[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12N 9/18 (2006.01)
C12N 9/48 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03817916.4

[45] 授权公告日 2007 年 5 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 1316016C

[22] 申请日 2003.7.25 [21] 申请号 03817916.4
[30] 优先权
[32] 2002.7.26 [33] JP [31] 218956/2002
[86] 国际申请 PCT/JP2003/009467 2003.7.25
[87] 国际公布 WO2004/022733 日 2004.3.18
[85] 进入国家阶段日期 2005.1.26
[73] 专利权人 味之素株式会社
地址 日本东京都
[72] 发明人 横关健三 铃木园子 原诚一
片山智
[56] 参考文献
CN1355841A 2002.6.26
WO8806187A1 1988.8.25
WO9001555A1 1990.2.22
审查员 辜学英

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 曹 雯 王景朝

权利要求书 1 页 说明书 32 页 附图 3 页

[54] 发明名称

新的生成肽的酶、生成该酶的微生物和利用它们合成二肽的方法

[57] 摘要

来源于选至稳杆菌属和鞘氨醇杆菌属的微生物的酶，能从羧组分和胺组分来合成肽。 并且，提供了使用该酶从羧组分和胺组分来合成二肽的方法。本发明涉及不经过复杂合成方法就能简单、廉价和高产地生产肽的新酶。 更具体地，本发明提供从羧组分和胺组分催化肽生成反应的新的酶、产生该酶的微生物，及用该酶或微生物生产二肽的廉价方法。 从新近发现的属于稳杆菌属的微生物中发现了新的高效生成肽的酶，和发现了可廉价和简单地生产肽的方法。

1.一种酶，其来源于属于选自穗杆菌属（*Empedobacter*）和鞘氨醇杆菌属（*Sphingobacterium*）的微生物、并具有从羧基组分和胺组分生成肽的能力，其中所述羧基组分选自氨基酸酯和氨基酸酰胺，所述胺组分选自氨基酸、C-保护的氨基酸和胺。

2.一种酶，其能利用羧基组分和胺组分生成肽以及能在根据(i)至(iv)的条件下的二肽生成反应中，以 0.03mM/min 或更高的生产率生成 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺：

(i) 羧基组分是量为 100mM 的 L-丙氨酸甲酯氢氯化物；

(ii) 胺组分是量为 200mM 的 L-谷氨酰胺；

(iii) pH 是 9.0；和

(iv) 加入均质纯化的酶的量，作为蛋白质的量少于 0.61mg/ml，

其中所述羧基组分选自氨基酸酯和氨基酸酰胺，所述胺组分选自氨基酸、C-保护的氨基酸和胺。

3.根据权利要求 1 或 2 的酶，其中酶能在 pH6.5 至 10.5 的范围生成肽。

4.根据权利要求 1 或 2 的酶，其中酶能在 0 至 60℃的温度范围生成肽。

5.根据权利要求 1 或 2 的酶，其中丝氨酸抑制物、苯基甲磺酰氟化物不能抑制该酶，但 p-硝基苯基-p'-胍基苯甲酸盐能抑制该酶。

6.根据权利要求 1 或 2 的酶，其中该酶具有通过 SDS-凝胶电泳确定的约 75 千道尔顿的分子量，和通过凝胶过滤层析法确定的约 150 千道尔顿的分子量。

7.一种穗杆菌属和鞘氨醇杆菌属微生物，其能产生根据权利要求 1 或 2 的酶。

8.根据权利要求 7 的微生物，其中微生物选自短穗杆菌（*Empedobacter brevis*）菌株 FERM BP-8113 和鞘氨醇杆菌（*Sphingobacterium sp.*）菌株 FERM BP-8124。

9.生产二肽的方法，包括使用根据权利要求 1 或 2 的酶或含有该酶的物质，由羧基组分和胺组分生成二肽。

新的生成肽的酶、生成该酶的微生物和利用它们合成二肽的方法

技术领域

本发明涉及不经过复杂的合成方法就能简单、廉价和高产地生产肽的新酶。更具体地，本发明涉及从羧组分和胺组分催化肽生成反应的新酶、生产该酶的微生物，及用该酶或微生物生产二肽的方法。

背景技术

肽在制药领域、食品领域和多种其他领域中得到应用。例如，由于L-丙氨酰-谷氨酰胺比L-谷氨酰胺具有更高的稳定性和水溶性，因此其作为输液和无血清培养基的组分得到使用。

已知的生产肽的化学合成方法，总是不易进行。这种方法的已知实施例包括使用N-苯氧基羰基丙氨酸（在下文，“Z-丙氨酸”）和经保护的L-谷氨酰胺（参见Bull.Chem.Soc.Jpn.，34，739(1961)，Bull.Chem.Soc.Jpn.，35，1966(1962)）的方法，和使用Z-丙氨酸和经保护的L-谷氨酸-γ-甲酯（参见Bull.Chem.Soc.Jpn.，37，200(1964)）的方法，和使用Z-丙氨酸和非保护的谷氨酸（参见日本公开专利申请号H1-96194）的方法，以及包含源自作为原料的2-取代-丙酰卤化物的中间体的N-(2-取代)-丙酰谷氨酰胺衍生物的合成方法（参见公开专利申请号H6-234715）。

然而，这些方法都需要引入和消除保护基或使用光学活化中间体，就工业应用而言它们并不尽人意。

另一方面，使用酶的肽生成法的代表性公知的实施例包括：使用N-保护和C-非保护的羧基组分、和N-非保护、C-保护的胺组分的缩和反应（在下文，“反应1”），使用了N-保护、C-保护的羧基组分和N-非保护、C-保护的胺组分的取代反应（在下文，“反应2”）。反应1的实施例是由Z-天冬氨酸和苯基丙氨酸甲酯生成Z-天冬氨酰苯基丙氨酸甲酯的方法（参见日本公开专利申请号S53－92729），而反应2的实施例是由乙酰苯基丙氨酸乙酯和亮氨酸酰胺生成乙酰苯丙氨酰亮氨酸酰胺的方法（参见Biochemical J.,163,531(1977)）。据报道很少有关于

使用 N-非保护、C-保护的羧基组分的实施例方法的研究。国际公开专利 WO90/01555 描述了使用 N-非保护、C-保护的胺组分的取代反应（在下文，“反应 3”）的实施例。例如，可提及由精氨酸乙酯和亮氨酰胺生成精氨酰亮氨酸的方法。欧洲公开专利 EP278787A1 和 EP359399B1 描述了使用 N-非保护、C-保护的羧基组分和 N-非保护、C-非保护的胺组分的取代反应（在下文，“反应 4”）的实施例。例如，可提及由酪氨酸乙酯和丙氨酸生成酪氨酰丙氨酸的方法。

发明内容

在上述的反应 1 至 4 的方法中，最廉价的生产方法自然属于反应 4 的一类，其包含最少的保护基。

然而，现有技术（欧洲公开专利 EP278787A1）中反应 4 的实例有以下主要问题:

(1) 极慢的肽生产率，

(2) 肽产率低，

(3) 能生成的仅限于那些具有较高疏水性的氨基酸的肽，

(4) 所加入的酶量极大，和

(5) 需要衍生于霉菌、酵母或植物的较昂贵的羧肽酶制剂。在反应 4 中，没有使用衍生于细菌或是酵母属的酵母之外的其他酵母的酶的已知方法，也没有生成丙氨酰谷氨酰胺和其他亲水性高的肽的已知方法。考虑到这种背景，需要发展工业上生产这些肽的廉价方法。

本发明的目的是提供新的不经过复杂合成方法就能简单、廉价和高产地生产肽的酶。更具体地，本发明的目的是提供新的从羧组分和胺组分催化肽生产反应的酶、生产该酶的微生物，和用该酶或微生物生产肽的廉价方法。

本发明的发明人从源自新近发现的、属于穗杆菌属（Empedobacter）等的细菌中找到了新的有效生产肽的酶，并完成本发明。

本发明如以下所述:

[1] 来自属于选自穗杆菌属和鞘氨醇杆菌属（Sphingobacterium）的酶，其具有由羧基组分和胺组分生成肽的能力。[2] 能由羧基组分和胺组分生成肽的酶，在条件(i)至(iv)下生成二肽的反应中，其能以

0.03mM/min 或更高的产率来生成 L-丙氨酰-谷氨酰胺;

(i)羧基组分是量为 100mM 的 L-丙氨酸甲酯氢氧化物;

(ii)胺组分是量为 200mM 的 L-谷氨酰胺;

(iii)pH 是 9.0; 和,

(iv)加入均质纯化的酶量,作为蛋白质少于 0.61mg/ml。

[3] 根据[1]或[2]的酶,其中作为底物的羧基组分包括氨基酸酯和氨基酸酰胺。

[4] 根据 [1]至[3] 任一项的酶,其中作为底物的胺组分包括任意一种氨基酸、C-保护的氨基酸和胺。

[5] 根据 [1]至[4] 任一项的酶,其中该酶在 pH6.5 至 10.5 的范围具有生成肽的能力。

[6] 根据 [1]至[5] 任一项的酶,其中该酶能在温度 0 至 60℃的范围具有生成肽的能力。

[7] 根据 [1]至[6] 任一项的酶,其中丝氨酸酶抑制物、苯基甲磺酰氟化物不能抑制该酶,但 p-硝基苯-p'-胍基苯甲酸盐能抑制该酶。

[8] 根据 [1]至[7] 任一项的酶,其中该酶具有通过 SDS-凝胶电泳确定的约 75 千道尔顿的分子量,和通过凝胶过滤层析法确定的约 150 千道尔顿的分子量。

[9] 一种微生物,能产生根据 [1]至[8] 任一项的酶。

[10] 根据[9]的微生物,其中,微生物是短穗杆菌(Empedobacter brevis)菌株 FERM BP-8113(保藏单位:独立行政法人产业综合技术研究所,国际专利微生物保藏中心,保藏单位地址:日本茨城县筑波市东 1-1-1,中央第 6, 国际保藏提交日期:2002 年 7 月 8 日)或鞘氨醇杆菌菌株(Sphingobacterium sp.)FERM BP-8124(保藏单位:独立行政法人产业综合技术研究所,国际专利微生物保藏中心,保藏单位地址:日本茨城县筑波市东 1-1-1,中央第 6, 国际保藏提交日期:2002 年 7 月 22 日)。

[11] 生产二肽的方法,包括用根据[1]至 [8]任一项的酶或含有该酶的物质,由羧基组分和胺组分生成二肽。

附图简述

图 1 是表示本发明的酶的最适 pH 图;

图 2 是表示本发明的酶的最适温度图；和

图 3 是表示由 L-丙氨酸甲酯和 L-丙氨酰胺生成 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺的时程图。

实施发明的最佳方式

依次详细解释实施本发明的最佳方式:

(1) 能产生本发明中的酶的微生物，

(2) 微生物的培养，

(3) 酶的纯化，

(4) 酶性质，和

(5) 二肽合成方法。

(1) 能产生本发明中的酶的微生物

本发明中的酶可以是能由羧基组分和胺组分生成肽的任意的酶，对生产该酶的微生物没有特别的限制。在本说明书中，羧基组分指为肽健(-CONH-)提供羰基位点(CO)的组分，而胺组分指在肽键提供氨基位点(NH)的组分。另外，在本说明书中，除非另有特别说明，单独用到的术语“肽”指有至少一个肽键的聚合体。另外，在本说明书中，术语“二肽”指有一个肽键的肽。

能产生本发明中的酶的微生物实施例包括属于稳杆菌等属的细菌，其中具体实施例包括短稳杆菌菌株 ATCC 14234（菌株 FERM P-18545),和鞘氨醇杆菌菌株 FERM BP-8124.短稳杆菌菌株 ATCC 14234（菌株 FERM P-18545，菌株 FERM BP-8113）和鞘氨醇杆菌菌株 FERM BP-8124 是本发明的发明者筛选的，能由羧基组分和胺组分高收率地生产肽的微生物的研究结果。具有短稳杆菌菌株 ATCC 14234（菌株 FERM P-18545）或鞘氨醇杆菌菌株 FERM BP-8124 的类似细菌学特征的微生物，也是能产生本发明中酶的微生物。

短稳杆菌菌株 ATCC 14234（菌株 FERM P-18545）已于 2001 年 10 月 1 日在独立行政法人产业综合技术研究所，国际专利微生物保藏中心（日本茨城县筑波市东 1－1－1，中央第 6）得到保藏，保藏号为 FERM P-18545。根据布达佩斯条约的规定，该微生物随即于 2002 年 7 月 8 日提交到独立行政法人产业综合技术研究所，国际专利微生物保

藏中心，保藏号为 FERM BP-8113（微生物说明：Empedobacter brevis 菌株 AJ 13933）。

鞘氨醇杆菌菌株 AJ 110003 于 2002 年 7 月 22 日在独立行政法人产业综合技术研究所，国际专利微生物保藏中心得到保藏，保藏号为 FERM BP-8124。应当指出通过下列描述的鉴定实验，将菌株 AJ 110003 鉴定为上述的鞘氨醇杆菌菌株 。菌株 FERM BP-8124（保藏单位：独立行政法人产业综合技术研究所，国际专利微生物保藏中心，保藏单位地址：日本茨城县筑波市东 1－1－1，中央第 6，国际保藏日期：2002 年 7 月 22 日）是不形成孢子的和不活动的革兰氏阴性杆菌（0.7 至 0.8 × 1.5 至 2.0 微米（以下，“μm”））。其菌落呈圆形，边缘整齐，中央轻度隆起，表面光滑，淡黄色。该微生物在 30℃生长，呈过氧化氢酶阳性、氧化酶阳性和 OF 测试阴性（葡萄糖），根据这些性质将其确定为属于鞘氨醇杆菌属的细菌。而且，从如下性质：对硝酸还原作用阴性、不产吲哚、不利用葡萄糖产酸、精氨酸双水解酶阴性、尿素酶阳性、七叶苷水解阳性、明胶水解阴性、β-半乳糖苷酶阳性、葡萄糖同化阳性、L-阿拉伯糖同化阴性、D-甘露糖同化阳性、D-甘露醇同化阴性、N-乙酰-D-葡糖胺同化阳性、麦芽糖同化阳性、葡糖酸钾同化阴性、n-羊醋酸阴性、己二酸同化阴性、dL-苹果酸同化阴性、柠檬酸钠同化阴性、乙酸苯酯同化阴性和细胞色素氧化酶阳性，确定该微生物具有类似于多食鞘氨醇杆菌（Shingobacterium multivorum）或模式种（Sphingobacterium spiritivorum）的性质。而且，作为 16S rRNA 基因碱基序列同源性的分析结果，尽管与多食鞘氨醇杆菌显示出最高的同源性(98.8%)，但没有它完全匹配的菌株。因此将这种菌株确定为鞘氨醇杆菌菌株。

从上述的短穗杆菌或鞘氨醇杆菌的细菌中可分离和纯化获得本发明的酶。另外，基于所分离的酶，通过遗传工程技术也可获得本发明的酶以及产生该酶的微生物。即，基于所分离和纯化的酶，通过分离编码该酶的 DNA，随即将 DNA 导入合适的宿主中来表达 DNA。另外，基于编码从短穗杆菌中获得的本发明的酶的多核苷酸等等来生成探针，从其他微生物中也能获得能从羧基组分和胺组分生成肽的酶。在第二版《分子克隆》，冷泉港出版社（1989）和其他出版物中描述了多种基因重组技术。

(2) 微生物的培养

为了获得含有本发明中用到的酶的微生物的细胞培养物，只要在适宜的培养基中培养和生长微生物就足够了。对用于此目地的培养基，只要其允许微生物生长，就没有特殊的限制。该培养基可以是含有必要的普通碳源、氮源、磷源、硫源、无机离子和有机营养源的普通培养基。

例如，只要该微生物能利用，就可以使用任何碳源。能使用的碳源的具体实施例，包括糖类诸如葡萄糖、果糖、麦芽糖和直链淀粉，醇类诸如山梨醇、乙醇和甘油，有机酸及其盐诸如延胡索酸、柠檬酸、乙酸和丙酸，碳氢化合物诸如石蜡及其混合物。

能使用的氮源实施例包括有机酸铵盐诸如硫酸铵和氯化铵，有机酸铵盐诸如延胡索酸铵盐和柠檬酸铵盐，硝酸盐诸如硝酸钠和硝酸钾，有机氮化合物及其混合物诸如蛋白胨、酵母提取物、肉汁和玉米浆。

另外，培养基中用到的普通氮源，例如无机盐、痕量金属盐和维生素，也能适宜地被混合和使用。

对于培养条件，并没有特别的限制，例如，在需要条件下，将 pH 和温度分别适当地控制在 pH5 至 8 的范围以及温度 15 至 40℃的范围，在有氧条件下培养约 12 至 48 小时。

(3) 酶的纯化

本发明中纯化酶的实施例说明了从 Empedobacter brevis 中分离和纯化肽合成酶的方法。首先，通过用例如超声波破碎的物理方法、或用溶壁酶的酶催法来破碎细胞，及通过离心分离等等除去非溶性部分，从例如 Empedobacter brevis 菌株 FERM BP-8113（保藏单位：独立行政法人产业综合技术研究所，国际专利微生物保藏中心，保藏单位地址：日本茨城县筑波市东 1－1－1，中央第 6，国际保藏提交日期：2002 年 7 月 8 日）的细胞中制备微生物细胞提取物。

然后通过结合诸如阴离子交换层析法、阳离子交换层析法或凝胶过滤层析法的普通的蛋白质纯化法，从以上方式获得的细胞提取物中纯化肽合成酶。

在阴离子交换层析法中用到的载体的实施例是 Q-琼脂糖凝胶 HP（Amersham 制造）。当含有该酶的细胞提取物通过装填了载体的层析

柱时，在 pH8.5 条件下，从未被吸附的部分中回收酶。

阳离子交还层析法中用到的载体实施例是 MonoS HR（Amersham 制造）。将含有酶的细胞提取物通过装填了载体的层析柱，使酶吸附在载体（柱中）上，然后洗柱，用含有高盐浓度的缓冲液将酶洗脱。在那时，可将盐浓度依次提高或梯度提高。例如，就使用 MonoS HR 来说，以约 0.2 至 0.5M 浓度的 NaCl 洗脱吸附在载体上的酶。

以上述的方式纯化的酶，可通过凝胶过滤层析法等等得到进一步均质纯化。在凝胶过滤层析法中用到载体的实施例是 Sephadex 200pg（Amersham 制造）。

在先前纯化过程中，可根据下述的方法通过测定各部分（分留物）的肽合成活性确定含有该酶的部分。

(4) 本发明的酶性质

鉴于本发明中的酶是具有由羧基组分和胺组分合成肽能力的酶，下文基于其性质来说明本发明中优选的酶实施例。

将二肽生成率作为指标，具有下述能力的酶，是本发明的酶的一种优选方式。即，本发明的酶的一种优选方式是，在以下(i)至(iv)的二肽生成反应中，具有从羧基组分和胺组分生成肽能力的酶，和具有显示优选 0.03mM/min 或更高的、更优选 0.3mM/min 或更高、和特别优选 1.0mM/min 或更高的 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺的生成率的酶。二肽生成反应的条件如下：

(i) 羧基组分是 L-丙氨酸甲酯氢氯化物（100mM）；

(ii) 胺组分是 L-谷氨酰胺（200mM）；

(iii) pH 是 9.0；和，

(iv) 加入均质纯化的酶量，作为蛋白质少于 0.61mg/ml。

上述加入的酶量指添加到反应系统中的终酶量，以及添加 0.01mg/ml 或更多、及优选 0.02mg/ml 或更多的酶，都是指所希望的蛋白质的量。术语“蛋白质的量”指用蛋白测定 CCB 溶液（Nakarai 制造）和小牛血清蛋白用作标准物质的考马斯亮蓝比色法显示的值。

上述合成速率远远超过常规使用的酶的合成肽的速率，并且本发明的酶具有以极高速率来催化肽生成的能力。

作为测定酶活方法的具体实施例，通过使酶在含有作为底物的氨基酸酯和胺的硼酸盐缓冲液中反应、随即确定最后得到的肽数量，从

而测定酶活。作为更具体的实施例，将酶在含有 100mM L-丙氨酸甲酯和 200mM L-谷氨酰胺的 100mM 硼酸盐缓冲液(pH.9.0) 中、25℃下反应几分钟。

将本发明中用到的酶活单位确定为：1 单位(U)是在含有 100mM L-丙氨酸甲酯和 200mM L-谷氨酰胺的 100mM 硼酸盐缓冲液(pH.9.0)中，在 25℃的反应条件下，1 分钟生成 1 微摩尔肽的所需酶量。

另外，本发明的酶学特性的优选方式的实施例是：氨基酸酯和氨基酸酰胺都可以作为该酶的羧基组分底物。措词“氨基酸酯和氨基酸酰胺都可被用作为底物”意思是将至少一种类型的氨基酸酯和至少一种类型的氨基酸酰胺作为底物。另外，本发明的酶学特性的优选方式是：任意氨基酸、C-保护的氨基酸和胺都可以作为该酶的胺组分底物。术语“氨基酸、C-保护的氨基酸、胺都可被用底物”意思是将至少一种类型的氨基酸、至少一种类型的 C-保护的氨基酸和至少一种类型的胺作为底物。由于考虑到其作为底物的羧基组分或氨基组分的特异性范围宽，本发明的酶在能选择范围广的原料的意义上被优选，同时，是在能有利于成本和生产设备方面被工业生产优选。

羧基组分的具体实施例包括 L-氨基酸酯、D-氨基酸酯、L-氨基酸酰胺和 D-氨基酸酰胺。另外，氨基酸酯不仅包括对应于天然存在的氨基酸的氨基酸酯，也包括对应于非天然存在的氨基酸及其衍生物的氨基酸酯。进一步，氨基酸酯的实施例包括 α-氨基酸酯、β- 、γ- 、和 ω-氨基酸酯以及含有不同氨基结合位点的其它氨基酸酯等。代表性氨基酸酯实施例包括氨基酸的甲酯、乙酯、正丙酯、异丙酯、正丁酯、异丁酯和特丁酯，等等。

胺组分的具体实施例包括 L-氨基酸、C-保护的 L-氨基酸、D-氨基酸、C-保护的 D-氨基酸和胺。另外，胺的实施例不仅包括天然存在的胺，而且包括非天然存在的胺及其衍生物。另外，氨基酸实施例不仅包括天然存在的氨基酸，而且包括非天然存在的氨基酸或其衍生物。这些包括 α-氨基酸、β- 、γ- 、和 ω-氨基酸以及含有不同氨基结合位点的其它氨基酸。

另外，在其他方面，本发明的酶的一个优选方式是 pH 范围超过了、能催化肽生产反应的 6.5 至 10.5 范围的酶。本发明的酶因为能在宽 pH 范围下催化该反应在工业生产中可根据各种限制因素灵活调

节，因而是优选的。然而，更优选通过进一步调整所获得的酶的最适pH以使酶的催化性能最大化。

而且，本发明的酶的优选方式的另一个不同方面的实施例是：温度范围超过了酶能催化肽生成反应是在0至60℃范围中的酶。由于本发明的酶能在宽温度范围催化反应，在工业生产中可针对各种限制因素灵活调节，因而优选。然而，在肽的实际生产中，更优选通过进一步调整所获得的酶的最适温度而使用酶，以使酶的催化性能最大化。

(5) 二肽合成方法

根据本发明的二肽生产方法，包括使用有肽合成活性的酶从羧基组分和胺组分来合成肽或使用含酶物质作用于羧基组分或胺组分。

涉及将本发明中用到的酶或含酶物质作用于羧基组分和胺组分的方法，只要将酶或含酶物质、羧基组分和胺组分混合就足够了。具体而言，方法可用于将酶或含酶物质加入含有羧基组分和胺组分的溶液中并使之反应，在使用产生该酶的微生物的情况下，可以利用培养产生该酶的微生物，产生和富集存在于微生物或微生物培养肉汤中的酶，然后将羧基组分和胺组分加入培养肉汤中的方法。然后通过已建立的方法收集和纯化所合成的二肽。

术语“含酶物质”指含有酶，及其特殊形式的实例，包括产生酶的微生物培养物、从培养物中分离的微生物细胞、和处理过的微生物细胞产物。微生物培养物指通过培养微生物而获得的物质，更具体地，指微生物细胞、用于培养微生物的培养基、和由培养的微生物等产生的物质的混合物。另外，可洗涤微生物细胞，再使用洗过的微生物细胞。进一步，处理过的微生物细胞产物包括破碎的、裂解的或冻干的微生物细胞，也包括通过处理微生物细胞等等而回收的粗酶和通过纯化粗酶而获得的纯酶。可将通过多种类型的纯化方法获得的不完全纯酶用作纯酶，或可使用通过共价连接、吸附或包埋法固定的固定化酶。另外，由于取决于所用的微生物，在培养中一些微生物会部分裂解，在此情况下也可将培养液上清作为含酶物质使用。

另外，不但野生菌株，遗传重组菌株也可作为含酶的微生物使用。微生物不限于完整细胞，也可使用丙酮处理过的微生物细胞、冻干的微生物细胞或其他处理过的微生物细胞。也可使用通过共价连接、吸附、包埋或其他方法固定的固定化微生物细胞以及处理过的固定化微

生物细胞。

应当指出在使用培养物的情况下，所培养的微生物细胞或所处理的微生物细胞产物中的酶，在一些情况中不是参与肽的合成而是降解生成的肽，在这样情况下，视情况而定更优选加入类似于乙二胺四乙酸(EDTA)等金属蛋白酶抑制物。添加的量在 0.1mM 至 300mM 的范围内，优选 1mM 至 100mM。

使用的酶量或含酶物质应当是显示目标效果的量（在下文，“有效量”）。尽管所属领域的技术人员通过简单的、基本的实验就能容易地确定该有效量，但就使用酶而言，例如，其使用的量是约 0.01 至 100 单位(U)，然而对于使用洗涤过的微生物细胞，其使用的量是约 1 至 500g/L。

只要其能和作为胺组分的形式的其他底物的缩和反应来生成肽，可使用任意的羧基组分。羧基组分的实施例包括 L-氨基酸酯、D-氨基酸酯、L-氨基酸酰胺和 D-氨基酸酰胺。氨基酸酯不仅包括对应于天然存在的氨基酸的氨基酸酯，也包括对应于非天然存在的氨基酸及其其衍生物的氨基酸酯。进一步，氨基酸酯的实施例包括 α-氨基酸酯、β- 、γ- 、和 ω-氨基酸酯以及含有不同氨基结合位点的其它氨基酸酯等。代表性氨基酸酯实施例包括氨基酸的甲酯、乙酯、正丙酯、异丙酯、正丁酯、异丁酯和特丁酯等等。

所使用的胺组分只要其能和作为羧基组分的形式的其他底物通过缩和反应来生成肽即可。胺组分的实施例包括 L-氨基酸、C-保护的 L-氨基酸、D-氨基酸、C-保护的 D-氨基酸和胺。胺的实施例不仅包括天然存在的胺，而且包括非天然存在的胺及其衍生物。另外，氨基酸实施例不仅包括天然存在的氨基酸，而且包括非天然存在的氨基酸或其衍生物。这些包括 α-氨基酸、β- 、γ- 、和 ω-氨基酸以及含有不同氨基结合位点的其它氨基酸。

尽管缩和反应中的作为起始物质的羧基组分和胺组分，分别是 1mM 至 10M，优选 0.05 摩尔（在下文，“M”）至 2M，还是有一些情况：其优选加入胺组分至等量于或大于所加入的羧基组分。另外，对于在高浓度下抑制反应的底物，可在反应中调整其至不会导致抑制反应的浓度并依次增加底物。

允许肽生成的反应温度是 0 至 60℃，优选 5 至 40℃。允许肽生成

的反应 pH 是 6.5 至 10.5，优选 7.0 至 10.0。

实施例

以下通过本发明的实施例给出更详细的说明，但本发明不限于这些实施例。除了通过茚三酮染色薄膜层析法（定性）确定之外，为了检测产物，还可以通过以下的高效液体色谱以进行定量。柱：惰性 ODS-2(GL Science,Inc.制造)，洗脱液：含 5.0 mM 1-辛烷磺酸钠(pH2.1)的磷酸盐水溶液:甲醇=100:15 至 50，流速：1.0mL/min，检测：210 纳米（在下文，“nm”）。

实施例 1 微生物的培养(Empedobacter brevis 菌株 FERM BP-8113)

将 1 升（在下文，“L”）中含有 5 克（在下文，“g”）葡萄糖、5g 硫酸铵、1g 磷酸二氢钾、3g 磷酸氢二钾、0.5g 硫酸镁、10g 酵母提取物和 10g 蛋白胨的 50mL 培养基(pH6.2)转入 500mL Sakaguchi 烧瓶中，115℃灭菌 15 分钟。然后向上述培养基中接种一环于 30℃培养 16 小时后的 Empedobacter brevis 菌株 FERM BP-8113（保藏单位：独立行政法人产业综合技术研究所，国际专利微生物保藏中心，保藏单位地址：日本茨城县筑波市东 1－1－1，中央第 6， 国际保藏提交日期：2002 年 7 月 8 日），随即 30℃、120 振荡/min 振荡培养 16 小时。

（实施例 2）使用微生物细胞来合成肽

通过离心（10,000 转数每分钟（在下文，“rpm”），15 分钟）在实施例 1 中获得的培养肉汤而收集微生物细胞，随即以含 10mM EDTA 的 100mM 硼酸盐缓冲液(pH9.0)将其悬浮至 100g/L 的浓度。分别将 1mL 该悬浮液加到含 10mM EDTA、200mM 的下述羧基组分和 400mM 的下述氨基酸的 1mL(100mM ,pH9.0）硼酸盐缓冲液中，直至终体积为 2mL，在 18℃下进行反应 2 小时。表 1 表示所生成的肽的反应结果。

表 1

羧基组分	胺组分	生成的肽(mM)	羧基组分	胺组分	生成的肽(mM)

L-Ala-OMe	L-Leu	L-Ala-L-Leu	38.2	Gly-OMe	L-His	L-Gly-L-His	22.1
	L-Met	L-Ala-L-Met	68.3	L-Ser-OMe	L-Ser	L-Ser-L-Ser	29.0
	L-Phe	L-Ala-L-Phe	62.4	L-Val-OMe	L-Met	L-Val-L-Met	10.5
	L-Ser	L-Ala-L-Ser	51.3	L-Met-OMe	L-Phe	L-Met-L-Phe	28.5
	L-His	L-Ala-L-His	52.1	L-Thr-OMe	L-Leu	L-Thr-L-Leu	23.0
	L-Arg	L-Ala-L-Arg	72.1	L-Ile-OMe	L-Met	L-Ile-L-Met	8.3
	L-Gln	L-Ala-L-Gln	68.0				

氢氯化盐用于作所有的羧基组分

实施例 3 酶的纯化

在离心分离后既可在冰上也可于 4℃进行该步骤。以实施例 1 中相同的方式培养 Empedobacter brevis 菌株 FERM BP-8113（保藏单位：独立行政法人产业综合技术研究所，国际专利微生物保藏中心，保藏单位地址：日本茨城县筑波市东 1－1－1，中央第 6，国际保藏提交日期：2002 年 7 月 8 日），通过离心分离（10,000rpm，15 分钟）收集微生物细胞。用 50mM Tris-HCl 缓冲液(pH8.0)洗涤 16g 微生物细胞后，将其悬浮于 40 毫升（在下文，“ml”或“mL”）的相同缓冲液中，使其接受以 195 瓦的超声波破碎处理 45 分钟。然后离心（10,000rpm，30 分钟）超声波破碎液来除去破碎的细胞碎片，得到超声波破碎上清液。将超声波破碎上清液经 50mM Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)过夜透析，随即通过超速离心（50,000rpm，30 分钟）除去非可溶性部分而得到以上清液形式的可溶性部分。所得到的可溶性部分上样于以 Tris-HCl 缓冲液(pH 8.0)预平衡的 Q-琼脂糖凝胶 HP 柱（Amersham 制造），从非吸附部分中收集活性部分。将活性部分经 50mM 乙酸盐缓冲液(pH 4.5)过夜透析，随即通过离心分离（10,000rpm，30 分钟）除去非可溶性部分而得到以上清液形式的透析部分。然后将透析部分上样于以 50mM 乙酸盐缓冲液(pH4.5)预平衡的 Mono S 柱（Amersham 制造），以含 0 至 1M NaCl 线性浓度梯度的相

同缓冲液来洗脱酶．将活性部分中含有最低水平的杂蛋白质的部分上样于以含 1M NaCl 的 50mM 乙酸盐缓冲液(pH4.5)预处理的 Superdex 200pg 柱（Amersham 制造），并将含有 1M NaCl 的相同缓冲液(pH4.5)过柱以进行凝胶过滤，获得活性部分溶液．作为进行这些步骤的结果，根据电泳实验结果来确定本发明中用到的肽合成酶被均质纯化．在前述的纯化方法中的酶回收率是 12.2%，纯度是 707 倍．

实施例 4 酶分子量的测量

SDS-凝胶电泳法

将由实施例 3 的方法获得的 0.3 微克(ug)纯化的酶组分上样于聚丙稀酰胺电泳．将 0.3%(w/v)Tris、1.44%(w/v)甘氨酸和 0.1%(w/v) 十二烷基磺酸钠用来作电泳缓冲液，将具有 10 至 20%胶浓度的浓度梯度的凝胶（Multigel 10 至 20，Daiichi Pure Chemicals 制造）用来作聚丙稀酰胺凝胶，并且使用 Pharmacia 的分子量标志用来作分子量标志．电泳结束后，用考马斯亮蓝 R-250 染色凝胶，并在约 75 千道尔顿（在下文，“kDa”）分子量的位置检出单一的带．

凝胶过滤

将由实施例 3 的方法获得的纯化的酶组分上样于用含 1M NaCl 的 50mM 乙酸缓冲液(pH4.5)预平衡的 Superdex 200pg 柱（Amersham 制造），通过将含有 1M NaCl 的相同缓冲液过柱来进行凝胶过滤，从而测定分子量．使用 Pharmacia 的分子量标志用作已知分子量的标准蛋白质来制备标准曲线．结果，该酶的分子量约为 150kDa．

基于 SDS-凝胶电泳和凝胶过滤的结果，显示该酶是具有分子量约 75kDa 的二体．

实施例 5 酶最适 pH

在由 L-丙氨酸甲酯氢氯化物和 L-谷氨酰胺生成的 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺的反应中，检验 pH 的影响．将乙酸盐缓冲液（pH3.9 至 5.4）、MES 缓冲液（pH5.4 至 6.4）、磷酸盐缓冲液（pH6.0 至 7.9）、硼酸盐缓冲液（pH7.8 至 9.3）、CAPS 缓冲液（pH9.3 至 10.7）和 K_2HPO_4-NaOH 缓冲液（pH10.8 至 11.6）作为缓冲液．将 1 微升(μl)从实施例 3（约 180U/ml）获得的 Mono S 酶部分加到 100μl 缓冲液中(100mM)，

其中每份缓冲液含 100mM L-丙氨酰胺甲酯、200mM L-谷氨酰胺和 10mM EDTA，并使其在 18℃下反应 5 分钟以确定反应中 pH 的影响。图 1 表示基于将使用硼酸盐缓冲液(pH9.3)的情况定值为 100%的结果。结果，最适酶 pH 是 8 至 9.5。

实施例 6 酶最适温度

在由 L-丙氨酸甲酯氢氯化物和 L-谷氨酰胺生成的 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺的反应中，检验温度的影响。将 1μl 从实施例 5 获得的等分量的相同酶部分加到 100μl 100mM 硼酸盐缓冲液(pH9.0)，该缓冲液含 100mM L-丙氨酰胺甲酯、200mM L-谷氨酰胺和 10mM EDTA，并使其在各个温度下反应 5 分钟以确定反应中温度的影响。图 2 表示基于将 34℃下的活性定值为 100%的结果。结果，最适酶温度是 30 至 40℃。

（实施例 7）酶抑制物

以 L-丙氨酸甲酯氢氯化物和 L-谷氨酰胺作为底物，检验在 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺的生产中的抑制物的影响。将 2μl 从实施例 5 获得的等分量的相同酶部分加到 50μl 的 100mM 硼酸盐缓冲液(pH9.0)中，该缓冲液含表 2 所示的 10mM 各种酶抑制物，并使其在 25℃下反应 5 分钟。应当指出，使用前将 o-二氮杂菲、苯基甲磺酰氟化物和 p-硝基苯-p'-胍基苯甲酸盐溶解于甲醇使浓度为 50mM。各个条件下的酶活表示为：把在缺乏酶抑制物时，合成的 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺定值为 100 的相对活性。结果如表 2 所示，在所检测的丝氨酸酶抑制物中，苯基甲磺酰氟化物不抑制该酶，但 p-硝基苯-p'-胍基苯甲酸盐抑制该酶。

表 2

酶抑制物		生产 L-Ala-L-Gln 的相对活性(%)
无		100
金属酶抑制物	EDTA	96
	o-二氮杂菲	96
SH 酶抑制物	N-乙基马来酰亚胺	110
	单碘醋酸盐	101
丝氨酸酶抑制物	苯基甲磺酰氟化物	115
	4-(2-氨乙酸)苯磺酰氟化物	75

	p-硝基苯-p'-脲基苯甲酸盐	0.1

实施例 8 由 L-丙氨酸甲酯和 L-谷氨酰胺来合成 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺

将在实施例 5 用到的 3μl 等分量的相同酶部分加到 100μl 的 100mM 硼酸盐缓冲液(pH9.0)，该缓冲液含 100mM L-丙氨酰胺甲酯氢氯化物、200mM L-谷氨酰胺和 10mM EDTA，并使其在 18℃下反应。结果如图 3 所示，在加入酶的批次可合成 83mM L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(L-Ala-L-Gln)，并且副产品 L-Ala-L-Ala-L-Gln 的浓度是 1.3mM。另一方面，在不加酶的批次很难观察到任何 L-Ala-L-Gln 的生成，并且在反应 120 分钟后，酶浓度仅仅约 0.07mM。

实施例 9 在 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺的生成中 L-谷氨酰胺浓度的影响

将在实施例 5 用到的 1μl 等分量的相同酶部分加到 100μl 的 100mM 硼酸盐缓冲液(pH9.0)，该缓冲液含 100mM L-丙氨酰胺甲酯氢氯化物、如图 3 所示浓度的 L-谷氨酰胺和 10mM EDTA，并使其在 18℃下反应 2 小时。结果如表 3 所示。

表 3

L-丙氨酸甲酯氢氯化物(mM)	L-谷氨酰胺(mM)	L-Ala-Gln(mM)
100	100	68.2
	110	72.1
	120	73.3
	130	75.1
	150	75.5
	200	82.0

实施例 10 酶底物特异性(1)

在以 L-氨基酸酯作为羧基组分的情况下检测酯特异性。将在实施例 5 用到的 2μl 等分量的相同酶部分加到 100μl 的 100mM 硼酸盐缓冲液(pH9.0)，该缓冲液含表 4 所示的 100mM 的羧基组分、200mM L-谷氨酰胺和 10mM EDTA，并使其在 25℃下反应 2 小时。表 4 所示反

应中的 L-Ala-L-Gln 生成量（表 4 中 HCl 代表氢氯化物）。

表 4

羧基组分	生成的 L-Ala-L-Gln(mM)
L-丙氨酸甲酯·HCl	84.3
L-丙氨酸乙酯·HCl	91.5
L-丙氨酸异丙酯·HCl	78.9
L-丙氨酸-t-丁酯·HCl	7.5

实施例 11 酶底物特异性(2)

在以 L-丙氨酸甲酯作为羧基组分和以多种 L-氨基酸作为胺组分的情况下检测肽的合成。将在实施例 5 用到的 2μl 等分量的相同酶部分加到 100μl 的 100mM 硼酸盐缓冲液(pH9.0)，该缓冲液含 100mM 的 L-丙氨酸甲酯氢氯化物、表 5 所示的 150mM 的 L-氨基酸和 10mM EDTA，并使其在 25℃下反应 3 小时。该反应中的各种肽生成量如表 5 所示。“+”标记指那些被确认生成却由于缺乏标准而不能得到量化的肽，同时“tr”指痕量。

表 5

胺组分	生成的肽(mM)		胺组分	生成的肽(mM)	
Gly	L-Ala-Gly	13.7	L-Asn	L-Ala-L-Asn	65.5
L-Ala	L-Ala-L-Ala	25.4	L-Gln	L-Ala-L-Gln	79.3
L-Val	L-Ala-L-Val	20.8	L-Tyr	L-Ala-L-Try	17.6
L-Leu	L-Ala-L-Leu	45.3	L-CySH	L-Ala-L-CySH	+
L-Ile	L-Ala-L-Ile	33.9	L-Lys	L-Ala-L-Lys	71.8
L-Met	L-Ala-L-Met	83.3	L-Arg	L-Ala-L-Arg	88.0
L-Phe	L-Ala-L-Phe	74.4	L-His	L-Ala-L-His	66.9
L-Trp	L-Ala-L-Trp	53.9	L-Asp	L-Ala-L-Asp	2.1
L-Ser	L-Ala-L-Ser	62.5	L-Glu	L-Ala-L-Glu	42.9
L-Thr	L-Ala-L-Thr	53.9	L-Pro	L-Ala-L-Pro	tr

实施例 12 酶底物特异性(3)

在以多种类型的 L-氨基酸甲酯作为羧基组分和以 L-谷氨酰胺作为胺组分的情况下检测肽的合成。将在实施例 5 用到的 2μl 等分量的相同酶部分加到 100μl 的 100mM 硼酸盐缓冲液(pH9.0)，该缓冲液含如表 6 所示的 100mM 的 L-氨基酸甲酯氢氯化物(AA-OMe HCl)、150mM 的 L-谷氨酰胺和 10mM EDTA，并使其在 25℃下反应 3 小时。表 6 所示该反应中的各种肽生成量。“+”标记指那些被确认生成却由于缺乏标准而不能得到量化的肽，同时“tr”指痕量。

此外，在使用 L-Trp-OMe 和 L-Tyr-OMe 的情况下，将 Tween-80 加到反应系统中直至 0.1%的终浓度。

表 6

羧基组分	生成的肽(mM)		羧基组分	生成的肽(mM)	
Gly-OMe	Gly-L-Gln	54.7	L-Tyr-OMe	L-Try-L-Gln	3.4
L-Ala-OMe	L-Ala-L-Gln	74.6	CySH-OMe	L-CySH-L-Gln	+
L-Val-OMe	L-Val-L-Gln	15.4	L-Lys-OMe	L-Lys-L-Gln	+
L-Leu-OMe	L-Leu-L-Gln	+	L-Arg-OMe	L-Arg-L-Gln	7.1
L-Ile-OMe	L-Ile-L-Gln	8.4	L-His-OMe	L-His-L-Gln	+
L-Met-OMe	L-Met-L-Gln	12.0	L-Asp-α-OMe	α-L-Asp-L-Gln	tr
L-Phe-OMe	L-Phe-L-Gln	0.9	L-Asp-β-OMe	β-L-Asp-L-Gln	tr
L-Trp-OMe	L-Trp-L-Gln	+	L-Glu-α-OMe	α-L-Glu-L-Gln	+
L-Ser-OMe	L-Ser-L-Gln	24.0	L-Glu-γ-OMe	γ-L-Glu-L-Gln	+
L-Thr-OMe	L-Thr-L-Gln	81.9	L-Pro-OMe	L-Pro-L-Gln	2.2
L-Asn-OMe	L-Asn-L-Gln	+			
L-Gln-OMe	L-Gln-L-Gln	0.3			

（氢氯化盐用于所有的羧基组分）

实施例 13 酶底物特异性(4)

在以多种 L-氨基酸甲酯作为羧基组分和多种 L-谷氨酰胺作为胺组分的情况下检测肽的合成。将在实施例 5 用到的 2μl 等分量的相同酶部分加到 100μl 的 100mM 硼酸盐缓冲液(pH9.0)，该缓冲液含如表 7 所示的 100mM 的 L-氨基酸甲酯氢氯化物(AA-OMe HCl)、如表 7 所示

的 150mM 的 L-氨基酸和 10mM EDTA，并使其在 25℃下反应 3 小时。表 7 所示该反应中的各种肽生成量。“tr”指痕量。此外，在使用 L-Trp-OMe 的情况下，将 Tween-80 加到反应系统中直至 0.1%的终浓度。“+”标记指那些被确认生成却由于缺乏标准而不能得到量化的肽。

表 7

羧基组分	胺组分	生成的肽 (mM)		羧基组分	胺组分	生成的肽(mM)	
Gly-OMe	L-CySH	Gly-L-CySH	45.6	L-Met-OMe	L-Ser	L-Met -L-Ser	12.8
	L-Arg	Gly-L-Arg	25.5		L-Met	L-Met -L-Met	25.0
	L-Phe	Gly-L-Phe	44.0		L-Phe	L-Met -L-Phe	34.0
	L-His	Gly-L-His	31.6	L-Ile-OMe	L-Ser	L-Ile-L-Ser	17.2
	L-Lys	Gly-L-Lys	9.8		L-Met	L-Ile -L-Met	10.0
	L-Ser	Gly-L-Ser	44.2		L-Phe	L-Ile -L-Phe	5.2
L-Thr-OMe	Gly	L-Thr-Gly	9.4	L-Arg-OMe	L-Ser	L-Arg -L-Ser	3.6
	L-Ala	L-Thr-L-Ala	9.4		L-Met	L-Arg -L-Met	0.7
	L-Val	L-Thr-L-Val	0.7		L-Phe	L-Arg -L-Phe	1.9
	L-Leu	L-Thr-L-Leu	28.4	L-Leu-OMe	L-Met	L-Leu -L-Met	12.2
	L-Met	L-Thr-L-Met	38.6	L-Trp-OMe	L-Met	L-Trp -L-Met	4.1
	L-Ser	L-Thr-L-Ser	58.2	L-Lys-OMe	L-Met	L-Lys -L-Met	6.8
L-Ser-OMe	L-Ser	L-Ser-L-Ser	38.0	L-His-OMe	L-Met	L-His -L-Met	6.5
	L-Met	L-Ser-L-Met	12.5	L-Asn-OMe	L-Glu	L-Asn -L-Glu	10.2
	L-Phe	L-Ser-L-Phe	20.3				
L-Val-OMe	L-Ser	L-Val-L-Ser	30.8				
	L-Met	L-Val-L-Met	10.3				
	L-Phe	L-Val-L-Phe	6.1				

氢氯化盐用于所有的羧基组分

实施例 14 酶底物特异性(5)

在以 L 或 D 型的多种氨基酸甲酯作为羧基组分，和 L 或 D 型的各种 L-氨基酸甲酯作为胺组分的情况下检测肽生产。将在实施例 5 用到的 2μl 等分量的相同酶部分加到 100μl 的 100mM 硼酸盐缓冲液(pH9.0)，该缓冲液含如表 8 所示的 100mM 的多种氨基酸甲酯氢氯化物(AA-OMe HCl)、如表 8 所示的 150mM 的多种氨基酸和 10mM EDTA，并使其在 25℃下反应 3 小时。该反应中的各种肽生成量如表 8 所示。“tr”指痕量。

表 8

羧基组分	胺组分	生成的肽	(mM)
D-Ala-OMe	L-Gln	D-Ala- L-Gln	69.3
D-Ala -OMe	L-Ser	D-Ala- L-Ser	20.3
D-Thr-OMe		D-Thr- L-Ser	1.0
D-Ser-OMe		D-Ser- L-Ser	3.3
D-Val-OMe		D-Val- L-Ser	0.6
D-Met-OMe		D-Met- L-Ser	5.1
L-Ala-OMe	D-Gln	L-Ala- D-Gln	0.3
L-Ala -OMe	D-Ser	L-Ala- D-Ser	5.4
L-Thr -OMe		L-Thr- D-Ser	6.9
L-Ser-OMe		L-Ser- D-Ser	16.2
L-Val-OMe		L-Val- D-Ser	1.4
L-Met-OMe		L-Met- D-Ser	1.9
D-Ala -OMe	D-Gln	D-Ala- D-Gln	tr
D-Ala -OMe	D-Ser	D-Ala- D-Ser	0.2
D-Thr -OMe		D-Thr- D-Ser	1.1
D-Ser -OMe		D-Ser- D-Ser	2.5
D-Val -OMe		D-Val- D-Ser	0.5
D-Met -OMe		D-Met- D-Ser	2.7

（氢氯化盐用于所有的羧基组分）

实施例 15 酶底物特异性(6)

在以多种 L-氨基酸酰胺作为羧基组分，和多种 L-氨基酸作为胺组分的情况下检测肽的合成。将在实施例 5 用到的 2μl 等分量的相同酶部分加到 100μl 的 100mM 硼酸盐缓冲液(pH9.0)，该缓冲液含如表 9 所示的 100mM 的 L-氨基酸酰胺盐(AA-NH_2HCl)、如表 9 所示的 150mM 的 L-氨基酸和 10mM EDTA，并使其在 25℃下反应 3 小时。该反应中的各种肽生成量如表 9 所示。

表 9

羧基组分	胺组分	生成的肽	(mM)
L-Phe-NH_2	L-Gln	L-Phe- L-Gln	0.2
L-Phe-NH_2	L-Ser	L-Phe- L-Ser	0.6
L-Ala-NH_2	L-Gln	L-Ala- L-Gln	7.6
L-Ala-NH_2	L-Met	L-Ala- L-Met	3.4
L-Ala-NH_2	L-His	L-Ala- L-His	3.9
L-Thr-NH_2	L-Gln	L-Thr- L-Gln	0.3

实施例 16 酶底物特异性(7)

在以多种 L-丙氨酸甲酯作为羧基组分和 C-保护的 L-氨基酸作为胺组分的情况下检测肽的合成。将在实施例 5 用到的 2μl 等分量的相同酶部分加到 100μl 的 100mM 硼酸盐缓冲液(pH9.0)，该缓冲液含如表 10 所示的 100mM 的 L-丙氨酸甲酯 (Ala-OMe HCl)、如表 10 所示的 150mM 的 L-氨基酸酰胺和 10mM EDTA，并使其在 25℃下反应 3 小时。表 10 所示该反应中的各种肽生成量。

表 10

羧基组分	胺组分	生成的肽	(mM)
L-Ala-OMe	Gly-NH_2	L-Ala- Gly-NH_2	7.4
	L-Ala-NH_2	L-Ala- L-Ala-NH_2	8.3
	L-Phe-NH_2	L-Ala- L-Phe-NH_2	12.2

实施例 17 酶底物特异性(8)

在以多种氨基酸甲酯作为羧基组分和甲胺作为胺组分的情况下检测肽的合成。将在实施例 5 用到的 2μl 等分量的相同酶部分加到 100μl 的 100mM 硼酸盐缓冲液(pH9.0),该缓冲液含如表 11 所示的 100mM 的氨基酸甲酯氢氯化物(AA-OMe HCl)、如表 11 所示的 150mM 的甲胺和 10mM EDTA，并使其在 25℃下反应 3 小时。该反应中的各种肽生成量如表 11 所示。

表 11

羧基组分	胺组分	生成的肽 (mM)	
Gly-OMe	甲胺	Gly-甲胺	1.1
L-Thr-OMe		L-Thr-甲胺	0.2
L-Ala-OMe		L-Ala-甲胺	0.3

实施例 18 酶底物特异性(9)

在以 β-氨基酸酯作为羧基组分或 β-氨基酸作为胺组分的情况下检测肽的合成。将在实施例 5 用到的 2μl 等分量的相同酶部分加到 100μl 的 100mM 硼酸盐缓冲液(pH9.0),该缓冲液含如表 12 所示的 100mM 的羧基组分、如表 12 所示的 150mM 的胺组分和 10mM EDTA，并使其在 25℃下反应 3 小时。该反应中的各种肽生成量如表 12 所示。“tr”指痕量。

表 12

羧基组分	胺组分	生成的肽 (mM)	
Gly-OMe	β-Ala	Gly-β-Ala	2.2
Gly-OMe	β-Phe	Gly-β-Phe	0.4
L-Ala-OMe	β-Ala	Ala-β-Ala	7.7
L-Ala-OMe	β-Phe	Ala-β-Phe	1.4
L-Thr-OMe	β-Ala	Thr-β-Ala	3.2
L-Thr-OMe	β-Phe	Thr-β-Phe	1.4
β-Ala-OMe	L-α-Ala	β-Ala-L-α-Ala	tr
β-Ala-OMe	β-Ala	β-Ala-β-Ala	0.2
β-Ala-OMe	L-Gln	β-Ala-L-Gln	0.6

β-Ala-OMe	L-Ser	β-Ala-L-Ser	3.2

氢氯化盐用于所有的羧基组分

实施例 19 酶底物特异性(10)

在以 L-氨基酸酯作为羧基组分和肽作为胺组分的情况下检测寡肽的合成。将在实施例 5 用到的 2μl 等分量的相同酶部分加到 100μl 的 100mM 硼酸盐缓冲液(pH9.0)，该缓冲液含如表 13 所示的 100mM 的羧基组分、如表 13 所示的 150mM 的胺组分和 10mM EDTA，并使其在 25℃下反应 3 小时。表 13 所示该反应中的各种肽生成量。结果，清楚地表明通过以肽作为胺组分，该酶不仅能生成二肽，而且能生成长链肽。

如前述的实施例 9 至 19 所示，确证了从 Empedobacter brevis 菌株 FERM BP-8113（保藏单位：独立行政法人产业综合技术研究所，国际专利微生物保藏中心，保藏单位地址：日本茨城县筑波市东 1－1－1，中央第 6， 国际保藏提交日期：2002 年 7 月 8 日）中获得的该酶具有极广泛的底物特异性。

表 13

羧基组分	胺组分	生成的肽	(mM)
L-Ala-OMe	L-Ala	L-Ala-L-Al	28.7
	L-Ala-L-Ala	L-Ala-L-Ala- L-Ala	57.5
	L-Ala-L-Ala- L-Ala	L-Ala-L-Ala- L-Ala- L-Ala	44.5
	L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala	L-Ala-L-Ala-L-Ala- L-Ala-L-Ala	34.8
	L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala	L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala	1.4*
	L-Ala-L-Gln	L-Ala-L-Ala-L-Gln	15.2
	Gly-L-Ala	L-Ala-Gly-L-Ala	25.9
	Gly-Gly	L-Ala-Gly-Gly	41.7
	L-His-L-Ala	L-Ala-L-His-L-Ala	55.9
	L-Leu-L-Ala	L-Ala-L-Leu-L-Ala	48.3
	L-Phe-L-Ala	L-Ala-L-Phe-L-Ala	49.7
	L-Phe-Gly	L-Ala-L-Phe-Gly	43.7
Gly-OMe	L-Ala-L-Tyr	Gly-L-Ala-L-Tyr	1.7

	Gly-L-Gln	Gly-Gly-L-Gln	7.2
	Gly-L-Tyr-L-Ala	Gly-Gly-L-Tyr-L-Ala	44.2
L-Thr-OMe	Gly-Gly	L-Thr-Gly-Gly	83.0

*: 由于 L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala 的溶解性低，因此在该反应系统中羧基使用 10mM 的浓度和胺组分使用 15mM 的浓度。其他条件与实施例中说明的相同。

实施例 20 与已知酶的催化肽生成能力的比较

将该酶的肽生成能力与已知酶进行比较。EP 278787A1 中描述的羧肽酶 Y 和 EP 359399B1 中描述的硫醇肽链内切酶（无花果蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶和木瓜凝乳蛋白酶）用来作已知酶，并且其以 Sigma 制造的纯化酶形式得到使用。实施例 3 中均质纯化的酶用来作本发明的酶源。将这些酶作为蛋白质按表 14 所示的量加到反应系统中。通过将酶加到含 100mM 的 L-丙氨酸甲酯和 200mM 的 L-谷氨酰胺的 100μl 硼酸盐缓冲液(pH9.0) 中并在 25℃反应来实施反应。此外，将溶于含 1mM EDTA 的 10mM 乙酸缓冲液(pH5.0)中的酶用作羧肽酶，同时将溶于含 2mM EDTA、0.1M KCl 和 5mM 二硫苏糖醇的 10mM 乙酸缓冲液(pH5.0)中的酶用作硫醇肽链内切酶。 表 14 所示通过这些酶的 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺生成率的比例。

结果，甚至在缺乏酶时也观察到极端痕量的 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺的生成，然而与没有加入酶的一批比较，在加入羧肽酶或硫醇肽链内切酶的一批中观察到生产率的轻度提高。相反，在加入该酶的一批中观察到压倒优势的更快比率的 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺的生成，并且其生成率比羧肽酶 Y 或硫醇肽链内切酶快约 5,000 至 100,000 倍。如以上所述，证实该酶不像现有技术中任何酶而有极快的肽合成速率。此外，与本发明的酶为分子量约 75,000 二聚体形成对比的是，由于据报道羧肽酶 Y 的分子量约是 61,000，同时据报道硫醇肽链内切酶的分子量约是 23,000 至 36,000，对于本发明的酶，每分子量的 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺产率大于实施例中所示的每单位分子量的产率。

表 14

酶	加入的酶量	L-Ala-L-Gln	每酶单位重量的

	(蛋白质 mg/ml)	产率(mM/min)	L-Ala-L-Gln 产率的比例
无酶	0	0.0006	
羧肽酶	0.61	0.0257	0.0191
无花果蛋白酶	2.60	0.0096	0.0017
木瓜蛋白酶	2.30	0.0106	0.0021
菠萝蛋白酶	2.80	0.0062	0.0010
木瓜凝乳蛋白酶	3.60	0.0100	0.0013
本发明的酶	0.02	4.4000	100.0

实施例 21 使用鞘氨醇杆菌 Sphingobacterium sp.微生物细胞生产 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺

将 1L 中含 5g 葡萄糖、5g 硫酸铵、1g 磷酸二氢钾、3g 磷酸氢二钾、0.5g 硫酸镁、10g 酵母提取物和 10g 蛋白胨的 50ml 培养基(pH7.0) 转入 500mL Sakaguchi 烧瓶中，115℃灭菌 15 分钟后用于培养 Sphingobacterium sp.菌株 FERM BP-8124（保藏单位：独立行政法人产业综合技术研究所，国际专利微生物保藏中心，保藏单位地址：日本茨城县筑波市东 1－1－1，中央第 6，国际保藏提交日期：2002 年 7 月 22 日）。然后向上述培养基中接种一环 Sphingobacterium sp.菌株 FERM BP-8124（保藏单位：独立行政法人产业综合技术研究所，国际专利微生物保藏中心，国际保藏提交日期：2002 年 7 月 22 日）在琼脂培养基（琼脂：20g/L，pH7.0）斜面上 30℃培养 24 小时后的培养物。每 1 升琼脂培养基中含 5g 葡萄糖、10g 酵母提取物、10g 蛋白胨和 5g NaCl。随即以 120 转/分钟于 30℃下振荡培养 20 小时。然后将 1ml 等分量的该培养基肉汤加到前述培养基（50ml/500ml Sakaguchi 烧瓶）中并于 30℃培养 18 小时。在完成培养之后，从培养肉汤中离心分离微生物细胞并按 100g/L 湿微生物细胞悬浮在含 10mM EDTA 的 0.1M 硼酸盐缓冲液中。然后将 0.1ml 等分量的含 10mM EDTA、200mM L-丙氨酰甲酯氢氯化物和 400mM L-谷氨酰胺的 100mM 硼酸盐缓冲液(pH9.0)加到 0.1ml 该微生物细胞悬浮液中，待到终体积 0.2ml 之后，使其在 25℃反应 120 分钟。此时 L-丙氨酰胺-L-谷氨酰胺的生成量是 62mM。

实施例 22 源自 Sphingobacterium sp.的酶纯化

下述离心分离后的步骤在冰上或4℃进行。按实施例21中相同方式培养Sphingobacterium sp.菌株FERM BP-8124（保藏单位：独立行政法人产业综合技术研究所，国际专利微生物保藏中心，保藏单位地址：日本茨城县筑波市东1－1－1，中央第6，国际保藏提交日期：2002年7月22日），并通过离心分离（10,000rpm，15分钟）收集微生物细胞。以20mM Tris-HCl缓冲液(pH7.6)洗涤2g微生物细胞之后，将其悬浮在8ml相同的缓冲液中并进行195W、45分钟的超声波破碎处理。然后离心（10,000rpm，30分钟）超声波破碎液来除去破碎的细胞碎片以得到超声波破碎上清液。将超声波破碎上清液经20mM Tris-HCl缓冲液(pH7.6)过夜透析，随即通过超速离心（50,000rpm，30分钟）除去非可溶性部分而得到以上清液形式的可溶性部分。所得到的可溶性部分上样于以Tris-HCl缓冲液(pH7.6)预平衡的Q-琼脂糖凝胶HP柱（Amersham制造），从非吸附部分中收集活性部分。将活性部分经20mM乙酸盐缓冲液(pH 5.0)过夜透析，随即通过离心分离（10,000rpm，30分钟）除去非可溶性部分而得到以上清液形式的透析部分。然后将透析部分上样于以20mM乙酸盐缓冲液(pH5.0)预平衡的SP-琼脂糖凝胶HP柱（Amersham制造），来获得含有以0至1M NaCl线性浓度梯度的相同缓冲液洗脱出来的酶的活性部分。

实施例23使用酶组分生产L-丙氨酰-L-谷氨酰胺

将实施例22中纯化的10μl等分量的SP-琼脂糖HP组分约27U/ml)加到含111mM L-丙氨酸甲酯氢氯化物、222mM L-谷氨酰胺和11mM EDTA的90μl的111mM硼酸盐缓冲液(pH9.0)中，并在25℃反应120分钟。结果，在添加酶的一批中生成了73mM的L-丙氨酰-L-谷氨酰胺。相反，在没有添加酶的一批中，很难观察到任何L-Ala-L-Glu的生成，并且在反应120分钟后产量仅仅约是0.07mM。

实施例24酶底物特异性(11)

对来源于Sphingobacterium sp.菌株FERM BP-8124（保藏单位：独立行政法人产业综合技术研究所，国际专利微生物保藏中心，保藏单位地址：日本茨城县筑波市东1－1－1，中央第6，国际保藏提交日期：2002年7月22日）的酶检验底物特异性。将100μl含有表15-1

至 15-4 中所示的 100mM 终浓度的多种羧基组分和 150mM 终浓度的多种胺组分的 100mM 硼酸盐缓冲液(pH9.0)、在实施例 22（反应液中添加 0.33 单位）纯化的 SP-琼脂糖 HP 组分酶和 10mM EDTA 在 25℃反应 1.5 小时。表 15 表示反应中各种肽生产量。“+”标记指那些被确认生成却由于缺乏标准而不能得到量化的肽，同时“tr”指痕量。此外，使用 L-Tyr-OMe 时则反应系统中加入 Tween-80 至终浓度 0.1%。另外，氢氯化物被用于所有的羧基组分。

表 15-1

羧基组分	胺组分	生成的肽	(mM)
L-Ala-OMe	Gly	L-Ala-Gly	11.1
	L-Ala	L-Ala-L-Ala	13.1
	L-Val	L-Ala-L-Val	10.9
	L-Leu	L-Ala-L-Leu	33.0
	L-Ile	L-Ala-L-Ile	24.7
	L-Met	L-Ala-L-Met	86.9
	L-Pro	L-Ala-L-Pro	1.5
	L-Phe	L-Ala-L-Phe	69.5
	L-Trp	L-Ala-L-Trp	46.0
	L-Thr	L-Ala-L-Thr	47.3
	L-Asn	L-Ala-L-Asn	52.3
	L-Tyr	L-Ala-L-Tyr	11.1
	L-CySH	L-Ala-L-CySH	+
	L-Lys	L-Ala-L-Lys	71.2
	L-Arg	L-Ala-L-Arg	72.2
	L-His	L-Ala-L-His	73.6
	L-Asp	L-Ala-L-Asp	2.3
	L-Glu	L-Ala-L-Glu	39.1
	L-Ser	L-Ala-L-Ser	43.8
	D-Ser	L-Ala-D-Ser	3.3
D-Ala-OMe	L-Ser	D-Ala-L-Ser	24.1

	D-Ser	D-Ala-D-Ser	5.5

表 15-2

羧基组分	胺组分	生成的肽 (mM)	
L-Thr-OMe	L-Gln	L-Thr-L-Gln	36.1
Gly-OMe		Gly-L-Gln	61.1
L-Ser-OMe		L-Ser-L-Gln	12.9
L-Val-OMe		L-Val-L-Gln	8.2
L-Met-OMe		L-Met-L-Gln	32.6
L-Ile-OMe		L-Ile-L-Gln	6.4
L-Arg-OMe		L-Arg-L-Gln	17.2
L-Tyr-OMe		L-Tyr-L-Gln	0.6
L-Pro-OMe		L-Pro-L-Gln	1.8
L-Phe-OMe		L-Phe-L-Gln	0.8
L-Gln-OMe		L-Gln-L-Gln	0.1
Asp-α-OMe		α-L-Asp-L-Gln	0.05

表 15-3

羧基组分	胺组分	生成的肽 (mM)	
L-Thr-OMe	Gly	L-Thr-Gly	0.4
	L-Ala	L-Thr-L-Ala	5.8
	L-Val	L-Thr-L-Val	1.3
	L-Leu	L-Thr-L-Leu	15.3
	L-Met	L-Thr-L-Met	28.9
Gly-OMe	L-Arg	Gly-L-Arg	17.9
	L-Phe	Gly-L-Phe	20.0
	L-His	Gly-L-His	36.2
	L-Lys	Gly-L-Lys	48.2

	L-Ser	Gly-L-Ser	53.8
L-Ser-OMe	L-Ser	L-Ser-L-Ser	9.9
	L-Met	L-Ser-L-Met	7.6
	L-Phe	L-Ser-L-Phe	4.3
L-Val-OMe	L-Ser	L-Val-L-Ser	31.9
	L-Met	L-Val-L-Met	6.8
	L-Phe	L-Val-L-Phe	1.0
L-Met-OMe	L-Ser	L-Met-L-Ser	25.3
	L-Met	L-Met-L-Met	28.4
	L-Phe	L-Met-L-Phe	8.9
L-Ile-OMe	L-Ser	L-Ile-L-Ser	17.3
	L-Met	L-Ile-L-Met	5.1
	L-Phe	L-Ile-L-Phe	1.5
L-Arg-OMe	L-Ser	L-Arg-L-Ser	2.2
	L-Met	L-Arg-L-Met	tr
	L-Phe	L-Arg-L-Phe	tr

表 15-4

羧基组分	胺组分	生成的肽 (mM)	
L-Ala-OMe	Gly 胺	L-Ala-Gly 胺	15.1
	L-Ala 胺	L-Ala-L-Ala 胺	9.2
	L-Phe 胺	L-Ala-L-Phe 胺	27.1
L-Ala-OMe	甲胺	L-Ala-甲胺	0.6
L-Thr-OMe		L-Thr-甲胺	0.3
Gly-OMe		Gly-甲胺	1.0
L-Ala 胺	L-Gln	L-Ala-L-Gln	0.3
	L-Met	L-Ala-L-Met	tr
	L-His	L-Ala-L-His	tr

实施例 25 酶底物特异性(12)

对来源于 Sphingobacterium sp.菌株 FERM BP-8124（保藏单位：独立行政法人产业综合技术研究所，国际专利微生物保藏中心，保藏单位地址：日本茨城县筑波市东 1－1－1，中央第 6，国际保藏提交日期：2002 年 7 月 22 日）的酶检验涉及寡肽产物的底物特异性。将 100μl 等分量的含有表 16 中所示的 100mM 终浓度的多种羧基组分和 150mM 终浓度的多种胺组分的 100mM 硼酸盐缓冲液(pH9.0)、在实施例 22（反应液中添加 0.33 单位）纯化的 SP-琼脂糖 HP 酶组分和 10mM EDTA 在 25℃反应 1.5 小时。表 16 表示反应中各种肽的合成量。此外，氢氯化物被用于所有的羧基组分。

表 16

羧基组分	胺组分	生成的肽 (mM)	
L-Ala-OMe	L-Ala	L-Ala-L-Ala	25.6
	L-Ala-L-Ala	L-Ala-L-Ala-L-Ala	41.1
	L-Ala-L-Ala-L-Ala	L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala	30.1
	L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala	L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala	22.8
	Gly-Gly	L-Ala-Gly-Gly	33.7
	Gly-Ala	L-Ala-Gly-L-Ala	35.1
	L-His-L-Ala	L-Ala-L-His-L-Ala	58.0
	L-Phe-Gly	L-Ala-L-Phe-Gly	34.0
	L-Leu-L-Ala	L-Ala-L-Leu-L-Ala	40.7
	L-Phe-L-Ala	L-Ala-L-Phe-L-Ala	24.8
L-Thr-OMe	Gly-Gly	L-Thr-Gly-Gly	8.4
Gly-OMe	L-Ala-L-Tyr	Gly-L-Ala-L-Tyr	0.6

实施例 26 酶底物特异性(13)

以如实施例 5 中用到的相同酶组分来进一步评定底物特异性。

羧基组分 (mM)	胺组分 (mM)	生成的肽 (mM)	反应时间 (hr)
H-Ala-OMe 50mM	H-p-F-Phe-OH 50mM	H-Ala-p-F-Phe-OH 21.9mM	3
H-Ala-OMe 40mM	H-Cl-F-Phe-OH 40mM	H-Ala-Cl-F-Phe-OH 20.8mM	3
H-Ala-OMe 40mM	H-p-NO_2-Phe-OH 40mM	H-Ala-p-NO_2-Phe-OH 27.5mM	3
H-Ala-OMe 100mM	H-t-Leu-OH 150mM	H-Ala-t-Leu-OH 0.4mM	3
H-Ala-OMe 20mM	H-2-Nal-OH 20mM	H-Ala-2-Nal-OH +	3
H-p-F-Phe-OMe 100mM	H-Gln-OH 150mM	H-p-F-Phe-H-Gln-OH tr	3
H-Cl-F-Phe-OMe 25mM	H-Gln-OH 50mM	H-Cl-F-Phe-H-Gln-OH tr	3
H-p-NO_2-Phe-OMe 40mM	H-Gln-OH 40mM	H-p-NO_2-Phe-H-Gln-OH 1.1mM	3
H-t-Leu-OMe 100mM	H-Gln-OH 150mM	H-t-Leu-H-Gln-OH tr	3
H-2-Nal-OMe 40mM	H-Gln-OH 40mM	H-2-Nal-H-Gln-OH tr	3
H-Aib-OMe 100mM	H-Gln-OH 150mM	H-Aib-H-Gln-OH 18.8mM	3
H-N-Me-Ala-OMe 100mM	H-Gln-OH 150mM	H-N-Me-Ala-H-Gln-OH 0.5mM	3
H-Aib-OMe 100mM	H-Phe-OH 150mM	H-Aib-Phe-OH 17.2mM	3
H-CHA-OMe 40mM	H-Phe-OH 40mM	H-CHA-Phe-OH +	3
H-N-Me-Ala-OMe 100mM	H-Phe-OH 150mM	H-N-Me-Ala-Phe-OH tr	3
H-Ala-OMe 100mM	H-Ser(tBu)-OH 150mM	H-Ala-Ser(tBu)-OH 48.8mM	2
H-Ser(tBu)-OMe 100mM	H-Gln-OH 150mM	H-Ser(tBu)-Gln-OH tr	2
H-Ala-OMe 100mM	H-Asp(OtBu)-OH 150mM	H-Ala-Asp(OtBu)-OH 62.6mM	2
H-Asp(OtBu)-OMe 100mM	H-Gln-OH 150mM	H-Asp(OtBu)-Gln-OH 0.9mM	2
H-Ala-OMe 100mM	H-Lys(Boc)-OH 150mM	H-Ala-Lys(Boc)-OH 51.0mM	2
H-Lys(Boc)-OMe 100mM	H-Gln-OH 150mM	H-Lys(Boc)-Gln-OH +	2

将含有表 17 中所示终浓度的各个羧基组分和胺组分的 100mM 硼酸盐缓冲液(pH9.0)组成的 100μl 反应液、酶（反应液中添加 0.1 单位）和 10mM EDTA 在 25℃按表 17 所示的反应时间进行反应。表 17 表示反应中各种肽生产量。“+”标记指那些被确认生成却由于缺乏标准而不能得到量化的肽，同时“tr”指痕量。

缩略语

H-Ala-OMe: L-丙氨酸甲酯氢氯化物

H-p-F-Phe-OMe: p-氟代-L-苯丙氨酸甲酯氢氯化物

H-Cl-F-Phe-OMe: p-氯代-L-苯丙氨酸甲酯氢氯化物

H-p-NO_2-Phe-OMe: p-硝代-L-苯丙氨酸甲酯氢氯化物

H-t-Leu-OMe: 叔-L-亮氨酸甲酯氢氯化物

H-2-Nal-OMe: 3-(2-萘基)-L-苯丙氨酸甲酯氢氯化物

H-Aib-OMe: α-氨基异丁酸甲酯氢氯化物

H-N-Me-Ala-OMe: N-甲基-L-苯丙氨酸甲酯氢氯化物

H-CHA-OMe: β-环己基-L-苯丙氨酸甲酯氢氯化物

H-Ser(tBu)-OMe: O-特-丁基-L-丝氨酸甲酯氢氯化物

H-Asp(OtBu)-OMe: L-天冬氨酸β-特-丁酯α-甲酯氢氯化物

H-Lys(Boc)-OMe: N-ε-特-丁氧基羰-L-赖氨酸甲酯氢氯化物

H-p-F-Phe-OH: p-氟代-L-苯丙氨酸

H-Cl-F-Phe-OH: p-氯代-L-苯丙氨酸

H-p-NO_2-Phe-OH: p-硝代-L-苯丙氨酸

H-t-Leu-OH: 叔-L-亮氨酸

H-2-Nal-OH: 3-(2-萘基)-L-丙氨酸

H-Gln-OH: L-谷氨酰胺

H-Phe-OH: L-苯丙氨酸

H-Ser(tBu)-OH: O-叔-丁基-L-丝氨酸

H-Asp(OtBu)-OH: L-天冬氨酸β-特-丁酯

H-Lys(Boc)-OH: N-ε-叔-丁氧基羰-L-赖氨酸

实施例27 酶底物特异性(14)

以如实施例26中的相同酶组分来评定涉及寡肽产物的底物特异性。将含有表18中所示终浓度的各个羧基组分和胺组分的100mM硼酸盐缓冲液(pH9.0)组成的100ul等分量的反应液、酶(表18描述加到反应液中的单位数量)和10mM EDTA在25℃反应3小时。表18表示反应中各种寡肽的合成量。"+"标记指那些被确认生成却由于缺乏标准而不能得到量化的肽,同时"tr"指痕量。应该指出氢氯化物被用于所有的羧基组分。

表18

羧基组分	胺组分	酶量(单位)	生成的肽 (mM)

Gly-OMe	L-Phe-L-Met	1.0	Gly-Phe-Met	13.3
L-Ala-OMe	L-Phe-L-Met	0.2	L-Ala-L-Phe-L-Met	+
L-Tyr-OMe	Gly-Gly-L-Phe-L-Met	1.0	L-Tyr-Gly-Gly-L-Phe-L-Met	2.7
L-Ala-OMe	Gly-Gly-L-Phe-L-Met	0.2	L-Ala-Gly-Gly-L-Phe-L-Met	+
Gly-OMe	Gly-L-Phe	0.1	Gly-L-Phe	17.3
L-Ala-OMe	Gly-L-Phe	0.1	L-Ala-Gly-L-Phe	+
D-Ala-OMe	Gly-L-Phe	0.1	D-Ala-Gly-L-Phe	Tr

工业实用性

本发明提供避免诸如引入和消除保护基的复杂合成方法，应用简单、廉价和高产地生产肽的新酶。使用本发明的酶使肽的高效工业化生产成为可能。

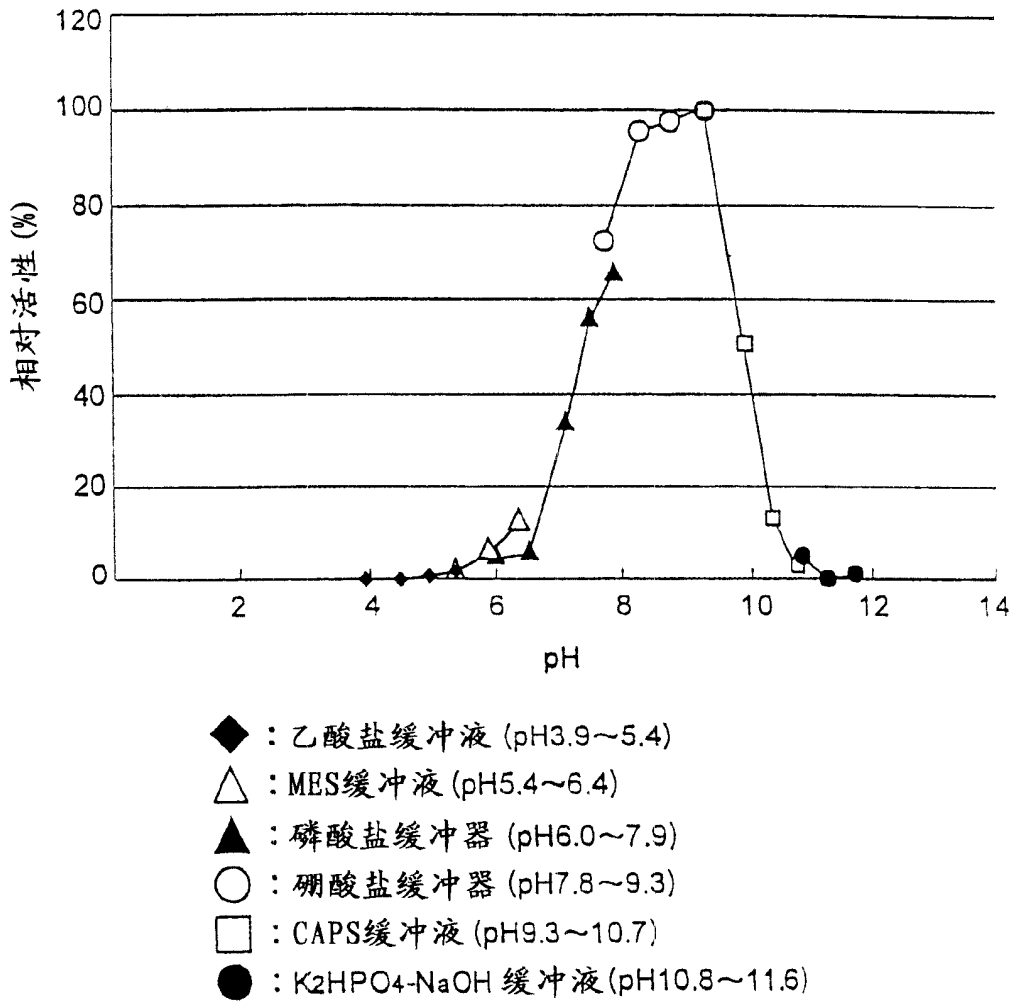

120
100
80
60
40
20
0
相对活性(%)
2
4
6
8
10
12
14
pH
◆：乙酸盐缓冲液(pH3.9～5.4)
△：MES缓冲液(pH5.4～6.4)
▲：磷酸盐缓冲器(pH6.0～7.9)
○：硼酸盐缓冲器(pH7.8～9.3)
□：CAPS缓冲液(pH9.3～10.7)
●：K2HPO4-NaOH缓冲液(pH10.8～11.6)

图 1

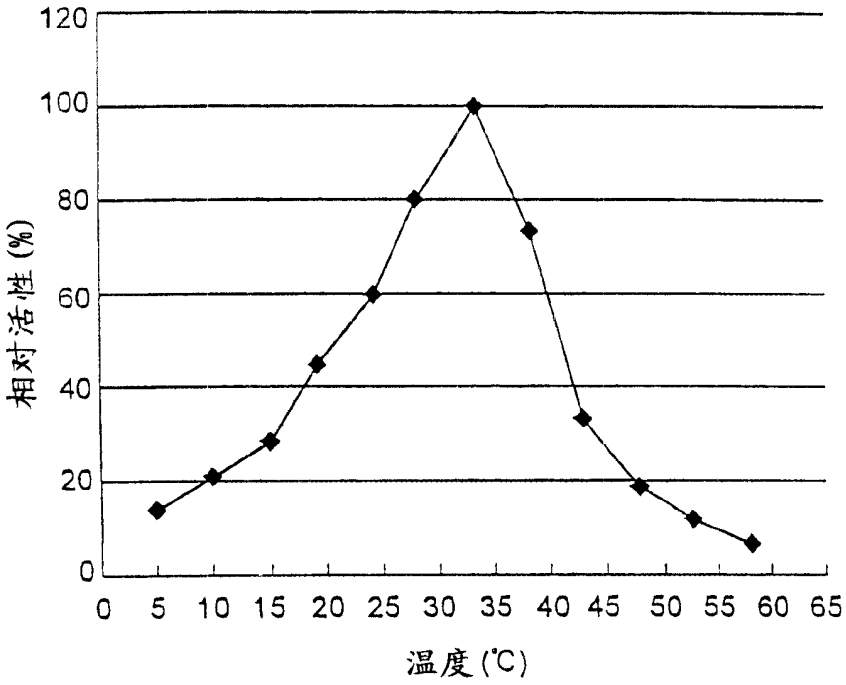


图 2

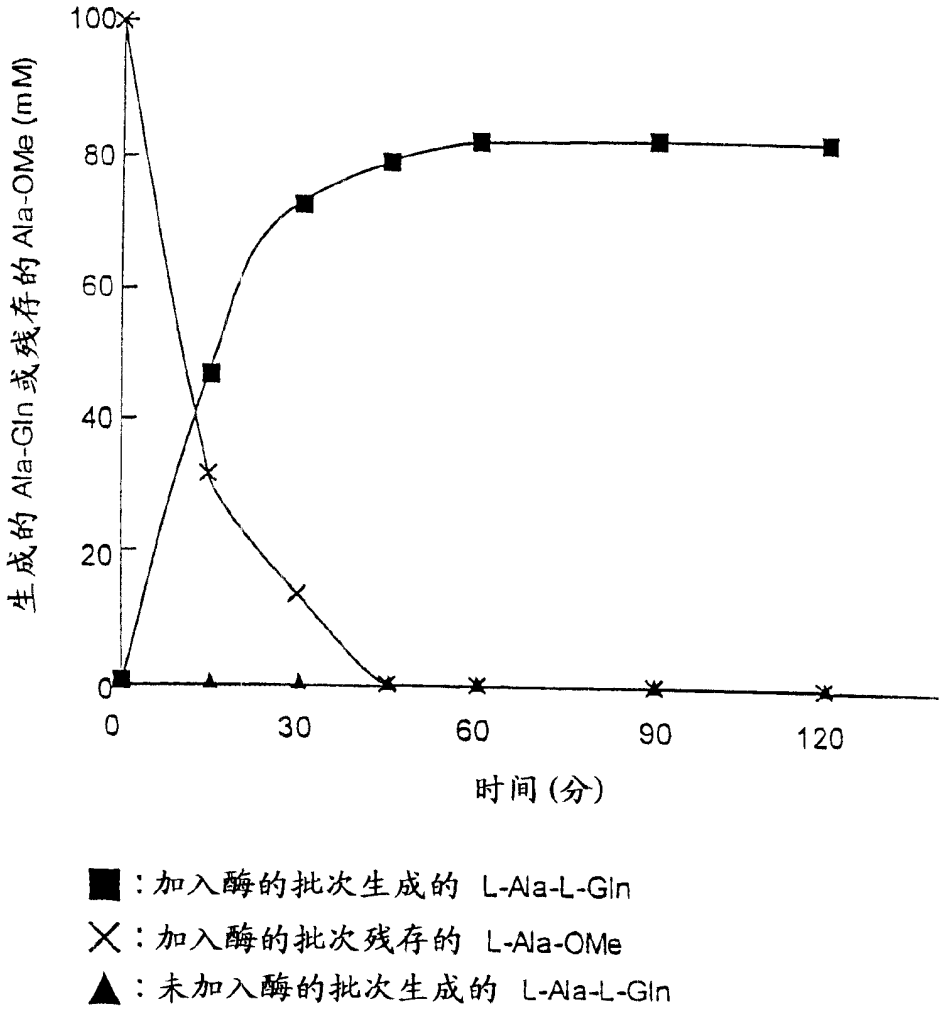

100
80
60
40
20
0
生成的 Ala-Gln 或残存的 Ala-OMe (mM)
0
30
60
90
120
时间 (分)
■：加入酶的批次生成的 L-Ala-L-Gln
╳：加入酶的批次残存的 L-Ala-OMe
▲：未加入酶的批次生成的 L-Ala-L-Gln

图 3