I301837

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：94042047

※ 申請日期：94-2-18　　※IPC 分類：C07K 14/195, C12N 15/11, C12N 15/63

一、發明名稱：（中文/英文）

異常球菌 *Deinococcus* 胺基端醯化胺基酸消旋酶 (N-acylamino acid racemase)，其製法及利用其製備L-胺基酸之方法

二、申請人：（共 1 人）

姓名或名稱：（中文/英文）國立中興大學

代表人：（中文/英文）蕭介夫

住居所或營業所地址：（中文/英文）台中市國光路 250 號

國　籍：（中文/英文）　中華民國

三、發明人：（共 2 人）

姓　名：（中文/英文）

1-許文輝

2-許世光

國　籍：（中文/英文）

1-中華民國

2-中華民國

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：

☐ 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】

寄存機構：食品工業發展研究所

日期：2005 年 2 月 15 日

號碼：BCRC940476

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。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係揭諸關於利用由*Deinococcus radiodurans* NCHU1003菌體本身或將菌體之NAAAR酵素基因選殖出，並利用表現載體在異常球菌*Deinococcus* sp或其他菌體進行此基因之表現，以轉形之菌體或以回收及純化之NAAAR酵素，進行N-端受甲胺醯基保護和N-端受乙醯基保護胺基酸之旋光性結構之轉換，例如：以N-乙醯基高苯丙胺酸、N-甲胺醯基高苯丙胺酸爲基質；再利用乙醯基轉移酶/消旋酶或甲胺醯基轉移酶/消旋酶酵素作用系統，即可大量生產高純度之光學活性胺基酸及其衍生物。

【先前技術】

[發明背景]

光學活性胺基酸已廣泛應用於食品、飼料、醫藥合成以及農業化學等工業上，以作爲原料之使用。然而不同構型的光學活性異構物具有截然不同的生物活性，例如：某一構型之光學異構物具有非常好的生物活性，然而另一型式可能不具此種活性。當兩種型式之異構物同時存在時，不僅會降低活性，進而可能會抑制原本的生

物活性；所以，如何能生產單一型式的光學活性胺基酸，在製藥及化學工業上相當重要。

早期光學活性胺基酸的合成大多以化學的方法來完成，但在合成上有其危險性存在，且常會造成環境的污染，純化分離之成本也不便宜。因此，在大量生產上會有其限制性。以後常以化學分割(chemical resolution)的方法、不對稱氫化法(asymmetric hydrogenation)或是酵素催化(enzyme-catalyzed reaction)的方法，來得到具有高純度的旋光性胺基酸及其衍生物。Frank J. Villani Jr等人(1998)以酒石酸及水楊醛將外消旋胺基酸化合物加以純化分離，所得產物之產量約爲32%，其ee值（對映體過量值(enantiomeric excess value)）爲94%。根據文獻記載，以生物轉換法生產L型胺基酸的方法有許多種，但大多會殘留近50%的D型基質。由於酵素催化反應具有基質專一性、立體化學選擇性…等優異之性質，所以可利用酵素催化反應進行胺基酸的消旋化作用，來生產高純度的光學活性胺基酸。Syldatk, C等人(1992)以D,L-5-經單一取代乙內醯爲基質，利用*Arthrobacter* sp. DSM3745，以生物轉換方式生產非天然性之L-型胺基酸；相同的方法也應用在其他微生物中，例如：*Pseudomonas*、*Achromobacter*、*Serratia*和*Aspergillus*

等。Tseng，Tsung-Chin等人(1991)利用酵素進行乙醯化催化反應，將(R)-2-羥基-4-苯基丁進行專一性立體選擇反應，生產L-型胺基酸；但此生產過程非常緩慢，需時12天以上反應才完全。

Shui-Tein Chen等人(1999)利用天冬胺酸和2-氧基-4-苯基丁酸作爲反應之基質，再以酪胺酸胺基轉移酶進行酵素催化反應（即平衡移動受控之酵素反應）生產高純度之L-HPA及其衍生物；Zhao等人（Enantiomer，Jan-Feb；7(1):1-3 (2002)）利用工業化蛋白分解酵素—alcalase來大量生產L-高苯丙胺酸鹽酸鹽，其ee值可達98%。此方法是以N-端受保護之胺基酸爲基質，在反應進行時只有L型之N-端受保護之胺基酸會被水解，因此達到選擇分離之效果；但此酵素反應方法，基質需先進行保護作用，當酵素反應完成後，需再將保護基(protective group)移除，因此在操作上非常繁瑣。因此，可藉由另一種酵素催化反應方式，將N-端受保護之胺基酸消旋混合物轉換成L型或D型胺基酸。例如利用L-胺基醯基轉移酶催化N-端受保護之胺基酸生產L型胺基酸（參見例如，EP99118844，JP11318442A)；再利用物理或化學法的消旋化作用可將殘留之D型N-端受保護之胺基酸轉換成L型的N-端受保護之胺基酸（JP656775A)。

此過程最大之困難處在於反應步驟必須重複進行，且每次反應後必須分離產物及反應物，再進一步提升反應之溫度及酸鹼值，以利將殘留之D型N-端受保護之胺基酸予以消旋化。或者例如利用胺基酸醯基轉移酶酵素生產L型胺基酸；此類醯基轉移酶僅作用在具有N-端受保護之胺基酸上（參見例如，EP99118844.2；及A. S. Bommarius等人，Tetrahedron Asymmetry，1997，8，3197-3200），進一步再利用消旋化作用，將殘留之D型N-端受保護之胺基酸完全轉換成L型；再者，利用已發表的一種醯基轉移酶/消旋酶酵素轉換系統，可將N-乙醯基甲硫胺酸製備成高純度的L型甲硫胺酸。

Takahashi等人(1991)首度於菌體中發現了N-醯基胺基酸消旋酶（亦即，胺基端醯化胺基酸消旋酵素，以下簡稱NAAAR），此酵素只能夠將N-端受保護之胺基酸進行消旋化作用，並不會作用在N-端沒有受保護的胺基酸上。根據文獻指出，NAAAR大多存在於放射菌類(actinomycetes)中，而目前所知，僅有少數的NAAAR酵素已被發表，這些消旋酵素大都分離自微生物體內，例如：得自*Streptomyces atratus* Y-53(Tokuyama等人，Appl. Microbiol. Biotechnol. 1994，40，835-840），該消旋酵素在溫度40℃時能穩定地進行酵素反應，但反應溫度一

旦超過50℃之後，活性即便消失；以及得自*Amycolatopis* sp. TS-1-60(Tokuyama等人，Appl. Microbiol. Biotechnol. 1995a，42，853-859)，其酵素活性在55℃的反應溫度下能維持30分鐘，但是由於此菌也含有D,L-胺基醯基轉移酶，因此會干擾甲硫胺酸產物光學純度的形成，故對於工業上之應用效率並不高。

L-高苯丙胺酸(簡稱爲L-HPA)是一種旋光性非天然胺基酸，可作爲合成許多降血壓藥物(ACE抑制劑)的前驅物。目前是以化學分割法或不對稱氫化法來生產具有高純度的L-HPA及其衍生物（參見例如，US05981794、EP00902011A1等）；然而，此些方法均有其缺點，例如以化學分割法及不對稱氫化法需要在高溫、強鹼的條件下作用，因此操作上有其危險性存在，此外也會造成環境的污染，再加上製造價格不便宜，且無法達到最佳之ee值及產量，因此在大量生產上會有其限制。本發明之製法爲一種酵素催化法，因此與前述生產方式不同，且本法所採用之條件亦可避免高溫、強鹼以及環境污染等問題。

利用酵素催化的方式生合成L-HPA，主要的優點爲酵素反應具有基質專一性，在生產過程中，可降低異構化作用或是消旋酶作用的發生，反應通常在常溫常壓下

具實用之功效，故以上創造已符合發明專利高度創作之要件，爰依法提起發明申請，並請早日賜予專利，至感德便。

序列表

<110>

<120> 序列表

<130>01-00001

<140>
<141>

<150>
<151>

<160> 4

<170> PatentIn Version 2.0

<210> 1
<211> 375
<212> 胺基酸序列
<213> 異常球菌 (*Deinococcus radiodurans*)

<400> 1

```
1        MAHTGRMFKI EAAEIVVARL PLKFRFETSF
31       GVQTHKVVPL LILHGEGVQG VAEGTMEARP
61       MYREETIAGA LDLLRGTFLP AILGQTFANP
91       EAVSDALGSY RGNRMARAMV EMAAWDLWAR
121      TLGVPLGTLL GGHKEQVEVG VSLGIQADEQ
151      ATVDLVRRHV EQGYRRIKLK IKPGWDVQPV
181      RATREAFPDI RLTVDANSAY TLADAGRLRQ
211      LDEYDLTYIE QPLAWDDLVD HAELARRIRT
241      PLCLDESVAS ASDARKALAL GAGGVINLKV
271      ARVGGHAESR RVHDVAQSFG APVWCGGMLE
301      SGIGRAHNIH LSTLSNFRLP GDTSSASRYW
331      ERDLIQEPLE AVDGLMPVPQ GPGTGVTLDR
361      EFLATVTEAQ EEHRA*
```

<210> 2

<211> 1125

<212> DNA

<213> 異常球菌 (*Deinococcus radiodurans*)

<400> 2

ATGGCGCATACTGGCCGTATGTTCAAAATCGAAGCTGCTGAAATCGTCGTGGCGCGGCTG
CCGCTCAAGTTCCGCTTTGAAACGAGTTTCGGGGTGCAGACCCACAAGGTGGTGCCGCTG
CTCATTCTCCACGGCGAAGGCGTGCAGGGCGTCGCCGAGGGCACCATGGAAGCGCGGCCC
ATGTACCGCGAGGAAACGATTGCCGGGGCACTGGACCTGCTGCGCGGCACCTTTTTGCCC
GCCATCCTGGGGCAGACCTTCGCCAACCCCGAAGCGGTGAGCGACGCACTCGGCAGCTAC
AGGGGCAACCGCATGGCGCGGGCGATGGTGGAAATGGCGGCCTGGGACCTCTGGGCGCGC
ACGCTGGGGGTGCCGCTCGGAACACTACTCGGCGGTCACAAGGAGCAGGTGGAGGTGGGG
GTCAGCCTCGGCATTCAGGCGGACGAGCAGGCGACGGTGGACCTCGTGCGCCGGCATGTC
GAGCAGGGCTACCGCCGTATCAAACTCAAGATCAAACCCGGCTGGGACGTGCAGCCGGTA
CGCGCGACCCGCGAGGCCTTTCCCGACATTCGCCTGACGGTGGACGCCAACAGCGCCTAC
ACCCTGGCCGACGCCGGGCGGCTGCGGCAACTCGACGAGTACGACCTGACCTACATCGAG
CAGCCGCTCGCCTGGGACGACCTCGTGGACCACGCTGAACTCGCCCGGCGCATTCGCACG
CCGCTGTGCCTCGACGAGTCGGTGGCGTCGGCGTCGGACGCCCGCAAGGCGCTGGCGCTG
GGCGCGGGCGGCGTCATCAACCTCAAGGTGGCCCGCGTGGGCGGACACGCCGAGTCGCGG
CGCGTGCACGACGTGGCCCAGAGCTTCGGCGCCCCGGTGTGGTGCGGCGGGATGCTGGAG
AGCGGCATCGGGCGGGCGCACAACATCCACCTCTCGACGCTGTCCAACTTCCGCTTGCCG
GGCGACACCAGTTCGGCCAGCCGCTACTGGGAGCGCGACCTGATTCAGGAACCGCTCGAA
GCGGTGGACGGCTTGATGCCGGTGCCGCAGGGGCCGGGCACAgGCGTAACCCTTGACCGC
GAGTTCCTGGCGACCGTCACCGAGGCGCAGGAGGAACACCGGGCGTGA

五、中文發明摘要：

本發明係關於分離自異常球菌 *Deinococcus radiodurans* NCHU1003之新穎耐熱性N-醯化胺基酸消旋酶(NAAAR)，及其製備方法，該NAAAR具有轉換N-端受保護胺基酸（包含，例如，N-醯化胺基酸及N-甲胺醯化胺基酸）之旋光性結構的性質。本發明亦關於具高純度天然或非天然L-胺基酸之製備方法，其特徵係利用該新穎N-醯化胺基酸消旋酶搭配甲胺醯基轉移酶(carbamoylase)共同作用，而將N-端受保護胺基酸，例如N-甲胺醯基高苯丙胺酸，轉換成相對應之具光學活性胺基酸及其衍生。

六、英文發明摘要：

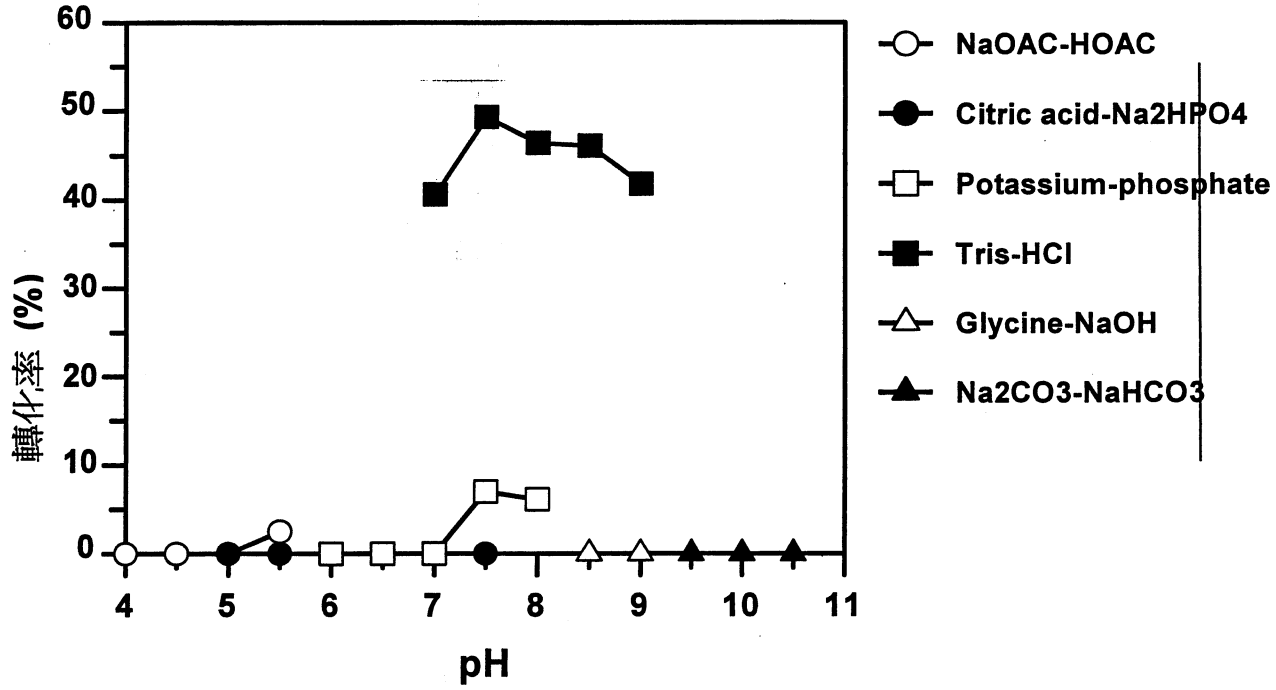

60
50
40
30
20
10
0
轉化率 (%)
4
5
6
7
8
9
10
11
pH
NaOAC-HOAC
Citric acid-Na2HPO4
Potassium-phosphate
Tris-HCl
Glycine-NaOH
Na2CO3-NaHCO3

圖 1

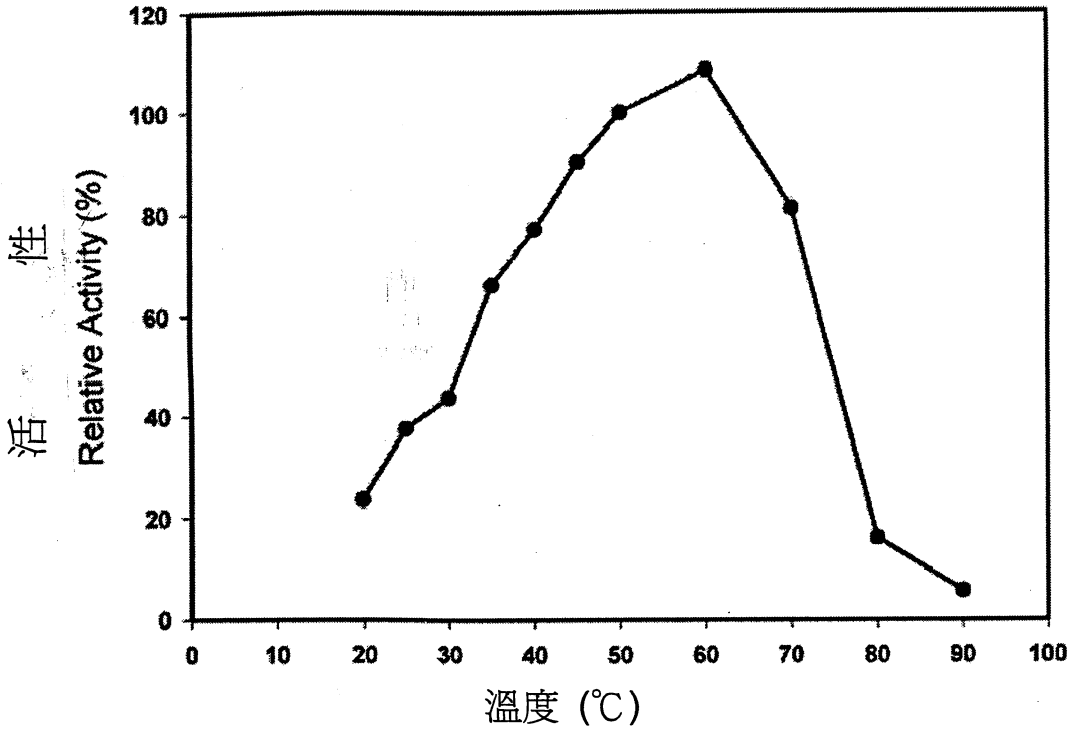

活性
Relative Activity (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
溫度（℃）

圖 2

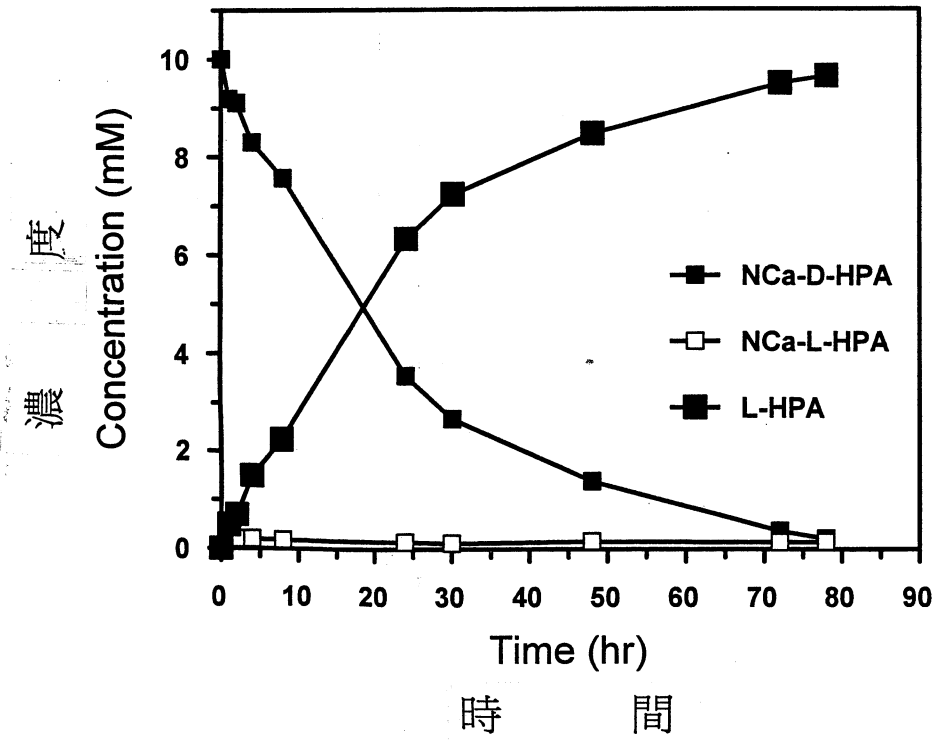

濃 度
Concentration (mM)
10
8
6
4
2
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
Time (hr)
時 間
NCa-D-HPA
NCa-L-HPA
L-HPA

圖 3

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第（ 3 ）圖。

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(0975.13)
年 月 日修(更)正替換頁

進行，可減少對環境的衝擊。以酵素法生產L-HPA之相關研究多集中於胺基轉移酶，以L-天冬胺酸或L-谷胺酸爲胺基供應者，而以2-氧基-4-苯基丁酸爲胺基接受者，經酵素轉換後可得到高純度的L-HPA。

Syldatk，C等人(1992)利用乙內醯酶具有催化D,L-5-經單一取代乙內醯(D,L-5-monosubstituted hydantoins)的能力，再配合D-N-甲胺醯基轉移酶或L-N-甲胺醯基轉移酶催化方式，進行生物轉換以生產特殊之D型或L-型胺基酸。目前已有許多成功例子，例如D-羥基苯基甘胺酸及D-苯基甘胺酸的生產。至於利用乙內醯酶製程(hydantoinase process)轉換生產L-HPA，目前已有相關文獻報導（參見例如，Lo與Hsu，2003）。但其使用得自*B. agri*之乙內醯酶，對於基質作用之選擇性偏向D型高苯丙胺醯基乙內醯(D-HPAH)，所以，在生產過程中，會形成大量的中間產物D-NCaHPA（D-N-甲胺醯基-高苯丙胺酸），因此不利於L-HPA的生合成。

Tokuyama等人(1994)成功地由*Streptomyces atratus* Y-53菌體中分離出NAAAR，並應用於工業上生產L-甲硫胺酸，但目前尚未有利用NAAAR酵素及甲胺醯基轉移酶將N-甲胺醯基-HPA轉換生產L-HPA之相關報告已公開。

因此，本發明係揭諸關於由*Deinococcus*

(0975.13)
年 月 日修(更)正替換

radiodurans NCHU1003菌體中將NAAAR酵素基因選殖出，並利用表現載體在*Deinococcus*.sp或其他菌體進行此基因之表現，以轉形之菌體或以回收及純化之NAAAR酵素，進行N-端受甲胺醯基保護胺基酸之旋光性結構之轉換。此NAAAR酵素具有優良之熱穩定性，在55℃作用下，其半衰期約爲15天；及其最適反應溫度爲40~70℃之間，且酵素對基質之轉換速率快，因此，再搭配甲胺醯基轉移酶之作用，可加速產物之形成，其生產率可達98%，而所形成之產物其光學純度爲99%之ee值。基於上述種種優異之生物特性，俾利用於工業上大量生產高純度之光學活性胺基酸及其衍生物。本發明所使用以選殖得到NAAAR基因之菌株爲*Deinococcus radiodurans* NCHU1003。

【發明內容】

於一方面，本發明係關於分離自異常球菌*Deinococcus radiodurans* NCHU1003之新穎N-醯化胺基酸消旋酶(NAAAR)，其特徵在於其與甲胺醯基轉移酶(carbamoylase)共同作用時，可將N-端受保護之天然與非天然胺基酸轉換成相對應之高純度光學活性胺基酸。

於另一方面，本發明關於編碼該新穎N-醯化胺基酸

(0975.13) 年 月 日修(更)正替換頁

消旋酶之核苷酸序列。於本發明一項具體態樣中係包括，其包含根據本發明之核苷酸序列以及一調控序列的重組載體。於本發明另一項具體態樣中，該重組載體爲可於適當宿主細胞中表現該新穎N-醯化胺基酸消旋酶之表現載體。

於另一方面，本發明關於製備該新穎 N-醯化胺基酸消旋酶之方法。於本發明一項具體態樣中，係藉由將根據本發明之重組載體轉形入適當宿主細胞中；在足以表現該 N-醯化胺基酸消旋酶活性的條件下，培養該經轉形之宿主細胞；以及純化並回收該 N-醯化胺基酸消旋酶而製備得該新穎 N-醯化胺基酸消旋酶。

於又一方面，本發明提供製備高純度光學活性天然與非天然胺基酸之方法，其特徵爲將 N-端受保護胺基酸與根據本發明之 N-醯化胺基酸消旋酶及 L-N-甲胺醯基轉移酶共同於 20~80℃下，於 Tris-HCl 緩衝液，pH6.0~10.0 中進行反應，而產生相對應之具光學活性 L-胺基酸。於本發明一項具體態樣中，係藉由將該 N-醯化胺基酸消旋酶及該 L-N-甲胺醯基轉移酶固定化於撐體上進行反應。於本發明另一項具體態樣中，係藉由將編碼該 N-醯化胺基酸消旋酶之核苷酸序列與編碼 L-N-甲胺醯基轉移酶之核苷酸序列共同選殖於宿主細

(0975.13)
年 月 日修(更)正替換頁

胞中，並以全細胞方式生產該光學活性胺基酸。

[發明詳述]

N-醯化胺基酸消旋酶(NAAAR)爲一種對外消旋性N-端受保護胺基酸具有特異性之酵素，其可催化將消旋性N-端受保護胺基酸轉化成具光學活性之N-端受保護胺基酸。本發明之特徵乃在於利用基因選殖方法，首先將異常球菌*Deinococcus radiodurans* NCHU1003菌體中之NAAAR酵素基因選殖出來，並表現於諸如大腸桿菌之宿主細胞中，經定序及生化特性分析加以鑑定，確定所得之N-醯化胺基酸消旋酶爲一種耐熱性，最適作用pH值範圍介於約7.0至約9.0之酵素。本發明之N-醯化胺基酸消旋酶的胺基酸序列及編碼其之核苷酸序列係分別列示於序列表中的No.1及No.2。

本發明亦提供含有嵌合抗原聚核苷酸、其類似物或同源物之重組DNA或RNA分子，其包括（但不限定於）噬菌體、質體、噬菌粒、黏粒、YACs(酵母人造染色體)、BACs(細菌人造染色體)以及該項技藝已熟知之各種病毒與非-病毒載體、與經此類重組DNA或RNA分子轉形或轉感染之細胞。用於製造此類分子之方法爲已知（參見，例如，山姆布克等人，分子選殖：實驗室手冊，第

(0975.13)
年 月 日修(更)正替換頁

2版，紐約：冷泉港出版，1989；及奧斯貝爾等人，現今分子生物學製程方案，威利國際科學出版社，（©1995，2004年4月增訂，補充本66））。

本發明進一步提供存在於適宜原核或真核宿主細胞內，而包含其含有嵌合抗原聚核苷酸，其類似物或同源物之重組DNA分子的宿主-載體系統。適宜宿主細胞包括細菌、酵母及昆蟲細胞等。較佳之酵母系統包括釀酒酵母、裂殖酵母、巴斯德畢赤酵母及八月畢赤酵母。

本發明之一項較佳具體態樣使用已建立用於製造L-N-甲胺醯基轉移酶與實施本發明所需得自異常球菌*Deinococcus radiodurans* NCHU1003菌體中之NAAAR酵素之融合蛋白質的重組DNA技術。融合蛋白質構築體係於併入特定限制酵素切位（其用於將所希望DNA片段併入表現載體中），及用於使所希望融合蛋白質於異源性表現系統表現之DNA層次所產生。用於本文，術語“載體”意指能夠攜帶編碼所希望蛋白質之DNA的質體。較佳用於本發明之質體載體包括（但不限定於）pQE30表現載體。

術語“表現載體”意指，一種其中係藉由將該分子與適當調節序列，例如啓動子及終結子(其爲使以細胞-爲基礎之表現發生所必需)進行可操作連結，而使經分

(0975.13)
年 月 日修(更)正替換頁

離核苷酸分子以可表現形式提供的基因構築物。

編碼L-N-甲胺醯基轉移酶之基因可經由聚合酶鏈反應(PCR)而自任何適當來源獲得。爲有助於後續之選殖步驟，較佳地將寡核苷酸引子設計爲可添加獨特限制酵素辨識位點。同樣，使用PCR獲得編碼異常球菌 *Deinococcus radiodurans* NCHU1003之NAAAR酵素的DNA，且PCR引子係經設計可添加獨特限制酵素辨識位點以助於選殖。然後可使用標準選殖技術將編碼L-N-甲胺醯基轉移酶與編碼異常球菌*Deinococcus radiodurans* NCHU1003之NAAAR酵素之聚核苷組合於單一構築物中。或者，可將分別之酵素編碼核苷酸序列與編碼連接（例如亮胺酸拉鍊、親和素或生物素化訊號）之DNA一起選殖，而共同表現於適當宿主細胞中。

本發明所利用NAAAR搭配L-N-甲胺醯基轉移酶生產L-HPA之方法，可於個別添加NAAAR酵素及L-N-甲胺醯基酶之條件下進行。於此類個案中，可將該等酵素同時或依序地添加至含有基質之反應混合物中，或者可將酵素以固定化方式固定於撐體上，在於適當反應條件下與基質進行反應。適宜之蛋白質固定化撐體包括（但不限定於）樹脂、珠粒、薄膜、微量平盤表面等。

或另供選擇地，本發明方法可於利用其中已包含編

碼NAAAR酵素及L-N-甲胺醯基轉移酶之核苷酸序列的全細胞條件下進行。於本發明一項具體態樣中，係利用其已經由包含編碼NAAAR酵素及L-N-甲胺醯基轉移酶之核苷酸序列的表現載體轉形之大腸桿菌全細胞與N-端受保護HPA及L-N-甲胺醯基轉移酶進行反應，而直接製造得高純度之L-HPA。

[實施方式]

本發明將以下述實施例進一步說明本發明之技術內容，然而所列之實施例僅作說明之用，而無意於限定本發明之範圍。任何習知該項技術人士，皆可根據本發明及具體實施例所述，在不偏離本發明精神及範圍下，作任意修飾及更改，惟仍應涵括於本發明之範圍內。

實施例1. NAAAR酵素基因的選殖

A. NAAAR酵素基因表現載體之構築

利用PCR（所使用引子爲：DRI-01 (5'-CGCGGATCCATGGCGCATACTGGCCGTATGT-3')，含有BamHI限制切位及DRI-02 (5'-CCCAAGCTTTCACGCCCGGTGTTCCTCCT-3')，含有HindIII限制切位），異常球菌*Deinococcus radiodurans* NCHU1003之染色體DNA爲PCR反應模板之來源以及基因重組技

(097.5.13)
年 月 日修(更)正替換頁

術，將異常球菌*Deinococcus radiodurans* NCHU1003菌體中之NAAAR酵素基因選殖出來，構築於表現載體上而製得重組質體pQE-naaar，並使用$CaCl_2$方法將所得之重組質體轉形送入宿主細胞*E. coli* JM109內，抽取質體以電泳分析加以確認。經定序後之*Deinococcus radiodurans* NCHU1003菌體中之NAAAR酵素基因編碼核苷酸序列係列示於序列表中，其與已知之*D. radiodurans*的NAAAR基因在核苷酸序列上之相同度爲96%。

B.重組蛋白質之大量表現

將含有NAAAR酵素基因之表現載體的菌株震盪培養過夜。將存在500毫升燒瓶中之含有適當濃度ampicillin之100毫升LB培養基接種1毫升該經過夜培養的菌液。於37℃下培養4小時後，培養物之OD_{600}值達約0.6-0.8，加入異丙基硫代-β-D半乳糖IPTG（最終濃度爲0.1~1 mM）並再於30℃下培養6小時以誘導蛋白質大量表現。將菌液以12,000 rpm離心10分鐘，以菌液體積約1/10量的TE緩衝液懸浮經離心沈澱後的*E. coli*，加入SDS-PAGE 2X sample buffer混合均勻，以100℃加熱約10分鐘後，進行蛋白質電泳分析。

C.蛋白質之純化

(097.5.13) 年 月 日修(更)正替換頁

將誘導過後之菌液，以3,000 rpm離心15分鐘，倒去上清液，回收菌體。加入50 mM Tris-HCl (pH8.0)緩衝液20 ml，劇烈震盪清洗菌體。再以相同條件離心，倒掉上清液後，加入相同之緩衝液10 ml，以回溶菌體。利用超音波磨碎機(XL-2020, Sonicator, Heat System, NY, USA)打破細胞，隨後置於4℃離心機以13,500 rpm 離心20分鐘。取上清液，以0.45 μm的濾膜過濾後，通過含Ni-NTA樹脂(Qiagen)的管柱回收純化蛋白，並根據Bradford方法以牛血清白蛋白爲標準物分析蛋白質濃度。

D. 酵素活性及生化性質分析

酵素活性的偵測是利用HPLC方法，在215 nm波長下偵測產物的變化量。NAAAR酵素活性分析大致上係根據德山等人所述。 酵素反應的緩衝液爲50 mM Tris-HCl buffer (pH8.0)、其中包含10 mM基質、0.5 mM $CoCl_2$以及適當量之純化酵素，於50℃下反應30分鐘，之後再置於沸水中作用5分鐘，以終止酵素反應，再以下述之Chiral-HPLC方法分析酵素活性。將最終反應物分離並取10微升加樣於ChiroBiotic T管柱(0.46x25 cm) (Astec Inc, Whippany, NJ, USA)上進行分析；該HPLC系統係由625 LC系統，717 plus Autosampler及996 Photodiode Array Detector (Water, Milford, MA, USA)所組成，並設

(0975.13)
年 月 日修(更)正替換頁

定於215 nm下記錄流出物之吸光值。從最初速率資料伴隨 NAc-$_D$-HPA 或 NAc-$_L$-HPA 之變化濃度測定 K_m 值(mM)。而一單位NAAAR活性係定義爲於所使用條件下於每分鐘催化1 μ mole產物形成的酵素量。由分析結果得知，此NAAAR酵素對基質(N-甲胺醯基乙醯基-D-HPA)之比活性(specific activity)爲1.31 μ mole/mg min（表一）。

表一、異常球菌 *Deinococcus radiodurans* NCHU1003 之 N-醯基胺基酸消旋酶對基質的選擇性

基質	比活性(U/mg)	相對活性(%)[a]
N-乙醯基-D-HPA	9.17	143.28
N-乙醯基-L-HPA	11.97	187.03
N-乙醯基-D-Met	6.40	100
N-乙醯基-L-Met	8.04	125.63
N-乙醯基-D-Phe	1.98	30.94
N-乙醯基-L-Phe	1.55	24.22
N-乙醯基-L-Gln	0.93	14.53
N-乙醯基-L-Leu	0.45	7.03
N-乙醯基-L-Trp	0.87	13.13
N-氯乙醯基-L-Phe	1.16	18.13
N-甲胺醯基-D-HPA	1.31	20.46
N-甲胺醯基-L-HPA	1.91	29.84

[a] 相對活性係以使用N-乙醯基-D-Met作爲基質時的酵素活性百分比表示

(0975.13)
年 月 日修(更)正替換頁

E.酵素反應最適 pH 值分析

將基質N-甲胺醯基-D-HPA溶於不同pH值的緩衝溶液中，包括：檸檬酸-Na_2HpO_4 (pH2.6~7.6)、磷酸鈉緩衝液(pH6.0~8.0)、 Tris-HCl (pH7.1~8.9)以及甘胺酸-NaOH (pH8.6~10.6)，加入0.5 mM $CoCl_2$以及適當量之純化酵素，於50℃下反應30分鐘，再置於沸水中作用5分鐘，以終止酵素反應，隨後進行酵素活性分析。由分析結果得知，此NAAAR酵素的最適反應緩衝液爲Tris-HCl緩衝液(pH7.0~9.0)（圖1）。

F. 最適反應溫度分析

將經誘導大量表現此N-端醯基胺基酸酶（消旋酵素）的轉形菌株離心收集，經純化回收後，於酵素反應溶液中加入50 mM Tris-HCl緩衝液(pH8.0)、10 mM的基質（N-甲胺醯基-D-HPA）、0.5 mM $CoCl_2$以及適當量之純化酵素，於不同溫度下（20~90℃）分別反應30分鐘，之後再置於沸水中作用5分鐘，以終止酵素反應，再以Chiral-HPLC方法分析酵素活性。由結果顯示此酵素最適之反應溫度爲40~70℃（圖2）。

G. 金屬離子對酵素活性影響之分析

將各種不同的金屬離子固定其濃度，分別加入純化

(0975.13)
年 月 日修(更)正替換頁

的NAAAR酵素溶液中，靜置15分鐘，再加入10 mM基質（N-甲胺醯基-D-HPA）、0.5 mM $CoCl_2$，於50℃下反應30分鐘之後，置於沸水中作用5分鐘，以終止酵素反應，利用Chiral-HPLC方法分析酵素活性。結果顯示此NAAAR酵素在含有Co^{++}, Mn^{++}, Ni^{++}之二價金屬離子下具有較好的酵素活性且其活性大小依序爲Co^{++} > Mn^{++} > Ni^{++}；當沒有添加任何金屬離子或加入EDTA時，則酵素不具有任何活性（表二），因此，推論此消旋酶屬於金屬需求酵素(metalloenzyme)的一種。

表二、異常球菌 *Deinococcus radiodurans* NCHU1003 之 N-醯基胺基酸消旋酶活性的影響.

化合物	濃度 (mM)	相對活性（%）[a]
無	2	0
$CaCl_2$	2	0
$CoCl_2$	2	100
$CuCl_2$	2	0
$MnCl_2$	2	79.1
$MgCl_2$	2	20.5
$NiCl_2$	2	40.6
$ZnCl_2$	2	19.7
EDTA	10	0

[a] 相對活性係表現以相對於與$CoCl_2$時之酵素活性百分比表示。

H. NAAAR 酵素的熱穩定性分析

(097.5.13) 年 月 日修(更)正替換頁

於純化所得之NAAAR酵素溶液中加入0.5 mM $CoCl_2$，置於55℃恆溫槽中作用，每間隔固定時間取出酵素，進行酵素殘存活性分析。結果顯示酵素於55℃作用下，其半衰期約爲15天，經持續作用25天後仍保有20%以上之酵素活性，因此推論此NAAAR酵素爲高耐熱性酵素。

實施例2. 生產光學純度胺基酸

A. NAAAR酵素基因與L-N-甲胺醯基轉移酶基因在單一宿主細胞中共同表現

培養 *B. kaustophilus* 菌體後，抽取其染色體做爲模板，根據L-N-甲胺醯基轉移酶基因的讀碼區(ORF)設計二條引子NCAU（5’-ggcgaggatccatgattcaaggggaacgtc-3’）含*Bam*HI切位以及NCAD(5’-aatttaagcttattccccttgggccagttg-3’)含*Hin*dIII切位，以聚合酶連鎖反應(polymerase chain reaction)來增幅L-N-甲胺醯基轉移酶基因，將PCR產物以1% agarose gel進行回收，再用*Bam*HI及*Hin*dIII限制酶切割後，與pQE30進行接合，構築成pQE-*Inca*質體。

爲了使 *B. kaustophilus* 之 L-N-甲胺醯基轉移酶基因和 *D. radiodurans* 之 *naaar* 基因，在 T_5 啓動子引導下，於單一 *E. coli* 宿主細胞中進行共同表現。於 pQE-30 載體的 T_5 啓動子序列前及 λ 轉錄終止子 (transcriptional terminator) 序列後設計兩條引

(097.5.13)

子pQEU及 pQED，皆帶有設計的 *Nhe*I 限制酶切位，以前述構築得之 pQE-*lnca* 作爲模板，利用 PCR 的方式將L-N-甲胺醯基轉移酶基因增幅出來，

，此增幅出的PCR產物的5'端包含有T5啓動子、*lac* 操作子(operator)及6×his-tag序列，在3'端則有 λ 轉錄終止子。回收含有L-N-甲胺醯基轉移酶基因的 PCR 產物，以 *Nhe*I 限制酶剪切後，與事先用相同限制酶剪切過的 pQE-*naaar* 進行黏合反應，構築成質體 pQE-*arlnca* ，再轉形至*E. coli* JM109 中，以進行基因的大量表現。在反應溶液中分別加入10 mM之基質（包含N-甲胺醯基-HPA）、0.5 mM $CoCl_2$、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)以及由共同表現基因所得到之酵素（其爲在同一細胞中共同表現兩種酵素，並加以純化得），於50℃下進行催化反應，分析酵素的轉換作用，結果顯示，共同表現之酵素作用2~3小時之後可以直接將原始之基質完全轉換成最終產物L型胺基酸，結果列示於下表三。

表三、NCa-D-HPA 由酵素（L-N-甲胺烯基轉移酶/ N-醯化胺基酸消旋酶）之轉化

時間 (小時)	NCa-D-HPA (mM)	NCa-L-HPA (mM)	L-HPA (mM)
0.5	4.16	0.88	4.96
1.0	1.16	0	8.84
2.0	0	0	10

(0975.13)

B. 利用全細胞轉換生產光學活性胺基酸

分別挑選攜帶如前述所製得有共同表現基因質體pQEarlnca的*E. coli* JM109轉形菌株，培養於500 ml的LB培養液（含有100 ug/ml之ampicillin），以37℃恆溫培養，直至OD_{600}值大於1。隨後加入IPTG（終濃度爲1 mM），誘導基因表現。

將誘導過後之菌液，經離心處理後收集菌體，稱菌體濕重後置於4℃備用。轉換生產L-HPA時，取經誘導並已回收之菌體0.2 g，加入已配製好的100 ml基質溶液中（10 mM N-甲胺醯基-D,L-HPA溶於含有0.5 mM $CoCl_2$的50 mM Tris-HCl pH8.0緩衝液），於37℃水浴槽以磁石攪拌進行轉換反應，利用pH值調控反應器（pH/ORP Controller PC310，Suntex，台灣）以1N HCl及1N NaOH來控制並穩定反應期間的pH值(pH 7.0 ~ pH 8.0)。每隔一段時間取樣0.5 ml，以Chiral-HPLC方法進行轉換分析經作用80小時之後，L-HPA的轉換生產率可達98%，而所生成之產物其光學純度爲99% ee值。

因此，本發明係利用自然法則之高度創作，其能達成本發明之預期目的，本發明是爲一種前所未見之設計，極

(0975.13)
年 月 日修(更)正替換頁

[圖式之簡要說明]

圖1列示於各種緩衝液中不同pH值對N-端醯基胺基酸消旋酶活性之影響。

圖2列示不同反應溫度對N-端醯基胺基酸消旋酶活性之影響。

圖3列示使用包含編碼L-甲胺醯基轉移酶/N-醯基胺基酸消旋酶之核苷酸序列的重組大腸桿菌宿主全細胞進行NCa-D-HPA之轉化作用。其係藉由測量受質NCa-D-HPA、轉化產物L-HPA及可能副產物NCa-L-HPA於反應期間隨時間之濃度變化，測定本發明以全細胞製備L-HPA之方法的效能。

(0977.10)
年 月 日修(更)正本

申請專利範圍：

1. 一種製備高純度光學活性 L-高苯丙胺酸之方法，其特徵爲將 N-端受保護之高苯丙胺酸與分離自異常球菌 *Deinococcus radiodurans* NCHU1003 之 N-醯化胺基酸消旋酶(NAAAR)及 L-N-甲胺醯基轉移酶共同於 40~70℃下，於 Tris-HCl 緩衝液，pH7.0~9.0 中進行反應，而產生相對應之具光學活性 L-高苯丙胺酸，其中該 N-醯化胺基酸消旋酶具有如 SEQ ID NO:1 之胺基酸序列。

2. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該 N-醯化胺基酸消旋酶爲自原菌 *Deinococcus radiodurans* NCHU1003 直接純化得。

3. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中該 N-醯化胺基酸消旋酶爲藉由重組之方法所製備得。

4. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其進一步包含於反應混合物中添加二價金屬離子以提高該 N-醯化胺基酸消旋酶之活性。

5. 根據申請專利範圍第 4 項之方法，其中該二價金屬離子係選自 Co^{++}、Mn^{++}、及 Ni^{++}。

6. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其特徵係將該 N-醯化胺基酸消旋酶及該 L-N-甲胺醯基轉移酶固定化

於撐體上進行反應。

7. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其特徵係將編碼該 N-醯化胺基酸消旋酶之核苷酸序列與編碼 L-N-甲胺醯基轉移酶之核苷酸序列共同選殖於宿主細胞中並以全細胞方式生產該光學活性 L-高苯丙胺酸。