

【11】證書號數：I545198

【45】公告日：中華民國 105 (2016) 年 08 月 11 日

【51】Int. Cl. : C12P17/06 (2006.01) C12N15/81 (2006.01)
C07D311/36 (2006.01) C12R1/84 (2006.01)

發明

全 7 頁

【54】名稱：製備鄰位-羥基異黃酮的方法

METHOD FOR MANUFACTURING ORTHO-HYDROXYISOFLAVONE

【21】申請案號：104130408 【22】申請日：中華民國 104 (2015) 年 09 月 15 日

【72】發明人：丁秀玉 (TW) DING, HSIU YU；張德生 (TW) CHANG, TE SHENG；江建
民 (TW) CHIANG, CHIEN MIN【71】申請人：嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學 CHIA NAN UNIVERSITY OF
PHARMACY & SCIENCE

臺南市仁德區二仁路 1 段 60 號

【74】代理人：陳豐裕

【56】參考文獻：

Te-Sheng Chang, Isolation, Bioactivity, and Production of ortho-Hydroxydaidzein and ortho-Hydroxygenistein, Int. J. Mol. Sci. 2014, 15, 5699-5716.

審查人員：林奕萍

[57]申請專利範圍

1. 一種製備鄰位-羥基異黃酮(ortho-hydroxyisoflavones)的方法，其包含下列步驟：
步驟一：製備一含有融合基因之環狀重組質體，該融合基因係具有 CYP57B3 基因之跨膜區(transmembrane domain)、CYP105D7 基因與細胞色素還原酶 sCPR (cytochrome P450 reductase)基因，其中該 CYP57B3 基因之跨膜區胺基酸序列為 SEQ ID NO:1；以及
步驟二：將該環狀重組質體置於一適合的微生物表達系統中，並利用含有異黃酮之培養基培養該微生物表達系統一作用時間，以產生鄰位-羥基異黃酮，其中該異黃酮係染料木黃酮(genistein)。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該環狀重組質體係由下述步驟製備而得：(a)利用聚合酶鏈鎖反應由米麴菌(*Aspergillus oryzae*)之 cDNA 擴增 CYP57B3 基因中的跨膜區 (transmembrane domain)，由阿佛曼鏈黴菌(*Streptomyces avermitilis*)擴增 CYP105D7 基因，以及由釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)之 gDNA 擴增一細胞色素還原酶基因 sCPR (cytochrome P450 reductase)基因；(b)將該 CYP57B3 基因、該 CYP105D7 基因及該細胞色素還原酶基因分別以第一、二、三組限制酶切割，再接合以形成一融合基因；以及(c)將該融合基因接合至一 pGAPZA 載體之相對應限制酶切位上以形成一環狀重組質體。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該鄰位-羥基異黃酮係 3'-羥基染料木黃酮(3'-hydroxygenistein)。
4. 如申請專利範圍第 2 項所述之方法，其中該第一組限制酶係 EcoRI/BglII，該第二組限制酶係 BstBI/BglII，以及該第三組限制酶係 BglII/XhoI。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該微生物表達系統係畢赤酵母(*Pichia pastoris*)。

(2)

6. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該培養基係 YPD (yeast extract peptone dextrose) 培養基。
7. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中該步驟二之作用時間為 32~72 小時。
8. 如申請專利範圍第 7 項所述之方法，其中該步驟二之作用時間為 48 小時。

圖式簡單說明

第一圖：本發明較佳實施例之製備方法步驟流程圖

第二圖：本發明較佳實施例之流程示意圖。

第三圖：本發明環狀重組質體 pGAP-mCYP105D7-sCPR 之示意圖。

第四圖：利用西方墨點法鑑定嵌合蛋白(chimeric proteins)。

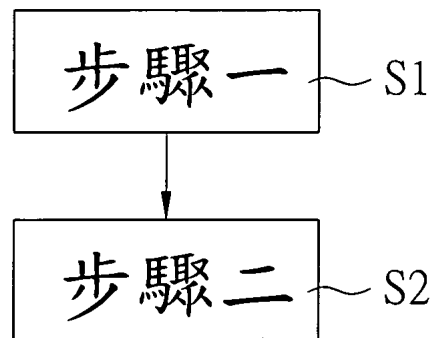
第五圖：含大豆黃酮(daidzein)發酵液培養 72 小時測得產物之 UPLC 色譜圖。

第六圖：含染料木黃酮(genistein)發酵液培養 72 小時測得產物之 UPLC 色譜圖。

第七圖：本發明由異黃酮生物轉換鄰位-羥基異黃酮之示意圖。

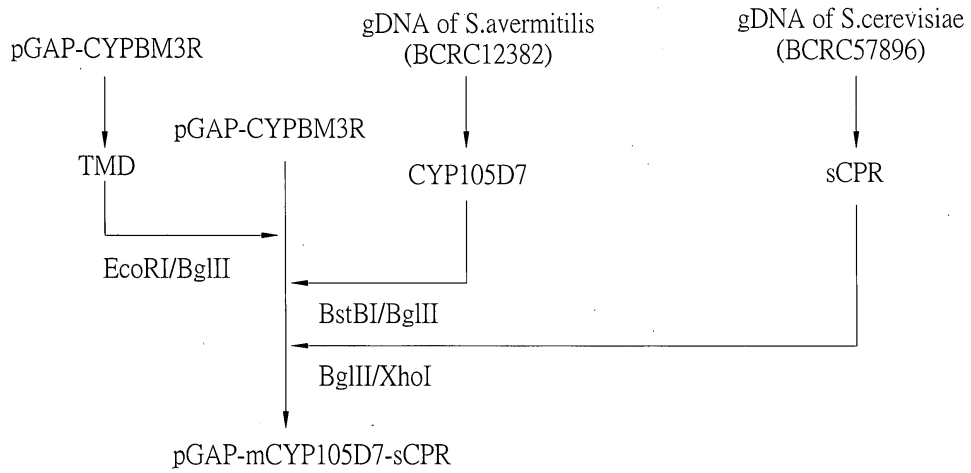
第八圖：含大豆黃酮發酵液進行發酵後得到的 6-羥基大豆黃酮產量(6-hydroxydaidzein)及重組畢赤酵母生長情形。

第九圖：含染料木黃酮發酵液進行發酵後得到的 3'-羥基染料木黃酮產量(3'-hydroxygenistein)及重組畢赤酵母生長情形。

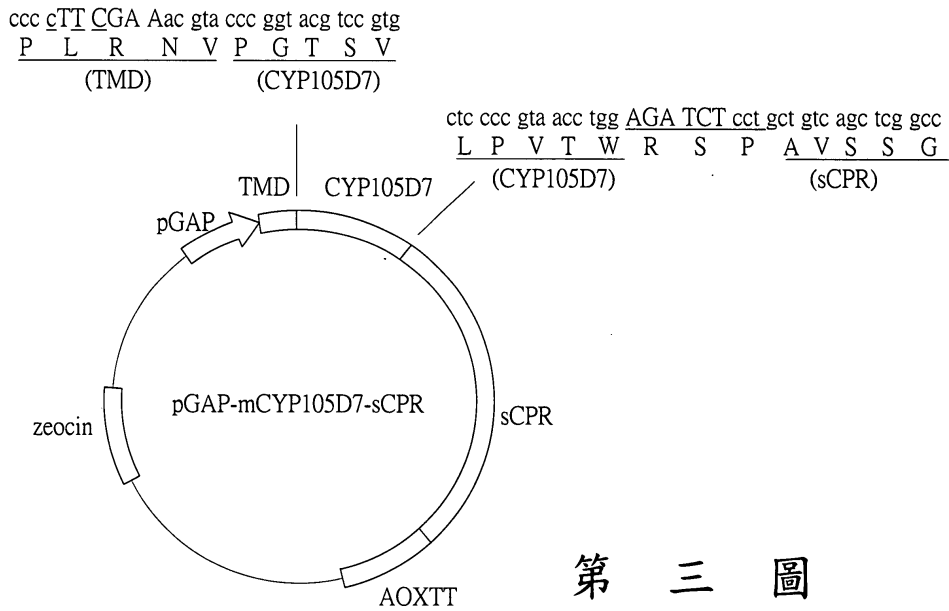


第一圖

(3)

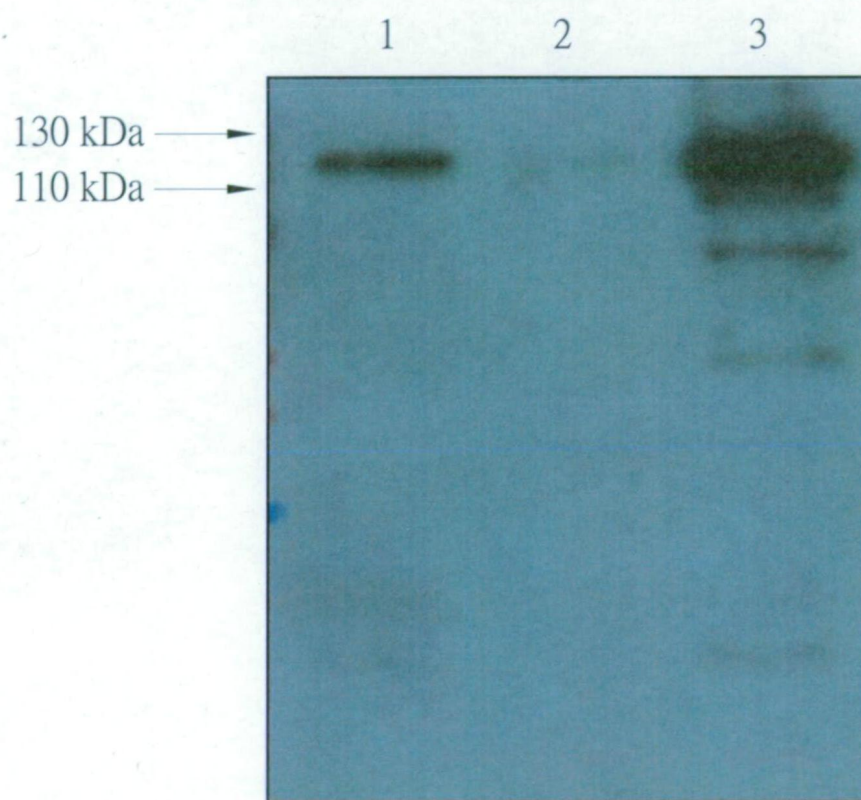


第 二 圖



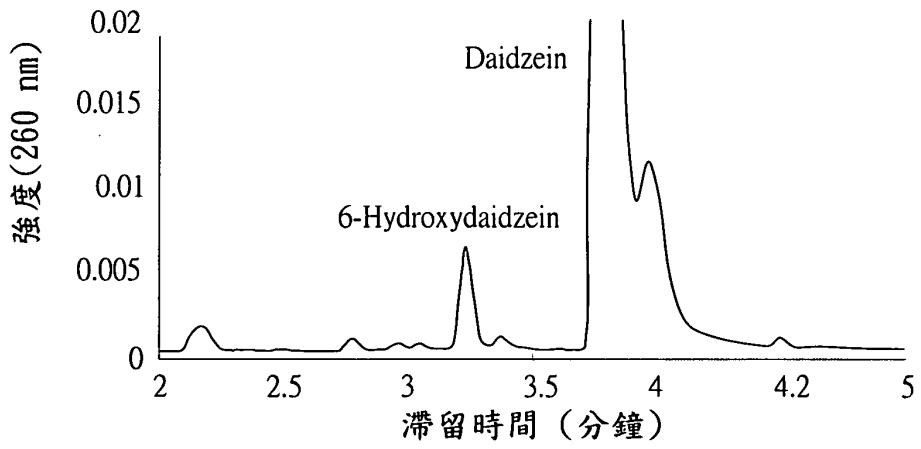
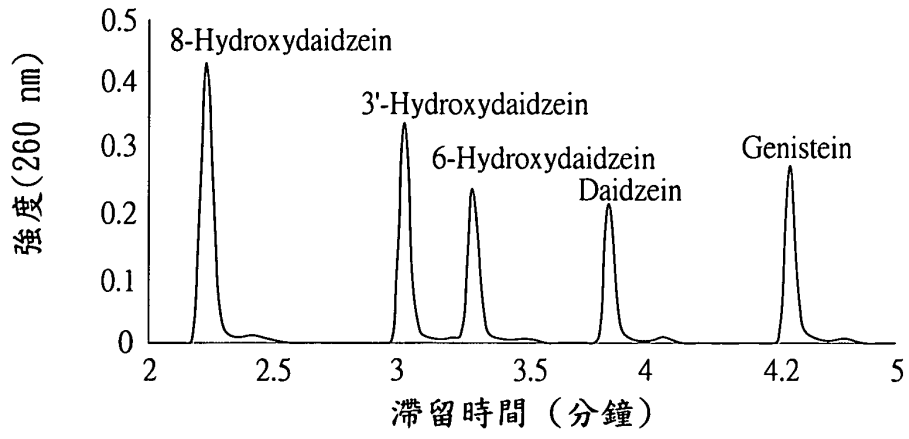
第 三 圖

(4)



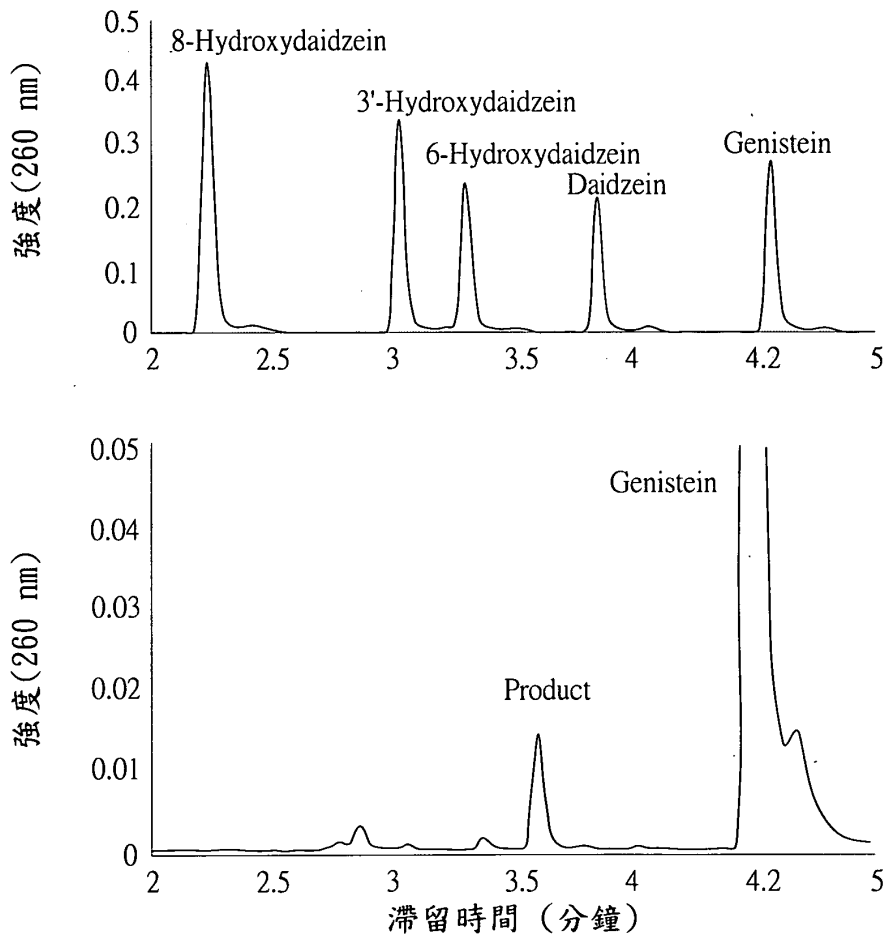
第 四 圖

(5)

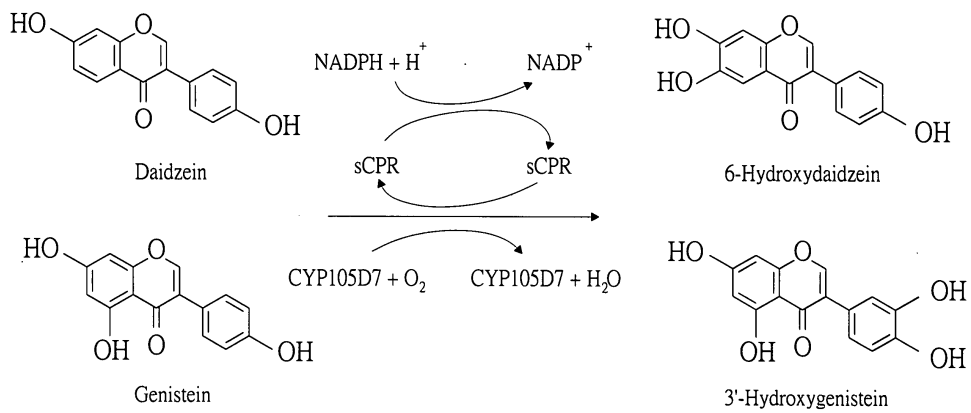


第五圖

(6)

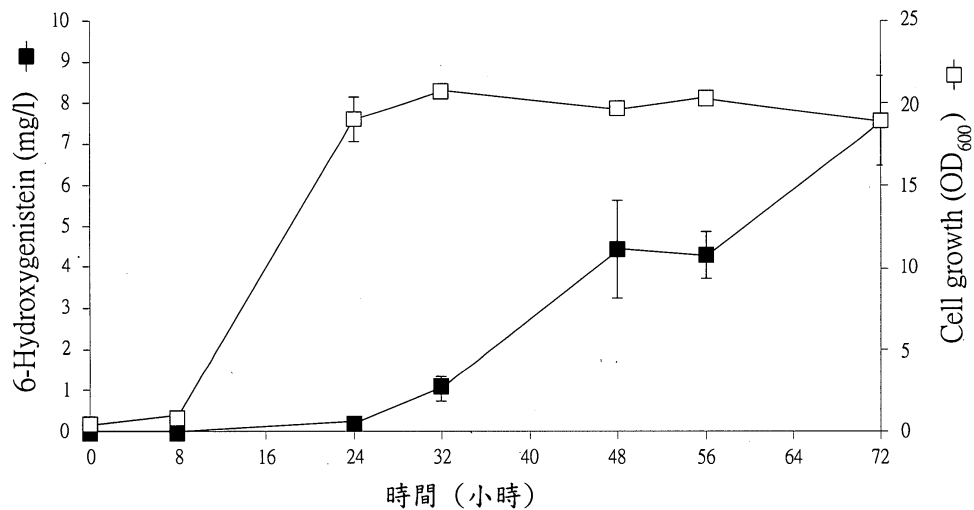


第六圖

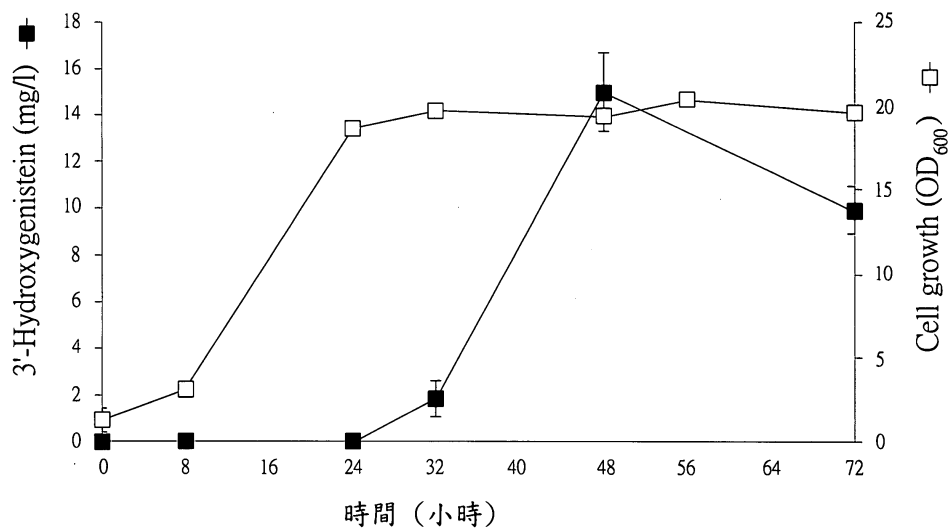


第七圖

(7)



第八圖



第九圖