I359014

公告本

發明專利說明書

（本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※ 申請案號：94121388

※ 申請日期：94/06/27　　※IPC 分類：A61K 31/198 (2006.01)
C12P 13/02 (2006.01)

一、發明名稱：（中文/英文）

茶胺酸之製造方法

二、申請人：（共 1 人）

姓名或名稱：（中文/英文）

太陽化學股份有限公司 / TAIYOKAGAKU CO., LTD.（太陽化学株式会社）

代表人：（中文/英文）

山崎長宏 / YAMAZAKI Nagahiro

住居所或營業所地址：（中文/英文）

日本國三重縣四日市市赤堀新町 9 番 5 號

9-5, Akahorishinmachi Yokkaichi-shi, Mie 510-0825 Japan

國　籍：（中文/英文）

日本 / Japan

三、發明人：（共 3 人）

姓　名：（中文/英文）

(1)岡田幸隆 / OKADA Yukitaka（岡田幸隆）

(2)小關誠 / OZEKI Makoto（小関誠）

(3)青井暢之 / AOI Nobuyuki

國　籍：（中文/英文）

(1)~(3)日本 / Japan

四、聲明事項：

□ 主張專利法第二十二條第二項□第一款或□第二款規定之事實，其事實發生日期為：　年　月　日。

☑ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號　順序註記】

☑ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 日本；2004/06/28；2004-189048
2. 日本；2004/12/27；2004-376443
3.
4.
5.

□ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

□ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號　順序註記】

□ 主張專利法第三十條生物材料：

□ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼　順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼　順序註記】

□ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

L-麩醯胺與乙胺合成茶胺酸的酵素法（日本專利特開平11-225789）。另外，已開發出將此酵素於載體上固定化的酵素法（日本專利特開平 5-328986）。但是，於使用來自假單胞菌屬之麩醯胺酶的情形中，經由合成茶胺酸的反應與水解反應，令 L-麩醯胺酸以副反應物型式合成。因此，副產物的 L-麩醯胺酸具有令茶胺酸精製煩雜的問題點。

[專利文獻 1] 日本專利特開平 11-225789 號公報

[專利文獻 2] 日本專利特開平 5-328986 號公報

[非專利文獻 1] Chem. Parm. Bull., 19 (7) 1301-1307 (1971)

【發明內容】

（發明所欲解決之問題）

本發明為鑑於上述問題而完成，其目的為在於提供茶胺酸的有效率製造方法。

（解決問題之手段）

發明者等人為了解決前述課題而重複致力研究，結果發現使用來自芽孢桿菌屬、黴菌或酵母中之一種或二種以上微生物的麩醯胺酶，可於高產率下合成茶胺酸，且副產物為極少量，而基本完成本發明。即，本發明的要旨為關於茶胺酸的製造方法，其特徵為，對麩醯胺與乙胺衍生物的混合物，以來自芽孢桿菌屬、黴菌或酵母中之一種或二種以上微生物的麩醯胺酶作用。

（發明效果）

若根據本發明，則提供茶胺酸之有效率的新穎製造方

法，為簡易且可於工業上有利的生產。即，經由使用來自芽孢桿菌屬、黴菌或酵母中之一種或二種以上微生物的麩醯胺酶，則可確認比以往更高的茶胺酸轉換率，且可進行工業性生產。

【實施方式】

其次，詳細說明本發明的實施形態，但本發明之技術性範圍並非被下述之實施形態所限定，且不變更其要旨下，可作出各式各樣改變而實施。又，本發明的技術性範圍為及於均等範圍為止。

本發明所用之茶胺酸為茶的葉中所含的麩醯胺酸衍生物，為茶味道的主成分，被使用於以呈現味道為用途的食品添加物。具體而言，為被稱為γ－麩醯胺基乙醯胺、L－麩醯胺酸－γ－乙醯胺等的化合物。

本發明所用的乙胺衍生物可列舉乙胺、乙胺鹽酸鹽、乙胺氯化金酸鹽、乙胺脂肪酸鹽、乙胺苦味酸鹽、乙胺之N－苯磺醯化合物、乙胺之N－對－甲苯磺醯化合物等，但並非限定於此。又，其中，特別以使用乙胺、乙胺鹽酸鹽為佳。

本發明中之麩醯胺酶為具有水解L－麩醯胺生成L－麩醯胺酸的麩醯胺酶活性，可使用於味噌、醬油等醱酵食品的味道提升、呈現味道性提升。已知麩醯胺酶為於鹼性條件下，γ－麩醯胺基轉移活性為比水解活性更高，亦可利用於茶胺酸為首的烷基醯胺合成。

本發明中之麩醯胺酶活性為以L－麩醯胺作為基質令酵素作用，並藉由定量所生成之L－麩醯胺酸而加以測量。生

成的L-麩醯胺酸量可使用市售的套件，例如，使用F套件L-麩醯胺酸(羅蘇·戴雅各諾斯提克斯公司)進行測量。本酵素的單位為將每1分鐘生成1微莫耳之麩醯胺酸的酵素量定義為「mU」。又，使用此定義，將溶液中之蛋白質每1毫克的酵素量定義為麩醯胺酶比活性「mU/mg」。

本發明中之芽孢桿菌屬為於細胞型態學上，具有格蘭氏陽性之嗜氧性菌、桿菌、芽胞形成能力、運動性等各性質的微生物。

本發明中來自芽孢桿菌屬之麩醯胺酶的起源並無特別限定，較佳為來自枯草桿菌(Bacillus subtilis)、解澱粉芽孢桿菌(Bacillus amyloliquefaciens)、凝結芽孢桿菌(Bacillus coagulans)、遲緩芽孢桿菌(Bacillus lentus)、地衣芽孢桿菌(Bacillus licheniformis)、多黏芽孢桿菌(Bacillus polymixa)、嗜熱脂肪芽孢桿菌(Bacillus stearothermophilus)、嗜熱解蛋白酶芽孢桿菌(Bacillus thermoproteolyticus)的酵素。若由麩醯胺酶比活性特別高的菌為佳的觀點來看，則最佳為來自枯草桿菌、解澱粉芽孢桿菌的麩醯胺。

又，來自芽孢桿菌屬的麩醯胺酶亦可使用應用生物技術，經由基因重組等之改質菌所製造者。

本發明中之黴菌為真菌類之中，菌絲為纏繞成為不定形之集合體的總稱，可見於許多藻菌類、子囊菌類及一部分担子菌類中。

本發明中來自黴菌之麩醯胺酶的起源並無特別限定，較

佳為來自米曲酶(Aspergillus oryzae)、黑黴菌(Aspergillus niger)、青黴菌(Penicillium notatum)、匐枝根黴菌(Rizopus stolonifer)、史普諾斯毛黴菌(Mucor sponosus)的酵素。由麩醯胺酶比活性特別高的菌為佳的觀點而言，最佳為來自綠黴菌、黑黴菌的麩醯胺酶。

又，來自黴菌之麩醯胺酶亦可使用應用生物技術，經由基因重組等之改質菌所製造者。

本發明中之酵母為屬於子囊菌屬的菌類。不含有葉綠素，雖經由出芽而繁殖，但亦可經由分裂。被利用於酒類、醬油、麵包等的製造。

本發明中來自酵母之麩醯胺酶的起源並無特別限定，較佳為來自釀酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)、魯酵母菌(Saccharomyces rouxii)、高蛋白假絲酵母(Candida utilis)、南極念珠菌(Candida antarctica)、雅諾馬拉漢歇納(Hansenulla anomala)、八孢裂殖酵母(Schizosaccaromyces octosporus)的酵素。若由麩醯胺酶比活性特別高的菌為佳的觀點來看，則最佳為來自釀酒酵母、魯酵母菌、高蛋白假絲酵母、南極念珠菌的麩醯胺酶。

又，來自酵母的麩醯胺酶亦可使用應用生物技術，經由基因重組等之改質菌所製造者。

上述來自芽孢桿菌屬、黴菌、酵母等之微生物的麩醯胺酶亦可使用(1)微生物本身、或(2)由微生物所抽出的粗製酵素。但是，若由茶胺酸轉換率的觀點來看，則以使用由微生物所精製的麩醯胺酶為佳。麩醯胺酶的精製方法可使

用公知的任何酵素精製法。可例示如柱層析、使用溶劑之分配、透析、超過濾、電泳、以中性鹽的分級鹽析、使用乙醇、丙酮的分級沈澱法、HPLC 等。其中,以組合溶劑分配及各種層析、HPLC,精製麩醯胺酶為佳。更且,亦可組合 CM-纖維素柱層析、塞佛蒂克斯 G150 柱層析、羥基磷灰石柱層析、丁基-東洋珠(Toyopearl)柱層析。

如此,本發明之茶胺酸的製造方法中,以令來自芽孢桿菌屬、青黴屬、根黴屬、毛黴屬、麴菌屬、漢歇納屬、裂殖酵母屬、念珠菌屬中之一種或二種以上微生物的麩醯胺酶作用於麩醯胺和乙胺衍生物為佳。於此情形中,(1)以此等微生物之培養上澄液的麩醯胺酶比活性為 10mU/mg 以上之條件培養之情況為佳,又,(2)關於麩醯胺酶,使用本發明中之主產物的茶胺酸與副產物的麩醯胺酸之比(茶胺酸/麩醯胺酸)為大於 5 者,係就減少副產物方面而言為佳。

本發明中之茶胺酸酶合成時的液性並無特別限定,但以 pH 為約 9~12 為佳,且以約 10~11 為更佳。又,反應溫度雖無特別限定,但以約 0℃~45℃為佳,且以約 4℃~30℃為更佳。使用作為基質的 L-麩醯胺、乙胺衍生物濃度並無特別限定,但以 L-麩醯胺約 0.1 莫耳以上、乙胺衍生物約 1 莫耳以上為佳。本發明中之 L-麩醯胺除了含有純的 L-麩醯胺以外,含有 L-麩醯胺鈉鹽等之適當的無機鹽或有機鹽。

將本發明之方法所合成的茶胺酸由反應液中單離精製上,可使用公知的任何胺基酸精製法,可例示如柱層析、使用溶劑之分配、透析、晶析、超過濾、電泳、以中性鹽

的分級鹽析、使用乙醇、丙酮的分級沈澱法、HPLC等。其中，以組合溶劑分配及各種層析、HPLC為佳。更且，亦可組合CM-纖維素柱層析、塞佛蒂克斯G150柱層析、羥基磷灰石柱層析、丁基-東洋珠柱層析。

本發明中之載體為將麩醯胺酶固定化者，可列舉如矽藻石(Celite)、矽藻土、高嶺土、矽膠、分子篩、多孔質玻璃、活性碳、碳酸鈣、陶瓷等無機載體、陶瓷粉末、聚乙烯醇、聚丙烯、幾丁聚糖、離子交換樹脂、斥水吸黏樹脂、螯合樹脂、合成吸黏樹脂等有機高分子等，但並非限定於此。

[實施例]

以下，根據實施例及比較例更加詳細說明本發明。其為本發明之實施例的一部分，本發明不被該實施例及試驗例所限定。

(實施例1)

將枯草桿菌以含有葡萄糖0.3%、聚蛋白3.0%、酵母萃取物1.0%、氯化鈉0.5%之pH7.0的培養基於30℃之溫度下培養。將所得之培養液離心，取得培養上澄液。於此培養上澄液中添加冷乙醇，並將所得之沈澱物離心、回收。將所得之沈澱物溶解於磷酸緩衝溶液(pH7.0)，並進行透析。透析液為使用DEAE-Sepharose Fast Flow，吸黏後，以鹽溶液予以溶離，提高蛋白質的純度。將所得之麩醯胺酶溶液使用UF膜(UFP-5-C-3MA)(亞馬相 生物科技(股))，進行濃縮及脫鹽，取得精製麩醯胺酶。培養上澄液的麩醯胺酶

比活性為 67mU/mg。

(實施例 2)

將解澱粉芽孢桿菌以含有葡萄糖 0.3%、聚蛋白 3.0%、酵母萃取物 1.0%、氯化鈉 0.5%之 pH7.0 的培養基於 30℃之溫度下培養。將所得之培養液離心，取得培養上澄液。於此培養上澄液中添加冷乙醇，並將所得之沈澱物離心、回收。將所得之沈澱物溶解於磷酸緩衝溶液(pH7.0)，並進行透析。透析液為使用 DEAE-Sepharose Fast Flow，吸黏後，以鹽溶液予以溶離，提高蛋白質的純度。將所得之麩醯胺酶溶液使用 UF 膜(UFP-5-C-3MA)(亞馬相 生物科技(股))，進行濃縮及脫鹽，取得精製麩醯胺酶。培養上澄液的麩醯胺酶比活性為 53mU/mg。

(實施例 3)

將凝結芽孢桿菌以含有葡萄糖 0.3%、聚蛋白 3.0%、酵母萃取物 1.0%、氯化鈉 0.5%之 pH7.0 的培養基於 30℃之溫度下培養。將所得之培養液離心，取得培養上澄液。於此培養上澄液中添加冷乙醇，並將所得之沈澱物離心、回收。將所得之沈澱物溶解於磷酸緩衝溶液(pH7.0)，並進行透析。透析液為使用 DEAE-Sepharose Fast Flow，吸黏後，以鹽溶液予以溶離，提高蛋白質的純度。將所得之麩醯胺酶溶液使用 UF 膜(UFP-5-C-3MA)(亞馬相 生物科技(股))，進行濃縮及脫鹽，取得精製麩醯胺酶。培養上澄液的麩醯胺酶比活性為 43mU/mg。

(實施例 4)

將地衣芽孢桿菌以含有葡萄糖0.3%、聚蛋白3.0%、酵母萃取物1.0%、氯化鈉0.5%之pH7.0的培養基於30℃之溫度下培養。將所得之培養液離心，取得培養上澄液。於此培養上澄液中添加冷乙醇，並將所得之沈澱物離心、回收。將所得之沈澱物溶解於磷酸緩衝溶液(pH7.0)，並進行透析。透析液為使用DEAE-Sepharose Fast Flow，吸黏後，以鹽溶液予以溶離，提高蛋白質的純度。將所得之麩醯胺酶溶液使用UF膜(UFP-5-C-3MA)(亞馬相 生物科技(股))，進行濃縮及脫鹽，取得精製麩醯胺酶。培養上澄液的麩醯胺酶比活性為40mU/mg。

(實施例5)

將蠟狀芽孢桿菌(Bacillus cereus)以含有葡萄糖0.3%、聚蛋白3.0%、酵母萃取物1.0%、氯化鈉0.5%之pH7.0的培養基於30℃之溫度下培養。將所得之培養液離心，取得培養上澄液。於此培養上澄液中添加冷乙醇，並將所得之沈澱物離心、回收。將所得之沈澱物溶解於磷酸緩衝溶液(pH7.0)，並進行透析。透析液為使用DEAE-Sepharose Fast Flow，吸黏後，以鹽溶液予以溶離，提高蛋白質的純度。將所得之麩醯胺酶溶液使用UF膜(UFP-5-C-3MA)(亞馬相 生物科技(股))，進行濃縮及脫鹽，取得精製麩醯胺酶。培養上澄液的麩醯胺酶比活性為5mU/mg。

(比較例1) 來自硝基還原假單胞菌(Pseudomonas nitroreducens)之精製麩醯胺酶的調製

將硝基還原假單胞菌使用含有麩醯胺酸鈉0.6%、酵母萃

取物0.1%、葡萄糖1.0%、KH_2PO_4 0.05%、K_2HPO_4 0.05%、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.07%、EDTA-Fe 0.01%的培養液(pH7)，於30公升容積之醱酵罐(Jar-fermentor)(30公升、通氣1vvm=25公升/分、迴轉數2,000rpm)中，將硝基還原假單胞菌培養約20小時。將所得培養液175公升部分的菌體洗淨後，懸浮於30mM磷酸鉀緩衝液(pH7.0)7.5公升中，並於5~20℃下超音波弄碎，取得菌體破碎物。

一邊以7%氨水將pH調整至7，一邊將菌體破碎物進行硫酸銨分級，取得45~90%飽和餾分。將其溶於0.01M磷酸鉀緩衝液中，並且對相同緩衝液透析。吸黏至DEAE-纖維素柱(15×60公分)，並且以含有0.1M食鹽之緩衝液溶出麩醯胺酶，取得麩醯胺酶液。對所得之麩醯胺酶溶液使用UF膜(UFP-5-C-3MA)(亞馬相 生物科技(股))，進行濃縮及脫鹽，取得精製麩醯胺酶。培養上澄液的麩醯胺酶比活性為15mU/mg。

(實施例6) 以精製麩醯胺酶酵素合成茶胺酸

使用精製麩醯胺酶(0.1毫升)，且令基質溶液10毫升(0.5M L-麩醯胺及各種濃度之乙胺)以pH10.0、溫度30℃之條件，進行茶胺酸的酵素合成。

(實施例7) 以HPLC定量茶胺酸量及麩醯胺酸量

進行茶胺酸之酵素合成的酵素反應液中的茶胺酸量及麩醯胺酸量，為經由適當稀釋反應液後，進行HPLC則可定量。使用所得之茶胺酸量(莫耳/升)及麩醯胺酸量(莫耳/升)，計算來自基質之麩醯胺量(莫耳/升)的莫耳轉換率

(%)。

HPLC的定量條件為如下表。

[表 1]

分析柱：Develosil ODS HG-5/野村化學(股)
檢測器：Waters2487Dual λ UV/VIS 檢測器/Waters
茶胺酸標準品：L-茶胺酸/栗田工業(股)
內部標準物質：菸鹼胺/拿卡萊跌克
移動相：純水：甲醇：三氟醋酸=980:20:1

(試驗例 1) 以來自芽孢桿菌屬之麩醯胺酶及來自假單胞菌屬之麩醯胺酶酵素合成茶胺酸

使用實施例1~實施例5及比較例1所調製之來自各微生物的麩醯胺酶，並以實施例6之條件進行茶胺酸酵素合成試驗。試驗後之茶胺酸量及麩醯胺酸量為以實施例7之條件測量。試驗結果示於圖1。

使用實施例1~實施例5及比較例1之任一者的麩醯胺酶之情況，由L-麩醯胺至茶胺酸的莫耳轉換率亦均為50%以上。特別是實施例1~實施例4之麩醯胺酶的莫耳轉換率分別為78%、76%、72%及70%的高數值。另一方面，由L-麩醯胺至L-麩醯胺酸的莫耳轉換率(副產物的生產)，於實施例1~實施例4之麩醯胺酶為6%以下的低數值，但於實施例5及比較例1之麩醯胺酶為顯示15%以上的高數值。於使用麩醯胺酶合成茶胺酸的情形中，以往茶胺酸的莫耳轉換率為高，加上往副產物之L-麩醯胺酸的莫耳轉換率低者為

佳。若為如此，則可簡化茶胺酸的精製步驟。於本試驗例中，為了滿足此類條件上，以使用來自芽孢桿菌屬之麩醯胺酶，其培養上澄液的麩醯胺酶比活性為 10mU/mg 以上者為佳。

（實施例 8）

將綠黴菌以含有麥芽萃取物(Malt extract)2.0%、葡萄糖 2.0%、蛋白 0.1%、酵母萃取物(Yeast extract)0.1%之 pH5.0 的培養基於 30℃之溫度下培養。將所得之培養液離心，取得培養上澄液。於此培養上澄液中添加冷乙醇，並將所得之沈澱物離心、回收。將所得之沈澱物溶解於磷酸緩衝溶液（pH7.0），並進行透析。透析液為使用 DEAE-Sepharose Fast Flow，吸黏後，以鹽溶液予以溶離，提高蛋白質的純度。將所得之麩醯胺酶溶液使用 UF 膜(UFP-5-C-3MA)(亞馬相 生物科技(股))，進行濃縮及脫鹽，取得精製麩醯胺酶。培養上澄液的麩醯胺酶比活性為 42mU/mg。

（實施例 9）

將黑黴菌以含有麥芽萃取物 2.0%、葡萄糖 2.0%、蛋白 0.1%、酵母萃取物 0.1%之 pH5.0 的培養基於 30℃之溫度下培養。將所得之培養液離心，取得培養上澄液。於此培養上澄液中添加冷乙醇，並將所得之沈澱物離心、回收。將所得之沈澱物溶解於磷酸緩衝溶液(pH7.0)，並進行透析。透析液為使用 DEAE-Sepharose Fast Flow，吸黏後，以鹽溶液予以溶離，提高蛋白質的純度。將所得之麩醯胺酶溶

液使用UF膜(UFP-5-C-3MA)(亞馬相 生物科技(股)),進行濃縮及脫鹽,取得精製麩醯胺酶。培養上澄液的麩醯胺酶比活性為39mU/mg。

(實施例10)

將匐枝根黴菌以含有麥芽萃取物2.0%、葡萄糖2.0%、蛋白0.1%、酵母萃取物0.1%之pH5.0的培養基於30℃之溫度下培養。將所得之培養液離心,取得培養上澄液。於此培養上澄液中添加冷乙醇,並將所得之沈澱物離心、回收。將所得之沈澱物溶解於磷酸緩衝溶液(pH7.0),並進行透析。透析液為使用DEAE-Sepharose Fast Flow,吸黏後,以鹽溶液予以溶離,提高蛋白質的純度。將所得之麩醯胺酶溶液使用UF膜(UFP-5-C-3MA)(亞馬相 生物科技(股)),進行濃縮及脫鹽,取得精製麩醯胺酶。培養上澄液的麩醯胺酶比活性為15mU/mg。

(實施例11)

將史普諾斯毛黴菌以含有麥芽萃取物2.0%、葡萄糖2.0%、蛋白0.1%、酵母萃取物0.1%之pH5.0的培養基於30℃之溫度下培養。將所得之培養液離心,取得培養上澄液。於此培養上澄液中添加冷乙醇,並將所得之沈澱物離心、回收。將所得之沈澱物溶解於磷酸緩衝溶液(pH7.0),並進行透析。透析液為使用DEAE-Sepharose Fast Flow,吸黏後,以鹽溶液予以溶離,提高蛋白質的純度。將所得之麩醯胺酶溶液使用UF膜(UFP-5-C-3MA)(亞馬相 生物科技(股)),進行濃縮及脫鹽,取得精製麩醯胺酶。培養上澄

液的麩醯胺酶比活性為 5mU/mg。

(試驗例 2) 以來自黴菌之麩醯胺酶及來自假單胞菌屬之麩醯胺酶酵素合成茶胺酸

使用實施例 8~實施例 11 及比較例 1 所調製之來自各微生物的麩醯胺酶，並以實施例 6 之條件進行茶胺酸酵素合成試驗。試驗後之茶胺酸量及麩醯胺酸量為以實施例 7 之條件測量。試驗結果示於圖 2。

使用實施例 8~實施例 11 及比較例 1 之任一者的麩醯胺酶之情況，由 L-麩醯胺至茶胺酸的莫耳轉換率亦均為 50%以上。特別是實施例 8 及實施例 9 之麩醯胺酶的莫耳轉換率分別為 72%及 73%的高數值。另一方面，由 L-麩醯胺至 L-麩醯胺酸的莫耳轉換率(副產物的生產)，於實施例 8 及實施例 9 之麩醯胺酶為 5%以下的低數值，但於比較例 1 之麩醯胺酶為顯示 10%以上的高數值。於使用麩醯胺酶合成茶胺酸的情形中，以往茶胺酸的莫耳轉換率為高，加上往副產物之 L-麩醯胺酸的莫耳轉換率低者為佳。若為如此，則可簡化茶胺酸的精製步驟。於本試驗例中，為了滿足此類條件上，顯示以使用來自黴菌(特別為麴菌屬、根黴屬、毛黴屬)之麩醯胺酶，(1)其培養上澄液之麩醯胺酶比活性為 10mU/mg 以上者、或(2)於來自 L-麩醯胺之莫耳轉換率中，本實施例中之主產物的茶胺酸與副產物的麩醯胺酸之比(茶胺酸/麩醯胺酸之比=X)為 X＞5 者為佳。

(實施例 12)

將釀酒酵母以含有麥芽萃取物 0.3%、酵母萃取物 0.3%、

蛋白 0.5%、葡萄糖 1.0%之 pH5.0 的培養基於 30℃之溫度下培養。將所得之培養液離心，取得培養上澄液。於此培養上澄液中添加冷乙醇，並將所得之沈澱物離心、回收。將所得之沈澱物溶解於磷酸緩衝溶液(pH7.0)，並進行透析。透析液為使用 DEAE-Sepharose Fast Flow，吸黏後，以鹽溶液予以溶離，提高蛋白質的純度。將所得之麩醯胺酶溶液使用 UF 膜(UFP-5-C-3MA)(亞馬相 生物科技(股))，進行濃縮及脫鹽，取得精製麩醯胺酶。培養上澄液的麩醯胺酶比活性為 45mU/mg。

(實施例 13)

將魯酵母菌以含有麥芽萃取物 0.3%、酵母萃取物 0.3%、蛋白 0.5%、葡萄糖 1.0%之 pH5.0 的培養基於 30℃之溫度下培養。將所得之培養液離心，取得培養上澄液。於此培養上澄液中添加冷乙醇，並將所得之沈澱物離心、回收。將所得之沈澱物溶解於磷酸緩衝溶液(pH7.0)，並進行透析。透析液為使用 DEAE-Sepharose Fast Flow，吸黏後，以鹽溶液予以溶離，提高蛋白質的純度。將所得之麩醯胺酶溶液使用 UF 膜(UFP-5-C-3MA)(亞馬相 生物科技(股))，進行濃縮及脫鹽，取得精製麩醯胺酶。培養上澄液的麩醯胺酶比活性為 40mU/mg。

(實施例 14)

將高蛋白假絲酵母以含有麥芽萃取物 0.3%、酵母萃取物 0.3%、蛋白 0.5%、葡萄糖 1.0%之 pH5.0 的培養基於 30℃之溫度下培養。將所得之培養液離心，取得培養上澄液。

於此培養上澄液中添加冷乙醇，並將所得之沈澱物離心、回收。將所得之沈澱物溶解於磷酸緩衝溶液(pH7.0)，並進行透析。透析液為使用 DEAE-Sepharose Fast Flow，吸黏後，以鹽溶液予以溶離，提高蛋白質的純度。將所得之麩醯胺酶溶液使用 UF 膜(UFP-5-C-3MA)(亞馬相 生物科技(股))，進行濃縮及脫鹽，取得精製麩醯胺酶。培養上澄液的麩醯胺酶比活性為 30mU/mg。

(實施例 15)

將南極念珠菌以含有麥芽萃取物 0.3%、酵母萃取物 0.3%、蛋白 0.5%、葡萄糖 1.0%之 pH5.0 的培養基於 30℃之溫度下培養。將所得之培養液離心，取得培養上澄液。於此培養上澄液中添加冷乙醇，並將所得之沈澱物離心、回收。將所得之沈澱物溶解於磷酸緩衝溶液(pH7.0)，並進行透析。透析液為使用 DEAE-Sepharose Fast Flow，吸黏後，以鹽溶液予以溶離，提高蛋白質的純度。將所得之麩醯胺酶溶液使用 UF 膜(UFP-5-C-3MA)(亞馬相 生物科技(股))，進行濃縮及脫鹽，取得精製麩醯胺酶。培養上澄液的麩醯胺酶比活性為 25mU/mg。

(實施例 16)

將雅諾馬拉漢歐納以含有麥芽萃取物 0.3%、酵母萃取物 0.3%、蛋白 0.5%、葡萄糖 1.0%之 pH5.0 的培養基於 30℃之溫度下培養。將所得之培養液離心，取得培養上澄液。於此培養上澄液中添加冷乙醇，並將所得之沈澱物離心、回收。將所得之沈澱物溶解於磷酸緩衝溶液(pH7.0)，並進

行透析。透析液為使用 DEAE-Sepharose Fast Flow，吸黏後，以鹽溶液予以溶離，提高蛋白質的純度。將所得之麩醯胺酶溶液使用 UF 膜(UFP-5-C-3MA)(亞馬相 生物科技(股))，進行濃縮及脫鹽，取得精製麩醯胺酶。培養上澄液的麩醯胺酶比活性為 15mU/mg。

(試驗例 3) 以來自酵母之麩醯胺酶及來自假單胞菌屬之麩醯胺酶酵素合成茶胺酸

使用實施例 12~實施例 16 及比較例 1 所調製之來自各屬的麩醯胺酶，並以實施例 6 之條件進行茶胺酸酵素合成試驗。試驗後之茶胺酸量及麩醯胺酸量為以實施例 7 之條件測量。試驗結果示於圖 3。

使用實施例 12~實施例 16 及比較例 1 之任一者的麩醯胺酶之情況，由 L-麩醯胺至茶胺酸的莫耳轉換率亦均為 50%以上。特別是實施例 12~實施例 15 之麩醯胺酶的莫耳轉換率分別為 70%的高數值。另一方面，由 L-麩醯胺至 L-麩醯胺酸的莫耳轉換率(副產物的生產)，於實施例 12~實施例 15 之麩醯胺酶均為低數值，但於比較例 1 之麩醯胺酶為顯示 10%的高數值。於使用麩醯胺酶合成茶胺酸的情形中，以往茶胺酸的莫耳轉換率為高，加上往副產物之 L-麩醯胺酸的莫耳轉換率低者為佳。若為如此，則可簡化茶胺酸的精製步驟。於本試驗例中，為了滿足此類條件上，以使用來自酵母(特別為酵母屬、念珠菌屬)之麩醯胺酶，其培養上澄液的麩醯胺酶比活性為 10mU/mg 以上者為佳。

(實施例 17) 調製使用奇吐珠 4010 之固定化麩醯胺酶

將幾丁聚糖珠粒之市售品奇吐珠 4010(富士紡績(股))浸漬於 50mM 磷酸鈉緩衝液(pH7.4)中 24 小時。將此平衡化後奇吐珠 4010 之 10 毫升浸漬於實施例 3 所調製的麩醯胺酶(15 毫克/毫升)25 毫升，且振盪約 2 小時。其後，將除去附著液的奇吐珠 4010 加至 2.5%戊二醛溶液中，且再振盪 2 小時。戊二醛處理後，使用 30 倍量之 50mM 磷酸鈉緩衝液(pH7.4)洗淨至吸光度(280nm)為 0.01 以下為止，並充填至柱中。

(實施例 18) 以固定化麩醯胺酶的酵素反應

使用實施例 17 所調製的固定化麩醯胺酶，將基質溶液(4%麩醯胺、25%乙胺 pH10.0)以 30℃、SV=0.2 之流速通筒時，可以 70%之產率取得茶胺酸。

(實施例 19) 使用陰離子交換樹脂之固定化麩醯胺酶的調製

對於實施例 3 所得之精製麩醯胺酶(15 毫克/毫升)25 毫升，添加陰離子交換樹脂 DIAION HPA25(三菱化學(股))10 毫升後，振盪約 2 小時。其後，將除去附著液的 HPA25 加至 2.5%戊二醛溶液中，再振盪 2 小時。戊二醛處理後，使用 30 倍量之 50mM 磷酸鈉緩衝液(pH7.4)洗淨至吸光度(280nm)為 0.01 以下為止，並充填至柱中。

(實施例 20) 以固定化麩醯胺酶的酵素反應

使用實施例 19 所調製的固定化麩醯胺酶，將基質溶液(4%麩醯胺、25%乙胺 pH10.0)以 30℃、SV=0.2 之流速通筒時，可以 75%之產率取得茶胺酸。

（實施例 21） 茶胺酸之精製

茶胺酸由反應液中的單離精製可經由將反應液中之乙胺以減壓濃縮除去後，以 RO 膜進行脫鹽，其後加至 Dowex 50 x8、Dowex 1x2 柱層析，並且予以乙醇處理而進行。

將此單離物質加至胺基酸分析器、紙層析時，顯示與茶胺酸標準物質相同舉動。又，將單離物質以鹽酸或麩醯胺酶進行水解處理時，以 1:1 之比例生成 L-麩醯胺酸和乙胺。如此，顯示單離物質為經由麩醯胺酶水解後，乙胺為結合至 L-麩醯胺酸的 γ 位。又，水解所產生的 L-麩醯胺酸為 L 型，係根據 L-麩醯胺酸脫氫酶（GluDH）而被確認。圖 4 中，示出茶胺酸標準品及單離物質的 IR 光譜。兩物質均顯示同等之光譜。由此，確認單離物質為茶胺酸。

【圖式簡單說明】

圖 1 為示出使用來自芽孢桿菌屬之麩醯胺酶及來自假單胞菌屬之麩醯胺酶，由 L-麩醯胺和乙胺酵素合成茶胺酸時之合成茶胺酸量、麩醯胺酸量之表。

圖 2 為示出使用來自黴菌之麩醯胺酶及來自假單胞菌屬之麩醯胺酶，由 L-麩醯胺和乙胺酵素合成茶胺酸時之合成茶胺酸量、麩醯胺酸量之表。

圖 3 為示出使用來自酵母之麩醯胺酶及來自假單胞菌屬之麩醯胺酶，由 L-麩醯胺和乙胺酵素合成茶胺酸時之合成茶胺酸量、麩醯胺酸量之表。

圖 4 為示出茶胺酸標準品及單離物質之 IR 光譜的圖。

五、中文發明摘要：

本發明係提供茶胺酸之有效率的新穎製造方法，並以副產物少，簡易且可於工業上有利生產茶胺酸為其目的。於麩醯胺與乙胺衍生物之混合物中，使用來自芽孢桿菌(Bacillus)屬、黴菌(特別為麴菌(Aspergillus)屬、根黴菌(Rizopus)屬、毛黴菌(Mucor)屬)或酵母(特別為漢歇納(Hansenulla)屬、酵母(Saccharomyces)屬、念珠菌(Candida)屬)中之一種或二種以上微生物的麩醯胺酶，則可解決上述課題。

六、英文發明摘要：

公告本

十一、圖式：

圖 1

菌之種類		實施例 1（枯草桿菌）	實施例 2（解澱粉芽孢桿菌）	實施例 3（凝結芽孢桿菌）	實施例 4（地衣芽孢桿菌）	實施例 5（蠟狀芽孢桿菌）	比較例 1（硝基還原假單胞菌）
培養上澄液之麩醯胺酶比活性(mU/mg)		67	53	43	40	5	15
由 L-麩醯胺之莫耳轉換率(%)	茶胺酸	75	74	70	69	55	50
	麩醯胺酸	2	3	5	7	10	10

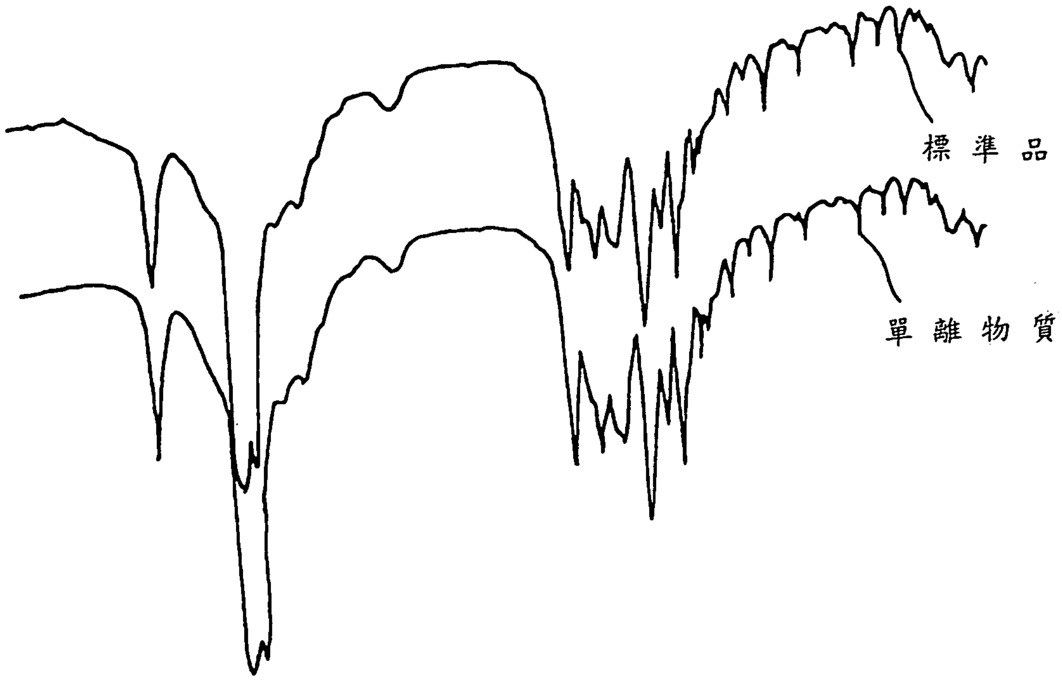
圖 2

菌之種類		實施例 8（綠黴菌）	實施例 9（黑黴菌）	實施例 10（匐枝根黴菌）	實施例 11（史普諾斯毛黴菌）	比較例 1（硝基還原假單胞菌）
培養上澄液之麩醯胺酶比活性(mU/mg)		42	39	15	5	15
由 L-麩醯胺之莫耳轉換率(%)	茶胺酸	72	73	65	52	50
	麩醯胺酸	5	4	5	9	10

圖 3

菌之種類		實施例 12（釀酒酵母）	實施例 13（魯酵母菌）	實施例 14（高蛋白假絲酵母）	實施例 15（南極念珠菌）	實施例 16（雅諾馬拉漢歇納）	比較例 1（硝基還原假單胞菌）
培養上澄液之麩醯胺酶比活性(mU/mg)		45	40	30	25	15	15
由 L-麩醯胺之莫耳轉換率(%)	茶胺酸	75	70	71	72	54	50
	麩醯胺酸	4	5	6	5	11	10

圖 4



七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（　1　）圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明:

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

OCT 0 6 2011

100年10月6日修正替換頁

替換頁

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於茶胺酸之新穎製造方法。

【先前技術】

茶胺酸已知為綠茶味道的主要成分，係為以茶為首之食品之香味成分的重要物質。含有茶胺酸的γ-麩醯胺基衍生物被指出於動物體及植物體中作用為生理活性物質。例如，於Chem. Parm. Bull., 19 (7) 1301-1307 (1971)中，報導茶胺酸和L-麩醯胺抵抗咖啡因所誘發的痙攣。由此認為該等化合物為作用至中樞神經系，並且期待作為生理活性物質的有用性。

自以往，茶胺酸的製造方法一般為由含有茶胺酸之玉露的生產用茶園中所得之茶葉乾燥物進行萃取的方法。但是，使用此方法時，具有下列二個缺點。即，(1)茶胺酸為茶葉乾燥物，僅以約 1.5%左右程度蓄積、及(2)於一般的煎茶用茶園中因光合成活潑，故所合成的茶胺酸被迅速分解，且蓄積量少。因此，在由茶葉乾燥物的萃取法中，難以工業上生產足夠份量的茶胺酸，且被指出為不實用。

如此，期待開發出工業性生產方法，其一，已報導化學上有機合成茶胺酸的方法(前述：Chem. Parm. Bull., 19 (7) 1301-1307 (1971))。但是，此有機合成反應被指出產率低，有於合成物之分離精製等中需要煩雜操作之問題。

又，另外的工業性生產方法為報導利用來自假單胞菌(Pseudomonas)屬之麩醯胺酶的γ-麩醯胺基轉移反應，由

公告本

100年10月6日修正本

OCT 0 6 2011
替換本

十、申請專利範圍：

1.一種茶胺酸之製造方法，其特徵為，係使用來自從解澱粉芽孢桿菌(Bacillus amyloliquefaciens)、凝結芽孢桿菌(Bacillus coagulans)、黑黴菌(Aspergillus niger)、匐枝根黴菌(Rizopus stolonifer)、釀酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)、魯酵母菌(Saccharomyces rouxii)、高蛋白假絲酵母(Candida utilis)及南極念珠菌(Candida antarctica)中選出之一種或二種以上微生物的麩醯胺酶，並將該麩醯胺酶作用於麩醯胺和乙胺衍生物而製造茶胺酸者，

其中，(i)上述微生物的培養上澄液的麩醯胺酶比活性為10mU/mg以上；(ii)上述麩醯胺酶係主產物之茶胺酸與副產物之麩醯胺酸之比(茶胺酸/麩醯胺酸)大於5；(iii)茶胺酸酵素合成時之pH為9~12；且

由L-麩醯胺至茶胺酸的莫耳轉換率為70%以上，及

由L-麩醯胺至麩醯胺酸的莫耳轉換率為6%以下。

2.如申請專利範圍第1項之茶胺酸之製造方法，其中，該麩醯胺酶被固定化至載體。