【19】中華民國　　【12】專利公報　（B）

【11】證書號數：I507527
【45】公告日： 中華民國 104 (2015) 年 11 月 11 日
【51】Int. Cl.：　*C12P17/06 (2006.01)*　*C12N15/81 (2006.01)*
C12R1/84 (2006.01)

發明　全 6 頁

【54】名　稱：利用生物轉換製備 6 －羥基芹菜素之方法
METHOD OF MANUFACTURING 6-HYDROXYAPIGENIN BY BIOTRANSFORMATION

【21】申請案號：102145727　【22】申請日： 中華民國 102 (2013) 年 12 月 11 日
【11】公開編號：201522644　【43】公開日期： 中華民國 104 (2015) 年 06 月 16 日

【72】發 明 人： 丁秀玉 (TW) DING, HSIOU YU；張德生 (TW) CHANG, TE SHENG
【71】申 請 人： 嘉藥學校財團法人嘉南藥理大學
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：
Chang TS. et al. “Production of ortho-hydroxydaidzein derivatives by a recombinant strain of Pichia pastoris harboring a cytochrome P450 fusion gene” Phys Biol. 2013, 48 (3): 426-9.
Barková K. et al. “Regioselective hydroxylation of diverse flavonoids by an aromatic peroxygenase” Tetrahedron. 2011, 67 (26): 4874-8.

審查人員：吳姵諄

[57]申請專利範圍

1. 一種利用生物轉換製備 6-羥基芹菜素之方法，其包含下列步驟：步驟一：利用聚合酶鏈鎖反應由米麴菌(*Aspergillus oryzae*)之 cDNA 擴增 CYP57B3 基因，並由釀酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)之 gDNA 擴增一細胞色素還原酶基因，其中該細胞色素還原酶基因係 sCPR(cytochrome P450 reductase)基因；步驟二：將該 CYP57B3 基因及該細胞色素還原酶基因分別以第一、二組限制酶切割，再接合以形成一融合基因；步驟三：將一 pGAPZA 載體以第三組限制酶切割後，並將該融合基因接合至該 pGAPZA 載體之相對應限制酶切位上以形成一環狀重組質體；以及步驟四：將該環狀重組質體置於一適合的微生物表達系統中，並利用含有芹菜素之培養基培養該微生物表達系統一作用時間，以產生 6-羥基芹菜素(6-Hydroxyapigenin)。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之利用生物轉換製備 6-羥基芹菜素之方法，其中該第一組限制酶係 EcoR I/Bgl Ⅱ，該第二組限制酶係 Bgl Ⅱ/XhoI，而該第三組限制酶係 EcoR I/XhoI。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之利用生物轉換製備 6-羥基芹菜素之方法，其中該微生物表達系統係畢赤酵母(*Pichia pastoris*)。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之利用生物轉換製備 6-羥基芹菜素之方法，其中該培養基係 YPD(yeast extract peptone dextrose)培養基。

5. 如申請專利範圍第 1 項所述之利用生物轉換製備 6-羥基芹菜素之方法，其中該作用時間超過 72 小時後，該 6-羥基芹菜素之產量達 0.22mg/L。

圖式簡單說明

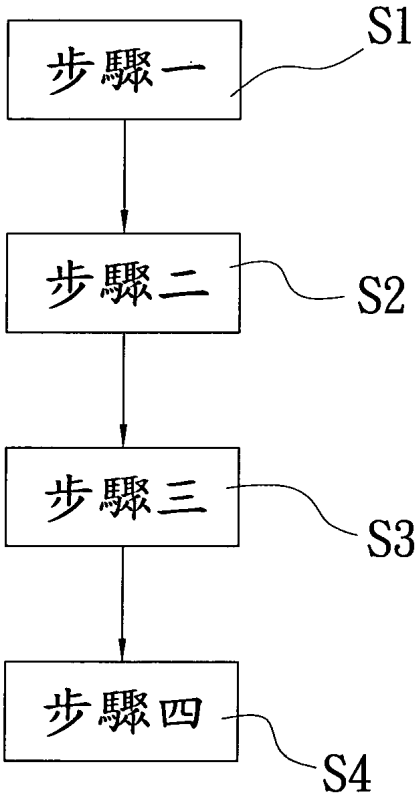
第一圖：本發明較佳實施例之製備方法步驟流程圖

第二圖：(A)本發明具體實施例之流程示意圖(B)本發明具體實施例之環狀重組質體示意圖

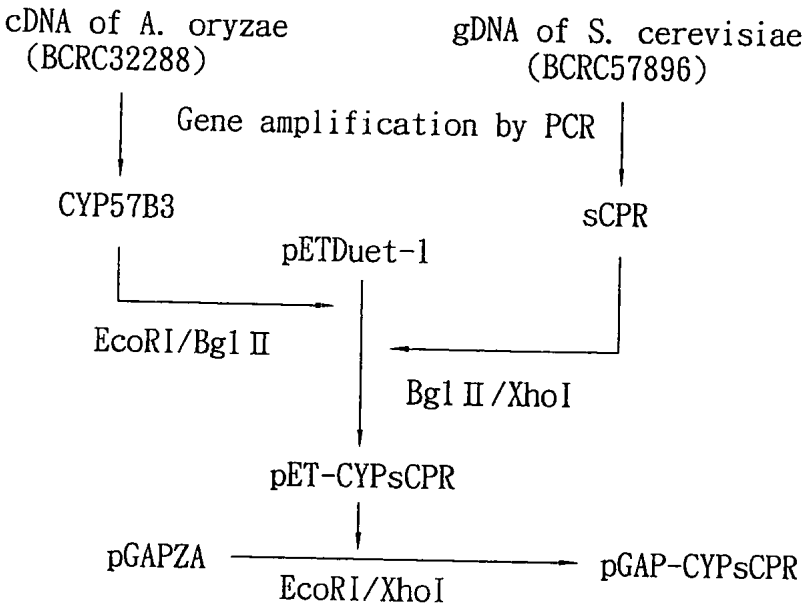
第三圖：(A)標準品芹菜素、6-羥基芹菜素、3-羥基芹菜素之 HPLC 分析圖譜(B)發酵液培養 72 小時測得產物之 HPLC 分析圖譜

第四圖：本發明芹菜素生物轉換之示意圖

第五圖：本發明較佳實施例之 6-羥基芹菜素產量分析圖

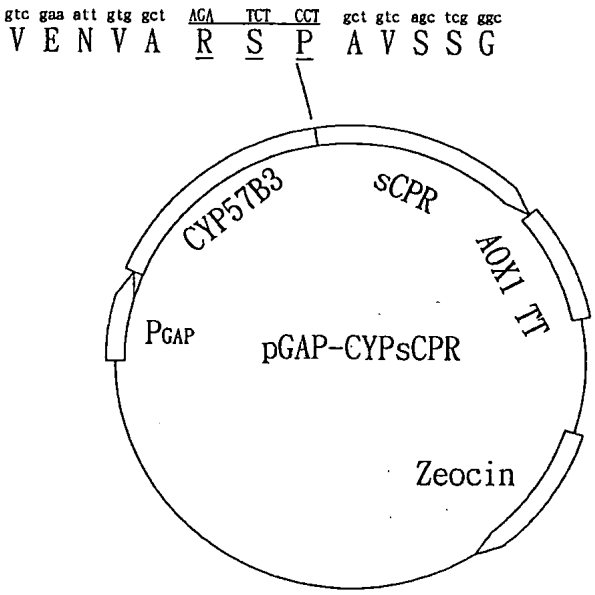


第 一 圖


cDNA of A. oryzae
(BCRC32288)
gDNA of S. cerevisiae
(BCRC57896)
Gene amplification by PCR
CYP57B3
sCPR
pETDuet-1
EcoRI/Bgl II
Bgl II/XhoI
pET-CYPsCPR
pGAPZA
EcoRI/XhoI
pGAP-CYPsCPR

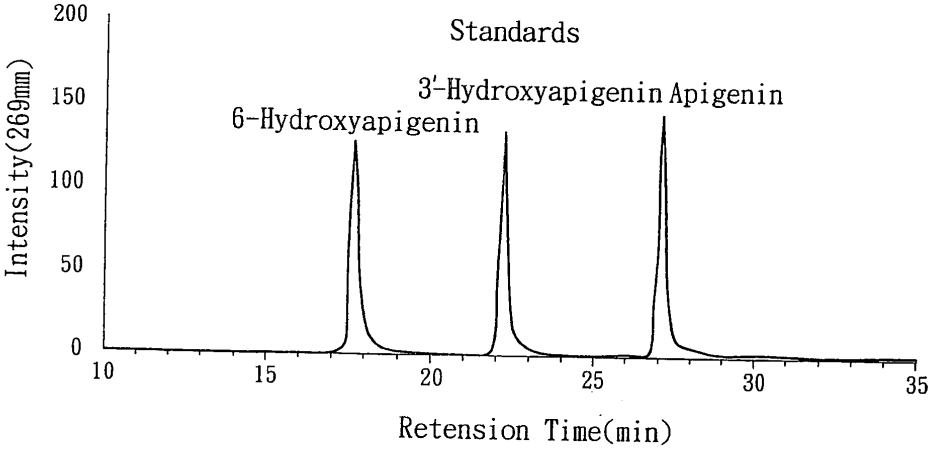
(A)

第 二 圖


gtc gaa att gtg gct AGA TCT CCT gct gtc agc tcg ggc
V E N V A R S P A V S S G
CYP57B3
sCPR
AOX1 TT
PGAP
pGAP-CYPsCPR
Zeocin

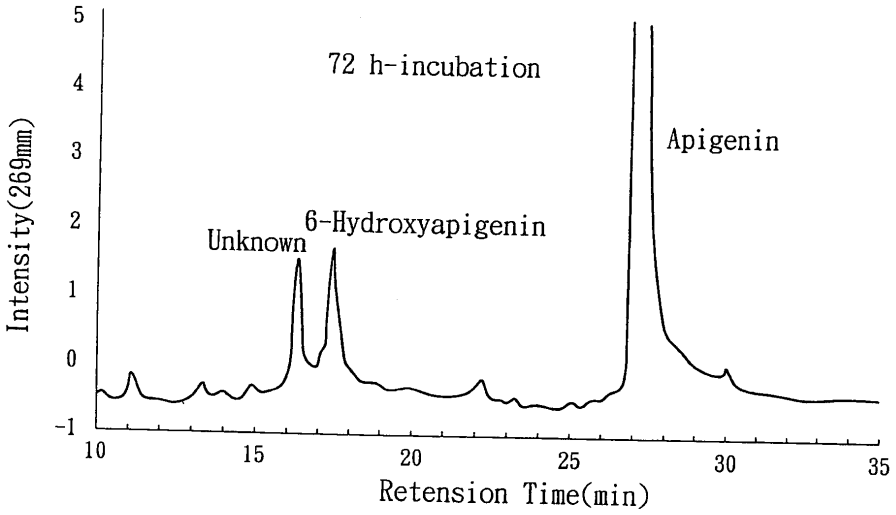
(B)

第 二 圖


Standards
6-Hydroxyapigenin
3'-Hydroxyapigenin
Apigenin
Intensity(269mm)
200
150
100
50
0
10
15
20
25
30
35
Retension Time(min)

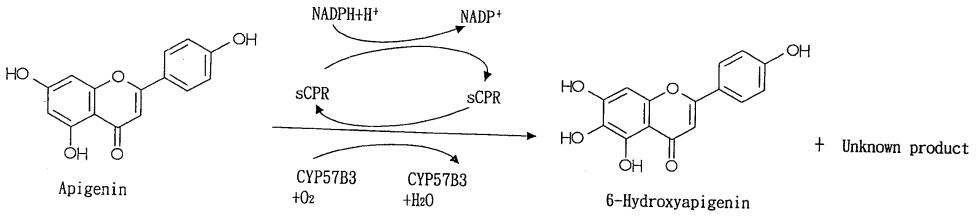
(A)

第 三 圖

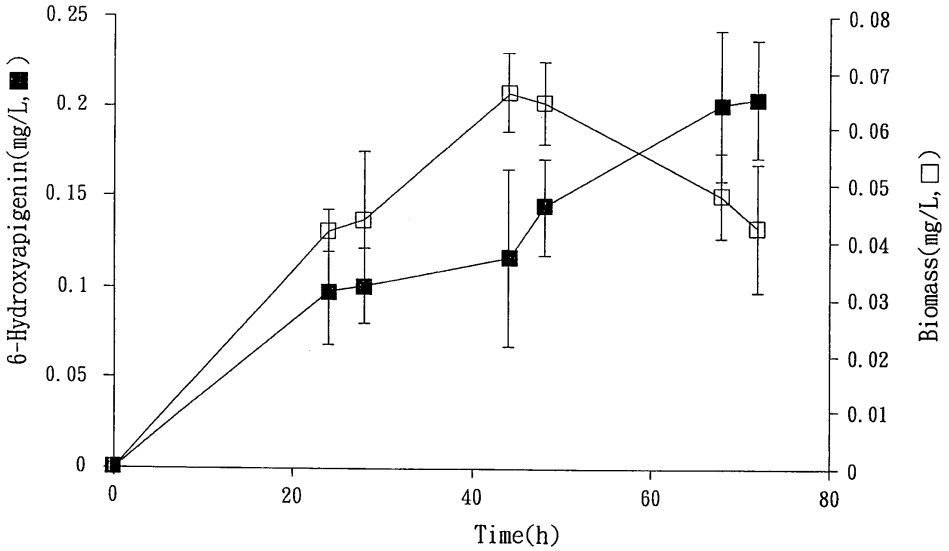

72 h-incubation
Unknown
6-Hydroxyapigenin
Apigenin
Intensity(269mm)
5
4
3
2
1
0
-1
10
15
20
25
30
35
Retension Time(min)

(B)

第 三 圖


NADPH+H+
NADP+
sCPR
sCPR
CYP57B3
+O2
CYP57B3
+H2O
Apigenin
6-Hydroxyapigenin
+ Unknown product

第 四 圖


6-Hydroxyapigenin(mg/L, ■)
Biomass(mg/L, □)
Time(h)
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
0.08
0.07
0.06
0.05
0.04
0.03
0.02
0.01
0
0
20
40
60
80

第 五 圖