

【11】證書號數：I250989

【45】公告日：中華民國95(2006)年3月11日

【51】Int. Cl.⁷： C07K14/195, C12N15/31

發明 全 5 頁

【54】名稱：熱穩定之N-胺甲醯基-D-胺基酸醯胺水解酶

THERMOSTABLE N-CARBAMOYL-D-AMINO ACID AMIDOHYDROLASE

【21】申請案號：093104776

【22】申請日：中華民國93(2004)年2月25日

【11】公開編號：200528469

【43】公開日：中華民國94(2005)年9月1日

【72】發明人：王雯靜 WANG, WEN CHING；游季禹 YOU, JI U

【71】申請人：國立清華大學 NATIONAL TSING HUA UNIVERSITY
新竹市光復路2段101號

【74】代理人：陳長文

1

2

[57]申請專利範圍：

1. 一種野生型N-胺甲醯基-D-胺基酸醯胺水解酶之突變株，其包含對應於SEQ ID NO：2胺基酸序列中，一或兩個選自Val⁴⁴及Ala³⁰²所組成之群之殘基經Cys取代之胺基酸序列，其中該突變株相較於該野生型N-胺甲醯基-D-胺基酸醯胺水解酶，其熱穩定性增加。
2. 根據申請專利範圍第1項之突變株，其中該野生型N-胺甲醯基-D-胺基酸

醯胺水解酶係為放射土壤桿菌之N-胺甲醯基-D-胺基酸醯胺水解酶或其功能同等物。

3. 根據申請專利範圍第2項之突變株，其中該放射土壤桿菌係為放射土壤桿菌CCRC14924株或放射土壤桿菌KNK712株。
4. 根據申請專利範圍第2項之突變株，其中該功能同等物具有SEQ ID NO：2之胺基酸序列。
- 10.

5. 根據申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之突變株，其中該取代係將 Val⁴⁴ 殘基以 Cys 取代。
6. 根據申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之突變株，其中該取代係將 Ala³⁰² 殘基以 Cys 取代。
7. 根據申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之突變株，其中該取代係將 Val⁴⁴ 及 Ala³⁰² 殘基以 Cys 取代。
8. 一種編碼申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之突變株之 DNA 分子。
9. 一種重組載體，其包含申請專利範圍第 8 項之 DNA 分子。
10. 一種宿主細胞，其係經由申請專利範圍第 9 項之重組載體所轉形。
11. 根據申請專利範圍第 10 項之宿主細胞，其係為原核細胞或真核細胞。
12. 根據申請專利範圍第 11 項之宿主細胞，其中該原核細胞係為大腸桿菌。
13. 一種製備製備熱穩定 N- 胺甲醯基 -D- 胺基酸醯胺水解酶之方法，其包含培養根據申請專利範圍第 10 至 12 項中任一項之宿主細胞，以表現熱穩定 N- 胺甲醯基 -D- 胺基酸醯胺水解酶。
14. 根據申請專利範圍第 13 項之方法，其中該宿主細胞係為原核細胞或真核細胞。

15. 根據申請專利範圍第 14 項之方法，其中該原核細胞係為大腸桿菌。
16. 根據申請專利範圍第 13 項之方法，其進一步包含純化該熱 N- 胺甲醯基 -D- 胺基酸醯胺水解酶之步驟。
5. 17. 一種製備 D-p- 羥苯基甘胺酸(D-p-HGP)之方法，其包含將 N- 胺甲醯基 -D-p- 羥苯基甘胺酸(Nca-HPG)與申請專利範圍第 1 至 4 項中任一項之突變株接觸。
10. 18. 一種製備 D-p- 羥苯基甘胺酸(D-p-HGP)之方法，其包含將 N- 胺甲醯基 -D-p- 羥苯基甘胺酸(Nca-HPG)與根據申請專利範圍第 10 至 12 項中任一項之宿主細胞接觸。
15. 圖式簡單說明：
圖 1 顯示酵素熱穩定半生期(Tm)之測定結果。
圖 2 顯示野生型與對照組 H58Y 相對活性測試比較之結果。
20. 圖 3 顯示野生型與突變株 V44C、A302C 及 V44C/A302C 相對活性測試比較之結果。
圖 4 顯示野生型與對照組 H58Y 酵素活性存活測試比較之結果。
25. 圖 5 顯示野生型與突變株 V44C、A302C 及 V44C/A302C 酵素活性存活測試比較之結果。

(3)

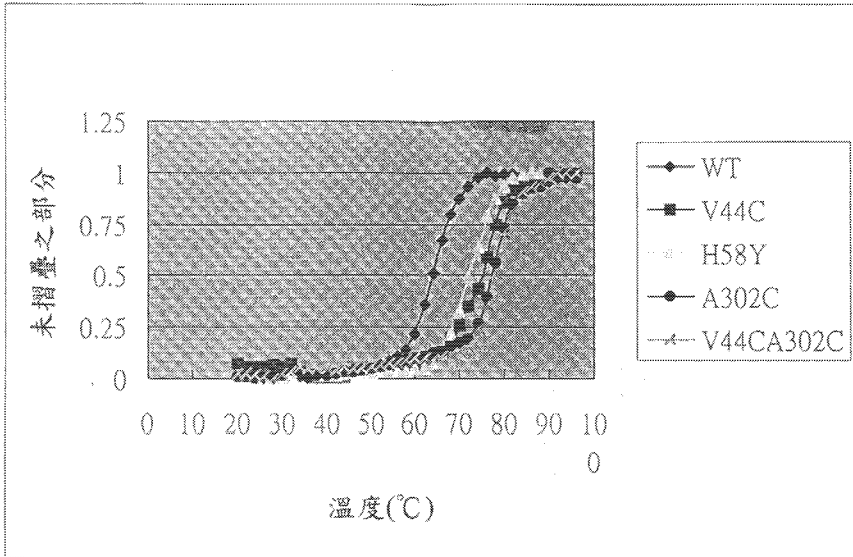


圖 1

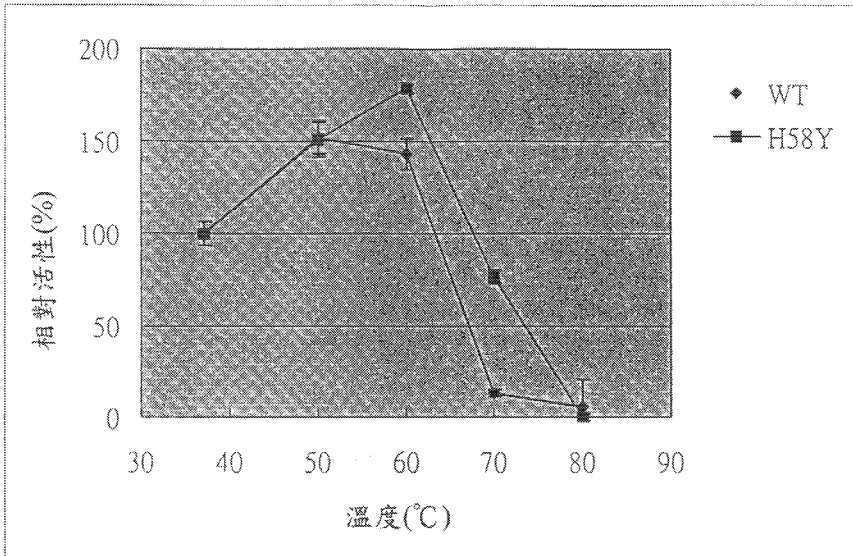


圖 2

(4)

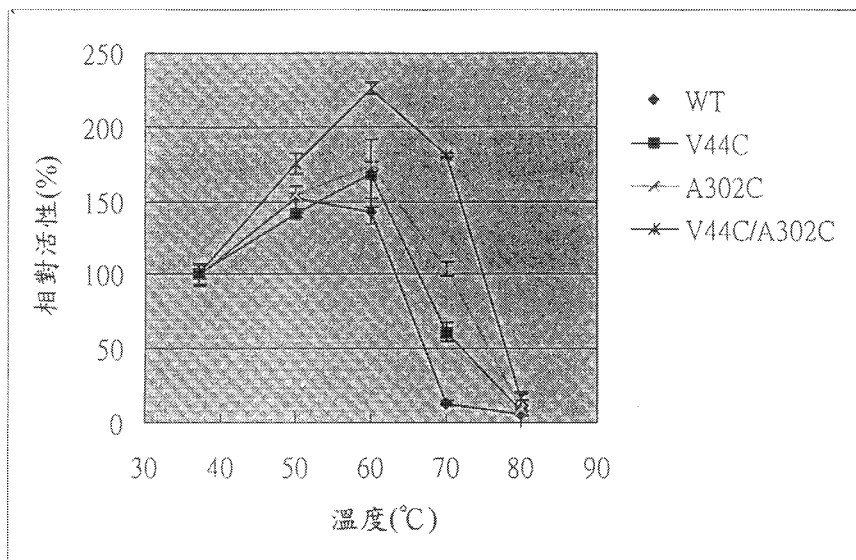


圖 3

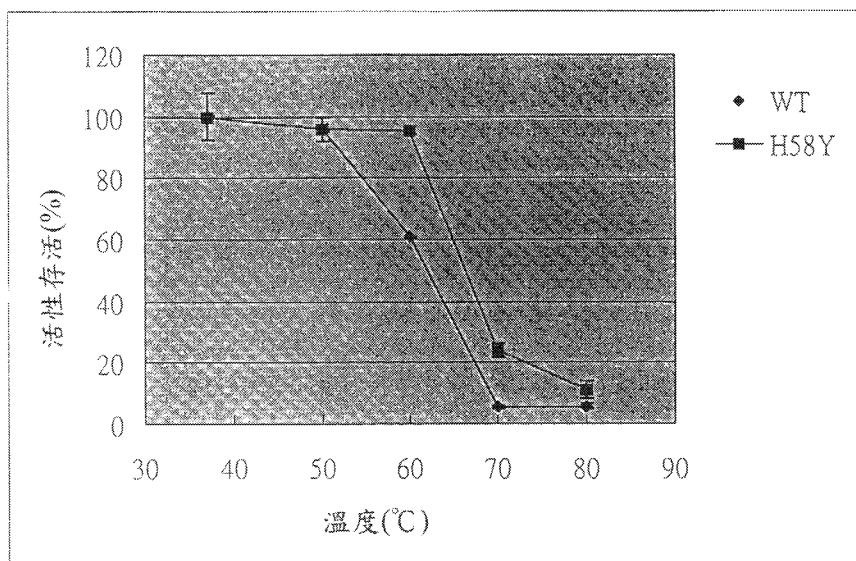


圖 4

(5)

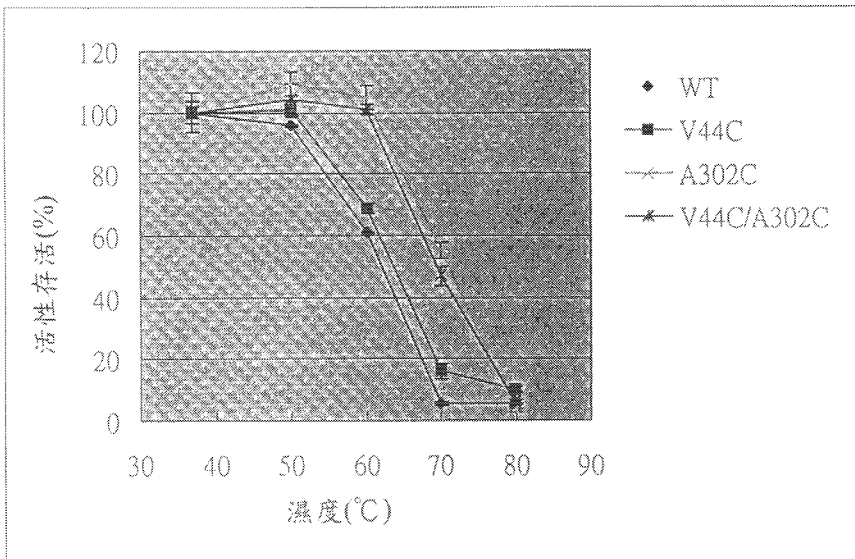


圖 5

