



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110382701 A

(43)申请公布日 2019.10.25

(21)申请号 201880014592.9

(74)专利代理机构 北京锤维联合知识产权代理

(22)申请日 2018.02.22

有限公司 11579

(30)优先权数据

10-2017-0026774 2017.02.28 KR

代理人 罗银燕

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.08.28

(51)Int.Cl.

C12N 15/70(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

C12N 9/02(2006.01)

PCT/KR2018/002201 2018.02.22

C12N 9/90(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

C12P 17/06(2006.01)

W02018/159957 K0 2018.09.07

(71)申请人 首尔大学校产学协力团

地址 韩国首尔市冠岳区冠岳路1(新林洞)

(72)发明人 金秉祺 李平康 李相赫 金濬园

权利要求书2页 说明书11页 附图11页

(54)发明名称

生产雌马酚衍生物的重组大肠杆菌及利用  
其的雌马酚衍生物合成方法

(57)摘要

本发明涉及利用表达来源于异黄酮转化斯奈克氏菌(*Slackia isoflavoniconvertens*)的酶(大豆昔元还原酶(daidzein reductase)、二氢大豆昔元消旋酶(dihydrodaidzein racemase)、二氢大豆昔元还原酶(dihydrodaidzein reductase)、四氢大豆昔元还原酶(tetrahydrodaidzein reductase))的重组大肠杆菌并从大豆昔元或染料木素(genistein)选择性和有效地合成雌马酚、脱氢雌马酚、5-羟基-雌马酚(5-hydroxy-equol)及5-羟基-脱氢雌马酚(5-hydroxy-dehydroequol)的方法。并且，用于表达上述微生物菌株和5-羟基-雌马酚或5-羟基-脱氢雌马酚的生物转化组合物可用作抗氧化剂、抗癌剂等，并且可用于预防或治疗更年期疾病。

1. 一种重组大肠杆菌，其特征在于，用于表达大豆昔元还原酶、二氢大豆昔元消旋酶、二氢大豆昔元还原酶及四氢大豆昔元还原酶。

2. 一种合成方法，其特征在于，利用权利要求1的重组大肠杆菌从作为底物的大豆昔元合成雌马酚。

3. 一种合成方法，其特征在于，利用权利要求1的重组大肠杆菌从作为底物的染料木素合成5-羟基-雌马酚或5-羟基-脱氢雌马酚。

4. 一种合成方法，其特征在于，利用表达大豆昔元还原酶、二氢大豆昔元消旋酶、二氢大豆昔元还原酶及四氢大豆昔元还原酶且将四种上述酶中的四氢大豆昔元还原酶相比于其余三种酶过表达5倍以上的重组大肠杆菌从作为底物的染料木素选择性地合成5-羟基-雌马酚。

5. 一种合成方法，其特征在于，利用表达大豆昔元还原酶及二氢大豆昔元消旋酶重组大肠杆菌和表达二氢大豆昔元还原酶及四氢大豆昔元还原酶的重组大肠杆菌从作为底物的染料木素选择性地合成5-羟基-雌马酚。

6. 一种合成方法，其特征在于，利用表达大豆昔元还原酶、二氢大豆昔元消旋酶及二氢大豆昔元还原酶而不表达四氢大豆昔元还原酶的重组大肠杆菌从作为底物的大豆昔元选择性地合成脱氢雌马酚。

7. 一种合成方法，其特征在于，利用表达大豆昔元还原酶、二氢大豆昔元消旋酶及二氢大豆昔元还原酶而不表达四氢大豆昔元还原酶的重组大肠杆菌从作为底物的染料木素选择性地合成5-羟基-脱氢雌马酚。

8. 根据权利要求4或5所述的合成方法，其特征在于，上述5-羟基-雌马酚为5-羟基-(S)-雌马酚。

9. 根据权利要求2至7中任一项所述的合成方法，其特征在于，将上述重组大肠杆菌用作全细胞催化剂。

10. 根据权利要求2至7中任一项所述的合成方法，其特征在于，在好氧条件下进行。

11. 根据权利要求2至7中任一项所述的合成方法，其特征在于，使用0.2~1mmol/L的底物。

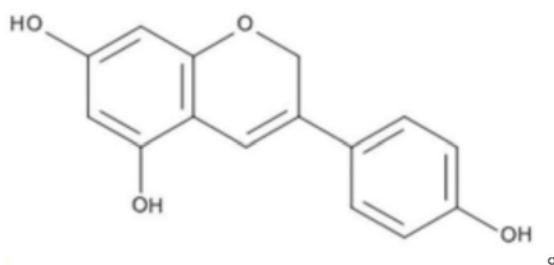
12. 根据权利要求2至7中任一项所述的合成方法，其特征在于，底物转化率为95%以上。

13. 根据权利要求2至7中任一项所述的合成方法，其特征在于，反应体系中还包含水溶性高分子。

14. 根据权利要求13所述的合成方法，其特征在于，上述水溶性高分子作为食品添加用水溶性高分子，是聚乙二醇或聚乙烯吡咯烷酮。

15. 一种5-羟基-脱氢雌马酚，其特征在于，通过权利要求3或7的合成方法合成。

16. 一种5-羟基-脱氢雌马酚，其特征在于，由下述化学式表示：



## 生产雌马酚衍生物的重组大肠杆菌及利用其的雌马酚衍生物合成方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生产雌马酚衍生物的重组大肠杆菌及利用其的雌马酚衍生物合成方法。

### 背景技术

[0002] 人类肠道中的一些厌氧微生物代谢人类通过豆科植物摄取的异黄酮并将其生物转化为雌马酚。到目前为止发现的雌马酚合成微生物都是细菌,代表性地,大多数属于红蝽菌属,例如有斯奈克氏菌属(*Slackia* sp.)、伊格尔兹氏菌属(*Eggerthella* sp.)、阿德勒克罗伊茨菌属(*Adlercreutzia* sp.),例外,还具有来源于乳球菌(*Lactococcus*)的。

[0003] 通过如上所述的肠道微生物的酶促反应产生的雌马酚仅与S构型的光学异构体合成,且其通过被人体吸收而产生植物雌激素(phytoestrogen)效果。因此,在持续摄取雌马酚的情况下,可以缓解女性更年期症状,特别是骨质疏松症的发病和症状,而没有如乳腺癌诱发等以往的更年期症状治疗剂的副作用。这种效果是由于雌马酚的分子结构与人体雌激素具有相似性,且雌激素受体α和β中α的选择性很高。不仅如此,(S)-雌马酚具有可预防心血管疾病并缓解前列腺癌的功效(非专利文献1)。作为雌马酚类似物的5-羟基-雌马酚是来源于作为异黄酮的染料木素(genistein)的物质,据报告,它是一种植物雌激素,其生物功效比雌马酚低,但具有比雌马酚更好的抗氧化性(非专利文献2)。并且,据报告,脱氢雌马酚(dehydroequol)可抑制前列腺癌和卵巢癌细胞的生长,二期临床试验结果显示,对化学抗癌剂具有耐性的卵巢癌具有抑制效果(非专利文献3)。

[0004] 然而,与为了使用肠道微生物合成雌马酚而做出的各种努力和研究相反,为了合成5-羟基-雌马酚而做出的努力受到限制。如下报告,仅生物合成雌马酚的一些肠道微生物可以合成5-羟基-雌马酚。使用在老鼠肠道鉴定的红蝽菌Strain Mt1B8和在人粪便中鉴定的异黄酮转化斯奈克氏菌,染料木素经二氢染料木素生物合成5-羟基-雌马酚(非专利文献4)。但是,使用这些菌株生产5-羟基雌马酚对在厌氧条件下生长微生物具有局限性,微生物接种后至少15小时之后才开始生产5-羟基雌马酚,因此生产率低,由于缺乏标准物质,而存在难以准确预测最终收率的局限性。

[0005] 据报告,异黄酮之一的染料木素通过微生物红蝽杆菌科Strain Mt1B8(*Coriobacteriaceae* Strain Mt1B8)(16)、异黄酮转化斯奈克氏菌(*Slackia isoflavoniconvertens*)(17)、strain AUH-JLC159生物转化成5-羟基-雌马酚,但是反应及培养时间长,即2~3天,并需要厌氧反应条件,在作为底物的染料木素的量为0.6mmol/L以上的情况下,存在转化率下降到80%以下的问题(专利文献1)。

[0006] 合成的5-羟基-雌马酚的1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)基团捕捉效果为(S)-雌马酚的20倍,已被证明可以增加秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)的寿命和抗压性(非专利文献5)。但是,没有阐明5-羟基-雌马酚的其他生理活性。

[0007] 最近,Annett Braune集团于2013年首次鉴定了在乳球菌属及斯奈克氏菌属的细

菌中具有将异黄酮大豆昔元(daidzein)转化成雌马酚的作用的四种酶(非专利文献6)。上述酶由三种还原酶和一种异构酶组成,它们分别为大豆昔元还原酶(daidzein reductase)、二氢大豆昔元消旋酶(dihydrodaidzein racemase)、二氢大豆昔元还原酶(dihydrodaidzein reductase)、四氢大豆昔元还原酶(tetrahydrodaidzein reductase)。

- [0008] 现有技术文献
- [0009] 专利文献
- [0010] 专利文献1:中国专利公报第103275884号
- [0011] 非专利文献
- [0012] 非专利文献1:Nutrition Reviews,69 (8),432-448,2011
- [0013] 非专利文献2:J.Chin.Pharm.Sci.,23 (6),378-384,2014
- [0014] 非专利文献3:Int.J.Gynecol.Cancer,21 (4),633-639,2011
- [0015] 非专利文献4:Applied and Environmental Microbiology,74,4847 (2008) / Applied and Environmental Microbiology,75,1740 (2009)
- [0016] 非专利文献5:Conghui Zhang et al.,J.Chin.Pharm.Sci.,23 (6):378-384,2014
- [0017] 非专利文献6:Appl.Environ.Microbiol.,79 (11),3494,2013。

## 发明内容

- [0018] 技术问题
- [0019] 本发明的目的在于,提供一种表达来源于异黄酮转化斯奈克氏菌的酶的重组大肠杆菌。
- [0020] 并且,本发明的再一目的在于,提供一种作为新型化合物的5-羟基-脱氢雌马酚,并且其合成方法完全没有被提出过。
- [0021] 为此,本发明的另一目的在于,提供一种利用上述重组大肠杆菌并从大豆昔元或染料木素合成雌马酚、脱氢雌马酚、5-羟基-雌马酚或5-羟基-脱氢雌马酚的方法。
- [0022] 并且,本发明的还有一目的在于,提供一种利用组合表达来源于异黄酮转化斯奈克氏菌的四种酶中的两种或三种酶的重组大肠杆菌来选择性和有效地合成5-羟基-雌马酚、脱氢雌马酚及5-羟基-脱氢雌马酚的方法。
- [0023] 解决问题的方案
- [0024] 为了实现上述目的,本发明人制备了表达来源于作为人类肠道微生物的异黄酮转化斯奈克氏菌(*Slackia isoflavoniconvertens*)的大豆昔元还原酶、二氢大豆昔元消旋酶、二氢大豆昔元还原酶、四氢大豆昔元还原酶的重组大肠杆菌以及组合表达上述四种酶中的两种或三种酶的重组大肠杆菌。
- [0025] 并且,本发明的重组大肠杆菌可用作从大豆昔元生物转化为雌马酚(equol)或脱氢雌马酚的全细胞催化剂(whole cell biocatalyst),并且可用作将染料木素选择性地生物转化为5-羟基-雌马酚或5-羟基-脱氢雌马酚的全细胞催化剂。
- [0026] 发明的效果
- [0027] 本发明在好氧条件、底物的浓度为约0.2mmol/L至约1mmol/L的条件下,以95%的底物转化率可生物合成雌马酚、脱氢雌马酚、5-羟基-雌马酚或5-羟基-脱氢雌马酚。
- [0028] 并且,本发明可选择性地生物合成5-羟基-雌马酚、脱氢雌马酚或5-羟基-脱氢雌

马酚。

[0029] 并且,本发明可在好氧条件下,以数小时为单位选择性地合成5-羟基-雌马酚、脱氢雌马酚及5-羟基-脱氢雌马酚,因此可以降低生产费用并获得高附加值,并且可以通过有效的大规模生产来适用于食品和药品的各种用途。

[0030] 并且,在将本发明的重组大肠杆菌用作全细胞催化剂的反应体系中应用额外的氧化还原酶的情况下,可合成各种羟基异黄酮,因此研究价值高。

[0031] 并且,通过本发明合成的化合物可用于预防或治疗更年期疾病,并可用作治疗前列腺癌、卵巢癌的抗癌剂。并且,可用作化妆品或食品添加剂形态的抗氧化剂。

## 附图说明

[0032] 图1为示出根据初始大豆昔元的浓度的(S)-雌马酚的收率的图表。

[0033] 图2为利用表达所有四种重组大肠杆菌的雌马酚、脱氢雌马酚、5-羟基-雌马酚(5-hydroxy-equol)及5-羟基-脱氢雌马酚(5-hydroxy-dehydroequol)合成反应的示意图。

[0034] 图3示出在图2的合成反应中根据反应时间在染料木素(genistein, GSN)、二氢染料木素(dihydrogenistein, DHG)、5-羟基-雌马酚(5-hydroxy-equol, 5OH-EQ)、5-羟基-脱氢雌马酚(5-hydroxy-dehydroequol, 5-OH-DEQ)的反应体系中的浓度( $\mu\text{M}$ )。

[0035] 图4为利用表达两种酶的重组大肠杆菌1及重组大肠杆菌2划分的合成反应的示意图。

[0036] 图5示出在图4的合成反应中根据反应时间在染料木素、二氢染料木素、5-羟基-雌马酚、5-羟基-脱氢雌马酚的反应体系中的浓度( $\mu\text{M}$ )。

[0037] 图6为利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)示出在图2及图4中提及的重组大肠杆菌的细胞提取物中的蛋白质量。

[0038] 图7为在210~320nm的波长范围内利用圆二色性分散计测定椭圆率的图表。

[0039] 图8示出利用表达两种或三种酶的重组大肠杆菌的根据反应时间在脱氢雌马酚的反应体系中的浓度( $\mu\text{M}$ )。

[0040] 图9为示出根据初始染料木素的浓度的底物转化率及5-羟基-脱氢雌马酚的收率的图表。

[0041] 图10的(甲)部分为5-羟基-雌马酚的利用电子轰击质谱(EI-MS)分析的质谱和分子结构,(乙)部分为5-羟基-脱氢雌马酚的质谱和分子结构。

[0042] 图11为示出根据时间在添加作为水溶性高分子的聚乙二醇(polyethylene glycol, 以下称为“PEG”)或聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone, 以下称为“PVP”)的反应液中的(S)-雌马酚的反应体系中的浓度的图表。

## 具体实施方式

[0043] 本发明所使用的术语是在本领域中通常使用的,并且本领域的技术人员都可以理解其含义,在本说明书中简要描述如下:

[0044] (1) 表达:是指包含重组基因的载体的微生物中生产重组蛋白质。

[0045] (2) 载体:是指由单链、双链、圆形或超螺旋脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)组成的多核苷酸。载体由复制起点、启动子、核糖体结合位点、核酸盒和终止物组成,它们在

适当的距离可操作地连接以产生重组蛋白。将编码待表达的重组蛋白的基因插入核酸盒位置。

[0046] (3) 细胞提取物:是指破碎待表达重组蛋白质的微生物后,利用离心机去除固体细胞碎片后的上清液。在本发明中是指表达部分或所有大豆昔元还原酶、二氢大豆昔元消旋酶、二氢大豆昔元还原酶、四氢大豆昔元还原酶的微生物提取物。

[0047] (4) 全细胞反应:是指通过破碎包含特定酶的细胞并使用细胞提取物或者使用未分离纯化酶的完整的细胞整体的反应。

[0048] 本发明涉及用于表达大豆昔元还原酶、二氢大豆昔元消旋酶、二氢大豆昔元还原酶及四氢大豆昔元还原酶的重组大肠杆菌。

[0049] 在本发明中,通过聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增对应于来源于异黄酮转化斯奈克氏菌(*Slackia isoflavoniconvertens*)的大豆昔元还原酶、二氢大豆昔元消旋酶、二氢大豆昔元还原酶、四氢大豆昔元还原酶的脱氧核糖核酸序列后,分别放入pRSFDuet或pCDFDuet载体中,并在大肠杆菌(*E.coli*)中与His标签(his-tag)(6组氨酸(6histidine))进行表达。

[0050] 上述重组大肠杆菌可在从作为底物的大豆昔元合成雌马酚或脱氢雌马酚中利用。

[0051] 并且,上述重组大肠杆菌可在从作为底物的染料木素合成5-羟基-雌马酚或5-羟基-脱氢雌马酚中利用。

[0052] 上述雌马酚或5-羟基-雌马酚合成方法可在合成(S)-雌马酚或5-羟基-(S)-雌马酚中利用。

[0053] 更具体地,上述重组大肠杆菌可用作从大豆昔元生物转化雌马酚及脱氢雌马酚的全细胞催化剂,并且,可用作将染料木素生物转化为5-羟基-雌马酚及5-羟基-脱氢雌马酚(5-hydroxy-dehyroequol)的全细胞催化剂。

[0054] 在将本发明的重组大肠杆菌用作全细胞催化剂的雌马酚合成反应中,通过添加还原剂来抑制产物的氧化,作为还原剂可使用NAD(P)H、L-抗坏血酸、谷胱甘肽(glutathione)、二硫苏糖醇(dithiothreitol)、半胱氨酸(cysteine)等。优选地,添加的还原剂的浓度为初始底物浓度的约10倍至约100倍。反应液含有用于pH缓冲作用的磷酸钾缓冲液,优选地,磷酸钾的浓度为约50mM至约400mM。优选地,反应温度为约18°C至约37°C,更优选地,为约25°C至约30°C。优选地,反应液的pH为约5至约10,更优选地,为约6至约9,更加优选地,为约7至约8。优选地,反应器的搅拌速度为约50rpm至约400rpm,更优选地,为约80rpm至约250rpm,更加优选地,为约100rpm至约200rpm。

[0055] 葡萄糖和甘油可用作上述雌马酚合成反应器中的碳源,优选地,葡萄糖或甘油的浓度为约1(w/v)%至约5(w/v)%,更优选地,为约1.5(w/v)%至约4(w/v)%,更加优选地,为约2(w/v)%至约3(w/v)%.本发明的重组微生物的浓度为约光学密度(Optical Density,以下O.D.)1至光学密度100,更优选地,为约0.D.5至约0.D.50,更加优选地,为约0.D.10至约0.D.30。

[0056] 根据所要合成的异黄烷(isoflavan)或异黄酮(isoflavene)的种类,作为上述雌马酚合成反应体系的底物可使用染料木素、黄豆黄素(glycitein)、大豆昔元、邻羟基大豆昔元(ortho-hydroxy-daidzein),邻羟基-染料木素(ortho-hydroxy-genistein)等。

[0057] 为了提高对上述底物的反应液的溶解度,可使用聚乙二醇(polyethylene

glycol)、聚乙烯吡咯烷酮(polyvinyl pyrrolidone)、聚乙烯醇(polyvinyl alcohol)及 $\beta$ -环糊精( $\beta$ -cyclodextrin)、甲基 $\beta$ -环糊精(methyl- $\beta$ -cyclodextrin)、2-羟丙基 $\beta$ -环糊精(2-(Hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin)等。

[0058] 图1为示出根据初始大豆昔元的浓度的(S)-雌马酚的收率的图表,如图1所示,(S)-雌马酚的收率(%)随着初始大豆昔元的浓度增加而减少,但是生产的(S)-雌马酚(mM)趋于增加。

[0059] 图2为示出利用从大豆昔元及染料木素表达大豆昔元还原酶(daidzein reductase:DZNR)、二氢大豆昔元消旋酶(dihydrodaidzein racemase:DDRC)、二氢大豆昔元还原酶(dihydrodaidzein reductase:DHDR),四氢大豆昔元还原酶(tetrahydrodaidzein reductase:THDR)的重组大肠杆菌的雌马酚、脱氢雌马酚、5-羟基-雌马酚及5-羟基-脱氢雌马酚合成反应的示意图。

[0060] 如上述图2所示,大豆昔元通过大豆昔元还原酶(DZNR)转化为(R)-二氢大豆昔元,其通过二氢大豆昔元消旋酶(DDRC)转化为(S)-二氢大豆昔元。(S)-二氢大豆昔元通过二氢大豆昔元还原酶(DHDR)转化为(3S,4R)-反式-四氢大豆昔元,其通过四氢大豆昔元还原酶(THDR)转化为雌马酚,或者通过脱水转化为脱氢雌马酚。

[0061] 并且,如上述图2所示,染料木素通过大豆昔元还原酶(DZNR)转化为(R)-二氢染料木素,其通过二氢大豆昔元消旋酶(DDRC)转化为(S)-二氢染料木素。(S)-二氢染料木素通过二氢大豆昔元还原酶(DHDR)转化为(3S,4R)-反式-四氢染料木素,其通过四氢大豆昔元还原酶(THDR)转化为5-羟基-雌马酚,或者通过脱水转化为5-羟基-脱氢雌马酚。

[0062] 本发明涉及利用表达大豆昔元还原酶、二氢大豆昔元消旋酶、二氢大豆昔元还原酶及四氢大豆昔元还原酶且将四种上述酶中的四氢大豆昔元还原酶相比于其余三种酶过表达5倍以上的重组大肠杆菌从作为底物的染料木素选择性地合成5-羟基-雌马酚的方法。

[0063] 具体地,若利用四氢大豆昔元还原酶相比于其余三种酶过表达5倍以上,优选地,过表达10倍以上的重组大肠杆菌,则可选择性地合成5-羟基-雌马酚。

[0064] 如图2所示,这是因为,若增加四氢大豆昔元还原酶的表达量,则增加从四氢染料木素合成5-羟基-雌马酚的速度,从而竞争性地抑制5-羟基-脱氢雌马酚的生成。

[0065] 上述重组大肠杆菌的表达方法及利用其的5-羟基-雌马酚和合成方法与如上所述的表达来源于异黄酮转化斯奈克氏菌的所有四种酶的重组大肠杆菌的制备方法及利用其的雌马酚合成方法相同。

[0066] 图6为利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)示出在图2及图4中提及的重组大肠杆菌的细胞提取物中的蛋白质量,在四种酶的表达量中,相比于在一个大肠杆菌中表达四种重组酶时,在用一个载体表达大豆昔元还原酶和二氢大豆昔元消旋酶的重组大肠杆菌以及用一个载体表达二氢大豆昔元还原酶和四氢大豆昔元还原酶的重组大肠杆菌中酶的表达量增加。在图6中,1:DDDT是在图2中提及的在一个大肠杆菌中表达四种重组酶时的情况,2:DD对应于图4中的用一个载体表达大豆昔元还原酶和二氢大豆昔元消旋酶的重组大肠杆菌的细胞提取物,3:DT对应于图4中的用一个载体表达二氢大豆昔元还原酶和四氢大豆昔元还原酶的重组大肠杆菌的细胞提取物。

[0067] 图5示出根据反应时间在染料木素、二氢染料木素、5-羟基-雌马酚、5-羟基-脱氢雌马酚的反应体系中的浓度( $\mu$ M),若将四氢大豆昔元还原酶的表达量相比于其余三种酶增

加5倍以上的重组大肠杆菌用于系统中(图6的2及3),则与表达所有四种酶的重组大肠杆菌有关的图2相比,可增加5-羟基-雌马酚的收率及生产性和针对于5-羟基-脱氢雌马酚的5-羟基-雌马酚的选择性。

[0068] 并且,本发明涉及利用表达大豆昔元还原酶及二氢大豆昔元消旋酶的重组大肠杆菌1和表达四氢大豆昔元还原酶及四氢大豆昔元还原酶的重组大肠杆菌2从作为底物的染料木素选择性地合成5-羟基-雌马酚的方法。

[0069] 可通过将上述重组大肠杆菌1及重组大肠杆菌2混合成全细胞催化剂的生物转化反应体系,从染料木素选择性地合成5-羟基-雌马酚。

[0070] 本发明的重组大肠杆菌1及重组大肠杆菌2的表达方法及利用其的5-羟基-雌马酚合成方法与如上所述的表达来源于异黄酮转化斯奈克氏菌的所有四种重组酶的方法及利用其的雌马酚合成方法相同。

[0071] 上述重组大肠杆菌1及重组大肠杆菌2的混合反应体系不仅可应用于5-羟基-雌马酚的选择性生产,而且可应用于雌马酚、6-甲氧基-雌马酚(6-Methoxy-equol)及多种羟基-雌马酚(Hydroxy-equol)等的生产中。

[0072] 图4示出通过用一个载体表达大豆昔元还原酶、二氢大豆昔元消旋酶的重组大肠杆菌和用一个载体表达二氢大豆昔元还原酶、四氢大豆昔元还原酶的另一种重组大肠杆菌将反应划分的全细胞反应体系。

[0073] 根据上述图4,染料木素通过上述重组大肠杆菌1转化为(S)-二氢染料木素,(S)-二氢染料木素通过上述重组大肠杆菌2转化为5-羟基-(S)-雌马酚,因此,可通过重组大肠杆菌1及重组大肠杆菌2从染料木素选择性地合成5-羟基-雌马酚。

[0074] 由不同的重组大肠杆菌将反应划分的全细胞反应体系在5-羟基-(S)-雌马酚的生产性及最终收率得以提高方面有利,并且在通过减少作为副产物的5-羟基-脱氢雌马酚的生成来增加对5-羟基-(S)-雌马酚的选择性方面优秀。

[0075] 选择性地合成上述5-羟基-雌马酚的方法可选择性地合成5-羟基-(S)-雌马酚。

[0076] 具体地,可利用四氢大豆昔元还原酶过表达5倍以上的重组大肠杆菌或上述重组大肠杆菌1及重组大肠杆菌2选择性地合成5-羟基-(S)-雌马酚。

[0077] 与此相关,图7是为了了解利用上述重组大肠杆菌合成的5-羟基-雌马酚的光学结构,而在210~320nm的波长范围内利用圆二色性分散计测定椭圆率的图表,可确认通过本发明的重组大肠杆菌生物合成的5-羟基-雌马酚在3号碳中具有S-构型。

[0078] 进一步地,本发明涉及利用表达大豆昔元还原酶、二氢大豆昔元消旋酶及二氢大豆昔元还原酶而不表达四氢大豆昔元还原酶的重组大肠杆菌从作为底物的大豆昔元选择性地合成脱氢雌马酚的方法。

[0079] 具体地,可将上述重组大肠杆菌用作全细胞催化剂来从大豆昔元选择性地合成脱氢雌马酚。

[0080] 若向合成上述脱氢雌马酚的反应液中添加硼酸,则促进(3S,4R)-反式-四氢大豆昔元的脱水反应,因此能够以高收率合成脱氢雌马酚。优选地,添加的硼酸的量为约50mM至约200mM。

[0081] 并且,本发明涉及利用表达大豆昔元还原酶、二氢大豆昔元消旋酶及二氢大豆昔元还原酶而不表达四氢大豆昔元还原酶的重组大肠杆菌从作为底物的染料木素选择性地

合成5-羟基-脱氢雌马酚的方法。

[0082] 具体地,可将上述重组大肠杆菌用作全细胞催化剂来从染料木素选择性地合成5-羟基-脱氢雌马酚。

[0083] 上述本发明的重组大肠杆菌的表达方法及利用其的脱氢雌马酚或5-羟基-脱氢雌马酚合成方法与如上所述的表达来源于异黄酮转化斯奈克氏菌的所有四种酶的重组酶的表达方法及利用其的雌马酚合成方法相同。

[0084] 图8为示出当利用表达大豆昔元还原酶、二氢大豆昔元还原酶的重组大肠杆菌(DZNR+DHDR)和表达大豆昔元还原酶、二氢大豆昔元消旋酶、二氢大豆昔元还原酶的重组大肠杆菌(DZNR+DDRC+DHDR)对大豆昔元进行全细胞反应时,根据反应时间在脱氢雌马酚的反应体系中的浓度的图表。如图8所示,可利用上述重组大肠杆菌从大豆昔元选择性地合成脱氢雌马酚,而没有生成雌马酚,并且相比于表达两种酶的重组大肠杆菌(DZNR+DHDR),利用表达三种酶的重组大肠杆菌(DZNR+DDRC+DHDR)时生成的脱氢雌马酚的浓度高。

[0085] 图9为示出当利用表达大豆昔元还原酶、二氢大豆昔元消旋酶、二氢大豆昔元还原酶的重组大肠杆菌对染料木素进行全细胞反应时,根据初始染料木素的浓度的底物转化率及5-羟基-脱氢雌马酚的收率的图表,如图9所示,可利用上述重组大肠杆菌从染料木素选择性地合成5-羟基-脱氢雌马酚。

[0086] 本发明的重组大肠杆菌可用作全细胞催化剂。全细胞催化剂用于多种生物催化反应中,在常温常压条件下进行反应,并具有反应特性优秀的优点。在必须需要辅酶或伴随多个步骤的反应的工序或者在纯化时酶的活性显著减少的情况等中,使用全细胞更有利于进行生物催化。并且,当在反应结束后纯化产物时,利用离心机可选择性分离用作全细胞的重组大肠杆菌而有利。

[0087] 上述合成的雌马酚、脱氢雌马酚、5-羟基-雌马酚或5-羟基-脱氢雌马酚合成方法可在好氧条件下进行,因此与在厌氧条件下合成雌马酚的现有技术相比,可在温和的条件下合成雌马酚。因此,本发明的合成方法不需要用于提供现有技术中的厌氧条件的装置或技术。

[0088] 上述合成的雌马酚,脱氢雌马酚,5-羟基-雌马酚或5-羟基-脱氢雌马酚合成方法可使用约0.2mmol/L至约5mmol/L的底物。

[0089] 在作为底物的大豆昔元或染料木素的浓度小于0.2mmol/L的情况下,合成的雌马酚、脱氢雌马酚、5-羟基-雌马酚及5-羟基-脱氢雌马酚的量不足或纯化费用也可能变高,在大于5mmol/L的情况下,由于底物转化率减少,而有可能发生额外的纯化费用。

[0090] 优选地,底物的浓度为约0.2mmol/L至1mmol/L,更优选地,底物的浓度为约0.8mmol/L至约1mmol/L。

[0091] 但是,在反应体系还包含水溶性高分子的情况下,即使底物的浓度大于1mmol/L,也能够以高收率合成雌马酚、脱氢雌马酚、5-羟基-雌马酚或5-羟基-脱氢雌马酚,因此,优选地,底物的浓度为约3mmol/L至5mmol/L。

[0092] 上述雌马酚或脱氢雌马酚合成方法的大豆昔元的转化率为95%以上,上述5-羟基-雌马酚或5-羟基-脱氢雌马酚合成方法的染料木素的转化率为95%以上。

[0093] 上述转化率由(减少的底物的浓度/初始底物的浓度)×100(%)表示。

[0094] 并且,本发明的合成方法在底物的浓度为0.6mmol/L以上,底物转化率也可以为

95%以上。

[0095] 图3及图5示出根据反应时间在染料木素、二氢染料木素、5-羟基-雌马酚的反应体系中的浓度(μM),在反应时间经过10小时后底物转化率为95%以上。

[0096] 在上述雌马酚、脱氢雌马酚、5-羟基-雌马酚或5-羟基-脱氢雌马酚合成方法中,反应体系中还可包含水溶性高分子。并且,上述水溶性高分子可使用食品添加用水溶性高分子。

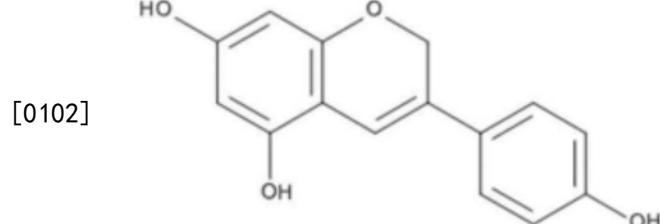
[0097] 例如,作为水溶性高分子可利用聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯醇及β-环糊精、甲基β-环糊精、2-羟丙基β-环糊精等。优选地,可利用聚乙二醇、聚乙烯醇或聚乙烯吡咯烷酮。

[0098] 通过在反应体系中进一步包含水溶性高分子,反应体系中的底物的溶解度增加,因此制备的雌马酚、脱氢雌马酚、5-羟基-雌马酚或5-羟基-脱氢雌马酚的最终收率可能增加。

[0099] 图11为示出根据时间在实施例1的反应液中进一步添加作为水溶性高分子的聚乙二醇或聚乙烯吡咯烷酮的反应液中的(S)-雌马酚的反应体系中的浓度的图表。如图11所示,在反应液进一步包含聚乙二醇(PEG)或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)的情况下,即使使用5mmol/L的底物,也能够以高收率合成雌马酚。

[0100] 并且,本发明涉及通过如上所述的本发明的合成方法制备的雌马酚、脱氢雌马酚、5-羟基-雌马酚或5-羟基-脱氢雌马酚。

[0101] 尤其,通过本发明的合成方法制备的5-羟基-脱氢雌马酚是以往未知的新型化合物,可由下述化学式来表示。



[0103] 本发明在好氧条件下能够以底物的高转化率合成(S)-雌马酚,合成的雌马酚具有与雌激素类似的分子结构,因此可缓解女性更年期症状,特别是骨质疏松症的发病急症状,而没有如乳腺癌诱发等以往的更年期症状治疗剂的副作用,并预防心血管疾病,可缓解前列腺癌。

[0104] 并且,在本发明中合成的脱氢雌马酚可用作用于治疗前列腺癌、卵巢癌的抗癌剂。

[0105] 并且,本发明可在好氧条件下,能够以数小时为单位进行5-羟基-雌马酚、脱氢雌马酚及5-羟基-脱氢雌马酚的选择性地合成,因此可以降低生产费用并获得高附加值,并且可以通过有效的大规模生产来适用于食品和药品的各种用途。

[0106] 并且,在将本发明的重组大肠杆菌用作全细胞催化剂的反应体系中应用额外的氧化还原酶的情况下,可合成各种羟基异黄酮,因此研究价值高。

[0107] 具体地,作为氧化还原酶可使用酪氨酸酶。细胞色素P450或黄素单加氧酶等,可合成羟基异黄酮,如3'-羟基-雌马酚、6-羟基-雌马酚、8-羟基-雌马酚、6,3'-二羟基-雌马酚。

[0108] 并且,通过本发明合成的5-羟基-雌马酚或5-羟基-脱氢雌马酚可用于预防或治疗更年期疾病,并可用作治疗前列腺癌、卵巢癌的抗癌剂。并且,可用作化妆品或食品添加剂

形态的抗氧化剂。

[0109] 以下,通过实施例对本发明的具体方法进行详细说明,但本发明的技术范围并不限于此。

[0110] 重组大肠杆菌的制备方法

[0111] 通过聚合酶链式反应扩增对应于大豆昔元还原酶、二氢大豆昔元消旋酶、二氢大豆昔元还原酶、四氢大豆昔元还原酶的脱氧核糖核酸序列后,分别放入pRSFDuet或pCDFDuet载体中,并在大肠杆菌中与His标签(6组氨酸)进行表达。

[0112] 具体地,将插入上述酶的碱基序列的质粒(plasmid)转化到BL21感受态细胞(competent cell)后,分别在包含对应质粒的抗生素的LB固体培养基中于37℃的培养器中培养12小时。将一个菌落接种于包含抗生素的3mL的LB液体培养基中,并在37℃的培养器中以200rpm的速度培养12小时。将2v% (1mL)的此培养液接种于包含50mL的抗生素的新LB液体培养基中。若培养液的O.D. (600nm)达到0.6~0.8,则加入0.1mM的异丙基硫代半乳糖苷(IPTG)和0.1mM的MnSO<sub>4</sub>,并在18℃的培养器中以200rpm诱导蛋白质表达18小时。18小时后,将细胞以4000rpm离心并用25mL的磷酸盐缓冲液(PBS)清洗来准备。

[0113] 利用本发明的重组大肠杆菌的全细胞反应体系中的雌马酚的生产方法(反应法1)

[0114] 作为反应器使用10~1000mL的透明的玻璃反应器,向反应器中提供如下的浓度的重组大肠杆菌及底物。

[0115] 向反应中添加初始底物浓度的10倍的L-抗坏血酸作为还原剂,并且反应液中包含200mmol/L浓度的用于pH缓冲作用的磷酸钾缓冲液,反应温度为30℃。反应液的pH为8,反应器的搅拌速度为150rpm。使用葡萄糖或甘油作为本发明的反应器中的碳源,葡萄糖或甘油的浓度为2(w/v)%,重组微生物的浓度为O.D.10或O.D.20。

[0116] 实施例

[0117] 实施例1:利用表达参与雌马酚转化的所有四种酶的重组大肠杆菌并从大豆昔元合成(S)-雌马酚

[0118] 对于0.2~5mM的大豆昔元,利用表达O.D.10的四种上述酶的重组大肠杆菌以与反应法1相同的方式进行反应。底物、中间体、产物用4倍以上的乙酸乙酯(ethyl acetate,以下称为“EA”)提取,利用离心减压器去除溶剂后,在规定量的甲醇中重新溶解并通过高效液相色谱确认物质的反应性和浓度。如图1中表示的(S)-雌马酚收率,可确认在0.2mM下收率为95%以上,在0.4mM、0.6mM下为80%以上,在2mM下为50%以上,在5mM下为20%以上。

[0119] 实施例2:利用表达参与雌马酚转化的所有四种酶的重组大肠杆菌并从染料木素合成5-羟基-雌马酚或5-羟基-脱氢雌马酚

[0120] 对于500μM的染料木素(图2),利用表达O.D.10的四种上述酶的重组大肠杆菌以与反应法1相同的方式进行反应。底物、中间体、产物用4倍以上的乙酸乙酯(ethyl acetate,以下称为“EA”)提取,利用离心减压器去除溶剂后,在规定量的甲醇中重新溶解并通过高效液相色谱确认物质的反应性和浓度。在反应6小时时确认500μM的染料木素转化99%以上,并生成97mg/L的5-羟基-雌马酚、22mg/L的5-羟基-脱氢雌马酚。

[0121] 通过如上所述的组成,对1mM的染料木素通过反应法1进行反应,从图3中可知,在10小时的反应时间内底物转化率为95%以上,并可生产199mg/L的5-羟基-雌马酚、63mg/L的5-羟基-脱氢雌马酚。

[0122] 实施例3:利用划分的反应体系的5-羟基-雌马酚的选择性地合成如图4的示意图,建立了将表达大豆昔元还原酶和二氢大豆昔元消旋酶的重组大肠杆菌1和表达二氢大豆昔元还原酶及四氢大豆昔元还原酶的重组大肠杆菌2混合成全细胞催化剂的生物转化反应体系。根据反应法1使1mM的染料木素进行反应时,如图5所示,通过液相色谱确认根据反应时间的底物产物的浓度。本反应体系中在10小时的反应时间内底物转化率为99%以上,并生产231mg/L的5-羟基-雌马酚、12mg/L的5-羟基-脱氢雌马酚。比较生产结果与实施例1的结果,5-羟基-雌马酚的生产性增加1.6倍,被定义为5-羟基雌马酚浓度/5-羟基-脱氢雌马酚的浓度的对于5-羟基-雌马酚的选择性增加5倍。

[0123] 并且,为了比较四种酶的表达量,通过超声波处理来破碎实施例2中的重组大肠杆菌及实施例3中的重组大肠杆菌1及重组大肠杆菌2的细胞提取物,将细胞提取物以13000rpm在4℃的条件下离心30分钟后,如图6所示,通过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析上清液。

[0124] 分析结果,对于四种酶的表达量,相比于实施例2中使用的大肠杆菌,在实施例3中使用的两种重组大肠杆菌种均增加。其中,四氢大豆昔元还原酶的表达量显著增加,相比于实施例1的大肠杆菌破碎液,增加20倍以上,相比于其余三种酶的表达量过表达5倍以上。

[0125] 实施例4:5-羟基-雌马酚的光学异构体分析

[0126] 为了确定用本发明的重组大肠杆菌合成的5-羟基-雌马酚的光学结构,进行了圆二向色散光谱分析。测度波长范围在210~320nm,并使用了圆二色性分散计ChirascanTM plus CD光谱仪(ChirascanTM plus CD spectrometer)(英国应用光物理公司(Applied Photophysics, UK))。将试样以1.5mg/ml的浓度溶解于纯甲醇后,进行测定。

[0127] 测定结果如图7的曲线图所示,在238nm处具有较高的阴性cotton效应,在270nm处具有较高的阳性cotton效应。因此,可确认通过本发明的重组大肠杆菌生物合成的5-羟基雌马酚在3号碳具有S-构型。

[0128] 实施例5:脱氢雌马酚的选择性地合成

[0129] 为了生物合成脱氢雌马酚,在实施例1的重组大肠杆菌中,制备了缺失四氢大豆昔元还原酶,并含有或不含有二氢大豆昔元消旋酶(DZNR+DDRC+DHDR,以下DDD菌株)的重组大肠杆菌(DZNR+DHDR,以下DD菌株)。利用上述的大肠杆菌并根据反应法1,并进行了以大豆昔元为底物的反应,向反应液中进一步添加了200mM的硼酸。其结果,确认仅生成脱氢雌马酚,而没有生成雌马酚(图8),具体地,当以初始大豆昔元的浓度为0.5mM开始生物反应并进行2小时时,在DD菌株中合成28μM的脱氢雌马酚,在DDD菌株中合成60μM的脱氢雌马酚。

[0130] 实施例6:5-羟基-脱氢雌马酚的选择性地合成

[0131] 为了生物合成5-羟基-脱氢雌马酚,在实施例2的重组大肠杆菌中,制备质粒中缺失四氢大豆昔元还原酶的重组大肠杆菌。利用上述的大肠杆菌并根据反应法1,并进行了以染料木素为底物的反应,确认仅生成5-羟基-脱氢雌马酚,而没有生成5-羟基-雌马酚(图9)。当以初始染料木素的浓度为0.2mM、0.4mM、0.6mM、1.0mM开始生物转化反应并进行36小时时,在0.6mM以下染料木素的转化率为99%以上,在1.0mM中染料木素的转化率为97%。5-羟基-脱氢雌马酚的转化收率分别为44%、35%、27%、39%。

[0132] 实施例7:5-羟基-雌马酚及5-羟基-脱氢雌马酚的质量分析

[0133] 通过气相色谱-质谱仪(GC-MS)鉴定在实施例3和实施例6中合成的5-羟基-雌马酚

及5-羟基-脱氢雌马酚,其结果如图10所示。

[0134] 通过电子轰击质谱分析利用上述重组微生物合成的5-羟基-雌马酚及5-羟基-二氢-雌马酚。电子轰击质谱使用了Thermo公司的TRACE GC超级气相色谱仪/ITQ1100 (TRACE GC Ultra gas chromatograph/ITQ1100)。在阳性模式中,使用非极性毛细管柱 (TR-5ms), 氦气流速为1mL/min, 入口 (inlet)、传质线 (mass transfer line) 和离子源 (ion source) 温度分别为250°C、275°C、230°C。将气相色谱仪的烘箱温度保持在65°C的温度下5分钟后, 以3°C/min的速率升至250°C。电离化电压为70eV, 测得的质量范围为50~600amu。

[0135] 电子轰击质谱分析结果与先前报告的DHD的光谱相同 (Chang, Y.C., and M.G.Nair. J.Natr.Proc. 58:1892-1896, 1995; Wahala, K., A.Salakka, and H.Adlercreutz .Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 217:293-29, 1998)。合成的化合物的电子轰击质谱显示  $[M+H]^+$  的分子离子峰与如预期的m/z 256处的C15H12O4 (DHD) 一致。合成的化合物的其他离子峰为137 (100)、120 (52)、91 (36)、65 (16)。

[0136] 实施例8:在额外包含水溶性高分子的反应体系中雌马酚的合成

[0137] 为了提高大豆昔元对反应液的溶解度,除了包含二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, 以下DMSO)、并额外包含聚乙二醇 (PEG) 或聚乙烯吡咯烷酮 (PVP) 的之外,以与实施例1相同的方式进行反应。

[0138] 具体地,为了增加在5mM的大豆昔元中的雌马酚收率,在进一步包含5% (w/v) 的水溶性高分子聚乙二醇或聚乙烯吡咯烷酮的反应器中进行反应,在添加聚乙烯吡咯烷酮的反应的情况下,在12小时的反应中合成5mM的雌马酚(收率为99%以上,1.16g/L),在添加聚乙二醇的反应的情况下,在24小时的反应中合成3.7mM的雌马酚(收率为74%以上,0.9g/L)。

[0139] 根据上述实施例1及实施例2,可通过表达来源于异黄酮转化斯奈克氏菌的四种酶的重组大肠杆菌,在好氧条件下在数小时内以高收率从大豆昔元合成(S)-雌马酚,或者从染料木素合成5-羟基-雌马酚及5-羟基-脱氢雌马酚。

[0140] 在上述实施例3、实施例5及实施例6中,利用组合四种酶中的两种或三种酶的重组大肠杆菌,可分别选择性地合成5-羟基-雌马酚、脱氢雌马酚或5-羟基-脱氢雌马酚。

[0141] 并且,可确认通过上述实施例4及实施例7,根据实施例2、实施例3及实施例6的重组大肠杆菌可合成5-羟基-(S)-雌马酚或5-羟基-脱氢雌马酚。

[0142] 并且,在上述实施例8中,相比于不含水溶性高分子的反应体系(实施例1),反应体系进一步包含水溶性高分子的雌马酚的收率更优秀。

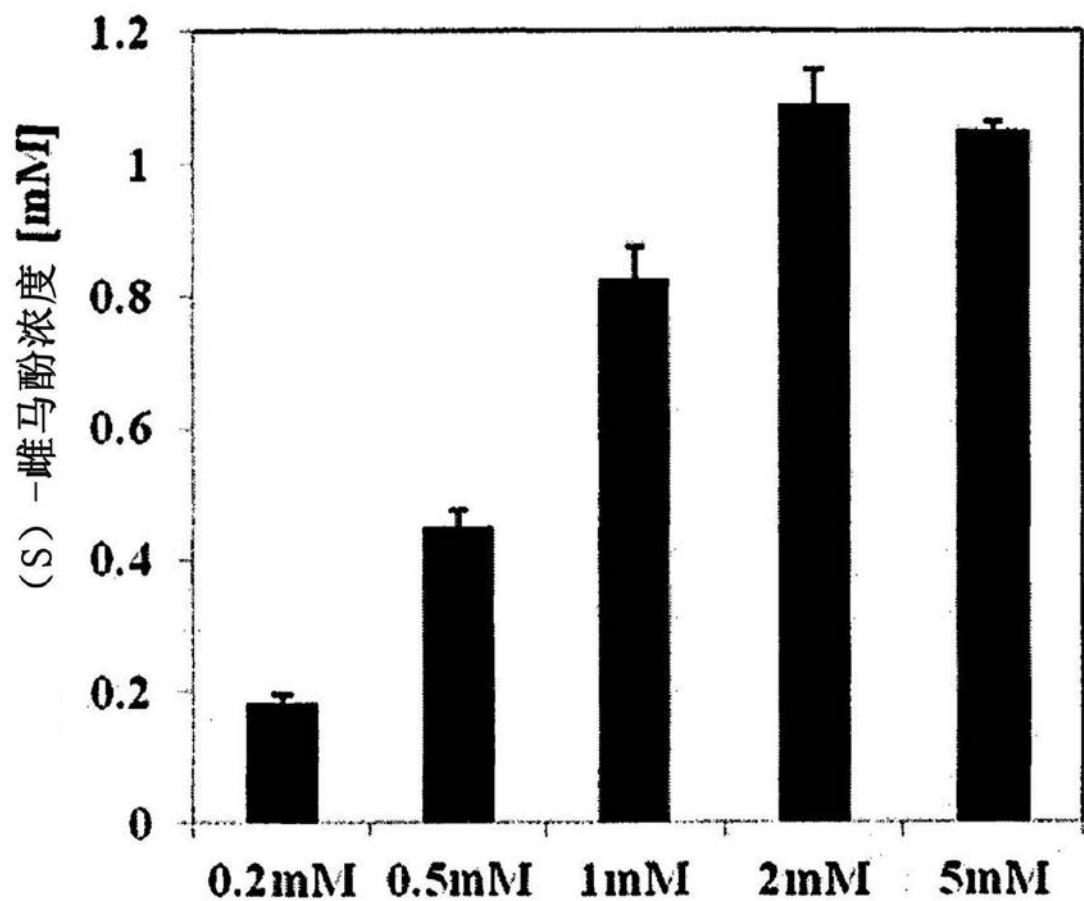


图1

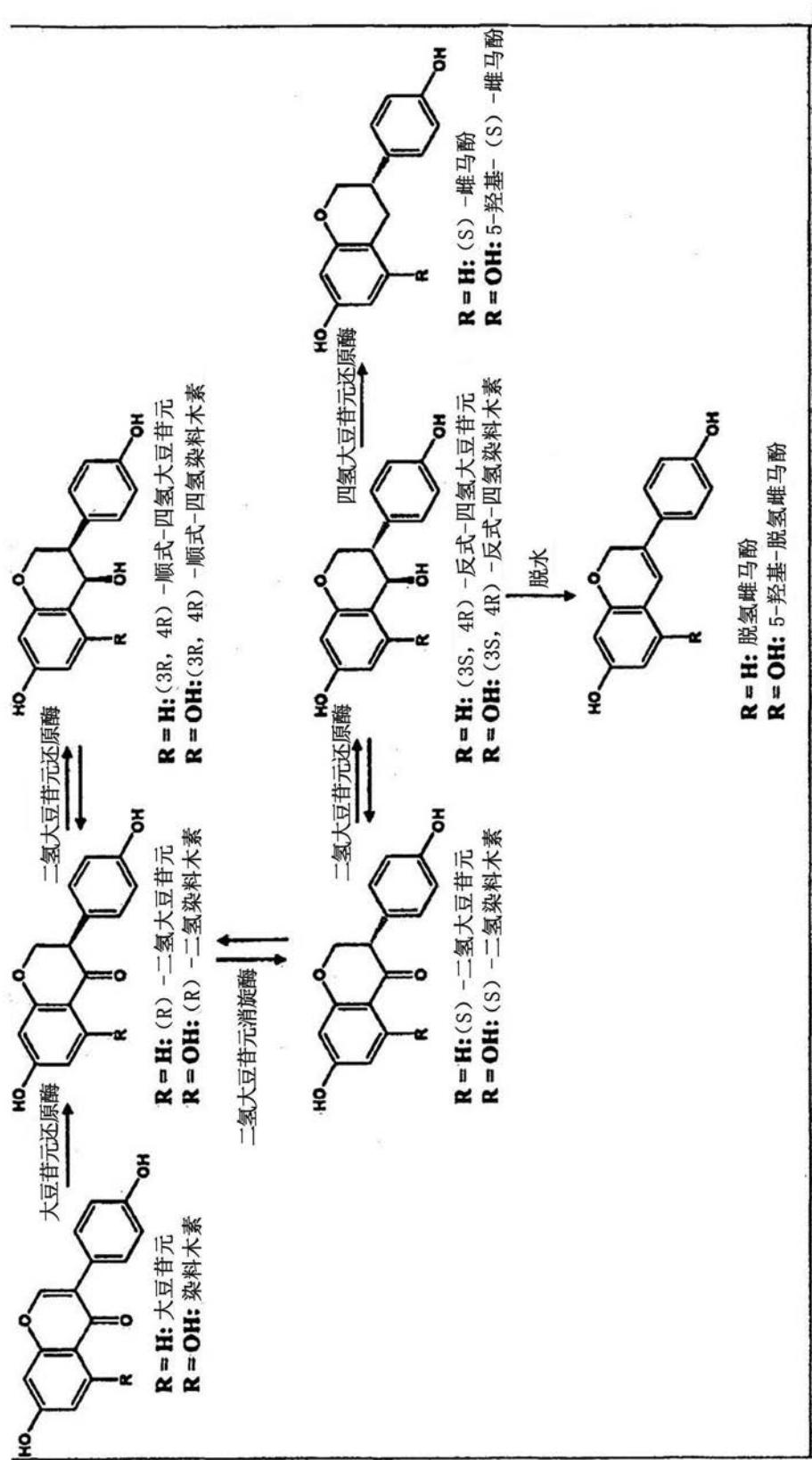


图2

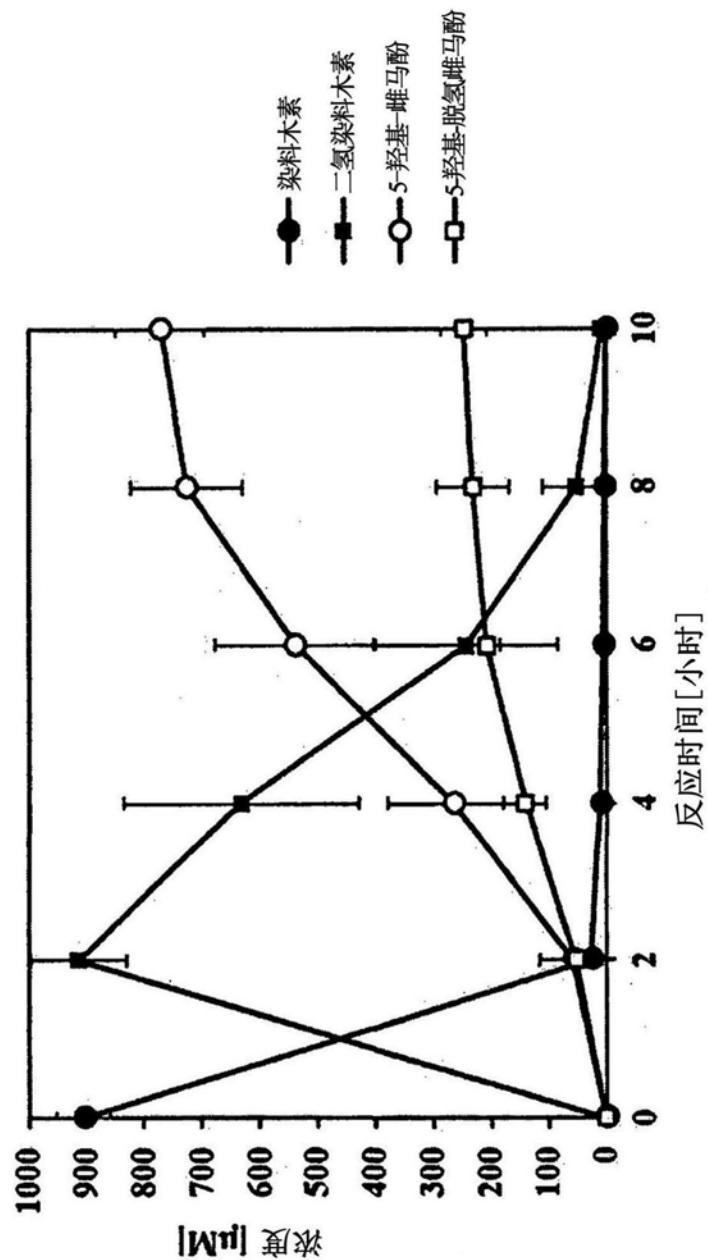


图3

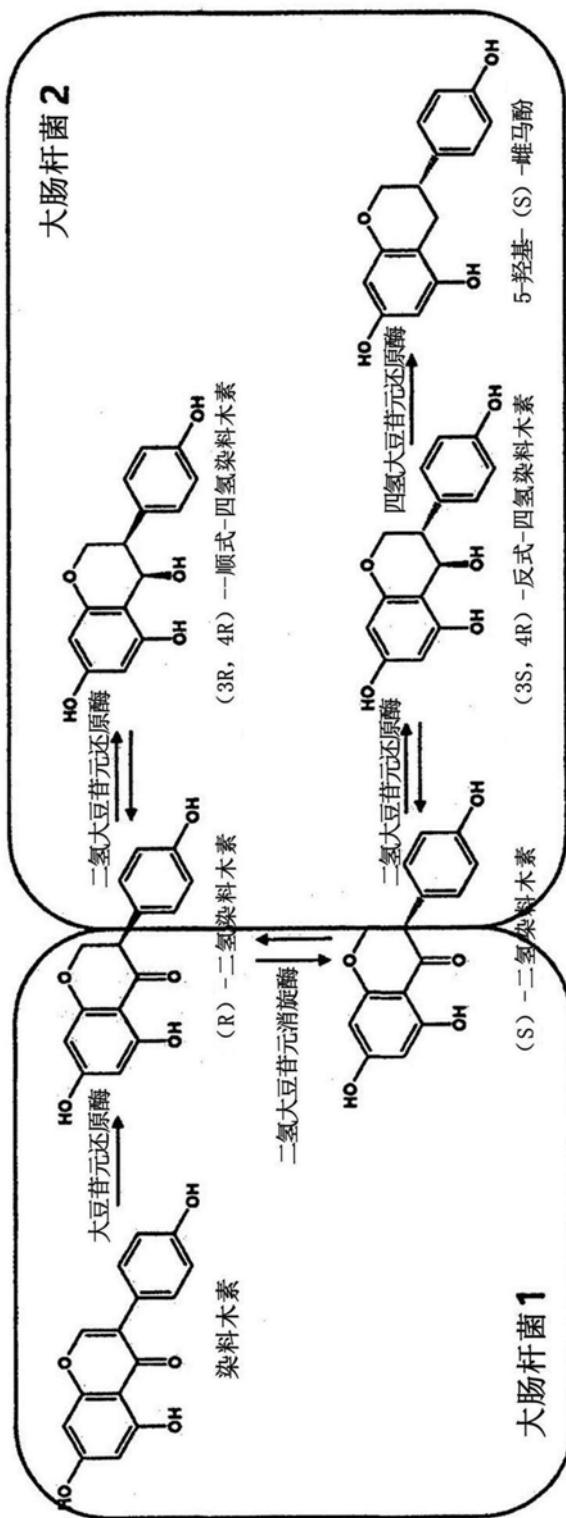


图4

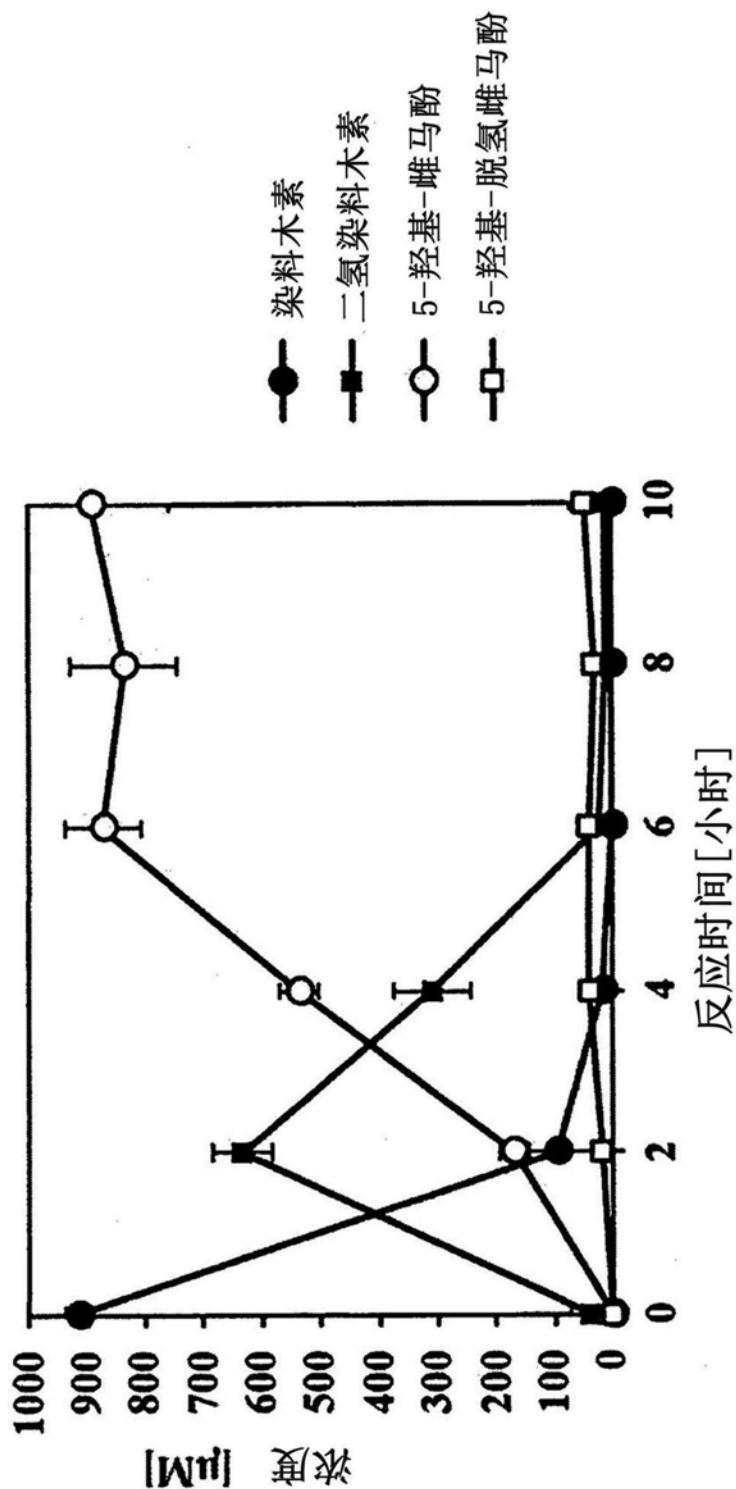
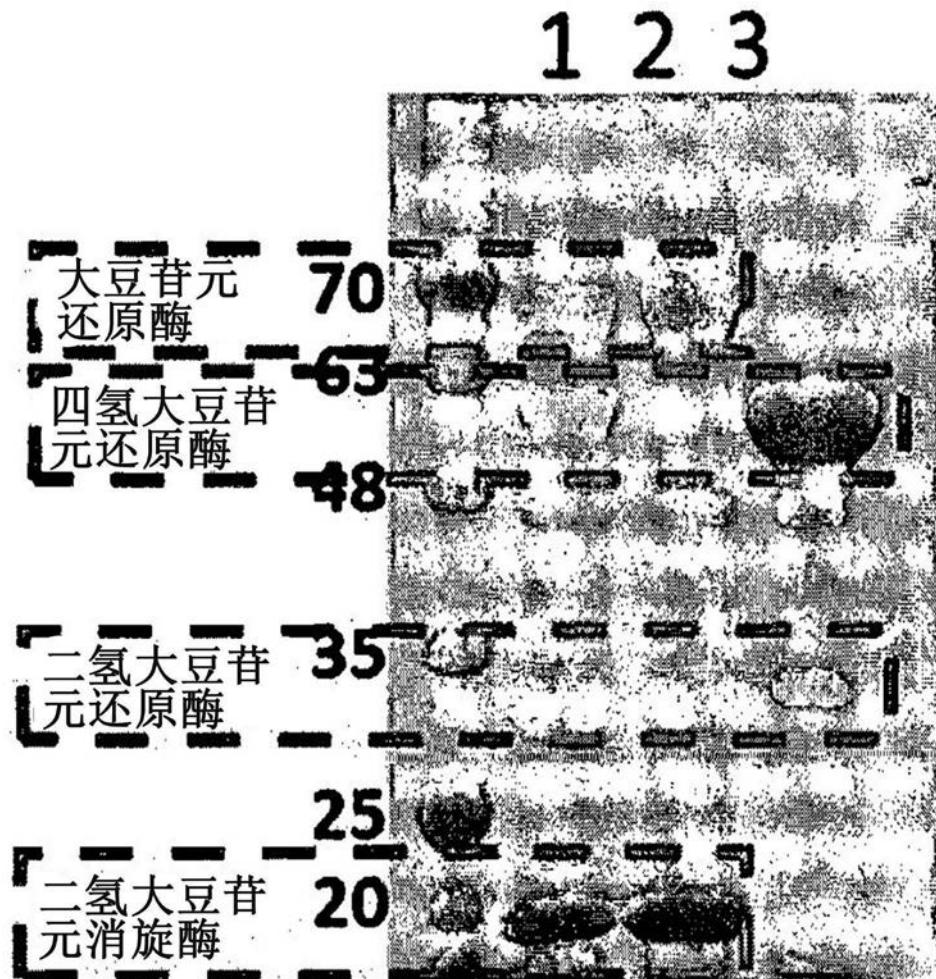


图5



1: DDDDT 2: DD 3: DT

图6

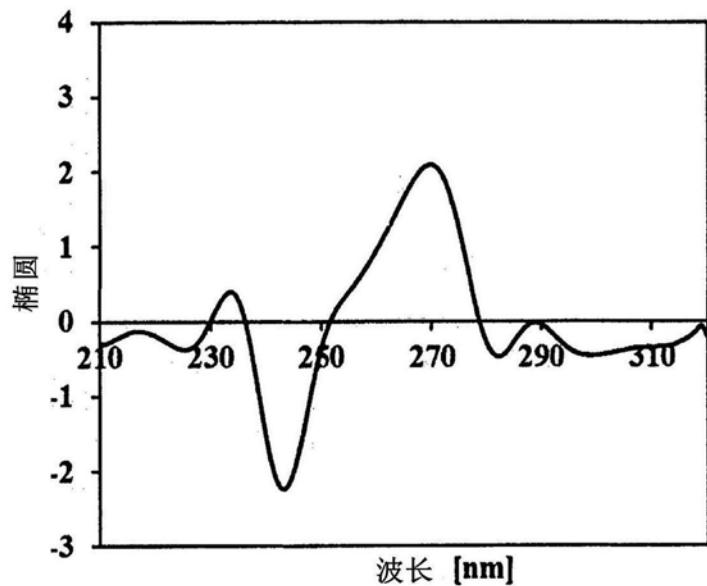


图7

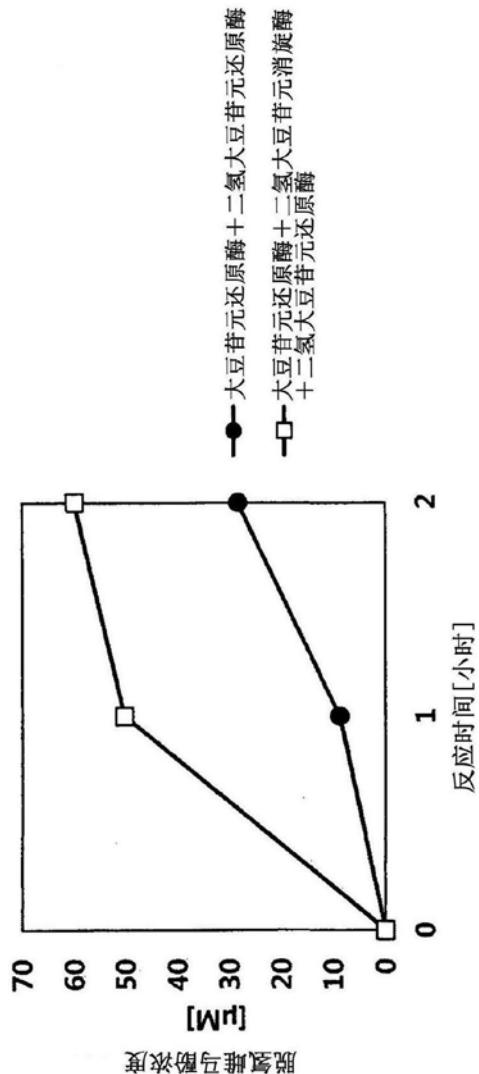


图8

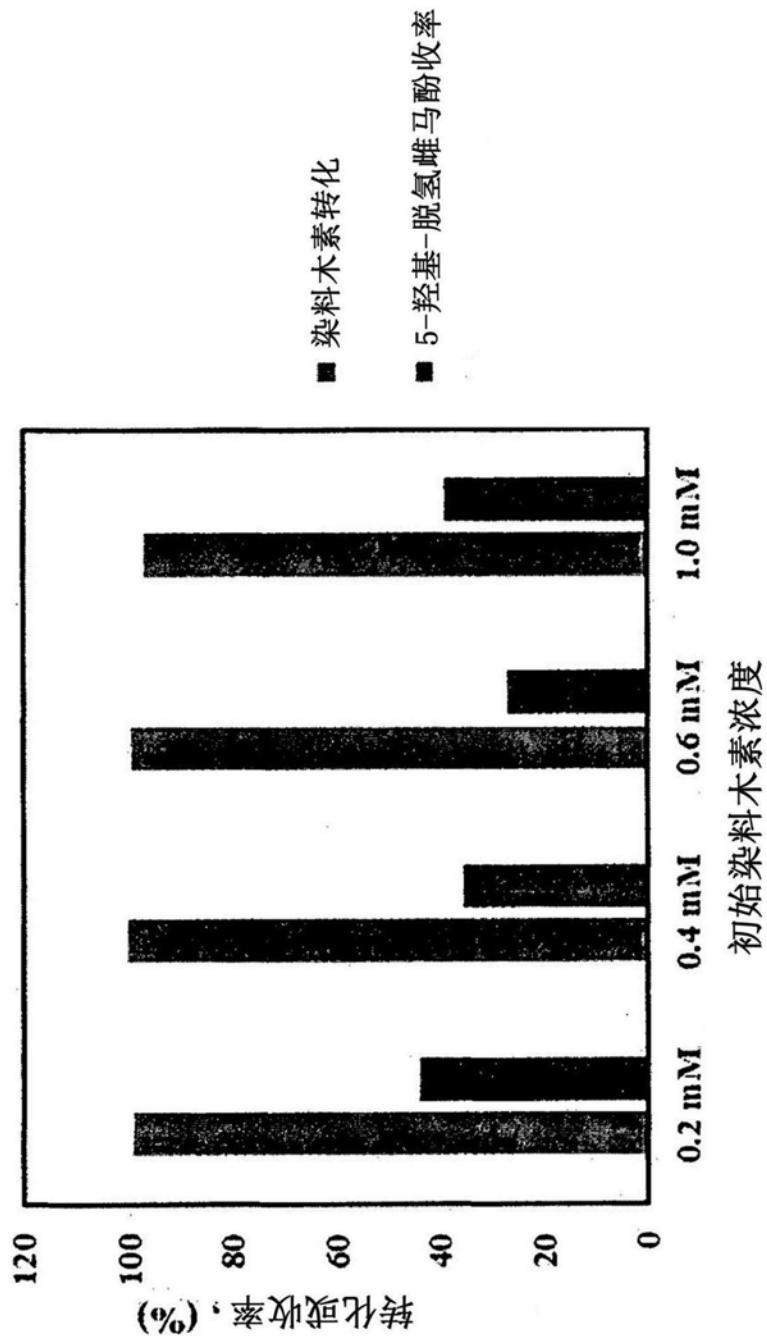


图9

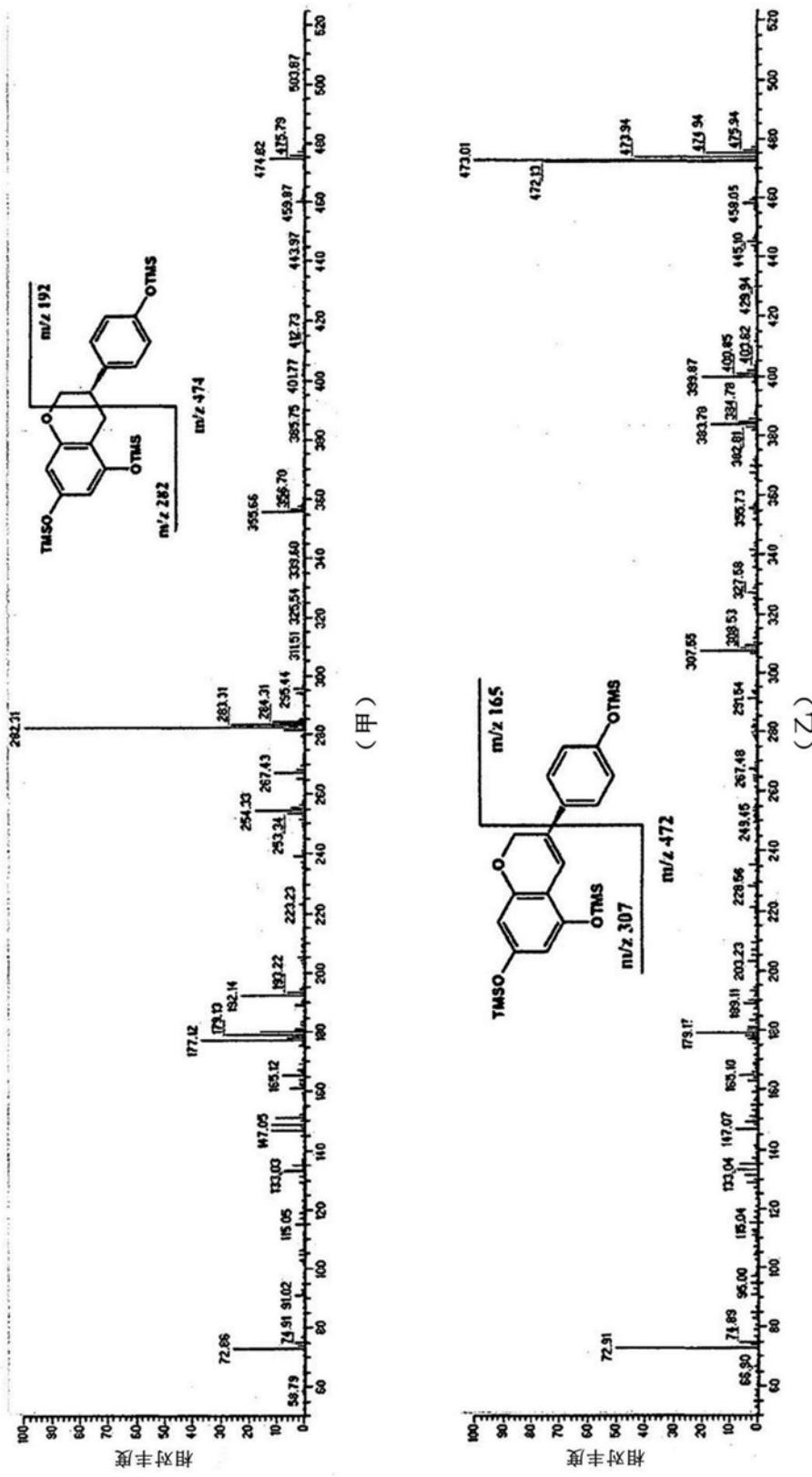


图10

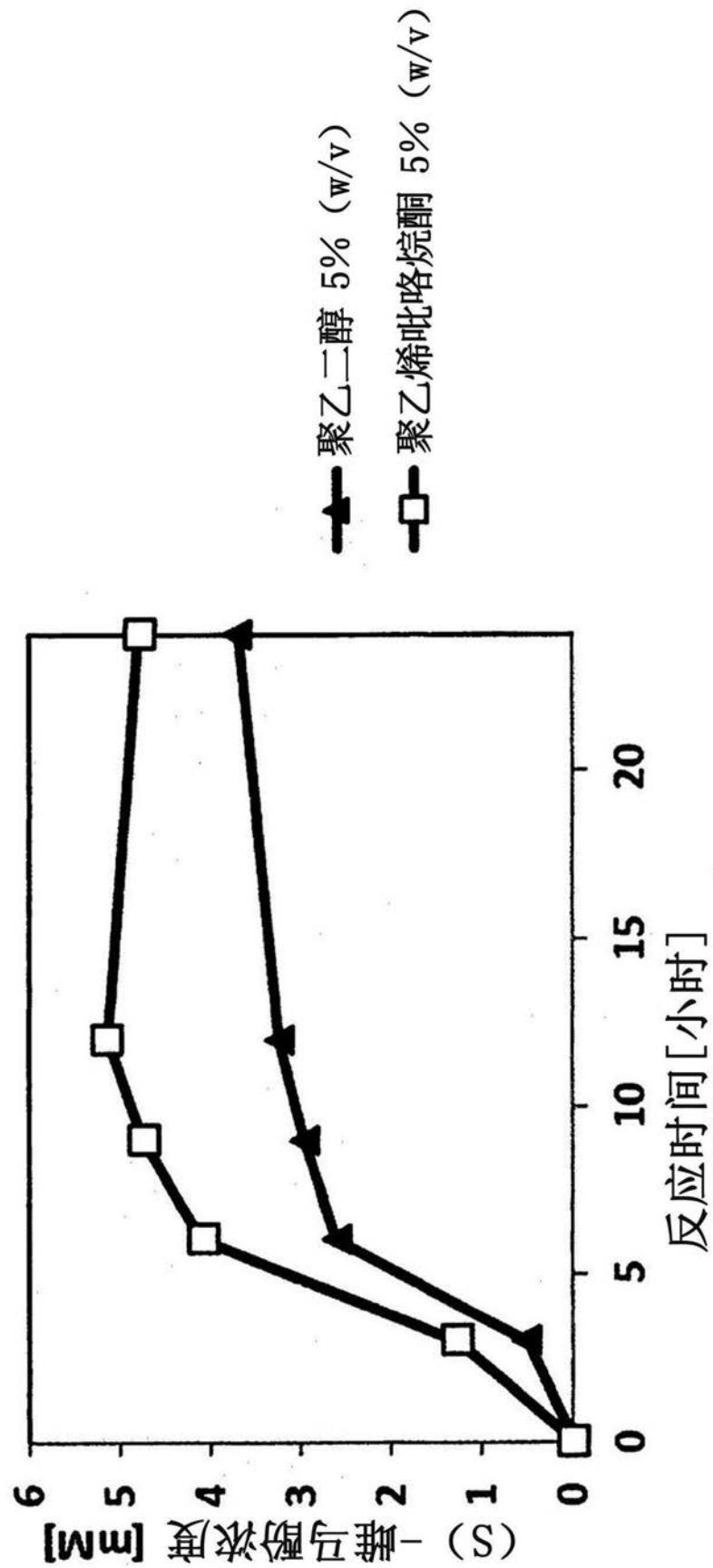


图11