 葡萄糖基芸香苷、1 重量份的液體石蠟、10 重量份的甘油三辛酸酯及適量的防腐劑，依習用方式加熱溶解混合物，混合 5 重量份的 1,3 - 丁二醇及 66 重量份的精製水，用均勻機乳化，及將適量的調味劑混入皮膚乳霜內。產品具有良好的塗抹性，可用當作防晒劑、皮膚美化劑及皮膚增白劑。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (54)

實例 B - 1 0

牙膏

使四十五重量的磷酸氫鈣、1.5 重量份的月桂基硫酸鈉、2.5 重量份的甘油、0.5 重量份的聚氧乙烯去水山梨糖醇月桂酸酯、0.02 重量份的糖精、0.05 重量份的防腐劑及1.3 重量份的水混合1.5 重量份的由實例 A - 6 方法所得之海藻糖而成為牙膏。

產品具有優良的光澤及清淨力，可適合用當作潔牙劑。

實例 B - 1 1

插管餵食用的營養物

製備一種含以下成分的組成物：80 重量份的由實驗 8 方法所得之富含葡萄糖 - D - 半乳糖苷的粉末、190 重量份的乾蛋黃、209 重量份的脫脂牛奶、4.4 重量份的氯化鈉、1.85 重量份的氯化鉀、4 重量份的硫酸鎂、0.01 重量份硫胺素及0.1 重量份的抗壞血酸鈉、0.6 重量份的維生素 E 及0.04 重量份的菸鹼醯胺。將二十五克整份的組成物注入小的疊層鋁袋內，其被熱封以獲得所要的產品。

在投經鼻腔、喉嚨或胃之前，將一袋產品溶於約150 - 300 毫升的水中以成為一種補充營養的食料。

實例 B - 1 2

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (55)

草莓果醬

混合一百五十重量份的新鮮草莓、60重量份的蔗糖、20重量份的麥芽糖、40重量份的由實例A-16方法所得之含海藻糖的醣溶液、5重量份的果膠及一重量份的檸檬酸。於鍋內將混合物煮沸及瓶裝成所要的產品。產品具有令人滿意的味道、風味和顏色。

實例B-13

甜的煉乳

於100重量份的新鮮牛乳中，溶解一重量份的蔗糖及3重量份的由實例A-17方法所得之含葡萄糖基-D-岩藻糖苷的醣溶液，及在板式加熱器上加熱而將溶液滅菌，濃縮而給予約70%的濃度，且無菌罐裝成所要的產品。產品具有淡的甜度、風味及味道，且其可任意用當作嬰兒食物、水果、咖啡、可可及茶的調味料。

[本發明的效果]

由上述明顯得知，本發明之完成係基於發現一種新穎的海藻糖磷酸化酶，其且比習用的海藻糖磷酸化酶具有較高的最適宜溫度及熱穩定性。本發明的海藻糖磷酸化酶具有相當寬範圍的pH-穩定性，最適宜的pH位於其中。可藉微生物來製造該海藻糖磷酸化酶，該微生物能以令人滿意的高產率來製造酶。因此，當於其它醣之存在中使本海藻糖磷酸化酶接觸當作醣供體的 β -D-葡萄糖

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (56)

— 1 — 磷酸時，能以工業規模及相當低的成本製造含葡萄糖基—D—半乳糖苷的葡萄糖基轉移醣，其係習知的但是幾乎不可獲得的。

葡萄糖基轉移醣及含其的醣組成物可用當作具有相當高品質甜度的甜味料、味道改良劑、品質改良劑、賦形劑、黏度控制劑、水分控制劑、光澤賦予劑及補充營養劑，用於食品、化粧品、藥物及成形品中。因為本發明這些出色的特徵，其對食品、化粧品及藥物界以及對農業、漁業、養殖業及化學工業有重大貢獻。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

四、中文發明摘要 (發明之名稱：海藻糖磷酸化酶，其製法與用途)

一種熱穩定性海藻糖磷酸化酶，其可由熱厭氧菌 (*Thermoanaerobium*) 屬之微生物獲得且其於無機磷酸之存在中將海藻糖水解形成 D-葡萄糖及 β -D-葡萄糖-1-磷酸。海藻糖磷酸化酶亦可由重組體 DNA 技術製得。當於其它醣之存在下令該酶接觸充作醣供體的 β -D-葡萄糖-1-磷酸時，能以工業規模及相當低的成本製造含葡萄糖基-D-半乳糖苷的葡萄糖基轉移醣，該轉移醣係習知的但是幾乎不可獲得的。

英文發明摘要 (發明之名稱：Trehalose phosphorylase, its preparation and uses)

A thermostable trehalose phosphorylase which is obtainable from microorganisms of the genus *Thermoanaerobium* and which hydrolyzes trehalose in the presence of an inorganic phosphoric acid to form D-glucose and β -D-glucose-1-phosphoric acid. The trehalose phosphorylase can be also prepared by recombinant DNA technology. When the enzyme is allowed to contact with β -D-glucose-1-phosphoric acid as a saccharide donor in the presence of other saccharides, glucosyl-transferred saccharides including glucosyl-D-galactoside, which are conventionally known but scarcely obtainable, can be produced on an industrial-scale and in a relatively-low cost.

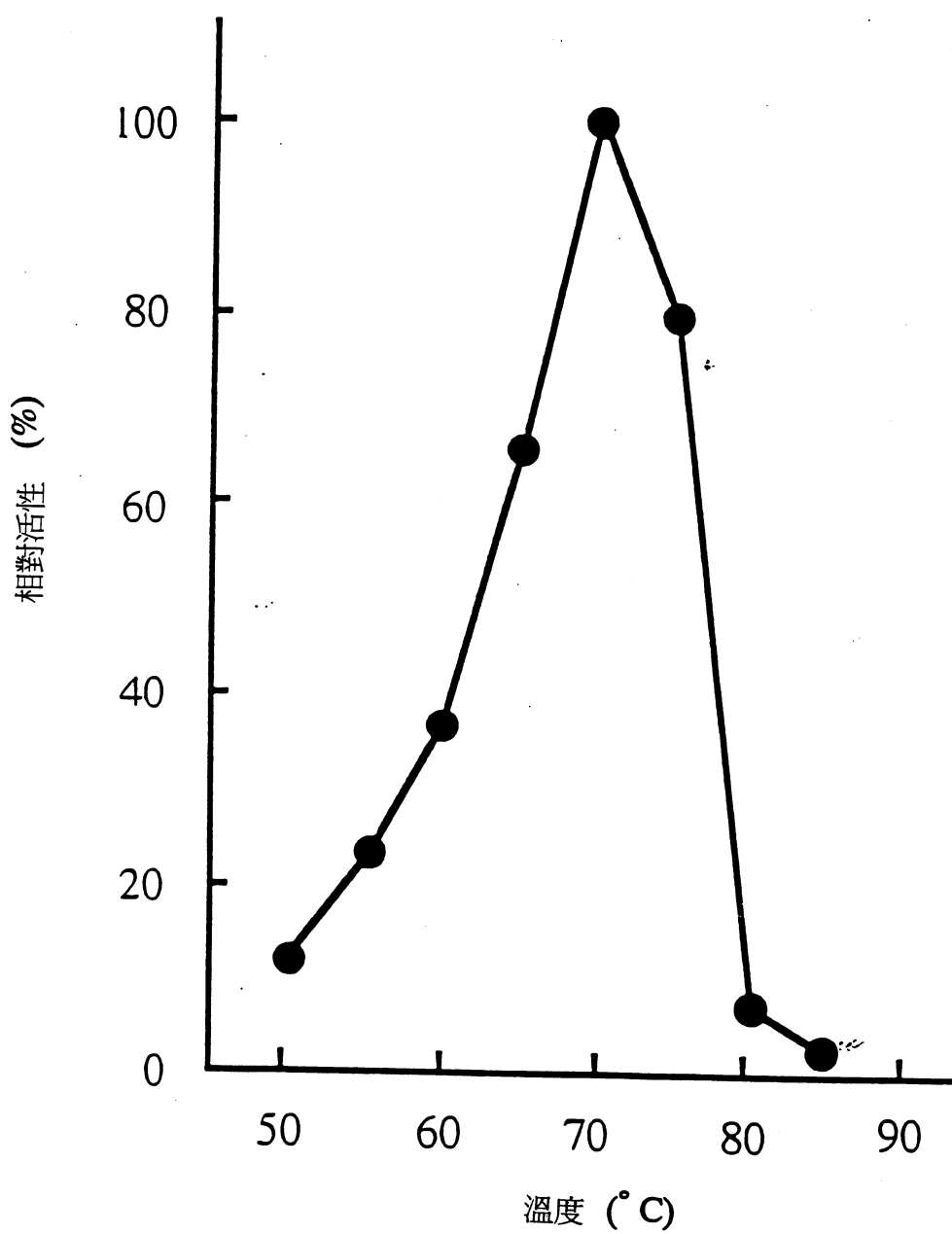
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

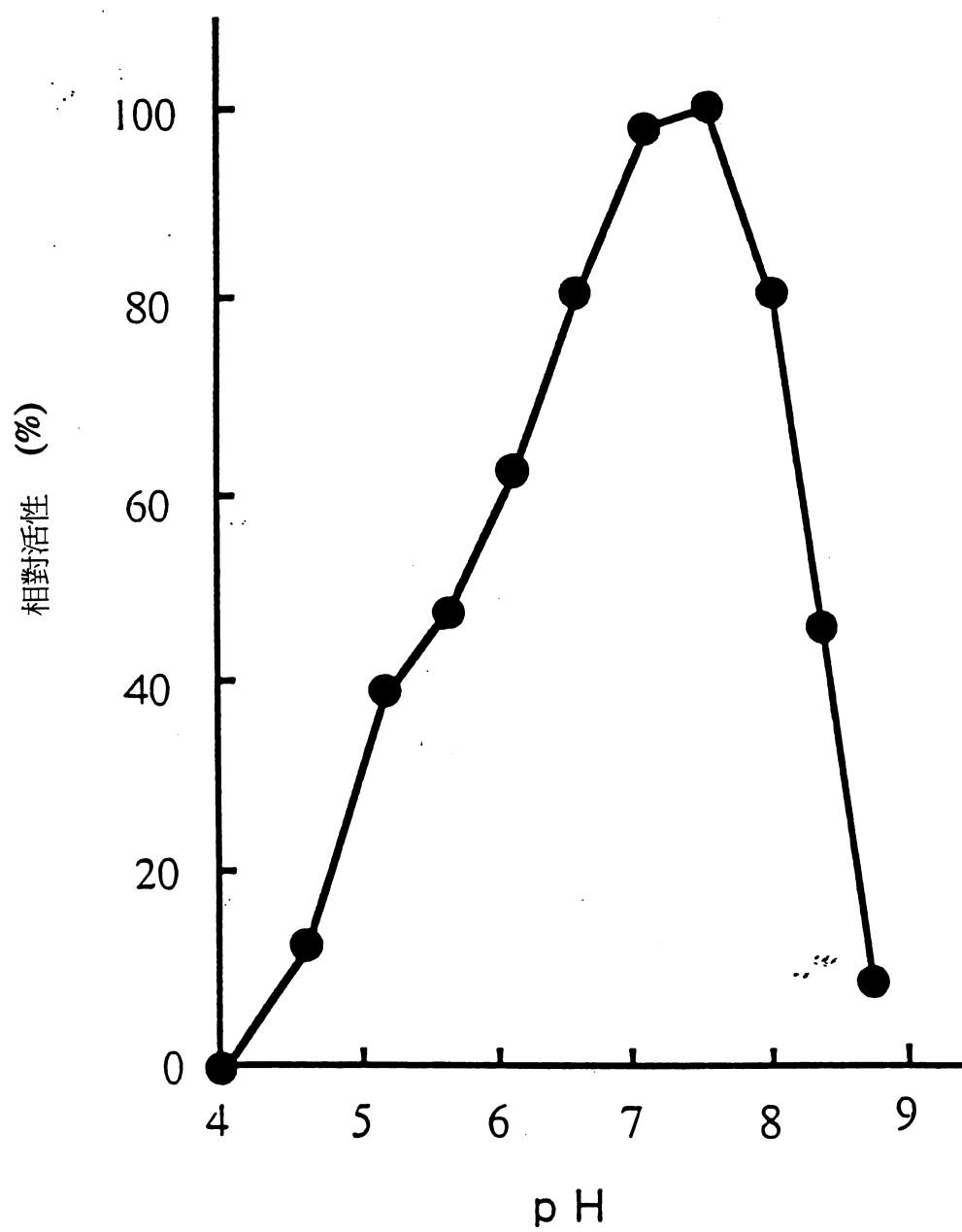
訂

線

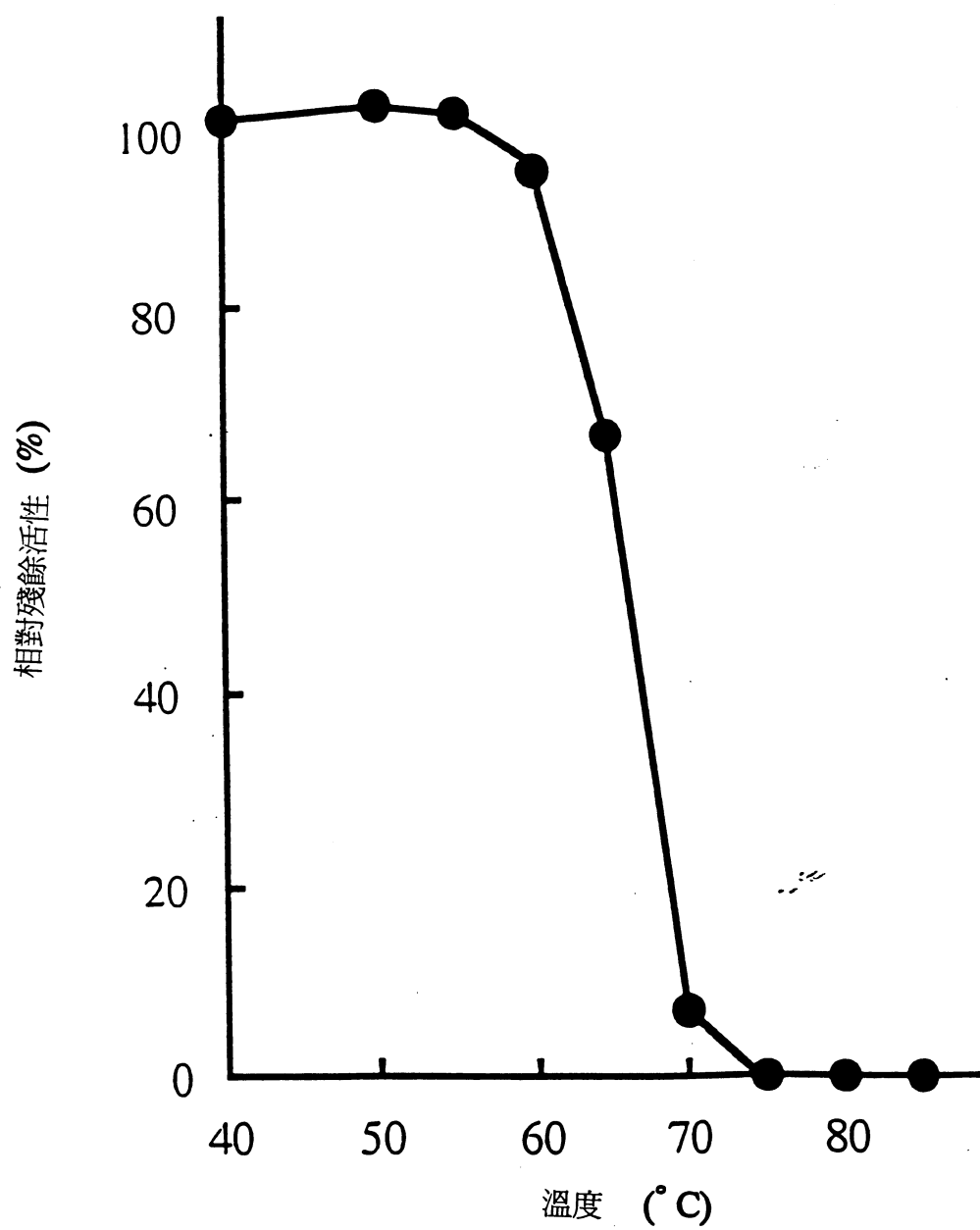
86116481



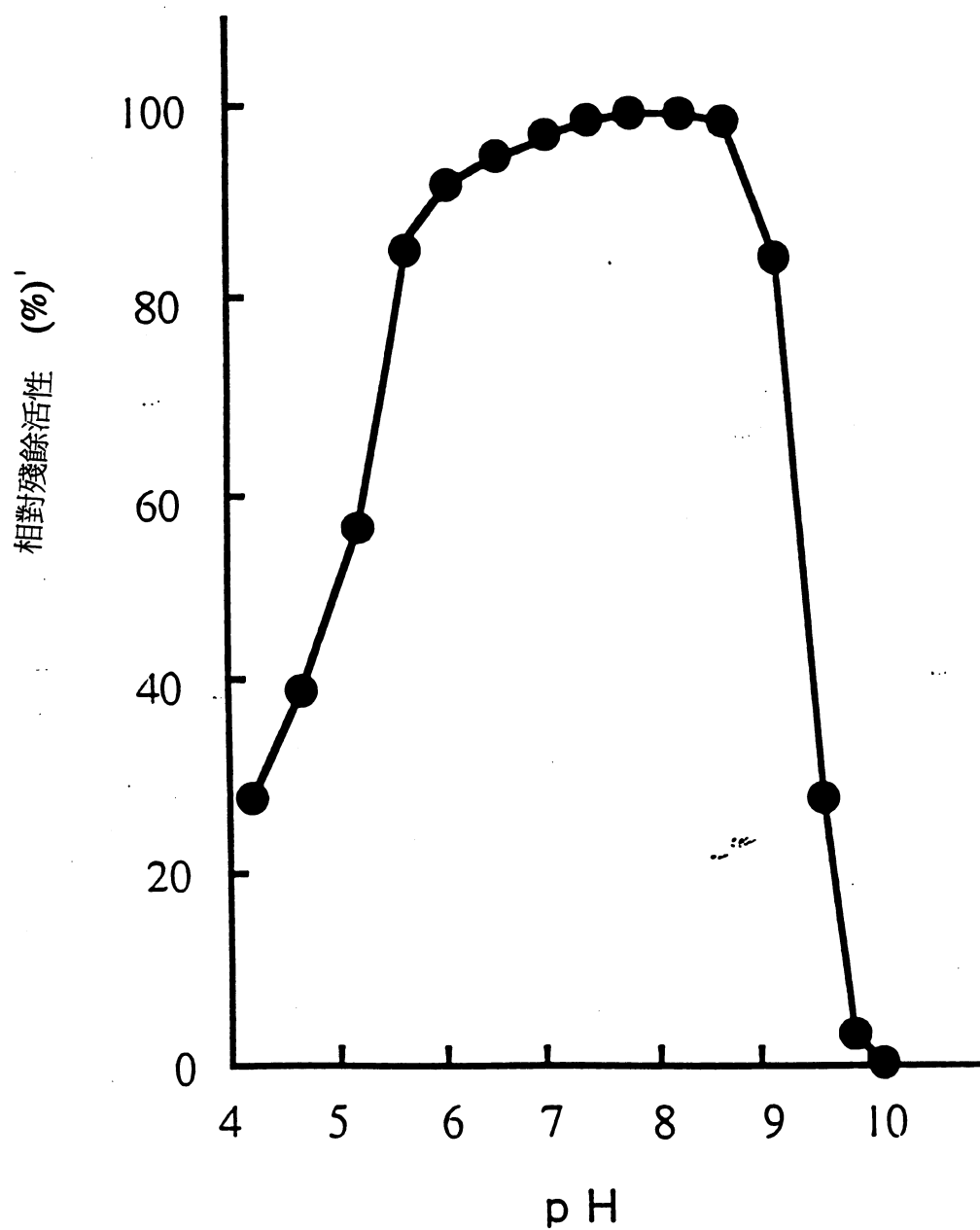
第1圖



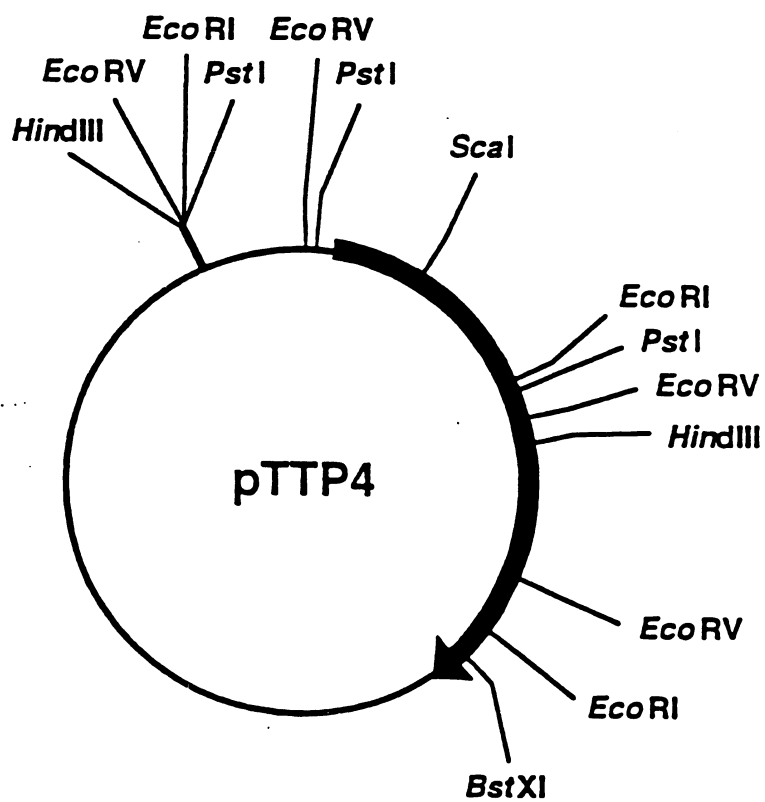
第 2 圖



第 3 圖



第4圖



第5圖

公 告 本

附件：第 86116481 號專利申請案

中文說明書(含申請專利範圍)修正本 民國 91 年 8 月 29 日呈

申請日期	86 年 11 月 5 日
案 號	86116481
類 別	C12N ^{9/24, 15/56, 1/20} , C12P ^{19/} , A61K ^{31/615}

A4
C4

91.8.29

(以上各欄由本局填註)

565611

發 明 專 利 說 明 書

一、發明 名稱	中 文	海藻糖磷酸化酶，其製法與用途
	英 文	Trehalose phosephoryase, its preparation and uses
二、發明人 姓名、 國籍、 住所、 居所	姓 名	(1) 仲田哲也 (2) 久保田倫夫 (3) 茶園博人
	國 籍	(1) 日本 (2) 日本 (3) 日本 (1) 日本國岡山縣岡山市津高三二六番地の一
	住、居所	(2) 日本國岡山縣岡山市四御神一番三〇 (3) 日本國岡山縣岡山市湊一〇七番地の二
	三、申請人	
三、申請人 姓名、 國籍、 住所、 居所	姓 名 (名稱)	(1) 林原生物化學研究所股份有限公司 株式会社林原生物化学研究所
	國 籍	(1) 日本 (1) 日本國岡山縣岡山市下石井一丁目二番三號
	住、居所 (事務所)	
	代 表 人 姓 名	(1) 林原健

裝

訂

線

公告本

序 列 表

民國 92 年 5 月 23 日 呈

72年5月23日 修正

(1) SEQ ID NO: 1 資料:

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 5 個胺基酸

(B) 類型: 胺基酸

(D) 拓樸學: 線型

(ii) 分子型式: 肽

(v) 片段類型: N端片段

(xi) 序列編號: SEQ ID NO: 1

A l a	A s n	L y s	T h r	L y s
1				5

(2) SEQ ID NO: 2 資料:

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 5 個胺基酸

(B) 類型: 胺基酸

(D) 拓樸學: 線型

(ii) 分子型式: 肽

(v) 片段類型: 內部片段

(xi) 序列編號: SEQ ID NO: 2

G l u	G l n	G l u	G l u	P h e
1				5

(3) SEQ ID NO: 3 資料:

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 5 個胺基酸

(B) 類型: 胺基酸

(D) 拓樸學: 線型

(ii) 分子型式: 肽

(v) 片段類型: 內部片段

(xi) 序列編號: SEQ ID NO: 3

A s n	T y r	A s p	T y r	T y r
1				5

(4) SEQ ID NO: 4 資料:

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 773 個胺基酸

(B) 類型: 胺基酸

(D) 拓樸學: 線型

(ii) 分子型式: 肽

(xi) 序列編號: SEQ ID NO: 4

Ala	Asn	Lys	Thr	Lys	Lys	Pro	Ile	Tyr	Pro	Phe	Glu	Asp	Trp	Val	Ile
1				5					10					15	
Arg	Glu	Thr	Gln	Phe	Ser	Ile	Asp	Thr	Asn	Tyr	Arg	Asn	Glu	Thr	Ile
			20					25					30		
Phe	Thr	Leu	Ala	Asn	Gly	Tyr	Ile	Gly	Met	Arg	Gly	Thr	Phe	Glu	Glu
			35				40					45			
Arg	Tyr	Ser	Gly	Pro	Lys	Asn	Thr	Ser	Phe	Asn	Gly	Thr	Tyr	Ile	Asn
		50				55					60				
Gly	Phe	Tyr	Glu	Ile	His	Asp	Ile	Val	Tyr	Pro	Glu	Gly	Gly	Tyr	Gly
65					70					75					80

Phe	Ala	Lys	Ile	Gly	Gln	Thr	Met	Leu	Asn	Val	Ala	Asp	Ser	Lys	Ile
				85					90					95	
Ile	Lys	Leu	Tyr	Val	Asp	Gly	Glu	Glu	Phe	Asp	Leu	Leu	Gln	Gly	Lys
			100				105						110		
Ile	Leu	Phe	Tyr	Glu	Arg	Val	Leu	Asp	Met	Lys	Lys	Gly	Phe	Val	Glu
		115					120					125			
Arg	Lys	Val	Lys	Trp	Glu	Ser	Pro	Thr	Gly	Lys	Ile	Leu	Glu	Val	Lys
	130					135					140				
Ile	Lys	Arg	Ile	Val	Ser	Leu	Asn	Arg	Gln	His	Leu	Ala	Ala	Ile	Ser
145					150					155					160
Phe	Thr	Met	Gln	Pro	Val	Asn	Phe	Thr	Gly	Lys	Ile	Arg	Phe	Val	Ser
			165						170					175	
Ala	Ile	Asp	Gly	Asn	Val	Ser	Asn	Ile	Asn	Asp	Ser	Glu	Asp	Val	Arg
			180					185					190		
Val	Gly	Ser	Asn	Leu	Lys	Gly	Lys	Val	Leu	Lys	Thr	Ile	Asp	Lys	Ser
		195					200					205			
Val	Glu	Gly	Leu	Lys	Gly	Trp	Ile	Val	Gln	Lys	Thr	Gln	Lys	Ser	Asn
	210					215									
Phe	Ser	Tyr	Ala	Cys	Ala	Ile	Asp	Asn	Val	Leu	Val	Ala	Asp	Ser	Lys
225					230					235					240
Tyr	Glu	Val	Ser	Asn	Ser	Leu	Glu	Glu	Asp	Gly	Val	Lys	Val	Ile	Val
				245					250					255	
Asp	Leu	Glu	Ala	Glu	Lys	Gly	Thr	Ser	Tyr	Thr	Leu	Asn	Lys	Phe	Ile
			260					265					270		
Ser	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Lys	Asp	Phe	Asp	Glu	Asn	Lys	Leu	Val	Ala	Leu
		275					280					285			
Ala	Leu	Glu	Glu	Ile	Glu	Lys	Ala	Lys	Asn	Asp	Gly	Phe	Glu	Thr	Ile
	290					295					300				
Glu	Lys	Glu	Gln	Glu	Glu	Phe	Leu	Asn	Ser	Phe	Trp	Lys	Asp	Ala	Asp
305					310					315					320
Val	Ile	Ile	Glu	Gly	Asp	Lys	Ala	Leu	Gln	Gln	Gly	Ile	Arg	Phe	Asn
				325					330					335	
Glu	Phe	His	Leu	Leu	Gln	Ser	Val	Gly	Arg	Asp	Gly	Lys	Thr	Asn	Ile
			340					345					350		
Ala	Ala	Lys	Gly	Leu	Thr	Gly	Gly	Gly	Tyr	Glu	Gly	His	Tyr	Phe	Trp
		355					360					365			
Asp	Ser	Asp	Ile	Tyr	Ile	Met	Pro	Phe	Phe	Leu	Tyr	Thr	Lys	Pro	Glu
	370					375					380				
Ile	Ala	Lys	Ala	Leu	Val	Met	Tyr	Arg	Tyr	Asn	Leu	Leu	Asp	Ala	Ala
385					390					395					400
Arg	Ser	Arg	Ala	Lys	Glu	Leu	Gly	His	Lys	Gly	Ala	Leu	Tyr	Pro	Trp
			405						410					415	
Arg	Thr	Ile	Asp	Gly	Pro	Glu	Cys	Ser	Ala	Tyr	Phe	Pro	Ala	Gly	Thr
			420					425					430		
Ala	Gln	Tyr	His	Ile	Asn	Ala	Asp	Ile	Val	Tyr	Ala	Leu	Lys	Arg	Tyr
		435					440					445			
Val	Glu	Ala	Thr	Asn	Asp	Val	Asp	Phe	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Gly	Cys	Glu
	450					455					460				
Ile	Leu	Phe	Glu	Thr	Ala	Arg	Phe	Trp	Glu	Asp	Leu	Gly	Ala	Tyr	Ile
465					470					475					480
Pro	Leu	Lys	Gly	Asn	Lys	Phe	Cys	Ile	Asn	Cys	Val	Thr	Gly	Pro	Asp
				485					490					495	
Glu	Tyr	Thr	Ala	Leu	Val	Asp	Asn	Asn	Ala	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Met	Ala
			500					505					510		
Lys	Met	Asn	Leu	Glu	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Ile	Ala	Asn	Lys	Met	Lys	Lys
		515						520				525			

Glu	Val	Pro	Gln	Lys	Tyr	Gln	Lys	Val	Ala	Ser	Lys	Leu	Asn	Leu	Lys
	530					535					540				
Asp	Glu	Glu	Ile	Val	Ala	Trp	Lys	Lys	Ala	Ala	Asp	Asn	Met	Tyr	Leu
545					550					555					560
Pro	Tyr	Ser	Lys	Glu	Leu	Asp	Ile	Ile	Pro	Gln	Asp	Asp	Ser	Phe	Leu
			565						570					575	
Tyr	Lys	Glu	Arg	Ile	Thr	Val	Asp	Glu	Ile	Pro	Glu	Asp	Gln	Phe	Pro
			580					585					590		
Leu	Leu	Leu	His	Trp	His	Tyr	Leu	Asn	Ile	Tyr	Arg	Tyr	Gln	Ile	Cys
		595					600					605			
Lys	Gln	Pro	Asp	Val	Leu	Leu	Leu	Met	Phe	Leu	Gln	Arg	Glu	Lys	Phe
	610					615					620				
Thr	Lys	Asp	Glu	Leu	Lys	Lys	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Glu	Pro	Ile	Thr
625					630					635					640
Thr	His	Asp	Ser	Ser	Leu	Ser	Pro	Ala	Ile	Phe	Ser	Ile	Leu	Ala	Asn
			645						650					655	
Glu	Ile	Gly	Tyr	Thr	Asp	Lys	Ala	Tyr	Lys	Tyr	Phe	Met	Met	Thr	Ala
			660					665					670		
Arg	Met	Asp	Leu	Asp	Asp	Tyr	Asn	Asp	Asn	Val	Lys	Asp	Gly	Ile	His
		675					680					685			
Ala	Ala	Ser	Met	Ala	Gly	Thr	Trp	Ser	Ala	Val	Val	Asn	Gly	Phe	Gly
	690					695					700				
Gly	Met	Arg	Val	Tyr	Thr	Asn	Glu	Leu	His	Phe	Glu	Pro	Arg	Leu	Pro
705					710					715					720
Lys	Glu	Trp	Asn	Leu	Leu	Ser	Phe	Asn	Val	Arg	Tyr	Lys	Gly	Arg	Lys
			725					730						735	
Ile	Asn	Val	Lys	Leu	Thr	Lys	Glu	Asn	Val	Val	Phe	Ala	Leu	Leu	Glu
			740					745					750		
Gly	Glu	Pro	Ile	Glu	Ile	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Lys	Lys	Ile	Leu	Leu	Glu
		755					760					765			
Lys	Gly	Glu	Ile	Lys											
	770														

(5) SEQ ID NO: 5 資料:

(i) 序列特徵:

- (A) 長度: 2319 個鹼基對
 (B) 類型: 核酸
 (C) 股型: 雙股
 (D) 拓樸學: 線型

(xi) 序列編號: SEQ ID NO: 5

GCCAACAAAA	CGAAGAAACC	AATTTACCCT	TTTGAAGATT	GGGTTATAAG	AGAGACGCAG	60
TTTAGTATAG	ATACTAATA	TAGAAATGAA	ACTATTTTAA	CTTTAGCAAA	TGGATATATT	120
GGAATGAGAG	GAACCTTTGA	GGAAAGATAT	TCAGGGCCTA	AAAATACTTC	TTTTAATGGG	180
ACGTATATCA	ATGGGTTTTA	TGAAATACAC	GATATAGTTT	ACCCTGAAGG	GGGATATGGT	240
TTTGCAAAAA	TAGGGCAGAC	GATGCTAAAT	GTTGCTGATA	GCAAAATAAT	AAAATTATAT	300
GTAGATGGGG	AAGAGTTTGA	TTTGTTACAA	GGGAAAATCC	TCTTTTATGA	GAGAGTACTT	360
GACATGAAGA	AAGGTTTTGT	AGAAAGAAAA	GTAAAATGGG	AATCCCCTAC	AGGAAAAATT	420
TTAGAGGTAA	AAATAAAGAG	AATTGTATCA	TTAAATAGAC	AACATTTAGC	GGCGATTCTT	480
TTTACTATGC	AACCTGTAAA	TTTTACCGGA	AAAATTAGAT	TTGTTTCCGC	TATTGACGGA	540
AATGTTTCAA	ATATAAATGA	TAGTGAAGAT	GTAAGAGTAG	GGTCAAATTT	AAAAGGAAAG	600
GTTTTAAAGA	CTATAGATAA	AAGTGTAGAG	GGTTTAAAG	GGTGGATTGT	TCAAAAGACA	660
CAAAAGAGCA	ATTTCTCCTA	TGCTTGCGCG	ATAGACAATG	TATTAGTGGC	AGATAGCAAA	720
TATGAAGTCT	CAAATAGTTT	AGAAGAAGAT	GGAGTAAAG	TAATTGTAGA	TCTAGAGGCT	780
GAAAAAGGCA	CCTCATACAC	TTTGAATAAA	TTTATTTCTT	ATTACACTTC	AAAGGATTTT	840
GATGAAAATA	AATTGGTTGC	TCTTGCTTTA	GAAGAAATAG	AAAAAGCCAA	AAATGACGGC	900

```

TTTGAAACGA TAGAAAAAGA GCAGGAAGAA TTTTGAATT CTTTTTGGAA AGATGCTGAT 960
GTAATCATAG AAGGAGATAA AGCTCTGCAG CAAGGCATAC GCTTTAATGA ATTTTCATCTA 1020
CTTCAATCTG TCGGAAGAGA TGGAAAGACA AATATTGCAG CAAAAGGGCT GACTGGAGGA 1080
GGTTATGAAG GCCATTATTT TTGGGATTCT GATATCTATA TAATGCCTTT CTTTCTTTAT 1140
ACAAAGCCTG AAATTGCAAA AGCTTTGGTA ATGTACAGGT ATAATCTTTT GGATGCAGCA 1200
AGATCCAGGG CAAAGGAATT AGGTCACAAA GGAGCTTTGT ATCCTTGGAG AACGATAGAT 1260
GGTCCTGAAT GTTCTGCTTA CTTTCCAGCT GGTACGGCAC AGTATCACAT AAATGCTGAT 1320
ATAGTTTATG CTTTGAAAAG ATATGTAGAA GCGACGAATG ACGTGGATTT TCTTTATGAC 1380
TACGGTTGTG AAATATTATT TGAAACTGCA AGATTTTGGG AAGATTTAGG AGCGTATATT 1440
CCTCTTAAGG GCAATAAATT CTGCATAAAC TGTGTCACTG GTCCGGATGA GTATACGGCA 1500
TTAGTTGACA ATAACGCTTA TACCAATTAT ATGGCGAAAA TGAATTTGGA ATATGCCTAT 1560
GACATTGCAA ACAAATGAA AAAAGAAGTG CCTCAAAAAT ATCAAAAAGT CGCTTCTAAA 1620
CTAAATCTAA AGGATGAAGA AATTGTTGCG TGGAAAAAAG CTGCTGACAA TATGTACCTT 1680
CCTTATTCAA AAGAACTTGA TATTATACCA CAGGATGACA GTTTTTTGTG TAAAGAAAGG 1740
ATAACAGTGG ATGAAATACC TGAGGACCAA TTTCCACTTT TATTGCACTG GCATTACCTA 1800
AATATTTACA GATATCAAAT ATGCAAACAG CCTGATGTGT TGCTTTTGAT GTTTTTACAG 1860
AGAGAAAAAT TACTAAAGA TGAACCTAAA AAGAATTACG ATTATTATGA ACCTATTACC 1920
ACTCACGACT CCTCCTTGTC GCCAGCTATA TTTAGCATAC TAGCCAATGA AATAGGATAT 1980
ACTGACAAGG CTTATAAATA CTTTATGATG ACTGCAAGAA TGGATTTGGA TGACTACAA 2040
GACAATGTTA AGGACGGAAT TCACGCTGCT TCTATGGCAG GGACATGGAG CGCAGTTGTG 2100
AATGGTTTTG GTGGAATGAG GGTTTATACA AATGAACTGC ATTTTGAGCC GAGATTGCCA 2160
AAAGAATGGA ATTTGCTCTC TTTTAATGTG AGATACAAAG GGAGAAAAAT AAATGTCAAA 2220
TTAACCAAAG AAAATGTTGT GTTTGCATTA TTAGAAGGAG AGCCTATAGA AATCTACTAC 2280
TTTGACAAAA AAATTTTACT TGAAAAAGGA GAAATAAAG 2319

```

(6) SEQ ID NO : 6 資料:

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 30 個胺基酸

(B) 類型: 胺基酸

(D) 拓樸學: 線型

(ii) 分子型式: 肽

(v) 片段類型: N端片段

(xi) 序列編號: SEQ ID NO : 6

Ala	Asn	Lys	Thr	Lys	Lys	Pro	Ile	Tyr	Pro	Phe	Glu	Asp	Trp	Val	Ile
1				5					10					15	
Arg	Glu	Thr	Gln	Phe	Ser	Ile	Asp	Thr	Asn	Tyr	Arg	Asn	Glu		
			20					25					30		

(7) SEQ ID NO : 7 資料:

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 15 個胺基酸

(B) 類型: 胺基酸

(D) 拓樸學: 線型

(ii) 分子型式: 肽

(v) 片段類型: 內部片段

(xi) 序列編號: SEQ ID NO : 7

Asn	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Glu	Pro	Ile	Thr	Thr	His	Asp	Ser	Ser	Leu
1				5					10					15

(8) SEQ ID NO : 8 資料:

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 3345 個鹼基對

(B) 類型: 核酸

(C) 股型: 雙股

(D) 拓樸學: 線型

(ii) 分子型式：基因組DNA

(vi) 原始來源：

(A) 生物體：熱厭氧菌

(F) 菌株：ATCC 35047

(ix) 特徵：

(A1) 名稱/KEY：1-595 5'-UTR

(C1) 鑑定方法：E

(A2) 名稱/KEY：596-2917 mat 肽

(C2) 鑑定方法：S

(A3) 名稱/KEY：2918-3345 3'-UTR

(C2) 鑑定方法：E

(xi) 序列編號：SEQ ID NO：8

CTGACTGGAA	TACACCTGTA	GAATATCTTG	CAAAAGAGAG	CGTATATTTG	GTTCAAAATT	60
GGCCGTACAC	TGCAAACGTT	CTTGTAGAGC	AGTATGGAAA	AAAGAACATT	TTGGCATATC	120
ACGGATGGAC	AGGTCCGGTT	AAAGAGTCCC	ACGTTTTTGGG	AGGAGAAGTT	ATAGGAATAC	180
CAACTGGTGC	ACCTAATAAA	GAGATGGCTA	TAAAGTTTAT	GGAATACCTT	ATGAGTAAAG	240
AAGTTCGAAG	GAACTTGTC	ACTAAATTAG	GATGGCCATC	CATGAGAAGT	GACGCTTATG	300
GGAAGGTTGC	AGAGTGGCAA	AAACCATATT	TTGAAGCTAT	AAATGAAGCG	TTAAAACATG	360
CAGAACCAAG	GCCAAACCTT	GTATACTGGG	CTGATGTGGA	CAAAGCTATA	AATGGAGCAT	420
TGAGAGAAAT	AATATTTGAA	GGCAAAGATA	TCAAGACAAC	TCTTGACAAA	TATCACAACA	480
TGATAGAAGA	AGCTAAGAAA	GCTGCAGAAA	GCAAGTAAAT	GTTTTAAATT	GTTTTAGTCG	540
GAAACGACTT	TGTTTCCGAC	TAAAATTTTG	AATAAAGTAA	GAGTGGAGGA	TGGAT	595
ATG GCC AAC AAA ACG AAG AAA CCA ATT TAC CCT TTT GAA GAT TGG GTT						643
Met Ala Asn Lys Thr Lys Lys Pro Ile Tyr Pro Phe Glu Asp Trp Val						
1 5 10 15						
ATA AGA GAG ACG CAG TTT AGT ATA GAT ACT AAC TAT AGA AAT GAA ACT						691
Ile Arg Glu Thr Gln Phe Ser Ile Asp Thr Asn Tyr Arg Asn Glu Thr						
20 25 30						
ATT TTT ACT TTA GCA AAT GGA TAT ATT GGA ATG AGA GGA ACT TTT GAG						739
Ile Phe Thr Leu Ala Asn Gly Tyr Ile Gly Met Arg Gly Thr Phe Glu						
35 40 45						
GAA AGA TAT TCA GGG CCT AAA AAT ACT TCT TTT AAT GGG ACG TAT ATC						787
Glu Arg Tyr Ser Gly Pro Lys Asn Thr Ser Phe Asn Gly Thr Tyr Ile						
50 55 60						
AAT GGG TTT TAT GAA ATA CAC GAT ATA GTT TAC CCT GAA GGG GGA TAT						835
Asn Gly Phe Tyr Glu Ile His Asp Ile Val Tyr Pro Glu Gly Gly Tyr						
65 70 75 80						
GGT TTT GCA AAA ATA GGG CAG ACG ATG CTA AAT GTT GCT GAT AGC AAA						860
Gly Phe Ala Lys Ile Gly Gln Thr Met Leu Asn Val Ala Asp Ser Lys						
85 90 95						
ATA ATA AAA TTA TAT GTA GAT GGG GAA GAG TTT GAT TTG TTA CAA GGG						931
Ile Ile Lys Leu Tyr Val Asp Gly Glu Glu Phe Asp Leu Leu Gln Gly						
100 105 110						
AAA ATC CTC TTT TAT GAG AGA GTA CTT GAC ATG AAG AAA GGT TTT GTA						979
Lys Ile Leu Phe Tyr Glu Arg Val Leu Asp Met Lys Lys Gly Phe Val						
115 120 125						
GAA AGA AAA GTA AAA TGG GAA TCC CCT ACA GGA AAA ATT TTA GAG GTA						1027
Glu Arg Lys Val Lys Trp Glu Ser Pro Thr Gly Lys Ile Leu Glu Val						
130 135 140						
AAA ATA AAG AGA ATT GTA TCA TTA AAT AGA CAA CAT TTA GCG GCG ATT						1075
Lys Ile Lys Arg Ile Val Ser Leu Asn Arg Gln His Leu Ala Ala Ile						
145 150 155 160						
TCT TTT ACT ATG CAA CCT GTA AAT TTT ACC GGA AAA ATT AGA TTT GTT						1123
Ser Phe Thr Met Gln Pro Val Asn Phe Thr Gly Lys Ile Arg Phe Val						

				165				170					175				
TCC	GCT	ATT	GAC	GGA	AAT	GTT	TCA	AAT	ATA	AAT	GAT	AGT	GAA	GAT	GTA		1171
Ser	Ala	Ile	Asp	Gly	Asn	Val	Ser	Asn	Ile	Asn	Asp	Ser	Glu	Asp	Val		
			180					185					190				
AGA	GTA	GGG	TCA	AAT	TTA	AAA	GGA	AAG	GTT	TTA	AAG	ACT	ATA	GAT	AAA		1219
Arg	Val	Gly	Ser	Asn	Leu	Lys	Gly	Lys	Val	Leu	Lys	Thr	Ile	Asp	Lys		
		195					200					205					
AGT	GTA	GAG	GGT	TTA	AAA	GGG	TGG	ATT	GTT	CAA	AAG	ACA	CAA	AAG	AGC		1267
Ser	Val	Glu	Gly	Leu	Lys	Gly	Trp	Ile	Val	Gln	Lys	Thr	Gln	Lys	Ser		
	210					215				220							
AAT	TTC	TCC	TAT	GCT	TGC	GCG	ATA	GAC	AAT	GTA	TTA	GTG	GCA	GAT	AGC		1315
Asn	Phe	Ser	Tyr	Ala	Cys	Ala	Ile	Asp	Asn	Val	Leu	Val	Ala	Asp	Ser		
	225				230					235					240		
AAA	TAT	GAA	GTC	TCA	AAT	AGT	TTA	GAA	GAA	GAT	GGA	GTA	AAA	GTA	ATT		1363
Lys	Tyr	Glu	Val	Ser	Asn	Ser	Leu	Glu	Glu	Asp	Gly	Val	Lys	Val	Ile		
			245					250							255		
GTA	GAT	CTA	GAG	GCT	GAA	AAA	GGC	ACC	TCA	TAC	ACT	TTG	AAT	AAA	TTT		1411
Val	Asp	Leu	Glu	Ala	Glu	Lys	Gly	Thr	Ser	Tyr	Thr	Leu	Asn	Lys	Phe		
			260				265								270		
ATT	TCC	TAT	TAC	ACT	TCA	AAG	GAT	TTT	GAT	GAA	AAT	AAA	TTG	GTT	GCT		14
Ile	Ser	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Lys	Asp	Phe	Asp	Glu	Asn	Lys	Leu	Val	Ala		
		275					280					285					
CTT	GCT	TTA	GAA	GAA	ATA	GAA	AAA	GCC	AAA	AAT	GAC	GGC	TTT	GAA	ACG		1507
Leu	Ala	Leu	Glu	Glu	Ile	Glu	Lys	Ala	Lys	Asn	Asp	Gly	Phe	Glu	Thr		
	290					295					300						
ATA	GAA	AAA	GAG	CAG	GAA	GAA	TTT	TTG	AAT	TCT	TTT	TGG	AAA	GAT	GCT		1555
Ile	Glu	Lys	Glu	Gln	Glu	Glu	Phe	Leu	Asn	Ser	Phe	Trp	Lys	Asp	Ala		
	305				310				315						320		
GAT	GTA	ATC	ATA	GAA	GGA	GAT	AAA	GCT	CTG	CAG	CAA	GGC	ATA	CGC	TTT		1603
Asp	Val	Ile	Ile	Glu	Gly	Asp	Lys	Ala	Leu	Gln	Gln	Gly	Ile	Arg	Phe		
			325					330							335		
AAT	GAA	TTT	CAT	CTA	CTT	CAA	TCT	GTC	GGA	AGA	GAT	GGA	AAG	ACA	AAT		1651
Asn	Glu	Phe	His	Leu	Leu	Gln	Ser	Val	Gly	Arg	Asp	Gly	Lys	Thr	Asn		
			340					345					350				
ATT	GCA	GCA	AAA	GGG	CTG	ACT	GGA	GGA	GGT	TAT	GAA	GGC	CAT	TAT	TTT		1699
Ile	Ala	Ala	Lys	Gly	Leu	Thr	Gly	Gly	Gly	Tyr	Glu	Gly	His	Tyr	Phe		
		355					360					365					
TGG	GAT	TCT	GAT	ATC	TAT	ATA	ATG	CCT	TTC	TTT	CTT	TAT	ACA	AAG	CCT		1747
Trp	Asp	Ser	Asp	Ile	Tyr	Ile	Met	Pro	Phe	Phe	Leu	Tyr	Thr	Lys	Pro		
	370				375						380						
GAA	ATT	GCA	AAA	GCT	TTG	GTA	ATG	TAC	AGG	TAT	AAT	CTT	TTG	GAT	GCA		1795
Glu	Ile	Ala	Lys	Ala	Leu	Val	Met	Tyr	Arg	Tyr	Asn	Leu	Leu	Asp	Ala		
	385				390				395						400		
GCA	AGA	TCC	AGG	GCA	AAG	GAA	TTA	GGT	CAC	AAA	GGA	GCT	TTG	TAT	CCT		1843
Ala	Arg	Ser	Arg	Ala	Lys	Glu	Leu	Gly	His	Lys	Gly	Ala	Leu	Tyr	Pro		
			405					410							415		
TGG	AGA	ACG	ATA	GAT	GGT	CCT	GAA	TGT	TCT	GCT	TAC	TTT	CCA	GCT	GGT		1891
Trp	Arg	Thr	Ile	Asp	Gly	Pro	Glu	Cys	Ser	Ala	Tyr	Phe	Pro	Ala	Gly		
			420				425						430				
ACG	GCA	CAG	TAT	CAC	ATA	AAT	GCT	GAT	ATA	GTT	TAT	GCT	TTG	AAA	AGA		1939
Thr	Ala	Gln	Tyr	His	Ile	Asn	Ala	Asp	Ile	Val	Tyr	Ala	Leu	Lys	Arg		
		435				440						445					
TAT	GTA	GAA	GCG	ACG	AAT	GAC	GTG	GAT	TTT	CTT	TAT	GAC	TAC	GGT	TGT		1987
Tyr	Val	Glu	Ala	Thr	Asn	Asp	Val	Asp	Phe	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Gly	Cys		
	450				455							460					
GAA	ATA	TTA	TTT	GAA	ACT	GCA	AGA	TTT	TGG	GAA	GAT	TTA	GGA	GCG	TAT		2035

Glu 465	Ile	Leu	Phe	Glu 470	Thr	Ala	Arg	Phe	Trp	Glu 475	Asp	Leu	Gly	Ala	Tyr 480	
ATT	CCT	CTT	AAG	GGC	AAT	AAA	TTC	TGC	ATA	AAC	TGT	GTC	ACT	GGT	CCG	2083
Ile	Pro	Leu	Lys	Gly 485	Asn	Lys	Phe	Cys	Ile	Asn	Cys	Val	Thr	Gly	Pro	
GAT	GAG	TAT	ACG	GCA	TTA	GTT	GAC	AAT	AAC	GCT	TAT	ACC	AAT	TAT	ATG	2131
Asp	Glu	Tyr	Thr	Ala	Leu	Val	Asp	Asn	Asn	Ala	Tyr	Thr	Asn	Tyr	Met	
			500					505					510			
GCG	AAA	ATG	AAT	TTG	GAA	TAT	GCC	TAT	GAC	ATT	GCA	AAC	AAA	ATG	AAA	2179
Ala	Lys	Met	Asn	Leu	Glu	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Ile	Ala	Asn	Lys	Met	Lys	
		515					520					525				
AAA	GAA	GTG	CCT	CAA	AAA	TAT	CAA	AAA	GTC	GCT	TCT	AAA	CTA	AAT	CTA	2227
Lys	Glu	Val	Pro	Gln	Lys	Tyr	Gln	Lys	Val	Ala	Ser	Lys	Leu	Asn	Leu	
	530					535					540					
AAG	GAT	GAA	GAA	ATT	GTT	GCG	TGG	AAA	AAA	GCT	GCT	GAC	AAT	ATG	TAC	2275
Lys	Asp	Glu	Glu	Ile	Val	Ala	Trp	Lys	Lys	Ala	Ala	Asp	Asn	Met	Tyr	
	545			550						555					560	
CTT	CCT	TAT	TCA	AAA	GAA	CTT	GAT	ATT	ATA	CCA	CAG	GAT	GAC	AGT	TTT	2323
Leu	Pro	Tyr	Ser	Lys	Glu	Leu	Asp	Ile	Ile	Pro	Gln	Asp	Asp	Ser	Phe	
			565					570						575		
TTG	TAT	AAA	GAA	AGG	ATA	ACA	GTG	GAT	GAA	ATA	CCT	GAG	GAC	CAA	TTT	2371
Leu	Tyr	Lys	Glu	Arg	Ile	Thr	Val	Asp	Glu	Ile	Pro	Glu	Asp	Gln	Phe	
			580					585					590			
CCA	CTT	TTA	TTG	CAC	TGG	CAT	TAC	CTA	AAT	ATT	TAC	AGA	TAT	CAA	ATA	2419
Pro	Leu	Leu	Leu	His	Trp	His	Tyr	Leu	Asn	Ile	Tyr	Arg	Tyr	Gln	Ile	
			595				600					605				
TGC	AAA	CAG	CCT	GAT	GTG	TTG	CTT	TTG	ATG	TTT	TTA	CAG	AGA	GAA	AAA	2467
Cys	Lys	Gln	Pro	Asp	Val	Leu	Leu	Leu	Met	Phe	Leu	Gln	Arg	Glu	Lys	
	610					615						620				
TTT	ACT	AAA	GAT	GAA	CTT	AAA	AAG	AAT	TAC	GAT	TAT	TAT	GAA	CCT	ATT	2515
Phe	Thr	Lys	Asp	Glu	Leu	Lys	Lys	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Glu	Pro	Ile	
	625				630					635					640	
ACC	ACT	CAC	GAC	TCC	TCC	TTG	TCG	CCA	GCT	ATA	TTT	AGC	ATA	CTA	GCC	2563
Thr	Thr	His	Asp	Ser	Ser	Leu	Ser	Pro	Ala	Ile	Phe	Ser	Ile	Leu	Ala	
			645						650					655		
AAT	GAA	ATA	GGA	TAT	ACT	GAC	AAG	GCT	TAT	AAA	TAC	TTT	ATG	ATG	ACT	2611
Asn	Glu	Ile	Gly	Tyr	Thr	Asp	Lys	Ala	Tyr	Lys	Tyr	Phe	Met	Met	Thr	
			660					665					670			
GCA	AGA	ATG	GAT	TTG	GAT	GAC	TAC	AAT	GAC	AAT	GTT	AAG	GAC	GGA	ATT	265
Ala	Arg	Met	Asp	Leu	Asp	Asp	Tyr	Asn	Asp	Asn	Val	Lys	Asp	Gly	Ile	
		675					680					685				
CAC	GCT	GCT	TCT	ATG	GCA	GGG	ACA	TGG	AGC	GCA	GTT	GTG	AAT	GGT	TTT	2707
His	Ala	Ala	Ser	Met	Ala	Gly	Thr	Trp	Ser	Ala	Val	Val	Asn	Gly	Phe	
	690					695						700				
GGT	GGA	ATG	AGG	GTT	TAT	ACA	AAT	GAA	CTG	CAT	TTT	GAG	CCG	AGA	TTG	2755
Gly	Gly	Met	Arg	Val	Tyr	Thr	Asn	Glu	Leu	His	Phe	Glu	Pro	Arg	Leu	
	705			710						715					720	
CCA	AAA	GAA	TGG	AAT	TTG	CTC	TCT	TTT	AAT	GTG	AGA	TAC	AAA	GGG	AGA	2803
Pro	Lys	Glu	Trp	Asn	Leu	Leu	Ser	Phe	Asn	Val	Arg	Tyr	Lys	Gly	Arg	
			725					730						735		
AAA	ATA	AAT	GTC	AAA	TTA	ACC	AAA	GAA	AAT	GTT	GTG	TTT	GCA	TTA	TTA	2851
Lys	Ile	Asn	Val	Lys	Leu	Thr	Lys	Glu	Asn	Val	Val	Phe	Ala	Leu	Leu	
			740					745					750			
GAA	GGA	GAG	CCT	ATA	GAA	ATC	TAC	TAC	TTT	GAC	AAA	AAA	ATT	TTA	CTT	2899
Glu	Gly	Glu	Pro	Ile	Glu	Ile	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Lys	Lys	Ile	Leu	Leu	
		755					760					765				

GAA AAA GGA GAA ATA AAG
Glu Lys Gly Glu Ile Lys
770

2917

TAGAAAGTCT	CAAAAATTAA	AGAAGTATGG	AGCCATTGGC	ACCATACTTC	TTTAATTTTT	2977
TTATATGTCG	TTACTTGAAA	GGGTGAGTGA	CCCGCCTCCT	ACACTTAAAT	CAAAGTAATA	3037
ATCTCCACTG	CCTCGGAAGG	AATATACTTT	GATATAATAG	GTTCCCGTTT	GTGTTGGAAT	3097
GTATGTTATT	GTCTCCTGCC	TTTGTGTTCC	AGTTGAACTT	TTGACAAGAG	TACCAGTTGG	3157
GTCATAGAGG	TATATATCGA	AATCAGGGTT	ATAGTTTGCC	CAATCAGGTA	TTATGAAAGT	3217
TATTGCAATA	GGATATGATG	TGTCTGTCAC	ATTAAATGTC	CAAATGTCAC	TGTAACGAGA	3277
CCCAGGAAGT	GACTCTTTAG	CATAATAGTG	GTTTGCGCGA	GATATATTAG	TTCCTGTGAA	3337
ATTTCCAG						3345

六、申請專利範圍

第 86116481 號 專 利 申 請 案

中 文 申 請 專 利 範 圍 修 正 本

民 國 92 年 10 月 13 日 修 正

1 . 一 種 海 藻 糖 磷 酸 化 酶 ， 其 可 得 自 於 熱 厭 氧 菌
(Thermoanaerobium) 屬 之 微 生 物 且 具 有 下 述 之 性 質：

(1) 作 用

自 海 藻 糖 和 無 機 磷 酸 及 / 或 其 鹽 生 成 D - 葡 萄 糖 和 β
- D - 葡 萄 糖 - 1 - 磷 酸 及 / 或 其 鹽 ， 且 反 之 亦 然 ， 並 利
用 β - D - 葡 萄 糖 - 1 - 磷 酸 及 / 或 其 鹽 充 作 葡 萄 糖 基 供
體 以 催 化 葡 萄 糖 基 轉 移 至 其 他 糖 類 之 反 應；

(2) 熱 安 定 性

當 於 pH 7 . 0 下 培 養 1 小 時 時 ， 安 定 之 溫 度 可 達 至
約 6 0 °C ； 及

(3) 部 份 胺 基 酸 序 列

具 有 選 自 SEQ ID NO : 1 、 SEQ ID
NO : 2 或 SEQ ID NO : 3 之 胺 基 酸 序 列 以 充 作
部 份 胺 基 酸 序 列

SEQ ID NO:1:
Ala Asn Lys Thr Lys
1 5

SEQ ID NO:2:
Glu Gln Glu Glu Phe
1 5

SEQ ID NO:3:
Asn Tyr Asp Tyr Tyr
1 5

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

2 . 如申請專利範圍第 1 項之海藻糖磷酸化酶，其具有下述之理化性質：

(1) 分子量

88,000 ± 5,000 道爾吞 (daltons)

，根據 SDS - 聚丙烯醯胺凝膠電泳 (SDS - PAGE) ；

(2) 最適溫度

約 70 °C , 當於 pH 7 . 0 下培養 30 分鐘時

；

(3) 最適 pH

約 7 . 0 - 7 . 5 , 當於 60 °C 下培養 30 分鐘時 ； 及

(4) pH 安定性

安定於 pH 約 6 . 0 至 9 . 0 , 當於 4 °C 下培養 24 小時。

3 . 如申請專利範圍第 1 或 2 項之海藻糖磷酸化酶，其具有選自 SEQ ID NO : 4 或其變異體之胺基酸序列，於該變異體中 1 或多個 SEQ ID NO : 4 之胺基酸殘基係經刪除、以不同之胺基酸加以取代、或 1 或多個胺基酸係加入至 SEQ ID NO : 4 之胺基酸序列中。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

SEQ ID NO:4:

Ala	Asn	Lys	Thr	Lys	Lys	Pro	Ile	Tyr	Pro	Phe	Glu	Asp	Trp	Val	Ile
1				5					10					15	
Arg	Glu	Thr	Gln	Phe	Ser	Ile	Asp	Thr	Asn	Tyr	Arg	Asn	Glu	Thr	Ile
			20					25					30		
Phe	Thr	Leu	Ala	Asn	Gly	Tyr	Ile	Gly	Met	Arg	Gly	Thr	Phe	Glu	Glu
		35					40					45			
Arg	Tyr	Ser	Gly	Pro	Lys	Asn	Thr	Ser	Phe	Asn	Gly	Thr	Tyr	Ile	Asn
	50					55				60					
Gly	Phe	Tyr	Glu	Ile	His	Asp	Ile	Val	Tyr	Pro	Glu	Gly	Gly	Tyr	Gly
65					70					75					80
Phe	Ala	Lys	Ile	Gly	Gln	Thr	Met	Leu	Asn	Val	Ala	Asp	Ser	Lys	Ile
				85					90					95	
Ile	Lys	Leu	Tyr	Val	Asp	Gly	Glu	Glu	Phe	Asp	Leu	Leu	Gln	Gly	Lys
			100					105					110		
Ile	Leu	Phe	Tyr	Glu	Arg	Val	Leu	Asp	Met	Lys	Lys	Gly	Phe	Val	Glu
		115					120					125			
Arg	Lys	Val	Lys	Trp	Glu	Ser	Pro	Thr	Gly	Lys	Ile	Leu	Glu	Val	Lys
	130					135					140				
Ile	Lys	Arg	Ile	Val	Ser	Leu	Asn	Arg	Gln	His	Leu	Ala	Ala	Ile	Ser
145					150					155					160
Phe	Thr	Met	Gln	Pro	Val	Asn	Phe	Thr	Gly	Lys	Ile	Arg	Phe	Val	Ser
				165					170					175	
Ala	Ile	Asp	Gly	Asn	Val	Ser	Asn	Ile	Asn	Asp	Ser	Glu	Asp	Val	Arg
			180					185					190		
Val	Gly	Ser	Asn	Leu	Lys	Gly	Lys	Val	Leu	Lys	Thr	Ile	Asp	Lys	Ser
		195					200						205		
Val	Glu	Gly	Leu	Lys	Gly	Trp	Ile	Val	Gln	Lys	Thr	Gln	Lys	Ser	Asn
	210					215					220				
Phe	Ser	Tyr	Ala	Cys	Ala	Ile	Asp	Asn	Val	Leu	Val	Ala	Asp	Ser	Lys
225					230					235					240
Tyr	Glu	Val	Ser	Asn	Ser	Leu	Glu	Glu	Asp	Gly	Val	Lys	Val	Ile	Val
				245					250					255	
Asp	Leu	Glu	Ala	Glu	Lys	Gly	Thr	Ser	Tyr	Thr	Leu	Asn	Lys	Phe	Ile
			260					265					270		
Ser	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Lys	Asp	Phe	Asp	Glu	Asn	Lys	Leu	Val	Ala	Leu
		275					280					285			
Ala	Leu	Glu	Glu	Ile	Glu	Lys	Ala	Lys	Asn	Asp	Gly	Phe	Glu	Thr	Ile
	290					295					300				
Glu	Lys	Glu	Gln	Glu	Glu	Phe	Leu	Asn	Ser	Phe	Trp	Lys	Asp	Ala	Asp
305					310					315					320
Val	Ile	Ile	Glu	Gly	Asp	Lys	Ala	Leu	Gln	Gln	Gly	Ile	Arg	Phe	Asn
				325					330					335	
Glu	Phe	His	Leu	Leu	Gln	Ser	Val	Gly	Arg	Asp	Gly	Lys	Thr	Asn	Ile
			340					345					350		
Ala	Ala	Lys	Gly	Leu	Thr	Gly	Gly	Gly	Tyr	Glu	Gly	His	Tyr	Phe	Trp
		355					360					365			
Asp	Ser	Asp	Ile	Tyr	Ile	Met	Pro	Phe	Phe	Leu	Tyr	Thr	Lys	Pro	Glu
	370					375					380				
Ile	Ala	Lys	Ala	Leu	Val	Met	Tyr	Arg	Tyr	Asn	Leu	Leu	Asp	Ala	Ala
385					390					395					400
Arg	Ser	Arg	Ala	Lys	Glu	Leu	Gly	His	Lys	Gly	Ala	Leu	Tyr	Pro	Trp
				405					410					415	

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

Arg Thr Ile Asp Gly Pro Glu Cys Ser Ala Tyr Phe Pro Ala Gly Thr
 420 425 430
 Ala Gln Tyr His Ile Asn Ala Asp Ile Val Tyr Ala Leu Lys Arg Tyr
 435 440 445
 Val Glu Ala Thr Asn Asp Val Asp Phe Leu Tyr Asp Tyr Gly Cys Glu
 450 455 460
 Ile Leu Phe Glu Thr Ala Arg Phe Trp Glu Asp Leu Gly Ala Tyr Ile
 465 470 475 480
 Pro Leu Lys Gly Asn Lys Phe Cys Ile Asn Cys Val Thr Gly Pro Asp
 485 490 495
 Glu Tyr Thr Ala Leu Val Asp Asn Asn Ala Tyr Thr Asn Tyr Met Ala
 500 505 510
 Lys Met Asn Leu Glu Tyr Ala Tyr Asp Ile Ala Asn Lys Met Lys Lys
 515 520 525
 Glu Val Pro Gln Lys Tyr Gln Lys Val Ala Ser Lys Leu Asn Leu Lys
 530 535 540
 Asp Glu Glu Ile Val Ala Trp Lys Lys Ala Ala Asp Asn Met Tyr Leu
 545 550 555 560
 Pro Tyr Ser Lys Glu Leu Asp Ile Ile Pro Gln Asp Asp Ser Phe Leu
 565 570 575
 Tyr Lys Glu Arg Ile Thr Val Asp Glu Ile Pro Glu Asp Gln Phe Pro
 580 585 590
 Leu Leu Leu His Trp His Tyr Leu Asn Ile Tyr Arg Tyr Gln Ile Cys
 595 600 605
 Lys Gln Pro Asp Val Leu Leu Leu Met Phe Leu Gln Arg Glu Lys Phe
 610 615 620
 Thr Lys Asp Glu Leu Lys Lys Asn Tyr Asp Tyr Tyr Glu Pro Ile Thr
 625 630 635 640
 Thr His Asp Ser Ser Leu Ser Pro Ala Ile Phe Ser Ile Leu Ala Asn
 645 650 655
 Glu Ile Gly Tyr Thr Asp Lys Ala Tyr Lys Tyr Phe Met Met Thr Ala
 660 665 670
 Arg Met Asp Leu Asp Asp Tyr Asn Asp Asn Val Lys Asp Gly Ile His
 675 680 685
 Ala Ala Ser Met Ala Gly Thr Trp Ser Ala Val Val Asn Gly Phe Gly
 690 695 700
 Gly Met Arg Val Tyr Thr Asn Glu Leu His Phe Glu Pro Arg Leu Pro
 705 710 715 720
 Lys Glu Trp Asn Leu Leu Ser Phe Asn Val Arg Tyr Lys Gly Arg Lys
 725 730 735
 Ile Asn Val Lys Leu Thr Lys Glu Asn Val Val Phe Ala Leu Leu Glu
 740 745 750
 Gly Glu Pro Ile Glu Ile Tyr Tyr Phe Asp Lys Lys Ile Leu Leu Glu
 755 760 765
 Lys Gly Glu Ile Lys.
 770

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

4. 一種 D N A，其編碼申請專利範圍第 1 項之海藻糖磷酸化酶。

5. 如申請專利範圍第 4 項之 D N A，其具有選自 S E Q I D N O : 5 或其互補序列之核苷酸序列：

SEQ ID NO:5:										
GCCAACAAAA	CGAAGAAACC	AATTTACCCT	TTTGAAGATT	GGGTTATAAG	AGAGACGCAG					60
TTTAGTATAG	ATACTAACTA	TAGAAATGAA	ACTATTTTTA	CTTTAGCAAA	TGGATATATT					120
GGAATGAGAG	GAACCTTTTGA	GGAAAGATAT	TCAGGGCCTA	AAAATACTTC	TTTTAATGGG					180
ACGTATATCA	ATGGGTTTTTA	TGAAATACAC	GATATAGTTT	ACCCTGAAGG	GGGATATGGT					240
TTTGCAAAAA	TAGGGCAGAC	GATGCTAAAT	GTTGCTGATA	GCAAAATAAT	AAAATTATAT					300
GTAGATGGGG	AAGAGTTTGA	TTTGTTACAA	GGGAAAATCC	TCTTTTATGA	GAGAGTACTT					360
GACATGAAGA	AAGGTTTTGT	AGAAAGAAAA	GTAATAATGGG	AATCCCTTAC	AGGAAAAATT					420
TTAGAGGTAA	AAATAAAGAG	AATTGTATCA	TTAAATAGAC	AACATTTAGC	GGCGATTTCT					480
TTTACTATGC	AACCTGTAAA	TTTTACCGGA	AAAATTAGAT	TTGTTTCCGC	TATTGACGGA					540
AATGTTTCAA	ATATAAATGA	TAGTGAAGAT	GTAAGAGTAG	GGTCAAATTT	AAAAGGAAAG					600
GTTTTAAAGA	CTATAGATAA	AAGTGTAGAG	GGTTTAAAAG	GGTGGATTGT	TCAAAAGACA					660
CAAAAGAGCA	ATTTCTCCTA	TGCTTGCGCG	ATAGACAATG	TATTAGTGGC	AGATAGCAAA					720
TATGAAGTCT	CAAATAGTTT	AGAAGAAGAT	GGAGTAAAAG	TAATTGTAGA	TCTAGAGGCT					780
GAAAAAGGCA	CCTCATACAC	TTTGAATAAA	TTTATTTTCT	ATTACACTTC	AAAGGATTTT					840
GATGAAAATA	AATTGGTTGC	TCTTGCTTTA	GAGGAAATAG	AAAAAGCCAA	AAATGACGGC					900
TTTGAAACGA	TAGAAAAAGA	GCAGGAAGAA	TTTTTGAATT	CTTTTGGGAA	AGATGCTGAT					960
GTAATCATAG	AAGGAGATAA	AGCTCTGCAG	CAAGGCATAC	GCTTTAATGA	ATTTTCATCTA					1020
CTTCAATCTG	TCGGAAGAGA	TGGAAAGACA	AATATTGCAG	CAAAAGGGCT	GACTGGAGGA					1080
GGTTATGAAG	GCCATTATTT	TTGGGATTCT	GATATCTATA	TAATGCCCTT	CTTTCTTTAT					1140
ACAAAGCCTG	AAATTGCAAA	AGCTTTGGTA	ATGTACAGGT	ATAATCTTTT	GGATGCAGCA					1200
AGATCCAGGG	CAAAGGAATT	AGGTCACAAA	GGAGCTTTGT	ATCCTTGGAG	AACGATAGAT					1260
GGTCCTGAAT	GTTCTGCTTA	CTTTCCAGCT	GGTACGGCAC	AGTATCACAT	AAATGCTGAT					1320
ATAGTTTATG	CTTTGAAAAG	ATATGTAGAA	GCGACGAATG	ACGTGGATTT	TCTTTATGAC					1380
TACGGTTGTG	AAATATTATT	TGAAACTGCA	AGATTTTGGG	AAGATTTAGG	AGCGTATATT					1440
CCTCTTAAGG	GCAATAAATT	CTGCATAAAC	TGTGTCACCTG	GTCCGGATGA	GTATACGGCA					1500
TTAGTTGACA	ATAACGCTTA	TACCAATTAT	ATGGCGAAAA	TGAATTTGGA	ATATGCCTAT					1560
GACATTGCAA	ACAAAATGAA	AAAAGAAGTG	CCTCAAAAAT	ATCAAAAAGT	CGCTTCTAAA					1620
CTAAATCTAA	AGGATGAAGA	AATTGTTGCG	TGGAAAAAAG	CTGCTGACAA	TATGTACCTT					1680
CCTTATTCAA	AAGAACTTGA	TATTATACCA	CAGGATGACA	GTTTTTTTGT	TAAAGAAAGG					1740
ATAACAGTGG	ATGAAATACC	TGAGGACCAA	TTTCCACTTT	TATTGCACTG	GCATTACCTA					1800
AATATTTACA	GATATCAAAT	ATGCAAACAG	CCTGATGTGT	TGCTTTTGAT	GTTTTTACAG					1860
AGAGAAAAAT	TTACTAAAGA	TGAACTTAAA	AAGAATTACG	ATTATTATGA	ACCTATTACC					1920
ACTCACGACT	CCTCCTTGTC	GCCAGCTATA	TTTAGCATAC	TAGCCAATGA	AATAGGATAT					1980
ACTGACAAGG	CTTATAAATA	CTTTATGATG	ACTGCAAGAA	TGGATTTGGA	TGACTACAAT					2040
GACAAATGTTA	AGGACGGAAT	TCACGCTGCT	TCTATGGCAG	GGACATGGAG	CGCAGTTGTG					2100
AATGGTTTTG	GTGGAATGAG	GTTTATATA	AATGAACTGC	ATTTTGAGCC	GAGATTGCCA					2160
AAAGAATTGA	ATTTGCTCTC	TTTTAATGTG	AGATACAAAG	GGAGAAAAAT	AAATGTCAAA					2220
TTAACC AAAAG	AAAATGTTGT	GTTTGCATTA	TTAGAAGGAG	AGCCTATAGA	AATCTACTAC					2280
TTTGACAAAA	AAATTTTACT	TGAAAAAGGA	GAAATAAAG							2319

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

6 . 如申請專利範圍第 4 項之 D N A , 其中 1 或多個鹼基係以遺傳密碼子之簡併性被不同的鹼基所替換 , 並未改變該 D N A 所編碼的胺基酸序列。

7 . 如申請專利範圍第 4 項之 D N A , 其係已引入至可自行複製之載體中。

8 . 如申請專利範圍第 4 項之 D N A , 其係已引入至適當的宿主中。

9 . 一種製造申請專利範圍第 1 項之海藻糖磷酸化酶之方法 , 其包含於營養培養基中培養能產製該海藻糖磷酸化酶之微生物以產製該海藻糖磷酸化酶 , 及自該培養物中收集所產製的海藻糖磷酸化酶。

1 0 . 如申請專利範圍第 9 項之方法 , 其中該微生物係熱厭氧菌 (Thermoanaerobium) 屬之微生物。

1 1 . 如申請專利範圍第 1 0 項之方法 , 其中該微生物係 Thermoanaerobium (熱厭氧菌) brockii 種之微生物。

1 2 . 如申請專利範圍第 9 項之方法 , 其中該微生物係轉形株 , 其係由將編碼申請專利範圍第 1 項之海藻糖磷酸化酶的 D N A 引入至適當的宿主中而製備。

1 3 . 如申請專利範圍第 9 項之方法 , 其中藉由 1 或多種選自下述之技術以收集所產製的海藻糖磷酸化酶 : 透析、鹽析、凝膠過濾、濃縮、分離沈降、離子交換層析、凝膠過濾層析、吸附層析、疏水層析、逆相層析、親和層析、凝膠電泳及電焦。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

1 4 . 一種製造含有 D - 葡萄糖基轉移醣的醣組成物之方法，其包含令申請專利範圍第 1 項之海藻糖磷酸化酶與 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸及 / 或其鹽及其他醣接觸以製造該 D - 葡萄糖基轉移醣之步驟。

1 5 . 如申請專利範圍第 1 4 項之方法，其中該 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸及 / 或其鹽係得自於令該海藻糖磷酸化酶於無機磷酸及 / 或其鹽之存在下與海藻糖接觸，令麥芽糖磷酸化酶於無機磷酸及 / 或其鹽之存在下與麥芽糖接觸，或令麴二糖磷酸化酶於無機磷酸及 / 或其鹽之存在下與麴二糖接觸。

1 6 . 如申請專利範圍第 1 4 項之方法，其中該其他醣係選自 D - 木糖、D - 半乳糖、D - 葡萄糖、D - 岩藻糖或 L - 岩藻糖。

1 7 . 如申請專利範圍第 1 4 項之方法，其包含選自管柱層析及利用酵母的醱酵法之技術，以充作移除葡萄糖基轉移醣以外的雜質之方法，該雜質係在酶催化反應期間所產生及 / 或殘存於反應混合物中。

1 8 . 一種製造海藻糖之方法，其包含於無機磷酸及 / 或其鹽之存在下令申請專利範圍第 1 項之海藻糖磷酸化酶及麥芽糖磷酸化酶與麥芽糖接觸以製造海藻糖，或於無機磷酸及 / 或其鹽之存在下令海藻糖磷酸化酶及麴二糖磷酸化酶與麴二糖接觸以製造海藻糖。

1 9 . 一種醣組成物，其包含藉由申請專利範圍第 1 4 項所述及之方法所產製的 1 或多種葡萄糖基轉移醣，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

其中該葡萄糖基轉移醣係選自葡萄糖基－D－木糖苷、葡萄糖基－D－半乳糖苷、海藻糖、葡萄糖基－D－果糖苷或葡萄糖基－L－岩藻糖苷之醣。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂