

申請日期	84年7月25日
案號	84107697
類別	C12N 9/64, 15/31, 15/52, C12P 21/02

86. 4. 23 修正
 年 月 日
 補充

418255
 418255

公告本

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

~~新 型~~

一、 發明 名稱 新型	中 文	自非還原醣釋出海藻糖之重組型對熱安定的酵素、彼之製法和用途
	英 文	Recombinant thermostable enzyme which releases trehalose from non-reducingsaccharide, its preparation and use
二、 發明人 創作	姓 名	(1) 三敏仁志 (2) 久保田倫夫 (3) 杉本利行
	國 籍	(1) 日本 (2) 日本 (3) 日本
	住、居所	(1) 日本國岡山縣岡山市桑野五二五番三—一〇二號 (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東陸六九五番四四號
三、申請人	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
	住、居所 (事務所)	(1) 日本國岡山縣岡山市下石井一丁目二番三號
	代 表 人 姓 名	(1) 林原健

418255

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
IPC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	1995 年 7 月 4 日	189760/1995	<input checked="" type="checkbox"/> 無主張優先權
日本	1995 年 4 月 11 日	109128/1995	<input checked="" type="checkbox"/> 無主張優先權
日本	1994 年 7 月 21 日	190180/1994	<input checked="" type="checkbox"/> 無主張優先權

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

有關微生物已寄存於: , 寄存日期: , 寄存號碼:

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

本發明的背景資料

本發明的領域

本發明是關於一種可自葡萄糖聚合度至少為3且末端帶有海藻糖構造的非還原醣釋出海藻糖之重組型對熱安定的酵素。

先前技藝的描述

海藻糖是由二分子葡萄糖靠其還原基鍵結而形成的雙醣，自然狀況下少量存在於真菌、藻類、昆蟲等。由於此分子內不具有還原基，即使與胺基酸類物質一起加熱，海藻糖並不會造成任何令人不悅的褐變反應，因此其可做為食品之甜味劑而不必擔心會有褐變和變質現象發生。由於海藻糖無法以傳統方式製得所需的量，因此很少做為食品甜味劑。

傳統方式可粗分為二大類，即第一種利用微生物細胞和第二種利用多酵素系統催化醣類。前者方法（參考刊載於日本專利公開公報 N o . 1 5 4 , 4 8 5 / 7 5 ）係培養細菌和酵母菌於營養培養基，然後從增殖細胞收集海藻糖。後者方法（參考刊載於日本專利公開公報 N o . 2 1 6 , 6 9 5 / 8 3 ）係以麥芽糖為受質，利用麥芽糖和海藻糖磷酸化酶的多酵素系統催化麥芽糖，然後從反應系統回收海藻糖。前者方法可促進微生物生長，但海藻糖於微生物內的含量最多為 1 5 w / w % 乾燥固體重（ d . s . b . ）。雖然後者方法相當容易分離海藻糖，但

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

五、發明說明(2)

理論上難以利用增加受質含量而增加海藻糖產率，因為本酵素反應本質上是二種不同酵素反應的平衡反應，此平衡點是傾向於形成葡萄糖磷酸鹽。

回顧以往，本發明者積極篩選可自澱粉類醣形成帶有海藻糖的醣類，他們自根瘤菌屬 (Rhizobium) 和分節芽胞桿菌屬 (Arthrobacter) 發現一種新型酵素，其可自葡萄糖聚合度至少為 3 的還原性澱粉類醣形成末端帶有海藻糖構造的非還原醣。此一酵素刊載於日本專利公開公報 No. 349, 216 / 93。同時他們發現：根瘤菌屬和分節芽胞桿菌屬產生的其他酵素可將這些非還原醣幾乎水解成海藻糖和葡萄糖和 / 或麥芽寡醣。

由上述微生物產生的酵素的最適溫度為 40 °C，因此當使用這些酵素以製造海藻糖時，會有熱安定性方面的困難。因為在此領域中認為：澱粉或澱粉類醣的澱粉化反應的建議溫度為超過 55 °C，因為當反應溫度低於 55 °C 時會發生細菌污染而降低反應混合物的酸鹼值和使酵素失去活性。因此相當大量的受質仍未被催化。當使用的酵素有較差的熱安定性時，必須小心控制酸鹼值，當酸鹼值降到相當低時，必須儘快加鹼至反應混合物內而增加其酸鹼值。

回顧以往，本發明者積極篩選具有酵素活性且對熱安定的酵素，他們自酸熱硫化葉菌 (Sulfolobus acidocaldarius) (ATCC 33909) 產生的酵素發現，即使於超過 55 °C 反應，本酵素仍不會失去活性。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(3)

它們可自葡萄糖聚合度至少為3且末端帶有海藻糖的非還原醣釋出海藻糖。然而這些微生物無法有效率生產這酵素，需要大規模培養以自非還原醣產生海藻糖。

最近，重組DNA技術有顯著進展。現今，即使酵素所有的胺基酸序列並未解讀，假如編碼此酵素的基因已被分離且鹼基序列被解讀，則可製備所需的酵素量。把可編碼此酵素的DNA嵌入載體內製備重組DNA，再把此重組DNA送入微生物或動植物細胞並培養其轉形物。因此，目前最急需要找到此對熱安定酵素的基因並解開其鹼基序列。

本發明的摘要

本發明的第一個目標是提供一種重組型對熱安定酵素，其可自葡萄糖聚合度至少為3且末端帶有海藻糖構造的非還原醣釋出海藻糖。

本發明的第二個目標是提供可編碼此重組型對熱安定酵素的DNA。

本發明的第三個目標是提供含有此DNA的可複製重組DNA。

本發明的第四個目標是提供一含有重組DNA的轉形物。

本發明的第五個目標是提供利用轉形物製備此重組型對熱安定酵素的步驟。

本發明的第六個目標是提供一酵素轉化方法，其可自

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(4)

葡萄糖聚合度至少為3且末端帶有海藻糖構造的非還原醣釋出海藻糖。

本發明的第一個目標係利用具有下列物化特性的重組型對熱安定酵素而達成：

(1) 作用機制

自葡萄糖聚合度至少為3且末端帶有海藻糖構造的非還原醣釋出海藻糖；

(2) 分子量

以硫酸十二酯鈉聚丙稀鹽胺凝膠電泳分析為
54000 - 64000道耳頓；

(3) 等電點

以等電電泳分析為5.6 - 6.6；

(4) 熱安定性

於pH 7.0水溶液、85℃加熱60分鐘仍
不會失去活性。

本發明的第二個目標獲得了一可編碼此重組型對熱安定酵素的DNA。

本發明的第三個目標獲得了包含一可自我複製載體和此重組型對熱安定酵素的可複製重組DNA。

本發明的第四個目標係利用將此可複製重組DNA送入適當宿主，製得轉形物而達成。

本發明的第五個目標係將此轉形物培養於營養培養基，從培養物中收集所形成的重組型對熱安定酵素而達成。

本發明的第六個目標係利用此重組型對熱安定酵素催

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

五、發明說明(5)

化非還原醣釋出海藻糖的酵素轉化方法而達成。

圖片的簡述

圖 1 為酸熱硫化葉菌 (A T C C 3 3 9 0 9) 產生的對熱安定酵素的最適溫度。

圖 2 為酸熱硫化葉菌 (A T C C 3 3 9 0 9) 產生的對熱安定酵素的最適酸鹼值。

圖 3 是酸熱硫化葉菌 (A T C C 3 3 9 0 9) 產生的對熱安定酵素的熱安定性。

圖 4 是酸熱硫化葉菌 (A T C C 3 3 9 0 9) 產生的對熱安定酵素的酸鹼值安定性。

圖 5 是根據本發明的重組 D N A p S U 1 8 的限制酶圖。

圖 6 是根據本發明的重組 D N A p S U 1 9 的限制酶圖。

本發明的詳細描述

根據本發明，此重組型對熱安定酵素可自葡萄糖聚合度至少為 3 且末端帶有海藻糖構造的非還原醣釋出海藻糖，即使於超過 55 °C 的溫度進行反應，本酵素仍未失去活性。

將可表現本酵素的 D N A 送入適當的可自我複製載體而形成可複製重組 D N A，然後將此可複製重組 D N A 送入本身不會產生本酵素但相當容易增殖的適當宿主內。

將根據本發明而可表現產生本酵素的 D N A 送入不會產生本酵素但容易增殖的適當宿主內。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明(6)

培養可產生本酵素的轉形物。

利用本製備方法培養轉形物以製造所需要的酵素含量

根據本發明的酵素轉化方法可將葡萄糖聚合度至少為3且末端帶有海藻糖構造的非還原糖轉化成含海藻糖和葡萄糖和/或麥芽寡糖的糖類組成物。

基於發現一種可自葡萄糖聚合度至少為3且末端帶有海藻糖構造的非還原糖釋出海藻糖的新型酵素而完成本發明。此一酵素是從酸熱硫化葉菌(ATCC 33909)的培養物中獲得。本發明者利用各種純化方法(主要技術是管柱層析法)將此酵素純化,然後研究其特性和性質發現:此酵素為一具有下列物化性質的胜肽:

(1) 作用機制

自葡萄糖聚合度至少為3且末端帶有海藻糖構造的非還原糖釋出海藻糖;

(2) 分子量

以硫酸十二酯鈉聚丙稀醯胺電泳分析為
54000-64000道耳頓;

(3) 等電點

以等電電泳分析為5.6-6.6;

(4) 最適溫度

於pH 6.0反應30分鐘其最適溫度約為
75°C;

(5) 最適酸鹼值

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明（7）

於 60 °C 反應 30 分鐘其最適酸鹼值為 5.5 - 6.0 ;

（6）熱安定性

於 pH 7.0 反應 60 分鐘其對熱穩定性可達 85 °C ;

（7）酸鹼值安定性

於 25 °C 反應 16 小時其對酸鹼穩定性可達 pH 5.5 - 9.5 .

以下的實驗將證明由酸熱硫化葉菌（ATCC 33909）產生的對熱安定酵素的物化特質。

實驗 1：純化酵素的製備

於 500 ml 錐瓶內加入 100 ml 液體培養基〔含 0.1 w/v % 多朊，0.1 w/v % 酵母萃取物，0.2 w/v % 硫酸銨，0.05 w/v % 磷酸二氫鉀，0.02 w/v % 七水合硫酸鎂，0.02 w/v % 氯化鉀和水〕，於 120 °C 消毒滅菌 20 分鐘。錐瓶冷卻後，取單一菌落的酸熱硫化葉菌（ATCC 33909）接種於液體培養基，於 75 °C 130 rpm 旋轉振盪培養 24 小時。取 5 升新鮮製備的相同液體培養基於 10 升發酵瓶內，經相同滅菌過程並冷卻至 75 °C，然後調整 pH = 3，加入 1 v/v % 的上述菌液，於 500 ml/min 好氧狀況下及 75 °C 培養 24 小時。然後取 250

五、發明說明(8)

m l 新鮮製備的液體培養基置於 300 l 發酵瓶、滅菌、冷卻至 75 °C、調整 pH = 3，加入 1 v / v % 第二種子菌液，於 100 L / min 好氧條件及 75 °C 培養 42 小時。

將約 170 l 的培養液以 SF 膜過濾，並把過濾物離心而得到溼的細胞。將約 258 g 的溼細胞懸浮於 300 m l、10 mM 磷酸鹽緩衝液 (pH 7) 並以超音波振盪打破細胞。然後於 10000 rpm 離心 30 分鐘，將約 300 m l 的上清液與硫酸銨混合在其飽和度為 70 w / v %，於 4 °C 靜置 24 小時然後於 10000 rpm 離心 30 分鐘。收集沈澱物，溶解於適當量的 10 mM Tris - HCl 緩衝液 (pH 8.5)，以新鮮製備相同的緩衝液進行透析 24 小時。然後於 10000 rpm 離心 30 分鐘而得到具酵素活性約 300 m l 上清液。

將上清液注入填充 360 m l "DEAE-TOYOPEARL® 凝膠 (購自 Tosoh Corporation, Tokyo, Japan) 的離子交換管柱，以含 0 - 0.3 M 氯化鈉直線梯度的 10 mM Tris - HCl 緩衝液 (pH 8.5) 引流。將以 0.1 M 氯化鈉沖提的具酵素活性部份收集，利用含 1 M 硫酸銨的 10 mM Tris - HCl 緩衝液 (pH 8.5) 進行 10 小時透析。把透析溶液離心去除不溶性物質，然後注入填充 350 m l "BUTYL-TOYOPEARL® 650" 凝膠 (購自 Tosoh Corporation, Tokyo, Japan) 且預先以含 1 M 硫酸銨的 10 mM Tris - HCl 緩衝液

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (g)

(pH 8 . 5) 平衡的忌水性管柱，以含 1 - 0 M 硫酸銨直線梯度的 1 0 m M T r i s - H C l 緩衝液 (pH 8 . 5) 進行引流。

將以 0 . 8 M 硫酸銨沖提出具酵素活性的部份收集，以含 0 . 2 M 氯化鈉的 1 0 m M T r i s - H C l 緩衝液 (pH 8 . 5) 進行 1 6 小時透析，然後離心去除不溶性物質。把得到的上清液注入填充 3 5 0 m l " TOYOPEARL® HW-55" 凝膠 (購自 Sepracor, Massachusetts, USA) 且預先以含 0 . 2 M 氯化鈉的 1 0 m M T r i s - H C l 緩衝液 (pH 8 . 5) 平衡的管柱內。收集具有酵素活性的沖提液部份，並以 1 0 m M T r i s - H C l 緩衝液 (pH 8 . 5) 進行 1 6 小時透析。然後離心去除不溶性物質，把上清液注入填充 1 0 m l " SUPERROSE 12 HR 10/30" 凝膠 (購自 Pharmacia LKB Uppsala, Sweden) 且預先以 1 0 m M T r i s - H C l 緩衝液 (pH 8 . 5) 平衡的離子交換管柱。將以 0 . 1 M 氯化鈉沖提出的具酵素活性部份收集以做為以下實驗之用。獲得的此純化酵素其比活性為 3 7 8 單位 / 毫克蛋白質，產率為每 1 升培養物約含 0 . 8 6 單位。

當此純化酵素以 7 . 5 w / v % 聚丙烯醯胺凝膠電泳分析時發現，其為單一染色帶，顯示它具有極高的純度。

酵素活性的測量方式如下：將含 1 . 2 5 w / v % α - 麥芽三糖基海藻糖的 5 0 m M 醋酸鹽緩衝液 (pH 6 . 0) 4 m l 置於試管中，加入 1 m l 經過適當稀釋的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(10)

酵素溶液，於60℃反應30分鐘；然後取1ml反應混合物與2ml Somogyi銅溶液混合以終止反應，再利用 Somogyi-Nelson's方法測定其還原力，對照組的酵素則先在100℃加熱30分鐘使其失活性，然後再利用相同步驟進行實驗分析。一單位的酵素活性定義為：於上述實驗條件下，每分鐘增加1μmol葡萄糖還原力所需的酵素含量。

實驗2：對熱安定酵素的物化性質

實驗2-1：作用機制

取含20w/v% α-葡萄糖基海藻糖、α-麥芽糖基海藻糖、α-麥芽三糖基海藻糖、α-麥芽四糖基海藻糖或α-麥芽五糖基海藻糖的50mM醋酸鹽緩衝液(pH5.5)做為受質與實驗1純化得到的酵素2units/g受質(乾燥固體重)，於60℃、反應48小時。然後以一般方式把反應混合物內的鹽類去除，利用“WAKOB-EADS WB-T-330”(購自Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan)的管柱的高效能液相層析儀(HPLC)分析反應物內的醣類組成份。高效能液相層析儀以水做為沖提液、流速為0.5ml/min，並以“MODEL RI-8012”型的微分折射計(購自Tosoh Corporation, Tokyo, Japan)監測沖出物。對照組則分別以麥芽三糖、麥芽四糖、麥芽五糖、麥芽六糖和麥芽七糖為受質，經過上述相同的測試。其結果顯示於表1。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(11)

表 1

受質	反應混合物內的醣類	以高效能液相層析 儀分析的沖提時間 (分)	組成物 (%)
α -葡萄糖基海藻糖	海藻糖	27.4	7.2
	葡萄糖	33.8	3.9
	α -葡萄糖基海藻糖	23.3	88.9
α -麥芽糖基海藻糖	海藻糖	27.4	40.2
	麥芽糖	28.7	40.5
	α -麥芽糖基海藻糖	21.6	19.3
α -麥芽三糖基海藻糖	海藻糖	27.4	41.1
	麥芽三糖	25.9	58.2
	α -麥芽三糖基海藻糖	19.7	0.7
α -麥芽四糖基海藻糖	海藻糖	27.4	34.0
	麥芽四糖	24.1	65.8
	α -麥芽四糖基海藻糖	18.7	0.2
α -麥芽五糖基海藻糖	海藻糖	27.4	29.1
	麥芽五糖	22.6	70.6
	α -麥芽五糖基海藻糖	17.8	0.3
麥芽三糖	麥芽三糖	25.9	100
麥芽四糖	麥芽四糖	24.1	100
麥芽五糖	麥芽五糖	22.6	100
麥芽六糖	麥芽六糖	21.8	100
麥芽七糖	麥芽七糖	21.0	100

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(12)

由表 1 結果顯示：本純化酵素可催化葡萄糖聚合度至少為 3 且末端帶有海藻糖構造的非還原醣釋出海藻糖和葡萄糖或麥芽寡醣，但並不會催化葡萄糖聚合度至少為 3 的麥芽寡醣。這些結果顯示：本純化酵素專一性催化葡萄糖聚合度至少為 3 且末端帶有海藻糖構造的非還原醣，並且專一性水解位於海藻糖和醣苷基之間的醣苷鍵。此種酵素並未被報導且推測其具有新的酵素路徑。

實驗 2 - 2 : 分子量

根據 U. K. Laemmli (Nature, Vol. 227, pp. 680-685 (1970)) 的方法，將本純化酵素以硫酸十二酯鈉聚丙稀醯胺電泳分析，其結果顯示為單一蛋白質帶，其分子量約為 54000 - 64000 道耳頓。本次實驗所使用的標準蛋為肌凝蛋白 (MW = 200000 道耳頓)、 β -半乳糖苷酶 (MW = 116250 道耳頓)、磷酸化酶及 (MW = 97400 道耳頓)、血清白蛋白 (MW = 66200 道耳頓) 和卵白蛋白 (MW = 45000 道耳頓)。

實驗 2 - 3 : 等電點

本實驗 1 得到的純化酵素以含 2 w / v % 安弗林 (Ampholine) 的聚丙稀醯胺凝膠等電電泳分析，其等電點為 5.6 - 6.6。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (13)

實驗 2 - 4 : 最適溫度

如圖 1 顯示：將此純化酵素於 20 mM 醋酸鹽緩衝液 (pH 6.0)、不同溫度反應 30 分鐘，其最適溫度為 75 °C。

實驗 2 - 5 : 最適酸鹼值

如圖 2 顯示：將此純化酵素於 60 °C、不同酸鹼值的麥克凡 (McIlvaine) 緩衝液反應 60 分鐘、其最適酸鹼值為 5.5 - 6.0。

實驗 2 - 6 : 熱安定性

如圖 3 顯示：將此純化酵素於 50 mM 醋酸鹽緩衝液 (pH 7) 反應 60 分鐘，其對熱安定性達到 85 °C。

實驗 2 - 7 : 酸鹼值安定性

如圖 4 顯示：將此純化酵素於 25 °C，不同酸鹼值的麥克凡 (McIlvaine) 緩衝液或 50 mM 碳酸鈉 / 碳酸氫鈉緩衝液反應 16 小時，其對酸鹼值安定性為 5.5 - 9.5。

實驗 2 - 8 : 含氮端的胺基酸序列

將實驗 1 純化得到的酵素，以 "MODEL 473 A" 氣相蛋白質序列儀 (購自 Perkin-Elmer Corp., Instrument Div., Norwalk, USA) 分析，其胺基酸序列顯示在

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (14)

S E Q I D N O : 3 .

實驗 2 - 9 : 部份胺基酸序列

取適量由實驗 1 得到的純化酵素，以 10 mM Tris - HCl 緩衝液 (pH 9) 於 4 °C 進行 18 小時透析，然後以 10 mM Tris - HCl 緩衝液 (pH 9) 調整酵素濃度至 1 mg / ml。取 1 ml 本溶液於容器內，加入 10 μ g 離胺酸肽鏈內切酶，於 30 °C 反應 60 小時以部份水解此酵素。利用預先以含 8 v / v % 水溶性乙腈的 0.1 v / v % 三氟醋酸鹽平衡的 μ BONDAPAK C18 高效能液相層析儀管柱 (購自 Japan Millipore Ltd., Tokyo, Japan) 分析水解物。以 0.9 ml / min 的 0.1 v / v % 三氟醋酸鹽沖提，並增加水溶性乙腈濃度由 8 - 48 v / v %，然後從開始沖提後的 57 分鐘起收集含有胜肽片段的濾液部份。將濾液混合，以真空乾燥，然後溶解於含 50 v / v % 水溶性乙腈的 0.1 v / v % 三氟醋酸鹽內。與實驗 2 - 8 相似方法分析此胜肽片段，結果顯示於 S E Q I D N O : 4 .

已知的酵素並沒有與本酵素有相同的物化性質，因此意味著本酵素是一種新型的酵素。

利用根據 S E Q I D N O : 3 和 4 的部份胺基酸序列而化學合成的寡核苷酸做為探針以篩選酸熱硫化葉菌 (ATCC 33909) 的染色體 DNA，得到一起始自 5' 端含有 1700 個鹼基對 (顯示於

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (15)

SEQ ID NO : 2) 的 DNA 片段。此對熱安定性酵素的鹼基序列可編碼出 556 個胺基酸和起始自氮端如 SEQ ID NO : 1 的部份胺基酸序列。

利用以下實驗方法以得到 SEQ ID NO : 1 的胺基酸序列和 SEQ ID NO : 2 的鹼基序列：

(1) 將對熱安定性的酵素從微生物培養物中分離，純化以決定其氮端胺基酸序列。以蛋白酶將此純化酵素部份水解，然後將胜肽片段分離並決定其胺基酸序列；

(2) 將染色體 DNA 從微生物內分離、純化並利用限制酶部份水解以得到含 2000 - 6000 個鹼基對的 DNA 片段，把此 DNA 片段以 DNA 連接酶連接到事先以限制酶切斷的質體載體，而得到重組 DNA；

(3) 把此重組 DNA 送入大腸桿菌而得到轉形物，利用根據上述部份胺基酸序列而化學合成的寡核苷酸做為探針，進行菌落雜交方法，而得到含有可編碼本酵素的 DNA 的轉形物；和

(4) 將從轉形物獲得的重組 DNA 與引子黏合，利用 DNA 聚合酶從引子端開始延伸，並以雙去氧鏈終止方法決定互補鏈 DNA 的鹼基序列。把經鹼基序列推測得到的胺基酸序列與上述胺基酸序列相比較可確定此鹼基序列編碼出本酵素。

下列的實驗 3 和 4 將說明上述步驟 (2) - (4)，所使用的技術描述於 J. Sumbruck et al. in "Molecular Cloning A Laboratory Manual", 2nd edition, pub-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(16)

lished by Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA
(1989)。

實驗 3 : 製備含有可編碼對熱安定之酵素的 D N A 的重組
D N A 和其轉形物

實驗 3 - 1 : 染色體 D N A 的製備

取 5 0 0 m l 錐瓶加入 1 0 0 m l 液體培養基 (含
0 . 1 w / v % 多朊、0 . 1 w / v % 酵母萃取物、
0 . 2 w / v % 硫酸銨、0 . 0 5 w / v % 磷酸二氫鉀、
0 . 0 2 w / v % 七水合硫酸鎂、0 . 0 2 w / v % 氯化
鉀和水) , 於 1 2 0 ° C 滅菌消毒 2 0 分鐘, 冷卻, 以硫酸
調整 p H = 3 。將單一菌落的酸熱硫化葉菌 (A T C C
3 3 9 0 9) 接種於錐瓶, 於 7 5 ° C 、 1 3 0 r p m 的迴
旋振盪培養 2 4 小時, 而得到種子培養物。製備 5 l 相同
的培養基置於 1 0 l 發酵器, 滅菌、冷卻至 7 5 ° C 、調整
p H = 3 並加入 1 v / v % 種子培養物, 然後於 7 5 ° C 、
5 0 0 m l / m i n 好氣狀況下培養 2 4 小時。

將細胞離心、懸濁於 T E S 緩衝液 (p H 8) 並混合
0 . 0 5 w / v % 溶菌酶, 於 3 7 ° C 培養 3 0 分鐘; 然後
- 8 0 ° C 冷凍 1 小時, 混入 T E S 緩衝液 (p H 9) 並加
熱至 6 0 ° C ; 然後加入 T E S 緩衝液和酚的混合溶液並於
冰上冷卻、離心而得到上清液。然後加入 2 倍體積的冰酒
精以沈澱染色體 D N A , 將沈澱的染色體 D N A 回收, 溶
解於 S S C 緩衝液 (p H 7 . 1) , 加入 7 . 5 μ g 核糖

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(17)

核酸酶和 $125 \mu\text{g}$ 蛋白酶，於 37°C 反應 1 小時。接著加入氯仿和異戊酒精的混合溶液以萃取染色體 DNA，並加入冰酒精以沈澱染色體 DNA。純化得到的染色體 DNA 溶於 SSC 緩衝液 (pH 7.1) 內，調整濃度約 $1 \text{ mg} / \text{ml}$ 並貯存在 -80°C 。

實驗 3-2：重組 DNA pSU18 和轉形物 SU18 的製備

取實驗 3-1 得到的純化染色體 DNA 1 ml 於容器內，並加入 35 單位的 *Sau* 3AI 限制酶於 37°C 酵素反應 20 分鐘，以部份水解染色體 DNA，利用蔗糖密度梯度超高速離心法回收含 $2000 \sim 6000$ 個鹼基對的 DNA 片段。稱取 $1 \mu\text{g}$ Bluescript II SK(+) 質體載體 (購自 Stratagene Cloning Systems, California, USA)，以 *Bam* HI 限制酶將質體載體完全水解，加入 $10 \mu\text{g}$ DNA 片段和 2 單位的 T4 DNA 連接酶，於 4°C 反應隔夜，使 DNA 片段連接到質體載體上。然後加入 $30 \mu\text{l}$ 的 "Epicurian Coli[®] XLI-Blue" 勝任細菌 (購自 Toyobo Co., Ltd., Tokyo, Japan) 於重組 DNA 內，放在冰上反應 30 分鐘， 42°C 熱休克反應，並混合 SOC 培養液於 37°C 反應 1 小時，使重組 DNA 進入大腸桿菌內。

將轉形物接種於含 $50 \mu\text{g} / \text{ml}$ 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -半乳糖苷酶的洋菜培養皿 (pH 7)，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(18)

於 37 °C 培養 18 小時，然後在洋菜培養皿上鋪上尼龍網使洋菜培養皿上形成的 7000 個菌落固定其上。根據 SEQ ID NO: 3 的胺基酸序列 P h e - L y s - L e u - T r p - A l a - P r o，以化學法合成如 5' - T T Y A A R Y T N T G G G C N C C - 3' 鹼基序列做為探針 1 號，並以 ³²P 放射線標識，然後進行菌落雜交實驗，得到具有強烈雜交訊號的 12 個轉形物。

將第一次篩選得到的 12 個轉形物，以 E. M. Southern (Journal of Molecular Biology, Vol. 98, pp. 503-517 (1975)) 的方法進行第 2 次篩選。第 2 次篩選所使用的探針 2 號的鹼基序列 5' - C A R T G G G T N G A Y G A Y T T Y C A - 3' 是根據 SEQ ID NO: 4 的胺基酸序列 G l n - T r p - V a l - A s p - A s p - P h e - H i s，以化學法合成並 ³²P 放射線標識；經實驗結果得到一具有強烈雜交訊號的轉形物。此重組 DNA 及轉形物分別命名為 "p S U 1 8" 和 "S U 1 8"。

將此轉形物 S U 1 8 接種於含 100 μg / ml 氨苄青黴素的 L - 液體培養基 (pH 7)，於 37 °C、振盪培養 24 小時。然後離心菌液以得到細菌細胞，再用鹼處理方法萃取重組 DNA，並經純化步驟得到由 6000 個鹼基對組成的重組 DNA，其中包含位在 S s p I 限制酶切斷位置下游約 1700 個可編碼此酵素的鹼基對。

實驗 3 - 3：利用轉形物 S U 1 8 製備重組型對熱安定酵

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(19)

素

取 500 ml 錐瓶加入 100 ml 液體培養基 (pH 7.0) [含 0.1 w/v % 多朊、0.1 w/v % 酵母萃取物、0.2 w/v % 硫酸銨、0.05 w/v % 磷酸二氫鉀、0.02 w/v % 七水合硫酸鎂、0.02 w/v % 氯化鉀和水]，於 120°C 消毒滅菌 20 分鐘、冷卻，加入 50 μg/ml 氨基青黴素並接種由實驗 3-2 得到的轉形物 SU18，於 37°C、130 rpm 迴旋振盪培養 24 小時，以得到種子培養物。取新鮮製備的相同液體培養基 5 l 於 10 l 發酵瓶內，滅菌、冷卻至 37°C、加入 50 μg/ml 氨基青黴素和 1 v/v % 種子培養物，於 37°C、500 ml/min 通氣條件下培養 24 小時。

利用超音波方式打破細菌細胞，離心去除不溶性物質，然後分析透析液酵素活性後得知：每 l 菌液可產生 30 單位的重組型對熱安定酵素。

對照組則將大腸桿菌 XLI-Blue 株或酸熱硫化葉菌 (ATCC 33909) 的種子培養物接種於不含氨基青黴素的相同新鮮液體培養基內。酸熱硫化葉菌 (ATCC 33909) 的培養條件除了起始酸鹼值設定為和培養溫度為 75°C 外，其他條件都與上述描述相同。分析酸熱硫化葉菌 (ATCC 33909) 的酵素活性為：每 l 菌液可產生 2 單位的對熱安定酵素，其產率明顯低於轉形物 SU18。大腸桿菌 XLI-Blue 株由

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明（20）

於不會產生對熱安定酵素，所以可做為宿主。

將轉形物 S U 1 8 產生的重組型對熱安定酵素以實驗 1 和 2 相同方法檢驗其特性發現：它與由酸熱硫化葉菌（A T C C 3 3 9 0 9）產生的對熱安定酵素有相同物化特性。即（i）重組型對熱安定酵素的分子量在硫酸十二酯鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳分析為 5 4 0 0 0 - 6 4 0 0 0 道耳頓和等電點為 5 . 6 - 6 . 6（ii）即使於 p H 7 . 0 水溶液、8 5 ° C 反應 6 0 分鐘仍不會失去活性。這些結果顯示：本對熱安定酵素可利用重組 D N A 技術製備並有效改善其產率。

實驗 4：互補鏈 D N A 製備和鹼基和胺基酸序列的定序

稱取 2 0 μ g 由實驗 3 - 2 得到的重組 D N A p S U 1 8，利用 2 M 氫氧化鈉溶液使其變性，加入適當量冰酒精沈澱此模版 D N A，收集此沈澱物並真空乾燥。於模版 D N A 內加入依化學方法合成序列為 5' - G T A A A A C G A C G G C C A G T - 3' 的引子（5 0 p m o l / m l）和 1 0 μ l 4 0 m M T r i s - H C l 緩衝液（p H 7 . 5）〔含 2 0 m M 氯化鎂和氯化鈉〕，於 6 5 ° C 反應 2 分鐘以進行配對反應。然後加入 2 μ l 水溶液（分別含有 7 . 5 μ M d A T P，d G T P 和 d T T P）、0 . 5 μ l [α - 32 P] d C T P（2 m C i / m l）、1 μ l 0 . 1 M 二硫蘇糖醇和 2 μ l 1 . 5 units / m l T 7 D N A 聚合酶

五、發明說明(21)

：於 25 °C 反應 5 分鐘以自引子的 5' 端延伸至 3' 端，而得到一互補鏈 DNA。

將含有互補鏈 DNA 的反應產物分成四部份，各自加入 2.5 μ l 50 mM 氯化鈉溶液 (含 80 μ M dNTP 和 8 μ M ddATP, ddTTP, ddCTP 和 ddGTP) 於 37 °C 反應 5 分鐘；然後加入 4 μ l 98 v/v% 甲醯胺溶液 (含 20 mM EDTA, 0.05 w/v% 溴酚藍和 0.05 w/v% 二甲苯氫醇)。進行終止反應。把此反應物置於沸水內加熱 3 分鐘再注入 6 w/v% 聚丙烯醯胺凝膠，於 2000 伏特條件下進行電泳分析以分離 DNA 片段，然後固定膠體、乾燥、進行放射線自動顯影。

分析顯影片上的 DNA 片段顯示此互補鏈 DNA 含有 1700 個鹼基對 (SEQ ID NO: 5)。從 SEQ ID NO: 5 的鹼基序列推測得到的胺基酸序列與 SEQ ID NO: 3 和 4 的部份胺基酸序列比較發現：SEQ ID NO: 3 的部份胺基酸序列相當於 SEQ ID NO: 5 上的第 1 - 30 個胺基酸，SEQ ID NO: 4 的部份胺基酸序列相當於 SEQ ID NO: 5 上的第 301 - 319 個胺基酸。這些結果顯示：本重組型對熱安定酵素具有 SEQ ID NO: 1 起始自氮端的胺基酸序列，且這些胺基酸序列是由源自於酸熱硫化葉菌 (ATCC 33909) 的 DNA 鹼基序列 (起始自

五、發明說明（22）

SEQ ID NO: 2 5（端）所編碼得到。

由上述解釋得知：本發明者經長期研究發現一種可自葡萄糖聚合度至少為3且末端帶有海藻糖構造的非還原糖釋出海藻糖的對熱安定酵素。此酵素與其他已知酵素有不同的物化特性，而本發明利用重組DNA技術製造此對熱安定酵素。此重組型對熱安定酵素的製備及應用，將於實施例中有詳細描述。

根據本發明，利用重組DNA技術可製備一可自葡萄糖聚合度至少為3且末端帶有海藻糖構造的非還原糖釋出海藻糖的重組型對熱安定酵素。一般來說，根據本發明，此重組型對熱安定酵素具有如SEQ ID NO: 1起始自氮端的相同或同源胺基酸序列。只要不改變此酵素的遺傳性物化特性，則將會得到改變1或更多位於

SEQ ID NO: 1 鹼基序列的各種具有同源胺基酸序列的變異型。即使拿取相同的DNA，由於不同的宿主、培養基組成份和培養的溫度和酸鹼值，都會產生修飾型的酵素。這些酵素可能在SEQ ID NO: 1的胺基酸序列上，有一或更多的胺基酸缺失，或經過宿主細胞內細胞作用而在氮端新增加1或更多的胺基酸，只要這些變異型具有本酵素的物化特性都可做為本發明之用。

利用培養含有特殊DNA的轉形物將可獲得重組型對熱安定酵素。例如將含有與SEQ ID NO: 2相同，同源或互補的鹼基序列的DNA送入宿主內，並培養此轉形物。這些鹼基序列可能由於遺傳密碼的退化性而改變

五、發明說明(23)

其鹼基，但並不改變其編碼出的胺基酸序列。

本發明所使用的DNA包括源自自然界來源和具有上述該鹼基序列的人工合成。自然界來源的DNA，例如本發明的酸熱硫化葉菌(ATCC 33909)。將此微生物接種於液體培養基，於好氣狀況下培養1-3天，然後收集菌體，以超音波或細胞壁分解酵素(如溶菌酶或β-聚葡萄糖酶)處理而萃取含有本DNA的基因。當使用細胞壁分解酵素時可伴隨使用蛋白酶；或以超音波分解器處理細胞時，也可使用表面作用劑(如硫酸十二酯)或冷凍解凍方法。然後把DNA經過酚萃取、酒精沈澱、離心、蛋白酶處理和/或核糖核酸酶處理。人工合成的DNA，則根據SEQ ID NO: 2鹼基序列合成，或可編碼SEQ ID NO: 1胺基酸序列的DNA。把此DNA嵌入一可自我複製適當的載體而得到重組DNA，然後送此重組DNA進入合適宿主內得到轉形物，培養此轉形物，從培養液中分離此增殖細胞並從這些細胞收集含有此DNA的質體。

此DNA一般是以重組型DNA型式送入宿主內。只要有DNA材料於手上，利用重組DNA技術將十分容易製備含有此DNA和自我複製載體的重組DNA。質體載體如：pBR322，pUC18，Bluescript II SK(+), pUB110，pTZ4，pC194，pHV14，TRp7，TEp7，pBS7等；和噬菌體載體如：λgt·λC，λgt·λB，ρ11，φ1，φ105

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(24)

等。在這些質體和噬菌體載體中，pBR322，pUC18，Bluescript II SK(+)，λgt·λC和λgt·λB適合在大腸桿菌中表現；而pUB110，pTZ4，pC194，ϕ11，ϕ1和ϕ105適合在芽孢桿菌中表現。質體載體pHV14，TRp7，TEp7和pBS7適合在二種以上宿主內生長。

將此DNA嵌入載體中所使用的方法都是本技藝中常用的方法。首先將含有本DNA的基因和一可自我複製的載體以限制酶和／或超音波方式水解，然後把DNA和載體片段相連接。可利用的第二型限制酶宜選用

Sau 3AI，Eco RI，Hind III，Bam HI，Saq I，Xba I，Sac I，Pst I，等。再利用DNA連接酶於試管內或試管外方式將DNA片段和載體片段相連接。當此重組DNA送入適當宿主，並培養此轉形物時，重組DNA將不受限制的複製。

重組DNA可送入如大腸桿菌、芽孢桿菌、放線菌和酵母菌內。如本例以大腸桿菌為宿主時，利用重組DNA和鈣離子將重組DNA送入宿主內；而以芽孢桿菌為宿主時，則利用勝任細菌方法和菌落雜交方法。利用菌落雜方法或把轉形物培養於含葡萄糖聚合度至少為3的還原性澱粉類糖，篩選可自葡萄糖聚合度至少為3且末端帶有海藻糖構造的非還原糖釋出海藻糖的轉形物。

當培養轉形物於營養培養基時，其會形細胞內或外方

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

檢

五、發明說明（25）

式產生酵素。一般液體培養基會補充碳源、氮源和礦物質，如果有需要，可進一步補充少量胺基酸和維生素。碳源如未加工澱粉、澱粉水解物、葡萄糖、果糖、蔗糖和海藻糖。氮源是包含氮的有機或無機物質，如氨、氨鹽、尿素、硝酸鹽、腺、酵母萃取物。脫脂黃豆、玉米浸液和牛肉萃取物。培養轉形物的溫度為 $20 - 65^{\circ}\text{C}$ ，酸鹼值為 $2 - 9$ ，於曝氣一搖動條件下培養 $1 - 6$ 天。然後以超音波和／或細胞壁分解酵素將培養基內的菌體細胞打破，經過濾和／或離心和純化步驟得到此酵素。純化方法包括：濃縮、鹽析、透析、沈澱分離、凝膠過濾層析法、離子交換層析法、忌水層析法、親合性層析法、凝膠電泳法和等電點電泳法。

如上所述，根據本發明本重組型對熱安定酵素可自葡萄糖聚合度至少為3且末端帶有海藻糖構造的非還原糖釋出海藻糖，即使反應溫度超過 55°C 。所形成的非還原糖具有令人滿意的適中高品質甜味、及適當黏稠度和保溼力。由於其分子內不具有還原基團，因此可做為食品甜味劑而不必擔心會造成令人不悅的褐變及變質現象。由於此特性，使得一些具還原能力的澱粉類糖可轉變成具有易操作、有利用性、不具還原力或低還原力的糖類。

現在更詳細解釋本轉化方法。具有海藻糖構造且葡萄糖聚合度至少為3的非還原糖，例如： α -葡萄糖基海藻糖、 α -麥芽糖基海藻糖、 α -麥芽三糖基海藻糖、 α -麥芽四糖基海藻糖和 α -麥芽五糖基海藻糖。這些非還原

五、發明說明(26)

醣可利用非還原醣生成酵素〔本酵素刊載於日本專利公開公報 No. 349,216/93 和發表於 1994 年 6 月 24 日，標題為“對熱安定非還原醣生成酵素，其製備和應用”的日本專利應用系列 No. 10046601〕催化葡萄糖聚合度至少為 3 的還原性澱粉類醣而製得。而葡萄糖聚合度至少為 3 的還原性澱粉類醣則是利用酸和／或澱粉酶處理澱粉或如支鏈澱粉和直鏈澱粉的澱粉類醣而製得。這些還原醣可做為非還原醣生成酵素的受質，通常受質包含 1 或 1 種以上葡萄糖聚合度至少為 3 的麥芽寡醣，例如：麥芽三糖、麥芽四糖、麥芽五糖、麥芽六糖和麥芽七糖。如“Handbook of Amylases and Related Enzymes”，1st edition (1988)，edited by The Amylase Research Society of Japan, published by Pergamon Press plc, Oxford, England，描述：利用如 α -澱粉酶、麥芽四糖生成澱粉酶、麥芽五糖生成澱粉酶和麥芽六糖生成澱粉酶中任何一種澱粉酶，將會提高澱粉類醣中葡萄糖聚合度至少為 3 的還原性澱粉類醣的產率。如果有必要，聯合使用澱粉酶或澱粉分支酶（如：支鏈澱粉酶和異澱粉酶）將會增加還原性澱粉類醣的產率。利用非還原醣生成酵素存在於濃度高達 50 w/w % 還原性澱粉類醣，於 40 - 85 °C 和 pH = 4 - 8 的條件下反應，可製得所需要量的非還原醣。

根據本發明的酵素轉化方法，本重組型對熱安定酵素可存在於含有一或一種以上的非還原醣的水溶液，經過設

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明（27）

定好的溫度和酸鹼值的酵素反應作用直到形成所需要量的海藻糖。雖然受質濃度即使低於 0.1 w/w%，本酵素反應仍會進行，而受質濃度高於 2 w/w%，尤其是 5-50 w/w% 利用本轉化方法將會有大規模產量。酵素反應的溫度和酸鹼值應設定於不會使重組型對熱安定酵素失去活性的範圍內，即溫度高於 55℃ 但不超過 85℃，但溫度宜為 56-70℃；酸鹼值設在 4-7，但酸鹼值宜為 5-6。重組型對熱安定酵素的含量及反應時間決定於酵素反應條件。因此，本重組型對熱安定酵素可有效將葡萄糖聚合度至少為 3 且末端帶有海藻糖構造的非還原糖轉化成海藻糖和葡萄糖和 / 或麥芽寡糖，例如：當酵素催化 α -麥芽三糖基海藻糖時，其轉化率增加達到 99%。當澱粉酶催化澱粉水解物時，聯合使用非還原糖生成酵素和本對熱安定酵素，將形成非還原糖並伴隨形成海藻糖和葡萄糖和 / 或麥芽寡糖。因此，將形成高產率的海藻糖糖類組成物。

經過本轉化方法獲得的反應混合物可直接使用，一般它們在使用前會經過純化過程：利用過濾和離心去除反應混合物中不溶性物質，然後活性炭脫色、離子交換法去除鹽類和純化，並濃縮成糖漿產品。依其需要，本糖漿產品利用真空乾燥和噴霧乾燥成固體產品。為了獲得由非還原糖組成的產品，把上述所謂糖漿產品以一或一種以上方式處理例如：利用離子交換、活性炭和矽膠層析法將糖類分離，使用酒精和 / 或丙酮進行分離式沈澱，膜過濾，酵母

五、發明說明（28）

菌發酵，和利用鹼將還原糖去除並分解。至於處理大規模的反應混合物的方法，則例如刊載於日本專利公開公報 Nos. 23, 799 / 83 和 72, 598 / 83 的固定床或偽移動床離子交換層析法，運用本方法將產生大規模且高產率的非還原糖產品。

海藻糖和含海藻糖的組成物將可應用於容易被糖類甜味劑的還原力破壞的產品上，例如可應用於食品、化粧品和藥品上；做為甜味劑、品質改良劑、味道改良劑、安定劑、填充劑、輔佐劑和賦形劑。

以下實施例將詳細解說本重組型對熱安定酵素的製備，和利用此酵素進行的還原性澱粉類糖酵素轉化方法：

實施例 A - 1：重組型對熱安定酵素的製備

取 500 ml 錐瓶加入 100 ml 液體培養基（pH 7.0）（含 1 w / v % 多朊，0.5 w / v % 酵母萃取物、0.05 w / v % 氯化鈉和水），於 120 °C 消毒滅菌 20 分鐘，再加入 50 μg / ml 的氨基青黴素。然後冷卻錐瓶，接種由實驗 3 - 2 得到的轉形物 SU18，於 37 °C、130 rpm 迴旋振盪培養 24 小時。取 30 ml 發酵瓶加入 18 ml 新鮮製備相同的液體培養基，滅菌、冷卻至 37 °C，加入 50 μg / ml 氨基青黴素和 1 v / v % 種子培養物，於 37 °C、曝氣搖動狀況下培養 24 小時。

以超音波方式將培養基內的細胞打破，離心去除不溶

五、發明說明（29）

性物質，然後分析上清液的酵素活性發現：每升菌液可產生350單位的本重組型對熱安定酵素。將培養物上清液依實驗1方法純化，得到230 units/mℓ的本重組型對熱安定酵素共12 mℓ，其比活性約為720 units/mg蛋白質。

實施例 A - 2 (a) : 轉形物的製備

依實驗3-2方法得到的重組DNA pSU18利用Ssp I和Ban III限制酶水解，而得到起始自SEQ ID NO: 2第22-740個鹼基序列的約720個鹼基對的DNA片段。把此DNA片段和事先經Ssp I和Ban III限制酶切斷的質體載體“Bluescript II SK(+)”（購自Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden）混合，加入T4 DNA連接酶於4℃隔夜以進行連接反應，而得到第一重組DNA。

取5種以化學方法合成的寡核苷酸，其鹼基序列如下：
 5' - C T G C A G T T T T T A A T A A A A T C
 A G G A G G A - 3'，5' - A A A A A T A T G T T
 T T C G T T C G G T G G A A A T - 3'，5' - A T
 T T C C A C C G A A C G A A A A - 3'，5' - C A
 T A T T T T T C C T C C T G A - 3' 和 5' - T T
 T T A T T A A A A A C T G C A G - 3'。將這些寡
 核苷酸以適當比例混合，於100℃，65℃，37℃和
 20℃各反應20分鐘而互相配對。把具有如

五、發明說明(30)

SEQ ID NO: 6 的鹼基序列和含有起始自
SEQ ID NO: 2 的第 1 - 21 個鹼基序列的 55
個鹼基對雙股 DNA 與事先經 Ssp I 限制酶切斷的第
一重組 DNA 經上述相同的方法相連接，而得到含有
SEQ ID NO: 6 鹼基序列和
SEQ ID NO: 2 第 1 - 740 鹼基的鹼基序列所
組成的第二重組 DNA。

依實驗 3 - 2 方法得到的重組 DNA pSU18 利
用 Ban III 和 Bst XI 限制酶水解，而得到起始自
SEQ ID NO: 2 第 741 - 1668 個鹼基序列
約 1600 個鹼基對的 DNA 片段。把此 DNA 片段和事
先經 Ban III 和 Bst XI 限制酶切斷的質體載體
"Bluescript II SK(+)" 相連接，而得到第三重組 DNA

取 5 種以化學方法合成的寡核苷酸，其鹼基序列如下
: 5' - AACAGAGGTGTGGG - 3'，5'
- GTATATCAATTAGAAATGAAGCTTG
AGCT - 3'，5' - CAAGCTTCATTCTA
- 3' 和 5' - ATTGATATAACCCCAAC
CTCTGTT - 3'。將這些寡核苷酸以適當比例混合
，並以上述相似方法進行互相配對。把具有由
SEQ ID NO: 2 第 1639 - 1668 鹼基序列
組成的 40 個鹼基對雙股 DNA 與事先以 Hpa I 和
Sac I 限制酶水解的第三重組 DNA 相連接，而得到

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (31)

含有 SEQ ID NO : 7 鹼基序列和

SEQ ID NO : 2 第 7 4 1 - 1 6 6 8 個鹼基序列
所組成的第四重組 DNA 。

將第二重組 DNA 以 P s t I 和 B a n III 限制酶切斷，而得到具有 SEQ ID NO : 2 第 1 - 7 4 0 個鹼基序列的約 7 7 0 個鹼基對的 DNA 片段和把第四重組 DNA 以 B a n III 和 H i n d III 限制酶切斷，而得到具有 SEQ ID NO : 2 第 7 4 1 - 1 6 6 8 個鹼基序列的約 9 3 0 個鹼基對的 DNA 片段，利用 T 4 DNA 連接酶連接到事先經 P s t I 和 H i n d III 限制酶切斷的 " p K K 2 2 3 - 3 "，而得到具有 SEQ ID NO : 2 鹼基序列的本重組 DNA p S U 1 9 。

根據實驗 3 - 2 方法，將重組 DNA p S U 1 9 送入 " B M H 7 1 - 1 8 " 的勝任細胞（購自 Takara Shuzo Co., Ltd., Tokyo, Japan），而得到具有可編碼此重組型對熱安定酵素的 DNA 的轉形物 S U 1 9。依照實驗 3 - 2 方法培養轉形物 S U 1 9，並收集增殖的細胞。從這些細胞得到一重組 DNA，分析其組成顯示：其係由 6 3 0 0 個鹼基對組成（如圖 6 所示），在 S s p I 限制酶水解位置下游含有一 1 6 6 8 個鹼基對的 DNA。

實施例 A - 2 (b) : 從轉形物製備重組型對熱安定酵素

將轉形物 S U 1 9 以實施例 A - 1 相同的方法培養於

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (32)

一液體營養培養基 (pH 7 . 0) [含 2 w / v % 麥芽糖、 4 w / v % " N-Z-SOY PEPTONE " (購自 Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA), 2 w / v % 酵母萃取物、 0 . 5 w / v % 磷酸二氫鈉、 2 0 0 μ g / m l 氯苄青黴素和水] 。以超音波方式將培養基內的細胞打破，離心方式去除不溶性物質，分析其上清液的重組型對熱安定酵素活性顯示：每 l 菌液可產生 8 0 0 , 0 0 0 單位的本重組型對熱安定酵素。上清液以實驗 1 的方法純化，而得到 3 2 0 0 units / m l 的重組型對熱安定酵素 1 8 5 0 m l ，其比活性為 7 2 0 units / mg 蛋白質。

此純化酵素以實驗 2 方法測其特性顯示：在硫酸十二酯鈉聚丙烯醯胺凝膠電泳分析其分子量為 5 4 0 0 0 - 6 4 0 0 0 道耳頓、等電點為 5 . 6 - 6 . 6 ；即使於 pH 7 溶液、 8 5 $^{\circ}$ C 加熱 6 0 分鐘仍不會失去活性。這些物化特性與酸熱硫化葉菌 (A T C C 3 3 9 0 9) 產生的對熱安定酵素的物化特性相同。

實施例 B - 1 (a) : 含海藻糖的糖漿產品轉化方法

於 5 0 0 m l 錐瓶內加入 1 0 0 m l 液體培養基 [含 0 . 1 w / v % 多朮， 0 . 1 w / v % 酵母萃取物， 0 . 2 w / v % 硫酸銨， 0 . 0 5 w / v % 磷酸二氫鉀， 0 . 0 2 w / v % 七水合硫酸鎂， 0 . 0 2 w / v % 氯化鉀和水] ，於 1 2 0 $^{\circ}$ C 消毒滅菌 2 0 分鐘。錐瓶冷卻並以硫酸調整 pH = 3 後，取單一菌落的酸熱硫化葉菌 (

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

五、發明說明 (33)

A T C C 33909) 接種於液體培養基，於 75 °C 130 r p m 旋轉振盪培養 24 小時。取 5 升新鮮製備的相同液體培養基於 10 升發酵瓶內，經相同滅菌過程並冷卻至 75 °C，然後調整 p H = 3，加入 1 v / v % 的上述菌液，於 500 m l / m i n 好氣狀況下及 75 °C 培養 24 小時。然後取 250 m l 新鮮製備的液體培養基置於 300 l 發酵瓶、滅菌、冷卻至 75 °C、調整 p H = 3，加入 1 v / v % 第二種子菌液，於 100 L / m i n 好氧條件及 75 °C 培養 42 小時。

將約 170 l 的培養液以 S F 膜過濾，並把過濾物離心而得到溼的細胞。將約 258 g 的溼細胞懸浮於 300 m l、10 m M 磷酸鹽緩衝液 (p H 7) 並以超音波振盪打破細胞。然後於 10000 r p m 離心 30 分鐘，把約 300 m l 的上清液與硫酸銨混合至其飽和度為 70 w / v %，於 4 °C 靜置 24 小時然後於 10000 r p m 離心 30 分鐘。收集沈澱物，溶解於適當量的 10 m M T r i s - H C l 緩衝液 (p H 8 . 5)，以新鮮製備相同的緩衝液進行透析 24 小時。然後於 10000 r p m 離心 30 分鐘而得到具酵素活性的 300 m l 上清液。

將上清液注入填充 360 m l "DEAE-TOYOPEARL® 凝膠 (購自 Tosoh Corporation, Tokyo, Japan) 的離子交換管柱，以含 0 - 0.3 M 氯化鈉直線梯度的 10 m M T r i s - H C l 緩衝液 (p H 8 . 5) 引流。將以 0.1 M 氯化鈉沖提的具酵素活性部份收集，利用含 1 M

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (34)

硫酸銨的 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) 進行 10 小時透析。把透析溶液於 10000 rpm 離心 30 分鐘去除不溶性物質，然後注入填充 350 mL "BUTYL-TOYOPEARL® 650" 凝膠 (購自 Tosoh Corporation, Tokyo, Japan) 且預先以含 1 M 硫酸銨的 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) 平衡的忌水性管柱，並以含 1-0 M 硫酸銨直線梯度的 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) 進行引流。

將以 0.8 M 硫酸銨沖提出具酵素活性的部份收集，以含 0.2 M 氯化鈉的 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) 進行 16 小時透析，然後離心去除不溶性物質。把得到的上清液注入填充 350 mL "TOYOPEARL® HW-55" 凝膠 (購自 Tosoh Corporation, Tokyo, Japan) 且預先以含 0.2 M 氯化鈉的 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) 平衡的管柱內。收集具有酵素活性的沖提液部份，並以 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) 進行 16 小時透析。然後離心去除不溶性物質，把上清液注入填充 "MONO Q" 凝膠 (購自 Pharmacia LKB Uppsala, Sweden) 且預先以 10 mM Tris-HCl 緩衝液平衡的離子交換管柱，利用含 0-0.2 M 氯化鈉直線梯度的 10 mM Tris-HCl 緩衝液進行引流。將以 0.1 M 氯化鈉沖提出的具酵素活性部份收集以做為以下實驗之用。獲得

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (35)

的此純化酵素其比活性為 81 單位 / 毫克蛋白質，產率為每 1 升培養物約含 0.24 單位。

非還原糖生成酵素活性的測量方式如下：將含 1.25 w / v % 麥芽五糖的 20 mM 醋酸鹽緩衝液 (pH 5.5) 4 ml 置於試管中，加入 1 ml 經過適當稀釋的酵素溶液，於 60 °C 反應 60 分鐘；然後於 100 °C 加熱 30 分鐘終止反應。取 1 ml 反應混合物以去離子水做 10 倍稀釋，利用 Somogyi-Nelson's 方法測定其還原力，對照組的酵素則先在 100 °C 加熱 30 分鐘使其失活性，然後再利用相同步驟進行實驗分析。一單位的酵素活性定義為：於上述實驗條件下，每分鐘減少 1 μ mo 麥芽五糖還原力所需的酵素含量。

實施例 B - 1 (b) : 含海藻糖糖漿產品的轉化方法

將玉米澱粉懸浮於水內成為 15 w / w % 懸濁液，加入 0.1 w / w % 碳酸鈣，調整其 pH = 6，再加入 0.2 w / w % "TERMAMYL 60L" α -澱粉酶 (購自 Novo Nordisk Bioindustri A/S, Copenhagen, Denmark)，於 95 °C 酵素反應 15 小時，使澱粉膠化和液化。然後於 120 °C 消毒 30 分鐘使酵素失活，冷卻至 58 °C，調整 pH = 5.5，並加入 3000 units / g 澱粉乾重的異澱粉酶，3 units / g 澱粉乾重的依實施例 B - 1 (a) 方法獲得的重組型對熱安定酵素，和 5 units / g 澱粉乾重的依實施例 A - 1 方法獲得的重組型對熱安定酵素，進

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(36)

行64小時酵素反應。然後把反應混合物於97℃加熱30分鐘使酵素失去活性，冷卻和過濾，以活性炭把濾液脫色，利用離子交換法去除鹽類和純化並濃縮成60 w/w %糖漿，其產率為澱粉材料乾重的90%。

本糖漿具有低葡萄糖當量，含有71.0 w/w %海藻糖、2.9 w/w %葡萄糖基海藻糖、1 w/w %麥芽糖基海藻糖、4.9 w/w %葡萄糖、10.5 w/w %麥芽糖、8.2 w/w %麥芽三糖和1.5 w/w %麥芽四糖和更高級麥芽寡糖。本產品具有適中甜度、黏稠度和保溼力，其可應用於食品、化粧品和藥品組成物上，做為甜味劑、味道改良劑、品質改良劑、安定劑、填充劑、輔佐劑和賦形劑。

實施例 B - 2 : 含有海藻糖的粉末狀糖漿的轉化方法

把實施例 B - 1 得到的糖漿產品通過強酸陽離子交換樹脂的管柱層析儀，以提高非還原糖含量。其步驟如下：把“XT-1016（鈉離子型，聚合度4%）”的強酸陽離子交換樹脂（購自Tokyo Organic Chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan）填充至4根：直徑5.4 cm和長度5 m的夾套式不銹鋼管柱內，然後連結成總長度為20 m的管柱。將相對於樹脂5 v/v %的糖漿產品注入管柱內，保持管內溫度為55℃，以空間速度0.13之55℃熱水沖提糖類組成物。將富含非還原糖的部份收集、合併、濃縮、真空乾燥、磨碎，而得到含

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (37)

97 w / w % 海藻糖的粉末狀產物，其產率為材料乾燥固體重的 55 %。

本產品具有適中甜度、黏稠度和保溼力。其可應用於食品、化粧品和藥品上，做為甜味劑、味道改良劑、品質改良劑、安定劑、填充劑、輔佐劑和賦形劑。

實施例 B - 3 : 含非還原醣糖漿產品的轉化方法

把依實施例 B - 2 方法獲得的富含海藻糖部份濃縮成約 75 w / w % 溶液，然後轉移至結晶器，慢慢冷卻並攪拌，而得到結晶度為 45 w / w % 的糖膏。將此糖膏由噴霧塔上方的管子由上往下輸送，壓力為 150 kg / c m²，85 °C 熱空氣由上往下吹動，然後收集在輸送帶上所形成的結晶粉，位於輸送帶下方以 45 °C 熱空氣吹動結晶粉。再把此結晶粉置於熟成塔，利用 40 °C 熱空氣流進行 10 小時熟成，使其完全結晶化並乾燥。因此可獲得粉末狀含水海藻糖結晶，其產率為材料乾重的 90 w / w %。

本產品不具吸溼性，易於操控，因此可併入食品、化粧品和藥品內，做為甜味劑、味道改良劑、品質改良劑、安定劑、填充劑、輔佐劑和賦形劑。

實施例 B - 4 : 含海藻糖結晶的粉末產物的轉化方法

取含 36 w / w % 乾燥固體重的樹薯澱粉懸濁液，加入碳酸鈣使其最終濃度為 0.1 w / w %，調整 pH = 6.0，加入 0.2 units / g 澱粉乾燥固體重的

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (38)

TERMAMYL 60L[™] α - 澱粉酶 (購自 Novo Nordisk Bioindustri A/S, Copenhagen, Denmark), 於 95 °C 反應 15 分鐘以膠化和液化澱粉。把此反應混合物於 120 °C 加熱 10 分鐘, 使酵素失去活性, 冷卻至 58 °C, 加入 2000 units/g 澱粉乾重的異澱粉酶 (購自 Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japan)、2.5 units/g 澱粉乾重的依實施例 B-1 (a) 方法獲得的對熱安定酵素, 5 units/g 澱粉乾重的依實施例 A-1 方法獲得的重組型對熱安定酵素, 進行 72 小時酵素反應。將此反應物於 97 °C 加熱 30 分鐘使其酵素失活, 冷卻至 50 °C, 加入 10 units/g 澱粉乾重的 "GLUCOZYME" (購自 Nagase Biochemicals, Ltd., Kyoto, Japan) 進行 40 小時酵素反應。然後於 95 °C 加熱 10 分鐘使酵素失活, 冷卻、過濾、活性炭脫色、離子交換法去除鹽類和純化, 濃縮成 60 w/w % 糖漿, 其含有 75.5 w/w % 海藻糖。

將此糖漿產品濃縮成 84 w/w % 溶液, 然後轉移至結晶器, 加入 2 w/w % 含水海藻糖結晶做為晶種, 於溫和攪拌條件下進行結晶化, 而得到 45 w/w % 結晶度的糖膏。把此糖膏分散於塑膠平面器具, 於室溫下置放 3 天進行固化和熟成。然後把形成的塊狀結晶移出容器, 利用磨碎機磨碎而得到產率為 90 w/w % 澱粉材料重的含水海藻糖結晶固體產物。

本產品具有適中甜度且不具吸溼性, 因此可應用於食

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (39)

品、化粧品和藥品上，做為甜味劑、味道改良劑、品質改良劑、安定劑、填充劑、輔佐劑和賦形劑。

實施例 B - 5 : 含海藻糖結晶的粉末狀產品的轉化方法

將馬鈴薯澱粉懸浮於水中，成為 6 w / w % 懸濁液，加入 0 . 1 w / w % “NEO-SPITASE” α - 澱粉酶（購自 Nagase Biochemicals, Ltd., Kyoto, Japan），調整 pH = 6 . 2，於 85 - 90 °C 進行 1 小時酵素反應使澱粉膠化和液化。把此混合物於 120 °C 加熱 10 分鐘使酵素失去活性，冷卻至 60 °C，調整 pH = 5 . 5，加入 50 units / g 澱粉乾重的 “PROMOZYME 200L” 支鏈澱粉酶（購自 Novo Nordisk Bioindustri A/S, Copenhagen, Denmark），3 units / g 澱粉乾重的依實施例 B - 1 (a) 方法製得的對熱安定非還原糖生成酵素和 5 units / g 澱粉乾重的依實施例 A - 1 方法製得的重組型對熱安定酵素，進行 48 小時酵素反應。把此混合物於 97 °C 加熱 30 分鐘使酵素失去活性，調整至 50 °C 及 pH = 5，加入 10 units / g 澱粉乾重的 “GLUCOZYME”（購自 Nagase Biochemicals, Ltd., Kyoto, Japan）進行 40 小時酵素反應。然後把此反應物於 95 °C 加熱 10 分鐘使酵素失去活性，冷卻、過濾、活性炭脫色、離子交換法去除鹽類和純化，並濃縮成 60 w / w % 糖漿產品（含有約 79 . 3 w / w % 海藻糖乾重。

將此糖漿產品通過與實施例 B - 2 相似的管柱層析儀

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

五、發明說明(40)

，除了以“C6000”（購自Japan Organo Co., Ltd., Tokyo, Japan）的鈉離子型做為強酸陽離子交換樹脂，然後收集含約95 w/w%海藻糖的濾液部份。將此濾出液部份濃縮成75 w/w%，利用實施例B-4相似方法進行結晶化，而得到塊狀的糖膏，然後磨碎得到一含水海藻糖結晶的粉末狀產品，其產率為70 w/w%澱粉材料乾重。

本產品不具吸溼性且易於掌握，可適當加入食品、化粧品和藥品中，做為甜味劑、味道改良劑、品質改良劑、安定劑、填充劑、輔佐劑和賦形劑。

實施例B-6：含無水海藻糖結晶的粉末狀產物的轉化方法

取1份“EX-1”直鏈澱粉（購自Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japan），加熱溶解於15份水內，然後調整水溶液至65℃和pH = 5.5，加入2 units/g直鏈澱粉乾重的依實施例B-1(a)方法製得的對熱安定非還原糖生成酵素和6 units/g直鏈澱粉乾重的依實施例A-2方法製得的重組型對熱安定酵素，進行48小時酵素反應。將此反應混合物於97℃加熱30分鐘使酵素失活，調整混合物至50℃及pH = 5.0，加入10 units/g直鏈澱粉乾重的“GLUCOZYME”葡萄糖澱粉酶（購自Nagase Biochemicals Ltd., Kyoto, Japan）反應40小時。然後把此反

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

五、發明說明(41)

應物於 95 °C 加熱 10 分鐘使酵素失去活性，冷卻、過濾、活性炭脫色、離子交換法去除鹽類和純化，並濃縮成 60 w / w % 濃度含 82.2 w / w % 海藻糖乾重的糖漿產品。

將此糖漿產品以實施例 B - 5 相似方法進行管柱層析，收集得到一含 98 w / w % 海藻糖乾重的濾液部份，然後減壓加熱使其濃度為 85 w / w %。於此濃縮物內加入 2 w / w % 無水海藻糖結晶做為晶種，然後於 120 °C 攪拌 5 分鐘。把此反應混合物分佈於塑膠平面容器，於 100 °C 真空乾燥結晶化。然後從容器中將所形成的塊狀產品移出，利用切割器磨碎，而得到固體產物。此產品含有無水海藻糖結晶、含水率為 0.3 w / w %，結晶度為 70 w / w %，其產率為 70 % 直鏈澱粉乾重。

無水海藻糖結晶可自含水物質吸收水份而轉變成含水海藻糖結晶，因此富含無水海藻糖結晶的本產品可做為乾燥劑，去除如食品、化粧品和藥品及其材料和中間物的水份。本產品具有適中和高純度甜味，可自由添加於食品、化粧品和藥品中，做為甜味劑、味道改良劑、品質改良劑、安定劑、填充劑、稀釋劑和賦形劑。

如上述，本發明是基於發現一種新型對熱安定酵素，其可自葡萄糖聚合度至少為 3 且末端帶有海藻糖構造的非還原糖釋出海藻糖。本發明研發了一種利用重組 DNA 技術以產生大規模和高效率的本對熱安定酵素的方法。本發明利用此重組型對熱安定酵素所構成的轉化方法，將十分

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(42)

容易把葡萄糖聚合度至少為3且末端帶有海藻糖構造的非還原糖轉變成海藻糖和葡萄糖和/或麥芽寡糖，而不必擔心造成細菌的污染。海藻糖具有適中且高純度甜味，由於其分子內不含還原基團，因此可有效應用於食品、化粧品和藥品上，而不必擔心會有令人不悅的褐變和變質現象。本重組型對熱安定酵素的胺基酸序列已解讀，因此它可自由應用於准許在食品和藥品上使用的海藻糖的製備。

因此，本發明對於本領域而言具有極顯著意義及影響。

然而除了本發明所描述的具體實例外，我們可了解的是：涵蓋本申請專利範圍以外的延伸修飾將是本發明真實精神及目標所期望的。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (43)

序列表

(1) S E Q I D N O : 1 的資料

(i) 序列特徵 :

(A) 長度 : 5 5 6 個胺基酸

(B) 種類 : 胺基酸

(D) 拓撲學 : 直源型

(i i) 分子種類 : 胜肽

(x i) 序列編號 : S E Q I D N O : 1

Met	Phe	Ser	Phe	Gly	Gly	Asn	Ile	Glu	Lys	Asn	Lys	Gly	Ile	Phe
1				5					10					15
Lys	Leu	Trp	Ala	Pro	Tyr	Val	Asn	Ser	Val	Lys	Leu	Lys	Leu	Ser
				20					25					30
Lys	Lys	Leu	Ile	Pro	Met	Glu	Lys	Asn	Asp	Glu	Gly	Phe	Phe	Glu
				35					40					45
Val	Glu	Ile	Asp	Asp	Ile	Glu	Glu	Asn	Leu	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Ile
				50					55					60
Ile	Glu	Asp	Lys	Arg	Glu	Ile	Pro	Asp	Pro	Ala	Ser	Arg	Tyr	Gln
				65					70					75
Pro	Leu	Gly	Val	His	Asp	Lys	Ser	Gln	Leu	Ile	Arg	Thr	Asp	Tyr
				80					85					90
Gln	Ile	Leu	Asp	Leu	Gly	Lys	Val	Lys	Ile	Glu	Asp	Leu	Ile	Ile
				95					100					105
Tyr	Glu	Leu	His	Val	Gly	Thr	Phe	Ser	Gln	Glu	Gly	Asn	Phe	Lys
				110					115					120
Gly	Val	Ile	Glu	Lys	Leu	Asp	Tyr	Leu	Lys	Asp	Leu	Gly	Ile	Thr
				125					130					135
Gly	Ile	Glu	Leu	Met	Pro	Val	Ala	Gln	Phe	Pro	Gly	Asn	Arg	Asp
				140					145					150
Trp	Gly	Tyr	Asp	Gly	Val	Phe	Leu	Tyr	Ala	Val	Gln	Asn	Thr	Tyr
				155					160					165
Gly	Gly	Pro	Trp	Glu	Leu	Ala	Lys	Leu	Val	Asn	Glu	Ala	His	Lys
				170					175					180
Arg	Gly	Ile	Ala	Val	Ile	Leu	Asp	Val	Val	Tyr	Asn	His	Ile	Gly
				185					190					195
Pro	Glu	Gly	Asn	Tyr	Leu	Leu	Gly	Leu	Gly	Pro	Tyr	Phe	Ser	Asp
				200					205					210
Arg	Tyr	Lys	Thr	Pro	Trp	Gly	Leu	Thr	Phe	Asn	Phe	Asp	Asp	Arg
				215					220					225
Gly	Cys	Asp	Gln	Val	Arg	Lys	Phe	Ile	Leu	Glu	Asn	Val	Glu	Tyr
				230					235					240
Trp	Phe	Lys	Thr	Phe	Lys	Ile	Asp	Gly	Leu	Arg	Leu	Asp	Ala	Val
				245					250					255
His	Ala	Ile	Phe	Asp	Asn	Ser	Pro	Lys	His	Ile	Leu	Gln	Glu	Ile
				260					265					270

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明(44)

Ala	Glu	Lys	Ala	His	Gln	Leu	Gly	Lys	Phe	Val	Ile	Ala	Glu	Ser
				275					280					285
Asp	Leu	Asn	Asp	Pro	Lys	Ile	Val	Lys	Asp	Asp	Cys	Gly	Tyr	Lys
				290					295					300
Ile	Asp	Ala	Gln	Trp	Val	Asp	Asp	Phe	His	His	Ala	Val	His	Ala
				305					310					315
Phe	Ile	Thr	Lys	Glu	Lys	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Gln	Asp	Phe	Gly	Arg
				320					325					330
Ile	Glu	Asp	Ile	Glu	Lys	Thr	Phe	Lys	Asp	Val	Phe	Val	Tyr	Asp
				335					340					345
Gly	Lys	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Arg	Gly	Arg	Thr	His	Gly	Ala	Pro	Val
				350					355					360
Gly	Asp	Leu	Pro	Pro	Arg	Lys	Phe	Val	Val	Phe	Ile	Gln	Asn	His
				365					370					375
Asp	Gln	Val	Gly	Asn	Arg	Gly	Asn	Gly	Glu	Arg	Leu	Ser	Ile	Leu
				380					385					390
Thr	Asp	Lys	Thr	Thr	Tyr	Leu	Met	Ala	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ile	Leu
				395					400					405
Ser	Pro	Tyr	Ile	Pro	Leu	Ile	Phe	Met	Gly	Glu	Glu	Tyr	Tyr	Glu
				410					415					420
Thr	Asn	Pro	Phe	Phe	Phe	Phe	Ser	Asp	Phe	Ser	Asp	Pro	Val	Leu
				425					430					435
Ile	Lys	Gly	Val	Arg	Glu	Gly	Arg	Leu	Lys	Glu	Asn	Asn	Gln	Met
				440					445					450
Ile	Asp	Pro	Gln	Ser	Glu	Glu	Ala	Phe	Leu	Lys	Ser	Lys	Leu	Ser
				455					460					465
Trp	Lys	Ile	Asp	Glu	Glu	Val	Leu	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Gln	Leu	Ile
				470					475					480
Asn	Ile	Arg	Lys	Arg	Tyr	Asn	Asn	Cys	Lys	Arg	Val	Lys	Glu	Val
				485					490					495
Arg	Arg	Glu	Gly	Asn	Cys	Ile	Thr	Leu	Ile	Met	Glu	Lys	Ile	Gly
				500					505					510
Ile	Ile	Ala	Ser	Phe	Asp	Asp	Ile	Val	Ile	Asn	Ser	Lys	Ile	Thr
				515					520					525
Gly	Asn	Leu	Leu	Ile	Gly	Ile	Gly	Phe	Pro	Lys	Lys	Leu	Lys	Lys
				530					535					540
Asp	Glu	Leu	Ile	Lys	Val	Asn	Arg	Gly	Val	Gly	Val	Tyr	Gln	Leu
				545					550					555
Glu														

(2) SEQ ID NO: 2 的資料

(i) 序列特徵:

(A) 長度: 1668 個鹼基對

(B) 種類: 核酸

(xi) 序列編號: SEQ ID NO: 2

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (45)

ATGTTTTTCGT TCGGTGGAAA TATTGAAAAA AATAAAGGTA TCTTTAAGTT ATGGGCACCT 60
TATGTTAATA GTGTTAAGCT GAAGTTAAGC AAAAAACTTA TTCCAATGGA AAAAAACGAT 120
GAGGGATTTT TCGAAGTAGA AATAGACGAT ATCGAGGAAA ATTTAACCTA TTCTTATATT 180
ATAGAAGATA AGAGAGAGAT ACCTGATCCC GCATCACGAT ATCAACCTTT AGGAGTTCAT 240
GACAAATCAC AACTTATAAG AACAGATTAT CAGATTCTTG ACCTTGGAAA AGTAAAAATA 300
GAAGATCTAA TAATATATGA ACTCCACGTT GGTACTTTTT CCCAAGAAGG AAATTTCAAA 360
GGAGTAATAG AAAAGTTAGA TTACCTCAAG GATCTAGGAA TCACAGGAAT TGAAGTATG 420
CCTGTGGCAC AATTTCCAGG GAATAGAGAT TGGGGATACG ATGGTGTTTT TCTATACGCA 480
GTTCAAAATA CTTATGGCGG ACCATGGGAA TTGGCTAAGC TAGTAAACGA GGCACATAAA 540
AGGGGAATAG CCGTAATTTT GGATGTTGTA TATAATCATA TAGGTCCTGA GGGAAATTAC 600
CTTTTAGGAT TAGGTCCTTA TTTTTCAGAC AGATATAAAA CTCCATGGGG ATTAACATTT 660
AATTTTGATG ATAGGGGATG TGATCAAGTT AGAAAAATCA TTTTAGAAAA TGTCGAGTAT 720
TGGTTAAGA CCTTTAAAAAT CGATGGTCTG AGACTGGATG CAGTTCATGC AATTTTGTAT 780
AATTCGCCTA AGCATATCCT CCAAGAGATA GCTGAAAAAG CCCATCAATT AGGAAAATTT 840
GTTATTGCTG AAAGTGATTT AAATGATCCA AAAATAGTAA AAGATGATTG TGGATATAAA 900
ATAGATGCTC AATGGGTTGA CGATTTCCAC CACGCAGTTC ATGCATTCAT AACCAGAA 960
AAAGATATT ATTACCAGGA TTTTGGAAAG ATAGAAGATA TAGAGAAAAC TTTTAAAGAT 1020
GTTTTTGTTT ATGATGGAAA GTATTCTAGA TACAGAGGAA GAACTCATGG TGCTCCTGTA 1080
GGTGATCTTC CACCACGTAA ATTTGTAGTC TTCATACAAA ATCACGATCA AGTAGGAAAT 1140

AGAGGAAATG GGGAAAGACT TTCCATATTA ACCGATAAAA CGACATACCT TATGGCAGCC 1200
ACACTATATA TACTCTCACC GTATATACCG CTAATATTTA TGGGCGAGGA ATATTATGAG 1260
ACGAATCCTT TTTTCTTCTT CTCTGATTTT TCAGATCCCG TATTAATTAA GGGTGTAGA 1320
GAAGGTAGAC TAAAGGAAAA TAATCAAATG ATAGATCCAC AATCTGAGGA AGCGTCTTA 1380
AAGAGTAAAC TTTTCATGGAA AATTGATGAG GAAGTTTTAG ATTATTATAA ACAACTGATA 1440
AATATCAGAA AGAGATATAA TAATTGTAAA AGGTTAAAGG AAGTTAGGAG AGAAGGGAAC 1500
TGTATTACTT TGATCATGGA AAAAAATAGGA ATAATTGCAT CGTTTGATGA TATTGTAATT 1560
AATTCTAAAA TTACAGGTAA TTTACTTATA GGCATAGGAT TTCCGAAAAA ATTGAAAAAA 1620
GATGAATTA TTAAGGTAA CAGAGGTGTT GGGGTATATC AATTAGAA 1668

(3) S E Q I D N O : 3 的資料

(i) 序列特徵 :

(A) 長度 : 30 個胺基酸

(B) 種類 : 胺基酸

(D) 拓撲學 : 直源型

(i i) 分子種類 : 胜肽

(v) 片段種類 : 氮端片段

(x i) 序列編號 : S E Q I D N O : 3

Met	Phe	Ser	Phe	Gly	Gly	Asn	Ile	Glu	Lys	Asn	Lys	Gly	Ile	Phe
1				5					10					15
Lys	Leu	Trp	Ala	Pro	Tyr	Val	Asn	Ser	Val	Lys	Leu	Lys	Leu	Ser
				20					25					30

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (46)

(4) S E Q I D N O : 4 的資料

(i) 序列特徵 :

(A) 長度 : 1 9 個胺基酸

(B) 種類 : 胺基酸

(D) 拓撲學 : 直源型

(i i) 分子種類 : 胜肽

(v) 片段種類 : 內部片段

(x i) 序列編號 : S E Q I D N O : 4

Ile	Asp	Ala	Gln	Trp	Val	Asp	Asp	Phe	His	His	Ala	Val	His	Ala
1				5					10					15
Phe	Ile	Thr	Lys											

(5) S E Q I D N O : 5 的資料

(i) 序列特徵 :

(A) 長度 : 1 6 6 8 個胺基酸

(B) 種類 : 核酸

(C) 股 : 雙股

(D) 拓撲學 : 直線

(i i) 分子種類 : 染色體 D N A

(v i) 最初來源 :

(A) 微生物 :

(B) 個別分離 : A T C C 3 3 9 0 9

(v i) 序列編號 : S E Q I D N O : 5

ATG	TTT	TCG	TTC	GGT	GGA	AAT	ATT	GAA	AAA	AAT	AAA	GGT	ATC	TTT	AAG	48
Met	Phe	Ser	Phe	Gly	Gly	Asn	Ile	Glu	Lys	Asn	Lys	Gly	Ile	Phe	Lys	

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (47)

1	TTA	TGG	GCA	CCT	5	TAT	GTT	AAT	AGT	GTT	AAG	CTG	AAG	TTA	AGC	AAA	AAA	96
	Leu	Trp	Ala	Pro	20	Tyr	Val	Asn	Ser	Val	Lys	Leu	Lys	Leu	Ser	Lys	Lys	
	CTT	ATT	CCA	ATG	GAA	AAA	AAC	GAT	GAG	GGA	TTT	TTC	GAA	GTA	GAA	ATA		144
	Leu	Ile	Pro	Met	Glu	Lys	Asn	Asp	Glu	Gly	Phe	Phe	Glu	Val	Glu	Ile		
	GAC	GAT	ATC	GAG	GAA	AAT	TTA	ACC	TAT	TCT	TAT	ATT	ATA	GAA	GAT	AAG		192
	Asp	Asp	Ile	Glu	Glu	Asn	Leu	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Ile	Ile	Glu	Asp	Lys		
	AGA	GAG	ATA	CCT	GAT	CCC	GCA	TCA	CGA	TAT	CAA	CCT	TTA	GGA	GTT	CAT		240
	Arg	Glu	Ile	Pro	Asp	Pro	Ala	Ser	Arg	Tyr	Gln	Pro	Leu	Gly	Val	His		
	GAC	AAA	TCA	CAA	CTT	ATA	AGA	ACA	GAT	TAT	CAG	ATT	CTT	GAC	CTT	GGA		288
	Asp	Lys	Ser	Gln	Leu	Ile	Arg	Thr	Asp	Tyr	Gln	Ile	Leu	Asp	Leu	Gly		
	AAA	GTA	AAA	ATA	GAA	GAT	CTA	ATA	ATA	TAT	GAA	CTC	CAC	GTT	GGT	ACT		336
	Lys	Val	Lys	Ile	Glu	Asp	Leu	Ile	Ile	Tyr	Glu	Leu	His	Val	Gly	Thr		
	TTT	TCC	CAA	GAA	GGA	AAT	TTC	AAA	GGA	GTA	ATA	GAA	AAG	TTA	GAT	TAC		384
	Phe	Ser	Gln	Glu	Gly	Asn	Phe	Lys	Gly	Val	Ile	Glu	Lys	Leu	Asp	Tyr		
	CTC	AAG	GAT	CTA	GGA	ATC	ACA	GGA	ATT	GAA	CTG	ATG	CCT	GTG	GCA	CAA		432
	Leu	Lys	Asp	Leu	Gly	Ile	Thr	Gly	Ile	Glu	Leu	Met	Pro	Val	Ala	Gln		
	TTT	CCA	GGG	AAT	AGA	GAT	TGG	GGA	TAC	GAT	GGT	GTT	TTT	CTA	TAC	GCA		480
	Phe	Pro	Gly	Asn	Arg	Asp	Trp	Gly	Tyr	Asp	Gly	Val	Phe	Leu	Tyr	Ala		
	GTT	CAA	AAT	ACT	TAT	GGC	GGA	CCA	TGG	GAA	TTG	GCT	AAG	CTA	GTA	AAC		528
	Val	Gln	Asn	Thr	Tyr	Gly	Gly	Pro	Trp	Glu	Leu	Ala	Lys	Leu	Val	Asn		
	GAG	GCA	CAT	AAA	AGG	GGA	ATA	GCC	GTA	ATT	TTG	GAT	GTT	GTA	TAT	AAT		576
	Glu	Ala	His	Lys	Arg	Gly	Ile	Ala	Val	Ile	Leu	Asp	Val	Val	Tyr	Asn		
	CAT	ATA	GGT	CCT	GAG	GGA	AAT	TAC	CTT	TTA	GGA	TTA	GGT	CCT	TAT	FTT		624
	His	Ile	Gly	Pro	Glu	Gly	Asn	Tyr	Leu	Leu	Gly	Leu	Gly	Pro	Tyr	Phe		
	TCA	GAC	AGA	TAT	AAA	ACT	CCA	TGG	GGA	TTA	ACA	TTT	AAT	TTT	GAT	GAT		672
	Ser	Asp	Arg	Tyr	Lys	Thr	Pro	Trp	Gly	Leu	Thr	Phe	Asn	Phe	Asp	Asp		
	AGG	GGA	TGT	GAT	CAA	GTT	AGA	AAA	TTC	ATT	TTA	GAA	AAT	GTC	GAG	TAT		720
	Arg	Gly	Cys	Asp	Gln	Val	Arg	Lys	Phe	Ile	Leu	Glu	Asn	Val	Glu	Tyr		
	TGG	TTT	AAG	ACC	TTT	AAA	ATC	GAT	GGT	CTG	AGA	CTG	GAT	GCA	GTT	CAT		768
	Trp	Phe	Lys	Thr	Phe	Lys	Ile	Asp	Gly	Leu	Arg	Leu	Asp	Ala	Val	His		
	GCA	ATT	TTT	GAT	AAT	TCG	CCT	AAG	CAT	ATC	CTC	CAA	GAG	ATA	GCT	GAA		816
	Ala	Ile	Phe	Asp	Asn	Ser	Pro	Lys	His	Ile	Leu	Gln	Glu	Ile	Ala	Glu		
	AAA	GCC	CAT	CAA	TTA	GGA	AAA	TTT	GTT	ATT	GCT	GAA	AGT	GAT	TTA	AAT		864
	Lys	Ala	His	Gln	Leu	Gly	Lys	Phe	Val	Ile	Ala	Glu	Ser	Asp	Leu	Asn		
	GAT	CCA	AAA	ATA	GTA	AAA	GAT	GAT	TGT	GGA	TAT	AAA	ATA	GAT	GCT	CAA		912
	Asp	Pro	Lys	Ile	Val	Lys	Asp	Asp	Cys	Gly	Tyr	Lys	Ile	Asp	Ala	Gln		
	TGG	GTT	GAC	GAT	TTC	CAC	CAC	GCA	GTT	CAT	GCA	TTC	ATA	ACC	AAA	GAA		960
	Trp	Val	Asp	Asp	Phe	His	His	Ala	Val	His	Ala	Phe	Ile	Thr	Lys	Glu		

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (48)

305	AAA	GAT	TAT	TAT	TAC	CAG	GAT	TTT	GGA	AGG	ATA	GAA	GAT	ATA	GAG	AAA	1008
	Lys	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Gln	Asp	Phe	Gly	Arg	Ile	Glu	Asp	Ile	Glu	Lys	
					325					330					335		
	ACT	TTT	AAA	GAT	GTT	TTT	GTT	TAT	GAT	GGA	AAG	TAT	TCT	AGA	TAC	AGA	1056
	Thr	Phe	Lys	Asp	Val	Phe	Val	Tyr	Asp	Gly	Lys	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Arg	
					340					345					350		
	GGA	AGA	ACT	CAT	GGT	GCT	CCT	GTA	GGT	GAT	CTT	CCA	CCA	CGT	AAA	TTT	1104
	Gly	Arg	Thr	His	Gly	Ala	Pro	Val	Gly	Asp	Leu	Pro	Pro	Arg	Lys	Phe	
					355					360					365		
	GTA	GTC	TTC	ATA	CAA	AAT	CAC	GAT	CAA	GTA	GGA	AAT	AGA	GGA	AAT	GGG	1152
	Val	Val	Phe	Ile	Gln	Asn	His	Asp	Gln	Val	Gly	Asn	Arg	Gly	Asn	Gly	
										375					380		
	GAA	AGA	CTT	TCC	ATA	TTA	ACC	GAT	AAA	ACG	ACA	TAC	CTT	ATG	GCA	GCC	1200
	Glu	Arg	Leu	Ser	Ile	Leu	Thr	Asp	Lys	Thr	Thr	Tyr	Leu	Met	Ala	Ala	
										395					400		
	ACA	CTA	TAT	ATA	CTC	TCA	CCG	TAT	ATA	CCG	CTA	ATA	TTT	ATG	GGC	GAG	1248
	Thr	Leu	Tyr	Ile	Leu	Ser	Pro	Tyr	Ile	Pro	Leu	Ile	Phe	Met	Gly	Glu	
					405					410					415		
	GAA	TAT	TAT	GAG	ACG	AAT	CCT	TTT	TTC	TTC	TTC	TCT	GAT	TTC	TCA	GAT	1296
	Glu	Tyr	Tyr	Glu	Thr	Asn	Pro	Phe	Phe	Phe	Phe	Ser	Asp	Phe	Ser	Asp	
					420					425					430		
	CCC	GTA	TTA	ATT	AAG	GGT	GTT	AGA	GAA	GGT	AGA	CTA	AAG	GAA	AAT	AAT	1344
	Pro	Val	Leu	Ile	Lys	Gly	Val	Arg	Glu	Gly	Arg	Leu	Lys	Glu	Asn	Asn	
					435					440					445		
	CAA	ATG	ATA	GAT	CCA	CAA	TCT	GAG	GAA	GCG	TTC	TTA	AAG	AGT	AAA	CTT	1392
	Gln	Met	Ile	Asp	Pro	Gln	Ser	Glu	Glu	Ala	Phe	Leu	Lys	Ser	Lys	Leu	
										455					460		
	TCA	TGG	AAA	ATT	GAT	GAG	GAA	GTT	TTA	GAT	TAT	TAT	AAA	CAA	CTG	ATA	1440
	Ser	Trp	Lys	Ile	Asp	Glu	Glu	Val	Leu	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Gln	Leu	Ile	
										470					480		
	AAT	ATC	AGA	AAG	AGA	TAT	AAT	AAT	TGT	AAA	AGG	GTA	AAG	GAA	GTT	AGG	1488
	Asn	Ile	Arg	Lys	Arg	Tyr	Asn	Asn	Cys	Lys	Arg	Val	Lys	Glu	Val	Arg	
										485					495		
	AGA	GAA	GGG	AAC	TGT	ATT	ACT	TTG	ATC	ATG	GAA	AAA	ATA	GGA	ATA	ATT	1536
	Arg	Glu	Gly	Asn	Cys	Ile	Thr	Leu	Ile	Met	Glu	Lys	Ile	Gly	Ile	Ile	
										505					510		
	GCA	TCG	TTT	GAT	GAT	ATT	GTA	ATT	AAT	TCT	AAA	ATT	ACA	GGT	AAT	TTA	1584
	Ala	Ser	Phe	Asp	Asp	Ile	Val	Ile	Asn	Ser	Lys	Ile	Thr	Gly	Asn	Leu	
										520					525		
	CTT	ATA	GGC	ATA	GGA	TTT	CCG	AAA	AAA	TTG	AAA	AAA	GAT	GAA	TTA	ATT	1632
	Leu	Ile	Gly	Ile	Gly	Phe	Pro	Lys	Lys	Leu	Lys	Lys	Asp	Glu	Leu	Ile	
										535					540		
	AAG	GTT	AAC	AGA	GGT	GTT	GGG	GTA	TAT	CAA	TTA	GAA					1668
	Lys	Val	Asn	Arg	Gly	Val	Gly	Val	Tyr	Gln	Leu	Glu					
										550					555		

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (49)

(6) S E Q I D N O : 6 的資料

(i) 序列特徵 :

(A) 長度 : 3 4 個鹼基對

(B) 種類 : 核酸

(C) 股 : 雙股

(D) 拓撲學 : 直線型

(i i) 分子種類 : 寡核苷

(x i) 序列編號 : S E Q I D N O : 6

CTGCAGTTTT TTAATAAAAT CAGGAGGAAA AAAT 34

(7) S E Q I D N O : 7 的資料

(i) 序列特徵 :

(A) 長度 : 9 個鹼基對和 4 個單一鹼基

(B) 種類 : 核酸

(D) 拓撲學 : 直線型

(i i) 分子種類 : 合成的 D N A

(x i) 序列編號 : S E Q I D N O : 7

5'-TGAAGCTTGA GCT-3'
3'-ACTTCGAAC -5'

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

四、中文發明摘要(發明之名稱：

自非還原醣釋出海藻糖之重組型對熱安定的酵素，彼之製法和用途

一種重組型對熱安定的酵素，其分子量約54000-64000道耳頓和等電點為5.6-6.6。其具有將葡萄糖聚合度至少為3且末端帶有海藻糖構造的非還原性醣所含的海藻糖釋出的活性。本酵素具有極佳對熱安定性，即即使於pH 7.0水溶液、85°C加熱60分鐘仍不會失去活性。因此可促進大規模和高產量的生產海藻糖。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

英文發明摘要(發明之名稱：Recombinant thermostable enzyme which releases trehalose from non-reducing saccharide, its preparation and use

Disclosed is a recombinant thermostable enzyme which has a molecular weight of about 54,000-64,000 daltons and a pI of about 5.6-6.6, and releases trehalose from non-reducing saccharides having a trehalose structure as an end unit and a degree of glucose polymerization of at least 3. The enzyme has a satisfactorily-high thermostability, i.e. it is not substantially inactivated even when incubated in an aqueous solution (pH 7.0) at 85°C for 60 min, and this facilitates the production of trehalose on an industrial scale and in a satisfactorily-high yield.

訂

線

86年9月1日 修正
補充

公告本

A8
B8
C8
D8

六、申請專利範圍

附件(A): 第84107697號專利申請案
418255
中文申請專利範圍修正本

民國86年9月修正

1. 一種重組型對熱安定之酵素，其係具有下列物化特性：

(1) 作用機制：

自葡萄糖聚合度至少為3且末端帶有海藻糖結構的非還原糖釋出海藻糖；

(2) 分子量：

以硫酸十二酯鈉聚丙稀醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)分析約為 59000 ± 5000 道耳頓；

(3) 等電點(pI)：

以等電電泳分析約為 6.1 ± 0.5 ；

(4) 熱安定性

本質上即使於pH 7.0之水溶液中、於85℃下加熱60分鐘，仍不會失去活性；

(5) 比活性

至少約為720單位/mg蛋白質；及，

(6) 胺基酸序列

六、申請專利範圍

SEQ ID NO: 1

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

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

原

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

六、申請專利範圍

Gly	Lys	Tyr	Ser	Arg	Tyr	Arg	Gly	Arg	Thr	His	Gly	Ala	Pro	Val
				350					355					360
Gly	Asp	Leu	Pro	Pro	Arg	Lys	Phe	Val	Val	Phe	Ile	Gln	Asn	His
				365					370					375
Asp	Gln	Val	Gly	Asn	Arg	Gly	Asn	Gly	Glu	Arg	Leu	Ser	Ile	Leu
				380					385					390
Thr	Asp	Lys	Thr	Thr	Tyr	Leu	Met	Ala	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ile	Leu
				395					400					405
Ser	Pro	Tyr	Ile	Pro	Leu	Ile	Phe	Met	Gly	Glu	Glu	Tyr	Tyr	Glu
				410					415					420
Thr	Asn	Pro	Phe	Phe	Phe	Phe	Ser	Asp	Phe	Ser	Asp	Pro	Val	Leu
				425					430					435
Ile	Lys	Gly	Val	Arg	Glu	Gly	Arg	Leu	Lys	Glu	Asn	Asn	Gln	Met
				440					445					450
Ile	Asp	Pro	Gln	Ser	Glu	Glu	Ala	Phe	Leu	Lys	Ser	Lys	Leu	Ser
				455					460					465
Trp	Lys	Ile	Asp	Glu	Glu	Val	Leu	Asp	Tyr	Tyr	Lys	Gln	Leu	Ile
				470					475					480
Asn	Ile	Arg	Lys	Arg	Tyr	Asn	Asn	Cys	Lys	Arg	Val	Lys	Glu	Val
				485					490					495
Arg	Arg	Glu	Gly	Asn	Cys	Ile	Thr	Leu	Ile	Met	Glu	Lys	Ile	Gly
				500					505					510
Ile	Ile	Ala	Ser	Phe	Asp	Asp	Ile	Val	Ile	Asn	Ser	Lys	Ile	Thr
				515					520					525
Gly	Asn	Leu	Leu	Ile	Gly	Ile	Gly	Phe	Pro	Lys	Lys	Leu	Lys	Lys
				530					535					540
Asp	Glu	Leu	Ile	Lys	Val	Asn	Arg	Gly	Val	Gly	Val	Tyr	Gln	Leu
				545					550					555
Glu														

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

原

2. 一種編碼如申請專利範圍第1項的重組型對熱安定之酵素的DNA，其係含有SEQ ID NO: 2之核苷酸序列

六、申請專利範圍

S E Q I D N O : 2

ATGTTTTTCGT	TCGGTGGAAA	TATTGAAAAA	AATAAAGGTA	TCTTTAAGTT	ATGGGCACCT	60
TATGTTAATA	GTGTTAAGCT	GAAGTTAAGC	AAAAAACTTA	TTCCAATGGA	AAAAAACGAT	120
GAGGGATTTT	TCGAAGTAGA	AATAGACGAT	ATCGAGGAAA	ÀTTTAACCTA	TTCTTATATT	180
ATAGAAGATA	AGAGAGAGAT	ACCTGATCCC	GCATCACGAT	ATCAACCTTT	AGGAGTTCAT	240
GACAAATCAC	AACTTATAAG	AACAGATTAT	CAGATTCTTG	ACCTTGGAAA	AGTAAAAATA	300
GAAGATCTAA	TAATATATGA	ACTCCACGTT	GGTACTTTTT	CCCAAGAAGG	AAATTTCAAA	360
GGAGTAATAG	AAAAGTTAGA	TTACCTCAAG	GATCTAGGAA	TCACAGGAAT	TGAACGTATG	420
CCTGTGGCAC	AATTTCCAGG	GAATAGAGAT	TGGGGATACG	ATGGTGTTTT	TCTATACGCA	480
GTTCAAAATA	CTTATGGCGG	ACCATGGGAA	TTGGCTAAGC	TAGTAAACGA	GGCACATAAA	540
AGGGGAATAG	CCGTAATTTT	GGATGTTGTA	TATAATCATA	TAGGTCCTGA	GGGAAATTAC	600
CTTTTAGGAT	TAGGTCCTTA	TTTTTCAGAC	AGATATAAAA	CTCCATGGGG	ATTAACATTT	660
AATTTTGATG	ATAGGGGATG	TGATCAAGTT	AGAAAATTCA	TTTTAGAAAA	TGTCGAGTAT	720
TGGTTTAAGA	CCTTTAAAAT	CGATGGTCTG	AGACTGGATG	CAGTTCATGC	AATTTTTGAT	780
AATTCGCTA	AGCATATCCT	CCAAGAGATA	GCTGAAAAAG	CCCATCAATT	AGGAAAATTT	840
GTTATTGCTG	AAAGTGATTT	AAATGATCCA	AAAATAGTAA	AAGATGATTG	TGGATATAAA	900
ATAGATGCTC	AATGGGTTGA	CGATTTCCAC	CACGCAGTTC	ATGCATTCAT	AACCAAAGAA	960
AAAGATTATT	ATTACCAGGA	TTTTGGAAGG	ATAGAAGATA	TAGAGAAAAC	TTTTAAAGAT	1020
GTTTTTGTTT	ATGATGGAAA	GTATTCTAGA	TACAGAGGAA	GAACTCATGG	TGCTCCTGTA	1080
GGTGATCTTC	CACCACGTAA	ATTTGTAGTC	TTCATACAAA	ÀTCACGATCA	AGTAGGAAAT	1140
AGAGGAAATG	GGGAAAGACT	TTCCATATTA	ACCGATAAAA	CGACATACCT	TATGGCAGCC	1200
ACACTATATA	TACTCTCACC	GTATATACCG	CTAATATTTA	TGGGCGAGGA	ATATTATGAG	1260
ACGAATCCTT	TTTTCTTCTT	CTCTGATTTT	TCAGATCCCG	TATTAATTAA	GGGTGTTAGA	1320
GAAGGTAGAC	TAAAGGAAAA	TAATCAAATG	ATAGATCCAC	AATCTGAGGA	AGCGTTCTTA	1380
AAGAGTAAAC	TTTCATGGAA	AATTGATGAG	GAAGTTTTAG	ATTATTATAA	ACAACGTATA	1440
AATATCAGAA	AGAGATATAA	TAATTGTAAA	AGGGTAAAGG	AAGTTAGGAG	AGAAGGGAAC	1500
TGTATTACTT	TGATCATGGA	AAAAATAGGA	ATAATTGCAT	CGTTTGATGA	TATTGTAATT	1560
AATTCTAAAA	TTACAGGTAA	TTTACTTATA	GGCATAGGAT	TTCCGAAAAA	ATTGAAAAAA	1620
GATGAATTAA	TTAAGGTTAA	CAGAGGTGTT	GGGGTATATC	AATTAGAA		1668

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

3. 如申請專利範圍第2項的DNA，其中SEQ ID NO: 2的一個或多個鹼基係藉由遺傳密碼之簡併性被其他鹼基所取代，但不改變SEQ ID NO: 1的胺基酸序列或實質性質。

4. 如申請專利範圍第2項的DNA，其係源自於酸熱硫化葉菌(ATCC 33909)。

5. 一種自葡萄糖聚合度至少為3且末端帶有海藻糖結構的非還原醣釋出海藻糖之酶催化方法，其係包含令如申請專利範圍第1項的重組型對熱安定之酵素作用於該非

六、申請專利範圍

還原醣上以釋出海藻糖的步驟。

6. 如申請專利範圍第5項的方法，其包含共存在該重組型對熱安定之酵素於一以乾固體計含有50 w / w % 或低於50 w / w % 之該非還原醣之水溶性溶液中，且以溫度超過55 °C之溫度下令該重組型對熱安定之酵素作用於該非還原醣上。

7. 如申請專利範圍第5項的方法，其中該非還原醣係受非還原醣生成酵素之作用，且所生成之非還原醣係受該重組型對熱安定酵素之作用。

8. 如申請專利範圍第5項的方法，其中該非還原醣係選自 α -葡萄糖基海藻糖、 α -麥芽糖基海藻糖、 α -麥芽三糖基海藻糖、 α -麥芽四糖基海藻糖、 α -麥芽五糖基海藻糖或其混合物。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

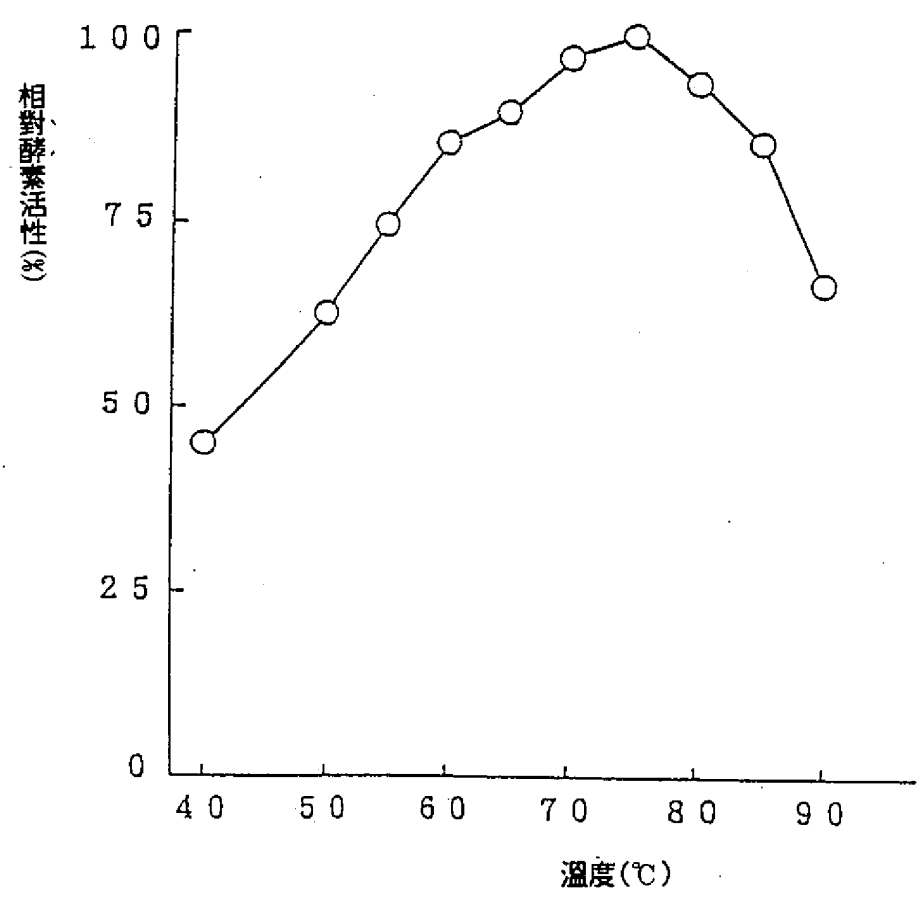
訂

線

86. 4. 23 修正
年 月 日 補充

附件五、第84107697號專利申請案
中文圖式修正本
民國86年4月修正

圖 1



418255

圖 2

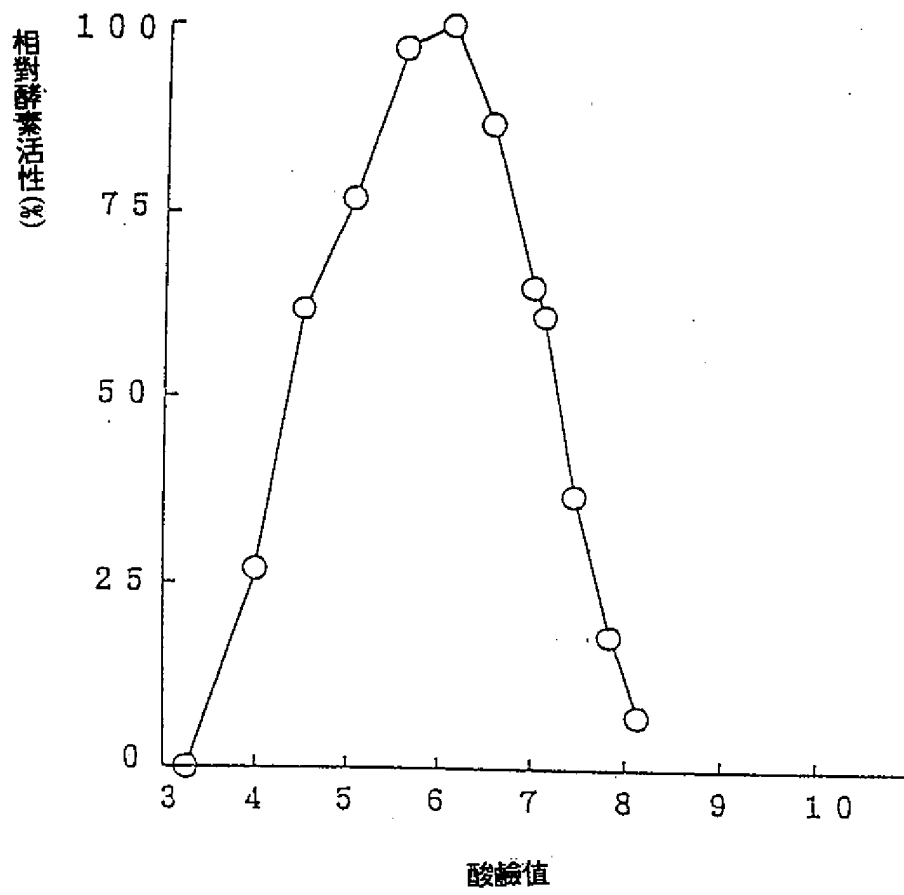


圖 3

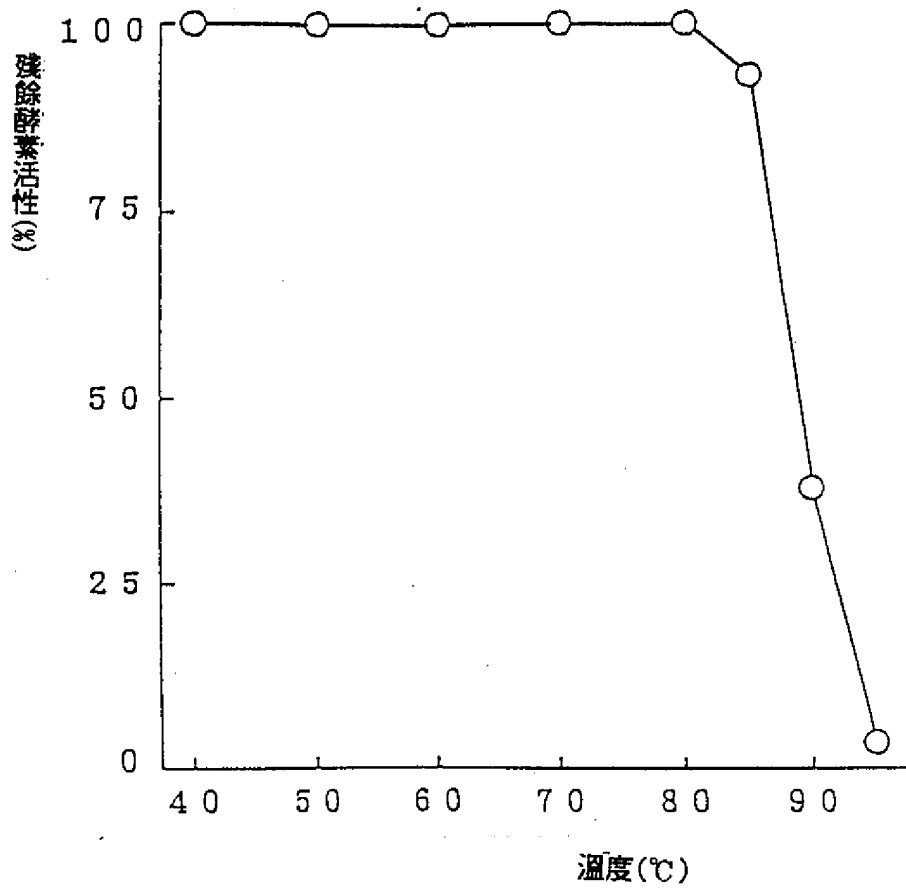
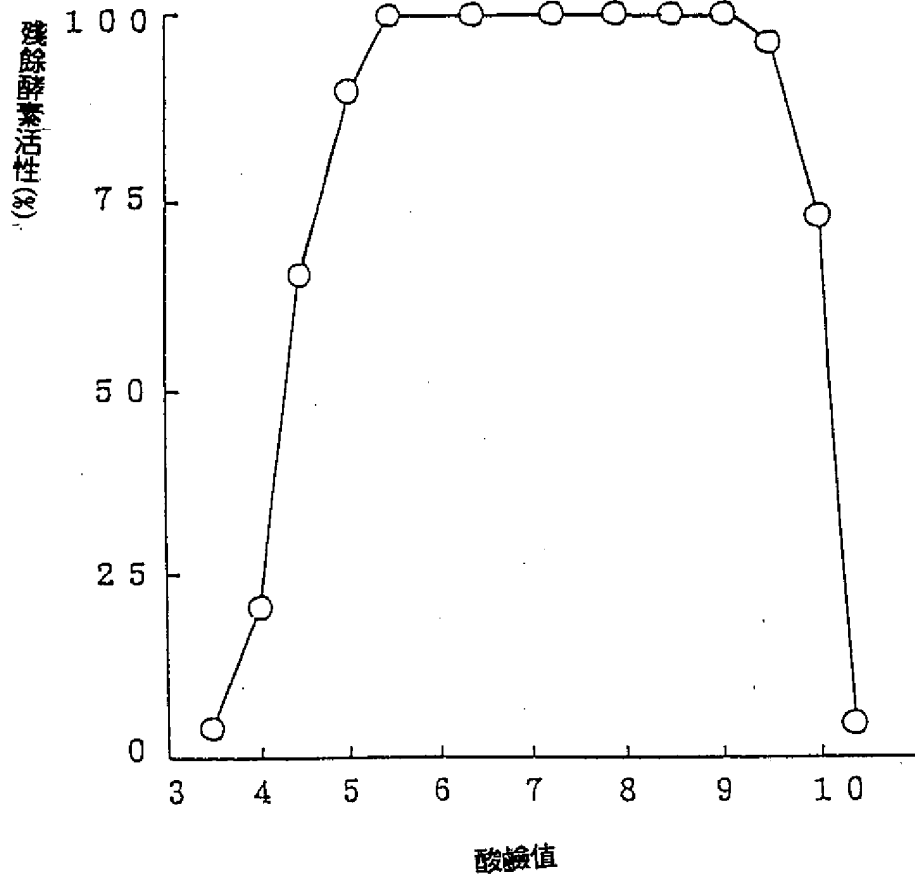
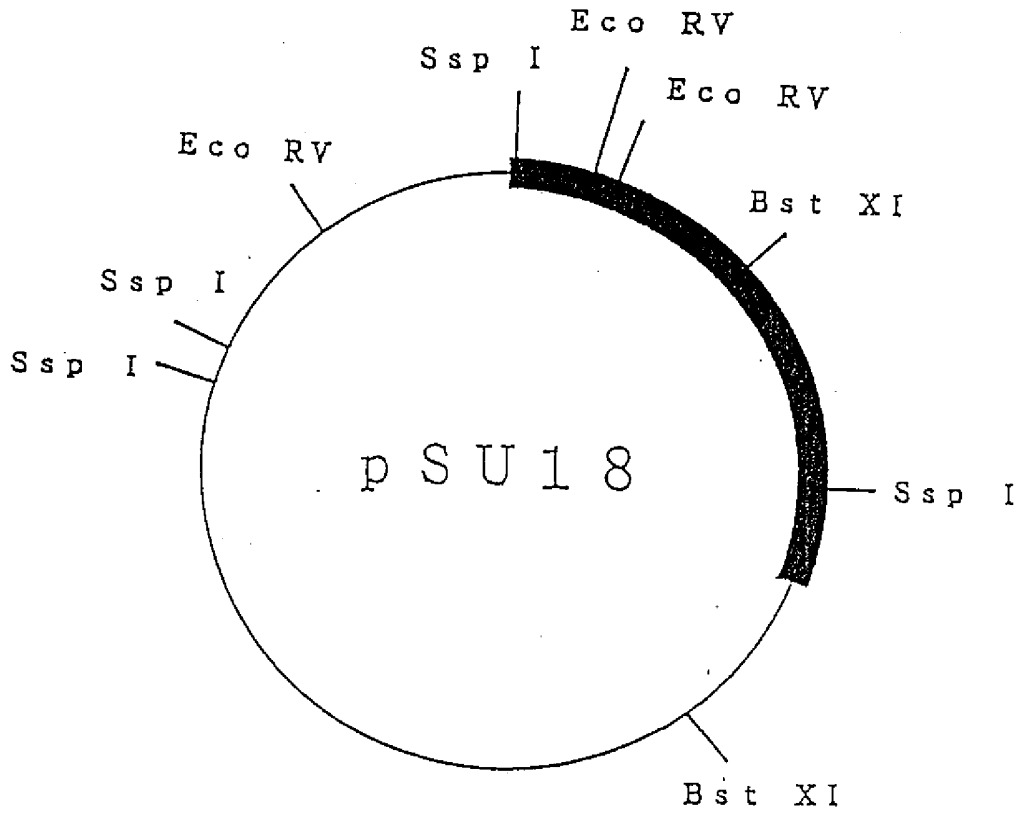


圖 4



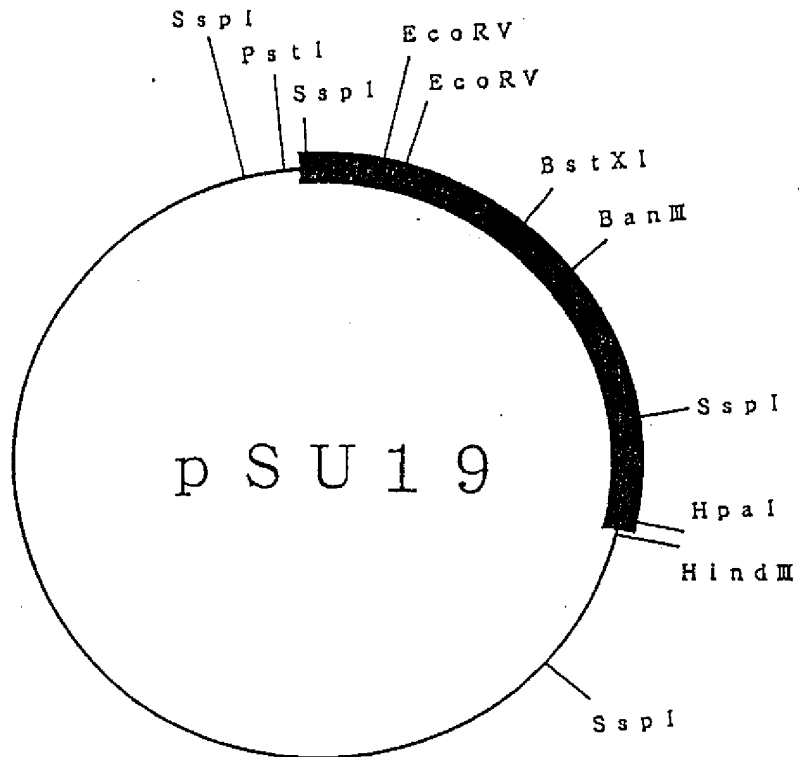
418255

圖 5



418255

6



申請日期	84年7月25日
案號	84107697
類別	C12N 9/64, 15/31, 15/52, C12P 21/02

86. 4. 23 修正
 年 月 日
 補充

418255
 418255

公告本

(以上各欄由本局填註)

發 明 專 利 說 明 書

~~新 型~~

一、 發明 名稱 新型	中 文	自非還原醣釋出海藻糖之重組型對熱安定的酵素、彼之製法和用途
	英 文	Recombinant thermostable enzyme which releases trehalose from non-reducingsaccharide, its preparation and use
二、 發明人 創作	姓 名	(1) 三敏仁志 (2) 久保田倫夫 (3) 杉本利行
	國 籍	(1) 日本 (2) 日本 (3) 日本
	住、居所	(1) 日本國岡山縣岡山市桑野五二五番三—一〇二號 (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東陸六九五番四四號
三、申請人	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
	住、居所 (事務所)	(1) 日本國岡山縣岡山市下石井一丁目二番三號
	代 表 人 姓 名	(1) 林原健

五、發明說明(2)

理論上難以利用增加受質含量而增加海藻糖產率，因為本酵素反應本質上是二種不同酵素反應的平衡反應，此平衡點是傾向於形成葡萄糖磷酸鹽。

回顧以往，本發明者積極篩選可自澱粉類醣形成帶有海藻糖的醣類，他們自根瘤菌屬 (Rhizobium) 和分節芽胞桿菌屬 (Arthrobacter) 發現一種新型酵素，其可自葡萄糖聚合度至少為 3 的還原性澱粉類醣形成末端帶有海藻糖構造的非還原醣。此一酵素刊載於日本專利公開公報 No. 349, 216 / 93。同時他們發現：根瘤菌屬和分節芽胞桿菌屬產生的其他酵素可將這些非還原醣幾乎水解成海藻糖和葡萄糖和 / 或麥芽寡醣。

由上述微生物產生的酵素的最適溫度為 40 °C，因此當使用這些酵素以製造海藻糖時，會有熱安定性方面的困難。因為在此領域中認為：澱粉或澱粉類醣的澱粉化反應的建議溫度為超過 55 °C，因為當反應溫度低於 55 °C 時會發生細菌污染而降低反應混合物的酸鹼值和使酵素失去活性。因此相當大量的受質仍未被催化。當使用的酵素有較差的熱安定性時，必須小心控制酸鹼值，當酸鹼值降到相當低時，必須儘快加鹼至反應混合物內而增加其酸鹼值。

回顧以往，本發明者積極篩選具有酵素活性且對熱安定的酵素，他們自酸熱硫化葉菌 (Sulfolobus acidocaldarius) (ATCC 33909) 產生的酵素發現，即使於超過 55 °C 反應，本酵素仍不會失去活性。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(3)

它們可自葡萄糖聚合度至少為3且末端帶有海藻糖的非還原醣釋出海藻糖。然而這些微生物無法有效率生產這酵素，需要大規模培養以自非還原醣產生海藻糖。

最近，重組DNA技術有顯著進展。現今，即使酵素所有的胺基酸序列並未解讀，假如編碼此酵素的基因已被分離且鹼基序列被解讀，則可製備所需的酵素量。把可編碼此酵素的DNA嵌入載體內製備重組DNA，再把此重組DNA送入微生物或動植物細胞並培養其轉形物。因此，目前最急需要找到此對熱安定酵素的基因並解開其鹼基序列。

本發明的摘要

本發明的第一個目標是提供一種重組型對熱安定酵素，其可自葡萄糖聚合度至少為3且末端帶有海藻糖構造的非還原醣釋出海藻糖。

本發明的第二個目標是提供可編碼此重組型對熱安定酵素的DNA。

本發明的第三個目標是提供含有此DNA的可複製重組DNA。

本發明的第四個目標是提供一含有重組DNA的轉形物。

本發明的第五個目標是提供利用轉形物製備此重組型對熱安定酵素的步驟。

本發明的第六個目標是提供一酵素轉化方法，其可自

(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：

自非還原醣釋出海藻糖之重組型對熱安定的酵素，彼之製法和用途

一種重組型對熱安定的酵素，其分子量約54000-64000道耳頓和等電點為5.6-6.6。其具有將葡萄糖聚合度至少為3且末端帶有海藻糖構造的非還原性醣所含的海藻糖釋出的活性。本酵素具有極佳對熱安定性，即即使於pH 7.0水溶液、85°C加熱60分鐘仍不會失去活性。因此可促進大規模和高產量的生產海藻糖。

英文發明摘要(發明之名稱：Recombinant thermostable enzyme which releases trehalose from non-reducing saccharide, its preparation and use

Disclosed is a recombinant thermostable enzyme which has a molecular weight of about 54,000-64,000 daltons and a pI of about 5.6-6.6, and releases trehalose from non-reducing saccharides having a trehalose structure as an end unit and a degree of glucose polymerization of at least 3. The enzyme has a satisfactorily-high thermostability, i.e. it is not substantially inactivated even when incubated in an aqueous solution (pH 7.0) at 85°C for 60 min, and this facilitates the production of trehalose on an industrial scale and in a satisfactorily-high yield.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

86年9月1日 修正
補充

公告本

A8
B8
C8
D8

六、申請專利範圍

附件(A): 第84107697號專利申請案
418255
中文申請專利範圍修正本

民國86年9月修正

1. 一種重組型對熱安定之酵素，其係具有下列物化特性：

(1) 作用機制：

自葡萄糖聚合度至少為3且末端帶有海藻糖結構的非還原糖釋出海藻糖；

(2) 分子量：

以硫酸十二酯鈉聚丙稀醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)分析約為 59000 ± 5000 道耳頓；

(3) 等電點(pI)：

以等電電泳分析約為 6.1 ± 0.5 ；

(4) 熱安定性

本質上即使於pH 7.0之水溶液中、於85℃下加熱60分鐘，仍不會失去活性；

(5) 比活性

至少約為720單位/mg蛋白質；及，

(6) 胺基酸序列

418255

86. 4. 23 修正
年 月 日 補充

附件五、第84107697號專利申請案
中文圖式修正本
民國86年4月修正

圖 1

