

# 行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

計劃編號：NSC89-2311-B-040-008

執行期限：89年8月1日~90年7月31日

主持人：簡宏堅 副教授 執行機關：中山醫學大學微生物及免疫學科

## 一、中文摘要

N-Carbamoyl-amino acid amidohydrolase 基因已從 *Bacillus kaustophilus* 中被選殖出來，並在 *Escherichia coli* 菌體中表現，之後純化 N-carbamoylase 酵素，探討其酵素特性，發現  $Mn^{2+}$ 、 $Co^{2+}$  或  $Ni^{2+}$  離子存在時提高酵素活性到 6 倍，而  $Cu^{2+}$  離子則不會抑制酵素活性。此 Nca 對  $H_2O_2$  的氧化作用有很差的抗性，且不受  $NH_4^+$  的回饋抑制。酵素的最適反應 pH 及溫度分別為 7.4 及 70。在酵素中添加 D 型或 L 型基質，於 50 中保溫 36 天，完全沒失去活性。*B. kaustophilus* 的 N-carbamoylase 能將 N-Carbamoyl-L-amino acids 轉換成對應的胺基酸至於基質如 N-Carbamoyl-D 型衍生物沒有活性。

關鍵詞：N-Carbamoyl-D-amino acid amidohydrolase 基因選殖，基因表現。

## Abstract

N-Carbamoyl-amino acid amidohydrolase gene from *Bacillus kaustophilus* was cloned and expressed in *Escherichia coli*. N-Carbamoylase was purified by immobilized metal affinity chromatography. The enzyme activity was elevated by  $Mn^{2+}$ ,

$Co^{2+}$  or  $Ni^{2+}$  ions to 6 folds but not inhibited by  $Cu^{2+}$  ion. The enzyme was sensitive to  $H_2O_2$  oxidation but resistant to  $NH_4^+$  inhibition. The optimal pH and temperature for the catalytic activity were 7.4 and 70, respectively. After incubation at 50 for 36 days no enzyme activity was lost in a reaction mixture containing D formed or L specific substrates. *B. kaustophilus* N-carbamoylase is capable of converting N-Carbamoyl-L-amino acids to corresponding amino acids, rest of substrates such as N-Carbamoyl-D-derivatives were not hydrolyzed.

Keywords: N-Carbamoyl-D-amino acid amidohydrolase, gene cloning, gene expression.

## 二、計畫緣由與目的

D 型胺基酸是由 5-substituted hydantoins 經 D 型 hydantoinase (EC3.5.2.2) 水解而成 N-carbamoyl-D-amino acid 再一次水解而成 (1,2,3)，它是用來合成抗生素，黴菌賀爾蒙、農藥甜味料的原料。在工業上將

N-carbamoyl-D-amino acid 降解成 D 型胺基酸的方法稱 diazotation, 但它對 D 型胺基酸產量低而使用大量化學溶劑對環境造成非常大的衝擊 (4), 取而代之的是酵素 N-carbamoyl-D-amino acid amidohydrolase (Nca) 水解流程, 它可解決上述的問題。

在探討 Nca 生產菌時, 研究團體發現 *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Blastobacter*, *Comamonas*, *Flavobacterium* 和 *Pseudomonas* 對 Nca 的生產能力較強 (5,6,7,8,9)。其中 *Pseudomonas* spp. 和 *Agrobacterium radiobacter* 以及 *Bacillus circulans* 的 *nca* 基因均已被選殖及定序 (10,11), 我們曾經將 *A. radiobacter* DH101 的 *nca* 基因選殖入 *E. coli* 中表現, 發現 Nca 是 homodimer, 單體分子量為 36 kDa, 此 Nca 酵素在 50 °C 中 5h 後其活性盡失, 探討此 Nca 酵素對氧的穩定度, 發現在 10 μM 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下其活性完消失。它的胺基酸殘基 M220, M239 和 M244 可能是容易被氧化的位置, 而 H129, D209, D267 和 D277 可能與酵素的催化作用有關。我們也曾經將 *B. circulans* 的 *nca* 基因選殖入 *E. coli* 中表現, 發現 Mn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup> 或 Ni<sup>2+</sup> 離子存在時此 Nca 活性並不會提高, 而 Cu<sup>2+</sup> 離子則會抑制酵素活性。此 Nca 對 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的氧化作用有很差的抗性, 且不受 NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 的回饋抑制。酵素的最適反應 pH 及溫度分別為 7.0 及 60 °C。在酵素中添加 500 μM Mn<sup>2+</sup> 離子, 於 50 °C 中保溫 20 分鐘, 即失去活性。*B. circulans* 的 Nca 能將 N-Carbamoyl-L-alanine 轉換成 alanine 至於基質如

N-Carbamoyl-D-hydroxyphenyl glycine 沒有活性。

截至目前為止, 僅有 *A. radiobacter* 和 *Pseudomonas* sp. 以及 *B. circulans* 的 *nca* 基因被選殖及定序, 然而三者的 Nca 不耐熱, 不適合工業上的使用, 而且從 *A. radiobacter* DH101 來的 Nca 其 DNA sequence 及 amino acid sequence 與文獻上報導的, 幾乎完全相同, 使用時可能會抵觸國外專利, 況且也不耐熱。所以, 本研究希望由嗜熱菌中選殖新的 N-Carbamoyl-D-amino acid amidohydrolase 基因, 隨後利用表現載體進行 *nca* 基因表現, 回收純化酵素研究其生化特性, 並探討酵素的最佳催化條件。

### 三、結果與討論

純化 *Bacillus kaustophilus* N-carbamoylase, 探討其酵素性質, 發現在 Mn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup> 或 Ni<sup>2+</sup> 離子存在時提高酵素活性到 6 倍, 而 Cu<sup>2+</sup> 離子不會抑制酵素活性。*B. kaustophilus* N-carbamoylase 的活性受到 EDTA (hydrophilic chelator) 及 2,6-dipicolinic acid (hydrophobic chelator) 分別抑制。透稀去除離子螯合劑後, 加入 Mn<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup> 或 Ni<sup>2+</sup> 離子可分別完全挽回酵素活性。

酵素的反應 pH 介於 5-10 之間, 且最適反應 pH 為 7.4, 與其他的 D-N-carbamoylase 相似。由於目前已知的 D-N-carbamoylase 其最適反應 pH 為 7.0~8.0 之間, 所以, 我們推測可能酵素在 pH 7.4 的環境下會使參與酵素活性的胺基酸殘基解離, 產生共軛酸鹼, 進行一般酸鹼催化。

### *B. kaustophilus*

N-carbamoylase 酵素的反應溫度介於 30-90 之間，且最適反應溫度為 70。將 N-carbamoylase 置於 50 中保存，發現其酵素在 D 型或 L 型基質存在下保溫 36 天，其酵素活性並無減低。此研究結果，顯示由嗜高溫菌中純化的 N-carbamoylase 穩定性高於來自常溫菌的 D-N-carbamoylase，但其熱穩定性的機制，目前仍是未知。

N-carbamoylase 以 0.5  $\mu\text{M}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$  處理 15 分鐘後，酵素即失去活性，但在無  $\text{H}_2\text{O}_2$  下，酵素活性維持穩定，而以 0.8M 的  $\text{NH}_4\text{Cl}$  處理 10 分鐘後酵素仍保有 90% 的活性，此結果顯示 N-carbamoylase 受  $\text{H}_2\text{O}_2$  的氧化抑制，但不受  $\text{NH}_4^+$  的回饋抑制而降低活性。

研究 N-carbamoylase 對各種基質的催化能力，發現 N-carbamoylase 對於 N-Carbamoyl- -alanine 或 N-Carbamoyl-D-amino acids 沒有活性，但對 N-carbamoyl-L-amino acids 有活性，因此，這個是屬於 L-N-carbamoylase 的酵素，經過胺基酸序列的比對與 *A. radiobacter* 的 D-N-carbamoylase 一致性為 12%。

綜合上述結果顯示 *B. kaustophilus* 對 N-Carbamoyl-L-homophenylalanine 具有催化能力，可將其轉換成相對應的 L-homophenylalanine，僅適合學術研究與工業上應用。

#### 四、計畫成果自評

本年度計畫的主要目標在於 *Bacillus kaustophilus* N-carbamoylase 酵素性質的分析。目前已完成進度，且其酵素性質及耐熱

性極佳，適合學術研究與工業上應用。

#### 五、參考文獻

1. Sylidatk, C., A. Laufer, R. Muller, and H. Hoke. 1990. Production of optically pure D- and L-amino acids by bioconversion of D, L-5-monosubstituted hydantoin derivatives. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 4:30-75.
2. 工業技術研究院化學工業研究所提供.
3. LaPointe, G., S. Viau, D. Leblanc, N. Robert, and A. Morin. 1994. Cloning, sequencing, expression in *Escherichia coli* of the D-hydantoinase gene from *Pseudomonas putida* and distribution of homologous genes in other microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:888-895.
4. Shimizu, S., H. Shimada, S. Takahashi, T. Ohashi, Y. Tani and H. Yamada. 1980. Synthesis of N-carbamyl-D-2-thienylglycine and D-2-thienylglycine by microbial hydantoinase. *Agric. Biol. Chem.* 44:2233-2234.
5. Yokozeki, K., Y. Hirose, and K. Kubota. 1987. Mechanism of asymmetric production of

- L-aromatic amino acids from the corresponding hydantoins by *Flavobacterium* sp. Agric. Biol. Chem. 51:737-746.
6. Moller, A., C. Syldatk, M. Schulze, and F. Wagner. 1988. Stereo- and substrate-specificity of a D-hydantoinase and a D-N-carbamyl-amino acid aminohydrolase of *Arthrobacter crystallopoietes* AM2. Enzyme Microb. Technol. 10:618-625.
  7. Runser, S., and E. Ohleyer. 1990. Properties of the hydantoinase from *Agrobacterium* sp. IP I -671. Biotechnol. Lett.12:259-264.
  8. Morin, A., W. Hummel, and M. R. Kula. 1986. Production of hydantoinase from *Pseudomonas fluorescens* strain DSM 84. Appl. Microbiol. Biotechnol. 25:91-96.
  9. Mukohara, Y., T. Ishikawa, K. Watabe, and H. Nakamura. 1994. A thermostable hydantoinase of *Bacillus stearothermophilus* NS1122A: cloning, sequencing, and high expression of the enzyme gene, and some properties of the expressed enzyme. Biosci. Biotech. Biochem. 58:1621-1626.
  10. Grifantini, R. 1996. *Agrobacterium radiobacter* D-hydantoinase gene, and D-N-alpha-carbamoylase gene. GenBank accession number x 91070.
  11. Watabe, k., T. Ishikawa, Y. Mukohara, and H. Nakamura. 1992. Cloning and sequencing of the genes involved in the conversion of 5-substituted hydantoins to the corresponding L-amino acids from the native plasmid *Pseudomonas* sp. strain NS671. J. Bacteriol. 174:962-969.