

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 15/09

C12N 9/80 C12N 5/10

C12P 13/04



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02800265.2

[43] 公开日 2003 年 11 月 19 日

[11] 公开号 CN 1457362A

[22] 申请日 2002.2.1 [21] 申请号 02800265.2

[30] 优先权

[32] 2001.2.1 [33] JP [31] 24986/2001

[86] 国际申请 PCT/JP02/00853 2002.2.1

[87] 国际公布 WO02/061077 日 2002.8.8

[85] 进入国家阶段日期 2002.10.8

[71] 申请人 三井化学株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 长部雅己 高桥克幸 八卷俊文

有井辉夫 及川利洋

[74] 专利代理机构 北京银龙专利代理有限公司

代理人 阎斌斌

权利要求书 3 页 说明书 19 页 序列表 4 页  
附图 1 页

[54] 发明名称 新型 DNA 编码的 D - 酰化氨基酸水解酶以及将其用于生产 D - 氨基酸的方法

[57] 摘要

本发明提供了一种新型的 D - 酰化氨基酸水解酶，它是对由甲基杆菌嗜中温菌属 (Methylobacterium mesophilicum) MT10894 等得到的新型 D - 酰化氨基酸水解酶的编码 DNA 进行克隆得到的，它对在工业有效基质浓度下有效进行由 N - 酰基 - DL - 氨基酸制备 D - 氨基酸的反应具有足够高的活性；本发明还提供了一种编码 D - 酰化氨基酸水解酶的 DNA，以及使用含有这种 DNA 的转化体来由相应的 N - 酰基氨基酸制备 D - 氨基酸的一种方法。

ISSN 1008-4274

1. 一种能够作用于 N-酰基-D-氨基酸而催化生成相应的 D-氨基酸反应的 D-酰化氨基酸水解酶，中在水介质中由 N-乙酰基-D-色氨酸经催化反应生成 D-色氨酸时，N-乙酰基-D-色氨酸浓度为 50g/L 时的反应速率至少是其浓度为 5g/L 时的 40%。

2. 根据权利要求 1 中所述的 D-酰化氨基酸水解酶，其中 N-乙酰基-D-色氨酸浓度为 100g/L 时的反应速率至少是其浓度为 5g/L 时的 20%。

3. 根据权利要求 1 中所述的 D-酰化氨基酸水解酶是由属于甲基杆菌 (Methylobacterium) 或类诺卡氏菌属 (Nocardioides) 的微生物得到的。

4. 根据权利要求 3 中所述的 D-酰化氨基酸水解酶，其中属于甲基杆菌 (Methylobacterium) 的微生物是甲基杆菌嗜中温菌属 (Methylobacterium mesophilicum)，属于类诺卡氏菌属 (Nocardioides) 的微生物是类诺卡氏菌属 (Nocardioides) thermolilacinus。

5. 根据权利要求 4 中所述的 D-酰化氨基酸水解酶，其中属于类诺卡氏菌属 (Nocardioides) thermolilacinus 的微生物是类诺卡氏菌属 (Nocardioides) thermolilacinus ATCC 35863 菌株。

6. 一种能够作用于 N-酰基-D-氨基酸而催化生成 D-氨基酸的反应的 D-酰化氨基酸水解酶，其包括：

(A) 列表中 SEQ. ID. No. 2 所示的氨基酸序列，或者

(B) 在保持催化活性下，插入、缺失或替换上述的氨基酸序列中至少一个氨基酸残基而得到的变异的氨基酸。

7. 据权利要求 6 中所述的 D-酰化氨基酸水解酶，其中在水介质中由 N-乙酰基-D-色氨酸经催化反应生成 D-色氨酸时，N-乙酰基-D-色氨酸浓度为 50g/L 时的反应速率至少是其浓度为 5g/L 时的 40%。

8. 根据权利要求 7 中所述的 D-酰化氨基酸水解酶，其中 N-乙酰基-D-色氨酸浓度为 100g/L 时的反应速率至少是其浓度为 5g/L 时的 20%。

9. 一种编码了能够作用于 N-酰基-D-氨基酸而催化生成 D-氨基酸的

反应的 D-酰化氨基酸水解酶的碱基序列，其包括：

(a) 序列表中 SEQ. ID. No. 1 所示的碱基序列，或者

(b) 在保持由上述的碱基序列中编码的 D-酰化氨基酸水解酶的催化活性下，由插入、缺失或替换上述的碱基序列 SEQ. ID. No. 1 中至少一个碱基而得到的变异的碱基序列。

10. 根据权利要求 9 中所述的碱基序列，其中变异的碱基序列与 SEQ. ID. No. 1 中的碱基序列在苛刻条件下进行杂交。

11. 根据权利要求 9 中所述的碱基序列，其中在水介质中由 N-乙酰基-D-色氨酸经催化反应生成 D-色氨酸时，N-乙酰基-D-色氨酸浓度为 50g/L 时的反应速率至少是其浓度为 5g/L 时的 40%。

12. 根据权利要求 11 中所述的碱基序列，其中 N-乙酰基-D-色氨酸浓度为 100g/L 时的反应速率至少是其浓度为 5g/L 时的 20%。

13. 一种含有权利要求 9 中所述碱基序列的质粒。

14. 一种由权利要求 13 中所述质粒经转化得到的转化体。

15. 一种制备 D-酰化氨基酸水解酶的方法，其中包括将含有碱基序列的质粒插入到权利要求 14 中所述的转化体中，并对此转化体进行培养生成编码的 D-酰化氨基酸水解酶的步骤。

16. 一种制备具有光活性的氨基酸的方法，其中包括在水介质中用 D-酰化氨基酸水解酶作用于 N-酰基氨基酸得到相应的 D-氨基酸的步骤，其中，在水介质中用 D-酰化氨基酸水解酶催化由 N-乙酰基-D-色氨酸生成 D-色氨酸的反应时，N-乙酰基-D-色氨酸浓度为 50g/L 时的反应速率至少是其浓度为 5g/L 时的 40%。

17. 根据权利要求 16 中所述的方法，其中 N-乙酰基-D-色氨酸浓度为 100g/L 时的反应速率至少是其浓度为 5g/L 时的 20%。

18. 根据权利要求 16 中所述的方法，其中的酰化氨基酸水解酶是由属于甲基杆菌 (Methylobacterium) 或类诺卡氏菌属 (Nocardioides) 的微生物得到的。

19. 根据权利要求 18 中所述的方法，其中属于甲基杆菌 (Methylobacterium) 的微生物是甲基杆菌嗜中温菌属

(*Methylobacterium mesophilicum*), 属于类诺卡氏菌属(*Nocardioideae*) 的微生物是类诺卡氏菌属 (*Nocardioideae*) *thermolilacinus*。

20. 根据权利要求 19 中所述的方法, 其中属于类诺卡氏菌属 (*Nocardioideae*) *thermolilacinus* 的微生物是类诺卡氏菌属 (*Nocardioideae*) *thermolilacinus* ATCC 35863 菌株。

21. 根据权利要求 16 中所述的方法, 其中 N-酰基氨基酸的浓度为大于等于 50g/L。

22. 根据权利要求 21 中所述的方法, 其中 N-酰基氨基酸的浓度为大于等于 100g/L。

23. 一种制备具有光活性的氨基酸的方法, 其中包括在水介质中用 D-酰化氨基酸水解酶作用于 N-酰基氨基酸得到相应的 D-氨基酸的步骤, 其中 D-酰化氨基酸水解酶为权利要求 6 中所述的 D-酰化氨基酸水解酶。

24. 根据权利要求 23 中所述的方法, 其中在水介质中用 D-酰化氨基酸水解酶催化由 N-乙酰基-D-色氨酸生成 D-色氨酸的反应时, N-乙酰基-D-色氨酸浓度为 50g/L 时的反应速率至少是其浓度为 5g/L 时的 40%。

25. 根据权利要求 24 中所述的方法, 其中 N-乙酰基-D-色氨酸浓度为 100g/L 时的反应速率至少是其浓度为 5g/L 时的 20%。

26. 根据权利要求 23 中所述的方法, 其中用于和 N-酰基氨基酸反应的 D-酰化氨基酸水解酶是将权利要求 14 中所述的转化体培养得到的培养基或者从培养基中分离得到的转化体或者由其制得的材料。

27. 根据权利要求 23 中所述的方法, 其中 N-酰基氨基酸作为基质的浓度为大于等于 50g/L。

28. 根据权利要求 27 中所述的方法, 其中 N-酰基氨基酸作为基质的浓度为大于等于 100g/L。

## 新型 DNA 编码的 D-酰化氨基酸水解酶

### 以及将其用于生产 D-氨基酸的方法

#### 技术领域

本发明涉及一种在工业有效的基质浓度下具有高活性的，特别是一种可以使 D-色氨酸由 N-乙酰基-DL-色氨酸经立体选择而高效获得的新型 D-酰化氨基酸水解酶，以及一种使用这种酶由 N-酰基氨基酸制备 D-氨基酸的方法。本发明还涉及一种编码 D-酰化氨基酸水解酶的碱基序列，一种含有这种序列的质粒，以及由这种质粒转化而得到的转化体。本发明还涉及一种使用这种转化体制备 D-酰化氨基酸水解酶的方法。本发明还涉及一种通过将 D-酰化氨基酸水解酶的转化体、其培养基或者其加工物作用在 N-乙酰基氨基酸上的反应来制备一种相应的光活性的 D-氨基酸的方法。

#### 背景技术

D-氨基酸是许多杀虫剂、抗生素和医药的重要中间体。对于它们的合成已进行了许多的研究。到目前为止，合成 DL-氨基酸可以通过物理化学、化学或酶的方法实现，其中，酶方法被认为是最方便和有效的。例如在一个已知的利用酶方法的例子中，使用 D-酰化氨基酸水解酶将 N-乙酰基-DL-氨基酸直接水解得到相应的 D-氨基酸。

已知的 D-酰化氨基酸水解酶包括属于细菌、放线菌和霉菌的微生物，例如，假单胞菌（日本专利公开（JP-B）60-31477）、链霉菌（JP-B 53-36035）、产碱杆菌（JP-B 07-83711）、Rhodococcus, Pimelobacter（日本专利请公开（JP-A）06-227789）、节核细菌、棒状杆菌、欧文氏菌、埃希氏杆菌、黄杆菌、Norcadia、精蛋白杆菌、黄（单胞）杆菌（日本专利申请公开（JP-A）11-113592）、Amycolatopsis（JP-A 11-98982）、Sebekia（JP-A 11-318442）、Hypomyces、镰刀菌、Auricularia、Pythium、Menisporosis（JP-A 12-41684）。已经有过用这些微生物得到的 D-酰化氨基酸水解酶作用在 N-酰基氨基酸上反应制备 D-氨基酸的报道。

然而，这些 D-酰化氨基酸水解酶的活性对于有效的基质浓度来说却是不够的，因而就需要有一种工业上可应用的 D-酰化氨基酸水解酶。特别的是，在水解 N-乙酰基-D-色氨酸时，这些酶的活性对于有效的基质浓度来说是不够的。因此，它们都不能被称为是满足工业需要的酶。近来，Tokuyama (JP-A 13-275688) 和 Taylor (Chirotech Technology Limited, WO 00/23598) 公开了一种作用于 N-乙酰基-D-色氨酸以制备 D-色氨酸的 D-酰化氨基酸水解酶，该 D-酰化氨基酸水解酶分别选自 *Hypomyces* 和产碱杆菌。这些 D-酰化氨基酸水解酶中的任何一种都只能使 N-乙酰基-D-色氨酸水解到 10g/L，不能认为是有效浓度下催化反应的酶。

D-氨基酸是医药的重要原料，因此需要找到一种生产成本更低的方法来生产 D-氨基酸。到目前，尚未发现一种能有效催化氨基酸的 D-酰化氨基酸水解酶。

#### 发明内容

本发明的目的是提供一种新型的在工业有效基质浓度下显示出有效高活性的 D-酰化氨基酸水解酶，使用该酶能够有效地由 N-乙酰基-DL-氨基酸得到 D-氨基酸，以及提供一种使用该酶由 N-酰基氨基酸制备 D-氨基酸的方法。本发明的另一目的是提供一种 D-酰化氨基酸水解酶的碱基序列编码，该 D-酰化氨基酸水解酶的碱基序列编码是生产 D-酰化氨基酸水解酶以及用 D-酰化氨基酸水解酶生产 D-氨基酸的有用材料；一种含有碱基序列的质粒；以及由这种质粒宿主转化而得到的转化体。

在解决问题的同时，我们还对由众多微生物得到的 D-酰化氨基酸水解酶的性能进行了评价。在研究基质浓度和反应速率的关系时，我们惊奇地发现，在一种已知的 D-酰化氨基酸水解酶中，更高的基质浓度更显著地降低了它的反应速率，即是说，抑制了酶的活性。这一现象当基质是 N-乙酰基-D-色氨酸时尤为显著。我们猜想，在普通的 D-酰化氨基酸水解酶中，这种现象可能会使得在有效的基质浓度下，由 N-乙酰基-DL-色氨酸生产 D-色氨酸的无效性。

因此，为了寻找一种新型的能够在高的 N-乙酰基-D-色氨酸基质浓度下仍显示出高活性而其活性不受抑制的 D-酰化氨基酸水解酶，我们测试

了各种不同的微生物，最后，发现了能满足上述要求的表现新型 D-酰化氨基酸水解酶活性属于甲基杆菌 (*Methylobacterium*) 和类诺卡氏菌属 (*Nocardioides*) 的微生物。通过各种纯化方法的结合使用，我们成功地测定了源自属于甲基杆菌 (*Methylobacterium*) 的微生物的 D-酰化氨基酸水解酶的氨基酸序列，得到了序列表 SEQ. ID. No. 3 中 N-端基氨基酸残基的氨基酸序列。我们还获得了具有序列表 SEQ. ID. No. 1 中序列的 DNA，并由含有此序列的 DNA 碎片质粒制得了转化体，还制得了活性态的 D-酰化氨基酸水解酶，并在有效的基质浓度下高效地由 N-乙酰基氨基酸制得了相应的 D-氨基酸。由此完成了本发明。

基于上述的新观察得到的本发明包括了以下方面：

(1) 一种能够作用于 N-酰基-D-氨基酸而催化生成相应的 D-氨基酸反应的 D-酰化氨基酸水解酶。

其中在水介质中由 N-乙酰基-D-色氨酸经催化反应生成 D-色氨酸时，N-乙酰基-D-色氨酸浓度为 50g/L 时的反应速率至少是其浓度为 5g/L 时的 40%。

(2) 根据 (1) 中所述的 D-酰化氨基酸水解酶，其中 N-乙酰基-D-色氨酸浓度为 100g/L 时的反应速率至少是其浓度为 5g/L 时的 20%。

(3) 根据 (1) 中所述的 D-酰化氨基酸水解酶是由属于甲基杆菌 (*Methylobacterium*) 或类诺卡氏菌属 (*Nocardioides*) 的微生物得到的。

(4) 根据 (3) 中所述的 D-酰化氨基酸水解酶，其中属于甲基杆菌 (*Methylobacterium*) 的微生物是甲基杆菌嗜中温菌属 (*Methylobacterium mesophilicum*)，属于类诺卡氏菌属 (*Nocardioides*) 的微生物是类诺卡氏菌属 (*Nocardioides*) *thermolilacinus*。

(5) 根据 (4) 中所述的 D-酰化氨基酸水解酶，其中属于类诺卡氏菌属 (*Nocardioides*) *thermolilacinus* 的微生物是类诺卡氏菌属 (*Nocardioides*) *thermolilacinus* ATCC 35863 菌株。

(6) 一种能够作用于 N-酰基-D-氨基酸而催化生成 D-氨基酸的反应的 D-酰化氨基酸水解酶，其包括：

(A) 序列表中 SEQ. ID. No. 2 所示的氨基酸序列，或者

(B) 在保持催化活性下，由插入、缺失或替换上述的氨基酸序列中至少一个氨基酸残基而得到的变异的氨基酸序列。

(7) 根据(6)中所述的 D-酰化氨基酸水解酶，其中在水介质中由 N-乙酰基-D-色氨酸经催化反应生成 D-色氨酸时，N-乙酰基-D-色氨酸浓度为 50g/L 时的反应速率至少是其浓度为 5g/L 时的 40%。

(8) 根据(7)中所述的 D-酰化氨基酸水解酶，其中 N-乙酰基-D-色氨酸浓度为 100g/L 时的反应速率至少是其浓度为 5g/L 时的 20%。

(9) 一种编码了能够作用于 N-酰基-D-氨基酸而催化生成 D-氨基酸的反应的 D-酰化氨基酸水解酶的碱基序列，其包括：

(a) 序列表中 SEQ. ID. No. 1 所示的碱基序列，或者

(b) 在保持由上述的碱基序列中编码的 D-酰化氨基酸水解酶的催化活性下，由插入、缺失或替换碱基序列 SEQ. ID. No. 1 中至少一个碱基而得到的变异的碱基序列。

(10) 根据(9)中所述的碱基序列，其中变异的碱基序列与 SEQ. ID. No. 1 中的碱基序列在苛刻条件下进行杂交。

(11) 根据(9)中所述的碱基序列，其中在水介质中由 N-乙酰基-D-色氨酸经催化反应生成 D-色氨酸时，N-乙酰基-D-色氨酸浓度为 50g/L 时的反应速率至少是其浓度为 5g/L 时的 40%。

(12) 根据(11)中所述的碱基序列，其中 N-乙酰基-D-色氨酸浓度为 100g/L 时的反应速率至少是其浓度为 5g/L 时的 20%。

(13) 一种含有(9)中所述碱基序列的质粒。

(14) 一种由(13)中所述质粒经转化得到的转化体。

(15) 一种制备 D-酰化氨基酸水解酶的方法，其中包括将含有碱基序列的质粒插入到(14)中所述的转化体中，并对此转化体进行培养生成编码的 D-酰化氨基酸水解酶的步骤。

(16) 一种制备具有光活性的氨基酸的方法，其中包括在水介质中用 D-酰化氨基酸水解酶作用于 N-酰基氨基酸得到相应的 D-氨基酸的步骤，其中，在水介质中用 D-酰化氨基酸水解酶催化由 N-乙酰基-D-色氨

酸生成 D-色氨酸的反应时, N-乙酰基-D-色氨酸浓度为 50g/L 时的反应速率至少是其浓度为 5g/L 时的 40%。

(17) 根据 (16) 中所述的方法, 其中 N-乙酰基-D-色氨酸浓度为 100g/L 时的反应速率至少是其浓度为 5g/L 时的 20%。

(18) 根据 (16) 中所述的方法, 其中的酰化氨基酸水解酶是由属于甲基杆菌 (*Methylobacterium*) 或类诺卡氏菌属 (*Nocardioideae*) 的微生物得到的。

(19) 根据 (18) 中所述的方法, 其中属于甲基杆菌 (*Methylobacterium*) 的微生物是甲基杆菌嗜中温菌属 (*Methylobacterium mesophilicum*), 属于类诺卡氏菌属 (*Nocardioideae*) 的微生物是类诺卡氏菌属 (*Nocardioideae*) *thermolilacinus*。

(20) 根据 (19) 中所述的方法, 其中属于类诺卡氏菌属 (*Nocardioideae*) *thermolilacinus* 的微生物是类诺卡氏菌属 (*Nocardioideae*) *thermolilacinus* ATCC 35863 菌株。

(21) 根据 (16) 中所述的方法, 其中 N-酰基氨基酸的浓度为大于等于 50g/L。

(22) 根据 (21) 中所述的方法, 其中 N-酰基氨基酸的浓度为大于等于 100g/L。

(23) 一种制备具有光活性的氨基酸的方法, 其中包括在水介质中用 D-酰化氨基酸水解酶作用于 N-酰基氨基酸得到相应的 D-氨基酸的步骤, 其中 D-酰化氨基酸水解酶为 (6) 中所述的 D-酰化氨基酸水解酶。

(24) 根据 (23) 中所述的方法, 其中在水介质中用 D-酰化氨基酸水解酶催化由 N-乙酰基-D-色氨酸生成 D-色氨酸的反应时, N-乙酰基-D-色氨酸浓度为 50g/L 时的反应速率至少是其浓度为 5g/L 时的 40%。

(25) 根据 (24) 中所述的方法, 其中 N-乙酰基-D-色氨酸浓度为 100g/L 时的反应速率至少是其浓度为 5g/L 时的 20%。

(26) 根据 (23) 中所述的方法, 其中用于和 N-酰基氨基酸反应的 D-酰化氨基酸水解酶是将 (14) 中所述的转化体培养得到的培养基或者从培养基中分离得到的转化体或者由其制得的材料。

(27) 根据 (23) 中所述的方法, 其中 N-酰基氨基酸作为基质的浓度为大于等于 50g/L。

(28) 根据 (27) 中所述的方法, 其中 N-酰基氨基酸作为基质的浓度为大于等于 100g/L。

本发明中的 D-酰化氨基酸水解酶可用于在工业有效的浓度下以更高的反应速率由 N-酰基氨基酸制备相应的 D-氨基酸。本发明还提供了在使用基因重组技术制备 D-酰化氨基酸水解酶的一种有用的碱基序列, 和一种含有此碱基序列的质粒以及通过将含有此质粒宿主转化得到的转化体。

#### 附图说明

图 1 为重组质粒 pUSDA3 的物理谱图。图中, “ori” 和 “Amp<sup>r</sup>” 分别代表了质粒的一个复制起点和一个抗氨比西林标计; “SacI”、“HincII”、“PstI” 和 “XhoI” 代表限制点; 粗箭头代表在 D-酰化氨基酸水解酶中 ORF 的位置和方向。

#### 具体实施方式

本发明中的 D-酰化氨基酸水解酶是一种能够作用于 N-酰基-D-氨基酸以催化制备相应的 D-氨基酸的反应的酶。特别的是, 即使是在较高的基质浓度下, 这种酶也只对 N-乙酰基-D-色氨酸表现出少量的抑制, 同时自身显示出较高的活性。对 N-乙酰基-D-色氨酸的抑制可以通过下面的基质浓度和反应速率的关系来定义。

I. 在水介质中, N-乙酰基-D-色氨酸浓度为 50g/L 时的反应速率至少是其浓度为 5g/L 时的 40%。

II. N-乙酰基-D-色氨酸浓度为 100g/L 时的反应速率至少是其浓度为 5g/L 时的 20%。

一种本发明中的 D-酰化氨基酸水解酶具有上述 I 中所述的性质, 优选为具有上述 I 和 II 中所述的性质。因此, 本发明可以包括由任何一种微生物得到的 D-酰化氨基酸水解酶或者由任何一种通过基因重组改变的已知的 D-酰化氨基酸水解酶, 只要它们至少表现出了上述的抑制性质 I 的 D-酰化氨基酸水解酶活性即可。

对于性质 I 来说,更优选的情况是 N-乙酰基-D-色氨酸浓度为 50g/L 时的反应速率至少是其浓度为 5g/L 时的 50%,特别是 60%。对于性质 II 来说,更优选的情况是 N-乙酰基-D-色氨酸浓度为 100g/L 时的反应速率至少是其浓度为 5g/L 时的 25%,特别是 30%。

本发明中基质浓度和反应速率的关系可以确定如下。例如,向 200  $\mu$ L 含有 10、50、100 或者 200g/L 基质(N-乙酰基-D-色氨酸)的 100mM 的磷酸盐缓冲液中加入 200  $\mu$ L 具有足够反应活性的酶溶液,将混合液在 30 $^{\circ}$ C 下反应适当的时间。反应生成的 D-色氨酸的量可以用如 HPLC 方法确定,并可用于比较得出每一个基质浓度下的酶活性(反应速率)。对于本发明中用于确定反应速率的水介质没有限制,只要它能够使酶反应得以进行即可,例如,水及缓冲液,这些缓冲液是向水中加入一种或多种适当选自磷酸、Tris、柠檬酸、乙酸、硼酸、氨基乙酸、HEPES、MOPS、MES、CAPS、CHES、PIPES 和其他的酸成分而得到。反应温度可以选自包含了最佳温度的选择范围。例如,特别优选的温度范围是使反应保持在 30-60 $^{\circ}$ C。反应的 pH 范围也应该能使 D-酰化氨基酸水解酶保持其活性,特别是当 pH 为 6-11 时,包括了最佳 pH 值。酶可以是微生物培养基自身,也可以是利用离心过滤通过分离和收集得到的微生物,或者是其提取物,由微生物制得的粗产品或纯化产品。在本发明中,以能够正确确定反应速率来选择反应速率的条件如酶的用量和反应时间;这些条件如,在确定反应速率的过程中,反应达到饱和前的时间段,优选的是当 N-乙酰基-D-色氨酸作为基质浓度为 5g/L 时,产生的 D-色氨酸的累积浓度约为 0.2g/L-1g/L 时。

本发明中的 D-酰化氨基酸水解酶的物理性质如下:

最佳 pH: pH8-10 (最优选为 pH9);

最佳温度: 60 $^{\circ}$ C;

热稳定性: 在 40 $^{\circ}$ C 下加热 20 小时后,有 80%保持活性。

本发明中的 D-酰化氨基酸水解酶具有序列表中 SEQ. ID. No. 2 的氨基酸序列,或者在保持 D-酰化氨基酸水解酶活性下,将 SEQ. ID. No. 2 的氨基酸序列进行替换、缺失、变形或插入其中的一个或两个,优选为

几个氨基酸而得到的氨基酸序列。

编码本发明中的 D-酰化氨基酸水解酶的多聚核苷酸包含序列表中 SEQ. ID. No. 1 的碱基序列。碱基序列 SEQ. ID. No. 1 编码了 SEQ. ID. No. 2 的蛋白质，尽管编码 SEQ. ID. No. 2 的氨基酸序列的碱基序列不仅仅局限于碱基序列 SEQ. ID. No. 1，但是任何碱基序列基于不同的密码子。另外，还可以通过适当引入替换、缺失、改变、插入和/或增加来提供一个多聚核苷酸的同源物。本发明中多聚核苷酸的同源物可以通过对碱基序列 SEQ. ID. No. 1 的一个或多个碱基在保持酶活性范围内进行替换、缺失或增加来制得。这种同源物的一个例子是一种具有能够在苛刻条件下和具有与 SEQ. ID. No. 1 互补序列的多聚核苷酸进行杂交的碱基序列的多聚核苷酸。

在苛刻条件下进行的杂交可根据“分子克隆”中描述的方式进行：Cold Spring Harbor Laboratory Press, 分子生物学中的通用协议 (Current Protocols in Molecular Biology) ; Wiley Interscience。一种可以由商业上可用的体系是 GeneImage 体系 (Amersham)。具体来说，杂交可以按照如下步骤进行，根据上述协议中的产物协议，将一个载有被转录的待测 DNA 或 RNA 分子的膜与一个标记探针在杂交缓冲液中进行杂交。杂交缓冲液的组成为 0.1wt% SDS、5wt% 硫酸右旋糖苷、一盒 1/20 的稀释抑制剂 (dilution blocking agent) 以及 2-7×SSC。稀释抑制剂可以例如由将 5 倍浓度的 100×Denhardt's 溶液、2% (重量/体积) 的牛血清蛋白、2% (重量/体积) 的 Ficoll™ 400 和 2% (重量/体积) 的聚乙烯吡咯烷酮稀释到 1/20 制得。20×SSC 为 3M 的氯化钠和 0.3M 的柠檬酸组成的溶液。优选使用的 SSC 为 3-6×SSC，更优选为 4-5×SSC。杂交温度为 40-80℃，更优选为 50-70℃，进一步优选为 55-65℃。在培养几小时或过夜后，用清洗缓冲液清洗膜。清洗温度优选为室温，更优选为杂交温度。清洗缓冲液的组成为 6×SSC+0.1wt%SDS 溶液，更优选为 4×SSC+0.1wt%SDS 溶液，进一步优选为 1×SSC+0.1wt%SDS 溶液，最优选为 0.1×SSC+0.1wt%SDS 溶液。当用这种清洗缓冲液清洗完膜后，就可以通过在 DNA 或 RNA 分子内被杂交的探针上的标记来识别 DNA 或 RNA 分子。

本发明中的新型 D-酰化氨基酸水解酶包括了从甲基杆菌嗜中温菌属 (*Methylobacterium mesophilicum*) MT 10894 菌株和类诺卡氏菌属 (*Nocardioides*) *thermolilacinus* ATCC 35863 菌株中得到的酶。其中, 甲基杆菌嗜中温菌属 (*Methylobacterium mesophilicum*) MT 10894 菌株是从日本的 Mobara 城, Ciba 中的土壤中分离得到的。表 1 给出了它的菌学特征。

表 1

培养温度	30°C	
细胞形态	杆状菌 (0.8×1.5 μm)	
革兰氏染色	-	
孢子	-	
游动性	+	
菌落形态	圆形 完全光滑 凸起 有光泽 浅黄	
过氧化氢酶	+	
氧化酶	+	
O/F 测试	无发酵沉淀物	
硝酸还原	-	
吲哚还原	-	
葡萄糖酸化	-	
精氨酸脱水酶	-	
尿素酶	+	
七叶甙水解	-	
明胶水解	-	
β-半乳糖苷酶	-	
麦克拉肯 (MacConkey) 琼脂上生长	-	
42°C 生长	-	
基质利用	葡萄糖	+
	L-阿拉伯糖	+
	D-甘露糖	-
	D-甘露醇	-
	N-乙酰基-D-葡(萄)糖胺	-
	麦芽糖	-
	葡(萄)糖酸钾	+
	正癸酸	-
	己二酸	-
	d1-苹果酸	+
	柠檬酸钠	-
	乙酸苯酯	-

通过将以上的菌学特征与 Bergey' s Manual of Systematic

Bacteriology Vol. 1 (1984) William & Wilkins, Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition (1994) Williams & Wilkins, G. I. Barrow and R. K. A. Feltham ed., Cowan & Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria 3<sup>rd</sup>. ed, Cambridge univ. press, (1993)等书中描述的类别相比较,从而确定出该菌株属于甲基杆菌嗜中温菌属(*Methylobacterium mesophilicum*)。菌株 MT 10984 于 2000 年 3 月 8 日在日本经济工业部下的国立生命科学和人体技术研究所 (1-1-1, Higashi, Tsukuba, Ibaragi, Japan) 保藏,保藏编号为 FERM P-17771,然后在 2002 年 1 月 21 日,根据布达佩斯条约转为国际保藏后,保藏编号变为 FERM BP-7856。

编码本发明的新型 D-酰化氨基酸水解酶的 DNA 可以通过如下步骤分离。从微生物中纯化一种基因组 DNA。用一种限制内切酶进行消化后得到的 DNA 通过超离心或电泳沿其长度分段。收集碎片 DNA,将之插入质粒以得到质粒库。从库中选出一个表达 D-酰化氨基酸水解酶的克隆,给出一个含有编码 D-酰化氨基酸水解酶基因的 DNA 的质粒。可通过分析该质粒的碱基序列确定出编码目标 D-酰化氨基酸水解酶基因的 DNA 碱基序列,并从该 DNA 碱基序列推断出编码 D-酰化氨基酸水解酶的氨基酸序列。

通过如上分离得到的编码本发明中 D-酰化氨基酸水解酶的 DNA 可被插入到一个表达质粒中,例如,当宿主为大肠杆菌时,典型的表达质粒为 pUC18、pKK223-3、pBR322、Bluescript II SK(+)和 pSC101,这样,可以得到表达 D-酰化氨基酸水解酶的质粒。对于宿主的选者不仅仅局限于大肠杆菌等,任何微生物只要满足重组载体可以稳定地和自动地生长并且一些外源 DNA 可以被表达即可作为转化宿主。

在本发明中,一种由质粒转化得到的转化体可以基于已知信息生长并产生本发明中的 D-酰化氨基酸水解酶。任何一种人工的或天然的含有适量的碳源、氮源、无机和其他营养物的介质均可使用。可使用通常的培养方法如摇瓶培养、充气旋转器培养、连续培养和流加培养在含有上述培养成分的液体介质中进行。对于培养条件的选择没有特别的限制,可以根据培养类型和方法等因素的不同而进行适当选择,只要使宿主菌

株能够产生 D-酰化氨基酸水解酶即可。

用于制备本发明的 D-氨基酸的方法中的 D-酰化氨基酸水解酶可以是上述产生 D-酰化氨基酸水解酶的细菌的培养物，也可以是通过将培养基进行离心后分离和收集得到的转化体细胞或者用其加工的细菌制品。这里使用的“加工的细菌制品”是指由转化体得到的提取物或粗产品、通过对提取物或粗产品中的 D-酰化氨基酸水解酶活性碎片进行分离和/或纯化得到的分离产品，或者通过固定转化体或提取物或者转化体的粗产品或分离产品而得到的固定产品。宿主生物体中产生的活性成分可能会对培养基介质本身、离心分离培养基介质并收集得到的转化体和/或由转化体的加工的细菌制品的目的反应的反应性或选择性造成不良的影响。在这种情况下，可以用有机溶剂或在反应前或反应中加热处理培养基介质本身、离心分离培养基介质并收集得到的转化体或者转化体的加工的细菌制品，以改善其反应性和/或选择性。有机溶剂可以适当地选用一种或多种醇类，如甲醇和乙醇；可与水混合的有机溶剂如丙酮、THF、DMF、DMI 和 DMSO；芳香有机溶剂如甲苯和苯；酯如乙酸乙酯和丁酸乙酯；烃如己烷和庚烷；卤化烃如二氯甲烷和氯仿；醚如二乙醚。有机溶剂用量范围根据 D-酰化氨基酸水解酶活性的稳定性存在范围而定。加热温度可以为 40°C-70°C，考虑到 D-酰化氨基酸水解酶的稳定性，优选为 45°C-55°C。加热的时间范围根据 D-酰化氨基酸水解酶活性的稳定性存在范围而定；30-100 分钟足够。

在用本发明中的 D-酰化氨基酸水解酶处理 N-酰基-D-氨基酸时，选择对反应性如 D-酰化氨基酸水解酶的活性和稳定性有利的条件有利于反应的进行。

反应中使用的介质可以是水或含有不同缓冲液的水介质。其中的缓冲液可以是向水中加入一种或多种适当选自磷酸、Tris、柠檬酸、乙酸、硼酸、氨基乙酸、HEPES、MOPS、MES、CAPS、CHES、PIPES 和其他的酸成分而得到。

为了进一步提高反应效率或产品产率，还可以加入各种添加剂。一些 D-酰化氨基酸水解酶对金属离子如  $Zn^{2+}$  和  $Co^{2+}$  具有活性，因此，可向反

应中加入这些二价金属离子。与此相反，如果金属离子抑制酶时，可加入螯合剂如 EDTA。

本发明中制备 D-氨基酸的原料 (N-酰基氨基酸) 包括 N-酰基-D-氨基酸，其存在形式可以是 DL-氨基酸、富集了 D-异构体或纯 D-异构体的光活性的氨基酸。

原料的浓度没有限制，通常为约 1g/L-300g/L。特别是考虑到反应性和经济性时，浓度优选为大于等于 50g/L，更优选为大于等于 100g/L 并且优选为小于等于 200g/L。反应温度优选保持在 D-酰化氨基酸水解酶可以表达其活性的温度范围内，优选为 30-60℃。反应 pH 也优选保持在 D-酰化氨基酸水解酶可以表达其活性的 pH 范围内，优选为 pH6-11。

本发明中的新型 D-酰化氨基酸水解酶可以提供由多种 N-酰基氨基酸的 D-异构体得到的相应的 D-氨基酸。因此，本发明中的 D-酰化氨基酸水解酶可以在工业上方便地用于由 N-酰基-DL-氨基酸制备旋光性氨基酸。可应用的 N-酰基-DL-氨基酸可选的化合物范围很广，没有限制。典型的优选 N-酰基-DL-氨基酸的例子包括 N-酰基-DL-甲硫氨酸、N-酰基-DL-亮氨酸、N-酰基-DL-色氨酸、N-酰基-DL-5-羟基色氨酸、N-酰基-DL-苯基丙氨酸、N-酰基-DL-苯基甘氨酸、N-酰基-DL-高苯基丙氨酸 (N-acyl-DL-homophenylalanine)、N-酰基-DL-二高苯基丙氨酸 (N-acyl-DL-bishomophenylalanine)、N-酰基-DL-对-硝基苯基丙氨酸、N-酰基-DL-对-氟苯基丙氨酸、N-酰基-DL-对-氯苯基丙氨酸、N-酰基-DL-对-溴苯基丙氨酸、N-酰基-DL-对-甲氧基苯基丙氨酸、N-酰基-DL-酪氨酸、N-酰基-DL-对-脞基苯基丙氨酸、N-酰基-DL-2-吡啶基丙氨酸、N-酰基-DL-3-吡啶基丙氨酸、N-酰基-DL-4-吡啶基丙氨酸、N-酰基-DL-邻-苄基丝氨酸、N-酰基-DL-S-苯基半胱氨酸、N-酰基-DL-1-萘基丙氨酸和 N-酰基-DL-2-萘基丙氨酸。更优选的 N-酰基-DL-氨基酸是 N-乙酰基-DL-氨基酸。特别是对于 N-乙酰基-D-苯基丙氨酸或 N-乙酰基-D-色氨酸来说，基质专一性特别高。

### 实施例

下面将用实施例对本发明作更为详细的描述，但并非对发明内容进

行限制。

通过高效液相色谱分析反应中产生的D-氨基酸和剩余的N-酰基氨基酸来评价反应性和光学纯度。(色谱柱: CROWNPAK CR(-); Daicel Chemical Industries, Ltd.; 柱温: 40°C; 流动相: HClO<sub>4</sub>水溶液, pH1.5和0-15%甲醇(V/V); 流速: 0.8mL/min; 检测波长: 210nm)

实施例 1: 甲基杆菌嗜中温菌属 (*Methylobacterium mesophilicum*) MT 10894 (FERM BP-7856) 的培养

在具有下述组成的液体介质中, 在肉汤琼脂皿中培养细菌, 介质在30°C下振荡培养40小时制备表现D-酰化氨基酸水解酶活性的细菌。

培养介质组成

N-乙酰基-DL-亮氨酸: 5g/L

葡萄糖: 10 g/L

胨: 10 g/L

磷酸二氢钾: 1 g/L

一代磷酸氢钾 (potassium hydrogenphosphate monobasic): 1 g/L

七水合硫酸镁: 0.1 g/L

酵母提取物: 0.5g/L

pH 7.0 (用 KOH 标定)

实施例 2: 类诺卡氏菌属 (*Nocardioides*) *thermolilacinus* (ATCC 35863) 的培养

在具有下述组成的液体介质中, 在肉汤琼脂皿中培养细菌, 介质在30°C下振荡培养100小时制备表现D-酰化氨基酸水解酶活性的细菌。

培养介质组成

N-乙酰基-DL-亮氨酸: 5g/L

改进的察氏-Dox 液体介质 (Oxoid): 5g/L

酵母提取物: 2g/L

维他命测试酪蛋白氨基酸 (vitamin assay casamino acid): 10g/L

pH 7.2 (用 KOH 标定)

实施例 3: 由甲基杆菌嗜中温菌属 (*Methylobacterium*

mesophilicum) MT 10894 (FERM BP-7856) 和类诺卡氏菌属 (Nocardioides) thermolilacinus (ATCC 35863) 得到的 D-酰化氨基酸水解酶的基质浓度与反应速率的关系

#### 粗酶溶液

用实施例 1 和 2 中得到的甲基杆菌嗜中温菌属 (Methylobacterium mesophilicum) MT 10894 (FERM BP-7856) 和类诺卡氏菌属 (Nocardioides) thermolilacinus (ATCC 35863) 制备细菌细胞悬浮液 (0.1g/0.1M 的磷酸缓冲溶液 (pH 7.8) 1 mL)。用超声均质器将每一悬浮液进行均质, 再用冷冻离心分离机使细胞碎片沉淀。收集上清液即为粗酶溶液。

#### 基质溶液

将 N-乙酰基-D-色氨酸溶于 0.1M 的磷酸盐缓冲液中 (pH7.8), 配成浓度为 200g/L 的基质溶液。

#### 测定

用 0.1M 的磷酸盐缓冲液 (pH7.8) 稀释基质溶液, 制备 200  $\mu$ L 的 5, 25, 50 和 100g/L 的基质溶液。向其中加入 200  $\mu$ L 的粗酶溶液后, 混合物在 30 $^{\circ}$ C 下反应 1 小时。然后, 加入 0.4mL 1M 的磷酸盐缓冲液结束反应。再加入 0.4mL 1N

的氢氧化钠溶解沉淀的未反应的乙酰基化合物。离心除去细菌碎片后, 用 HPLC 确定反应液中生成的 D-色氨酸。表 2 中假设基质浓度为 5g/L 时反应速率为 100 时, 给出了用不同菌株得到的 D-酰化氨基酸水解酶作用于浓度分别为 25、50 和 100g/L 的基质时, D-色氨酸的相对生成速率。

表 2

N-乙酰基-D-色氨酸浓度 (g/L)	甲基杆菌嗜中温菌属 (Methylobacterium mesophilicum) (FERM BP-17771)	类诺卡氏菌属 (Nocardioides) thermolilacinus (ATCC 35863)
5	100	100
25	122	110
50	91	108
100	42	103

### 对比例 1: 在已知菌株中基质浓度与反应速率的关系

我们研究过已知的带有 D-酰化氨基酸水解酶的细菌株产碱杆菌属 *denitrificans* subsp. *xylosodans* MI4 (FERM P-9413) 和链霉菌 *tuirus* (IFO 13418) 中基质浓度与反应速率之间的关系。这些菌株的制备方法将在下面介绍。如例 1 所述的方法制备 *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosodans* MI4 (FERM P-9413)。将链霉菌 *tuirus* (IFO 13418) 在含有下列组分的液体介质中于 30°C 下培养 48 小时以制得链霉菌 *tuirus* (IFO 13418)。

#### 培养基介质组成

D-缬氨酸: 4g/L

葡萄糖: 10g/L

胨: 10g/L

磷酸二氢钾: 1 g/L

一代磷酸氢钾 (potassium hydrogenphosphate monobasic): 1 g/L

七水合硫酸镁: 0.5 g/L

酵母提取物: 10g/L

氯化钴: 1mg/mL

pH 7.0 (用 KOH 标定)

粗酶溶液和基质溶液的制备以及酶活性的测定如实施例 3 所述进行。表 3 中假设基质浓度为 5g/L 时反应速率为 100 时, 给出了用不同菌株得到的 D-酰化氨基酸水解酶作用于浓度分别为 25、50 和 100g/L 的基质时, D-色氨酸的相对生成速率。

表 3

N-乙酰基-D-色氨酸浓度 (g/L)	产碱杆菌属 <i>denitrificans</i> subsp. <i>xylosodans</i> MI4 (FERM P-9413)	链霉菌 <i>tuirus</i> (IFO 13418)
5	100	100
25	36	45
50	13	22
100	4	6

实施例 4：由甲基杆菌嗜中温菌属 (*Methylobacterium mesophilicum*) MT 10894 (FERM P-17771) 得到的 D-酰化氨基酸水解酶的 N-端基氨基酸序列

如实施例 1 所述培养并收集甲基杆菌嗜中温菌属 (*Methylobacterium mesophilicum*)。将细菌细胞悬浮于 0.1M 的含 1mM DTT (dithiothreitol) 的磷酸盐缓冲液中 (pH 7.8)。悬浮的细菌细胞通过超声均质机进行匀质。再用冷冻离心分离机将细胞碎片除去，得到粗酶溶液。向粗酶溶液中加入硫酸铵。然后，将 30-60% 的沉淀组分进行脱盐，并通过一个 DEAE Toypearl 柱收集流过的组分。再将收集的组分经过采用苯基 Toypearl 和 Q-琼脂糖凝胶的色谱进行分离，得到表现 D-酰化氨基酸水解酶活性的组分。组分再经过十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，在 56kDa 处观察到谱带。对 56kDa 处的蛋白质的 N-端基氨基酸进行排序，结果确认为如 SEQ. ID. No. 3. 中的 Thr-Asp-Ser-Thr-Arg-。

实施例 5：甲基杆菌嗜中温菌属 (*Methylobacterium mesophilicum*) MT 10894 (FERM P-17771) 的基因组 DNA 库的制备

如实施例 1 所述将甲基杆菌嗜中温菌属 (*Methylobacterium mesophilicum*) 培养 2 天。然后对细菌细胞离心收集并用磷酸盐缓冲液 (pH 7.8) 洗。再按照 “Kiso Seikagaku Jikken Hou 2, Extraction, Separation and Purification, Koichi Anami et al., Maruzen Publication” 中所述的 DNA 分离方法从细菌细胞中制备基因组 DNA。得到的基因组 DNA 用限制性内切酶 Sac I 进行完全消化，并用超离心沿 DNA 长度分段，收集 3kb 或更长的 DNA。用 5' -端基已被限制性内切酶 Sac I 消化后已经被脱去磷酸的载体 pUC18 对 DNA 进行绑扎，以制备质粒库。用质粒库对大肠杆菌 DH5  $\alpha$  进行转化。将转化体放入含有 50  $\mu$ g/mL 氨比西林的 LB (Luria-Bertani) 琼脂糖介质中静置培养以生成菌落。

实施例 6：从质粒库中对 D-酰化氨基酸水解酶进行活性筛选

在实施例 5 中形成的每一个菌落到在 LB 介质 (1% bactor 胰岛素, 0.5% bacto 酵母提取物, 1%氯化钠, pH 7.0) 中于 37°C 下进行液相摇瓶培养过夜。转化体经离心沉淀，再用 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.8)

洗一次。离心收集细菌细胞。对得到的细菌细胞进行均质得到粗酶溶液。选择表现 D-酰化氨基酸水解酶活性的转化体，通过它作用于基质 N-乙酰基-D-色氨酸产生 D-色氨酸。测定步骤如下所述。

#### 粗酶溶液

将得到的细菌细胞悬浮于 0.1M 的磷酸缓冲溶液(pH 7.8) 中，配成浓度为 0.1mg/mL 的悬浮液。用超声均质器将细菌细胞进行均质，再用冷冻离心分离机使细胞碎片沉淀。收集上清液即为粗酶溶液。

#### 基质溶液

将 N-乙酰基-D-色氨酸溶于 0.1M 的磷酸盐缓冲液中 (pH7.8)，配成浓度为 10g/L 的基质溶液。

#### 测定

向 200  $\mu$  L 的基质溶液中加入 200  $\mu$  L 的粗酶溶液，混合物在 30 $^{\circ}$ C 下反应 1 小时。然后，加入 0.4mL1M 的磷酸盐缓冲液结束反应。离心除去碎片后，用 HPLC 确定反应液中生成的 D-色氨酸。

#### 实施例 7：编码 D-酰化氨基酸水解酶的 DNA 序列的测定

从实施例 6 中得到的表现 D-酰化氨基酸水解酶活性的转化体中提取质粒。其物理谱图表示在图 1 中。其进一步排序，利用 BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (PE Applied Biosystem)，通过基因分析仪 310 (PE 应用生物系统) (PE Applied Biosystem) 对它进行测序。结果得到编码 D-酰化氨基酸水解酶基因的 DNA 的碱基序列 (SEQ. ID. No. 1)。SEQ. ID. No. 2 为 D-酰化氨基酸水解酶碱基序列的氨基酸翻译后的序列。它的 N-端基氨基酸序列与实施例 2 中的 N-端基氨基酸的测序结果是一致的。由氨基酸序列估计的 D-酰化氨基酸水解酶的分子量约为 53kDa。

实施例 8：含有由甲基杆菌嗜中温菌属 (*Methylobacterium mesophilicum*) MT 10894 (FERM P-17771) 得到的 D-酰化氨基酸水解酶基因的 DNA 的大肠杆菌转化体作用于基质 N-乙酰基-DL-色氨酸时反应的评价

实施例 7 中由图 1 中所示的质粒得到的大肠杆菌在含氨比西林 (50  $\mu$  g/mL) 的 LB 介质中于 37 $^{\circ}$ C 下进行摇瓶培养过夜。然后，离心收集细菌

表 5

基质	相对活性 (%)	光学纯度 (%ee) / D-色氨酸产率 (%) *
N-乙酰基-DL-色氨酸	100	100%ee/50%
N-乙酰基-DL-5-羟基色氨酸	80	99%ee/48%
N-乙酰基-DL-苯基丙氨酸	104	99%ee/50%
N-乙酰基-DL-高苯基丙氨酸	45	100%ee/48%
N-乙酰基-DL-4-氟-苯基丙氨酸	99	98%ee/50%
N-乙酰基-DL-4-氯-苯基丙氨酸	89	98%ee/49%
N-乙酰基-DL-酪氨酸	67	100%ee/48%
N-乙酰基-DL-邻-苄基丝氨酸	30	100%ee/48%

\* (产生的 D-氨基酸 [mM]) ÷ (产生的 D-氨基酸 [mM] + 产生的 L-氨基酸 [mM] + 剩余的 N-乙酰基-DL-氨基酸 [mM])

#### 工业应用

本发明提供了一种新型的由如甲基杆菌嗜中温菌属 (*Methylobacterium mesophilicum*) MT 10894 (FERM BP-7856) 得到的 D-酰化氨基酸水解酶和编码它的 DNA。本发明的 D-酰化氨基酸水解酶是一种工业上有用的酶, 它可以使由 N-酰基氨基酸生成相应的 D-氨基酸的反应以更高的效率进行。

细胞并用 0.1M 的磷酸缓冲溶液 (pH 7.8) 洗。再将细菌细胞悬浮于 0.1M 的磷酸缓冲溶液 (pH 7.8) 中。

#### N-乙酰基-DL-色氨酸溶液的制备

将 N-乙酰基-DL-色氨酸溶解于 0.1M 的磷酸盐缓冲溶液 (pH 7.8)，配成浓度为 200g/L 的基质溶液。

#### 测定

将上述的于 40℃ 下预热的细菌细胞悬浮液 (2.5mL) 和基质溶液 (2.5mL) 混合并在 40℃ 下反应 (反应基质浓度为 100g/L)。反应 20 小时后，从反应液中取 100 μL，并加入相同量的 1N 的 NaOH 结束反应。然后用 HPLC 流动相将取出样品稀释到 1/200，并离心沉淀细菌细胞。上清液用 HPLC 分析以测定由基质 N-乙酰基-DL-色氨酸产生的 D-和 L-色氨酸的浓度。结果见表 4。

表 4

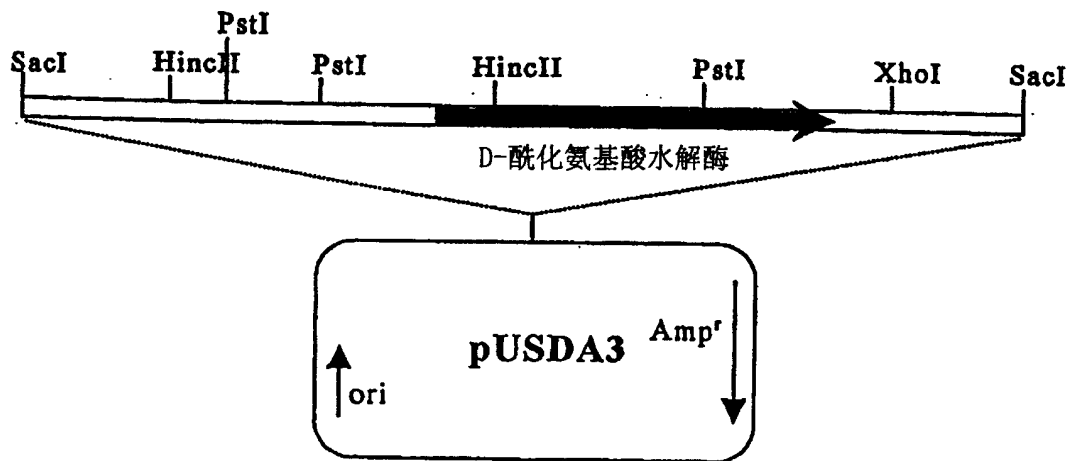
产生的 D-色氨酸 [mM]	184
产生的 L-色氨酸 [mM]	0.0
剩余的 N-乙酰基-DL-色氨酸 [mM]	218
D-色氨酸的产率 [%]	45.8*
D-色氨酸的光学纯度 [%e. e.]	100

\* (产生的 D-色氨酸 [mM]) ÷ (产生的 D-色氨酸 [mM] + 产生的 L-色氨酸 [mM] + 剩余的 N-乙酰基-DL-色氨酸 [mM])

实施例 9：含有由甲基杆菌嗜中温菌属 (*Methylobacterium mesophilicum*) MT 10894 (FERM BP-7856) 得到的 D-酰化氨基酸水解酶基因的 DNA 的大肠杆菌转化体对基质的专一性

对实施例 7 中用图 1 所示质粒转化的大肠杆菌对 N-乙酰基-DL-氨基酸的基质专一性进行了比较。此例中，在基质 N-乙酰基-DL-氨基酸的浓度为 5g/L 时，在 40℃ 下反应 16 小时。假设基质为 N-乙酰基-DL-色氨酸时 D-酰化氨基酸水解酶的活性为 100 时，同时测定多种 N-乙酰基-DL-氨基酸的的相对活性与产物光学纯度以及反应产率。结果见表 5。

图 1



## 序列表

<110> Mitsui Chemicals Inc.

<120> 编码新型 D-酰化氨基酸水解酶的 DNA 及其制备方法

<130> MTC02P014

<160> 3

<210> 1

<211> 1464

<212> DNA

<213> 甲基杆菌嗜中温菌属

<400> 1

```

atgaccgaca gcaccgtaa gcacgacctg atcatccgcg gcggcaccgt catcgacggc 60
cgccggacgc cccgcttccg cgccgatgtg gcggtgcgcg acggccgact gagcgccatc 120
ggcgatctgg cggaccatcg ggccgccag gagatcgatg ccacgggacg catcgtggcg 180
ccgggcttca tcgactcgca cacgcacgat gaccaggcgg tgctgtcgca gccgcagatc 240
ccgttcaagg tgtcgcaggg cgtcacgacg gtgatcgccg gcaatlgcgg catcagcgcg 300
gcgccgctgc ggccggacat ggacctgcc atgccctca acctgatcga cgtgcccgcc 360
gaggagcgct tcaccgcct cgccgactac ctggatgcgc tgcgtgcccg cccctcgtcg 420
gtcaacgtgg ccgcatggt cgccacicc acctgcgcg ccgtcaccat gccggcgctg 480
gaccgcgagg ccaacagcga ggaaatcgca cgcatgcgcg cgctgggtgca ggaggcgatg 540
gacgcgggcg ccatcggcgt ctccaccggc accttctatc cacccgcggt gaaggccacc 600
acggaggaga tcatcgaagt ctgccggccc ctactgccc cggggggcct gtacgtcacc 660
cacatgcggg acgagtccga ccaggigatg acctcgttgg aagagacctt ccgcatcggc 720
cgcgcgctgg acgtgccggt ggtcgtctcc caccacaaag tgcagaacac gcccaacttc 780
ggcaagtgc aggtcacgct gcccttcaic cgcaagcca tgcacgcca gcgcagtgtg 840
cctcgactgc tctccctaca cggcgggctc gaccatgatc cgcgcggacc ggggcatgct 900
cgaaggccgc gtgctgatcg ccgagacct gcccatccg gaatgcgcag gccgcgacct 960
ggacgacatc gcccgcgact gggcgctgac cgggtggagg ccgccgccg gctgcagccc 1020
ggcagcgcca tctacttcc gatggacgag ggcgatgtgc agcgcatect gcccttcgac 1080
gacacgatga tcggctcgga cggcatccc gtcggcagca agccgatcc gcggctctgg 1140
ggcaccttcc cgcgcgtgct gggcattac agccgcgacg tcggcctgtt ccccttgag 1200
accgccgtct ggaagatgac cggactcacg gcccgcaact tcggcctgca cggccggggc 1260

```

acgctggagg cggccaggc cgccgacatc gggctctcg atgccggcac cgtgcgac 1320  
 gcggccgact atgccgagcc cacgcgtccc gcggaaggca tcgatgcggt gatcgtcaat 1380  
 ggcgccatca cctggcaagg cggccagcac acggggcgac gccagggtca ggtcatecgc 1440  
 cgccaggcgg ccccatecca ctga 1464

<210> 2

<211> 487

<212> PRT

<213> 甲基杆菌嗜中温菌属

<400> 2

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

	180		185		190										
Tyr	Pro	Pro	Ala	Val	Lys	Ala	Thr	Thr	Glu	Glu	Ile	Ile	Glu	Val	Cys
	195		200		205										
Arg	Pro	Leu	Thr	Ala	Ala	Gly	Gly	Leu	Tyr	Val	Thr	His	Met	Arg	Asp
	210		215		220										
Glu	Ser	Asp	Gln	Val	Met	Thr	Ser	Leu	Glu	Glu	Thr	Phe	Arg	Ile	Gly
225			230		235										240
Arg	Ala	Leu	Asp	Val	Pro	Val	Val	Val	Ser	His	His	Lys	Val	Gln	Asn
			245		250										255
Thr	Pro	Asn	Phe	Gly	Lys	Ser	Gln	Val	Thr	Leu	Pro	Phe	Ile	Arg	Glu
	260		265		270										
Ala	Met	Gln	Arg	Gln	Arg	Ser	Val	Pro	Arg	Leu	Leu	Ser	Leu	His	Gly
	275		280		285										
Gly	Leu	Asp	His	Asp	Pro	Arg	Gly	Pro	Gly	His	Ala	Arg	Arg	Pro	Arg
	290		295		300										
Ala	Asp	Arg	Arg	Glu	Pro	Ala	Ala	Ser	Gly	Met	Arg	Arg	Pro	Arg	Pro
305			310		315										320
Gly	Arg	His	Arg	Pro	Arg	Leu	Gly	Arg	Asp	Arg	Val	Glu	Ala	Ala	Arg
			325		330										335
Arg	Leu	Gln	Pro	Gly	Ser	Ala	Ile	Tyr	Phe	Leu	Met	Asp	Glu	Gly	Asp
	340		345		350										
Val	Gln	Arg	Ile	Leu	Ala	Phe	Asp	Asp	Thr	Met	Ile	Gly	Ser	Asp	Gly
	355		360		365										
Ile	Pro	Val	Gly	Ser	Lys	Pro	His	Pro	Arg	Leu	Trp	Gly	Thr	Phe	Pro
	370		375		380										
Arg	Val	Leu	Gly	His	Tyr	Ser	Arg	Asp	Val	Gly	Leu	Phe	Pro	Leu	Glu
385			390		395										400
Thr	Ala	Val	Trp	Lys	Met	Thr	Gly	Leu	Thr	Ala	Arg	Asn	Phe	Gly	Leu
			405		410										415
His	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Glu	Ala	Gly	Gln	Ala	Ala	Asp	Ile	Val	Val
	420		425		430										
Phe	Asp	Ala	Gly	Thr	Val	Arg	Asp	Ala	Ala	Asp	Tyr	Ala	Glu	Pro	Thr

