

申請日期： 92.12.10	IPC分類 C12P 11/00, C12N 15/52, 9/00, C07D 339/04
申請案號： 90104778	// (C12N 15/52, C12R 1:19)

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書 200426218

一、 發明名稱	中文	以發酵方式製造 R- α -硫辛酸之方法
	英文	Method for the fermentative production of R- α -lipoic acid
二、 發明人 (共1人)	姓名 (中文)	1. 陶弼阿斯·達斯勒爾博士
	姓名 (英文)	1. Dr. Tobias Daßler
	國籍 (中英文)	1. 德國 DE
	住居所 (中文)	1. 德國慕尼黑市喜馬拉雅路十四號
	住居所 (英文)	1. Himalajastrasse 14, D-81825 Muenchen, Germany
三、 申請人 (共1人)	名稱或姓名 (中文)	1. 德商·電化工業聯合公司
	名稱或姓名 (英文)	1. Consortium fuer elektrochemische Industrie GmbH
	國籍 (中英文)	1. 德國 DE
	住居所 (營業所) (中文)	1. 德國慕尼黑市斯勒史達特街二十號 (本地址與前向貴局申請者不同)
	住居所 (營業所) (英文)	1. Zielstattstr. 20, 81379 Muenchen, Germany
	代表人 (中文)	1. 符藍克·繆勒博士
	代表人 (英文)	1. Dr. Frank Mueller



一、本案已向

國家(地區)申請專利

申請日期

案號

主張專利法第二十四條第一項優先權

德國 DE

2002/12/12

102 58 127.4

有

二、☐主張專利法第二十五條之一第一項優先權：

申請案號：

無

日期：

三、主張本案係符合專利法第二十條第一項☐第一款但書或☐第二款但書規定之期間

日期：

四、☒有關微生物已寄存於國外：

寄存國家：1. 德國 DE

寄存機構：1. DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN

寄存日期：1. 2002/11/25

寄存號碼：1. DSM 15299

☒有關微生物已寄存於國內(本局所指定之寄存機構)：

寄存機構：1. 財團法人食品工業發展研究所

寄存日期：1. 2004/03/04

寄存號碼：1. BCRC910246

☐熟習該項技術者易於獲得，不須寄存。

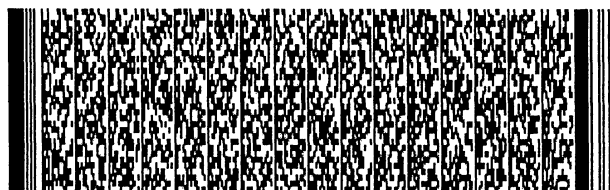
五、發明說明 (1)

一、【發明所屬之技術領域】

在許多原核生物及真核生物中R- α -硫辛酸係特殊多酶複合體之輔因子。R- α -硫辛酸總是以共價方式與適當酶特定離胺酸殘基之 ϵ -胺基鍵結。如此，R- α -硫辛酸係丙酮酸脫氫酶(PDH)E2次單元之一部分[EC 2.3.1.12]及 α -酮戊二酸脫氫酶(KGDH)E2次單元之一部分[EC 2.3.1.61]且於該處扮演重要角色，在 α -酮酸類氧化脫羧作用中作為氧化還原夥伴及醯基供體。再者，硫辛酸在甘胺酸卵裂酶系統中擔任胺基甲基載體。

α -硫辛酸係一具有光活性之分子，其手性(對掌性)中心位於C6碳上。 α -硫辛酸之R構型係天生之對映體。僅此型具有生理活性作為對應酶類之輔因子。 α -硫辛酸可由兩種形態存在：氧化型(5-[1,2]-二氫二噻-3-基戊酸)及還原型(6,8-二氫硫基辛酸)。 α -硫辛酸"一詞以下係指 α -硫辛酸之該兩種型態及其特別鹽類，例如： α -硫辛酸之鈣鹽、鉀鹽、鎂鹽、鈉鹽或銨鹽。

R- α -硫辛酸之生物合成之研究業已特別集中在大腸桿菌(請參閱第一圖)。此處與醯載體蛋白質(ACP)共價鍵結之辛酸係用作硫辛酸合成之特定前驅體。在一複雜反應中，將兩個硫原子轉移到如此活化之辛酸(辛醯基-醯載體蛋白質)上，形成R- α -硫辛醯-醯載體蛋白質。此反應係經硫轉移酶硫辛酸合成酶[EC 2.8.1-](lipA基因產物)催化。最後胺基酸L-半胱氨酸用作硫供體。隨後R- α -硫辛酸自R- α -硫辛醯基-醯載體蛋白質轉移至 α -酮酸脫氫酶之E2次單



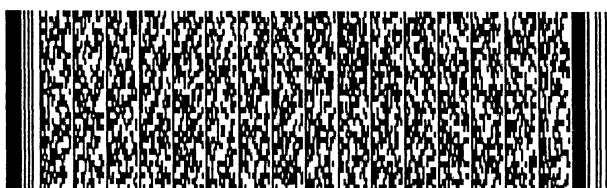
五、發明說明 (2)

元係由硫辛醯基-蛋白質連接酶B [EC 6.-.-.] (lipB 基因產物) 催化，但並無R- α -硫辛醯基-醯載體蛋白質或R- α -硫辛酸呈自由中間產物出現(米勒等人，2000，生物化學 39：15166 至15178)。

無論如何，大腸桿菌亦能由環境培養基接受三個R- α -硫辛酸且利用其生殖官能 α -銅酸脫氫酶。為此，R- α -硫辛酸係第一次藉由ATP至R- α -硫辛酸AMP活化，且轉移至對應的酵素次單元(請參閱第二圖)。二個活化係由硫辛醯基-蛋白質連接酶A [EC 6.-.-.] (lplAB 基因產物) 催化(莫里斯等人，1994，生物化學期刊，269：16091 至16100)。但，如果內源性硫辛酸菌株及硫辛醯基團經由LipA/LipB 轉移，則lplA 活性對長腸桿菌野生型菌株是不必要的。所以，舉例言之，lplA 突變株不再具有任何可偵檢之硫辛醯基-蛋白質連接酶A 活性，且其表現型在正長生長環境並不會自野生型細胞辨識出來(莫里斯等人，1994，生物化學，269：16091 至16100；莫里斯等人，1995，細菌期刊，177：1 至10)。

有關真核生物內實施R- α -硫辛酸生物合成甚少公開。但假設R- α -硫辛酸之合成及轉移至對應酶類係在真核生物細胞粒線體內以類似於細菌者之方式進行。

除其作為酶類重要成分擔任新陳代謝重要角色之外，由於其兩個硫醇基， α -硫辛酸具有顯著之抗氧化活性，因此可保護有機體不受氧化應力所誘導有害化學作用之影響， α -硫辛酸早經公認對藥物治療及作為食物補品(營養劑)



五、發明說明 (3)

非常重要。再者， α -二氫硫辛酸(還原型 α -硫辛酸)可在人體內直接或間接再生其他經氧化之天然抗氧化劑(例如：抗壞血酸或 α -生育酚)，或若缺乏抗氧化劑時，由於其具有強還原劑之性能，亦可替代該等抗氧化劑。所以結合抗壞血酸、 α -生育酚及麩氨酸硫("抗氧化劑網")作用， α -硫辛酸最為重要。 α -硫辛酸亦用以預防及控制第II型糖尿病及其傷害性副作用，例如：多神經病、白內障或心臟血管狀況。

與S型者相較，雖然由日益增多之驗證顯示， α -硫辛酸純R對映體之應用特別有利，目前該兩種 α -硫辛酸對映體之不同生物活性仍是集中研究之目標。因此，由體外實驗顯示，僅天然R- α -硫辛酸可導致官能 α -酮酸脫氫酶之形成。相反地，S型對映體甚至對R- α -硫辛酸激發酶活性之作用有抑制效果。因此在粒線體內 α -硫辛酸之還原作用及具有抗氧化活性之 α -二氫硫辛酸之再生對細胞極為重要。與R型對映體結合哺乳動物粒線體還原型菸草醯胺腺嘌呤二核苷酸-依賴硫辛醯胺還原酶之活性較與S型結合者幾乎高20倍。再者，與S型對映體相較，R- α -硫辛酸對於抗胰島素老鼠攝入受胰島素影響之葡萄糖及骨肌細胞之葡萄糖新陳代謝具有顯著較強之作用。再者，在一動物實驗中，R型顯示有消炎作用，而S型其實有止痛作用。為避免非所願之副作用，所以極期望總是以對映體純粹形態之情況下製得 α -硫辛酸。

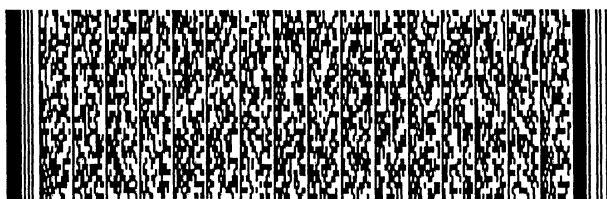
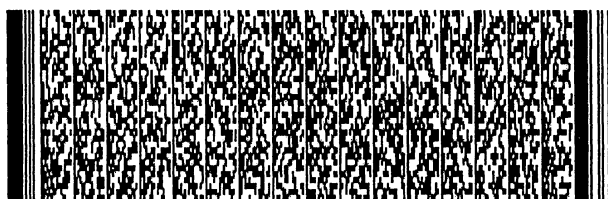
二、【先前技術】



五、發明說明 (4)

目前， α -硫辛酸之工業製造唯獨藉助於化學方法，所得最終產物總是R型及S型之消旋物(亞達夫等人，1990，科學工業研究學報49：400至409)。為製得對映體純粹R- α -硫辛酸，曾研發出許多不同方法。舉例言之，用化學方法藉助於對掌性助劑(華爾頓等人，1954，美國化學學會學報76：4748；德國專利DE 4137773)或用酶析法(愛德格等人，1995，化學學會化學通訊學報：1563至1564)可將 α -硫辛酸或合成中間產物之一之消旋物分開。在其他方法中，由於一對映體選擇性合成步驟可防止消旋物之形成，藉化學方法(德國專利DE 3629116；DE 19533881；布林格曼等人，1999，自然研究雜誌 54b：655至661；DE 10036516)或藉助於微生物利用立體特異生物轉化作用(哥巴蘭及加可布，1989，四面體通訊30：5705至5708；達薩拉迪等人，1990，化學學會化學通訊學報：729至730；DE 10056025)可引進新對掌性中心。利用一天生對掌性反應物(例如：S-順丁烯二酸或D-甘露糖醇(布魯克斯及哥爾丁，1988，化學學會學報Perkin Trans. I：9至12；拉瑪勞等人，1987，四面體通訊28，2183至2186)，其他方法依次開始對映體純 α -硫辛酸之化學合成。由於若干部分複雜之合成步驟、產率低及原料成本高，目前製造對映體純R- α -硫辛酸之所有習知方法均不經濟。

最近，許多低分子量天然物質(例如：抗生素、維生素或胺基酸)常利用不同微生物菌株藉助於發酵方法實施工業規模製造。



五、發明說明 (5)

案號10235270.4之德國專利及商標申請文獻中，曾述及分泌對映體純R- α -硫辛酸之細胞及發酵方法唯獨製造對映體R- α -硫辛酸之方法。硫辛酸-合成酶基因之過度表現引起細胞分泌自由R- α -硫辛酸至培養基中，但程度仍然有限。

僅在少數案例內，在野生型菌株"代謝工程"過程中一單獨基因操作可造成預期化合物之足量過度生產。

與業經自其分離出硫辛醯蛋白質連接酶B基因之特殊野生型細胞相較，本發明之過表現意謂硫辛醯蛋白質連接酶B基因之表現以至少高出2倍為佳，尤以高出5倍更佳。

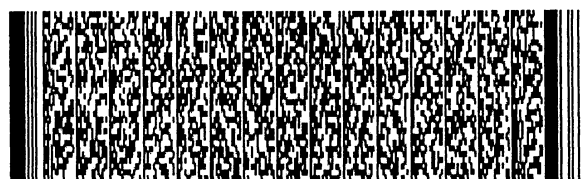
該硫辛醯蛋白質連接酶B基因最好係一基因，該基因具有順序識別號碼：1之順序或該基因之官能變種。

本發明之官能變種意謂：藉核苷酸之消除、插入或取代，由順序識別號碼：1內圖示順序衍生之一個DNA順序，該硫辛醯蛋白質連接酶B之酶活性係由所保留之基因編碼。

為過表現該細胞內之lipB基因，一細胞可具有一增加之lipB基因複製數目及/或該表現內增加之lipB基因(尤以由於適當啟動子為佳)。

一lipB基因之過表現總是以至少相同之倍數增加細胞之硫辛醯蛋白質連接酶B活性。

最好，本發明之一個細胞過表現一個硫辛醯蛋白質連接酶B基因以編碼一蛋白質，該蛋白質包括順序號碼：2或順序超過40%與順序識別號碼：2同源之官能變種。



五、發明說明 (6)

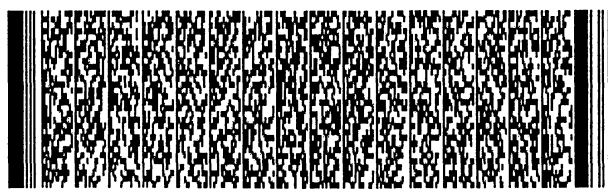
順序與順序識別號碼：2同源以超過60%為佳，尤以超過80%更佳。

在本發明中，所述所有同源值係指利用最佳擬合演算法(GCG 威斯康辛套裝軟體，遺傳學電腦小組(GCG)，麥迪遜，威斯康辛)所得之結果。

利用精於此項技術者習知之方法可增加一細胞內lipB基因之複製數目。舉例言之，因此可將一lipB基因選殖入一每個細胞具有許多複製品(例如：pUC19、pBR322、pACYC184在大腸桿菌之案例中)之質粒載體內並將該基因引進該細胞內。另一變通方式，一lipB基因之許多複製品可整合成一細胞之染色體。可用之整合方法係利用溫和噬菌體、整合性質粒或經由同源重組之習知系統(例如：漢彌頓等人，1989，細菌學報，171：4617至4622)。

藉將一lipB基因選殖入一質粒載體內以增加複製數目以在有一啟動子控制下為佳。尤以藉將一lipB基因選殖入一pBAD衍生物內，例如：pBAD-GFP以增加大腸桿菌內之複製數目更佳(克拉梅立等人，1996，自然生物科技14：315至319)。所以本發明之另一內容係一質粒，在一啟動子官能控制之情況下該質粒含有一lipB基因。

該lipB基因之天然啟動子及操縱基因區亦可用作一質粒-編碼lipB基因表現之控制區，尤其藉助於其他啟動子亦可增加lipB基因之表現。可連續式或在控制下誘導硫辛醯蛋白質連接酶B基因表現之適當啟動子系統，例如：gapA基因之組成分甘油醛-3-磷酸去氫酶(GAPDH)啟動子或



五、發明說明 (7)

大腸桿菌內之可誘導lac、tac、trc、拉目達、ara或tet啟動子乃精於此項技術者所習知者(馬克萊德斯, 1996, 微生物評論60:512至538)。

在一特別合適之具體實施例中, 選殖-lipB基因係使用一質粒, 該質粒業已含有一用以增強表現之啟動子, 例如: 大腸桿菌之可誘導阿拉伯糖啟動子/阻礙物系統。

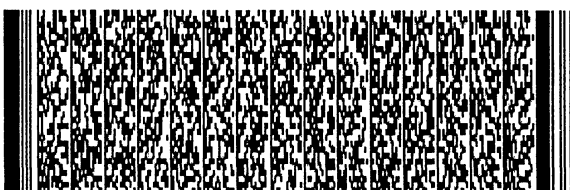
再者, 可增強表現之方法有二: (1) 轉譯起始訊號(例如: 基因之核糖體結合部位或起始密碼子, 在特別結構上呈最適化順序) 或 (2) 用更常發生之密碼子替代甚至依照"密碼子用途"之密碼子。

本發明之細胞最好含有一包括-lipB基因及該等調節訊號修飾之質粒。在一特別合適之具體實施例中, lipB基因之天然弱起始密碼子(TTG)係由強起始密碼子(ATG)替代。

舉例言之, 藉助於聚合酶鏈反應, 利用包圍整個lipB基因之特定引物及隨後與載體DNA碎片之連接, 藉特定放大-lipB基因, 可將-lipB基因選殖入一質粒載體內。

與一起始細胞相較, 其lipB基因之表現增加及其相關硫辛醯蛋白質連接酶B活性增加之本發明細胞, 可利用標準分子生物技術製得。

硫辛醯蛋白質連接酶B基因曾經於許多細胞中鑑別出來。因此, 本發明之細胞最好可由原核生物有機體或真核生物有機體之細胞製造, 該等有機體可合成R- α -硫辛酸本身(起始細胞), 該等細胞可採用重組方法且可藉發酵作用



五、發明說明 (8)

製成培養物。因此，凡在細胞培養物內可生長之植物細胞或動物細胞亦適用於製備本發明之細胞。

本發明之細胞以微生物類為佳，例如：酵母或細菌菌株。但以腸內桿菌科之細菌菌株較佳，尤以大腸桿菌種最佳。

特別適當之起始細胞亦係由於lipA基因增強表現、業已具有增強硫辛酸-合成酶活性之細胞。

舉例言之，藉助於對抗生素之抗力，係使用一普通轉化方法(例如：電穿透作用)將含有lipB之質粒送入一起始細胞內並選擇藏有質粒之無性生殖系。

三、【發明內容】

本發明之內容係若干分泌R- α -硫辛酸之細胞及利用該等細胞以發酵方式製造該R- α -硫辛酸之方法。

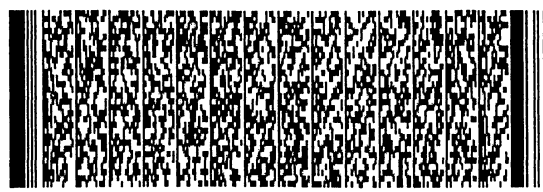
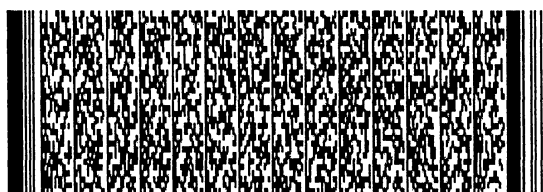
本發明之目的係提供若干有效之細胞，該等細胞可分泌對映體純R- α -硫辛酸至一培養基內。

藉可過表現一硫辛醯蛋白質連接酶B基因(lipB基因)之若干細胞可達成此目的。

此處lipB基因-編碼之酶活性係指一細胞之硫辛醯蛋白質連接酶活性，作為基質(底物)，該細胞特別嗜號R- α -硫辛醯基-醯基載體蛋白質超過自由R- α -硫辛酸(請參閱第一圖)。

本發明之另一內容係若干製備本發明細胞之方法，該方法包括將本發明之質粒送至起始細胞內。

本發明之另一目的係提供一種發酵方法，該方法可製



五、發明說明 (9)

造對映體純R- α -硫辛酸。

該目的係由一種方法達成，該方法包括於一培養基內將本發明之細胞製成培養物，該細胞分泌自由形態之對映體純R- α -硫辛酸至培養基內，並將該對映體純R- α -硫辛酸自該培養基內移除。

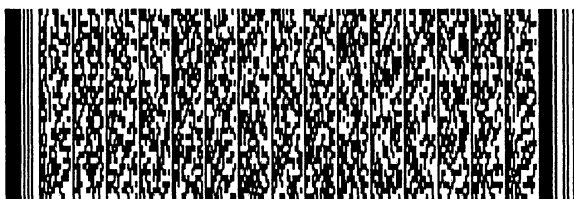
藉精於此項技術者習知之方法可由培養基回收R- α -硫辛酸，例如：將培養基施以離心作用以移除諸細胞，隨後藉萃取作用或沉澱作用取得產物。

四、【實施方式】

由生理數據及生化數據顯示：出現於野生型細胞內之硫辛酸實際上經常呈結合形式，蓋因R- α -硫辛酰業已以完全蛋白質-結合方式合成(請參閱第一圖)(赫伯特及蓋斯特，1975，原始微生物學106：259至266；米勒等人，2000，生物化學39：15166至15178)。但，驚奇的是，經發現：在本發明架構內，一硫醯蛋白質連接酶B基因導致自由對映體純R- α -硫辛酸累積在宿主有機體之培養基內。於生物物質經移除之後，此種情形依次可使產物簡單地自培養基分開，無需事先將該等細胞加以破壞或藉助於複雜及昂貴之水解步驟將該R- α -硫辛酸自所結合之載體蛋白質移除(醯載體蛋白質或 α -酮酸去氫酶之E2次單元)。

本發明用以製造R- α -硫辛酸之若干細胞最好在文獻公開之最低鹽培養基內製成培養物(赫伯特及蓋斯特，1970，系統化酶學18A、269至272)。

原則上，任何可利用之糖類、糖醇類或有機酸類可用



五、發明說明 (10)

作碳源。另外亦可於培養基內添加具有鏈長度C2至C8，尤以鏈長C6至C8者更佳，(分別為己酸及辛酸)之短鏈脂肪酸作為 α -硫辛酸合成之特定前驅物。所加碳源之濃度以1至30公克/公升為佳。

本發明之細胞最好在需氧培養條件下、對特定細胞最適當之生長溫度範圍內保溫16至150小時。

最適溫度範圍以15至55℃為佳，尤以溫度為30至37℃更佳。

舉例言之，本發明方法內所製R- α -硫辛酸之偵檢及數量測定係藉助於生物檢定利用硫辛酸指示菌株營養缺陷型(lipA突變體)。此型R- α -硫辛酸之濁度計定量法係由文獻公開者(赫伯特及蓋斯特，1970，系統化酶學18A，269至272)。除葡萄糖之外，若培養基亦含有乙酸脂及琥珀酸酯，本發明架構內所用之指示菌株，W1485lip2(ATCC 25645)在無補充R- α -硫辛酸之情況下亦將生長。測定所製R- α -硫辛酸時，旨在防止生物檢定中該指示菌株之假-正生長，除R- α -硫辛酸之外，該生長係由於葡萄糖及生產體菌株所分泌乙酸及琥珀酸之引進，即使R- α -硫辛酸產體之生長係以琥珀酸酯為唯一之碳源。該菌株係補充以本發明細胞培養物之上清液；隨後可以指示菌株生長為基準，以測定培養基內之硫辛酸含量。

茲利用下列諸實驗例將本發明作進一步說明。實施該等實驗例所用之細菌菌株大腸桿菌W3110 Δ lip1A業已依照布達佩斯條約以編號DSM 15299寄存在德國微生物及培養細



五、發明說明 (11)

胞收集公司(DSMZ)(D-38142, 勃朗希威格, 德國)。

實驗例1: pBAD-lipB 載體建造

A. lipB 基因放大

依照精於此項技術者習知常用之方法利用Pwo DNA 聚合酶藉助於聚合酶鏈反應(PCR)將大腸桿菌lipB 基因放大。所用模板係大腸桿菌W3110(ATCC 27325)野生型菌株之染色體DNA。所用引物係5'-磷酸化低聚核苷酸lipB-fwd及具有下列順序之lipB-rev

lipB-fwd: (順序識別號碼: 3)

5'- CGG GAT CCC TAT CTG CGC CTG ACA CTC GAC -3'
BamHI

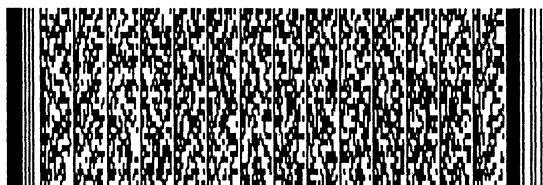
lipB-rev: (順序識別號碼: 4)

5'- CGG GAT CCT TTA TCT GAA CCG CCA TTT GCG CTG -3'
BamHI

隨後藉助於QIAprep 旋轉小型製備套具(奇亞根公司、希爾頓, 德國)DNA 吸收柱、依照製造商說明書方法將聚合酶鏈反應所製約0.68 仟鹼基之DNA 碎片加以純化。

B. 將lipB 基因選殖入該pKP477 載體內

經由引物諸順序將NdeI 限制核酸內切酶之卵裂部位(在寡核苷酸內強調(劃底線)之識別引物順序)送入該PCR 碎片內。在製造商所示條件下, 用NdeI 限制核酸內切酶將經純化之PCR 碎片加以卵裂, 隨後於一瓊脂糖凝膠上將其加以分餾, 之後藉助於GENECLEAN 套具(BIO 101 公司, 拉荷拉, 加州), 依照製造商說明書方法將其自該瓊脂糖凝膠

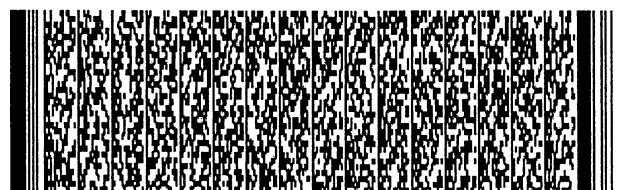
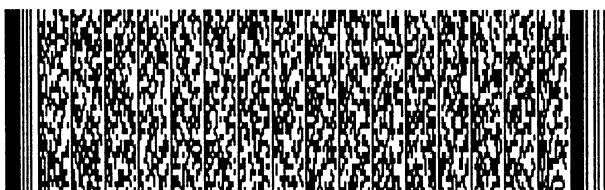


五、發明說明 (12)

分離出來。

該無性生殖及表現載體pKP477係由載體pBAD-GFP(克拉瑪利等人, 1996, 天然生物技術14:315至319)(係載體pBAD18之一個衍生物)製得如下: 首先, 用核酸內切酶NheI及EcoRI藉載體pBAD-GFP之限制作用將GFP基因移除。之後用克倫諾酶將其餘部分之5'-突出端(約4.66仟鹼基載體碎片)填入, 最後利用T4連接酶將該載體加以再連接。以精於此項技術者習知之方式、藉助於電穿透作用、用該連接混合物將該菌株之大腸桿菌細胞加以轉化。將該轉化混合物塗敷在LB-安比西林瓊脂培養皿上(10公克/公升胰蛋白酶水解膽, 5公克/公升酵母萃取液, 10公克/公升NaCl, 15公克/公升瓊脂, 100毫克/公升安比西林)並在37℃溫度下保溫過夜。藉助於一QIAprep轉動小型製備套具(奇亞根公司出品, 希爾頓, 德國)分離出該等質粒之後, 用限制作用分析法將預期之轉化物加以識別。如此製得之載體稱作pKP476。

為移除載體pKP476之第二個NdeI卵裂部位(位於接近複製原點處), 用NdeI以精於此項技術者習知之方式首先將該載體pKP476加以部分限制。依照以上所述方法將線性化(亦即僅單獨切割)之載體碎片分離出來。隨後, 利用克倫諾酶將該碎片之5'-突出端填入, 並依照上述方法、藉助於限制作用分析法, 將該載體加以再連接、轉化及抑制。於距一最適化核糖體結合部位之最佳距離處, 如此所製質粒pKP477現在含有該單獨NdeI卵裂部位。該質粒pKP477



五、發明說明 (13)

含有容許任何基因實施控制表現之各種基因要素。此係一載體，該載體具有一衍生自pBR質粒科之複製原點。該經無性生殖基因之表現係受AraC阻遏物之阻遏且可由阿拉伯糖加以誘導。

該lipB基因係在製造商所示條件下、用限制酶NdeI及SmaI、藉卵裂該載體pKP477而無性生殖者，隨後用鹼性磷酸化酶加以處理將該載體之5'終端加以脫磷酸化，之後藉助於GENECLEAN法，如同lipB PCR碎片，將該載體加以純化。

如以上所述實施：用經卵裂及經脫磷酸化之載體pKP477連接PCR碎片、轉化物之轉化作用及抑制作用。所製質粒稱作pBAD-lipB(第二圖)。

實驗例2：R- α -硫辛酸產體之製備

藉助於電穿透作用將實驗例1內所述pBAD-lipB質粒轉化為大腸桿菌W3110，於含有100毫克/公升安比西林之LB瓊脂培養皿上選擇之後，將該質粒自轉化物之一再分離出來，用限制核酸內切酶加以卵裂並加以抑制。用類似之方式將該比較質粒(pKP477)加以處理。

實驗例3：R- α -硫辛酸之發酵法製造

R- α -硫辛酸之發酵法製造係使用菌株W3110/pBAD-lipB。為作比較，含有"空"pKP477比較質粒之菌株係在完全相同之條件下培養者。

作為產體培養之前培養菌種，首先將5毫升、含有100毫克/公升安比西林之LB液體培養基與各個菌株加以接種

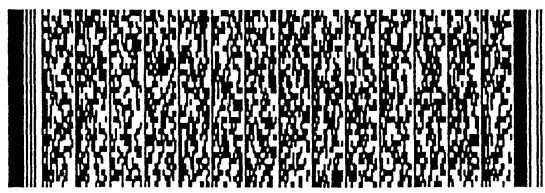
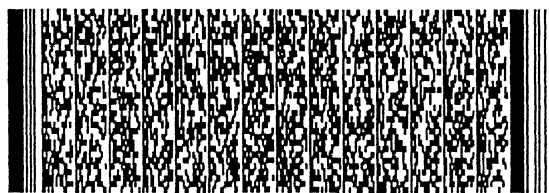


五、發明說明 (14)

，並於一振盪器上、在溫度37℃及轉速160轉/分鐘之情況下保溫16小時。之後藉離心作用將該等細胞採集下來，並用對應體積之消毒鹽水(0.9% NaCl)清洗兩次。最後利用如此製得之細胞接種15毫升BS培養基(7公克/公升 K_2HPO_4 ；3公克/公升 KH_2PO_4 ；1公克/公升 $(NH_4)_2SO_4$ ；0.1公克/公升 $MgSO_4 \times 7 H_2O$ ；0.5公克/公升檸檬酸鈉 $\times 3 H_2O$ ；0.2%酸水解酪蛋白(不含維生素)；13.5公克/公升琥珀酸鈉 $\times 6H_2O$ ；用HCl將酸度值調節至6.8)其中另外含有100毫克/公升安比西林，依照以1：100比例。於一振盪器上，在溫度37℃及轉速160轉/分鐘之情況下，將該等產體培養物加以接種，歷時24小時。保溫約4小時之後，添加0.2公克/公升L-阿拉伯糖以誘導硫辛醯蛋白質連接酶B基因之表現。24小時之後，將該等試樣取下，並藉離心作用將該等細胞自培養基取出。其中所含R- α -硫辛酸之數量係藉助於習知濁度計生物檢定法(赫伯特及蓋斯特，1970，系統化酶學18A，269至272)加以測定。表1所示係保溫24小時之後該特別培養物上清液內所達成之自由R- α -硫辛酸含量：

表1：

菌 株	R- α -硫辛酸[微克/公升]
W3110	0
W3110 $\Delta lp1A$	25
W3110 $\Delta pKP477$	0
W3110 $\Delta lp1A pKP477$	27
W3110pBAD-lipB	25
W3110 $\Delta lp1A pBAD-lipB$	191



五、發明說明 (15)

SEQUENCE LISTING

<110> Consortium fuer elektrochemische Industrie GmbH

5 <120> Cells and a method for the fermentative production of R-alpha-lipoic acid

<130> Co 10227

10 <140>
<141>

<160> 4

15 <170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 1017
<212> DNA

20 <213> Escherichia coli

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(1014)

25 <300>
<301> Morris, Timothy W.
Reed, Kelynn E.
Cronan Jr., John E.

30 <302> Identification of the Gene Encoding Lipoate-Protein
Ligase A of Escherichia coli
<303> J. Biol. Chem.
<304> 269
<305> 23

35 <306> 16091-16100
<307> 1994

<400> 1
atg tcc aca tta cgc ctg ctc atc tct gac tct tac gac ccg tgg ttt 48
40 Met Ser Thr Leu Arg Leu Leu Ile Ser Asp Ser Tyr Asp Pro Trp Phe
1 5 10 15

aac ctg gcg gtg gaa gag tgt att ttt cgc caa atg ccc gcc acg cag 96
45 Asn Leu Ala Val Glu Glu Cys Ile Phe Arg Gln Met Pro Ala Thr Gln
20 25 30

cgc gtt ctg ttt ctc tgg cgc aat gcc gac acg gta gta att ggt cgc 144
Arg Val Leu Phe Leu Trp Arg Asn Ala Asp Thr Val Val Ile Gly Arg
35 40 45

50 gcg cag aac ccg tgg aaa gag tgt aat acc cgg cgg atg gaa gaa gat 192
Ala Gln Asn Pro Trp Lys Glu Cys Asn Thr Arg Arg Met Glu Glu Asp
50 55 60



五、發明說明 (16)

	aac gtc cgc ctg gcg cgg cgc agt agc ggt ggc ggc gcg gtg ttc cac	240
	Asn Val Arg Leu Ala Arg Arg Ser Ser Gly Gly Ala Val Phe His	
	65 70 75 80	
5	gat ctc ggc aat acc tgc ttt acc ttt atg gct ggc aag ccg gag tac	288
	Asp Leu Gly Asn Thr Cys Phe Thr Phe Met Ala Gly Lys Pro Glu Tyr	
	85 90 95	
10	gat aaa act atc tcc acg tcg att gtg ctc aat gcg ctg aac gcg ctc	336
	Asp Lys Thr Ile Ser Thr Ser Ile Val Leu Asn Ala Leu Asn Ala Leu	
	100 105 110	
15	ggc gtc agc gcc gaa gcg tcc gga cgt aac gat ctg gtg gtg aaa acc	384
	Gly Val Ser Ala Glu Ala Ser Gly Arg Asn Asp Leu Val Val Lys Thr	
	115 120 125	
20	gtc gaa ggc gac cgc aaa gtc tca ggc tcg gcc tat cgc gaa acc aaa	432
	Val Glu Gly Asp Arg Lys Val Ser Gly Ser Ala Tyr Arg Glu Thr Lys	
	130 135 140	
25	gat cgc ggc ttc cac cac ggc acc ttg cta ctc aat gcc gac ctc agc	480
	Asp Arg Gly Phe His His Gly Thr Leu Leu Leu Asn Ala Asp Leu Ser	
	145 150 155 160	
30	cgc ctg gca aac tat ctc aat ccg gat aaa aag aaa ctg gcg gcg aaa	528
	Arg Leu Ala Asn Tyr Leu Asn Pro Asp Lys Lys Lys Leu Ala Ala Lys	
	165 170 175	
35	ggc att acg tcg gta cgt tcc cgc gtg acc aac ctc acc gag ctg ttg	576
	Gly Ile Thr Ser Val Arg Ser Arg Val Thr Asn Leu Thr Glu Leu Leu	
	180 185 190	
40	ccg ggg atc acc cat gag cag gtt tgc gag gcc ata acc gag gcc ttt	624
	Pro Gly Ile Thr His Glu Gln Val Cys Glu Ala Ile Thr Glu Ala Phe	
	195 200 205	
45	ttc gcc cat tat ggc gag cgc gtg gaa gcg gaa atc atc tcc ccg aac	672
	Phe Ala His Tyr Gly Glu Arg Val Glu Ala Glu Ile Ile Ser Pro Asn	
	210 215 220	
50	aaa acg cca gac ttg cca aac ttc gcc gaa acc ttt gcc cgc cag agt	720
	Lys Thr Pro Asp Leu Pro Asn Phe Ala Glu Thr Phe Ala Arg Gln Ser	
	225 230 235 240	
55	agc tgg gaa tgg aac ttc ggt cag gct ccg gca ttc tcg cat ctg ctg	768
	Ser Trp Glu Trp Asn Phe Gly Gln Ala Pro Ala Phe Ser His Leu Leu	
	245 250 255	
60	gat gaa cgc ttt acc tgg ggc ggc gtg gaa ctg cat ttc gac gtt gaa	816
	Asp Glu Arg Phe Thr Trp Gly Gly Val Glu Leu His Phe Asp Val Glu	
	260 265 270	
65	aaa ggc cat atc acc cgc gcc cag gtg ttt acc gac agc ctc aac ccc	864
	Lys Gly His Ile Thr Arg Ala Gln Val Phe Thr Asp Ser Leu Asn Pro	
	275 280 285	



五、發明說明 (18)

Arg Leu Ala Asn Tyr Leu Asn Pro Asp Lys Lys Lys Leu Ala Ala Lys
165 170 175

5 Gly Ile Thr Ser Val Arg Ser Arg Val Thr Asn Leu Thr Glu Leu Leu
180 185 190

Pro Gly Ile Thr His Glu Gln Val Cys Glu Ala Ile Thr Glu Ala Phe
195 200 205

10 Phe Ala His Tyr Gly Glu Arg Val Glu Ala Glu Ile Ile Ser Pro Asn
210 215 220

Lys Thr Pro Asp Leu Pro Asn Phe Ala Glu Thr Phe Ala Arg Gln Ser
225 230 235 240

15 Ser Trp Glu Trp Asn Phe Gly Gln Ala Pro Ala Phe Ser His Leu Leu
245 250 255

20 Asp Glu Arg Phe Thr Trp Gly Gly Val Glu Leu His Phe Asp Val Glu
260 265 270

Lys Gly His Ile Thr Arg Ala Gln Val Phe Thr Asp Ser Leu Asn Pro
275 280 285

25 Ala Pro Leu Glu Ala Leu Ala Gly Arg Leu Gln Gly Cys Leu Tyr Arg
290 295 300

Ala Asp Met Leu Gln Gln Glu Cys Glu Ala Leu Leu Val Asp Phe Pro
305 310 315 320

30 Glu Gln Glu Lys Glu Leu Arg Glu Leu Ser Ala Trp Met Ala Gly Ala
325 330 335

Val Arg
35

<210> 3
<211> 30
40 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide
45 lplA-fwd

<400> 3
cgggatccct atctgcgcct gacactcgac 30

50 <210> 4
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
55



五、發明說明 (19)

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide
lplA-rev

5 <400> 4
 cgggatacctt tatctgaacc gccatttgcg ctg 33



圖式簡單說明

第一圖：R- α -硫辛酸在大腸桿菌中之合成；

第二圖：用硫辛醯蛋白質連接酶A之大腸桿菌活化及建構
R- α -硫辛酸。



四、中文發明摘要 (發明名稱：以發酵方式製造 R- α -硫辛酸之方法)

本發明之內容係以發酵方式製造 R- α -硫辛酸之方法，該方法包括在培養基中培養弱化硫辛醯蛋白質連接酶A活性細胞，其特徵為，該細胞分泌對映純 R- α -硫辛酸至培養基內)並將該對映體純 R- α -硫辛酸自該培養基內移除。

伍、(一)、本案代表圖為：第一圖

(二)、本案代表圖之元件代表符號簡單說明：

LipA 基因

LipB 基因

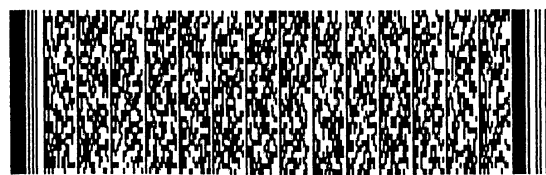
六、英文發明摘要 (發明名稱：Method for the fermentative production of R- α -lipoic acid)

The invention relates to a method for preparing R- α -lipoic acid by means of fermentation, which comprises culturing a cell having an attenuated lipoyl protein ligase A activity in a culture medium, said cell secreting enantiomerically pure R- α -lipoic acid in free form into said culture medium and said enantiomerically pure R- α -lipoic acid being removed from the culture medium.



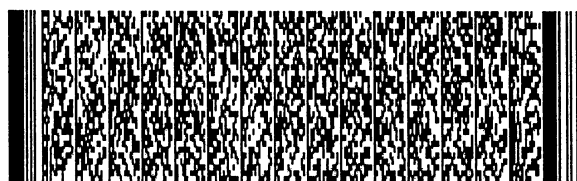
六、申請專利範圍

1. 一種製造對映體純R- α -硫辛酸之方法，其包括在培養基中培養弱化硫辛醯蛋白質連接酶A活性細胞，其特徵為，該細胞分泌對映純R- α -硫辛酸至培養基內)並將該對映體純R- α -硫辛酸自該培養基內移除。
2. 一種分泌對映體純R- α -硫辛酸至培養基內的細胞，該細胞具有弱化硫辛醯蛋白質連接酶A活性，且該細胞具有一lplA對偶基因而不是野生型lplA基因，在鹼基對範圍367-465，鹼取代之結果：lplA蛋白質活性減少至50%，或在lplA基機中有一缺失。
3. 如申請專利範圍第2項之細胞，其中每一個lplA蛋白質活性不再是可偵檢的。
4. 如申請專利範圍第2或3項之細胞，其中該細胞具有更多的硫辛酸合成酶活性或更多的硫辛醯蛋白質連接酶B活性。
5. 如申請專利範圍第2、3或4項之細胞，其中該細胞係該細胞係一微生物，例如：一酵母或細菌菌株。
6. 如申請專利範圍第5項之細胞，其中該細胞係一屬於腸內桿菌科之細菌菌株，尤以大腸桿菌種之菌株更佳。
7. 如申請專利範圍第1項之方法，其中細胞係如申請專利範圍第1、2、3、4、5或6項所用者，具有弱化硫辛醯蛋白質連接酶A活性細胞。
8. 如申請專利範圍第1、2、3、4、5、6或7項之方法，其中對映體純R- α -硫辛酸係藉將培養基施以離心作用而移除，繼之將該R- α -硫辛酸加以萃取或沉澱。



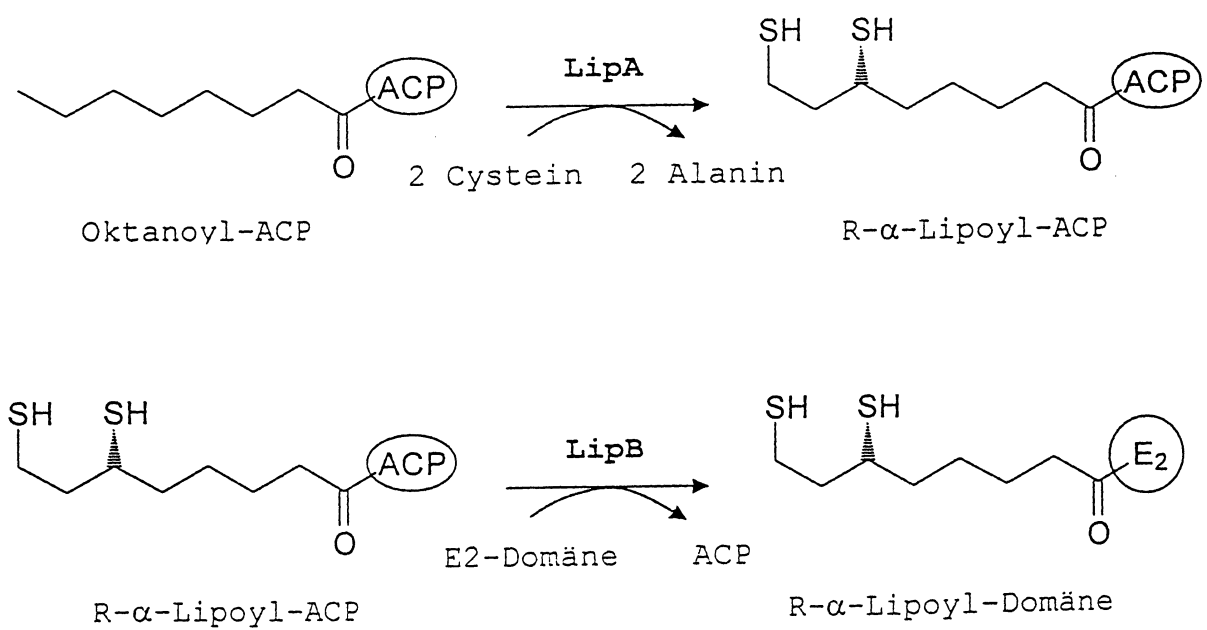
六、申請專利範圍

9. 如申請專利範圍第1、7或8之方法，其中培養基所用之碳源係選自可用的糖類、糖醇類或有機酸類。
10. 如申請專利範圍第1、7、8或9項之方法，其中可於培養基內添加具有C2至C8鏈長度，尤以鏈長C6至C8者更佳（分別為己酸及辛酸）之脂肪酸。
11. 如申請專利範圍第9或10項，其中碳源之濃度為0.1至30公克/公升。
12. 如申請專利範圍第1、7、8、9、10或11項之方法，其中該等細胞係於一以最低鹽介質製成之培養基內、在需氧培養條件下及特別細胞最佳生長溫度範圍內實施保溫，歷時16至150小時。



200426218

第一圖



第二圖

