

申請日期	86 年 11 月 4 日
案 號	86116399
類 別	C12N/15/54, 9/10, 15/70, 1/21, C12P19/18, A61K 31/70

公告本

Int. Cl.

557327

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、發明 名稱	中 文	麴二糖磷酸化酶，彼之製法及用途
	英 文	Kojibiose phosphorylase, its preparation and uses
二、發明 創作人	姓 名	(1) 西本友之 (2) 久保田倫夫 (3) 茶園博人
	國 籍	(1) 日本 (2) 日本 (3) 日本 (1) 日本國岡山縣岡山市桑野五二五番地の三
	住、居所	(2) 日本國岡山縣岡山市四御神一番三〇 (3) 日本國岡山縣岡山市湊一〇七番地の二
三、申請人	姓 名 (名稱)	(1) 林原生物化學研究所股份有限公司 株式会社林原生物化学研究所
	國 籍	(1) 日本 (1) 日本國岡山縣岡山市下石井一丁目二番三號
	住、居所 (事務所)	
	代 表 人 姓 名	(1) 林原健

裝

訂

線

申請日期	86 年 11 月 4 日
案 號	86116399
類 別	

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

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

裝
訂
線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C分類：

A6
B6

本案已向：

國 (地區) 申請專利，申請日期： 案號： ， ☐有 ☐無主張優先權

日本	1996 年 11 月 8 日	8-311235	☒ 有主張優先權
日本	1997 年 3 月 3 日	9-61710	☒ 有主張優先權

有關微生物已寄存於： ， 寄存日期： ， 寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝
訂
線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

發明背景發明領域

本發明關於一種新穎麴二糖磷酸化酶、彼之製法及用途，更詳而言之，關於一種新穎麴二糖磷酸化酶，其於無機磷酸及／或它的鹽（若沒有引起任何不便，則以下本發明說明書中縮寫成“無機磷酸”）之存在中將麴二糖水解形成D-葡萄糖和 β -D-葡萄糖-1-磷酸及／或它的鹽（若沒有引起任何不便，則以下本發明說明書中縮寫成“ β -D-葡萄糖-1-磷酸”），且其相反地由 β -D-葡萄糖-1-磷酸和D-葡萄糖形成麴二糖和無機磷酸，及關於麴二糖磷酸化酶之製法，用麴二糖磷酸化酶製造的含葡萄糖基轉移醣之醣組成物，及含醣組成物的組成物。

先前技藝之說明

近來，寡醣如麥芽糖和海藻糖及其功能已經成為焦點，且已經對它們的獨特及不同製法就各種不同觀點作研究。已知磷酸化酶如麥芽糖、海藻糖、蔗糖、纖維二糖及昆布二糖磷酸化酶可用當作製造上述寡醣的方法。各種不同微生物已知是這些磷酸化酶的來源。

這些磷酸化酶的活性和來源係摘錄於“酵素手冊”中，由日本東京的Asakur-Shoten Publisier(1982)所出版。然而，目前已知沒有磷酸化酶可以形成麴二糖，而希望有真實的供應品。

五、發明說明(2)

發明概述

本發明提供一種新穎酶，麴二糖磷酸化酶，其製法，用該酶製備的含葡萄糖基轉移醣之醣組成物，及其用途。

爲了達成以上目的及獲得一種未知的麴二糖磷酸化酶，本案發明人廣泛地篩選製造該酶用的微生物。結果，它們發現歸屬於熱厭氧菌屬的 *Thermoanaerobium brockii*，A T C C 3 5 0 4 7 製造一種新穎的麴二糖磷酸化酶及建立製法。它們亦建立一種新穎及／或習知的葡萄糖基轉移醣，其可藉於醣之存在中讓酶接觸當作醣供體的 β -D-葡萄糖-1-磷酸而製得，及一種製造含有上述新穎及／或習知的醣之組成物的方法。因此，它們完成本發明。

附圖之詳細說明

圖 1 顯示溫度對依本發明的麴二糖磷酸化酶之活性的影響。

圖 2 顯示 p H 值對依本發明的麴二糖磷酸化酶之活性的影響。

圖 3 顯示溫度對依本發明的麴二糖磷酸化酶之穩定性的影響。

圖 4 顯示 p H 值對依本發明的麴二糖磷酸化酶之穩定性的影響。

圖 5 顯示重組體 D A N 之限制圖。圖中，箭頭顯示 D N A 編碼本麴二糖磷酸化酶。

五、發明說明(3)

發明之詳細說明

本發明的麴二糖磷酸化酶包括於無機磷酸之存在中將麴二糖水解形成 D - 葡萄糖及 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸的所有酶，而未限制該酶的起源。本 (the present) 麴二糖磷酸化酶可具有以下作用及物理化學特性：

(1) 作用

(a) 於無機磷酸之存在中將麴二糖水解形成 D - 葡萄糖及 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸；

(b) 由葡萄糖及 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸形成麴二糖及無機酸，及使用 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸當作醣供體將葡萄糖基之轉移反應催化至其它醣；

(2) 分子量

83,000 $\pm$ 5,000 道爾吞 (daltons)，根據 SDS - PAGE；

(3) 等電點

pI 4.4 $\pm$ 0.5，根據使用兩性電解質的電泳；

(4) 最適宜溫度

約 65 $^{\circ}$ C，當於 pH 5.5 培養 30 分鐘時；

(5) 最適宜 pH

約 5.5，當於 60 $^{\circ}$ C 培養 30 分鐘時；

(6) 熱穩定性

穩定至溫度高及於約 65 $^{\circ}$ C，當於 pH 5.5 $^{\circ}$ C 培養一小時；

裝

訂

五、發明說明(4)

(7) pH 穩定性

穩定於 pH 約 5.5 至 10.0，當於 4℃ 培養 24 小時；

(8) 活性抑制

被 1 mM Hg^{++} 所抑制。

更具體地，麴二糖磷酸化酶包括蛋白質具有 SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 3 的胺基酸序列當作部分胺基酸序列，及或當作全部，具有 SEQ ID NO: 4 的胺基酸序列，及其功能均等物。措辭“功能均等物”意為蛋白質其仍具有實質上與麴二糖磷酸化酶相同的活性，及具有酶的胺基酸序列，其中一或多個胺基酸被不同者所替換，一或多個胺基酸加到 N-及/或 C-端或插入於內胺基酸序列內，在 N-及/或 C-端區域的一或多個胺基酸被刪除，及在內胺基酸序列中的一或多個胺基被刪除。上述麴二糖磷酸化酶包括任一由天然來源中分離出，如由會製造酶的微生物之培養物，藉突變劑處理而獲得的其突變種，及藉應用重組體 DNA 和肽合成技術所人工合成者。如上述，依本發明，所要的酶可由天然來源及由重組體技術獲得。

依本發明的 DNA 係包括所有上述的 DNA s，其將本麴二糖磷酸化酶編碼。該 DNA s 之例子是那些含有 SEQ ID NO: 5 之核苷序列及編碼 SEQ ID NO: 4 之胺基酸序列者，及其功能均等物。措辭“功能

五、發明說明(5)

均等物”意味 D N A s (其編碼蛋白質)實質上保有與麴二糖磷酸化酶相同的活性,及具有 S E Q I D N O : 5 之核苷序列,其中一或多個鹼基被不同者所替換,一或多個鹼基加到 5' - 及 / 或 3' - 端或插入內核苷序列內,在 5' - 及 / 或 3' - 端區域中或內核苷序列的一或多個鹼基被刪除,及其互補者。這些功能均等物包括 D N A s ,其係 S E Q I D N O : 5 之變種,其中一或多個鹼基被不同者所替換而不改變 S E Q I D N O : 5 所編碼的胺基酸序列。除了上述的 D N A s 外,本 D N A 尚包括其它 D N A s ,其中 5' - 及 / 或 3' - 端係連接至一或多個那些編碼麴二糖磷酸化酶者以外的 D N A s ,如開始密碼子起始者、停子密碼子、Shine-Dalgarno序列、編碼訊息肽的核苷序列、啟動子、增強者、及終止者。

本發明未特定限制這些 D N A s 的來源和製法。例如,含 *Thermoanaerobium brockii*, A T C C 35047 的熱厭氧菌屬之微生物當作 D N A s 的天然來源可被提及。可藉由培養之微生物的細胞碎屑收集 D N A 部分而獲得本 D N A 。所收集的 D N A 本身可用於本發明中,且其可被製備成極有利的重組體 D N A ,此係藉將一含本 D N A 的片段引入一自身可複製性載體中;重組體 D N A 之獲得可通常應用普遍於上述 D N A 的重組 D N A 技術以獲得基因庫,及施用一選擇法如雜交法來由基於核苷序列的基因庫選擇所欲的重組體 D N A ,其編碼本麴二糖磷酸化酶,如 S E Q I D N O : 5 。所獲得的重組體 D N A 可被放大

五、發明說明(6)

，當藉引入適當的宿主如埃希氏菌(Escherichia)屬微生物而獲得培養的轉形體時，接著應用普遍於培養的鹼—S D S法而容易獲得所欲量的本D N A。可容易獲得本D N A，藉依習用方式應用P C R法使用當作模板的上述微生物之毀壞細胞或由細胞所收集的D N A，及使用當作引體的基於S E Q I D N O：5化學合成的D N A，或藉化學合成一種含S E Q I D N O：5的D N A。可獲得本D N A的上述功能均等物，例如藉應用位置指向之突變於上述重組體D N A，或應用上述使用重組體D N A當作模板和一種含核苷序列的化學合成D N A的P C R法，其被轉化成所欲的核苷序列，當作引體。

本D N A包括那些重組體D N A形式者，其被引入自身可複製性載體中。如上述，這些重組體D N A s係極有用於製備本D N A，且亦有用於製造本麴二糖磷酸化酶。一旦如上述獲得所欲的D N A後，應用普遍於將D N A插入適當載體內的重組D N A技術而可相當容易獲得那些重組體D N A s。該載體之例子為那些在適當宿主血漿中具有複製性者。本發明中可任意地使用以下載體：

p U C 1 8，BluescriptII SK(+)，p k k 2 2 3 - 3，及λ g t · λ C，其需要埃希氏菌(Escherichia)屬微生物當作宿主；p U B 1 0，p T Z 4，p C 1 9 4，ρ 1 1，1，及1 0 5，其需要桿菌(Bacillus)當作宿主，及p H Y 3 0 0 P L K，p H V 1 4，T R p 7，Y E p 7，及p B S 7，其需要至少兩種宿主。關於將本D N A插

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(7)

入載體的方法之例子，用限制酶來裂斷適當的載體及所得的本DNA或一含本DNA的DNA，及連接所形成的DNA片段和載體片段。所適當選用的該限制酶之例子是A c c I，B a m H I，B g l I I，B s t X i，E c o R I，H i n d I I I，N o t I，P s t I，S a c I，S a l I，S m a I，S p e I，X b a I，及X h o I。在連結DNA和載體片段的情況中，例如，可用對限制酶有適當識別順序的化學合成DNA s。爲了連結DNA s與其它者，在緩冷後它們以內細胞地或外細胞地接觸DNA連接酶。

本DNA包括那些轉形體形式者，其內引入有DNA。該轉形體係極可用於獲得本麴二糖磷酸化酶及DNA。例如，埃希氏菌(Escherichia)及桿菌(Bacillus)屬、放線菌、酵母之微生物可任意用當作轉形體之宿主微生物。通常將上述重組體DNA引入一適當的宿主內可獲得轉形體；當使用埃希氏菌屬微生物時，微生物和重組體DNA係於鈣離子之存在中培養，當使用桿菌屬微生物時，則應用競爭細胞及原生質體法。上述製備本DNA的方法本身係屬技藝中所習用者，例如敘述於J. Sumbruck等人的"Molecular Cloning A Laboratory Manual"，第二版，由Cold Spring Harbor Laboratory Press出版(1989)。

製造麴二糖磷酸化酶的本方法之特徵在於其包括培養會製造酶的微生物，及由培養物中收集所製得的酶。本發明並未特別限制所用的該微生物之屬和種以及培養的方法

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(8)

。該微生物之例子包括那些屬於熱厭氧菌屬的微生物，較佳為 *Thermoanaerobium brockii*，A T C C 3 5 0 4 7，及藉將本 D N A 引入適當的宿主微生物而獲得的轉形體。

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

微生物的培養條件係可由較適宜它們生長者中挑出。就熱厭氧菌屬微生物的培養而言，它們通常於厭氧狀態下於溫度 5 0 - 8 0 °C，較佳 6 0 至 7 0 °C，及於 p H s 5 - 8，較佳 6 . 5 - 7 . 5 培養。本發明中可用任何的培養時間，只要足夠微生物之生長，較佳為 1 0 - 5 0 小時。在使用上述轉形體的情況中，它們通常於通氣攪拌的好氧狀態下於溫度 2 0 - 6 5 °C 及 p H 值 2 - 9 培養約 1 - 6 天。

培養微生物後，可從培養物中收集本酶。因為酶活性

五、發明說明(9)

通常可能出現於細胞內，可獲得完整及經處理的細胞當無粗酶。全部培養物亦可用當作粗酶。可用習用的固-液分離法來分離細胞與營養培養基；例如可用直接離心培養物的方法，在加助濾劑入培養物後或預覆後過濾培養物的方法，及薄膜如普通濾材和中空纖維來過濾培養物的方法。完整及經處理的細胞本身可用當作粗酶，且若需要，它們可被製成部分純化的酶。在用桿菌（*Bacillus*）屬之微生物當宿主製備轉形體的情況中，所要的酶可分泌於營養培養基內，視轉形體所用的重組體DNA之種類而定。這樣的情況中，培養物上清液可用作粗酶。

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

粗酶可用為原封完整的或可經習用純化方法所純化。例如，用硫酸銨將經處理的細胞鹽析成粗酶，接著將酶透析及接續用陰離子交換管析層析術使用"DEAT-TOYOPEARL®"（一種Tosoh公司販售的樹脂），陽離子交換管柱層析術使用"CM-TOYOPEARL®"（一種日本東京Tosoh公司販售的樹脂），疏水管柱層析術使用"BUTYL-TOYOPEARL®"（一種日本東京Tosoh公司販

五、發明說明(10)

售的樹脂)，及凝膠過濾管柱層析術使用" ULTROGEL® AcA44 RESIN" (一種凝膠過濾管柱層析術用的凝膠，由 Sepracor/IBF s. a. 販售，Villeneuve la Garenne，法國)，以獲得酶之電泳單蛋白質帶。

如下分析本發明的麴二糖磷酸化酶：將 0.2 毫升酶溶液加到 2 毫升的 20 mM 含有 1.0 w/v % 麴二糖當作受質的磷酸鹽緩衝液 (pH 5.5)，於 60 °C 培養溶液 30 分鐘，對反應混合物取樣 0.5 毫升，及於 100 °C 培養 10 分鐘以中止酵催反應。將 0.5 毫升 D-葡萄糖氧化酶/過氧化酶試劑加到該加熱的樣品，攪拌混合物，保持混合物於 40 °C 歷 30 分鐘，及添加 2.5 毫升 5-N 鹽酸，攪拌所產生的混合物，及測量混合物在 525 nm 波長的吸收度。酶活性的一單位係定義為酶每分鐘形成一微莫耳 D-葡萄糖。以類似於上述的分析可分析麥芽糖-及海藻糖-磷酸化酶，例外的是分別以麥芽糖及海藻糖代替麴二糖當作受質。

在使用麴二糖磷酸化酶製造含葡萄糖基轉移酶的醣組成物之本酵催反應中，通常讓酶接觸當作醣供體的 β -D-葡萄糖-1-磷酸並於以其它適當醣當作受體的條件下，例如，單醣如 D-葡萄糖及 L-山梨糖，雙醣如麥芽糖、麴二糖、海藻糖及蔗糖，及三-及更高-寡醣如麥芽三糖、麥芽四糖及麥芽五糖。結果，視所用的受體而定，形成葡萄糖基轉移酶，包括麴二糖、葡萄糖基山梨糖、麴二糖基葡萄糖、麴三糖、麴二糖基葡萄糖苷、麴二糖基果糖

五、發明說明(11)

苷、麴二糖基麥芽糖、麴二糖麥芽三糖、及麴二糖基-麥芽四糖。在這些葡萄糖基轉移醣中，本發明首先發現的新穎醣是葡萄糖基山梨糖及麴二糖果糖苷。

市售當作試劑的 β -D-葡萄糖-1-磷酸可原封完整地用當作本發明中的醣供體，且其之製備可藉於無機磷酸及／或它的鹽之存在中使一適當的磷酸化酶接觸當作受質的醣；例如，其之製備可藉於無機磷酸及／或它的鹽之存在中使麴二糖磷酸化酶接觸麴二糖，使麥芽糖接觸麥芽糖磷酸化酶；或使海藻糖接觸海藻糖磷酸化酶。當上述以磷酸化酶形成 β -D-葡萄糖-1-磷酸的任一反應係在使用本麴二糖磷酸化酶形成葡萄糖基轉移醣的相同反應系統中進行時，可將 β -D-葡萄糖-1-磷酸直接供應給系統，結果有利特徵為製造成本降低且製造步驟簡化。如上述，二或多種當作受體的醣可任意同時使用。上述無機磷酸包括正磷酸及濃縮磷酸，且通常，較宜使用正磷酸。無機磷酸鹽包括磷酸離子之化合物，通常衍生自上述無機磷酸，且通常較宜使用高水溶性磷酸鈉鹽及鉀鹽。

對於利用本麴二糖磷酸化酶的葡萄糖基轉移醣形成反應中所用的受質濃度係不特別限制的。通常，較宜使用者係含有 1-20 w/w % (措辭 "w/w %" 在說明書中將縮寫成 %，除非另有指明) 當作醣供體的 β -D-葡萄糖-1-磷酸水溶液及 1-20 % 含受體的水溶液。如上述，當在相同於上述葡萄糖基轉移醣形成反應的反應系統中進行藉適當磷酸化酶之作用所作的 β -D-葡萄糖-1-

五、發明說明 (12)

磷酸形成反應時，可推薦以下者：當採用麴二糖磷酸化酶之作用時，約 1 - 20 % 麴二糖水溶液用於代替 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸當作葡萄糖基轉移反應的受質，並共存有約 0.5 - 20 mM 的磷酸鹽如磷酸二氫鈉。當採用其它磷酸時，約 1 - 20 % 麥芽糖或海藻糖可與約 0.5 - 20 mM 的磷酸鹽如磷酸二氫鈉共存以代替 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸當作葡萄糖基轉移反應的受質，及視所用的醣之種類而定，以乾燥固體基準 (d . s . b) 計，麥芽糖 - 或 麴二糖 - 磷酸化酶的較佳共存量係約 0.1 - 50 單位 / 克醣。

上述反應可在不會將受質之存在中所用的酶鈍化之溫度進行，即高及於約 70 °C，較佳約 15 - 65 °C。通常可將反應之 pH 調整至 pH 值約 4.0 - 9.0，較佳約 5.0 - 7.5。可適當選擇反應時間，視酵催反應速率而定，通常其約 0.1 - 100 小時，當酶的一般用量約 0.1 - 50 單位 / 克受質 (d . s . b) 時。如上述，當在相同於葡萄糖基轉移醣形成反應的反應系統中進行藉不同的磷酸化酶之作用所作的 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸形成反應時，反應溫度及 pH 值係設定在不會鈍化所用的磷酸化酶者，視它們的熱穩定性而定。

因此，所得的反應混合物含有葡萄糖基轉移醣，其對應於用當作受質的醣。葡萄糖基轉移醣的產率係依酵催反應中所用的受質濃度、受質種類及反應條件而變化。例如，在於無機磷酸之存在中使用 5 % β - D - 葡萄糖 - 1 -

五、發明說明(13)

磷酸及 25 % 山梨糖當麴二糖當作受質的情況中，所形成的葡萄糖基半乳糖苷之產率係約 30 %。本說明書中，葡萄糖基轉移醣的產率係意味反應混合物中所形成的該轉移醣相對於全部醣的百分率(%)，d . s . b .。

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

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

可依習用方式過濾及離心所製造的含葡萄糖基轉移醣之反應混合物以去除雜質，然後經純化步驟如用活性炭脫色，及用 H - 和 OH - 型離子交換劑除鹽，及濃縮成糖漿產品。若需要，可藉噴霧乾燥來任意乾燥糖漿產品成爲粉狀產品。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

五、發明說明 (14)

所得含葡萄糖轉基移醣的本醣組成物通常含有至少 5 %，較佳至少 10 % 的葡萄糖基轉移醣，d . s . b . 。

本麴二糖磷酸化酶所形成的本醣組成物具有令人滿意的味道、甜味、滲透控制能力、保濕性、光澤給予能力、防止結晶能力、及防止回凝能力、抗蛀性、雙叉乳酸桿菌 (bifid) 之生長促進活性、及礦物吸收促進活性。因為這些令人滿意的特性和功能，本醣組成物可任意廣泛地用於組成物中，如食品、菸草、香煙、飼料、寵物食物、化粧品、藥物、成形體、日常食物及產品、林業及農業產品、試劑、及化學工業產品。

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

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

本醣組成物可用於調味料中、如豆醬、粉末豆醬、"味噌"、"funmmatsu-味噌"(一種粉末味噌)、"moromi"(一種精

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (15)

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

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

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (16)

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

本醃組成物亦可用於動物如家畜、家禽及魚類的飼料和寵物食物中以改善它們的味覺喜好。本醃組成物可當作甜味料、味道改良劑及品質改良劑以糊狀或液狀用任意地用於其它組成物中,如菸草、香煙、牙膏、唇膏、腮紅、

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(17)

唇霜、內服藥、錠劑、片劑、液滴形式的魚肝油、口香片、口腔清涼劑、含漱劑、化粧品及藥物。

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

如上述，本發明中所用的措辭“組成物”係包括口服

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (18)

— 或非經腸 — 可用的食品，化粧品及藥物，以及日常產品，農業和漁業產品、試劑、及化學工業產品。

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

以下實驗更詳細說明本發明：

實驗 1

麴二糖磷酸化酶之製備

依照“細菌及噬菌體之 A T C C 編目”，第 18 版，第 452 - 456 頁 (1992) 中所揭示的 *Thermoanaerobium* < 熱厭氧菌 > *brockii* 之培養基的製法但是用 0 . 5 w / v % 海藻糖代替 0 . 5 w / v % 葡萄糖當作碳源，而製備得培養基，將 100 毫升整份的培養基置於 100 毫升加壓瓶內，接著接種 *Thermoanaerobium brockii*，A T C C 35047 的種菌，及讓其停駐於 60℃ 歷 48 小時以供種菌培養。

將 10 升整份的新鮮營養培養基（與種菌培養所用的相同）置於四個 11 升不銹鋼瓶內，加熱滅菌，冷卻至 60℃，將一 v / v % 的種菌接種至培養基，接著於 60℃ 靜置培養約 40 小時。

將約 40 升所得集結的培養物離心以獲得 92 克濕細

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (19)

胞，然後懸浮於 10 mM 磷酸鹽緩衝液中，超音波破碎，及離心以獲得毀壞的細胞之懸浮液的上清液。上清液具有活性為 0.1 單位／毫升的麴二糖磷酸化酶。

實驗 2

麴二糖磷酸化酶之純化

用 UF 膜將實驗 1 中的上清液濃縮成約 360 毫升的酶濃縮物，其具有活性約 10 單位／毫升的麴二糖磷酸化酶。

將 300 毫升酶濃縮物對著 10 mM 磷酸鹽緩衝液 (pH 7.0) 作透析 24 小時，及離心以去除不溶性物質。使 380 毫升所得之上清液經過 380 毫升 "DEAE-TOYOPEARL® 650 GEL" 作離子交換管柱層析，離子交換管柱層析所用的凝膠係為日本東京 Tosoh 公司的商品。

讓本麴二糖磷酸化酶吸附在凝膠上，及藉送入線性梯度的氯化鈉 (由 0 M 增加至 0.5 M) 以由管柱溶析出。具有酶活性的部分 (在約 0.2 M 溶析出的) 被收集及集結，然後如下將集結溶液中的酶純化；對著新鮮製備的含有 1.5 M 硫酸銨的同樣緩衝液將溶液透析，將透析後的溶液離心以去除不溶性物質，及使上清液經使用 100 毫升 "BUTYL-TOYOPEARL® 650 GEL" 疏水性管柱作層析。用線性梯度的硫酸銨 (由 1.5 M 減少至 0 M) 以溶析吸附在凝膠上的麴二糖磷酸化酶，及收集具有酶

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (20)

活性的部分。

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

由上述純化步驟所獲得純化酶樣品之產率係約 2 0 %，此係相對於毀壞細胞的上清液之酶活性而言。酶樣品具有比活性為 7 1 . 4 單位 / 毫克蛋白質。依照 L o w r y 法使用牛血清蛋白當作標準蛋白質對蛋白質作定量。

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

實驗 3

麴二糖磷酸化酶之特性

使實驗 2 中的麴二糖磷酸化酶經過使用 1 0 w / v % 凝膠的 S D S - P A G E。與標記蛋白質作比較，其係日本東京的日本 B i o - R a d 實驗室的商品，它們平行電泳，測量酶的分子量，透露其分子量為 8 3 , 0 0 0 ± 5 , 0 0 0 道耳吞，且根據填充有 " T S K g e l G 4 0 0 S W " 的 7 . 5 m m 直徑和 6 0 0 m m 長度的管柱之凝膠過濾係給予分子量為 5 0 0 , 0 0 0 ± 3 0 , 0 0 0 道耳吞，該凝膠過濾用的凝膠係東京 T o s o h 公司的商品。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(21)

使純化後的麴二糖磷酸化酶經過使用 2 w / v % "AMPHOLINE"(一種兩性電解質,為瑞典 Uppsala 的 Pharmacia LKB Biotechnology AB 的商品)的聚丙烯醯胺凝膠電泳,接著測量蛋白質帶及凝膠的 p H 值,透露酶具有 p I 為 4 . 4 $\pm$ 0 . 5 。

依酶活性的分析來研究溫度和 p H 值對本麴二糖磷酸化酶活性的影響。為了研究溫度的影響,使酶於約 4 0 - 8 0 $^{\circ}$ C 之溫度反應以代替酶分析中所用的 6 0 $^{\circ}$ C。若要研究 p H 值的影響,則使酶於 p H 值約 4 - 8 反應以代替酶活性之分析中所用的緩衝液之 p H。這兩種情況中,類似於酶分析者來中止酵催反應,接著對所形成的葡萄糖作定量。這些結果係於圖 1 及 2 中,其分別為溫度和 p H 值之影響數據,且以相對於最大值的數值來表示。當在 p H 5 . 5 培養 3 0 分鐘時酶之最適宜溫度約 6 5 $^{\circ}$ C,當在 6 0 $^{\circ}$ C 培養 3 0 分鐘時最適宜 p H 約 5 . 5。酶之熱穩定性的測量係藉由:將酶溶解於 1 0 m M 磷酸鹽緩衝液 (p H 5 . 5) 於溫度約 4 0 - 8 0 $^{\circ}$ C 培養一小時,將所培養的酶冷卻,及依照酶分析法來分析剩餘的酶活性。酶之 p H 穩定性的測量係藉:將酶溶解於具有不同 p H 值 (約 3 . 5 - 1 0) 的緩衝液內,保持各酶溶液於 4 $^{\circ}$ C 2 4 小時,調整各溶液以給予 p H 5 . 5,及依照酶分析法來分析殘存的酶活性。這些結果係於圖 3 及 4 中,其分別為酶的熱及 p H 穩定性的數據且以相對於最大值的數值來表示。酶具有熱穩定性高至於約 6 5 $^{\circ}$ C 及 p H 穩定性約 5 . 5

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (22)

— 10.0。酶活性被 — mM Hg^{++} 所抑制。

實驗 4

麴二糖磷酸化酶之部分胺基酸序列

實驗 4 - (1)

N - 端胺基酸序列

將實驗 2 方法所獲得的純化酶樣品之一部分對著蒸餾水作透析，及將以蛋白質計約 $40 \mu g$ 的經透析酶當作樣品用於分析 N - 端胺基酸序列。"PROTEIN SEQUENCER MODEL 473A"，一種美國 Foster 市 Applied Biosystes 公司所販售的裝置，被用於分析 N - 端之高到五個的胺基酸殘基。分析過的部分胺基酸序列為 SEQ ID NO : 1。使用相同酶樣品之新鮮製劑作更精確的分析，透露酶在 N - 端具有 SEQ ID NO : 6 的胺基酸序列。

實驗 4 - (2)

內部分胺基酸序列

將實驗 2 方法所獲得的純化酶樣品之一部分對 10 毫升 Tris - HCl 緩衝液 (pH 9.0) 作透析，及用相同緩衝液的新鮮製劑來稀釋經透析的溶液以給予一毫克 / 毫升的蛋白質濃度。使一毫升所得溶液混合 $10 \mu g$ 賴胺醯肽鏈內切酶，一種日本東京 Wako 純化學工業公司販售的酶樣品，及於 $30^{\circ}C$ 使經過酵催反應 22 小時以形成肽。進行逆相 HPLC (高效液體層析) 以分離肽，分

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (23)

離條件為使用 " μ BONDASPHERE C-18 COLUMN (2 . 1 毫米直徑及 1 5 0 毫米長度) " , 一種美國麻州 Milford 的 Waters Chromatograph, Div . , MILLIPORE 公司所販售的逆相 H P L C 管柱, 流速為 0 . 9 毫升 / 分鐘, 周圍溫度, 及線性梯度丙腈由 0 v / v % 增加至 4 8 v / v % 於 0 . 1 v / v % 三氟醋酸中歷 1 2 0 分鐘。藉測量 2 1 0 n m 的吸收度來檢測由管柱溶析出的肽。兩種肽, 即具有滯時間 6 6 分鐘的 K P 1 5 及具有滯留時間 9 6 分鐘的 K P 2 3 , 它們明顯地互相分離, 被分開收集, 於真空乾燥, 及溶於 0 . 1 v / v % 三氟醋酸和 5 0 v / v % 乙腈的 2 0 0 μ l 溶液內。在蛋白質序列器上分析各肽, 透露 N - 端之高至五個的胺基酸殘基。K P 1 5 及 K P 2 3 分別給予 S E Q I D N O : 2 及 S E Q I D N O : 3 的胺基酸序列。使用相同分析之相同酶樣品的新鮮製劑作更精確的分析, 透露 K P 1 5 具有 S E Q I D N O : 7 在 N - 端而 K P 2 3 具有 S E Q I D N O : 8 在它們的 N - 端。

實驗 5麴二糖磷酸化酶的醣水解反應之受質專一性

一種選自 D - 葡萄糖、麥芽糖、蔗糖、乳糖、海藻糖、新海藻糖、纖維二糖、蜜二糖、麴二糖、異麥芽糖、槐糖、龍膽二糖、尼加糖及昆布二糖的醣之水溶液與 1 0 單位 / 克 (d . s . b .) 實驗 2 之方法所得的純化麴二糖

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(24)

磷酸化酶之醣混合，及於 5 m M 磷酸二氫鈉的存在中於 60 °C 及 pH 5.5 培養 24 小時。

各反應溶液的醣濃度為 2 w / v %。預－反應溶液及後－反應混合物經薄層層析（以下縮寫成“TLC”），其使用“KIESELGEL 60（20 × 20 公分）”，一種美國 Rahway 的 Merck & Co. 公司所販售的 TLC 用鋁板。樣品在周圍溫度於使用 1－丁醇／吡啶／水（= 7 : 3 : 1 體積比）當作展開溶劑系統之板上展開一次，及用 20 v / v % 硫酸／甲醇溶液噴灑該板，及於 110 °C 加熱約 10 分鐘以著色。比較板上所檢測到的溶液和混合物之點，查核酶是否作用於醣。結果於表 1 中：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

A7
B7

五、發明說明(25)

表 1

受 質	分 解
D - 葡萄糖	-
麥 芽 糖	-
蔗 糖	-
海 藻 糖	-
新 海 藻 糖	-
纖 維 二 糖	-
蜜 二 糖	-
麴 二 糖	+
異 麥 芽 糖	-
槐 糖	-
龍 膽 二 糖	-
尼 加 糖	-
昆 布 二 糖	-

註) + : 被麴二糖磷酸化酶之作用所水解。

- : 不被麴二糖磷酸化酶之作用所水解。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

原

五、發明說明 (26)

如表 1 中所示，發現本麴二糖磷酸化酶對於麴二糖表現強的受質專一性及對其作用形成 D - 葡萄糖及 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸，但是不會作用其它的糖。

實驗 6

麴二糖磷酸化酶在葡萄糖基轉移醣形成反應中對受體的專一性

一水溶液，其溶於等量以重量計的當作醣供體的 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸及表 2 中當作受體的單醣、寡醣及糖醇之一中，係與 10 單位 / 克實驗 2 之方法所得的純化麴二糖磷酸化酶之 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸混合，及於 60 °C 和 pH 5.5 酵催反應 24 小時。將受體及醣供體之濃度調整至 1 w / v %。類似於實驗 5，預 - 反應溶液及後 - 反應混合物經 TLC，接將板著色。比較板上所檢測到的溶液和混合物樣品之點，根據後反應的新檢測到點判斷是否形成轉移醣。藉肉眼觀察新檢測到點之色度，相對評估轉移醣的產率。結果於表 2 中：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

A7

B7

五、發明說明(27)

表 2

受 體		葡 萄 糖 基 轉 移 醴 的 形 成
分 類	名 稱	
醛 戊 醴	D-木 糖	+
	L-木 糖	+
	D-阿 拉 伯 糖	-
	L-阿 拉 伯 糖	-
	D-核 糖	-
醛 己 醴	D-半 乳 糖	-
	D-葡 萄 糖	+++
	D-甘 露 糖	-
酮 己 醴	L-山 梨 糖	+++
	D-果 糖	-
去 氧 糖	2-去 氧 果 糖	-
	D-岩 藻 糖	+
	L-岩 藻 糖	+
	L-鼠 李 糖	-
葡 萄 糖 苷	α -甲 基 葡 萄 糖 苷	+++
	β -甲 基 葡 萄 糖 苷	+++
糖 醇	山 梨 糖 醇	-
胺 糖	葡 萄 糖 胺	-
	N-乙 醴 基 葡 萄 糖 胺	-
寡 醴	麥 芽 糖	+++
	異 麥 芽 糖	+++
	麴 二 糖	+++
	昆 布 二 糖	+++
	尼 加 糖	+++
	纖 維 二 糖	++
	龍 膽 二 糖	++
	海 藻 糖	+++
	新 海 藻 糖	+++
	蔗 糖	++
	巴 拉 金 糖	+++
	麥 吐 糖 (Maltulose)	+++
	松 二 糖	+++
	乳 糖	-
	蜜 二 糖	-
	乳 酮 糖	-
	麥 芽 糖 醇	+++
	麥 芽 三 糖	+++
	麥 芽 四 糖	+++
	麥 芽 五 糖	+++

註) - : 沒 有 形 成 葡 萄 糖 基 轉 移 醴。
 + : 相 當 小 量 形 成 葡 萄 糖 基 轉 移 醴
 ++ : 相 當 大 量 形 成 葡 萄 糖 基 轉 移 醴
 +++ : 非 常 大 量 形 成 葡 萄 糖 基 轉 移 醴

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (28)

如表 2 中所示，其透露本麴二糖磷酸化酶有效地由當作醴供體的 β -D-葡萄糖-1-磷酸轉移葡萄糖基給單醴如 D-葡萄糖及 L-山梨糖，雙醴如麥芽糖、麴二糖、海藻糖及蔗糖，及三-和更高-寡醴如麥芽三糖、麥芽四糖及麥芽五糖。當使用 α -D-葡萄糖-1-磷酸當作醴供體代替 β -D-葡萄糖-1-磷酸時，沒有形成葡萄糖基轉移醴。

參照以下實驗 7 和 12 將詳細說明部分實驗 6 中所揭露的葡萄糖基轉移醴，該醴係藉本麴二糖磷酸化酶之醴轉移反應而形成的。

實驗 7

來自 D-葡萄糖及 β -D-葡萄糖-1-磷酸的
葡萄糖基轉移醴

酵催反應的醴成分，其由實驗 6 中用 D-葡萄糖及 β -D-葡萄糖-1-磷酸當作受質而獲得者，經氣體層析術（以下稱作“GLC”）分析。一部分的反應混合物經乾燥，溶於吡啶中，及經三甲基矽烷化以便當作 GLC 分析用的樣品，該 GLC 使用不銹鋼管柱，3 毫米直徑及 2 公尺長度，填充有 2% “SILICONE OV-17 / CHROMOSOLB W”，一種日本東京 GL 科學公司所販售的 GLC 用樹脂，氮氣當作載體，流速為 40 毫升／分鐘，管柱烘箱溫度為 160-320℃，加熱速率為 7.5℃／分鐘。藉氫火焰離子化檢測器偵檢醴成分。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (29)

結果，藉本麴二糖磷酸化酶之作用而由 D - 葡萄糖及 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸形成的葡萄糖基轉移醣之峰的滯留時間係與真實麴二糖者一致。根據，推測葡萄糖基轉移醣係麴二糖。

實驗 8

葡萄糖基山梨糖

為了鑑定藉本麴二糖磷酸化酶經醣轉移反應至 L - 山梨糖所形成的葡萄糖基轉移醣，製備該醣，分離，及檢驗結構；提供一種含有 2.5% β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸及 2.5% L - 山梨糖的水溶液，調整水溶液之 pH 值至 5.0，加到 10 單元 / 克實驗 2 方法所得之純化的麴二糖磷酸化酶之 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸溶液，於 60℃ 使溶液反應 48 小時，於 100℃ 加熱反應混合物歷 10 分鐘以鈍化殘存的酶，及依實驗 7 方法用 G.L.C 分析所得之混合物的樣品。結果，證實反應混合物含有相當大量的物質具有滯留時間不同於 L - 山梨糖和 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸者，估計其是葡萄糖基轉移醣。根據 G.L.C 的數據，醣之產率約 24%。殘存的反應混合物經活性炭脫色，過濾，用 H - 和 OH - 型離子交換樹脂除鹽及純化，濃縮成約 50% 的濃度，及經以下管柱層析，接著收集富含葡萄糖基轉移醣的部分。

分餾所用的樹脂係 "X T - 1016"，一種鹼金屬強酸陽離子交換樹脂，Na - 型，聚合度為 4%，由日本

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (30)

東京的 T o k y o 有機化學工業公司所販售，及將樹脂懸浮於水中，填充於四個套層不銹鋼管柱內，各為 3 公分直徑及一公尺長度，它們串級串聯以給予總凝膠床約 4 公尺深。保持內管柱溫度為 40℃，將醣溶液以對樹脂的 5 v / v % 體積送入管柱，接著將熱到 40℃ 的水以對分餾醣溶液的 S V (空間速度) 0.15 流速送入管柱，及收集富含葡萄糖基轉移醣的餾分。

集結餾分，脫鹽，純化，及濃縮成約 40% 濃縮物，其然後在填充有 " Y M C - P a c k O S D " 的管柱上層析，其係一種日本京都的 Y M C 公司所販售的十八基矽石凝膠，以收集含有葡萄糖基轉移醣的餾分。集結餾分及濃縮成約 40% 濃縮物，其然後再用於上述管柱層析。所產生富含含有葡萄糖基轉移醣的溶液被脫鹽，純化，濃縮，及於真空中乾燥以獲得粉狀產品，含有醣產率約 20%，d . s . b .，相對於醇催反應中所用的材料醣。依實驗 7 之方法，用 G L C 分析該粉狀產品，透露其含有約 98% 的葡萄糖基轉移醣，d . s . b .。

在用酸分解後，富含含有葡萄糖基轉移醣的粉狀產品經 G L C 分析，透露醣以莫耳比約 1 : 1 製造 D - 葡萄糖及 L - 山梨糖，當用酸分解時。將粉狀產品甲基化，用酸水解，還原，及乙醯化以獲得一部分甲基己醇醋酸酯，其然後經 G L C 分析以檢測 2, 3, 4, 6 - 四甲基 - 1, 5 - 二乙醯葡萄糖醇。根據此，葡萄糖基轉移醣係由莫耳比 1 : 1 的 D - 葡萄糖及 L - 山梨糖所構成，其中 D - 葡萄

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(31)

糖之 C - 1 的 O H - 基係與這些醣間的鍵結有關聯。可推測因為被酸所分解，所以沒有檢測到山梨糖的甲基衍生物。

為了更詳細檢驗葡萄糖基轉移糖之結構，測量醣的 ^{13}C - N M R 光譜。結果，其給予 ^{13}C - N M R 光譜 (1 0 0 M H z , D_2O) : T S P 的 σ p p m 為 1 0 1 . 2 , 1 0 0 . 4 , 9 9 . 5 , 9 9 . 3 , 7 7 . 1 , 7 5 . 6 , 7 4 . 9 , 7 4 . 5 , 7 4 . 0 , 7 3 . 2 , 7 2 . 2 , 6 6 . 3 , 6 3 . 2 , 及 6 2 . 1 。根據數據，葡萄糖基轉移醣經鑑定為葡萄糖基山梨糖，為一種雙醣，即 α - D - 葡萄糖基 - (1 $\rightarrow$ 5) - L - 山梨糖，由 D - 葡萄糖及 L - 山梨糖所構成，其經 D - 葡萄糖之 C - 1 處及 L - 山梨糖之 C - 5 處的 α - 鍵所連結一起。此化合物為一種新穎醣。

實驗 9

麴二糖基葡萄糖

為了確認藉本麴二糖磷酸化酶由 D - 葡萄糖至麥芽糖的轉移反應所形成的葡萄糖基轉移醣，製備葡萄糖基轉移醣，分離，及檢驗結構如下：一種含有 5 % β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸及 1 0 % 麥芽糖的水溶液之 p H 值被調整至 6 . 0 ，與 2 0 單位 / 克實驗 2 方法所獲得的純化之麴二糖磷酸化酶的 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸 (d . s . b .) 混合，接著於 6 0 $^{\circ}\text{C}$ 酵催反應 4 8 小時。之後，於

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (32)

100 °C 加熱反應混合物 10 分鐘以鈍化殘存的酶。依實驗 7 方法用 G L C 分析一部分的反應混合物。結果，證實反應混合物含有相當大量的化合物具有滯留時間不同於麥芽糖及 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸者，產生結論為化合物是葡萄糖基轉移醣。根據 G L C 的數據，產率約 40 %，d . s . b . 。類似於實驗 8，殘存的反應混合物經分餾、純化、濃縮及於真空中乾燥以獲得一種富含葡萄糖基轉移醣的粉狀產品，產率約 20 %，相對於材料醣 (d . s . b .) 而言。粉狀產品含有約 98 % 的葡萄糖基轉移醣，d . s . b . 。

粉狀產品經甲基化、酸水解、還原及乙醯化以獲得一部分甲基己醇醋酸酯，其然後經 G L C 分析。分析查出 2，3，4，6 - 四甲基 - 1，5 - 二乙醯葡萄糖醇、3，4，6 - 三甲基 - 1，2，5 - 三乙醯葡萄糖醇及 2，3，6 - 三甲基 - 1，4，6 - 三乙醯葡萄糖醇，以約 1 : 1 : 1 的莫耳比。資料指出葡萄糖基轉移醣係一種由葡萄糖分子所構成的寡醣；一具有鍵結相關的 O H - 基在 C - 1，另一具有鍵結相關的 O H - 基在 C - 1 和 C - 2 或鍵結相關的 O H - 基在 C - 2，及另一具有鍵結相關的 O H - 基在 C - 1 和 C - 4 或鍵結相關的 O H - 基在 C - 4，以 1 : 1 : 1 的莫耳比。

爲了更詳細檢驗葡萄糖基轉移糖之結構，測量醣的 ^{13}C - N M R 光譜。結果，其給予 ^{13}C - N M R 光譜 (100 M H z，D₂O) : T S P 的 σ p p m 爲 99 . 5，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

原

五、發明說明 (33)

9 9 . 4 , 9 9 . 1 , 9 8 . 6 , 9 4 . 6 , 7 9 . 2 ,
7 8 . 8 , 7 8 . 6 , 7 8 . 0 , 7 7 . 6 , 7 7 . 3 ,
7 7 . 0 , 7 6 . 1 , 7 5 . 6 , 7 5 . 3 , 7 4 . 7 ,
7 4 . 2 , 7 4 . 1 , 7 3 . 8 , 7 2 . 7 , 7 2 . 2 ,
7 2 . 1 , 6 3 . 6 , 6 3 . 5 , 6 3 . 2 及 6 3 . 1 。

根據數據，葡萄糖基轉移醣經鑑定為麴二糖基葡萄糖，一種三醣，即 α -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 4)-D-葡萄糖，由麥芽糖及D-葡萄糖所構成，其經 α -1,2鍵連接至麥芽糖之非還原端的葡萄糖殘基。

實驗 1 0

麴三糖

爲了確認藉本麴二糖磷酸化酶由D-葡萄糖至麴二糖的轉移反應所形成的葡萄糖基轉移醣，製備葡萄糖基轉移醣，分離，及檢驗結構如下：含有20%麴二糖的5mM磷酸二氫鈉被調整至pH5.5，與10單位/克實驗2方法所獲得的純化之麴二糖磷酸化酶的麴二糖(d.s.b.)混合，接著於60℃酵催反應48小時。之後，於100℃加熱反應混合物10分鐘以鈍化殘存的酶。依實驗7方法用GLC分析一部分的反應混合物。結果，證實反應混合物含有麴二糖及相當大量的化合物具有滯留時間不同於D-葡萄糖及 β -D-葡萄糖-1-磷酸者，產生結論爲化合物是葡萄糖基轉移醣。根據GLC的數據，產

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (34)

率約 30 %，d . s . b . 。類似於實驗 8，殘存的反應混合物經分餾、純化、濃縮及於真空中乾燥以獲得一種富含葡萄糖基轉移醣的粉狀產品，產率約 15 %，相對於材料麴二糖 (d . s . b .) 而言。粉狀產品含有約 98 % 的葡萄糖基轉移醣，d . s . b . 。

粉狀產品經甲基化、酸水解、還原及乙醯化以獲得一部分甲基己醇醋酸酯，其然後經 G L C 分析。分析查出 2，3，4，6 - 四甲基 - 1，5 - 二乙醯葡萄糖醇及 3，4，6 - 三甲基 - 1，2，5 - 三乙醯葡萄糖醇，以約 1 : 2 的莫耳比。資料強烈指出葡萄糖基轉移醣係一種由葡萄糖分子所構成的寡醣；一具有鍵結相關的 O H - 基在 C - 1，另一具有鍵結相關的 O H - 基在 C - 1 和 C - 2，及另一具有鍵結相關的 O H - 基在 C - 2，以 1 : 1 : 1 的莫耳比。

爲了更詳細檢驗葡萄糖基轉移糖之結構，測量醣的 ^{13}C - N M R 光譜。結果，其給予 ^{13}C - N M R 光譜 (100 M H z，D₂O) : T S P 的 σ_{ppm} 爲 99 . 3，99 . 0，98 . 3，97 . 6，96 . 5，92 . 2，81 . 3，78 . 8，78 . 6，78 . 5，77 . 2，77 . 1，75 . 7，75 . 6，74 . 7，74 . 6，74 . 5，74 . 3，74 . 2，74 . 1，74 . 0，73 . 9，72 . 6，72 . 3，72 . 2，72 . 1，72 . 0，63 . 6，63 . 4，63 . 2，63 . 1，63 . 1 及 63 . 0。根據數據，葡萄糖基麴二糖經鑑定

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (35)

爲麴三糖，一種三醣，即 α -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-葡萄糖基-(1 $\rightarrow$ 2)-D-葡萄糖，由麴二糖及D-葡萄糖所構成，其經 α -1, 2鍵連接至麥芽糖之非還原端的葡萄糖殘基。

實驗 1 1

麴二糖基葡萄糖苷

爲了確認藉本麴二糖磷酸化酶由D-葡萄糖至海藻糖的轉移反應所形成的葡萄糖基轉移醣，製備葡萄糖基轉移醣，分離，及檢驗結構如下：一種含有5% β -D-葡萄糖-1-磷酸及10%海藻糖的水溶液之pH值被調整至5.5，與10單位/克實驗2方法所獲得的純化之麴二糖磷酸化酶的 β -D-葡萄糖-1-磷酸(d.s.b.)混合，接著於60℃酵催反應48小時。之後，於100℃加熱反應混合物10分鐘以鈍化殘存的酶。依實驗7方法用GLC分析一部分的反應混合物。結果，證實反應混合物含有相當大量的化合物具有滯留時間不同於 β -D-葡萄糖及海藻糖者，產生結論爲化合物是葡萄糖基轉移醣。根據GLC的數據，產率約75%，d.s.b.。類似於實驗8，殘存的反應混合物經分餾、純化、濃縮及於真空中乾燥以獲得一種富含葡萄糖基轉移醣的粉狀產品，產率約65%，相對於材料醣(d.s.b.)而言。粉狀產品含有約98%的葡萄糖基轉移醣，d.s.b.。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (36)

粉狀產品經甲基化、酸水解、還原及乙醯化以獲得一部分甲基己醇醋酸酯，其然後經 G L C 分析。分析查出 2, 3, 4, 6 - 四甲基 - 1, 5 - 二乙醯葡萄糖醇及 3, 4, 6 - 三甲基 - 1, 2, 5 - 三乙醯葡萄糖醇，以約 2 : 1 的莫耳比。資料指出葡萄糖基轉移醣係一種由葡萄糖分子所構成的寡醣；一具有鍵結相關的 O H - 基在 C - 1，及另一具有鍵結相關的 O H - 基在 C - 1 和 C - 2，以 2 : 1 的莫耳比。

爲了更詳細檢驗葡萄糖基轉移糖之結構，測量醣的 $^{13}\text{C} - \text{NMR}$ 光譜。結果，其給予 $^{13}\text{C} - \text{NMR}$ 光譜 (100 MHz, D_2O) : T S P 的 σ p p m 爲 98.6, 96.2, 93.3, 77.3, 75.8, 75.4, 75.1, 74.8, 74.6, 74.6, 74.0, 73.9, 72.5, 72.3, 72.2, 63.4, 63.4 及 63.3。根據數據，葡萄糖基海藻糖經鑑定爲麴二糖基葡萄糖苷或捲柏醇，一種三醣，即 $\alpha - \text{D} - \text{葡萄糖基} - (1 \rightarrow 2) - \alpha - \text{D} - \text{葡萄糖基} - (1 \rightarrow 1) - \alpha - \text{D} - \text{葡萄糖苷}$ ，由海藻糖及 D - 葡萄糖所構成，其經 $\alpha - 1, 2$ 鍵連接至海藻糖之非還原端的葡萄糖殘基。

實驗 12麴二糖基果糖苷

爲了確認藉本麴二糖磷酸化酶由 D - 葡萄糖至蔗糖的轉移反應所形成的葡萄糖基轉移醣，製備葡萄糖基轉移醣

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(37)

，分離，及檢驗結構如下：一種含有 5 % β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸及 10 % 蔗糖的水溶液之 pH 值被調整至 5.5，與 10 單位 / 克實驗 2 方法所獲得的純化之麴二糖磷酸化酶的 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸 (d . s . b .) 混合，接著於 60 °C 酵催反應 48 小時。之後，於 100 °C 加熱反應混合物 10 分鐘以鈍化殘存的酶。依實驗 7 方法用 GLC 分析一部分的反應混合物。結果，證實反應混合物含有相當大量的化合物具有滯留時間不同於 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸及蔗糖者，產生結論為化合物是葡萄糖基轉移醣。根據 GLC 的數據，產率約 75 %，d . s . b . 。類似於實驗 8，殘存的反應混合物經分餾、純化、濃縮及於真空中乾燥以獲得一種富含葡萄糖基轉移醣的粉狀產品，產率約 50 %，相對於材料醣 (d . s . b .) 而言。粉狀產品含有約 98 % 的葡萄糖基轉移醣，d . s . b . 。

粉狀產品經酸水解及經 GLC 分析，透露其形成 D - 葡萄糖及 D - 果糖，以約 2 : 1 之莫耳比。粉狀產品經甲基化、酸水解、還原及乙醯化而獲得一部分甲基己醇醋酸酯。GLC 分析查出 2, 3, 4, 6 - 四甲基 - 1, 5 - 二乙醯葡萄糖醇及 3, 4, 6 - 三甲基 - 1, 2, 5 - 三乙醯葡萄糖醇，以 1 : 1 的莫耳比。這些資料指出葡萄糖基轉移醣係由 D - 葡萄糖及 D - 果糖以 2 : 1 之莫耳比所構成，及 D - 葡萄糖分子中的一個係具有鍵結相關的 OH - 基在 C - 1 和 C - 2，而另具有鍵結相關的 OH - 基在

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (38)

C - 1 和 C - 2，以 1 : 1 的莫耳比。可推測因為酸分解，所以沒有發現 D - 果糖的甲基衍生物。

為了更詳細檢驗葡萄糖基轉移糖之結構，測量醴的 ^{13}C - NMR 光譜。結果，其給予 ^{13}C - NMR 光譜 (100 MHz ， D_2O) : TSP 的 ppm 為 107.0，99.3，92.5，84.0，79.1，78.5，76.5，75.7，74.9，74.7，74.1，74.0，72.2，72.1，64.9，64.6，63.2，及 63.1。根據數據，葡萄糖基蔗糖經鑑定為麩二糖基果糖苷，一種三醴，即 α - D - 葡萄糖基 - ($1 \rightarrow 2$) - α - D - 葡萄糖基 - ($1 \rightarrow 2$) - β - D - 果糖苷，由蔗糖及 D - 葡萄糖所構成，其經 α - 1，2 鍵連接至蔗糖的葡萄糖殘基。

實驗 13

急毒性試驗

口服投予七週大之 dd - 型老鼠實驗 8 - 12 中的富含葡萄糖基山梨糖、麩三糖、麩二基葡萄糖苷及麩二糖基果糖苷的粉末產品以作急毒性試驗。結果，即使投予最大劑量即是 50 克 / 公斤老鼠以重量計也沒有老鼠死亡。此數據顯示這些醴是極低毒性的。

實例 A 解釋本麩二糖磷酸化酶及含葡萄糖基轉移醴的醴，編碼酶的 DNA，及使用酶製備含葡萄糖基轉移醴之醴組成物的方法；而實例 B 解釋含醴組成物的組成物：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (39)

實例 A - 1

酶 溶 液

依實驗 1 方法培養 *Thermoanaerobium* < 熱厭氧菌 > *brockii*, A T C C 3 5 0 4 7 以獲得種菌，及將一 v / v % 種菌接種於新鮮相同於實驗 1 中所用的培養基內，依實驗 1 方法置於厭氧發酵器內，及於 6 5 °C 培養約 3 0 小時。離心所產生的培養物以獲得細胞，其然後經超音波破壞及離心，接著測量上清液的麴二糖磷酸化酶活性。活性為 0 . 0 8 單位 / 毫升培養物。毀壞細胞的上清液經超濾膜濃縮，及將濃縮物透析以獲得一種酶溶液具有約 8 單位 / 毫升的麴二糖磷酸化酶，相對於材料培養物的總活性而言產率約 7 0 %。

實例 A - 2

D N A 之 製 備

依照實驗 1 之方法，將 *Thermoanaerobium brockii*, A T C C 3 5 0 4 7 之種菌接種於 1 1 升新鮮的相同於實驗 1 所用的營養培養基中內，及於 6 0 °C 培養 2 4 小時。藉離心由培養物中分離出所繁殖的細胞，懸浮於適量的 T r i s - E D T A - 食鹽緩衝液（以下縮寫成“T E S 緩衝液”）（p H 8 . 0）中，使細胞懸浮液混合 0 . 0 5 w / v % 的溶菌酶，及於 3 7 °C 培養 3 0 分鐘。之後，於 - 8 0 °C 將經處理過的酶混合物冷凍一小時，及

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(40)

接續混合 T E S 緩衝液 (p H 9 . 0) 和熱到 6 0 ° C 的 T E S 緩衝液 - 酚混合物溶液，接著充分攪拌及冷卻混合物，離心生成物，及收集所形成的上層。將兩倍體積的冷乙醇加到該層，及收集所形成的沈積物，溶解於適量的 S S C 緩衝液 (p H 7 . 1) 內，與 7 . 5 μ g 核糖核酸酶及 1 2 5 μ g 蛋白酶混合，及於 3 7 ° C 培養一小時。於所產生的混合物中加入氯仿與異戊醇的混合物，接著攪拌及讓混合物停置，及收集上層。在將冷乙醇加到該層後，收集所形成的沈積物，用 7 0 v / v % 冷乙醇沖洗，及於真空中乾燥以獲得一種 D N A 。將 D N A 溶解於 S S C 緩衝液 (p H 7 . 1) 內以獲得約一毫克 / 毫升的濃度，及於 - 8 0 ° C 冷凍。

實例 A - 3轉形體及重組體 D N A 之製備

將一毫升實例 A - 2 的 D N A 溶液置於一容器內，與約 2 0 單位的限制酶 H i n d I I I 混合，及於 3 7 ° C 培養 3 0 分鐘以部分分解 D N A 。所產生的混合物經蔗糖蜜度超濾以收集約 2 , 0 0 0 - 5 , 0 0 0 鹼基對的 D N A 片段。平行地，"Bluescript® I I S K (+)"，一種美國加州的 Stratagene Cloning Systems 所販售的血漿載體，係完全被限制酶 Hind III 所裂解，及用日本滋賀縣 Otsu 的 Takarr Shuzo 公司的 "DNA LIGATION KIT < 套件 > " 依套件中所附的手續來連結 0 . 3 μ g 裂斷的載體與約 3 μ g D N A

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (41)

片段。利用所得的重組體 DNA, 100 μ g "EPICURIAN COLI® XL1-BLUE", 一種美國加州的 Stratagene Cloning Systems 所販售的大腸桿菌種之微生物, 被習用競爭細胞法轉形而獲得基因庫。

將所產生的當作基因庫的轉形體接種於瓊脂培養皿 (pH 7.0) 內, 該皿係以常見方式製備得, 含有 10 克/升胰酶、5 克/升酵母萃取物、5 克/升氯化鈉、75 毫克/升安比西林 (ampicillin) 和 50 毫克/升 5-溴-4-氯-3-吡啶基- β -半乳糖苷, 及於 37°C 培養 18 小時, 接著將形成在皿上的約 4,000 白菌落固定於 "HYBOND-N+" 上, 一種美國 Arlington Heights, 的 Amersham Corp., Div. Amersham International 所販售的耐綸薄膜。基於實驗 4 中所揭露的 SEQ ID NO: 7 之胺基酸 1-7, 一種寡核苷酸具有核苷序列由 5'-TTYGAYGARAAYAAAYATGCC-3' 所表示者被化學合成, 及標識 [γ - 32 P] ATP 及 T4 多核苷酸激酶以獲得一種合成 DNA 當作探測物。在固定於耐綸薄膜上的菌落中, 與探測物所強度雜交的一菌落係應用習知菌落雜交法來選擇, 且命名為 "TKP1"。

以習用方式將轉形體 TKP1 接種於一含 100 μ g/ml 安比西林之鈉鹽的 L-肉汁培養液 (pH 7.0) 內, 及於 37°C 旋轉搖動狀態下培養 24 小時。完成培養後, 將培養物離心以獲得細胞, 其然後經習用的鹼-SDS 法處理以萃取重組體 DNA。重組體 DNA 的習用

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明(42)

雙脫氧分析透露其含有一種DNA具有SEQ ID NO : 9的核苷序列，由3,956個衍生自Thermoanaerobium brockii, ATCC 35047的鹼基對所構成。如圖5中所示，重組體DNA係連結於限制酶Hind III之識別處的下流。一衍生自核苷序列的胺基酸序列如並行顯示於SEQ ID NO : 9中的。比較SEQ ID NO : 9與SEQ ID NOs : 1-3之胺基酸序列（它們為N-端胺基酸序列），及與SEQ ID NOs : 6-8之胺基酸序列（它們為實驗4中所揭露的本麴二糖磷酸化酶之內胺基酸序列），SEQ ID NOs : 1-3之胺基酸序列係分別與SEQ ID NO : 9之胺基酸1-5、590-594及357-361（如並行顯示者）一致，SEQ ID NOs : 6-8之胺基酸序列係分別與SEQ ID NOs : 9之胺基酸1-10、590-599及357-366（如並行顯示者）一致。這些顯示本麴二糖磷酸化酶具有SEQ ID NO : 4之胺基酸序列，及Thermoanaerobium brockii, ATCC 35047之酶係被具有SEQ ID NO : 5的核苷序列的DNA所編碼。重組體DNA，其藉上述方法所獲得及透露其核苷序列者，係被命名為"pTKP1"。

實例A-4

藉轉形體製造麴二糖磷酸化酶

將100毫升含有16克/升多朊、10克/升酵母

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明 (43)

萃取物及 5 克／升氯化鈉的水溶液置於 500 毫升的錐形瓶內，於 121℃ 殺菌 15 分鐘，冷卻，無菌調整至 pH 7.0，及無菌地與 10 毫克安比西林的鈉鹽混合入液體營養培養基內。將實例 A-3 的轉形體 TKP1 接種入培養基，及於 37℃ 通氣攪拌狀態下培養約 20 小時以獲得種菌。依照種菌的製法，將 7 升新鮮相同於種菌培養所用的營養培養基置於 10 升發酵器內，用 70 毫升種菌接種，及於通氣攪拌狀態下培養約 20 小時。所產生的培養物經習用方式離心以收集細胞，其然後懸浮於 10 mM 磷酸鹽緩衝液 (pH 7.0) 中，超音波破壞細胞，及離心以去除不溶性物質，接著收集上清液。上清液對著 10 mM 磷酸鹽緩衝液作透析，及分析上清液中的麴二糖磷酸化酶活性，透露製得約 500 單位／升酶培養物。

作為第一對照組，將 *Escherichia coli* < 大腸桿菌 > XL1-Blue 株之種菌接種於一類似於上述轉形體之培養中所用的營養培養基，及培養，但是培養基內沒有加安比西林。破壞所繁殖的細胞，接著收集及透析上清液。作為第二對照組，依照實驗 1 的的方法，於相同於轉形體之培養中所用的營養培養基內但是不用安比西林及於 60℃ 靜置培養 *Thermoanaerobium brockii*, ATCC 35047 之種菌，類似於轉形體之情況，破壞培養物中的細胞，接著收集及透析上清液。作為第一對照組的透析溶液中沒有檢測到本酶之酶活性。作為第二對照組的透析溶液係具有酶活性約 100 單位／升培養物，其係低於轉

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(44)

形體 T K P 1 者。

依照實驗 2 的方法，在用 D E A E - T O Y O P E A R L[®] 6 5 0 G E L[™] 及 U L T R O G E L[®] A c A 4 4 R E S I N[™] 的管析層析上純化實例 A - 4 的透析溶液，及依照實驗 3 的方法來分析經純化的酶，透露其分子量為 83,000 ± 5,000 道耳吞（根據 S D S - P A G E），及分子量為 500,000 ± 30,000 道耳吞（根據凝膠過濾層析），等電點為 4.4 ± 0.5（根據使用聚丙烯醯胺凝膠的電焦），最適宜溫度約 65℃，最適宜 pH 約 5.5 - 10.0，熱穩定性高及於 65℃，及 pH 穩定性約 5.5 - 10.0，它們皆實質上與實驗 1 及 2 中所製備的酶者相同。這些結果顯示藉重組 D N A 技術可容易製造本麴二糖磷酸化酶，且可明顯增加酶產率。

實例 A - 5

酶溶液

依實例 A - 4 之方法於營養培養基內培養實例 A - 3 的轉形體 T K P 1。離心培養物所獲得的細胞被超音波所破壞，分析上清液的麴二糖磷酸化酶活性，活性約 0.5 單位／毫升培養物。用超濾膜來濃縮上清液及透析以獲得一種酶溶液，具有約 10 單位／毫升麴二糖磷酸化酶，產率約 70%，相對於材料培養物之總酶活性而言

實例 A - 6

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

五、發明說明(45)

含麴二糖的醴溶液

於 25 mM 含有 5 % 麥芽糖的磷酸氫二鉀－檸檬酸緩衝液 (pH 6 . 0) 中，加入 5 單位／克市售細菌麥芽糖磷酸化酶之麥芽糖，及 50 單位／克實例 A - 1 方法所獲得的麴二糖磷酸化酶之麥芽糖，接著於 30 °C 培養 72 小時。於 100 °C 加熱反應混合物 30 分鐘以鈍化殘存的酶，冷卻，以習用方式用活性炭脫色，過濾，用 H - 和 OH - 型離子交換劑除鹽及純化，及更進一步濃縮成約 75 % 的含麴二糖之糖漿醴溶液，產率約 95 %，相對於材料 d . s . b . 而言。

產品，其含有約 30 % 麴二糖，d . s . b .，及麴二糖基葡萄糖且具有令人滿意的甜度和適當的黏度及保濕度，可任意地用於食品、化粧品、藥物和成形品中當作甜味料、味道改良劑、穩定劑、雙叉乳酸桿菌的生長促進劑、及礦物質吸收促進劑。

實例 A - 7

富含麴二酶的粉末

一種含有約 30 % 麴二糖 (d . s . b .) 的醴溶液，當作材料，由實例 A - 6 的反應及純化而獲得的，被調整到濃度約 20 %，d . s . b .，其然後與 5 單位／克葡萄糖澱粉酶乾燥固體混合，及於 pH 4 . 5 及 40 °C 培養 16 小時以分解殘存的麥芽糖。將反應混合物加熱 100 °C 30 分鐘以中止酵催反應，然後濃縮成約 40 %

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(46)

溶液。爲了增加麴二糖含量，藉四支套層不銹鋼管柱來分餾該濃縮的溶液，該管柱之直徑爲3公分且長度爲一公尺，填充有"XT-1016"的水懸浮液，其爲一種鹼金屬強酸陽離子交換樹脂，Na-型，聚合度爲4%，由日本東京的Tokyo有機化學工業公司所販售，它們串級串聯以給予總凝膠床約4公尺深，將溶液以對樹脂的5v/v%送入，接著將熱到40℃的水以SV 0.15送入以便將溶液分餾，及收集富含麴二糖的餾份。集結餾份，濃縮，於真空中乾燥，及粉碎以獲得富含麴二糖的粉末，產率約20%，相對於材料d.s.b.而言。

產品含有約90%麴二糖，d.s.b.，且具有令人滿意的可口甜度和適當的保濕度，其可任意地用於食品、化粧品、藥物和成形品中當作甜味料、味道改良劑、穩定劑、雙叉乳酸桿菌的生長促進劑、及礦物質吸收促進劑。

實例 A - 8

含葡萄糖基山梨糖的醴溶液

一含有5%β-D-葡萄糖-1-磷酸及5%L-山梨糖的水溶液之pH值被調整到5.5，與10單位/克實例A-1之方法所獲得的麴二糖磷酸化酶之β-D-葡萄糖-1-磷酸混合，及於60℃酵催反應72小時。於90℃加熱反應混合物30分鐘以鈍化殘存的酶，冷卻，以習用方式用活性炭脫色，過濾，用H-和OH-型離子

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(47)

交換樹脂除鹽及純化，及更進一步濃縮成約 75 % 的含葡萄糖基山梨糖之糖漿醴溶液，產率約 95 %，相對於材料 d . s . b . 而言。

產品含有約 30 % 麴二糖，d . s . b .，且具有令人滿意的可口甜度和適當的黏度及保濕度，其可任意地用於食品、化粧品、藥物和成形品中當作甜味料、味道改良劑、穩定劑、雙叉乳酸桿菌的生長促進劑、及礦物質吸收促進劑。

實例 A - 9富含葡萄糖基山梨糖的醴溶液

一含有 5 % β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸及 10 % L - 山梨糖的水溶液之 pH 值被調整到 6 . 0，與 30 單位／克實例 A - 1 之方法所獲得的麴二糖磷酸化酶之 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸混合，及於 60 °C 酵催反應 72 小時。將反應混合物冷卻，與 5 % 以濕重計的市售麵包酵母混合，於 27 °C 酵催反應 6 小時並藉添加 1 - N 氫氧化鈉溶液來控制 pH 值在 5 - 6 之範圍內。於 90 °C 加熱反應混合物 30 分鐘以中止酵催反應，冷卻，脫色，及以習用方式使用 H - 和 OH - 型離子交換樹脂純化，及更進一步濃縮而獲得約 75 % 的含葡萄糖基山梨糖之糖漿醴溶液，產率約 65 %，相對於材料 d . s . b . 而言。

產品含有約 40 % 葡萄糖基山梨糖，d . s . b .，且具有令人滿意的可口甜度和適當的黏度及保濕度，其可

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(48)

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

實例 A - 10富含葡萄糖基山梨糖的粉末

一種含有約 40 % 葡萄糖基山梨糖 (d . s . b .) 的醣溶液，當作材料，由實例 A - 9 的反應及純化而獲得的，被調整到濃度約 45 %，d . s . b .。為了增加葡萄糖基山梨糖的含量，藉四支套層不銹鋼管柱來分餾所得之溶液，該管柱之直徑為 3 公分且長度為一公尺，填充有 " X T - 1016 " 的水懸浮液，其為一種鹼金屬強酸陽離子交換樹脂，Na - 型，聚合度為 4 %，由日本東京的 T o k y o 有機化學工業公司所販售，它們串級串聯以給予總凝膠床約 4 公尺深，將 5 v / v % 溶液餵給樹脂，接著將熱到 40 °C 的水以 S V 0 . 15 送入管柱以便將溶液分餾，及收集所產生的富含葡萄糖基山梨糖的餾份。集結餾份，濃縮，於真空中乾燥，及粉碎以獲得富含葡萄糖基山梨糖的粉末，產率約 25 %，相對於材料 d . s . b . 而言。

產品含有約 90 % 葡萄糖基山梨糖，d . s . b .，且具有令人滿意的可口甜度和適當的保濕度，其可任意地用於食品、化粧品、藥物和成形品中當作甜味料、味道改良劑、穩定劑、雙叉乳酸桿菌的生長促進劑、及礦物質吸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (49)

收促進劑。

實例 A - 1 1

含麴二糖基果糖苷的醴溶液

製備一含有 1 0 % 麴二糖及 1 0 % 蔗糖的水溶液，與 4 0 單位／克實例 A - 1 之方法所獲得的麴二糖磷酸化酶之麴二糖混合，及於 5 m M 磷酸二氫鈉之存在中於 p H 5 . 0 及 6 0 °C 酵催反應 7 2 小時。於 9 0 °C 加熱反應混合物 3 0 分鐘以鈍化殘存的酶，冷卻，以習用方式用活性炭脫色，過濾，用 H - 和 O H - 型離子交換樹脂除鹽及純化，及更進一步濃縮而獲得約 7 5 % 糖漿醴溶液，產率約 9 5 % ，相對於材料 d . s . b . 而言。

產品含有約 5 5 % 麴二糖基果糖苷，d . s . b . ，且具有令人滿意的可口甜度和適當的黏度及保濕度，其可任意地用於食品、化粧品、藥物和成形品中。

實例 A - 1 2

富含麴二糖基果糖苷的粉末

一種含有約 5 5 % 麴二糖基果糖苷 (d . s . b .) 的醴溶液，當作材料，由實例 A - 1 1 的反應及純化而獲得的，被調整到濃度約 4 5 % ，d . s . b . 。爲了增加麴二糖基果糖苷的含量，依實例 A - 1 0 的方法對所得溶液作管柱層析，但是使用 " D O W E X 5 0 W X 4 (鈣型) ，其爲一種鹼土金屬強酸陽離子交換樹脂，由美國密西

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (50)

根 Midland 的 D O W 化學公司所販售，以收集富含麴二糖基果糖苷的餾份。集結餾份，濃縮，於真空中乾燥，及粉碎以獲得富含麴二糖基果糖苷的粉末，產率約 40 %，
d . s . b . .

產品含有約 95 % 麴二糖基果糖苷，d . s . b . .，且具有令人滿意的可口甜度和適當的保濕度，其可任意地用於食品、化粧品、藥物和成形品中。

實例 A - 1 3含麴二糖基葡萄糖的醴溶液

一含有約 10 % β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸及 20 % 麥芽糖的水溶液之 pH 值被調整到 5 . 0，與 40 單位 / 克實例 A - 1 之方法所獲得的麴二糖磷酸化酶之麴二糖混合，及於 60 °C 酵催反應 72 小時。於 90 °C 加熱反應混合物 30 分鐘以鈍化殘存的酶，冷卻，以習用方式用活性炭脫色，過濾，用 H - 和 OH - 型離子交換樹脂除鹽及純化，及更進一步濃縮而獲得約 75 % 糖漿醴溶液，產率約 95 %，相對於材料的 d . s . b . 而言。

產品含有約 45 % 麴二糖基葡萄糖，d . s . b . .，且具有令人滿意的可口甜度和適當的黏度及保濕度，其可任意地用於食品、化粧品、藥物和成形品中。

實例 A - 1 4富含麴二糖基葡萄糖苷的醴溶液

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (51)

一含有約 5 % β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸及 10 % 海藻糖的水溶液之 pH 值被調整到 5 . 0 , 與 20 單位 / 克實例 A - 1 之方法所獲得的麴二糖磷酸化酶之 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸混合 , 及於 60 °C 酵催反應 72 小時。於 100 °C 加熱反應混合物並保持 pH 值在鹼性超過 10 , 冷卻 , 及以習用方式用活性炭脫色 , 過濾 , 用 H - 和 OH - 型離子交換樹脂除鹽及純化 , 及更進一步濃縮而獲得約 75 % 富含麴二糖葡萄糖苷的糖漿醴溶液 , 產率約 60 % , 相對於材料 d . s . b . 而言。

產品含有約 95 % 麴二糖基葡萄糖 , d . s . b . , 且具有令人滿意的可口甜度和適當的黏度及保濕度 , 其可任意地用於食品、化粧品、藥物和成形品中。

實例 A - 1.5

含麴二糖的醴溶液

於 25 mM 含有 5 % 麥芽糖的磷酸氫二鉀 - 檸檬酸緩衝液 (pH 6 . 0) 中 , 加入 5 單位 / 克市售細菌麥芽糖磷酸化酶之麥芽糖 , 及 40 單位 / 克實例 A - 5 之方法所獲得的麴二糖磷酸化酶之麥芽糖 , 及於 37 °C 酵催反應 72 小時。於 100 °C 加熱反應混合物 30 分鐘以鈍化殘存的酶 , 冷卻 , 以習用方式用活性炭脫色 , 過濾 , 用 H - 和 OH - 型離子交換劑除鹽及純化 , 及更進一步濃縮而獲得約 75 % 含麴二糖的糖漿醴溶液 , 產率約 95 % , 相於材料 d . s . b . 而言。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (52)

因為產品含有約 30 % 麴二糖，d . s . b .，及麴二糖基葡萄糖，及具有令人滿意的可口甜度、適當的黏度及保濕度，其可任意地用於食品、化粧品、藥物和成形品中當作甜味料、品質改良劑、穩定劑、雙叉乳酸桿菌的生長促進劑、及礦物質吸收促進劑。

實例 A - 16

富含麴二糖基葡萄糖苷的醴溶液

一含有約 5 % β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸及 10 % 海藻糖的水溶液之 pH 值被調整到 5 . 0，與 20 單位 / 克實例 A - 5 之方法所獲得的麴二糖磷酸化酶之 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸混合，及於 60 °C 酵催反應 72 小時。於 100 °C 加熱反應混合物並藉添加氫氧化鈉保持 pH 值在鹼性超過 10，冷卻，及以習用方式用活性炭脫色，過濾，用 H - 和 OH - 型離子交換劑除鹽及純化，及更進一步濃縮而獲得約 75 % 含麴二糖基葡萄糖苷的糖漿醴溶液，產率約 60 %，相對於材料 d . s . b . 而言。

因為產品含有約 95 % 麴二糖基基葡萄糖苷，d . s . b .，且具有令人滿意的可口甜度和適當的黏度及保濕度，其可任意地用於食品、化粧品、藥物和成形品中。

實例 B - 1

甜味料

於一重量份的由實例 A - 10 方法所得之富含葡萄糖

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (53)

基山梨糖的粉末中，加入 0 . 0 5 重量份的 " α G SWEET "，其為一種 T o y o 糖精製公司所販售的 α - 葡萄糖基甜菊苷，及將混合物混合均勻成為一種粉狀甜味料。產品為一種高品質甜味料，甜度為蔗糖的兩倍高，而卡值於為蔗糖的一半。因此，產品能用當作低卡甜味料來使一些人的低卡食物變甜，該些人被限制攝取較低卡路里，如肥胖人及糖尿病患者。因為產品較少產生葡聚糖及酸（由誘導蛀牙的微生物而產生者），所以其可適用於使蛀牙禁止的食品變甜。

實例 B - 2

硬糖果

將三十重量份的由實例 A - 8 方法所得之含葡萄糖基山梨的醣溶液加到及混合溶解於 8 0 重量份的具有 2 5 % 含水率的氫化麥芽糖漿中，及於減壓下將所得溶液濃縮至含水率低於 2 %，與一重量份的檸檬酸及適量檸檬香料和著色劑捏合，接著將混合物捏合及成形為硬糖果。產品具有高品質的甜度、低保濕性及令人滿意的嚼性不會引起熔化。

實例 B - 3

口香糖

使四重量份的由實例 A - 1 2 方法所得之富含麩二糖基果糖苷的粉末混合 3 重量份的葡萄糖及 2 重量份的樹膠

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(54)

基質，該樹膠基質已經先被加熱熔化直到軟化，及更進一步混合適量的薄荷調味料，接著用輥子捏揉將混合物成形為口香糖。產品具有令人滿意的口感及風味。

實例 B - 4

巧克力

使十五重量份的由實例 A - 7 方法所得之富含麩二糖的粉末混合 40 重量份的可可糊、10 重量份的可可脂、10 重量份的蔗糖及 15 重量份的脫脂牛奶，及使混合物通經一精製器以降低粒子大小。之後，將所產生的混合物置於柯奇 (conche) 內，與 0.5 重量份的卵磷脂混合，及於 50℃ 捏揉兩天兩夜。將捏揉後的混合物倒入模製機內，成形及固化成巧克力。產品沒有脂肪 - 及糖 - 白粉花現象，而具有令人滿意的味道、風味及在您舌上的可熔化性。

實例 B - 5

卡士達 (Custard) 糊

於 400 重量份的由實例 A - 10 方法所得之富含葡萄糖基山梨糖的粉末中，加入 500 重量份的玉米澱粉、500 重量份的麥芽糖及 5 重量份的鹽，及使混合物通經一篩子而充分混合，與 1,400 重量份的新鮮蛋混點，攪拌，徐徐混合 5,000 重量份的煮沸牛乳，及經慢火加熱和攪拌。當玉米澱粉完全膠化而呈現半透明時則中止

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (55)

加熱，然後冷卻，混合少量的香草調味料以獲得卡士達糊。產品具有平滑表面及令人滿意的味道，而無強烈甜度。

實例 B - 6

U i r o (澱粉糊)

於 90 重量份的由實例 A - 11 方法所得之含麴二糖基果糖苷的醴溶液中，加入 90 重量份的稻米粉末、20 重量份的玉米澱粉、20 重量份的糖、一重量份的 m a t c h a (綠茶) 粉及適量的水，及將混合物捏揉，置於容器內，及蒸 60 分鐘而成 match auir o。產品具有令人滿意的光澤、嚼性、風味及味道。澱粉的回凝被良好地防止，產生相當長的保存期限。

實例 B - 7

Bettara-zuke (新鮮蘿蔔醃漬品)

藉混合均勻一重量份的由實例 A - 13 方法所得之含麴二糖基葡萄糖的醴溶液、0.05 重量份的甘草料、0.008 重量份的蘋果酸、0.07 重量份的麩胺酸鈉、0.03 重量份的山梨酸鉀及 0.2 重量份的聚三葡萄糖而製備得 Bettara-zuke 之預混物。30 公斤蘿蔔依習用方式首先經鹽醃漬，經糖醃漬，及浸泡於調味溶液中，與 4 公斤預混物製備成所要的產品。產品具有令人滿意的顏色、光澤及香味，以及適當的甜度，及令人滿意的嚼性。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (56)

實例 B - 8具有乳酸菌的飲料

一百三十重量份的由實例 A - 6 方法所得之含麴二糖的醴溶液、175 重量份的脫脂牛奶及 50 重量份的 "NYUKAOLIGO®" (其為一種日本大阪的 Hayashibara Shoji 公司所販售的高乳糖蔗糖含量的粉末) 溶解於 1,150 重量份的水中，於 65℃ 30 分鐘對溶液殺菌，冷卻至 40℃，及依習用方式接種 30 重量份當作接種菌的乳酸菌，接著於 37℃ 培養 8 小時以獲得所要的產品。產品係一種含有乳酸菌的飲料，具有令人滿意的風味和味道。產品含有寡醣，其穩定該菌及促進生長。

實例 B - 9合成酒

藉混合 6,518 重量份溫度為 15℃ 的 30 v / v % 酒精溶液、600 重量份的 70 % 葡萄糖水溶液、50 重量份的由實例 A - 6 方法所得之含麴二糖的醴溶液，11.1 重量份的琥珀酸、3.66 重量份的 75 % 乳酸水溶液、2.3 重量份麴胺酸鈉、1.2 重量份的甘胺酸、1.2 重量份的丙胺酸、2.22 重量份的琥珀酸鈉、1.6 重量份的鹽、1.4 重量份的天然鹽及 2,500 重量份的水而獲得一具有 20 v / v % 酒精的原料酒。將原料酒稀釋成一具有 15 - 16 v / v % 酒精的酒。產品具有淡甜度及高品質風味、味道及可口的。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(57)

實例 B - 1 0

乳液

於 3 . 5 重量份由實例 A - 6 方法所得之富含葡萄糖基山梨糖的醣溶液中，加入 0 . 5 重量份的聚氧乙烯廿二基醚、1 重量份的聚氧乙烯山梨糖醇四油酸脂、1 重量份的油溶性甘油單硬脂酸酯、0 . 5 重量份的廿二醇、1 重量份的酪梨油、1 重量份的 α - 葡萄糖基芸香苷、適量的維生素 E 和防腐劑。所產生的混合物與 5 重量份的 1 , 3 - 丁二醇、0 . 1 重量份的羧乙烯聚合物及 8 5 . 3 重量份的精製水混合，及藉均勻器將混合物乳化成乳液。

產品具有令人滿意的保濕性，可任意用當作防腐劑及皮膚增白劑。

實例 B - 1 1

皮膚乳霜

於 4 重量份的由實例 A - 1 2 方法所得之富含麴二糖基果糖苷的粉末中，加入 2 重量份的聚氧乙烯乙二醇單硬脂酸酯、5 重量份的半乳化的甘油單硬脂酸酯、2 重量份的 α - 葡萄糖基芸香苷、1 重量份的液體石蠟、1 0 重量份的甘油三辛酸酯及適量的防腐劑，依習用方式加熱溶解混合物，混合 5 重量份的 1 , 3 - 丁二醇及 6 6 重量份的精製水，用均勻機乳化，及將適量的調味劑混入皮膚乳霜內。產品具有良好的塗抹性，可用當作防晒劑、皮膚美化劑。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (58)

及皮膚增白劑。

實例 B - 1 2牙膏

使適量的磷酸單氫鈣、1.5 重量份的月桂基硫酸鈉、2.5 重量份的甘油、0.5 重量份的聚氧乙烯去水山梨糖醇月桂酸酯、0.02 重量份的糖精、0.05 重量份的防腐劑及 1.3 重量份的水混合 1.3 重量份的由實例 A - 1.4 方法所得之富含麴二糖基葡萄糖苷的醴溶液而成爲牙膏。

產品具有優良的光澤及清淨力，可適用當作潔牙劑。

實例 B - 1 3插管餵食用的營養物

一種組成物由 8.0 重量份的由實例 A - 7 方法所得之富含麴二糖的粉末、1.9 重量份的乾蛋黃、2.09 重量份的脫脂牛奶、4.4 重量份的氯化鈉、1.85 重量份的氯化鉀、4 重量份的硫酸鎂、0.01 重量份硫胺素及 0.1 重量份的抗壞血酸鈉、0.6 重量份的維生素 E 及 0.04 重量份的菸鹼醯胺。將二十五克整份的組成物注入小的疊層鋁袋內，其被熱封以獲得所要的產品。

在投經鼻腔、喉嚨或胃之前，將一袋產品溶於約 150 - 300 毫升的水中以成爲一種補充營養的食料。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (59)

實例 B - 1 4

錠劑

將十五重量份的阿司匹靈、10重量份的麥芽糖、4重量份的玉米澱粉加到4重量份由實驗8方法所得之富含葡萄糖基山梨糖的粉末，及將混合物混合均勻，及用直徑12毫米的20R沖壓機製成錠劑，各為680毫克重，5.25毫米厚，8公斤±1公斤硬度。產品具有適當黏度，為易吞服的錠劑。

實例 B - 1 5

草莓果醬

混合一百五十重量份的新鮮草莓、60重量份的蔗糖、20重量份的麥芽糖、40重量份的由實例A-15方法所得之含麴二糖的醣溶液、5重量份的果膠及一重量份的檸檬酸。於鍋內將混合物煮沸及瓶裝成所要的產品。產品具有令人滿意的味道、風味和顏色。

實例 B - 1 6

甜的煉乳

於100重量份的新鮮牛乳中，溶解一重量份的蔗糖及3重量份的由實例A-16方法所得之富含麴二糖基葡萄糖苷的醣溶液，及在板式加熱器上加熱而將溶液滅菌，濃縮而給予約70%的濃度，且無菌罐裝成所要的產品。產品具有淡的甜度、風味及味道，且其可任意用當作嬰兒

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明(60)

食物、水果、咖啡、可可及茶的調味料。

由上述明顯得知，本發明之完成係基於發現一種未知的麴二糖形成磷酸化酶，即麴二糖磷酸化酶。本發明的麴二糖磷酸化酶具有相當高的最適宜溫度及熱穩定性，及相當寬範圍的 pH - 穩定性，最適宜的 pH 位於其中。可藉微生物來製造該麴二糖磷酸化酶，該微生物能以令人滿意的高產率來製造酶。因此，當於其它醴之存在中使本麴二糖磷酸化酶接觸當作醴供體的 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸時，能以工業規模及相當低的成本製造含麴二糖的化合物（其係係習知的但是幾乎不可獲得的）、葡萄糖基轉移醴如新穎葡萄糖基山梨糖、及含葡萄糖基轉移醴的醴組成物。

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

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

四、中文發明摘要 (發明之名稱： 麴二糖磷酸化酶，彼之製法及用途)

一種麴二糖磷酸化酶，其於無機磷酸之存在中將麴二糖水解而形成 D - 葡萄糖及 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸，由 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸形成麴二糖及無機磷酸，及用 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸當作醣供體催化葡萄糖基之轉移反應至其它醣。該酶係可由天然來源如熱厭氧菌 (Thermoanaerobium) 屬之微生物獲得，且可由重組體技術獲得。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

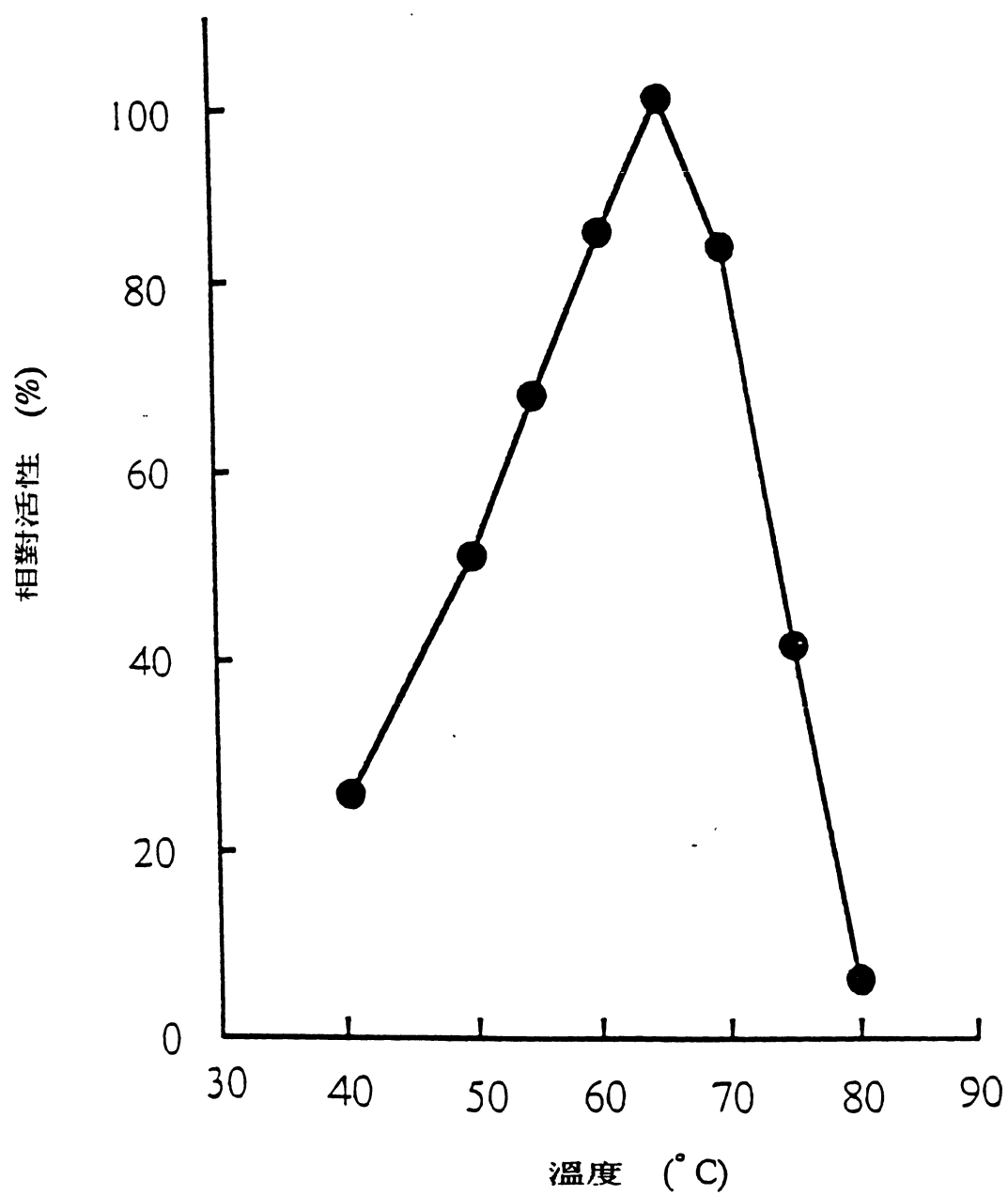
訂

線

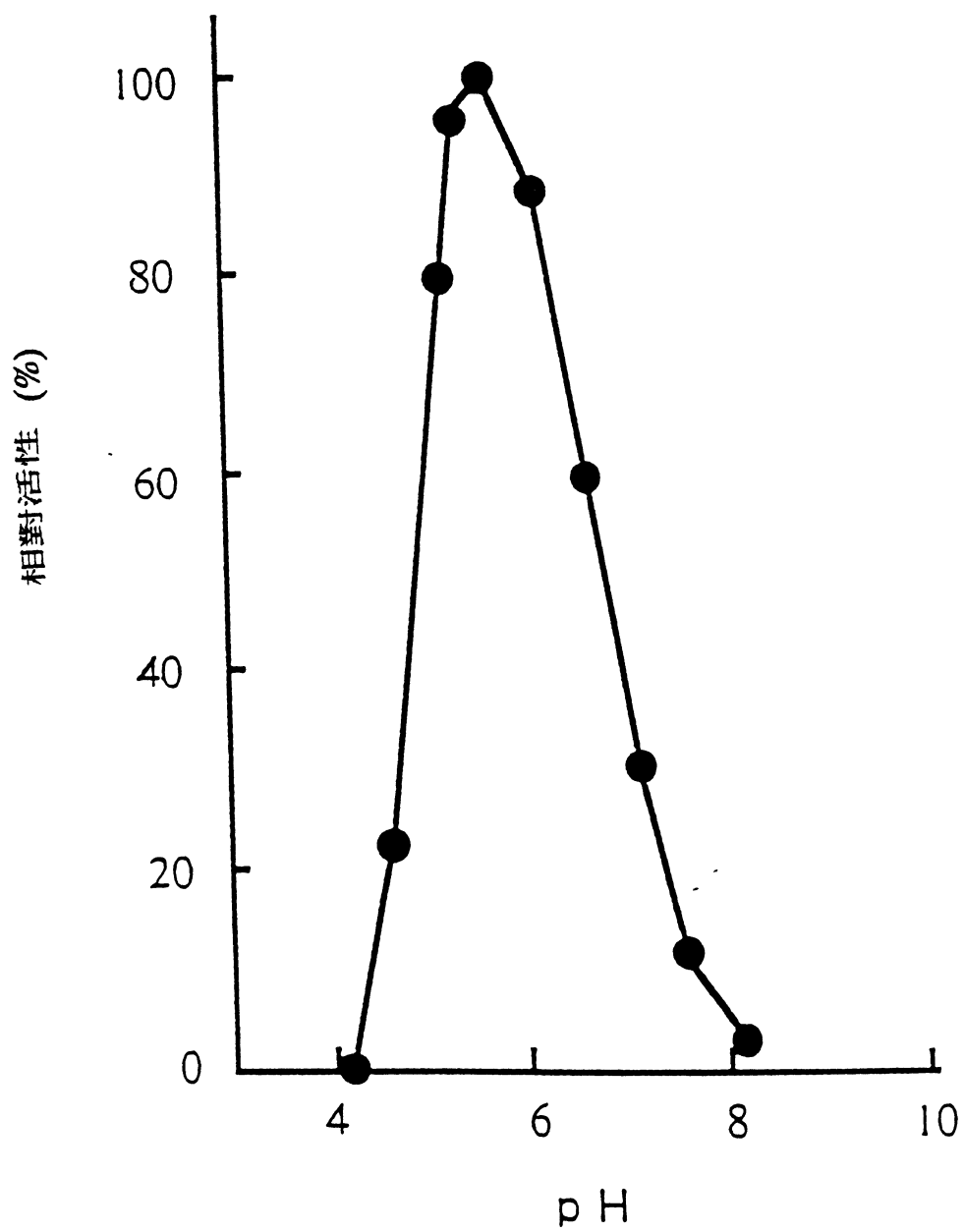
英文發明摘要 (發明之名稱：KOJIBIOSE PHOSPHORYLASE, ITS PREPARATION AND USES)

A kojibiose phosphorylase which hydrolyzes kojibiose in the presence of an inorganic phosphoric acid to form D-glucose and β -D-glucose-1-phosphoric acid, forms kojibiose and an inorganic phosphoric acid from β -D-glucose-1-phosphoric acid, and catalyzes the transfer reaction of glucosyl group to other saccharides using β -D-glucose-1-phosphoric acid as a saccharide donor. The enzyme is obtainable from natural sources such as microorganisms of the genus *Thermoanaerobium*, and obtainable by recombinant technology.

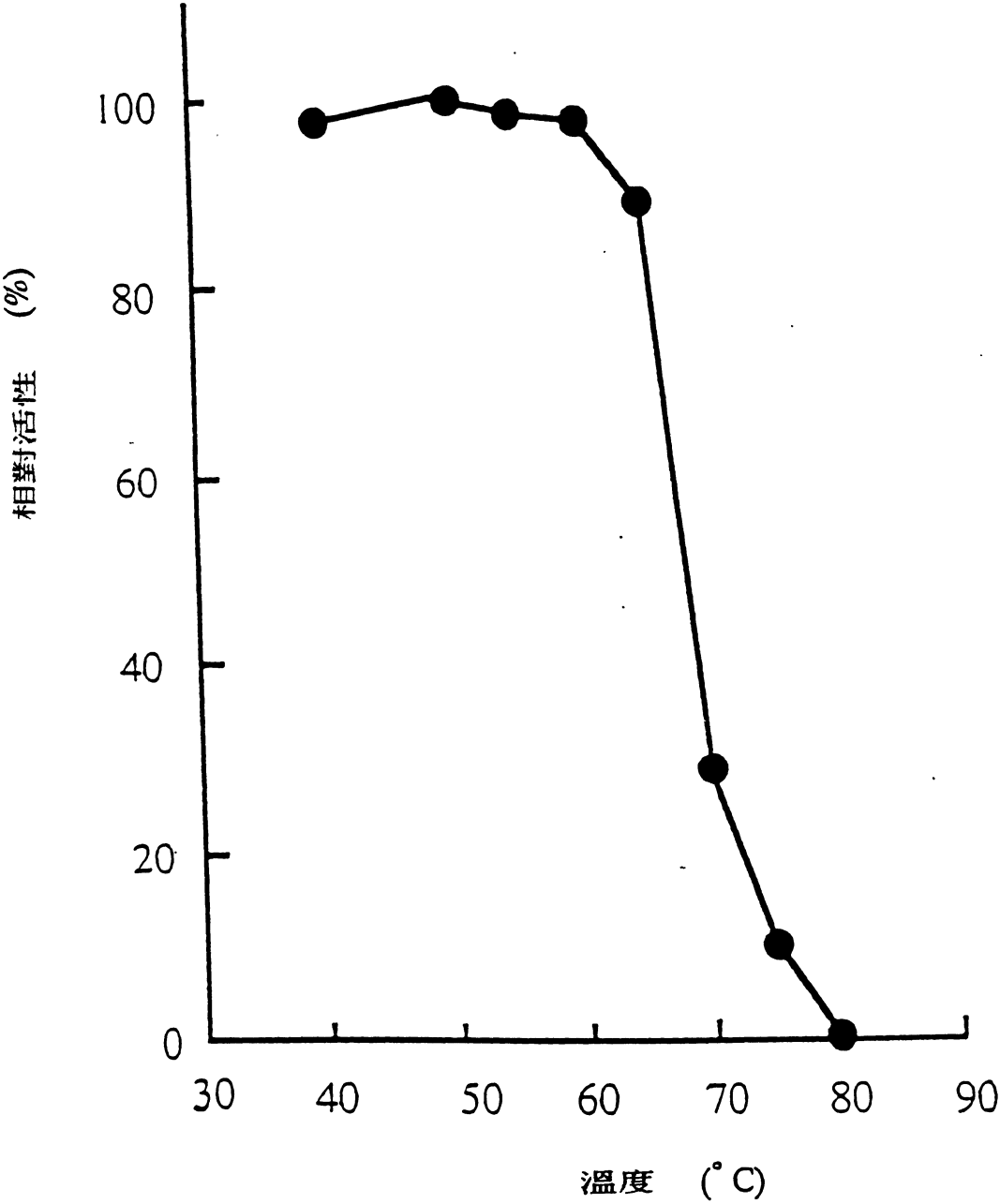
729783



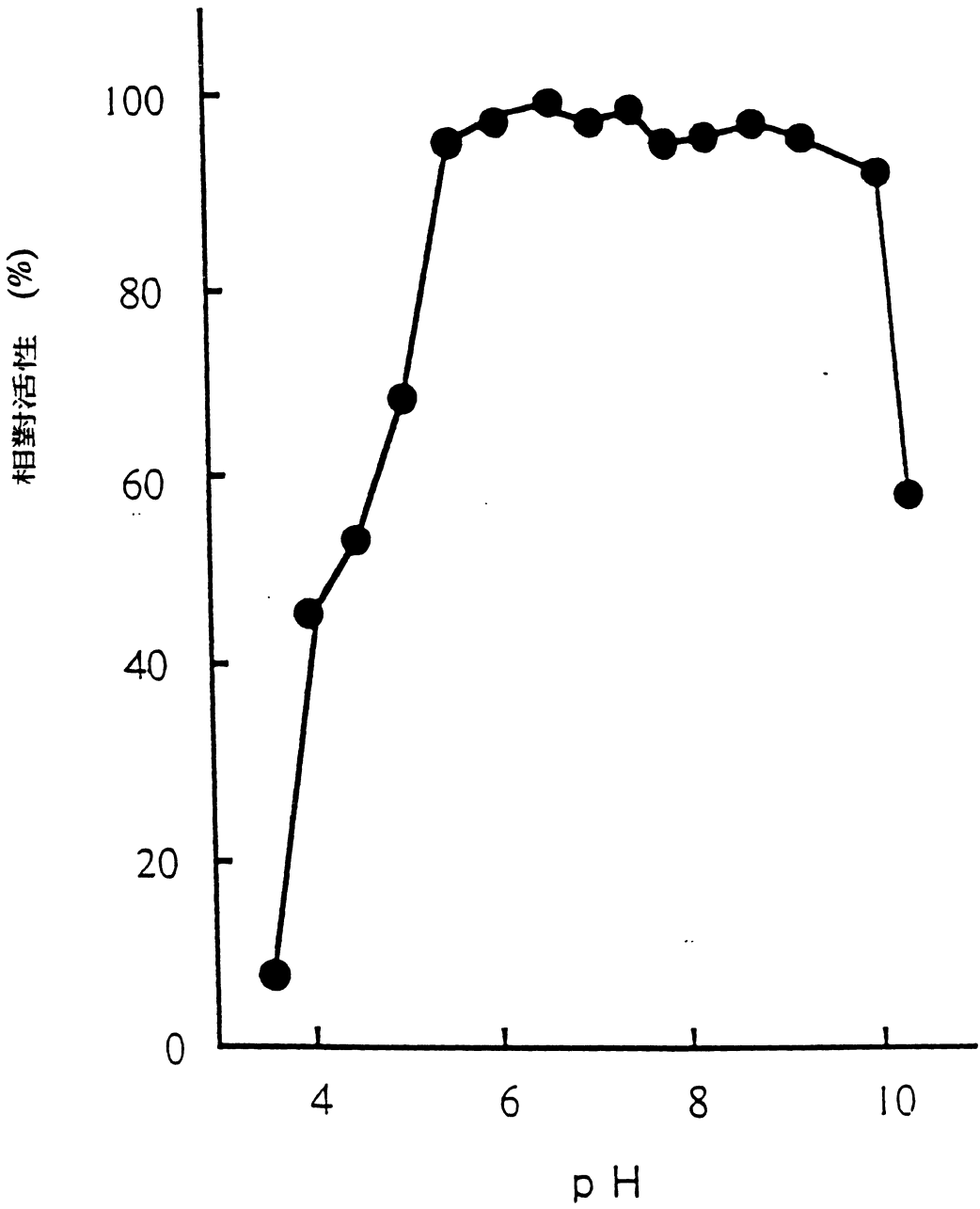
第 1 圖



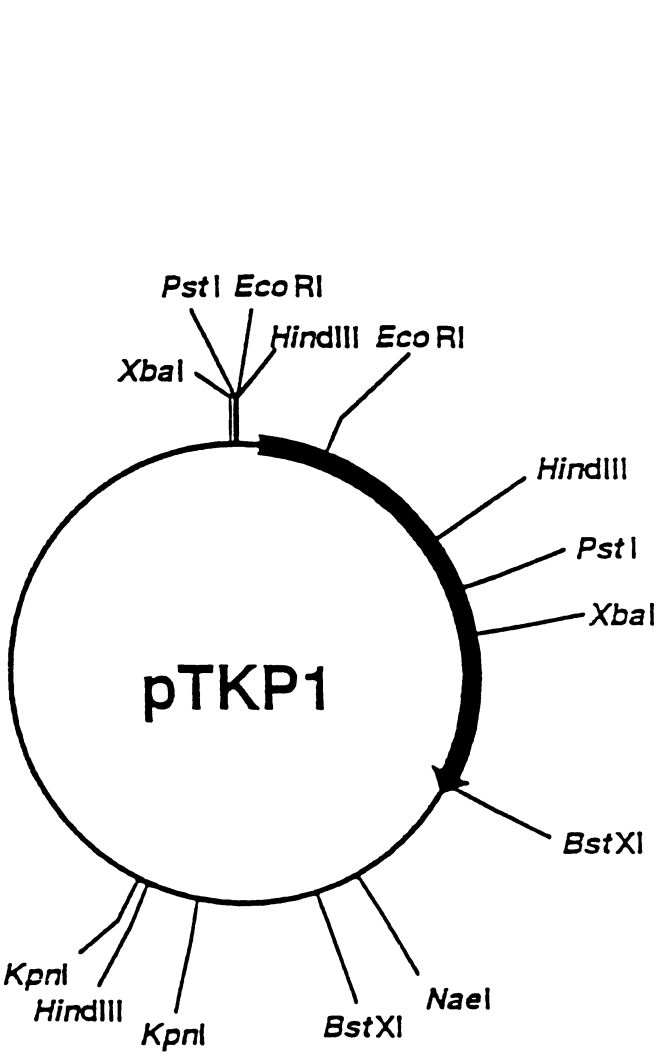
第 2 圖



第 3 圖



第 4 圖



第 5 圖

附件： 第 86116399 號專利申請案
中文說明書修正頁

民國 92 年 8 月 4 日 修正

序列表



(1) SEQ ID NO:1之資料:

(i)序列特性:

- (A)長度:5個胺基酸
- (B)類型:胺基酸
- (D)拓撲學:線型

(ii)分子類型:胜肽

(v)片段類型:N-末端片段

(xi)序列說明:SEQ ID NO:1:

Met Val Lys His Met
1 5

(2) SEQ ID NO:2之資料:

(i)序列特性:

- (A)長度:5個胺基酸
- (B)類型:胺基酸
- (D)拓撲學:線型

(ii)分子類型:胜肽

(v)片段類型:內部片段

(xi)序列說明:SEQ ID NO:2:

Phe Asp Glu Asn Asn
1 5

(3) SEQ ID NO:3之資料:

(i)序列特性:

- (A)長度:5個胺基酸
- (B)類型:胺基酸
- (D)拓撲學:線型

(ii)分子類型:胜肽

(v)片段類型:內部片段

(xi)序列說明:SEQ ID NO:3:

Gly His Val Phe Trp
1 5

(4) SEQ ID NO:4之資料:

(i)序列特性:

- (A)長度:775個胺基酸
- (B)類型:胺基酸
- (D)拓撲學:線型

(ii)分子類型:胜肽

(xi)序列說明:SEQ ID NO:4:

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

Ala	Gln	Asn	Trp	Leu	Arg	Ile	Lys	Leu	Tyr	Val	Glu	Gly	Glu	Glu	Leu	
				85					90					95		
Ser	Leu	Asp	Lys	Cys	Gln	Leu	Ile	Glu	Phe	Lys	Arg	Ile	Leu	Asp	Met	
			100					105					110			
Lys	Lys	Gly	Ile	Leu	Phe	Arg	Ser	Met	Leu	Ile	Lys	Asp	Ser	Lys	Asp	
		115					120					125				
Arg	Ile	Thr	Arg	Ile	Glu	Gly	Tyr	Arg	Phe	Ile	Ser	Arg	Ser	Asp	Leu	
	130					135					140					
His	Arg	Ser	Ala	Ile	Lys	Leu	Phe	Val	Thr	Pro	Val	Asn	Tyr	Ser	Gly	
145					150					155					160	
Val	Val	Gly	Ile	Glu	Ser	Ile	Ile	Asp	Gly	Thr	Val	Leu	Asn	Ser	Ala	
				165					170					175		
Asp	Ser	Pro	Lys	His	Arg	Val	Lys	His	Leu	Lys	Val	Ala	Asp	Asn	Ser	
			180					185					190			
Ser	Leu	Asn	Lys	Ser	Gly	Val	Tyr	Leu	Glu	Thr	Ala	Thr	Ile	Asp	Asp	
		195					200					205				
Asp	Ile	Arg	Ile	Ala	Thr	Gly	Ser	Ala	Val	Arg	Leu	Tyr	His	Tyr	Glu	
	210					215					220					
Asp	Lys	Glu	Lys	Asn	Asn	Ile	Ala	Lys	Phe	Lys	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	
225				230						235					240	
Gly	Glu	Met	Ser	Ile	Glu	Tyr	Phe	Glu	Phe	Asp	Gly	Thr	Glu	Asn	Lys	
				245					250					255		
Thr	Val	Val	Ile	Asp	Lys	Phe	Ile	Ile	Thr	Tyr	Thr	Ser	Arg	Asp	Val	
			260					265					270			
Lys	Lys	Gly	Leu	Leu	Lys	Ser	Thr	Val	Glu	Lys	Glu	Leu	Phe	Ala	Phe	
		275					280					285				
Ala	Gly	Glu	Gly	Ile	Asp	Lys	Glu	Leu	Gln	Arg	His	Ile	Glu	Val	Tyr	
	290					295					300					
Glu	Glu	Leu	Trp	Ser	Val	Ala	Asp	Ile	Asn	Ile	Glu	Gly	Asp	Glu	Glu	
305				310						315					320	
Ala	Asp	Lys	Ala	Leu	Arg	Phe	Asn	Ile	Phe	His	Leu	Met	Ser	Ser	Val	
				325					330					335		
Asn	Glu	Asn	Asp	Pro	Met	Val	Ser	Ile	Ala	Ala	Lys	Ala	Leu	His	Gly	
			340					345					350			
Glu	Gly	Tyr	Lys	Gly	His	Val	Phe	Trp	Asp	Thr	Glu	Ile	Phe	Met	Leu	
		355					360					365				
Pro	Phe	Phe	Ile	Tyr	Val	His	Pro	Lys	Ala	Ala	Lys	Thr	Leu	Leu	Met	
	370					375					380					
Tyr	Arg	Tyr	Asn	Met	Leu	Asp	Ala	Ala	Arg	Lys	Asn	Ala	Ala	Leu	Asn	
385				390						395					400	
Gly	Tyr	Lys	Gly	Ala	Gln	Tyr	Pro	Trp	Glu	Ser	Ala	Asp	Thr	Gly	Glu	
			405						410					415		
Glu	Glu	Thr	Pro	Lys	Trp	Gly	Phe	Asp	Tyr	Met	Gly	Asn	Pro	Val	Arg	
			420					425					430			
Ile	Trp	Thr	Gly	Asp	Leu	Glu	His	Ile	Thr	Ala	Asp	Ile	Ala	Phe		
	435						440				445					
Ala	Val	Trp	Glu	Tyr	Phe	Arg	Ala	Thr	Glu	Asp	Ile	Glu	Phe	Met	Leu	
	450					455					460					
Asn	Tyr	Gly	Ala	Glu	Val	Ile	Phe	Glu	Thr	Ala	Arg	Phe	Trp	Val	Ser	
465				470						475					480	
Arg	Cys	Glu	Tyr	Val	Lys	Glu	Leu	Asp	Arg	Tyr	Glu	Ile	Asn	Asn	Val	
				485					490					495		
Ile	Gly	Pro	Asp	Glu	Phe	His	Glu	His	Val	Asp	Asn	Asn	Ala	Tyr	Thr	
			500					505					510			
Asp	Tyr	Leu	Ala	Lys	Trp	Asn	Ile	Lys	Lys	Gly	Leu	Glu	Leu	Ile	Asn	
		515					520					525				

Met	Leu	Lys	Glu	Lys	Tyr	Pro	Glu	His	Tyr	His	Ala	Ile	Ser	Asn	Lys
	530					535					540				
Lys	Cys	Leu	Thr	Asn	Glu	Glu	Met	Glu	Lys	Trp	Lys	Glu	Val	Glu	Glu
545					550					555					560
Lys	Ile	Tyr	Ile	Pro	Tyr	Asp	Lys	Asp	Lys	Lys	Leu	Ile	Glu	Gln	Phe
				565					570					575	
Glu	Gly	Tyr	Phe	Asp	Lys	Lys	Asp	Tyr	Val	Ile	Asp	Lys	Phe	Asp	Glu
			580					585					590		
Asn	Asn	Met	Pro	Ile	Trp	Pro	Glu	Gly	Val	Asp	Ile	Thr	Lys	Leu	Gly
		595					600					605			
Asp	Thr	Gln	Leu	Ile	Lys	Gln	Ala	Asp	Val	Val	Met		Leu	Met	Leu
	610					615					620				
Leu	Gly	Glu	Glu	Phe	Asp	Glu	Glu	Thr	Lys	Arg	Ile	Asn	Tyr	Glu	Tyr
625					630					635					640
Tyr	Glu	Lys	Arg	Thr	Met	His	Lys	Ser	Ser	Leu	Gly	Pro	Ser	Met	Tyr
				645					650					655	
Ala	Ile	Met	Gly	Leu	Lys	Val	Gly	Asp	His	Lys	Asn	Ala	Tyr	Gln	Ser
			660					665						670	
Phe	Met	Arg	Ser	Ala	Asn	Val	Asp	Leu	Val	Asp	Asn	Gln	Gly	Asn	Thr
		675					680					685			
Lys	Glu	Gly	Leu	His	Ala	Ala	Ser	Ala	Gly	Gly	Thr	Trp	Gln	Val	Val
	690					695					700				
Val	Phe	Gly	Phe	Gly	Gly	Met	Glu	Ile	Asp	Lys	Glu	Gly	Ala	Leu	Asn
705					710					715					720
Ile	Asn	Ser	Trp	Leu	Pro	Glu	Lys	Trp	Asp	Lys	Leu	Ser	Tyr	Lys	Val
				725					730					735	
Phe	Trp	Lys	Gly	Asn	Leu	Ile	Glu	Val	Ile	Val	Thr	Lys	Gln	Glu	Val
			740					745					750		
Thr	Val	Lys	Lys	Leu	Lys	Gly	Lys	Gly	Asn	Ile	Lys	Val	Lys	Val	Lys
		755					760					765			
Gly	Lys	Glu	Leu	Thr	Ile	Glu									
	770					775									

(5) SEQ ID NO:5之資料:

(i)序列特性:

(A)長度:2325 鹼基對

(B)類型:核酸

(C)股數:雙股

(D)拓撲學:線型

(xi)序列說明:SEQ ID NO:5:

GTGGTAAAGC	ACATGTTTTT	AGAGGATGTA	AACAATTTAA	TAAGTGATGA	CAAATGGCTT	60
ATTTTCCAAA	ATGAGTATAA	TACAGAGGTA	AATCCTCGAT	ATGAGACCCT	TTTTACACTT	120
ACAAATGGTT	ACATGGGCGT	AAGAGGTACT	TTTGAGGAAG	GAAGCGAGGG	AGAAAGGTCTG	180
GGAAATTTTA	TTGCAGGAAT	TTTTGACAAG	TCAGATGCGC	AGGTTAGAGA	AATAGTAAAT	240
GCTCAAAATT	GGTTGAGAAT	AAAGTTGTAT	GTTGAAGGTG	AAGAATTAAG	TTTGGATAAA	300
TGCCAGTTGA	TAGAATTTAA	AAGAATTCTT	GATATGAAAA	AAGGTATTCT	ATTTAGGAGT	360
ATGTTGATAA	AAGACAGCAA	AGATAGAATT	ACTCGAATTG	AGGGATACAG	GTTTATAAGC	420
CGTAGCGACC	TTCATCGTTC	TGCAATTAAG	CTATTTGTAA	CACCTGTAAA	TTACAGTGGT	480
GTTGTAGGTA	TAGAGAGCAT	TATTGATGGG	ACTGTTTTAA	ATTCAGCAGA	TAGCCCAAAG	540
CATAGGGTAA	AGCATTTGAA	AGTGGCTGAC	AATAGCAGTT	TAAATAAAAG	CGGAGTTTAT	600
CTTGAAACAG	CAACTATTGA	CGATGATATT	CGCATTGCAA	CAGGTAGTGC	AGTGAGGTTA	660
TATCATTATG	AGGATAAAGA	GAAAAATAAC	ATAGCTAAAT	TTAAGAGATT	TTTGCCTTTA	720
GGTGAAATGA	GTATTGAATA	CTTTGAGTTT	GATGGCACAG	AGAACAAAAC	AGTAGTAATT	780
GACAAATTTA	TTATAACCTA	TACCTCAAGA	GACGTAAAAA	AAGGCCTATT	AAAGAGTACG	840
GTGGAAAAAG	AACTCTTTGC	TTTTGCTGGA	GAAGGTATTG	ACAAAGAGTT	GCAGAGACAT	900

```

ATTGAGGTAT ATGAAGAACT ATGGTCTGTT GCAGATATAA ATATTGAAGG GGATGAAGAA 960
GCAGATAAAG CTTTGAGGTT TAATATTTTT CATCTCATGA GTTCTGTCAA TGAAAATGAC 1020
CCCATGGTAA GTATCGCTGC AAAGGCCCTT CATGGTGAGG GATACAAAGG CCATGTCTTT 1080
TGGGATACAG AAATATTTAT GCTTCCGTTT TTCATATATG TGCATCCAAA AGCGGCAAAG 1140
ACACTTTTGA TGTACAGGTA CAATATGCTG GATGCAGCGA GAAAAAATGC GGCTTTAAAC 1200
GGGTATAAGG GAGCACAATA CCCTTGGGAA TCTGCAGATA CAGGAGAGGA AGAGACACCT 1260
AAATGGGGAT TTGATTACAT GGGAAACCCT GTAAGGATAT GGACGGGTGA TTTAGAGCAT 1320
CATATAACTG CTGATATAGC TTTTGCAGTG TGGGAGTATT TTAGAGCGAC AGAGGATATT 1380
GAGTTTATGT TGAATTACGG TGCAGAAGTC ATTTTGTAGA CTGCAAGGTT TTGGGTATCT 1440
AGATGTGAAT ATGTAAAAGA ATTAGACAGG TATGAAATAA ACAATGTCAT AGGTCCTGAT 1500
GAATTTTCATG AGCATGTTGA TAATAATGCT TATACTGATT ACCTTGCAA ATGGAATATT 1560
AAAAAGGGAC TTGAACATA CAATATGTTA AAAGAAAAAT ACCCTGAACA TTATCATGCT 1620
ATATCAAACA AGAAATGTTT GACAAATGAG GAAATGGAAA AGTGGAAAGA AGTTGAAGAA 1680
AAAATATATA TACCTTATGA CAAAGACAAA AAGCTGATAG AACAAATTGA AGGCTATTTT 1740
GATAAAAAAG ATTATGTTAT TGATAAATTT GATGAAAACA ATATGCCTAT ATGGCCTGAA 1800
GGTGTGATA TAACAAAATT GGGTGATACC CAGCTTATTA AACAGGCTGA TGTTGTTATG 1860
TTAATGCTTT TGTTAGGTGA GGAATTTGAC GAAGAAACGA AAAGAATCAA TTACGAATAT 1920
TATGAAAAGC GAACTATGCA CAAATCTTCA TTAGGTCCCA GCATGTATGC CATTATGGGG 1980
TTAAAAGTAG GGGACCACAA AAACGCATAT CAGTCTTTCA TGAGAAGTGC CAACGTGGAC 2040
CTTGTGGACA ATCAGGGGAA CACTAAAGAA GGTTTGCATG CTGCATCTGC TGGTGGTACA 2100
TGGCAAGTAG TTGTTTTTGG ATTTGGCGGA ATGGAAATTG ACAAAGAAGG GGCATTAAAT 2160
ATAAATTCGT GGCTGCCAGA AAAATGGGAT AAACTTTCCT ATAAAGTATT TTGGAAAGGC 2220
AATTTAATAG AGGTGATTGT TACAAAACAG GAAGTGACAG TAAAAAATT AAAAGGAAAA 2280
GGAAATATAA AAGTAAAGGT AAAAGGGAAA GAGCTGACAA TAGAA 2325

```

(6) SEQ ID NO:6之資料:

(i)序列特性:

(A)長度:10個胺基酸

(B)類型:胺基酸

(D)拓撲學:線型

(ii)分子類型:胜肽

(v)片段類型:N-末端片段

(xi)序列說明:SEQ ID NO:6:

```

Met Val Lys His Met Phe Leu Glu Asp Val
1          5          10

```

(7) SEQ ID NO:7之資料:

(i)序列特性:

(A)長度:10個胺基酸

(B)類型:胺基酸

(D)拓撲學:線型

(ii)分子類型:胜肽

(v)片段類型:內部片段

(xi)序列說明:SEQ ID NO:7:

```

Phe Asp Glu Asn Asn Met Pro Ile Trp Pro
1          5          10

```

(8) SEQ ID NO:8之資料:

(i)序列特性:

(A)長度:10個胺基酸

(B)類型:胺基酸

(D)拓撲學:線型

(ii)分子類型:胜肽

(v)片段類型:內部片段

(xi)序列說明:SEQ ID NO:8:

Gly His Val Phe Trp Asp Thr Glu Ile Phe
 1 5 10

(9) SEQ ID NO:9之資料:

(i)序列特性:

(A)長度:3956 鹼基對

(B)類型:核酸

(C)股數:雙股

(D)拓撲學:線型

(ii)分子類型:基因組 DNA

(vi)原本來源:

(A)生物:熱厭氧菌 (*Thermoanaerobium brockii*)

(F)菌株:ATCC 35047

(ix)特徵:

(A1)名稱/關鍵字:1-100 5'-UTR

(C1)鑑定方法:E

(A2)名稱/關鍵字:101-2425 mat 胜肽

(C2)鑑定方法:S

(A3)名稱/關鍵字:2426-3956 3'-UTR

(C3)鑑定方法:E

(xi)序列說明:SEQ ID NO:9:

```

AGCTTGTAAT TAGAGATTCA GCTAGAAAGA TATAATTTTT TTTAAAAAGT ACCCAAACG 60
TTTCGGATAA AATTTTTAGC AGGAATCAGG AGGTATATAA 100
GTG GTA AAG CAC ATG TTT TTA GAG GAT GTA AAC AAT TTA ATA AGT GAT 148
Met Val Lys His Met Phe Leu Glu Asp Val Asn Asn Leu Ile Ser Asp
1 5 10 15
GAC AAA TGG CTT ATT TTC CAA AAT GAG TAT AAT ACA GAG GTA AAT CCT 196
Asp Lys Trp Leu Ile Phe Gln Asn Glu Tyr Asn Thr Glu Val Asn Pro
20 25 30
CGA TAT GAG ACC CTT TTT ACA CTT ACA AAT GGT TAC ATG GGC GTA AGA 244
Arg Tyr Glu Thr Leu Phe Thr Leu Thr Asn Gly Tyr Met Gly Val Arg
35 40 45
GGT ACT TTT GAG GAA GGA AGC GAG GGA GAA AGG TCG GGA AAT TTT ATT 292
Gly Thr Phe Glu Glu Gly Ser Glu Gly Glu Arg Ser Gly Asn Phe Ile
50 55 60
GCA GGA ATT TTT GAC AAG TCA GAT GCG CAG GTT AGA GAA ATA GTA AAT 340
Ala Gly Ile Phe Asp Lys Ser Asp Ala Gln Val Arg Glu Ile Val Asn
65 70 75 80
GCT CAA AAT TGG TTG AGA ATA AAG TTG TAT GTT GAA GGT GAA GAA TTA 388
Ala Gln Asn Trp Leu Arg Ile Lys Leu Tyr Val Glu Gly Glu Glu Leu
85 90 95
AGT TTG GAT AAA TGC CAG TTG ATA GAA TTT AAA AGA ATT CTT GAT ATG 436
Ser Leu Asp Lys Cys Gln Leu Ile Glu Phe Lys Arg Ile Leu Asp Met
100 105 110
AAA AAA GGT ATT CTA TTT AGG AGT ATG TTG ATA AAA GAC AGC AAA GAT 484
Lys Lys Gly Ile Leu Phe Arg Ser Met Leu Ile Lys Asp Ser Lys Asp
115 120 125
AGA ATT ACT CGA ATT GAG GGA TAC AGG TTT ATA AGC CGT AGC GAC CTT 532
Arg Ile Thr Arg Ile Glu Gly Tyr Arg Phe Ile Ser Arg Ser Asp Leu
130 135 140
CAT CGT TCT GCA ATT AAG CTA TTT GTA ACA CCT GTA AAT TAC AGT GGT 580
His Arg Ser Ala Ile Lys Leu Phe Val Thr Pro Val Asn Tyr Ser Gly

```

145					150					155					160	
GTT	GTA	GGT	ATA	GAG	AGC	ATT	ATT	GAT	GGG	ACT	GTT	TTA	AAT	TCA	GCA	628
Val	Val	Gly	Ile	Glu	Ser	Ile	Ile	Asp	Gly	Thr	Val	Leu	Asn	Ser	Ala	
				165					170							
GAT	AGC	CCA	AAG	CAT	AGG	GTA	AAG	CAT	TTG	AAA	GTG	GCT	GAC	AAT	AGC	676
Asp	Ser	Pro	Lys	His	Arg	Val	Lys	His	Leu	Lys	Val	Ala	Asp	Asn	Ser	
			180					185						190		
AGT	TTA	AAT	AAA	AGC	GGA	GTT	TAT	CTT	GAA	ACA	GCA	ACT	ATT	GAC	GAT	724
Ser	Leu	Asn	Lys	Ser	Gly	Val	Tyr	Leu	Glu	Thr	Ala	Thr	Ile	Asp	Asp	
		195					200					205				
GAT	ATT	CGC	ATT	GCA	ACA	GGT	AGT	GCA	GTG	AGG	TTA	TAT	CAT	TAT	GAG	772
Asp	Ile	Arg	Ile	Ala	Thr	Gly	Ser	Ala	Val	Arg	Leu	Tyr	His	Tyr	Glu	
	210					215					220					
GAT	AAA	GAG	AAA	AAT	AAC	ATA	GCT	AAA	TTT	AAG	AGA	TTT	TTG	CCT	TTA	820
Asp	Lys	Glu	Lys	Asn	Asn	Ile	Ala	Lys	Phe	Lys	Arg	Phe	Leu	Pro	Leu	
225				230				235							240	
GGT	GAA	ATG	AGT	ATT	GAA	TAC	TTT	GAG	TTT	GAT	GGC	ACA	GAG	AAC	AAA	868
Gly	Glu	Met	Ser	Ile	Glu	Tyr	Phe	Glu	Phe	Asp	Gly	Thr	Glu	Asn	Lys	
			245					250						255		
ACA	GTA	GTA	ATT	GAC	AAA	TTT	ATT	ATA	ACC	TAT	ACC	TCA	AGA	GAC	GTA	916
Thr	Val	Val	Ile	Asp	Lys	Phe	Ile	Ile	Thr	Tyr	Thr	Ser	Arg	Asp	Val	
			260				265						270			
AAA	AAA	GGC	CTA	TTA	AAG	AGT	ACG	GTG	GAA	AAA	GAA	CTC	TTT	GCT	TTT	964
Lys	Lys	Gly	Leu	Leu	Lys	Ser	Thr	Val	Glu	Lys	Glu	Leu	Phe	Ala	Phe	
		275					280					285				
GCT	GGA	GAA	GGT	ATT	GAC	AAA	GAG	TTG	CAG	AGA	CAT	ATT	GAG	GTA	TAT	1012
Ala	Gly	Glu	Gly	Ile	Asp	Lys	Glu	Leu	Gln	Arg	His	Ile	Glu	Val	Tyr	
	290					295					300					
GAA	GAA	CTA	TGG	TCT	GTT	GCA	GAT	ATA	AAT	ATT	GAA	GGG	GAT	GAA	GAA	1060
Glu	Glu	Leu	Trp	Ser	Val	Ala	Asp	Ile	Asn	Ile	Glu	Gly	Asp	Glu	Glu	
305				310				315							320	
GCA	GAT	AAA	GCT	TTG	AGG	TTT	AAT	ATT	TTT	CAT	CTC	ATG	AGT	TCT	GTC	1108
Ala	Asp	Lys	Ala	Leu	Arg	Phe	Asn	Ile	Phe	His	Leu	Met	Ser	Ser	Val	
			325					330						335		
AAT	GAA	AAT	GAC	CCC	ATG	GTA	AGT	ATC	GCT	GCA	AAG	GCC	CTT	CAT	GGT	1156
Asn	Glu	Asn	Asp	Pro	Met	Val	Ser	Ile	Ala	Ala	Lys	Ala	Leu	His	Gly	
			340					345					350			
GAG	GGA	TAC	AAA	GGC	CAT	GTC	TTT	TGG	GAT	ACA	GAA	ATA	TTT	ATG	CTT	1194
Glu	Gly	Tyr	Lys	Gly	His	Val	Phe	Trp	Asp	Thr	Glu	Ile	Phe	Met	Leu	
		355					360					365				
CCG	TTT	TTC	ATA	TAT	GTG	CAT	CCA	AAA	GCG	GCA	AAG	ACA	CTT	TTG	ATG	1252
Pro	Phe	Phe	Ile	Tyr	Val	His	Pro	Lys	Ala	Ala	Lys	Thr	Leu	Leu	Met	
	370					375					380					
TAC	AGG	TAC	AAT	ATG	CTG	GAT	GCA	GCG	AGA	AAA	AAT	GCG	GCT	TTA	AAC	1300
Tyr	Arg	Tyr	Asn	Met	Leu	Asp	Ala	Ala	Arg	Lys	Asn	Ala	Ala	Leu	Asn	
385				390				395						400		
GGG	TAT	AAG	GGA	GCA	CAA	TAC	CCT	TGG	GAA	TCT	GCA	GAT	ACA	GGA	GAG	1348
Gly	Tyr	Lys	Gly	Ala	Gln	Tyr	Pro	Trp	Glu	Ser	Ala	Asp	Thr	Gly	Glu	
			405					410						415		
GAA	GAG	ACA	CCT	AAA	TGG	GGA	TTT	GAT	TAC	ATG	GGA	AAC	CCT	GTA	AGG	1396
Glu	Glu	Thr	Pro	Lys	Trp	Gly	Phe	Asp	Tyr	Met	Gly	Asn	Pro	Val	Arg	
			420					425					430			
ATA	TGG	ACG	GGT	GAT	TTA	GAG	CAT	CAT	ATA	ACT	GCT	GAT	ATA	GCT	TTT	1444
Ile	Trp	Thr	Gly	Asp	Leu	Glu	His	His	Ile	Thr	Ala	Asp	Ile	Ala	Phe	
		435					440					445				
GCA	GTG	TGG	GAG	TAT	TTT	AGA	GCG	ACA	GAG	GAT	ATT	GAG	TTT	ATG	TTG	1492

Ala	Val	Trp	Glu	Tyr	Phe	Arg	Ala	Thr	Glu	Asp	Ile	Glu	Phe	Met	Leu	.
450						455					460					
AAT	TAC	GGT	GCA	GAA	GTC	ATT	TTT	GAG	ACT	GCA	AGG	TTT	TGG	GTA	TCT	1540
Asn	Tyr	Gly	Ala	Glu	Val	Ile	Phe	Glu	Thr	Ala	Arg	Phe	Trp	Val	Ser	
465					470					475					480	
AGA	TGT	GAA	TAT	GTA	AAA	GAA	TTA	GAC	AGG	TAT	GAA	ATA	AAC	AAT	GTC	1588
Arg	Cys	Glu	Tyr	Val	Lys	Glu	Leu	Asp	Arg	Tyr	Glu	Ile	Asn	Asn	Val	
				485					490					495		.
ATA	GGT	CCT	GAT	GAA	TTT	CAT	GAG	CAT	GTT	GAT	AAT	AAT	GCT	TAT	ACT	1636
Ile	Gly	Pro	Asp	Glu	Phe	His	Glu	His	Val	Asp	Asn	Asn	Ala	Tyr	Thr	
				500				505					510			.
GAT	TAC	CTT	GCA	AAA	TGG	AAT	ATT	AAA	AAG	GGA	CTT	GAA	CTA	ATC	AAT	1684
Asp	Tyr	Leu	Ala	Lys	Trp	Asn	Ile	Lys	Lys	Gly	Leu	Glu	Leu	Ile	Asn	
		515					520					525				
ATG	TTA	AAA	GAA	AAA	TAC	CCT	GAA	CAT	TAT	CAT	GCT	ATA	TCA	AAC	AAG	1732
Met	Leu	Lys	Glu	Lys	Tyr	Pro	Glu	His	Tyr	His	Ala	Ile	Ser	Asn	Lys	
		530				535					540					
AAA	TGT	TTG	ACA	AAT	GAG	GAA	ATG	GAA	AAG	TGG	AAA	GAA	GTT	GAA	GAA	1780
Lys	Cys	Leu	Thr	Asn	Glu	Glu	Met	Glu	Lys	Trp	Lys	Glu	Val	Glu	Glu	
545				550						555					560	
AAA	ATA	TAT	ATA	CCT	TAT	GAC	AAA	GAC	AAA	AAG	CTG	ATA	GAA	CAA	TTT	1828
Lys	Ile	Tyr	Ile	Pro	Tyr	Asp	Lys	Asp	Lys	Lys	Leu	Ile	Glu	Gln	Phe	
				565					570					575		
GAA	GGC	TAT	TTT	GAT	AAA	AAA	GAT	TAT	GTT	ATT	GAT	AAA	TTT	GAT	GAA	1876
Glu	Gly	Tyr	Phe	Asp	Lys	Lys	Asp	Tyr	Val	Ile	Asp	Lys	Phe	Asp	Glu	
			580					585					590			
AAC	AAT	ATG	CCT	ATA	TGG	CCT	GAA	GGT	GTT	GAT	ATA	ACA	AAA	TTG	GGT	1924
Asn	Asn	Met	Pro	Ile	Trp	Pro	Glu	Gly	Val	Asp	Ile	Thr	Lys	Leu	Gly	
		595					600					605				
GAT	ACC	CAG	CTT	ATT	AAA	CAG	GCT	GAT	GTT	GTT	ATG	TTA	ATG	CTT	TTG	1972
Asp	Thr	Gln	Leu	Ile	Lys	Gln	Ala	Asp	Val	Val	Met	Leu	Met	Leu	Leu	
		610				615					620					
TTA	GGT	GAG	GAA	TTT	GAC	GAA	GAA	ACG	AAA	AGA	ATC	AAT	TAC	GAA	TAT	2020
Leu	Gly	Glu	Glu	Phe	Asp	Glu	Glu	Thr	Lys	Arg	Ile	Asn	Tyr	Glu	Tyr	
625				630						635					640	
TAT	GAA	AAG	CGA	ACT	ATG	CAC	AAA	TCT	TCA	TTA	GGT	CCC	AGC	ATG	TAT	2068
Tyr	Glu	Lys	Arg	Thr	Met	His	Lys	Ser	Ser	Leu	Gly	Pro	Ser	Met	Tyr	
				645					650					655		
GCC	ATT	ATG	GGG	TTA	AAA	GTA	GGG	GAC	CAC	AAA	AAC	GCA	TAT	CAG	TCT	2116
Ala	Ile	Met	Gly	Leu	Lys	Val	Gly	Asp	His	Lys	Asn	Ala	Tyr	Gln	Ser	
			660					665					670			
TTC	ATG	AGA	AGT	GCC	AAC	GTG	GAC	CTT	GTG	GAC	AAT	CAG	GGG	AAC	ACT	2164
Phe	Met	Arg	Ser	Ala	Asn	Val	Asp	Leu	Val	Asp	Asn	Gln	Gly	Asn	Thr	
		675					680					685				
AAA	GAA	GGT	TTG	CAT	GCT	GCA	TCT	GCT	GGT	GGT	ACA	TGG	CAA	GTA	GTT	2212
Lys	Glu	Gly	Leu	His	Ala	Ala	Ser	Ala	Gly	Gly	Thr	Trp	Gln	Val	Val	
		690				695					700					
GTT	TTT	GGA	TTT	GGC	GGA	ATG	GAA	ATT	GAC	AAA	GAA	GGG	GCA	TTA	AAT	2260
Val	Phe	Gly	Phe	Gly	Gly	Met	Glu	Ile	Asp	Lys	Glu	Gly	Ala	Leu	Asn	
705				710						715					720	
ATA	AAT	TCG	TGG	CTG	CCA	GAA	AAA	TGG	GAT	AAA	CTT	TCC	TAT	AAA	GTA	2308
Ile	Asn	Ser	Trp	Leu	Pro	Glu	Lys	Trp	Asp	Lys	Leu	Ser	Tyr	Lys	Val	
				725					730					735		
TTT	TGG	AAA	GGC	AAT	TTA	ATA	GAG	GTG	ATT	GTT	ACA	AAA	CAG	GAA	GTG	2356
Phe	Trp	Lys	Gly	Asn	Leu	Ile	Glu	Val	Ile	Val	Thr	Lys	Gln	Glu	Val	
			740					745					750			

ACA	GTA	AAA	AAA	TTA	AAA	GGA	AAA	GGA	AAT	ATA	AAA	GTA	AAG	GTA	AAA	2404
Thr	Val	Lys	Lys	Leu	Lys	Gly	Lys	Gly	Asn	Ile	Lys	Val	Lys	Val	Lys	
		755					760					765				
GGG	AAA	GAG	CTG	ACA	ATA	GAA										2425
Gly	Lys	Glu	Leu	Thr	Ile	Glu										
		770				775										
TAGTCAAAAA	GGTATAGGCA	GGTGGATAAC	CTGCTATACC	TTAAATAAAA	TTGATTATGT	2485										
TTTAAGGGGG	GATAAGTGGA	GTTAGAGTAA	AATTTTAAAGT	CCTCAATCAG	ATATTTTACT	2545										
ATAAAATTGT	GAAAGGGGAA	AGTGGTAATG	AGTAAAAAAC	TTTCAAGCAT	CTTTGTATTG	2605										
ACGATCTTTG	TATTAGCTAC	TGTTTTAGCT	GGTTGTTCAT	CCAGTAAAAA	TAATACTTCC	2665										
AGTGCCAATG	AGACAAATAC	ACAAAAACAA	GAGACAGCAA	AACCAGTTAC	TATAAAATTA	2725										
GGCATGTGGT	CTTCATCTCC	AGCAGAAAAG	AAGATAGTGG	ATGACCAAAT	AGCTAAGTTT	2785										
AAAGAAAAAT	ATCCAAATAT	AGATGTGCAA	ATTGAGACAA	TTGTGGGAGA	TTACATGCAA	2845										
AAATTACAAA	CAGAAGTGGC	GTCAAATACA	GCACCAGACA	TATTCTATCT	TGACAGAATG	2905										
CCGGCACCAC	AGCTTATGTC	TTCAGAGATT	TTAGAGCCAT	TAGATGATTA	TATTAAGAAA	2965										
TACAATGTGG	ATGTAAATGA	TTTCGAGCCA	GCATTGCTTT	CCGCTTTTCA	GTGGGAGGGA	3025										
AAAACCTTATG	GTTTACCAAA	GGATTTCAAT	ACTCTAGCTT	TGTTTTACAA	CAAAGACATG	3085										
TTTAAAGCGG	CTGGAATAAA	TGAGCCTCCA	AAAACATGGG	AGGAATTAAG	AGATGTAGCT	3145										
AAAAAGTTGA	CAAAGACGG	TGTCAAAGGT	TTGGTTTTAT	CAGCAGACCT	TGCAAGATTT	3205										
GATGCTTTTA	TAAATCAAAA	TGGCGGTTCA	GTATATCAAG	GATGGAAAAG	TTACTTTTAA	3265										
TCTGCCAGAG	AATGCACAAG	CTCTTGATTT	TTATGTAGGC	CTCATTACAA	AAGACAAAGT	3325										
TACTGACACA	CCACAAAACA	TGGGAGAAGG	CTGGAATGGA	GATGCTTTTG	CTGCTAAAAA	3385										
AGCTGCAATG	GCAATAGAAG	GTGGCTGGAT	GATACCATT	CTCAAAGAAA	AAGCTCCTGA	3445										
TTTAAACTAT	GGTATAGCAG	AGCTTCCAGC	AGGAAAGCAA	AAATCTACAA	TGGCTTTTCA	3505										
TGTTGCATAT	GTGATGAATA	AAAACAGCAA	ACATAAAGAT	GAAGCCTTTA	AACTTATTGA	3565										
ATTTTTAACC	GGTAAAGAAG	GACAGCAATT	TGTAGTAGAT	TCAGGCCTTG	CACTTCCATC	3625										
GAGAAAGTCT	ATGCAAGAAG	GATTTAAGGA	GAAATATCCT	GAAAGAGCTG	CCTTTGTAGA	3685										
TGGTGCTTCT	TATGCGGTAC	CATGGCAATT	CGGTTTGTAT	GGCACAAAGG	TAGTAGATGC	3745										
GGCTAATAAA	GCCTGTGAAG	CATTAATAAT	GAAGCAAATA	AGTAGTGCTC	AGCAAGCTCT	3805										
TGACAACGCA	CAAAGGAAG	TTGGACAATA	ATTTAAGTAA	GCAGCACCTT	ACTAAAATAA	3865										
GGTGCTGCAA	TTATGATTTT	TTAAGGTTGA	AGGGAAGGAT	GTATTTATGG	AAGCTAAAAT	3925										
GA	CTATGAAA	AAGAGGTATT	TATACGAAGC	T		3956										

附件：

修正
92.8.28 補充

A8
B8
C8
D8

公告本

六、申請專利範圍

第 8 6 1 1 6 3 9 9 號 專 利 申 請 案

中 文 申 請 專 利 範 圍 修 正 本

民 國 9 2 年 8 月 2 8 日 修 正

1 . 一 種 麴 二 糖 磷 酸 化 酶 ， 其 係 於 無 機 磷 酸 及 / 或 其 鹽 之 存 在 下 水 解 麴 二 糖 以 生 成 D - 葡 萄 糖 及 β - D - 葡 萄 糖 - 1 - 磷 酸 及 / 或 其 鹽 ， 該 麴 二 糖 磷 酸 化 酶 係 由 S E Q I D N O : 4 之 胺 基 酸 序 列 所 組 成 :

SEQ ID NO:4:

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

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

210	215	220
Asp Lys Glu Lys Asn Asn Ile Ala Lys Phe Lys Arg Phe Leu Pro Leu		
225	230	235
Gly Glu Met Ser Ile Glu Tyr Phe Glu Phe Asp Gly Thr Glu Asn Lys		
245	250	255
Thr Val Val Ile Asp Lys Phe Ile Ile Thr Tyr Thr Ser Arg Asp Val		
260	265	270
Lys Lys Gly Leu Leu Lys Ser Thr Val Glu Lys Glu Leu Phe Ala Phe		
275	280	285
Ala Gly Glu Gly Ile Asp Lys Glu Leu Gln Arg His Ile Glu Val Tyr		
290	295	300
Glu Glu Leu Trp Ser Val Ala Asp Ile Asn Ile Glu Gly Asp Glu Glu		
305	310	315
Ala Asp Lys Ala Leu Arg Phe Asn Ile Phe His Leu Met Ser Ser Val		
325	330	335
Asn Glu Asn Asp Pro Met Val Ser Ile Ala Ala Lys Ala Leu His Gly		
340	345	350
Glu Gly Tyr Lys Gly His Val Phe Trp Asp Thr Glu Ile Phe Met Leu		
355	360	365
Pro Phe Phe Ile Tyr Val His Pro Lys Ala Ala Lys Thr Leu Leu Met		
370	375	380
Tyr Arg Tyr Asn Met Leu Asp Ala Ala Arg Lys Asn Ala Ala Leu Asn		
385	390	395
Gly Tyr Lys Gly Ala Gln Tyr Pro Trp Glu Ser Ala Asp Thr Gly Glu		
405	410	415
Glu Glu Thr Pro Lys Trp Gly Phe Asp Tyr Met Gly Asn Pro Val Arg		
420	425	430
Ile Trp Thr Gly Asp Leu Glu His His Ile Thr Ala Asp Ile Ala Phe		
435	440	445
Ala Val Trp Glu Tyr Phe Arg Ala Thr Glu Asp Ile Glu Phe Met Leu		
450	455	460
Asn Tyr Gly Ala Glu Val Ile Phe Glu Thr Ala Arg Phe Trp Val Ser		
465	470	475
Arg Cys Glu Tyr Val Lys Glu Leu Asp Arg Tyr Glu Ile Asn Asn Val		
485	490	495
Ile Gly Pro Asp Glu Phe His Glu His Val Asp Asn Asn Ala Tyr Thr		
500	505	510
Asp Tyr Leu Ala Lys Trp Asn Ile Lys Lys Gly Leu Glu Leu Ile Asn		
515	520	525
Met Leu Lys Glu Lys Tyr Pro Glu His Tyr His Ala Ile Ser Asn Lys		
530	535	540
Lys Cys Leu Thr Asn Glu Glu Met Glu Lys Trp Lys Glu Val Glu Glu		
545	550	555
Lys Ile Tyr Ile Pro Tyr Asp Lys Asp Lys Lys Leu Ile Glu Gln Phe		
565	570	575
Glu Gly Tyr Phe Asp Lys Lys Asp Tyr Val Ile Asp Lys Phe Asp Glu		
580	585	590
Asn Asn Met Pro Ile Trp Pro Glu Gly Val Asp Ile Thr Lys Leu Gly		
595	600	605
Asp Thr Gln Leu Ile Lys Gln Ala Asp Val Val Met Leu Met Leu Leu		
610	615	620
Leu Gly Glu Glu Phe Asp Glu Glu Thr Lys Arg Ile Asn Tyr Glu Tyr		
625	630	635
Tyr Glu Lys Arg Thr Met His Lys Ser Ser Leu Gly Pro Ser Met Tyr		
645	650	655
Ala Ile Met Gly Leu Lys Val Gly Asp His Lys Asn Ala Tyr Gln Ser		

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

六、申請專利範圍

			660						665					670			
Phe	Met	Arg	Ser	Ala	Asn	Val	Asp	Leu	Val	Asp	Asn	Gln	Gly	Asn	Thr		
		675					680					685					
Lys	Glu	Gly	Leu	His	Ala	Ala	Ser	Ala	Gly	Gly	Thr	Trp	Gln	Val	Val		
	690					695					700						
Val	Phe	Gly	Phe	Gly	Gly	Met	Glu	Ile	Asp	Lys	Glu	Gly	Ala	Leu	Asn		
705					710					715					720		
Ile	Asn	Ser	Trp	Leu	Pro	Glu	Lys	Trp	Asp	Lys	Leu	Ser	Tyr	Lys	Val		
			725						730						735		
Phe	Trp	Lys	Gly	Asn	Leu	Ile	Glu	Val	Ile	Val	Thr	Lys	Gln	Glu	Val		
			740					745					750				
Thr	Val	Lys	Lys	Leu	Lys	Gly	Lys	Gly	Asn	Ile	Lys	Val	Lys	Val	Lys		
		755					760					765					
Gly	Lys	Glu	Leu	Thr	Ile	Glu											
	770					775											

2. 如申請專利範圍第1項之麴二糖磷酸化酶，其係由D-葡萄糖及 β -D-葡萄糖-1-磷酸及／或其鹽生成麴二糖及無機磷酸及／或其鹽，及利用 β -D-葡萄糖-1-磷酸及／或其鹽充作醱供體以催化葡萄糖基轉移至其他醱之反應。

3. 如申請專利範圍第1項之麴二糖磷酸化酶，其具有下述之理化性質：

(1) 分子量

83,000 $\pm$ 5,000道爾吞(daltons)，根據SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳(SDS-PAGE)；

(2) 最適宜溫度

約65 $^{\circ}$ C，當於pH5.5培養30分鐘時；

(3) 最適宜pH

約5.5，當於60 $^{\circ}$ C培養30分鐘時；

(4) 熱穩定性

穩定至溫度約65 $^{\circ}$ C，當於pH5.5培養1

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

小時；及

(5) p H 穩 定 性

穩定於 p H 約 5 . 5 至 1 0 . 0 ， 當 於 4 ° C 培
養 2 4 小 時 。

4 . 如 申 請 專 利 範 圍 第 1 項 之 麴 二 糖 磷 酸 化 酶 ， 其 可
由 基 因 表 現 而 獲 得 。

5 . 一 種 D N A ， 其 編 碼 申 請 專 利 範 圍 第 1 項 之 麴 二
糖 磷 酸 化 酶 ， 該 D N A 係 S E Q I D N O : 5 之 核 苷
酸 序 列 或 其 完 全 互 補 序 列 ；

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

SEQ ID NO:5:

GTGGTAAAGC	ACATGTTTTT	AGAGGATGTA	AACAATTTAA	TAAGTGATGA	CAAATGGCTT	60
ATTTTCCAAA	ATGAGTATAA	TACAGAGGTA	AATCCTCGAT	ATGAGACCCT	TTTTACACTT	120
ACAAATGGTT	ACATGGGCGT	AAGAGGTACT	TTTGAGGAAG	GAAGCGAGGG	AGAAAGGTCG	180
GGAAATTTTA	TTGCAGGAAT	TTTTGACAAG	TCAGATGCGC	AGGTTAGAGA	AATAGTAAAT	240
GCTCAAAATT	GGTTGAGAAT	AAAGTTGTAT	GTTGAAGGTG	AAGAATTAAG	TTTGGATAAA	300
TGCCAGTTGA	TAGAATTTAA	AAGAATTCTT	GATATGAAAA	AAGGTATTCT	ATTTAGGAGT	360
ATGTTGATAA	AAGACAGCAA	AGATAGAATT	ACTCGAATTG	AGGGATACAG	GTTTATAAGC	420
CGTAGCGACC	TTCATCGTTC	TGCAATTAAG	CTATTTGTAA	CACCTGTAAA	TTACAGTGGT	480
GTTGTAGGTA	TAGAGAGCAT	TATTGATGGG	ACTGTTTTAA	ATTCAGCAGA	TAGCCCAAAG	540
CATAGGGTAA	AGCATTGTA	AGTGGCTGAC	AATAGCAGTT	TAAATAAAAG	CGGAGTTTAT	600
CTTGAAACAG	CAACTATTGA	CGATGATATT	CGCATTGCAA	CAGGTAGTGC	AGTGAGGTTA	660
TATCATTATG	AGGATAAAGA	GAAAAATAAC	ATAGCTAAAT	TTAAGAGATT	TTTGCCTTTA	720
GGTGAAATGA	GTATTGAATA	CTTTGAGTTT	GATGGCACAG	AGAACAAAAC	AGTAGTAATT	780
GACAAATTTA	TTATAACCTA	TACCTCAAGA	GACGTAAAAA	AAGGCCTATT	AAAGAGTACG	840
GTGGAAAAAG	AACTCTTTGC	TTTTGCTGGA	GAAGGTATTG	ACAAAGAGTT	GCAGAGACAT	900
ATTGAGGTAT	ATGAAGAACT	ATGGTCTGTT	GCAGATATAA	ATATTGAAGG	GGATGAAGAA	960
GCAGATAAAG	CTTTGAGGTT	TAATATTTTT	CATCTCATGA	GTTCTGTCAA	TGAAAATGAC	1020
CCCATGGTAA	GTATCGCTGC	AAAGGCCCTT	CATGGTGAGG	GATACAAAGG	CCATGTCTTT	1080
TGGGATACAG	AAATATTTAT	GCTTCCGTTT	TTCATATATG	TGCATCCAAA	AGCGGCCAAAG	1140
ACACTTTTGA	TGTACAGGTA	CAATATGCTG	GATGCAGCGA	GAAAAAATGC	GGCTTTTAAAC	1200
GGGTATAAAG	GAGCACAATA	CCCTTGGGAA	TCTGCAGATA	CAGGAGAGGA	AGAGACACCT	1260
AAATGGGGAT	TTGATTACAT	GGGAAACCCT	GTAAGGATAT	GGACGGGTGA	TTTAGAGCAT	1320
CATATAACTG	CTGATATAGC	TTTTGTCAGT	TGGGAGTATT	TTAGAGCGAC	AGAGGATATT	1380
GAGTTTATGT	TGAATTACGG	TGCAGAAGTC	ATTTTTGAGA	CTGCAAGGTT	TTGGGTATCT	1440
AGATGTGAAT	ATGTAAGAAG	ATTAGACAGG	TATGAAATAA	ACAATGTCAT	AGGTCCTGAT	1500
GAATTTTCAT	AGCATGTTGA	TAATAATGCT	TATACTGATT	ACCTTGCAAA	ATGGAATATT	1560
AAAAAGGGAC	TTGAACTAAT	CAATATGTGA	AAAGAAAAAT	ACCCTGAACA	TTATCATGCT	1620
ATATCAAACA	AGAAATGTTT	GACAAATGAG	GAAATGGAAA	AGTGGAAAGA	AGTTGAAGAA	1680
AAAAATATATA	TACCTTATGA	CAAAGACAAA	AAGCTGATAG	AACAATTTGA	AGGCTATTTT	1740
GATAAAAAAG	ATTATGTTAT	TGATAAATTT	GATGAAAACA	ATATGCCTAT	ATGGCCTGAA	1800
GGTGTTGATA	TAACAAAATT	GGGTGATACC	CAGCTTATTA	AACAGGCTGA	TGTTGTTATG	1860
TTAATGCTTT	TGTTAGGTGA	GGAATTTGAC	GAAGAAACGA	AAAGAATCAA	TTACGAATAT	1920
TATGAAAAGC	GAACATATGCA	CAAATCTTCA	TTAGGTCCCA	GCATGTATGC	CATTATGGGG	1980
TTAAAAGTAG	GGGACCACAA	AAACGCATAT	CAGTCTTTCA	TGAGAAGTGC	CAACGTGGAC	2040
CTTGTGGACA	ATCAGGGGAA	CACTAAAGAA	GGTTTGCATG	CTGCATCTGC	TGGTGGTACA	2100
TGGCAAGTAG	TTGTTTTTGG	ATTTGGCGGA	ATGGAAATTG	ACAAAGAAGG	GGCATTAAT	2160
ATAAATTTCG	GGCTGCCAGA	AAAATGGGAT	AACTTTTCCT	ATAAAGTATT	TTGGAAAGGC	2220
AATTTAATAG	AGGTGATTGT	TACAAAACAG	GAAGTGACAG	TAAAAAATT	AAAAGGAAAA	2280
GGAAATATAA	AAGTAAAGGT	AAAAGGGAAA	GAGCTGACAA	TAGAA		2325

家

訂

六、申請專利範圍

- 6 . 一種 D N A , 其中
S E Q I D N O : 5 的 1 或多個鹼基係被不同之鹼基所取代, 其係基於基因密碼之簡併性而未改變由 S E Q I D N O : 5 核苷酸序列所編碼之胺基酸序列。
- 7 . 如申請專利範圍第 5 項之 D N A , 其係經引入至自身可複製之載體中。
- 8 . 如申請專利範圍第 5 項之 D N A , 其係經引入至適當的宿主內。
- 9 . 一種製造申請專利範圍第 1 項之麴二糖磷酸化酶之方法, 其包括於營養培養基中培養能製造該麴二糖磷酸化酶的熱厭氧菌 (*Thermoanaerobium brockii*) 種微生物, 及自該培養物收集所製造的麴二糖磷酸化酶。
- 10 . 如申請專利範圍第 9 項之方法, 其中藉由選自下述之技術以收集所製造的麴二糖磷酸化酶: 透析、鹽析、過濾、濃縮、分離沈降、離子交換層析、凝膠過濾層析、吸附層析、疏水層析、逆相層析、親和層析、凝膠電泳及電焦。
- 11 . 一種製造包含葡萄糖基轉移酶的糖組成物之方法, 其包括令申請專利範圍第 1 項之麴二糖磷酸化酶與 β -D-葡萄糖-1-磷酸及/或其鹽及其他糖接觸的步驟。
- 12 . 如申請專利範圍第 11 項之方法, 其中該 β -D-葡萄糖-1-磷酸及/或其鹽係由下述所製得: 令該麴二糖磷酸化酶於無機磷酸及/或其鹽之存在下與麴二糖

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

接觸，令麥芽糖磷酸化酶於無機磷酸及／或其鹽之存在下與麥芽糖接觸，或令海藻糖磷酸化酶於無機磷酸及／或其鹽之存在下與海藻糖接觸。

1 3．如申請專利範圍第 1 1 項之方法，其中該其他醣係選自 D－葡萄糖、L－山梨糖、麥芽糖、麴二糖、海藻糖或蔗糖。

1 4．如申請專利範圍第 1 1 項之方法，其中利用選自管柱層析或用酵母菌的醱酵法之技術以移除該葡萄糖基轉移醣以外的雜質，該雜質係在酶催化反應期間所產生的及／或殘存於該反應混合物中者。

1 5．一種製造麴二糖之方法，其包括於無機磷酸及／或其鹽之存在下令申請專利範圍第 1 項之麴二糖磷酸化酶和麥芽糖磷酸化酶與麥芽糖接觸。

1 6．一種製造麴二糖之方法，其包括於無機磷酸及／或其鹽之存在下令申請專利範圍第 1 項之麴二糖磷酸化酶和海藻糖磷酸化酶與海藻糖接觸。

1 7．一種醣組成物，其包含葡萄糖基轉移醣，該葡萄糖基轉移醣係選自 α -D-葡萄糖基-(1→5)-L-山梨糖， α -D-葡萄糖基-(1→2)- α -D-葡萄糖基-(1→2)- β -D-果糖苷，及彼之混合物。

1 8．如申請專利範圍第 1 7 項之醣組成物，其進一步含有一或多種選自麴二糖、麴二糖基葡萄糖、麴三糖、或麴二糖基葡萄糖苷之糖。

1 9．一種呈食品形式之組成物，其含有申請專利範

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

圖第 1 7 項之醣組成物。

2 0 . 一種呈化粧品形式之組成物，其含有申請專利範圍第 1 7 項之醣組成物。

2 1 . 一種呈藥品形式之組成物，其含有申請專利範圍第 1 7 項之醣組成物。

2 2 . 一種呈成形體形式之組成物，其含有申請專利範圍第 1 7 項之醣組成物。

2 3 . 一種葡萄糖基轉移醣，其係選自 α - D - 葡萄糖基 - (1 $\rightarrow$ 5) - L - 山梨糖及 α - D - 葡萄糖基 - (1 $\rightarrow$ 2) - α - D - 葡萄糖基 - (1 $\rightarrow$ 2) - β - D - 果糖苷。

2 4 . 如申請專利範圍第 1 1 項之方法，其中該醣組成物係用於製備食品，化粧品，藥品或成形體。

2 5 . 一種可由熱厭氧菌 (*Thermoanaerobium brockii*) 製得之麴二糖磷酸化酶，其係於無機磷酸及／或其鹽之存在下水解麴二糖以生成 D - 葡萄糖及 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸及／或其鹽，且可選擇地其係由 D - 葡萄糖及 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸及／或其鹽生成麴二糖及無機磷酸及／或其鹽，且其利用 β - D - 葡萄糖 - 1 - 磷酸及／或其鹽充作醣供體以催化葡萄糖基轉移至其他醣之反應，該麴二糖磷酸化酶具有下述之理化性質：

(1) 分子量

8 3 , 0 0 0 $\pm$ 5 , 0 0 0 道爾吞 (daltons)

，根據 S D S - 聚丙烯醯胺凝膠電泳 (S D S - P A G E

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

六、申請專利範圍

) ；

(2) 最 適 宜 溫 度

約 6 5 °C ， 當 於 p H 5 . 5 培 養 3 0 分 鐘 時 ；

(3) 最 適 宜 p H

約 5 . 5 ， 當 於 6 0 °C 培 養 3 0 分 鐘 時 ；

(4) 熱 穩 定 性

穩 定 至 溫 度 約 6 5 °C ， 當 於 p H 5 . 5 培 養 1
小 時 ； 及

(5) p H 穩 定 性

穩 定 於 p H 約 5 . 5 至 1 0 . 0 ， 當 於 4 °C 培
養 2 4 小 時 。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂