



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 106536536 B

(45)授权公告日 2019.12.06

(21)申请号 201580035507.3

(22)申请日 2015.05.05

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106536536 A

(43)申请公布日 2017.03.22

(30)优先权数据
14/269,435 2014.05.05 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.12.29

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2015/029163 2015.05.05

(87)PCT国际申请的公布数据
W02015/171555 EN 2015.11.12

(73)专利权人 科纳根公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 G.毛 V.S.P.查图尔维杜拉 X.于

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 权陆军 万雪松

(51)Int.Cl.

C07H 15/256(2006.01)

C07H 15/24(2006.01)

C12N 9/10(2006.01)

C12P 19/56(2006.01)

审查员 付丹

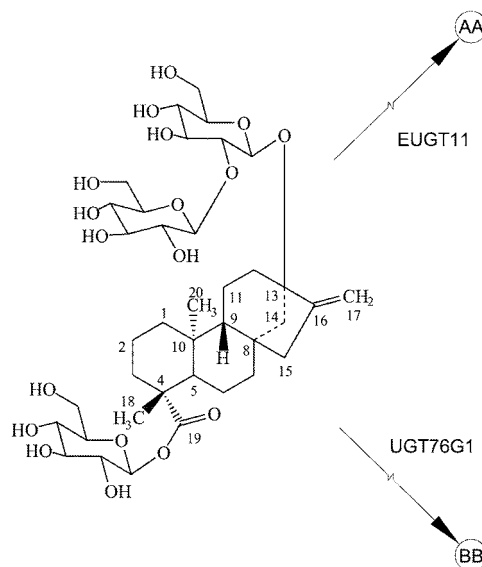
权利要求书7页 说明书31页
序列表16页 附图13页

(54)发明名称

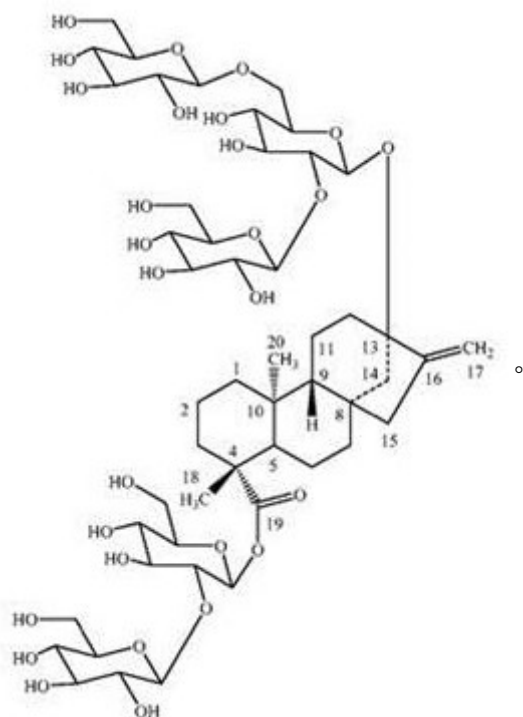
无热量甜味剂

(57)摘要

本发明公开了被称为莱鲍迪苷D2的甜菊醇糖苷。莱鲍迪苷D2具有连接至无糖基甜菊醇的五个β-D-葡萄糖基单元。本发明还公开了用于生产莱鲍迪苷D2的方法、UDP-糖基转移酶融合酶以及用于生产莱鲍迪苷D和莱鲍迪苷E的方法。

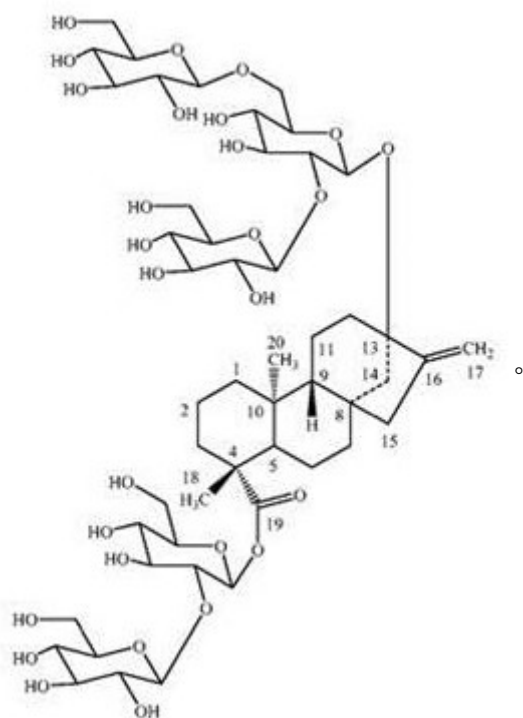


1. 合成的莱鲍迪苷,其化学结构为:

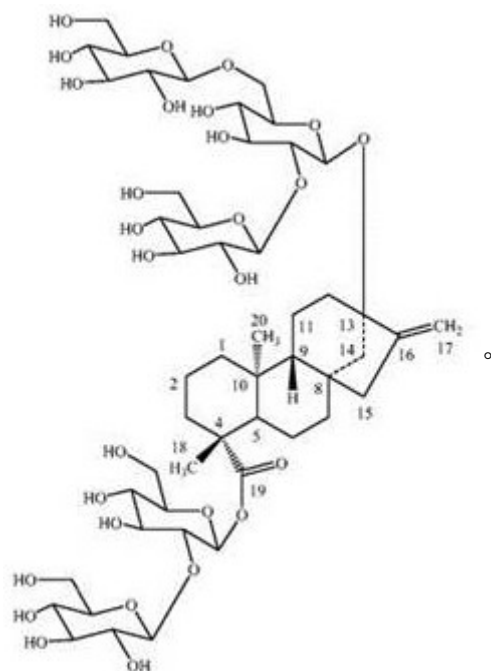


2. 用于合成化学结构如下的莱鲍迪苷D2的方法,所述方法包括:

制备反应混合物,所述反应混合物包含:莱鲍迪苷E;底物,选自蔗糖、尿苷二磷酸 (UDP) 和尿苷二磷酸-葡萄糖 (UDP-葡萄糖);以及尿苷二磷酸 (UDP)-糖基转移酶,选自包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的EUGT11 UDP-糖基转移酶和UDP-糖基转移酶融合酶,所述UDP-糖基转移酶融合酶包含偶联至蔗糖合成酶结构域的尿苷二磷酸糖基转移酶结构域,所述UDP-糖基转移酶融合酶包含与SEQ ID NO: 5的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并将所述反应混合物温育足够的时间以生成莱鲍迪苷D2,其中葡萄糖被共价偶联至所述莱鲍迪苷E以生成莱鲍迪苷D2



3. 权利要求2的方法,其中所述UDP-糖基转移酶是所述EUGT11 UDP-糖基转移酶。
4. 权利要求3的方法,其还包括向所述反应混合物中添加蔗糖合成酶。
5. 权利要求4的方法,其中所述蔗糖合成酶选自:拟南芥属蔗糖合成酶1、拟南芥属蔗糖合成酶3和绿豆蔗糖合成酶。
6. 权利要求4的方法,其中所述蔗糖合成酶是拟南芥蔗糖合成酶1。
7. 权利要求2的方法,其中所述UDP-糖基转移酶是所述UDP-糖基转移酶融合酶,所述融合酶包含偶联至蔗糖合成酶结构域的尿苷二磷酸糖基转移酶结构域。
8. 权利要求7的方法,其中所述尿苷二磷酸糖基转移酶结构域是稻尿苷二磷酸糖基转移酶EUGT11结构域。
9. 权利要求7的方法,其中所述蔗糖合成酶结构域选自:拟南芥属蔗糖合成酶1、拟南芥属蔗糖合成酶3和绿豆蔗糖合成酶。
10. 权利要求2的方法,其中所述蔗糖合成酶结构域是拟南芥蔗糖合成酶1。
11. 权利要求2的方法,其中所述蔗糖合成酶结构域是SEQ ID NO:3的氨基酸序列。
12. 用于合成化学结构如下的莱鲍迪苷D2的方法,所述方法包括:
制备反应混合物,所述反应混合物包含:甜菊苷;底物,选自蔗糖、尿苷二磷酸和尿苷二磷酸-葡萄糖;以及UDP-糖基转移酶,选自包含SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的EUGT11 UDP-糖基转移酶和UDP-糖基转移酶融合酶,所述UDP-糖基转移酶融合酶包含偶联至蔗糖合成酶结构域的尿苷二磷酸糖基转移酶结构域,所述UDP-糖基转移酶融合酶包含与SEQ ID NO: 5的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;并将所述反应混合物温育足够的时间以生成莱鲍迪苷D2,其中葡萄糖被共价偶联至所述甜菊苷以生成莱鲍迪苷E中间体,并且其中葡萄糖被共价偶联至所述莱鲍迪苷E中间体以生成莱鲍迪苷D2



13. 权利要求12的方法,其中所述UDP-糖基转移酶是所述EUGT11 UDP-糖基转移酶。

14. 权利要求13的方法,其还包括向所述反应混合物中添加蔗糖合成酶。

15. 权利要求14的方法,其中所述蔗糖合成酶选自:拟南芥属蔗糖合成酶1、拟南芥属蔗糖合成酶3和绿豆蔗糖合成酶。

16. 权利要求14的方法,其中所述蔗糖合成酶是拟南芥蔗糖合成酶1。

17. 权利要求12的方法,其中所述UDP-糖基转移酶是所述UDP-糖基转移酶融合酶,所述融合酶包含偶联至蔗糖合成酶结构域的尿苷二磷酸糖基转移酶结构域。

18. 权利要求12的方法,其中所述尿苷二磷酸糖基转移酶结构域是稻尿苷二磷酸糖基转移酶EUGT11。

19. 权利要求12的方法,其中所述蔗糖合成酶结构域选自:拟南芥属蔗糖合成酶1、拟南芥属蔗糖合成酶3和绿豆蔗糖合成酶。

20. 权利要求12的方法,其中所述蔗糖合成酶结构域是拟南芥蔗糖合成酶1。

21. 权利要求12的方法,其中所述蔗糖合成酶结构域是SEQ ID NO:3的氨基酸序列。

22. 可口服产品,其包含增甜量的权利要求1的合成的莱鲍迪苷,所述可口服产品选自饮料产品和可食用产品。

23. 权利要求22的可口服产品,其包含5 ppm至100 ppm的权利要求1的合成的莱鲍迪苷。

24. 权利要求22的可口服产品,其中权利要求1的合成的莱鲍迪苷是唯一的甜味剂。

25. 权利要求22的可口服产品,其中所述可口服产品与1 w/v-%至4 w/v-%的蔗糖溶液具有等同的甜味强度。

26. 权利要求22的可口服产品,其还包含至少一种另外的甜味剂。

27. 权利要求26的可口服产品,其中所述至少一种另外的甜味剂是高强度甜味剂。

28. 权利要求26的可口服产品,其中所述至少一种另外的甜味剂是天然的高强度甜味剂。

29. 权利要求26的可口服产品,其中所述至少一种另外的甜味剂选自:甜菊提取物、甜菊醇糖苷、甜菊苷、莱鲍迪苷A、莱鲍迪苷B、莱鲍迪苷C、莱鲍迪苷D、莱鲍迪苷E、莱鲍迪苷F、杜克苷A、甜茶苷、甜菊双糖苷、蔗糖、高果糖玉米糖浆、果糖、葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、鼠李糖、赤藓糖醇、木糖醇、甘露糖醇、山梨糖醇、肌醇、AceK、阿斯巴甜、纽甜、三氯蔗糖、糖精、柚皮苷二氢查尔酮(NarDHC)、新橙皮苷二氢查耳酮(NDHC)、甜茶苷、罗汉果苷IV、赛门苷I、罗汉果苷V、莫纳甜、奇异果甜蛋白、应乐果甜蛋白、布那珍、L-丙氨酸、甘氨酸、罗汉果(Lo Han Guo)、hernandulcin、叶甜素、trilobtain及其组合。

30. 权利要求22的可口服产品,其还包含选自以下的至少一种添加剂:碳水化合物、多元醇、核苷酸、有机酸、无机酸、有机盐、无机盐、苦味化合物、风味料、收敛化合物、蛋白质、蛋白水解产物、表面活性剂、乳化剂、类黄酮、酒精、聚合物及其组合。

31. 权利要求22的可口服产品,其还包含选自以下的至少一种添加剂:氨基酸或其盐、聚氨基酸或其盐、有机酸盐、有机碱盐、风味成分及其组合。

32. 权利要求22的可口服产品,其中所述可食用产品选自:食物产品、保健品、药物、膳食补充剂、牙科卫生组合物、可食用凝胶组合物、化妆产品和桌上调味料。

33. 饮料产品,其包含增甜量的权利要求1的合成的莱鲍迪苷。

34. 权利要求33的饮料产品,其中所述饮料产品选自碳酸饮料产品和非碳酸饮料产品。

35. 权利要求33的饮料产品,其中所述饮料产品选自:喷泉饮料、咖啡、茶、乳饮料、加味水、果汁、运动饮料和能量饮料。

36. 权利要求33的饮料产品,其包含5 ppm至100 ppm的权利要求1的合成的莱鲍迪苷。

37. 权利要求33的饮料产品,其中权利要求1的合成的莱鲍迪苷是唯一的甜味剂。

38. 权利要求33的饮料产品,其中所述饮料产品与1 w/v-%至4 w/v-%的蔗糖溶液具有等同的甜味强度。

39. 权利要求33的饮料产品,其还包含至少一种另外的甜味剂,其中所述饮料产品与1 w/v-%至10 w/v-%的蔗糖溶液具有等同的甜味强度。

40. 权利要求39的饮料产品,其中所述至少一种另外的甜味剂是高强度甜味剂。

41. 权利要求39的饮料产品,其中所述至少一种另外的甜味剂是天然的高强度甜味剂。

42. 权利要求39的饮料产品,其中所述至少一种另外的甜味剂选自:甜菊提取物、甜菊醇糖苷、甜菊苷、莱鲍迪苷A、莱鲍迪苷B、莱鲍迪苷C、莱鲍迪苷D、莱鲍迪苷E、莱鲍迪苷F、杜克苷A、甜茶苷、甜菊双糖苷、蔗糖、高果糖玉米糖浆、果糖、葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、鼠李糖、赤藓糖醇、木糖醇、甘露糖醇、山梨糖醇、肌醇、AceK、阿斯巴甜、纽甜、三氯蔗糖、糖精、柚皮苷二氢查尔酮(NarDHC)、新橙皮苷二氢查耳酮(NDHC)、甜茶苷、罗汉果苷IV、赛门苷I、罗汉果苷V、莫纳甜、奇异果甜蛋白、应乐果甜蛋白、布那珍、L-丙氨酸、甘氨酸、罗汉果(Lo Han Guo)、hernandulcin、叶甜素、trilobtain及其组合。

43. 权利要求33的饮料产品,其还包含选自以下的至少一种添加剂:碳水化合物、多元醇、核苷酸、有机酸、无机酸、有机盐、无机盐、苦味化合物、风味料、收敛化合物、蛋白质、蛋白水解产物、表面活性剂、乳化剂、类黄酮、酒精、聚合物及其组合。

44. 权利要求33的饮料产品,其还包含选自以下的至少一种添加剂:氨基酸或其盐、聚氨基酸或其盐、有机酸盐、有机碱盐、风味成分及其组合。

45. 可食用产品,其包含增甜量的权利要求1的合成的莱鲍迪苷。

46. 权利要求45的可食用产品,其中所述可食用产品选自:食物产品、保健品、药物、膳食补充剂、牙科卫生组合物、可食用凝胶组合物、化妆产品和桌上调味料。

47. 权利要求45的可食用产品,其包含5 ppm至100 ppm的权利要求1的合成的莱鲍迪苷。

48. 权利要求45的可食用产品,其中权利要求1的合成的莱鲍迪苷是唯一的甜味剂。

49. 权利要求45的可食用产品,其中所述可食用产品与1 w/v-%至4 w/v-%的蔗糖溶液具有等同的甜味强度。

50. 权利要求45的可食用产品,其还包含至少一种另外的甜味剂,其中所述可食用产品与1 w/v-%至10 w/v-%的蔗糖溶液具有等同的甜味强度。

51. 权利要求50的可食用产品,其中所述至少一种另外的甜味剂是高强度甜味剂。

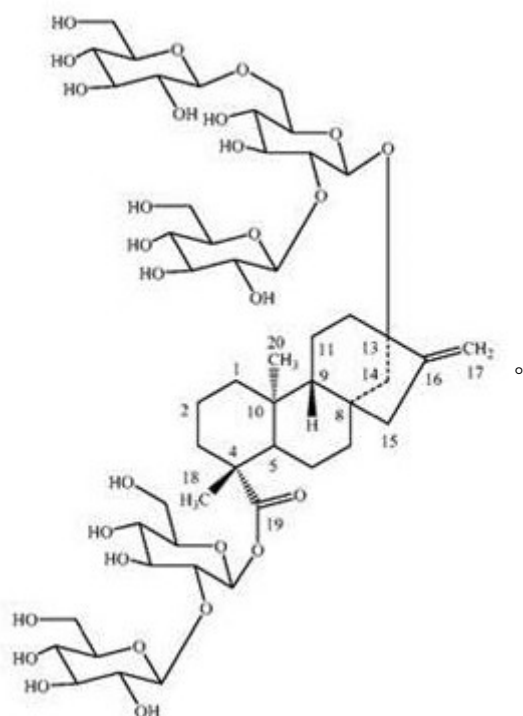
52. 权利要求50的可食用产品,其中所述至少一种另外的甜味剂是天然的高强度甜味剂。

53. 权利要求50的可食用产品,其中所述另外的甜味剂选自:甜菊提取物、甜菊醇糖苷、甜菊苷、莱鲍迪苷A、莱鲍迪苷B、莱鲍迪苷C、莱鲍迪苷D、莱鲍迪苷E、莱鲍迪苷F、杜克苷A、甜茶苷、甜菊双糖苷、蔗糖、高果糖玉米糖浆、果糖、葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、鼠李糖、赤藓糖醇、木糖醇、甘露糖醇、山梨糖醇、肌醇、AceK、阿斯巴甜、纽甜、三氯蔗糖、糖精、柚皮苷二氢查尔酮(NarDHC)、新橙皮苷二氢查耳酮(NDHC)、甜茶苷、罗汉果苷IV、赛门苷I、罗汉果苷V、莫纳甜、奇异果甜蛋白、应乐果甜蛋白、布那珍、L-丙氨酸、甘氨酸、罗汉果(Lo Han Guo)、hernandulcin、叶甜素、trilobtain及其组合。

54. 权利要求45的可食用产品,其还包含选自以下的至少一种添加剂:碳水化合物、多元醇、核苷酸、有机酸、无机酸、有机盐、无机盐、苦味化合物、风味料、收敛化合物、蛋白质、蛋白水解产物、表面活性剂、乳化剂、类黄酮、酒精、聚合物及其组合。

55. 权利要求45的可食用产品,其还包含选自以下的至少一种添加剂:氨基酸或其盐、聚氨基酸或其盐、有机酸盐、有机碱盐、风味成分及其组合。

56. 甜味剂,其化学结构为:



57. 权利要求56的甜味剂,其还包含下列中的至少一种:填充剂、增量剂和防结块剂。

58. 制备包含权利要求56的甜味剂的产品的方法,所述方法包括将所述甜味剂添加到所述产品中,其中所述产品选自饮料产品和可食用产品,并且其中将5 ppm至100 ppm的所述甜味剂添加到所述产品中。

59. 权利要求58的方法,其中权利要求56的甜味剂是唯一的甜味剂,并且所述产品与1 w/v-%至4 w/v-%的蔗糖溶液具有等同的甜味强度。

60. 权利要求58的方法,其还包括添加至少一种另外的甜味剂,其中所述产品与1 w/v-%至10 w/v-%的蔗糖溶液具有等同的甜味强度。

61. 用于提高产品甜度的方法,所述方法包括将5 ppm至100 ppm的权利要求56的甜味剂添加到产品中,所述产品选自饮料产品和可食用产品,其中相比对应的不含所述添加的甜味剂的产品,所添加的甜味剂提高所述产品的甜度。

62. 权利要求61的方法,其中权利要求56的甜味剂是唯一的甜味剂,并且所述产品与1 w/v-%至4 w/v-%的蔗糖溶液具有等同的甜味强度。

63. 权利要求61的方法,其还包括添加另外的甜味剂,其中所述产品与1 w/v-%至10 w/v-%的蔗糖溶液具有等同的甜味强度。

64. 用于制备增甜的产品的方法,所述方法包括:提供产品,其中所述产品选自饮料产品和可食用产品;并且将5 ppm至100 ppm的权利要求56的甜味剂添加到所述产品中。

65. 权利要求64的方法,其还包括向所述产品中添加至少一种添加剂。

66. 权利要求64的方法,其中所述至少一种添加剂选自:碳水化合物、多元醇、核苷酸、有机酸、无机酸、有机盐、无机盐、苦味化合物、风味料、收敛化合物、蛋白质、蛋白水解产物、表面活性剂、乳化剂、类黄酮、酒精、聚合物及其组合。

67. 权利要求64的方法,其中所述至少一种添加剂选自:氨基酸或其盐、聚氨基酸或其盐、有机酸盐、有机碱盐、风味成分及其组合。

68. 权利要求64的方法,其还包括添加至少一种另外的甜味剂。

69. 权利要求68的方法,其中所述至少一种另外的甜味剂是高强度甜味剂。

70. 权利要求69的方法,其中所述至少一种另外的甜味剂是天然的高强度甜味剂。

71. 权利要求68的方法,其中所述至少一种另外的甜味剂选自:甜菊提取物、甜菊醇糖苷、甜菊苷、莱鲍迪苷A、莱鲍迪苷B、莱鲍迪苷C、莱鲍迪苷D、莱鲍迪苷E、莱鲍迪苷F、杜克苷A、甜茶苷、甜菊双糖苷、蔗糖、高果糖玉米糖浆、果糖、葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、鼠李糖、赤藓糖醇、木糖醇、甘露糖醇、山梨糖醇、肌醇、AceK、阿斯巴甜、纽甜、三氯蔗糖、糖精、柚皮苷二氢查尔酮(NarDHC)、新橙皮苷二氢查耳酮(NDHC)、甜茶苷、罗汉果苷IV、赛门苷I、罗汉果苷V、莫纳甜、奇异果甜蛋白、应乐果甜蛋白、布那珍、L-丙氨酸、甘氨酸、罗汉果(Lo Han Guo)、hernandulcin、叶甜素、trilobtain及其组合。

无热量甜味剂

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本公开是名称为无热量甜味剂的PCT申请。本申请要求于2014年5月5日提交的美国专利申请号14/269,435的优先权,其以引用方式全文并入本文。

[0003] 支持提交序列表的声明

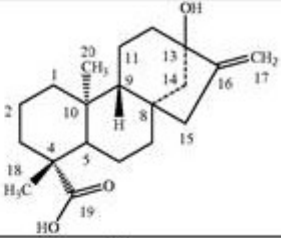
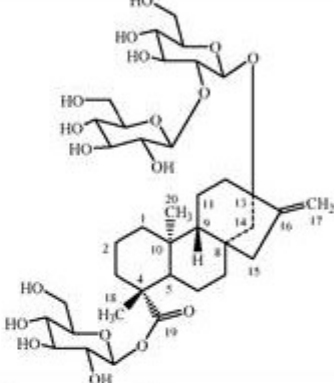
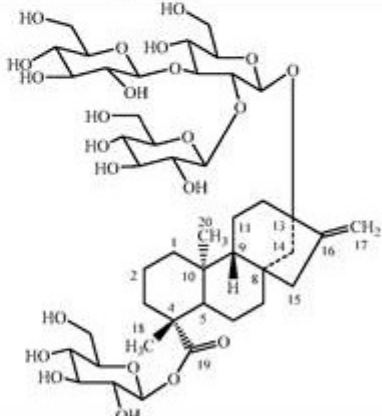
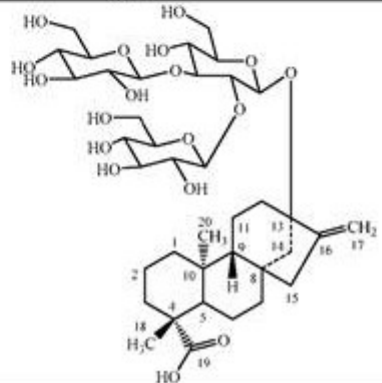
[0004] 本文提供了序列表的纸件和文件名为“32559-1 1_ST25.txt”的序列表的计算机可读形式,其大小为32,670字节(如在MICROSOFT WINDOWS® EXPLORER中所测),并且均通过引用并入本文。此序列表由SEQ ID NO: 1-6组成。

[0005] 发明背景

[0006] 本公开整体涉及天然甜味剂。更具体地讲,本公开涉及无热量甜味剂以及用于合成所述无热量甜味剂的方法。

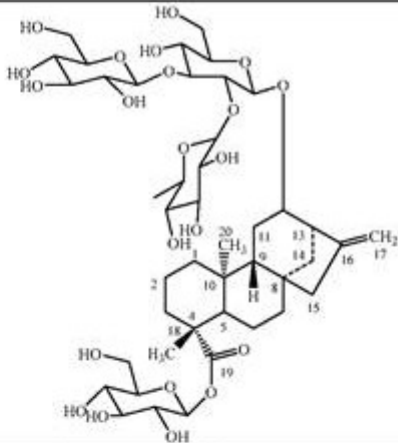
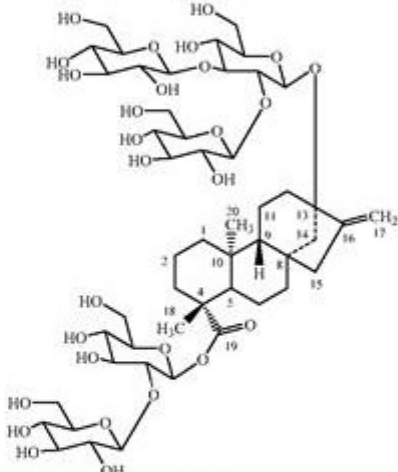
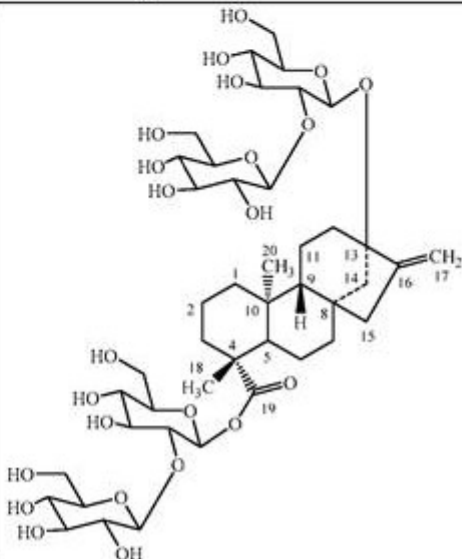
[0007] 甜菊醇糖苷是分离自甜菊叶的天然产物。甜菊醇糖苷被广泛用作高强度、低热量的甜味剂,并且明显甜于蔗糖。天然存在的甜菊醇糖苷具有相同的基本甜菊醇结构,但在位于C13和C19的糖类残基(例如,葡萄糖、鼠李糖和木糖残基)的含量上有所不同。结构已知的甜菊醇糖苷包括:甜菊醇、甜菊苷、莱鲍迪苷A、莱鲍迪苷B、莱鲍迪苷C、莱鲍迪苷D、莱鲍迪苷E、莱鲍迪苷F和杜克苷A(参见例如,表1)。

表1: 甜菊醇糖苷.

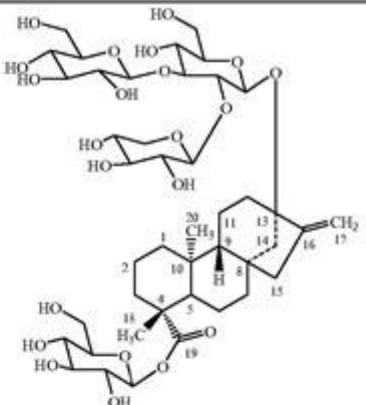
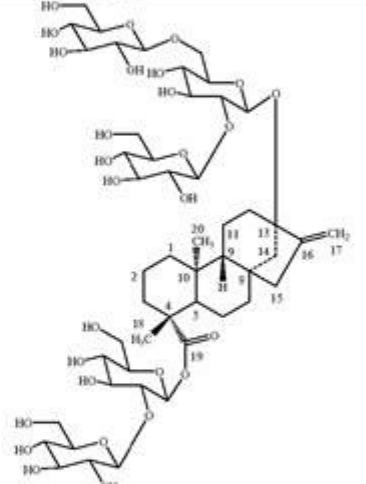
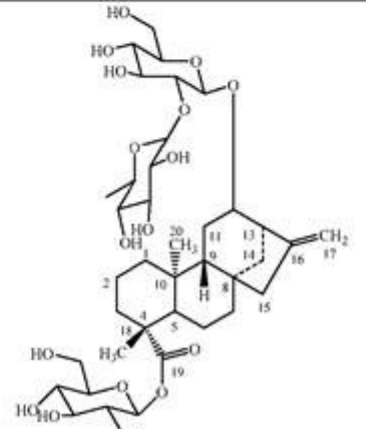
名称	结构	分子式	分子量
甜菊醇		$C_{20}H_{30}O_3$	318
甜菊苷		$C_{38}H_{60}O_{18}$	804
莱鲍迪苷A		$C_{44}H_{70}O_{23}$	966
莱鲍迪苷B		$C_{38}H_{60}O_{18}$	804

[0008]

[0009]

莱鲍迪苷C		$C_{44}H_{70}O_{22}$	950
莱鲍迪苷D		$C_{50}H_{80}O_{28}$	1128
莱鲍迪苷E		$C_{44}H_{70}O_{23}$	966

[0010]

莱鲍迪苷F		$C_{43}H_{68}O_{22}$	936
莱鲍迪苷D2		$C_{50}H_{80}O_{28}$	1128
杜克苷A		$C_{38}H_{60}O_{17}$	788

[0011] 按干重计,甜菊苷、莱鲍迪苷A、莱鲍迪苷C和杜克苷A,分别占叶片中甜菊醇糖苷总重量的9.1、3.8、0.6和0.3%,而其它甜菊醇糖苷则以低得多的量存在。来自甜菊植株的提取物可商购获得,其通常含有甜菊苷和莱鲍迪苷A作为主要化合物。其它甜菊醇糖苷通常在甜菊提取物中作为次要成分存在。例如,商业制备物中莱鲍迪苷A的量可以在总甜菊醇糖苷含量的约20%至超过90%之间变化,而莱鲍迪苷B的量可以是约1-2%,莱鲍迪苷C的量可以是约7-15%,而莱鲍迪苷D的量可以是总甜菊醇糖苷的约2%。

[0012] 甜菊醇糖苷不仅在分子结构上彼此不同,在其味觉特性上也彼此不同。例如,不同的甜菊醇糖苷具有不同程度的甜度和余味。例如,甜菊苷比蔗糖甜100-150倍,但具有苦涩的余味。例如,莱鲍迪苷A和莱鲍迪苷E比蔗糖甜250-450倍并具有弱于甜菊苷的余味。莱鲍迪苷C比蔗糖甜40-60倍。杜克苷A比蔗糖甜约30倍。

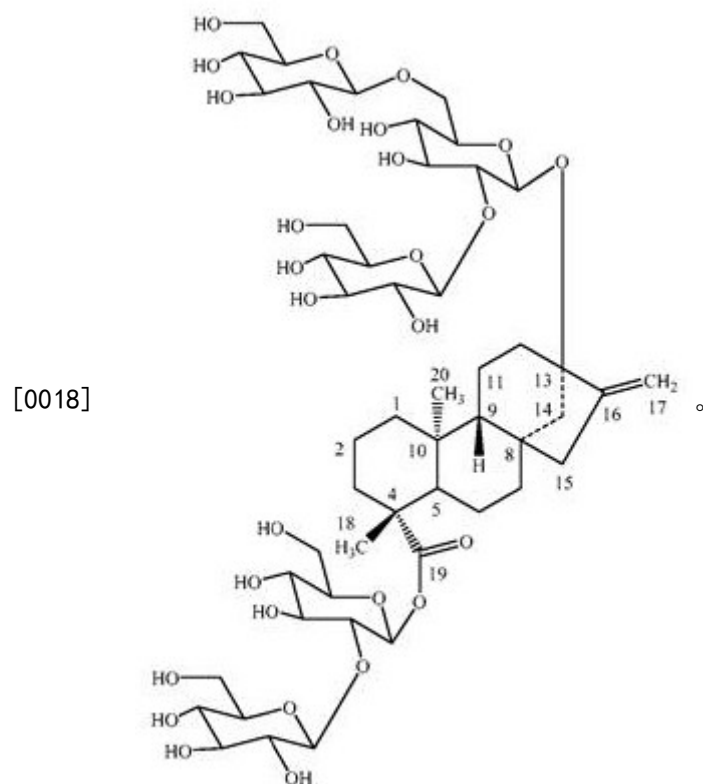
[0013] 大部分的甜菊醇糖苷通过甜菊醇的若干糖基化反应而形成,这些反应通常由UDP-糖基转移酶(UGT)催化并使用尿苷5'-二磷酸葡萄糖(UDP-葡萄糖)作为糖类部分的供体。植物中的UGT构成了一组非常多样化的酶,其将葡萄糖残基从UDP-葡萄糖转移至甜菊醇。例如,甜菊苷的C-13-O-葡萄糖的C-3'的糖基化得到莱鲍迪苷A;而甜菊苷的19-O-葡萄糖的C-2'的糖基化得到莱鲍迪苷E。莱鲍迪苷A(在C-19-O-葡萄糖处)或莱鲍迪苷E(在C-13-O-葡萄糖处)的进一步糖基化生成莱鲍迪苷D。(图1)。

[0014] 由于意识到许多疾病与高糖食物和饮料的摄入相关,替代的甜味剂正受到越来越多的关注。尽管存在可用的人工甜味剂,但由于对其安全性的顾虑,许多人工甜味剂如甘素、环己氨基磺酸钠和糖精已经被一些国家禁止或限制使用。因此,天然来源的无热量甜味剂正变得日益流行。甜菊甜味剂的广泛使用的主要障碍之一是其不佳的味觉属性。因此,需要开发替代的甜味剂及其生产方法以提供甜度与风味属性的最佳组合。

[0015] 发明简述

[0016] 本公开整体涉及天然甜味剂。更具体地讲,本公开涉及无热量甜味剂以及用于合成所述无热量甜味剂的方法。本公开还涉及可以被用于制备所述无热量甜味剂的酶。

[0017] 甜菊醇糖苷 - 合成的莱鲍迪苷D2。在一个方面,本公开涉及合成的莱鲍迪苷(莱鲍迪苷D2),其化学结构为:



[0019] 从莱鲍迪苷E生产莱鲍迪苷D2的方法。在另一方面,本公开涉及从莱鲍迪苷E合成莱鲍迪苷D2的方法。所述方法包括:制备反应混合物,所述反应混合物包含:莱鲍迪苷E、底物(选自蔗糖、尿苷二磷酸(UDP)和尿苷二磷酸-葡萄糖(UDP-葡萄糖))以及尿苷二磷酸糖基转移酶(UDP-糖基转移酶)(选自尿苷二磷酸糖基转移酶和UDP-糖基转移酶融合酶,所述融合酶包含偶联至蔗糖合成酶结构域的尿苷二磷酸糖基转移酶结构域);并将所述反应混合物温育足够的时间以生成莱鲍迪苷D2,其中葡萄糖被共价偶联至所述莱鲍迪苷E以生成莱

鲍迪苷D2。

[0020] 从甜菊苷生产莱鲍迪苷E和莱鲍迪苷D2的方法。在另一方面,本公开涉及从甜菊苷合成莱鲍迪苷E和莱鲍迪苷D2的方法。所述方法包括:制备反应混合物,所述反应混合物包含:甜菊苷、底物(选自蔗糖、尿苷二磷酸(UDP)和尿苷二磷酸-葡萄糖(UDP-葡萄糖))以及尿苷二磷酸糖基转移酶(UDP-糖基转移酶)(选自尿苷二磷酸糖基转移酶和UDP-糖基转移酶融合酶,所述融合酶包含偶联至蔗糖合成酶结构域的尿苷二磷酸糖基转移酶结构域);并将所述反应混合物温育足够的时间以生成莱鲍迪苷E和莱鲍迪苷D2,其中葡萄糖被共价偶联至所述甜菊苷以生成莱鲍迪苷E中间体,并且其中葡萄糖被共价偶联至所述莱鲍迪苷E中间体以生成莱鲍迪苷D2。

[0021] UDP-糖基转移酶融合酶("EUS")。在另一方面,本公开涉及UDP-糖基转移酶融合酶(在本文中称为"EUS")。所述UDP-糖基转移酶融合酶包含偶联至蔗糖合成酶结构域的尿苷二磷酸糖基转移酶结构域。所述UDP-糖基转移酶融合酶具有1,2-β糖苷键和1,6-β糖苷键酶活性以及蔗糖合成酶活性。

[0022] 从莱鲍迪苷A生产莱鲍迪苷D的方法。在另一方面,本公开涉及从莱鲍迪苷A合成莱鲍迪苷D的方法。所述方法包括:制备反应混合物,所述反应混合物包含:莱鲍迪苷A、底物(选自蔗糖、尿苷二磷酸(UDP)和尿苷二磷酸-葡萄糖(UDP-葡萄糖))以及UDP-糖基转移酶(选自尿苷二磷酸糖基转移酶和UDP-糖基转移酶融合酶(EUS),所述EUS包含偶联至蔗糖合成酶结构域的尿苷二磷酸糖基转移酶结构域);并将所述反应混合物温育足够的时间以生成莱鲍迪苷D,其中葡萄糖被共价偶联至所述莱鲍迪苷A以生成莱鲍迪苷D。

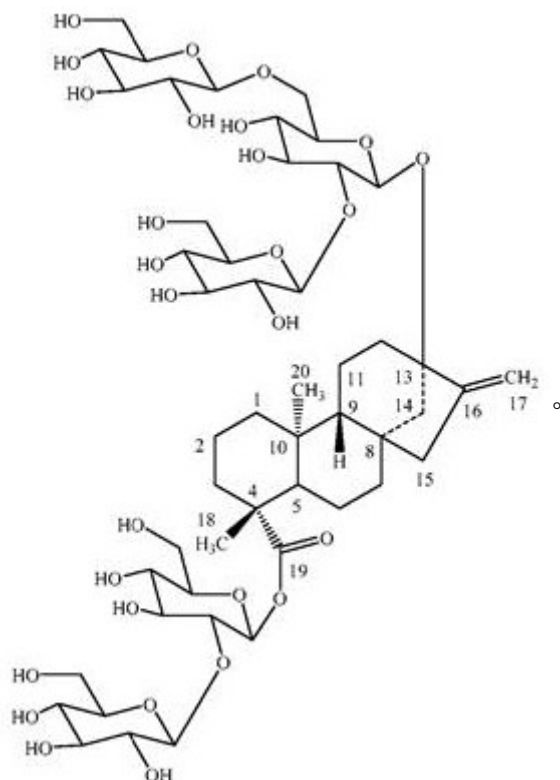
[0023] 在另一方面,本公开涉及包含增甜量的莱鲍迪苷D2的可口服产品,所述产品选自饮料产品和可食用产品。

[0024] 在另一方面,本公开涉及包含增甜量的莱鲍迪苷D2的饮料产品。莱鲍迪苷D2以约5 ppm至约100 ppm的浓度存在于所述饮料产品中。在一些实施方案中,低浓度的莱鲍迪苷D2,例如,低于100 ppm,与浓度为10,000至30,000 ppm的蔗糖溶液具有等同的甜度。

[0025] 在另一方面,本公开涉及包含增甜量的莱鲍迪苷D2的可食用产品。莱鲍迪苷D2以约5 ppm至约100 ppm的浓度存在于所述可食用产品中。在一些实施方案中,低浓度的莱鲍迪苷D2,例如,低于100 ppm,与浓度为10,000至30,000 ppm的蔗糖溶液具有等同的甜度。

[0026] 在另一方面,本公开涉及甜味剂,其化学结构为:

[0027]



[0028] 在可以与任一前述实施方案结合的某些实施方案中,莱鲍迪苷D2是唯一的甜味剂,并且所述产品与约1%至约4% (w/v-%) 的蔗糖溶液具有等同的甜味强度。在可与任一前述实施方案结合的某些实施方案中,所述可口服产品还包含另外的甜味剂,其中所述产品与约1%至约10% (w/v-%) 的蔗糖溶液具有等同的甜味强度。在可与任一前述实施方案结合的某些实施方案中,所述产品中的每种增甜成分均是高强度甜味剂。在可与任一前述实施方案结合的某些实施方案中,所述产品中的每种增甜成分均是天然的高强度甜味剂。在可与任一前述实施方案结合的某些实施方案中,所述另外的甜味剂包括选自以下的一种或多种甜味剂:甜菊提取物、甜菊醇糖苷、甜菊苷、莱鲍迪苷A、莱鲍迪苷B、莱鲍迪苷C、莱鲍迪苷D、莱鲍迪苷E、莱鲍迪苷F、杜克苷A、甜茶苷、甜菊双糖苷、蔗糖、高果糖玉米糖浆、果糖、葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、鼠李糖、赤藓糖醇、木糖醇、甘露糖醇、山梨糖醇、肌醇、AceK、阿斯巴甜、纽甜、三氯蔗糖、糖精、柚皮苷二氢查尔酮(arDHC)、新橙皮苷二氢查耳酮(NDHC)、甜茶苷、罗汉果苷IV、

[0029] 赛门苷I、罗汉果苷V、莫纳甜、奇异果甜蛋白、应乐果甜蛋白、布那珍、L-丙氨酸、甘氨酸、罗汉果(Lo Han Guo)、hernandulcin、叶甜素、trilobtain及其组合。在可与任一前述实施方案结合的某些实施方案中,所述饮料产品和可食用产品还包含选自以下的一种或多种添加剂:碳水化合物、多元醇、氨基酸或其盐、聚氨基酸或其盐、糖酸或其盐、核苷酸、有机酸、无机酸、有机盐、有机酸盐、有机碱盐、无机盐、苦味化合物、风味料、风味成分、收敛化合物、蛋白质、蛋白水解产物、表面活性剂、乳化剂、类黄酮、酒精、聚合物及其组合。在可与任一前述实施方案结合的某些实施方案中,在其被添加到所述产品之前,莱鲍迪苷D2具有按重量计约50%至约100%的纯度。在可与任一前述实施方案结合的某些实施方案中,所述产品中的莱鲍迪苷D2是莱鲍迪苷D2多晶型物或非晶莱鲍迪苷D2。在可与任一前述实施方案结合的某些实施方案中,所述产品中的莱鲍迪苷D2是莱鲍迪苷D2立体异构体。

[0030] 本公开的其它方面涉及制备饮料产品和可食用产品的方法,其通过在所述产品中或在用于制造所述饮料产品和所述可食用产品的成分中包含经纯化的莱鲍迪苷D2而实现,其中莱鲍迪苷D2以约5 ppm至约100 ppm的浓度存在于所述产品中。本公开的其它方面涉及用于提高饮料产品和可食用产品的甜度的方法,其通过将约5 ppm至约100 ppm的经纯化的莱鲍迪苷D2添加到所述饮料产品和所述可食用产品中而实现,其中相比对应的不含所述经纯化的莱鲍迪苷D2的饮料产品和可食用产品,所添加的莱鲍迪苷D2提高所述饮料产品和所述可食用产品的甜度。

[0031] 在可与任一前述实施方案结合的某些实施方案中,莱鲍迪苷D2是唯一的甜味剂,并且所述产品与约1%至约4% (w/v-%) 的蔗糖溶液具有等同的甜味强度。在可与任一前述实施方案结合的某些实施方案中,所述方法还包括添加另外的甜味剂,其中所述产品与约1%至约10% (w/v-%) 的蔗糖溶液具有等同的甜味强度。

[0032] 本公开的其它方面涉及用于制备增甜饮料产品或增甜可食用产品的方法,其通过如下实现:a) 提供含有一种或多种甜味剂的饮料产品或可食用产品;并且 b) 向所述饮料产品或所述可食用产品中添加约5 ppm至约100 ppm的经纯化的莱鲍迪苷D2。

[0033] 在可与任一前述实施方案结合的某些实施方案中,所述方法还包括向所述饮料产品或所述可食用产品中添加一种或多种添加剂。在可与任一前述实施方案结合的某些实施方案中,所述可口服产品还含有一种或多种添加剂。在可与任一前述实施方案结合的某些实施方案中,所述一种或多种添加剂选自:碳水化合物、多元醇、氨基酸或其盐、聚氨基酸或其盐、糖酸或其盐、核苷酸、有机酸、无机酸、有机盐、有机酸盐、有机碱盐、无机盐、苦味化合物、风味料、风味成分、收敛化合物、蛋白质、蛋白水解产物、表面活性剂、乳化剂、类黄酮、酒精、聚合物及其组合。在可与任一前述实施方案结合的某些实施方案中,所述产品中的每种增甜成分均是高强度甜味剂。在可与任一前述实施方案结合的某些实施方案中,所述产品中的每种增甜成分均是天然的高强度甜味剂。在可与任一前述实施方案结合的某些实施方案中,所述甜味剂选自:甜菊提取物、甜菊醇糖苷、甜菊苷、莱鲍迪苷A、莱鲍迪苷B、莱鲍迪苷C、莱鲍迪苷D、莱鲍迪苷E、莱鲍迪苷F、杜克苷A、甜茶苷、甜菊双糖苷、蔗糖、高果糖玉米糖浆、果糖、葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、鼠李糖、赤藓糖醇、木糖醇、甘露糖醇、山梨糖醇、肌醇、AceK、阿斯巴甜、纽甜、三氯蔗糖、糖精、柚皮苷二氢查尔酮(arDHC)、新橙皮苷二氢查耳酮(NDHC)、甜茶苷、罗汉果苷IV、赛门苷I、罗汉果苷V、莫纳甜、奇异果甜蛋白、应乐果甜蛋白、布那珍、L-丙氨酸、甘氨酸、罗汉果(Lo Han Guo)、hernandulcin、叶甜素、trilobtain及其组合。在可与任一前述实施方案结合的某些实施方案中,在其被添加到所述产品之前,莱鲍迪苷D2具有按重量计约50%至约100%的纯度。在可与任一前述实施方案结合的某些实施方案中,所述产品中的莱鲍迪苷D2是莱鲍迪苷D2多晶型物或非晶莱鲍迪苷D2。

[0034] 附图简述

[0035] 当考虑到以下详细说明时,将更好地理解本公开,并且除上述那些以外的特征、方面和优点将变得显而易见。此类详细说明参考了以下附图,其中:

[0036] 图1A-1C是说明从甜菊苷生物合成甜菊醇糖苷的途径的示意图。

[0037] 图2A和2B示出了经纯化的重组UDP-糖基转移酶(EUGT1 1)和经纯化的重组UDP-糖基转移酶融合酶(EUS)的SDS-PAGE分析,如实施例1中所述。

[0038] 图3A-3G是显示下列物质的HPLC保留时间的曲线图:甜菊苷("Ste")、莱鲍迪苷A("LbD")、

Reb A”)和莱鲍迪苷D(“Reb D”)标准品(图3A);在14小时由EUS酶促产生的莱鲍迪苷D(图3B);在14小时由EUGT11酶促产生的莱鲍迪苷D(图3C);在14小时由UGT-SUS (EUGT1 1-AtSUS1)偶联系统酶促产生的莱鲍迪苷D(图3D);在24小时由EUS酶促产生的莱鲍迪苷D(图3E);在24小时由EUGT11酶促产生的莱鲍迪苷D(图3F);以及在24小时由UGT-SUS (EUGT1 1-AtSUS1)偶联系统酶促产生的莱鲍迪苷D(图3G),如实施例2中所述。

[0039] 图4A-4G是显示下列物质的HPLC保留时间的曲线图:甜菊苷(“Ste”)、莱鲍迪苷A(“Reb A”)和莱鲍迪苷D(“Reb D”)标准品(图4A);在14小时由EUS酶促产生的莱鲍迪苷D2(“Reb D2”) (图4B);在14小时由EUGT11酶促产生的莱鲍迪苷E(“Reb E”) (图4C);在14小时由UGT-SUS (EUGT1 1-AtSUS1)偶联系统酶促产生的莱鲍迪苷D2(图4D);在24小时由EUS酶促产生的莱鲍迪苷D2(“Reb D2”) (图4E);在24小时由EUGT1 1酶促产生的莱鲍迪苷E(“Reb E”) (图4F);以及在24小时由UGT-SUS (EUGT1 1-AtSUS1)偶联系统酶促产生的莱鲍迪苷D2(图4G),如实施例3中所述。

[0040] 图5A-5J是显示下列物质的HPLC保留时间的曲线图:莱鲍迪苷D(“Reb-D”)标准品(图5A);莱鲍迪苷E(“Reb-E”)标准品(图5B);在12小时由EUGT11酶促产生的莱鲍迪苷D2(“Reb D2”) (图5C);在12小时由UGT-SUS (EUGT1 1-SUS 1)偶联系统(图5D)以及在12小时由EUS(图5E);在12小时由UGT76G1-AtSUS1偶联系统酶促产生的莱鲍迪苷D(“Reb D”) (图5F);在24小时由EUGT1 1酶促产生的莱鲍迪苷D2(图5G);在24小时由UGT-SUS (EUGT1 1-SUS1)偶联系统酶促产生的莱鲍迪苷D2(图5H);在24小时由EUS酶促产生的莱鲍迪苷D2(图5I);在24小时由UGT76G1-AtSUS1偶联系统酶促产生的莱鲍迪苷D(图5J),如实施例4中所述。

[0041] 图6A-6B示出了莱鲍迪苷D2和莱鲍迪苷E的化学结构,如实施例5中所述。

[0042] 图7是莱鲍迪苷D2的化学结构,其示出了关键的TOCSY和HMBC相关性,如实施例5中所述。

[0043] 图8A-8C示出了莱鲍迪苷D2、莱鲍迪苷E和莱鲍迪苷D的化学结构,如实施例5中所述。

[0044] 虽然本公开容易有各种修改和替代形式,但已经在附图中以举例的方式示出了特定的实施方案并在下文中详述。然而,应当理解,对特定实施方案的说明并非意图限制本公开,其所有修改形式、等同形式和替代形式均落入如所附权利要求书限定的本公开的精神和范围内。

[0045] 发明详述

[0046] 除非另行定义,否则本文中所用的全部技术与科学术语具有与本公开所属领域普通技术人员通常所理解的相同的含义。尽管与本文所述那些类似或等同的方法和材料可用于实践或测试本公开,但仍然在下文中描述了优选的材料和方法。

[0047] 术语“互补的”依其本领域普通技术人员普遍和惯常所理解的意思使用,并且被不加限制地用于描述能够彼此杂交的核苷酸碱基之间的关系。例如,就DNA而言,腺嘌呤与胸腺嘧啶互补,而胞嘧啶与鸟嘌呤互补。因此,所讨论的技术还包括分离的核酸片段,其与如所附序列表中报道的完整序列以及那些基本上相似的核酸序列互补。

[0048] 术语“核酸”和“核苷酸”依其相应的本领域普通技术人员普遍和惯常所理解的意思使用,并且被不加限制地用于指代单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。除非特别限定,否则该术语涵盖含有天然核苷酸的已知类似物的核酸,其具有与参

照核酸相似的结合特性,并且以类似于天然存在的核苷酸的方式被代谢。除非另外指明,否则具体的核酸序列还默认涵盖其经保守修饰或简并的变体(例如,简并密码子置换)和互补序列以及所明示的序列。

[0049] 术语“分离的”依其本领域普通技术人员普遍和惯常所理解的意思使用,并且当用在分离的核酸或分离的多肽的上下文中时,被不加限制地用于指代通过人工脱离其原生环境而存在并因此不是自然产物的核酸或多肽。分离的核酸或多肽可以纯化形式存在或可以存在于非原生环境中,如例如,在转基因宿主细胞中。

[0050] 如本文中所用的术语“温育”(“incubating”和“incubation”)指代这样的方法:将两种或更多种化学或生物实体(如化学化合物和酶)混合并允许其在有利于产生甜菊醇糖苷组合物的条件下相互反应。

[0051] 术语“简并变体”指代这样的核酸序列,其由于一个或多个简并密码子置换而具有不同于参照核酸序列的残基序列。简并密码子置换可以通过生成如下序列而实现,其中一个或多个选定(或全部)密码子的第三位被混合的碱基和/或脱氧肌苷残基置换。核酸序列及其所有简并变体将表达相同的氨基酸或多肽。

[0052] 术语“多肽”、“蛋白质”和“肽”依其相应的本领域普通技术人员普遍和惯常所理解的意思使用;这三个术语有时可互换使用,并且被不加限制地用于指代氨基酸或氨基酸类似物的聚合物,而无论其大小或功能。虽然“蛋白质”通常用于指代相对大的多肽,而“肽”通常用于指代小的多肽,但在本领域中这些术语的使用有重叠和差异。除非另有说明,否则如本文中所用的术语“多肽”指代肽、多肽和蛋白质。当指代多核苷酸产物时,术语“蛋白质”、“多肽”和“肽”在本文中可互换使用。因此,示例性多肽包括多核苷酸产物、天然存在的蛋白质及其同源物、直系同源物、旁系同源物、片段和其它等同物、变体以及类似物。

[0053] 术语“多肽片段”和“片段”,当用于指代参照多肽时,依其本领域普通技术人员普遍和惯常所理解的意思使用,并且被不加限制地用于指代这样的多肽,其相比该参照多肽自身存在氨基酸残基缺失,但其中剩余的氨基酸序列通常与该参照多肽中的对应位置相同。此类缺失可以发生在该参照多肽的氨基末端或羧基末端,或作为另外一种选择同时在这两处发生。

[0054] 术语多肽或蛋白质的“功能性片段”指代这样的肽片段,其是全长多肽或蛋白质的一部分,并且与全长多肽或蛋白质具有基本上相同的生物活性,或执行基本上相同的功能(例如,进行相同的酶促反应)。

[0055] 可互换使用的术语“变体多肽”、“经修饰的氨基酸序列”或“经修饰的多肽”指代这样的氨基酸序列,其例如通过一个或多个氨基酸置换、缺失和/或添加而与参照多肽有一个或多个氨基酸不同。在一方面,变体是保持了参照多肽的部分或全部能力的“功能性变体”。

[0056] 术语“功能性变体”还包括经过保守置换的变体。术语“经过保守置换的变体”指代这样的肽,其由于一个或多个保守氨基酸置换而具有不同于参照肽的氨基酸序列,并且保持了该参照肽的部分或全部活性。“保守氨基酸置换”是用功能上相似的残基置换氨基酸残基。保守置换的实例包括:非极性(疏水性)残基如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸间的相互置换;带电荷或极性(亲水性)残基间的相互置换如精氨酸与赖氨酸之间、谷氨酰胺与天冬酰胺之间、苏氨酸与丝氨酸之间;碱性残基如赖氨酸或精氨酸间的相互置换;或酸性残基如天冬氨酸或谷氨酸间的相互置换;或芳香族残基如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸间的

相互置换。预计此类置换对蛋白质或多肽的表观分子量或等电点具有轻微影响或没有影响。短语“经过保守置换的变体”还包括这样的肽,其中残基被化学衍生的残基所替换,前提是所得到的肽保持如本文所述的参照肽的部分或全部活性。

[0057] 术语“变体”,结合所讨论的技术的多肽,还包括功能活性多肽,其具有与参照多肽的氨基酸序列至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%和甚至100%相同的氨基酸序列。

[0058] 术语“同源的”以其所有语法形式和拼写变型指代具有“共同进化起源”的多核苷酸或多肽之间的关系,包括来自超家族的多核苷酸或多肽以及来自不同物种的同源多核苷酸或蛋白质(Reeck 等人,Cell 50:667, 1987)。此类多核苷酸或多肽具有序列同源性,正如其序列相似性所反映的,无论是就百分比同一性而言或是在保守位置上存在特定氨基酸或基序。例如,两个同源多肽可以具有至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%和甚至100%相同的氨基酸序列。

[0059] 相对于所讨论的技术的变体多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”指代与参照多肽(如例如,SEQ ID NO:6)的氨基酸残基相同的候选序列中氨基酸残基的百分比,在比对序列并(如果需要)引入空位后,以实现最大百分比序列同一性,并且不将任何保守置换视为序列同一性的一部分。

[0060] 出于确定百分比氨基酸序列同一性的目的的比对可以本领域技术范围内的各种方式实现,例如,使用公开获得的计算机软件如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2或Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的合适参数,包括实现在被比较序列的全长上的最大比对所需的任何算法。例如,可使用序列比较程序NCBI-BLAST2确定%氨基酸序列同一性。NCBI-BLAST2序列比较程序可从ncbi.nlm.nih.gov上下载。NCBI BLAST2使用若干个搜索参数,其中将所有这些搜索参数均设为默认值,包括,例如,无遮蔽 是,核酸链=全部,期望事件 10, 最小低复杂度长度=15/5,多通e-值=0.01,多通常数=25,最终空位比对的衰减=25 和 评分矩阵=BLOSUM62。在采用NCBI-BLAST2进行氨基酸序列比较的情况下,给定氨基酸序列A相对于、与或针对给定氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性(其或者可以描述为相对于、与或针对给定氨基酸序列B具有某一%氨基酸序列同一性的给定氨基酸序列A)的计算如下:100乘以分数X/Y,其中X是在由序列比对程序NCBI-BLAST2进行的A和B的比对中被评分为相同匹配的氨基酸残基的数量,而其中Y是B中的氨基酸残基总数。应当理解,当氨基酸序列A的长度与氨基酸序列B的长度不相等时,A相对于B的%氨基酸序列同一性将不等于B相对于A的%氨基酸序列同一性。

[0061] 从这个意义上讲,用于确定氨基酸序列“相似性”的技术是本领域众所周知的。通常,“相似性”指代两个或更多个多肽在合适位置的精确的氨基酸对氨基酸比较,其中氨基酸是相同的或具有相似化学和/或物理性质如电荷或疏水性。然后可确定所比较多肽序列间所谓的“百分比相似性”。用于确定核酸和氨基酸序列同一性的技术也是本领域众所周知的,并且包括确定该基因的mRNA的核苷酸序列(通常经由cDNA中间体)以及确定其所编码的

氨基酸序列,并且将该氨基酸序列与第二氨基酸序列进行比较。通常,“同一性”指代两个多核苷酸或多肽序列分别的精确的核苷酸对核苷酸或氨基酸对氨基酸对应。两个或更多个多核苷酸序列可以通过确定其“百分比同一性”进行比较,两个或更多个氨基酸序列亦可。威斯康辛序列分析包,第8版(可得自Genetics Computer Group, Madison, Wis.)中拥有的这些程序,例如,GAP程序,能够分别计算两个多核苷酸间的同一性以及两个多肽序列间的同一性和相似性。用于计算序列间同一性或相似性的其它程序是本领域技术人员已知的。

[0062] “对应于”参照位置的氨基酸位置指代与参照序列对齐的位置,正如通过比对氨基酸序列所识别出的。此类比对可以通过手动或通过使用众所周知的序列比对程序如ClustalW2、Blast 2等完成。

[0063] 除非另外指明,否则两个多肽或多核苷酸序列的百分比同一性指代在所述两个序列中较短一方的整个长度上相同氨基酸残基或核苷酸的百分比。

[0064] “编码序列”依其本领域普通技术人员普遍和惯常所理解的意思使用,并且被不加限制地用于指代编码特定氨基酸序列的DNA序列。

[0065] “合适的调控序列”依其本领域普通技术人员普遍和惯常所理解的意思使用,并且被不加限制地用于指代位于编码序列上游(5'非编码序列)、内或下游(3'非编码序列)的核苷酸序列,并且其影响该相关编码序列的转录、RNA加工或稳定性、或翻译。调控序列可包括启动子、翻译前导序列、内含子和多腺苷酸化识别序列。

[0066] “启动子”依其本领域普通技术人员普遍和惯常所理解的意思使用,并且被不加限制地用于指代能够控制编码序列或功能性RNA的表达的DNA序列。通常,编码序列位于启动子序列的3'。启动子可整个来源于天然基因,或由来源于天然存在的不同启动子的不同元件构成,或甚至包含合成的DNA节段。本领域技术人员应当理解,不同的启动子可指导基因在不同细胞类型中,或在发育的不同阶段,或响应于不同环境条件的表达。引起基因于大多数时间在大多数细胞类型中表达的启动子通常被称为“组成型启动子”。还认识到,由于在大多数情况下,调控序列的准确界限尚未完全明确,所以不同长度的DNA片段可能具有相同的启动子活性。

[0067] 术语“可操作地连接”指代单个核酸片段上核酸序列间的关联,使得其中一个的功能受到另一个的影响。例如,当启动子能够影响编码序列的表达时,则该启动子与该编码序列可操作地连接(即,所述编码序列处于所述启动子的转录控制之下)。编码序列可以有义或反义取向而被可操作地连接至调控序列。

[0068] 如本文所用的术语“表达”依其本领域普通技术人员普遍和惯常所理解的意思使用,并且被不加限制地用于指代来源于所讨论技术的核酸片段的有义(mRNA)或反义RNA的转录和稳定积聚。“过表达”指代基因产物在转基因或重组生物体中的产量超过在正常或非转化生物体中的生产水平。

[0069] “转化”依其本领域普通技术人员普遍和惯常所理解的意思使用,并且被不加限制地用于指代将多核苷酸转移到靶细胞中。所述被转移的多核苷酸可以被并入靶细胞的基因组或染色体DNA中,得到基因上稳定的遗传,或其可以独立于该宿主染色体而复制。含有转化的核酸片段的宿主生物体被称为“转基因的”或“重组的”或“转化的”生物体。

[0070] 术语“转化的”、“转基因的”和“重组的”,当在本文中结合宿主细胞使用时,依其本领域普通技术人员普遍和惯常所理解的意思使用,并且被不加限制地用于指代其中已经引

入了异源核酸分子的宿主生物体的细胞,如植物或微生物细胞。所述核酸分子可以被稳定地整合到所述宿主细胞的基因组中,或所述核酸分子可以作为染色体外的分子存在。此类染色体外的分子可以是自主复制的。经转化的细胞、组织或对象应当被理解为不仅涵盖转化过程的最终产物,还涵盖其转基因子代。

[0071] 术语“重组的”、“异源的”和“外源的”,当在本文中结合多核苷酸使用时,依其本领域普通技术人员普遍和惯常所理解的意思使用,并且被不加限制地用于指代这样的多核苷酸(例如,DNA序列或基因),其相对于该具体宿主细胞而言起源于外部来源,或者如果来自相同来源,则在其原始形式上经过修饰。因此,宿主细胞中的异源基因包括这样的基因,其相对于该具体宿主细胞而言是内源的,但已经通过例如使用定点诱变或其它重组技术进行了修饰。该术语还包括天然存在的DNA序列的非天然存在的多个拷贝。因此,该术语指代这样的DNA节段,其相对于细胞而言是外来的或异源的,或相对于细胞而言是同源的但所述元件处在不常见于该宿主细胞内的位置或形式。

[0072] 类似地,术语“重组的”、“异源的”和“外源的”,当在本文中结合多肽或氨基酸序列使用时,意指这样的多肽或氨基酸序列,其相对于该具体宿主细胞而言起源于外部来源,或者如果来自相同来源,则在其原始形式上经过修饰。因此,可以在宿主细胞中表达重组DNA节段以生产重组多肽。

[0073] 术语“质粒”、“载体”和“盒”依其本领域普通技术人员普遍和惯常所理解的意思使用,并且被不加限制地用于指代染色体外的元件,其通常携带并非细胞的核心代谢的一部分的基因,并通常处于环状双链DNA分子的形式。此类元件可能是任何来源的自主复制序列、基因组整合序列、噬菌体或核苷酸序列、线性或环状的单链或双链DNA或RNA,其中大量核苷酸序列已经被接合或重组成独特的构造,其能够将选定的基因产物的启动子片段和DNA序列连同适当的3'非翻译序列引入到细胞中。“转化盒”指代特定的载体,其含有外来基因并具有除该外来基因以外的、有利于具体宿主细胞的转化的元件。“表达盒”指代特定的载体,其含有外来基因并具有除该外来基因以外的、允许该基因在外来宿主中的增强表达的元件。

[0074] 本文中所用的标准重组DNA和分子克隆技术是本领域众所周知的,并且在以下文献中有述,例如:Sambrook, J., Fritsch, E. F. 和 Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第2版;Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 (在下文中称为“Maniatis”); 和 Silhavy, T. J., Bannan, M. L. 和 Enquist, L. W. *Experiments with Gene Fusions*; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N.Y., 1984; 以及 Ausubel, F. M. 等人, *In Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley-Interscience 出版, 1987; 这些文献以与本文保持一致的程度各自通过引用全文并入本文中。

[0075] 如本文所用,“合成的”或“有机合成的”或“化学合成的”或“有机合成”或“化学合成”(“organically synthesizing”或“chemically synthesizing”或“organic synthesis”或“chemical synthesis”)被用于指代通过一系列化学反应制备化合物;这不包括例如从天然来源提取化合物。

[0076] 如本文所用的术语“可口服产品”指代与人或动物的口接触的并且当以通常可接受的浓度范围使用时对于人或动物消费是安全的任何饮料、食物产品、膳食补充剂、保健

品、药物组合物、牙科卫生组合物和化妆产品,包括:放入并随后从口中吐出的物质和饮用、食用、吞咽或以其它方式摄取的物质。

[0077] 如本文所用的术语“食物产品”指代水果、蔬菜、果汁、肉制品(如火腿、熏肉和香肠);蛋制品、水果浓缩液、明胶及明胶类产品(如果酱、果冻、蜜饯等);奶制品(如冰淇淋、酸奶油、酸奶和冰冻果子露);糖衣、糖浆(包括糖蜜);玉米、小麦、裸麦、大豆、燕麦、水稻和大麦制品、谷物制品、坚果仁及坚果制品、蛋糕、饼干、糖食(如糖果、口香糖、果味滴露以及巧克力、橡皮糖、薄荷糖、奶油、糖衣、冰淇淋、馅饼和面包)。“食物产品”还指代调味品(如草本香料、香料和佐料)、增味剂(如谷氨酸一钠)。“食物产品”还指代包括预包装产品如限糖甜味剂、液态甜味剂、桌上调味料、粒状风味混合物,其与水重构而提供非碳酸饮料、速溶布丁混合物、速溶咖啡和茶、咖啡伴侣、麦芽牛奶混合物、宠物食品、牲畜饲料、烟草,以及用于烘焙应用的材料,如用于制备面包、饼干、蛋糕、煎饼、面包圈等的粉状烘焙混合物。“食物产品”还指代减肥或低热量食物以及含有少量蔗糖或不含蔗糖的饮料。

[0078] 如本文所用,术语“立体异构体”是对个体分子的仅在其原子的空间取向上有所不同的所有异构体的统称。“立体异构体”包括对映异构体和具有不止一个手性中心的化合物的彼此非镜像对称的异构体(非对映异构体)。

[0079] 如本文所用,术语“非晶莱鲍迪苷D2”指代非晶态固体形式的莱鲍迪苷D2。

[0080] 如本文所用,术语“甜味强度”指代个体(例如,人)所观察到或经历的甜味感觉的相对强度,或品尝者所检测到的甜味的程度或量(例如在Brix量度上)。

[0081] 如本文所用,术语“提高甜度”指代相比对应的不含莱鲍迪苷D2的可口服产品,莱鲍迪苷D2在增加、加强、强化、强调、放大和/或增强本公开的饮料产品或可食用产品的一种或多种甜味特性的感知而不改变其本质或品质上的效果。

[0082] 如本文所用,术语“异味”指代一定量或程度的并非典型或通常存在于本公开的饮料产品或可食用产品中的味道。例如,异味是消费者可食用的增甜产品的不期望的味道,如苦味、类似甘草的味道、金属味、令人厌恶的味道、涩味、延迟出现的甜味、悠长的甜的余味等。

[0083] 如本文所用,术语“w/v-%”指代化合物(如糖)在每100 ml含有该化合物的本公开的液态可口服产品中的重量(按克计)。如本文所用,术语“w/w-%”指代化合物(如糖)在每克含有该化合物的本公开的可口服产品中的重量(按克计)。

[0084] 如本文所用,术语“ppm”指代按重量计的份/百万份,例如,化合物(如莱鲍迪苷D2)在每千克含有该化合物的本公开的可口服产品中的重量(按毫克计)(即,mg/kg),或化合物(如莱鲍迪苷D2)在每升含有该化合物的本公开的可口服产品中的重量(按毫克计)(即,mg/L);或按体积计,例如,化合物(如莱鲍迪苷D2)在每升含有该化合物的本公开的可口服产品中的体积(按毫升计)(即,ml/L)。

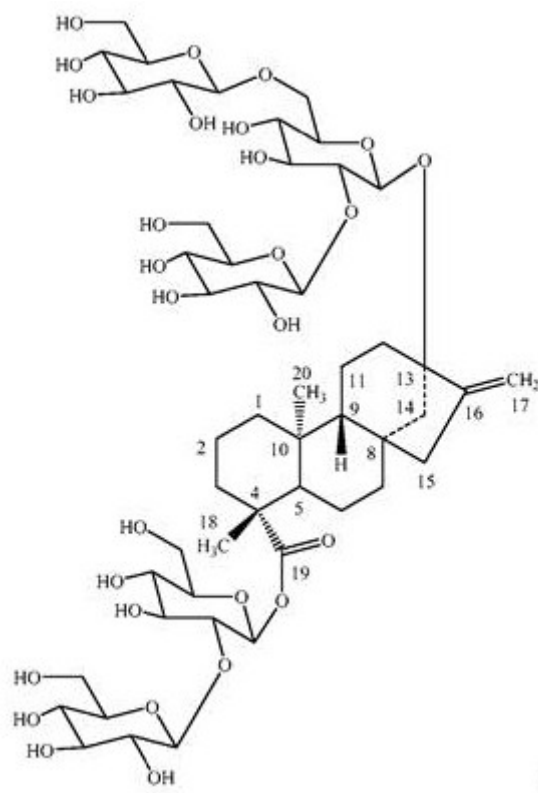
[0085] 根据本公开,公开了无热量甜味剂及用于合成所述无热量甜味剂的方法。根据本公开,还公开了酶及使用该酶制备所述无热量甜味剂的方法。

[0086] 合成的无热量甜味剂:合成的莱鲍迪苷D2

[0087] 在一个方面,本公开涉及合成的无热量甜味剂。所述合成的无热量甜味剂是合成的莱鲍迪苷型甜菊醇糖苷,并且已被命名为“莱鲍迪苷D2”。如以下化学结构(I)所示,莱鲍迪苷D2(“Reb D2”)是具有类似于甜菊醇糖苷莱鲍迪苷D的五个糖苷残基的五个糖苷残基的

甜菊醇糖苷。

[0088]



[0089] 莱鲍迪苷D2具有分子式 $C_{50}H_{80}O_{28}$ 和IUPAC名称, 13-[(2-*O*- β -D-吡喃葡萄糖基-6-*O*- β -D-吡喃葡萄糖基-6-D-吡喃葡萄糖基)氧基] *ent*-16-贝壳杉烯-19-酸-(2-*O*- β -D-吡喃葡萄糖基- β -D-吡喃葡萄糖基)酯。

[0090] 如莱鲍迪苷D2、莱鲍迪苷E和莱鲍迪苷D的化学结构所示, 莱鲍迪苷D2和莱鲍迪苷D的结构中具有五个 β -D-葡萄糖基单元连接至无糖基甜菊醇, 而莱鲍迪苷E含有四个D-糖苷残基(参见, 例如, 表1和图8)。合成的莱鲍迪苷D2在甜菊醇的C19处含有两个糖苷残基并在C13处含有三个糖苷残基。相比之下, 莱鲍迪苷D也包含五个糖苷残基; 在无糖基甜菊醇的C19处含有两个糖苷残基并在C13处含有三个糖苷残基。莱鲍迪苷D2的第五个糖苷残基(“糖V”)通过1,6 β 糖苷键而位于Reb E的C13 *O*-葡萄糖的C-6', 而莱鲍迪苷D的第五个糖苷残基(“糖V”)通过1,3 β 糖苷键而位于Reb E的C13 *O*-葡萄糖的C-3' (参见, 图8)。然而, 莱鲍迪苷E在C19处含有两个糖苷残基并在C13处含有两个糖苷残基。不受理论的约束, 据信, 具有5个糖苷残基的甜菊醇糖苷(莱鲍迪苷D)和具有4个糖苷残基的甜菊醇糖苷(莱鲍迪苷A和莱鲍迪苷E)相比具有更少的糖苷残基的甜菊醇糖苷(甜菊苷和甜茶苷)有着明显更好的味道品质。

[0091] 生产莱鲍迪苷D2的方法

[0092] 在另一方面, 本公开涉及从莱鲍迪苷E合成莱鲍迪苷D2的方法。在一个实施方案中, 所述方法包括: 制备反应混合物, 所述反应混合物包含: 莱鲍迪苷E、底物(选自蔗糖、尿苷二磷酸(UDP)和尿苷二磷酸-葡萄糖(UDP-葡萄糖))以及UDP-糖基转移酶(选自尿苷二磷酸糖基转移酶和UDP-糖基转移酶融合酶(EUS), 所述EUS包含偶联至蔗糖合成酶结构域的尿苷二磷酸(UDP)糖基转移酶结构域); 并将所述反应混合物温育足够的时间以生成莱鲍迪苷D2, 其中葡萄糖被共价偶联至所述莱鲍迪苷E以生成莱鲍迪苷D2。

[0093] 特别合适的尿苷二磷酸(UDP)糖基转移酶可以是,例如,EUGT11(如WO 2013022989中所述)。EUGT11是尿苷5'-二磷酸-依赖性糖基转移酶("UGT"),其具有1,2-19-O-葡萄糖和1,2-13-O-葡萄糖糖基化活性。已知EUGT11催化甜菊苷至莱鲍迪苷E以及莱鲍迪苷A至莱鲍迪苷D的生产。然而,令人惊奇且出乎意料的是,已发现,尿苷二磷酸(UDP)糖基转移酶可以被用于将莱鲍迪苷E体外转化成莱鲍迪苷D2。

[0094] 合适的尿苷二磷酸糖基转移酶可以是,例如,稻尿苷二磷酸糖基转移酶EUGT11。特别合适的尿苷二磷酸糖基转移酶具有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列。

[0095] 所述方法还可以包括向所述含有尿苷二磷酸(UDP)糖基转移酶的反应混合物中添加蔗糖合成酶。向所述含有尿苷二磷酸糖基转移酶的反应混合物中添加蔗糖合成酶构建起"UGT-SUS偶联系统"。在所述UGT-SUS偶联系统中,可以从UDP和蔗糖再生UDP-葡萄糖,这允许省略掉向所述反应混合物中添加额外的UDP-葡萄糖或允许在所述反应混合物中使用UDP。

[0096] 合适的蔗糖合成酶结构域可以是例如,拟南芥属蔗糖合成酶1、拟南芥属蔗糖合成酶3和绿豆蔗糖合成酶。特别合适的蔗糖合成酶结构域可以是,例如,拟南芥属蔗糖合成酶1。特别合适的拟南芥属蔗糖合成酶1是拟南芥蔗糖合成酶1(AtSUS1)。特别合适的蔗糖合成酶1可以是,例如,具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的蔗糖合成酶1。

[0097] 在另一个实施方案中,所述UDP-糖基转移酶可以是UDP-糖基转移酶融合酶(在本文中也称为"EUS"),其包含偶联至蔗糖合成酶结构域的尿苷二磷酸糖基转移酶结构域。所述UDP-糖基转移酶融合酶在下文中有更详细的描述。

[0098] 在反应中,所述UDP-糖基转移酶(例如,EUGT11和EUS)具有1,6-13 O 葡萄糖糖基化活性,并且在一个实施方案中,可以将葡萄糖分子转移至莱鲍迪苷E以形成莱鲍迪苷D2。所述UDP-糖基转移酶(例如,EUGT11和EUS)还具有1,2-19 O-葡萄糖和1,2-13-O-葡萄糖糖基化活性。在另一个实施方案中,所述UDP-糖基转移酶可以将葡萄糖分子转移至甜菊苷以形成莱鲍迪苷E,并且还可以将葡萄糖分子转移至莱鲍迪苷A以形成莱鲍迪苷D。另外,所述EUS融合酶具有蔗糖合成酶活性,并因而可以从UDP和蔗糖再生UDP-葡萄糖。

[0099] 特别合适的实施方案涉及使用UGT-SUS偶联系统从莱鲍迪苷E生产莱鲍迪苷D2的方法。所述方法包括:制备反应混合物,所述反应混合物包含:莱鲍迪苷E、蔗糖、尿苷二磷酸(UDP)、尿苷二磷酸糖基转移酶和蔗糖合成酶;并将所述反应混合物温育足够的时间以生成莱鲍迪苷D2,其中葡萄糖被共价偶联至所述莱鲍迪苷E以生成莱鲍迪苷D2。

[0100] 用于此实施方案的方法中的合适的UDP糖基转移酶与以上所述的相同。用于此实施方案的方法中的合适的蔗糖合成酶与以上所述的相同。

[0101] 另一个特别合适的实施方案涉及使用UDP-糖基转移酶融合酶从莱鲍迪苷E生产莱鲍迪苷D2的方法,所述融合酶包含偶联至蔗糖合成酶结构域的尿苷二磷酸糖基转移酶结构域。所述方法包括:制备反应混合物,所述反应混合物包含:莱鲍迪苷E、蔗糖、尿苷二磷酸(UDP)、尿苷二磷酸糖基转移酶融合酶,所述融合酶包含偶联至蔗糖合成酶结构域的尿苷二磷酸糖基转移酶结构域;并将所述反应混合物温育足够的时间以生成莱鲍迪苷D2,其中葡萄糖被共价偶联至所述莱鲍迪苷E以生成莱鲍迪苷D2。

[0102] 特别合适的UDP-糖基转移酶融合酶在下文中有更详细的描述。

[0103] 在另一方面,本公开涉及从甜菊苷合成莱鲍迪苷D2的方法。所述从甜菊苷合成莱

鲍迪昔D2的方法包括：制备反应混合物，所述反应混合物包含：甜菊苷、底物（选自蔗糖、尿苷二磷酸（UDP）和尿苷二磷酸-葡萄糖（UDP-葡萄糖））以及UDP-糖基转移酶（选自尿苷二磷酸糖基转移酶和UDP-糖基转移酶融合酶，所述融合酶包含偶联至蔗糖合成酶结构域的尿苷二磷酸糖基转移酶结构域）；并将所述反应混合物温育足够的时间以生成莱鲍迪昔D2，其中葡萄糖被共价偶联至所述甜菊苷以生成莱鲍迪昔E中间体，并且其中葡萄糖被共价偶联至所述莱鲍迪昔E中间体以生成莱鲍迪昔D2。

[0104] 最初，用于此实施方案的方法中的UDP糖基转移酶与以上所述的相同。如上所述，所述方法还可包括向所述含有尿苷二磷酸糖基转移酶的反应混合物中添加蔗糖合成酶以构建UGT-SUS偶联系统。

[0105] 特别合适的实施方案涉及使用UGT-SUS偶联系统从甜菊苷生产莱鲍迪昔D2的方法。所述方法包括：制备反应混合物，所述反应混合物包含：甜菊苷、蔗糖、尿苷二磷酸（UDP）、尿苷二磷酸糖基转移酶和蔗糖合成酶；并将所述反应混合物温育足够的时间以生成莱鲍迪昔D2，其中葡萄糖被共价偶联至所述甜菊苷以生成莱鲍迪昔E中间体，并且其中葡萄糖被共价偶联至所述莱鲍迪昔E中间体以生成莱鲍迪昔D2。

[0106] 用于此实施方案的方法中的合适的UDP糖基转移酶与以上所述的相同。用于此实施方案的方法中的合适的蔗糖合成酶与以上所述的相同。

[0107] 另一个特别合适的实施方案涉及使用UDP-糖基转移酶融合酶从甜菊苷生产莱鲍迪昔D2的方法，所述融合酶包含偶联至蔗糖合成酶结构域的尿苷二磷酸糖基转移酶结构域。所述方法包括：制备反应混合物，所述反应混合物包含：甜菊苷、底物（选自蔗糖、尿苷二磷酸（UDP））以及UDP-糖基转移酶融合酶，所述融合酶包含偶联至蔗糖合成酶结构域的尿苷二磷酸糖基转移酶结构域；并将所述反应混合物温育足够的时间以生成莱鲍迪昔D2，其中葡萄糖被共价偶联至所述甜菊苷以生成莱鲍迪昔E中间体，并且其中葡萄糖被共价偶联至所述莱鲍迪昔E中间体以生成莱鲍迪昔D2。

[0108] 特别合适的UDP-糖基转移酶融合酶在下文中有更详细的描述。

[0109] UDP-糖基转移酶融合酶

[0110] 在另一方面，本公开涉及UDP-糖基转移酶融合酶（在本文中也称为“EUS”）。具体地讲，所述UDP-糖基转移酶融合酶包含偶联至蔗糖合成酶结构域的尿苷二磷酸糖基转移酶结构域。所述EUS融合酶具有1,2-19 O-葡萄糖糖基化活性。令人惊奇且出乎意料的是，所述EUS融合酶还具有1,6-13 O-葡萄糖糖基化活性，其可以将葡萄糖分子转移至莱鲍迪昔E以形成莱鲍迪昔D2。另外，所述EUS融合酶具有蔗糖合成酶活性，并因而可以从UDP和蔗糖再生UDP-葡萄糖。

[0111] 所述UDP-糖基转移酶融合酶可以具有与SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%和甚至100%相同的多肽序列。合适地，所述UDP-糖基转移酶融合酶的氨基酸序列与SEQ ID No:5具有至少80%的同一性。更合适地，所述UDP-糖基转移酶融合酶的氨基酸序列可以与SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列具有至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%和甚至100%的氨基酸序列同一性。

[0112] 在另一方面，本公开涉及分离的核酸，其具有编码本文所述的UDP-糖基转移酶融

合酶的核苷酸序列。例如,所述分离的核酸可以包含这样的核苷酸序列,其编码UDP-糖基转移酶融合酶的多肽,所述多肽的核酸序列与SEQ ID NO: 6中所示的核酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%和甚至100%的序列同源性。合适地,所述分离的核酸包含这样的核苷酸序列,其编码UDP-糖基转移酶融合酶的多肽,所述多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列具有至少80%的序列同一性。更合适地,所述分离的核酸包含这样的核苷酸序列,其编码UDP-糖基转移酶融合酶的多肽,所述多肽的氨基酸序列与SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列具有至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%和甚至100%的序列同一性。因此,所述分离的核酸包含这样的核苷酸序列,其编码SEQ ID NO:5的功能性片段、SEQ ID NO:5的功能性变体或其它同源多肽,所述同源多肽与SEQ ID NO:5具有例如至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%和甚至100%的序列同一性。正如本领域技术人员已知的,所述编码UDP-糖基转移酶的核酸序列可以经过密码子优化以在合适的宿主生物体(如例如细菌和酵母)中表达。

[0113] 合适的尿苷二磷酸糖基转移酶结构域可以是稻尿苷二磷酸糖基转移酶EUGT11 (GenBank登录号AC133334)。特别合适的尿苷二磷酸糖基转移酶EUGT11可以是,例如,具有SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的尿苷二磷酸糖基转移酶EUGT11结构域。

[0114] 合适的蔗糖合成酶结构域可以是例如,拟南芥属蔗糖合成酶1、拟南芥属蔗糖合成酶3和绿豆蔗糖合成酶。特别合适的蔗糖合成酶结构域可以是,例如,拟南芥属蔗糖合成酶1。特别合适的拟南芥属蔗糖合成酶1是拟南芥蔗糖合成酶1 (AtSUS1)。特别合适的蔗糖合成酶1结构域可以是,例如,具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的蔗糖合成酶1。

[0115] 蔗糖合成酶催化NDP-葡萄糖与D-果糖之间的化学反应以生成NDP和蔗糖。蔗糖合成酶是糖基转移酶。此类酶的系统命名是NDP-葡萄糖:D-果糖 2- α -D-葡萄糖基转移酶。其它常用名称包括:UDP葡萄糖-果糖葡萄糖基转移酶、蔗糖合成酶、蔗糖-UDP葡萄糖基转移酶、蔗糖-尿苷二磷酸葡萄糖基转移酶以及尿苷二磷酸葡萄糖-果糖葡萄糖基转移酶。

[0116] 生产莱鲍迪苷D的方法

[0117] 在另一方面,本公开涉及合成莱鲍迪苷D的方法。所述方法包括:制备反应混合物,所述反应混合物包含:莱鲍迪苷A、底物(选自蔗糖、尿苷二磷酸(UDP)和尿苷二磷酸-葡萄糖(UDP-葡萄糖))以及UDP-糖基转移酶(选自尿苷二磷酸糖基转移酶和UDP-糖基转移酶融合酶(EUS),所述EUS包含偶联至蔗糖合成酶结构域的尿苷二磷酸糖基转移酶结构域);并将所述反应混合物温育足够的时间以生成莱鲍迪苷D,其中葡萄糖被共价偶联至所述莱鲍迪苷A以生成莱鲍迪苷D。

[0118] 在其中所述UDP-糖基转移酶是尿苷二磷酸糖基转移酶的实施方式中,合适的尿苷二磷酸糖基转移酶可以是稻尿苷二磷酸糖基转移酶EUGT11 (GenBank登录号AC133334)。特别合适的尿苷二磷酸糖基转移酶可以是,例如,具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的尿苷二磷酸糖基转移酶。

[0119] 在其中所述UDP-糖基转移酶是尿苷二磷酸糖基转移酶的实施方式中,所述方法还可以包括向所述反应混合物中添加蔗糖合成酶。合适的蔗糖合成酶可以是例如,拟南芥属蔗糖合成酶1、拟南芥属蔗糖合成酶3和绿豆蔗糖合成酶。特别合适的蔗糖合成酶可以是,例

如,拟南芥属蔗糖合成酶1。特别合适的拟南芥属蔗糖合成酶1是拟南芥蔗糖合成酶1 (AtSUS1)。特别合适的蔗糖合成酶1可以是,例如,具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的蔗糖合成酶1。

[0120] 在其中所述UDP-糖基转移酶是UDP-糖基转移酶融合酶(EUS)(如上所述,其包含偶联至蔗糖合成酶结构域的尿苷二磷酸糖基转移酶结构域)的实施方案中,合适的尿苷二磷酸糖基转移酶结构域可以是稻尿苷二磷酸糖基转移酶EUGT11 (GenBank登录号AC133334)。特别合适的尿苷二磷酸糖基转移酶结构域可以是,例如,具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的尿苷二磷酸糖基转移酶结构域。特别合适的蔗糖合成酶1结构域可以具有,例如,SEQ ID NO:3的氨基酸序列。特别合适的UDP-糖基转移酶融合酶(EUS)可以具有,例如,SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

[0121] 特别合适的实施方案涉及使用UGT-SUS偶联系统合成莱鲍迪苷D的方法。所述方法包括:制备反应混合物,所述反应混合物包含:莱鲍迪苷A、蔗糖、尿苷二磷酸(UDP)、UDP-糖基转移酶和蔗糖合成酶;并将所述反应混合物温育足够的时间以生成莱鲍迪苷D,其中葡萄糖被共价偶联至所述莱鲍迪苷A以生成莱鲍迪苷D。

[0122] 用于此实施方案的方法中的合适的UDP糖基转移酶与以上所述的相同。用于此实施方案的方法中的合适的蔗糖合成酶与以上所述的相同。

[0123] 特别合适的实施方案涉及使用UDP-糖基转移酶融合酶合成莱鲍迪苷D的方法。所述方法包括:制备反应混合物,所述反应混合物包含:莱鲍迪苷A、蔗糖、尿苷二磷酸(UDP)以及UDP-糖基转移酶融合酶(EUS),所述EUS包含偶联至蔗糖合成酶结构域的尿苷二磷酸糖基转移酶结构域;并将所述反应混合物温育足够的时间以生成莱鲍迪苷D,其中葡萄糖被共价偶联至所述莱鲍迪苷A以生成莱鲍迪苷D。

[0124] 特别合适的UDP-糖基转移酶融合酶在上文中有更详细的描述。

[0125] 可口服产品

[0126] 在另一方面,本公开涉及包含增甜量的莱鲍迪苷D2的可口服产品,所述产品选自饮料产品和可食用产品。

[0127] 所述可口服产品可以与约1% (w/v-%)至约4% (w/v-%)的蔗糖溶液具有等同的甜味强度。

[0128] 所述可口服产品可以含有约5 ppm至约100 ppm的莱鲍迪苷D2。

[0129] 莱鲍迪苷D2可以是所述可口服产品中唯一的甜味剂。

[0130] 所述可口服产品还可以含有至少一种另外的甜味剂。所述至少一种另外的甜味剂可以是例如,天然的高强度甜味剂。所述另外的甜味剂可以选自:甜菊提取物、甜菊醇糖苷、甜菊苷、莱鲍迪苷A、莱鲍迪苷B、莱鲍迪苷C、莱鲍迪苷D、莱鲍迪苷E、莱鲍迪苷F、杜克苷A、甜茶苷、甜菊双糖苷、蔗糖、高果糖玉米糖浆、果糖、葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、鼠李糖、赤藓糖醇、木糖醇、甘露糖醇、山梨糖醇、肌醇、AceK、阿斯巴甜、纽甜、三氯蔗糖、糖精、柚皮苷二氢查尔酮(arDHC)、新橙皮苷二氢查耳酮(NDHC)、甜茶苷、罗汉果苷IV、赛门苷I、罗汉果苷V、莫纳甜、奇异果甜蛋白、应乐果甜蛋白、布那珍、L-丙氨酸、甘氨酸、罗汉果(Lo Han Guo)、hernandulcin、叶甜素、trilobtain及其组合。

[0131] 所述可口服产品还可以含有至少一种添加剂。所述添加剂可以是,例如:碳水化合物、多元醇、氨基酸或其盐、聚氨基酸或其盐、糖酸或其盐、核苷酸、有机酸、无机酸、有机盐、

有机酸盐、有机碱盐、无机盐、苦味化合物、风味料、风味成分、收敛化合物、蛋白质、蛋白水解产物、表面活性剂、乳化剂、类黄酮、酒精、聚合物及其组合。

[0132] 在一个方面,本公开涉及包含增甜量的莱鲍迪苷D2的饮料产品。

[0133] 所述饮料产品可以是,例如,碳酸饮料产品和非碳酸饮料产品。所述饮料产品还可以是,例如:软饮料、喷泉饮料、冰冻饮料;即饮型饮料;冷冻且即饮型饮料、咖啡、茶、乳饮料、粉状软饮料、浓缩液、加味水、强化水、果汁、果汁调味饮料、运动饮料和能量饮料。

[0134] 在一些实施方案中,本公开的饮料产品可以包含一种或多种饮料成分,如例如:酸化剂、果汁和/或蔬菜汁、果肉等、风味剂、着色剂、防腐剂、维生素、矿物质、电解质、赤藓糖醇、塔格糖、甘油和二氧化碳。此类饮料产品可以任何合适形式提供,如饮料浓缩液和碳酸即饮型饮料。

[0135] 在某些实施方案中,本公开的饮料产品可以具有众多不同特定配方或组成中的任一种。本公开的饮料产品的配方可以在某种程度上变化,这取决于如下因素:该产品的预期细分市场、其需要的营养特性、风味属性等。例如,在某些实施方案中,向具体的饮料产品中添加另外的成分通常可以是一个选项。例如,可以添加另外的(即,更多的和/或其它的)甜味剂,通常可将风味剂、电解质、维生素、果汁或其它水果产品、增味剂、掩蔽剂等、风味增强剂和/或碳酸化添加至任何此类配方中以改变味道、口感、营养特性等。在实施方案中,所述饮料产品可以是可乐饮料,其含有水、约5 ppm至约100 ppm的莱鲍迪苷D2、酸化剂和风味剂。示例性风味剂可以是,例如,可乐风味剂、柑橘风味剂和香料风味剂。在一些实施方案中,可以二氧化碳的形式添加碳酸化用于泡腾。在其它实施方案中,可以根据其它成分、生产技术、所需保质期等添加防腐剂。在某些实施方案中,可以添加咖啡因。在一些实施方案中,所述饮料产品可以是可乐味碳酸饮料,特征在于含有碳酸水、甜味剂、可乐果提取物和/或其它风味剂、焦糖色、一种或多种酸和任选的其它成分。

[0136] 存在于所述饮料产品中的莱鲍迪苷D2的合适的量可以是,例如,约5 ppm至约100 ppm。在一些实施方案中,低浓度的莱鲍迪苷D2,例如,低于100 ppm,与浓度为10,000至30,000 ppm的蔗糖溶液具有等同的甜度。所述最终浓度的范围是:约5 ppm至约100 ppm、约5 ppm至约95 ppm、约5 ppm至约90 ppm、约5 ppm至约85 ppm、约5 ppm至约80 ppm、约5 ppm至约75 ppm、约5 ppm至约70 ppm、约5 ppm至约65 ppm、约5 ppm至约60 ppm、约5 ppm至约55 ppm、约5 ppm至约50 ppm、约5 ppm至约45 ppm、约5 ppm至约40 ppm、约5 ppm至约35 ppm、约5 ppm至约30 ppm、约5 ppm至约25 ppm、约5 ppm至约20 ppm、约5 ppm至约15 ppm、或约5 ppm至约10 ppm。作为另外一种选择,莱鲍迪苷D2可以范围如下的最终浓度存在于本公开的饮料产品中:约5 ppm至约100 ppm、约10 ppm至约100 ppm、约15 ppm至约100 ppm、约20 ppm至约100 ppm、约25 ppm至约100 ppm、约30 ppm至约100 ppm、约35 ppm至约100 ppm、约40 ppm至约100 ppm、约45 ppm至约100 ppm、约50 ppm至约100 ppm、约55 ppm至约100 ppm、约60 ppm至约100 ppm、约65 ppm至约100 ppm、约70 ppm至约100 ppm、约75 ppm至约100 ppm、约80 ppm至约100 ppm、约85 ppm至约100 ppm、约90 ppm至约100 ppm、或约95 ppm至约100 ppm。

[0137] 在另一方面,本公开涉及包含增甜量的莱鲍迪苷D2的可食用产品。所述可食用产品可以是,例如:食物产品、保健品、药物、膳食补充剂、牙科卫生组合物、可食用凝胶组合物、化妆产品和桌上调味料。

[0138] 如本文所用,“膳食补充剂”指代旨在补充膳食并提供营养物质(如维生素、矿物质、纤维、脂肪酸、氨基酸等)的化合物,其可能缺失或可能未在饮食中摄入足够的量。可使用本领域已知的任何合适的膳食补充剂。合适的膳食补充剂的实例可以是,例如,营养物质、维生素、矿物质、纤维、脂肪酸、药草、植物制剂、氨基酸和代谢物。

[0139] 如本文所用,“保健品”指代这样的化合物,其包括可提供医药或健康益处的任何食物或食物的一部分,所述益处包括预防和/或治疗疾病或障碍(例如,疲劳、失眠、衰老、记忆丧失、心境障碍、心血管疾病和血液中高水平的胆固醇、糖尿病、骨质疏松、炎症、自身免疫性疾病等)。可使用本领域已知的任何合适的保健品。在一些实施方案中,保健品可以被用作对食物和饮料的补充以及作为用于肠内或肠外应用的药物制剂,其可能是固体制剂(如胶囊或片剂)或液体制剂(如溶液或悬浮液)。

[0140] 在一些实施方案中,膳食补充剂和保健品还可以含有:保护性水解胶体(例如树胶、蛋白质、改性淀粉)、粘结剂、成膜剂、胶囊包封剂/材料、壁/壳材料、基质化合物、包衣、乳化剂、表面活性剂、增溶剂(油、脂肪、蜡、卵磷脂等)、吸附剂、载体、填充剂、共化合物、分散剂、润湿剂、加工助剂(溶剂)、流化剂、掩味剂、增重剂、果冻化剂、凝胶形成剂、抗氧化剂和抗菌剂。

[0141] 如本文所用,“凝胶”指代胶态体系,其中颗粒的网络散布于液体介质的整个体积中。尽管凝胶主要由液体构成,并因而具有类似于液体的密度,但是由于散布于液体介质中的颗粒网络,使得凝胶具有固体的结构连贯性。因此,凝胶通常看起来是固态、果冻状的材料。凝胶可以被用于许多应用中。例如,凝胶可以被用于食品、油漆和粘接剂。可以食用的凝胶被称为“可食用凝胶组合物”。可食用凝胶组合物通常作为零食、甜品、主食的一部分食用,或伴着主食一起食用。合适的可食用凝胶组合物的实例可以是,例如:凝胶甜品、布丁、果酱、果冻、糊酱、乳脂松糕、肉冻、棉花软糖、橡皮糖等。在一些实施方案中,可食用凝胶混合物通常是粉末状或颗粒状固体,可向其中加入液体以形成可食用凝胶组合物。合适的液体的实例可以是,例如:水、乳液、类乳液体、果汁、酒精、酒精性饮料及其组合。合适的乳液的实例可以是,例如:奶、发酵奶、奶油、液体乳清及其混合物。合适的类乳液体的实例可以是,例如:豆奶和非乳制咖啡伴侣。

[0142] 如本文所用,术语“胶凝成分”指代可以在液体介质内形成胶态体系的任何材料。合适的胶凝成分的实例可以是,例如:明胶、藻酸盐、角叉菜胶、树胶、果胶、魔芋、琼脂、食品酸、凝乳酶、淀粉、淀粉衍生物及其组合。对于本领域技术人员众所周知的是,可食用凝胶混合物或可食用凝胶组合物中所用胶凝成分的量可以根据许多因素而有很大差异,所述因素如例如,所用的具体胶凝成分、所用的具体液体基质以及该凝胶的所需特性。

[0143] 本公开的凝胶混合物和凝胶组合物可以通过本领域已知的任何合适的方法制备。在一些实施方案中,本公开的可食用凝胶混合物和可食用凝胶组合物可以使用除莱鲍迪苷D2和所述胶凝剂以外的其它成分制备。其它合适的成分的实例可以是,例如:食品酸、食品酸的盐、缓冲系统、增量剂、多价螯合剂、交联剂、一种或多种香精、一种或多种色素及其组合。

[0144] 可使用本领域已知的任何合适的药物组合物。在某些实施方案中,本公开的药物组合物可以含有约5 ppm至约100 ppm的莱鲍迪苷D2和一种或多种药学上可接受的赋形剂。在一些实施方案中,本公开的药物组合物可以被用于配制含有一种或多种发挥生物效应的

活性试剂的药品。因此,在一些实施方案中,本公开的药物组合物可以含有一种或多种发挥生物效应的活性试剂。合适的活性试剂是本领域众所周知的(例如,The Physician's Desk Reference)。此类组合物可以根据本领域熟知的程序制备,例如,如在Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., USA中所述的。

[0145] 莱鲍迪苷D2可以与本领域已知的任何合适的牙科和口腔卫生组合物一起使用。合适的牙科和口腔卫生组合物的实例可以是,例如:牙膏、牙齿抛光剂、牙线、洗口药、漱口水、牙粉、口喷剂、口腔清新剂、牙斑冲洗液、牙科止痛药等。

[0146] 存在于所述可食用产品中的莱鲍迪苷D2的合适的量可以是,例如,约5份/百万份(ppm)至约100份/百万份(ppm)。在一些实施方案中,低浓度的莱鲍迪苷D2,例如,低于100 ppm,与浓度为10,000至30,000 ppm的蔗糖溶液具有等同的甜度。所述最终浓度的范围是:约5 ppm至约100 ppm、约5 ppm至约95 ppm、约5 ppm至约90 ppm、约5 ppm至约85 ppm、约5 ppm至约80 ppm、约5 ppm至约75 ppm、约5 ppm至约70 ppm、约5 ppm至约65 ppm、约5 ppm至约60 ppm、约5 ppm至约55 ppm、约5 ppm至约50 ppm、约5 ppm至约45 ppm、约5 ppm至约40 ppm、约5 ppm至约35 ppm、约5 ppm至约30 ppm、约5 ppm至约25 ppm、约5 ppm至约20 ppm、约5 ppm至约15 ppm、或约5 ppm至约10 ppm。作为另外一种选择,莱鲍迪苷D2可以范围如下的最终浓度存在于本公开的可食用产品中:约5 ppm至约100 ppm、约10 ppm至约100 ppm、约15 ppm至约100 ppm、约20 ppm至约100 ppm、约25 ppm至约100 ppm、约30 ppm至约100 ppm、约35 ppm至约100 ppm、约40 ppm至约100 ppm、约45 ppm至约100 ppm、约50 ppm至约100 ppm、约55 ppm至约100 ppm、约60 ppm至约100 ppm、约65 ppm至约100 ppm、约70 ppm至约100 ppm、约75 ppm至约100 ppm、约80 ppm至约100 ppm、约85 ppm至约100 ppm、约90 ppm至约100 ppm、或约95 ppm至约100 ppm。

[0147] 在某些实施方案中,食物产品组合物中存在约5 ppm至约100 ppm的莱鲍迪苷D2。如本文所用,“食物产品组合物”指代任何固态或液态的可服用材料,其可以(但不必)具有营养价值并旨在用于人类和动物的食用。

[0148] 合适的食物产品组合物的实例可以是,例如:糖果组合物,如糖果、薄荷糖、果味滴露、可可制品、巧克力等;调味品,如番茄酱、芥末酱、奶黄酱等;口香糖;谷物组合物;烘焙制品,如面包、蛋糕、馅饼、饼干等;乳制品,如奶、奶酪、奶油、冰淇淋、酸奶油、酸奶、冰冻果子露等;桌上甜味剂组合物;汤;炖菜;方便食品;肉类,如火腿、熏肉、香肠、肉干等;明胶及明胶类产品,如果酱、果冻、蜜饯等;水果;蔬菜;蛋制品;糖衣;糖浆,包括糖蜜;零食;坚果仁及坚果制品;以及动物饲料。

[0149] 食物产品组合物还可以是草本香料、香料和佐料、天然及合成的香精、以及增味剂,如谷氨酸一钠。在一些实施方案中,食物产品组合物可以是,例如:预包装产品,如限糖甜味剂、液态甜味剂、粒状风味混合物、宠物食品、牲畜饲料、烟草,以及用于烘焙应用的材料,如用于制备面包、饼干、蛋糕、煎饼、面包圈等的粉状烘焙混合物。在其它实施方案中,食物产品组合物还可以是减肥及低热量食物以及含有少量蔗糖或不含蔗糖的饮料。

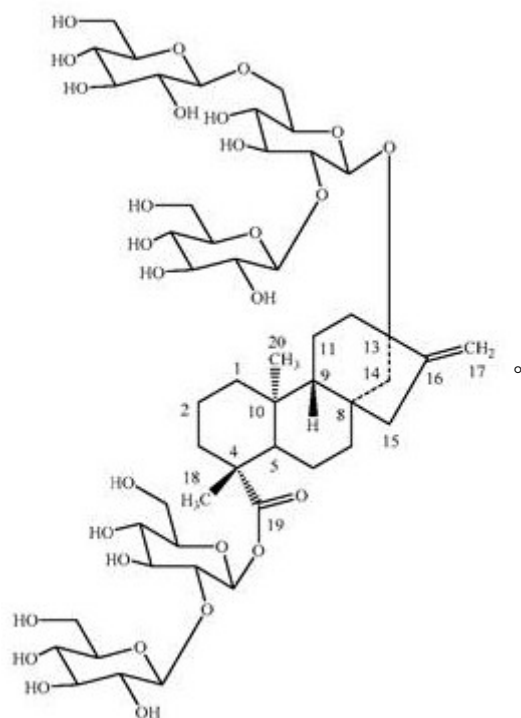
[0150] 在可与任一前述实施方案结合的某些实施方案中,莱鲍迪苷D2是唯一的甜味剂,并且所述产品与约1%至约4% (w/v-%)的蔗糖溶液具有等同的甜味强度。在可以与任一前述实施方案结合的某些实施方案中,所述可食用产品和饮料产品还可以包含另外的甜味剂,其中所述产品与约1%至约10% (w/v-%)的蔗糖溶液具有等同的甜味强度。在可以与任一前

述实施方案结合的某些实施方案中,所述产品中的每种增甜成分均是高强度甜味剂。在可以与任一前述实施方案结合的某些实施方案中,所述产品中的每种增甜成分均可以是天然的高强度甜味剂。在可以与任一前述实施方案结合的某些实施方案中,所述另外的甜味剂包括选自以下的一种或多种甜味剂:甜菊提取物、甜菊醇糖苷、甜菊苷、莱鲍迪苷A、莱鲍迪苷B、莱鲍迪苷C、莱鲍迪苷D、莱鲍迪苷F、杜克苷A、甜茶苷、甜菊双糖苷、蔗糖、高果糖玉米糖浆、果糖、葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、鼠李糖、赤藓糖醇、木糖醇、甘露糖醇、山梨糖醇、肌醇、AceK、阿斯巴甜、纽甜、三氯蔗糖、糖精、柚皮苷二氢查尔酮(arDHC)、新橙皮苷二氢查耳酮(NDHC)、甜茶苷、罗汉果苷IV、赛门苷I、罗汉果苷V、莫纳甜、奇异果甜蛋白、应乐果甜蛋白、布那珍、L-丙氨酸、甘氨酸、罗汉果(Lo Han Guo)、hernandulcin、叶甜素、trilobtain及其组合。在可以与任一前述实施方案结合的某些实施方案中,所述可食用产品和饮料产品还可以包含选自以下的一种或多种添加剂:碳水化合物、多元醇、氨基酸或其盐、聚氨基酸或其盐、糖酸或其盐、核苷酸、有机酸、无机酸、有机盐、有机酸盐、有机碱盐、无机盐、苦味化合物、风味料、风味成分、收敛化合物、蛋白质、蛋白水解产物、表面活性剂、乳化剂、类黄酮、酒精、聚合物及其组合。在可以与任一前述实施方案结合的某些实施方案中,在其被添加到所述产品之前,莱鲍迪苷D2具有按重量计约50%至约100%的纯度。

[0151] 甜味剂

[0152] 在另一方面,本公开涉及甜味剂,其化学结构为:

[0153]



[0154] 所述甜味剂还可以包含下列中的至少一种:填充剂、增量剂和防结块剂。合适的填充剂、增量剂和防结块剂是本领域已知的。

[0155] 在某些实施方案中,莱鲍迪苷D2甜味剂可以被包含在所述可食用产品和饮料产品中并且/或者以足以给所述可食用产品和饮料产品增甜和/或提高其甜度的最终浓度添加。莱鲍迪苷D2的“最终浓度”指代存在于所述最终可食用产品和饮料产品中的莱鲍迪苷D2的浓度(即,在已经添加了所有成分和/或化合物以生产所述可食用产品和饮料产品之后)。因

此,在某些实施方案中,莱鲍迪苷D2被包含在所述可食用产品和饮料产品中并且/或者被添加到用于制备所述可食用产品和饮料产品的化合物或成分中。莱鲍迪苷D2可能存在于单一化合物或成分中,或存在于多种化合物和成分中。在其它实施方案中,莱鲍迪苷D2被包含在所述可食用产品和饮料产品中并且/或者被添加到其中。在某些优选的实施方案中,莱鲍迪苷D2以范围如下的最终浓度被包含和/或被添加:约5 ppm至约100 ppm、约5 ppm至约95 ppm、约5 ppm至约90 ppm、约5 ppm至约85 ppm、约5 ppm至约80 ppm、约5 ppm至约75 ppm、约5 ppm至约70 ppm、约5 ppm至约65 ppm、约5 ppm至约60 ppm、约5 ppm至约55 ppm、约5 ppm至约50 ppm、约5 ppm至约45 ppm、约5 ppm至约40 ppm、约5 ppm至约35 ppm、约5 ppm至约30 ppm、约5 ppm至约25 ppm、约5 ppm至约20 ppm、约5 ppm至约15 ppm、或约5 ppm至约10 ppm。作为另外一种选择,莱鲍迪苷D2以范围如下的最终浓度被包含和/或被添加:约5 ppm至约100 ppm、约10 ppm至约100 ppm、约15 ppm至约100 ppm、约20 ppm至约100 ppm、约25 ppm至约100 ppm、约30 ppm至约100 ppm、约35 ppm至约100 ppm、约40 ppm至约100 ppm、约45 ppm至约100 ppm、约50 ppm至约100 ppm、约55 ppm至约100 ppm、约60 ppm至约100 ppm、约65 ppm至约100 ppm、约70 ppm至约100 ppm、约75 ppm至约100 ppm、约80 ppm至约100 ppm、约85 ppm至约100 ppm、约90 ppm至约100 ppm、或约95 ppm至约100 ppm。例如,莱鲍迪苷D2可以如下的最终浓度被包含和/或添加:约5 ppm、约10 ppm、约15 ppm、约20 ppm、约25 ppm、约30 ppm、约35 ppm、约40 ppm、约45 ppm、约50 ppm、约55 ppm、约60 ppm、约65 ppm、约70 ppm、约75 ppm、约80 ppm、约85 ppm、约90 ppm、约95 ppm、或约100 ppm,包括这些值之间的任何范围。

[0156] 在某些实施方案中,莱鲍迪苷D2是被包含在所述可食用产品和所述饮料产品中并且/或者被添加到其中的唯一的甜味剂。在此类实施方案中,所述可食用产品和所述饮料产品与约1%至约4% (w/v-%) 的蔗糖溶液、约1%至约3% (w/v-%) 的蔗糖溶液、或约1%至约2% (w/v-%) 的蔗糖溶液具有等同的甜味强度。作为另外一种选择,所述可食用产品和所述饮料产品与约1%至约4% (w/v-%) 的蔗糖溶液、约2%至约4% (w/v-%) 的蔗糖溶液、约3%至约4% (w/v-%) 的蔗糖溶液、或约4%的蔗糖溶液具有等同的甜味强度。例如,所述可食用产品和所述饮料产品可与约1%、约2%、约3%或约4% (w/v-%) (包括这些值之间的任何范围) 的蔗糖溶液具有等同的甜味强度。

[0157] 本公开的可食用产品和饮料产品可以包含莱鲍迪苷D2与本公开的一种或多种甜味剂的以一定比率的混合物,所述比率足以实现所需甜味强度、营养特性、味道属性、口感或其它感官因素。

[0158] 参考下列非限制性实施例将更加充分地理解本公开。

实施例

[0159] 实施例1

[0160] 在本实施例中,合成了所有候选UGT基因的全长DNA片段。

[0161] 具体地讲,cDNA经过密码子优化而用于大肠杆菌表达(Genscript, Piscataway, NJ)。将合成的DNA克隆到细菌表达载体,pETite N-His SUMO Kan Vector (Lucigen)中。对于编码UDP-糖基转移酶融合酶(EUS)的核苷酸序列(参见,SEQ ID NO:6),将GSG-接头(由核苷酸序列:ggttctggt 编码)插入到编码稻尿苷二磷酸糖基转移酶(EUGT11)结构域的核苷

酸序列 (参见,SEQ ID NO:2) 与编码拟南芥蔗糖合成酶1 (AtSUS1) 结构域的核苷酸序列 (参见,SEQ ID NO:4) 之间的框架中。表2汇总了蛋白质和序列识别号。

表2: 序列识别号.

[0162]	名称	SEQ ID NO	说明
	EUGT11	SEQ ID NO:1	氨基酸
	EUGT11	SEQ ID NO:2	核酸
	AtSUS1	SEQ ID NO:3	氨基酸
	AtSUS1	SEQ ID NO:4	核酸
	EUS融合酶	SEQ ID NO:5	氨基酸
	EUS融合酶	SEQ ID NO:6	核酸

[0163] 将各表达构建体分别转化到大肠杆菌BL21 (DE3) 中,然后在含有50 μg/mL 卡那霉素的LB培养液中于37℃生长直至OD₆₀₀达到0.8-1.0。通过加入1 mM 异丙基 β-D-1-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导蛋白表达,并使培养物在16℃再生长22小时。通过离心 (3,000 x g; 10 min; 4℃) 收获细胞。收集细胞团块并立即使用或保存在-80℃。

[0164] 将细胞团块重悬浮于裂解缓冲液 (50 mM 磷酸钾缓冲液,pH 7.2、25 μg/ml 1溶菌酶、5 μg/ml DNase I、20 mM 咪唑、500 mM NaCl、10% 甘油 和 0.4% TRITON X-100) 中。在4℃通过超声处理破坏细胞,并通过离心 (18,000 x g; 30 min) 澄清细胞碎片。将上清液上样到经过平衡的 (平衡缓冲液:50 mM 磷酸钾缓冲液,pH 7.2、20 mM 咪唑、500 mM NaCl、10% 甘油) Ni-NTA (Qiagen) 亲和层析柱上。在上样蛋白样品后,将柱用平衡缓冲液洗涤以去除未结合的污染蛋白。用含有250mM 咪唑的平衡缓冲液洗脱His-标签的UGT重组多肽。纯化后,通过SDS-PAGE分析重组EUGT11蛋白 (图2A中箭头所指示的62kD条带) 和EUS融合酶 (图2B中箭头所指示的155kD条带)。在各个SDS凝胶图像的左侧标明了分子量标准。

[0165] 实施例2

[0166] 在本实施例中,使用莱鲍迪苷A作为甜菊醇糖苷底物测定了重组EUGT11蛋白和重组EUS融合酶的1,2-19 O-葡萄糖糖基化活性。

[0167] 在200 μL的体外反应系统中测试了所述重组多肽 (10 μg)。所述反应系统含有50 mM 磷酸钾缓冲液,pH 7.2、3 mM MgCl₂、1 mg/ml 甜菊醇糖苷底物 和 1 mM UDP-葡萄糖。反应在30℃进行并通过加入200 μL的1-丁醇终止。用200 μL的1-丁醇萃取样品三次。将汇集的级分干燥并溶于70 μL的80% 甲醇中用于高效液相色谱 (HPLC) 分析。莱鲍迪苷A (纯度99%) 被用作底物。莱鲍迪苷A得自Blue California (Rancho Santa Margarita, CA)。体外反应进行了14小时和24小时。图3A示出了莱鲍迪苷D (标记为“Reb D”) 的峰用于比较。

[0168] 将UGT催化的糖基化反应与由蔗糖合成酶 (例如,AtSUS1) 催化的UDP-葡萄糖生成反应偶联起来 (在本文中称为“UGT-SUS偶联系统”)。具体地讲,合成了拟南芥蔗糖合成酶1 (AtSUS1) 序列 (Bieniawska 等人,Plant J. 2007, 49: 810-828) 并将其插入到细菌表达载体中。表达重组AtSUS1蛋白并通过亲和层析纯化。将AtSUS1蛋白加入到EUGT11蛋白中以形成体外反应混合物,在本文中称为EUGT11-AtSUS1偶联系统。在所得到的UGT-SUS (例如,EUGT11-AtSUS1) 偶联系统中,从蔗糖和UDP生成了UDP-葡萄糖,从而省略掉添加另外的UDP-葡萄糖。

[0169] 使用Dionex UPLC ultimate 3000 系统 (Sunnyvale, CA) 进行HPLC分析,该系统包括四元泵、温控柱室、自动采样器和UV吸光度检测器。带保护柱的Phenomenex Luna NH2

(150 x 3.0 mm, 3 μ m (100 Å)) 被用于表征甜菊醇糖苷。72% 乙腈水溶液在HPLC分析中被用于等梯度洗脱。

[0170] 如图3中所示,在所有反应条件下,EUS和EUGT11均将糖类部分转移至莱鲍迪苷A以生成莱鲍迪苷D。EUS融合酶(图3B和3E)和UGT-SUS(即,EUGT11-AtSUS1)偶联反应系统(图5D和5G)以14小时和24小时的温育时间将莱鲍迪苷A全部转化成莱鲍迪苷D。然而,单凭EUGT11酶在14小时(图3C)和24小时(图3F)仅将莱鲍迪苷A部分转化成莱鲍迪苷D。此外,相同分子数量的EUS相比EUGT11具有更高的酶活性,并以14小时(图3B)和24小时(图3E)的温育时间将全部莱鲍迪苷A转化成莱鲍迪苷D。这些结果表明,可以使用EUS融合酶实现UGT-SUS(即,EUGT11-AtSUS1)偶联系统的反应。另外,这些结果表明,EUGT11显示出1,2-19 O-葡萄糖糖基化活性以从莱鲍迪苷A生成莱鲍迪苷D(图3C和3F),并且AtSUS1提高了EUGT11在UGT-SUS偶联系统中的转化效率(图3B、3D、3E和3G)。图3A示出了甜菊苷(标记为“Ste”)、莱鲍迪苷A(标记为“Reb A”)和莱鲍迪苷D(标记为“Reb D”)的峰用于比较。

[0171] 实施例3

[0172] 在本实施例中,使用甜菊苷作为甜菊醇糖苷底物以14小时和24小时的温育时间测定EUGT11和EUS的1,2-19 O-葡萄糖糖基化活性,如实施例2中所述。

[0173] 除了如以上实施例2中所述EUGT11将莱鲍迪苷A转化成莱鲍迪苷D之外,EUGT11还将甜菊苷转化成莱鲍迪苷E(在图4中标记为“Reb E”)。令人惊讶的是,在所有反应中,EUGT11和EUS均生成了预料之外的化合物,莱鲍迪苷D2(在图4中标记为“Reb D2”),其具有约7.28分钟的HPLC保留时间。当AtSUS1被添加到EUGT11反应混合物中以构建UGT-SUS偶联系统(图4D和4G)时以及当使用了EUS(图4B和4E)时,生成了更多的莱鲍迪苷D2。随着莱鲍迪苷D2产量的增加,生成的莱鲍迪苷E(在图4C和4F中标记为“Reb E”)在生产莱鲍迪苷D2的过程中被消耗。这些结果表明,EUGT11可以催化从莱鲍迪苷E生成莱鲍迪苷(莱鲍迪苷D2)的反应。图4A示出了甜菊苷(标记为“Ste”)、莱鲍迪苷A(标记为“Reb A”)和莱鲍迪苷D(标记为“Reb D”)的峰用于比较。

[0174] 实施例4

[0175] 在本实施例中,为了确认莱鲍迪苷E至莱鲍迪苷D2的体外转化,使用莱鲍迪苷E作为甜菊醇糖苷底物测定了EUGT11和EUS,如实施例2中所述。

[0176] 作为比较,还测定了另一种UGT(UGT76G1)的酶活性。UGT76G1(来自甜菊)已经被鉴别为这样的酶,其将糖类残基转移至甜菊苷的C13 O-葡萄糖的C-3'以形成莱鲍迪苷A。如图5F和5J中所示,当UGT76G1被用在UGT-SUS偶联系统中时,糖类残基被转移至莱鲍迪苷E的C13 O-葡萄糖的C-3'以形成莱鲍迪苷D。图5A和5B示出了经纯化的莱鲍迪苷D(“Reb D”)和莱鲍迪苷E(“Reb-E”)用于比较。

[0177] 如以上实施例3中所述并如图5C和5G中所示,单凭EUGT11可以将一个葡萄糖分子转移至莱鲍迪苷E以形成不同于莱鲍迪苷D和E的莱鲍迪苷(在本文中称为“莱鲍迪苷D2”并在图5C和5G中标记为“Reb D2”)(分别在图5A和图5B中比较了峰)。UGT-SUS偶联系统中的EUGT11(图5D和5H)和EUS(图5E和5I)提高了从莱鲍迪苷E至莱鲍迪苷D2的转化。

[0178] 这些结果表明,EUGT11是具有1,2-19 O-葡萄糖糖基化活性的UGT以生产相关的甜菊醇糖苷。EUGT11可以催化从甜菊苷作为底物生成Reb-E以及从Reb A作为底物生成Reb D的反应。令人惊讶的是,在以甜菊苷作为底物的体外反应中出乎意料地合成了化合物(Reb

D2)。进一步的实验确认, Reb D2是从Reb E直接合成。根据Reb D2的结构, 在体外反应中, EUGT11将D-葡萄糖转移至Reb-E的C13 O-葡萄糖的C-6' 以生成1,6- β -糖苷键。

[0179] 实施例5

[0180] 在本实施例中, 从扩大的体外反应中纯化莱鲍迪苷(莱鲍迪苷D2)并将其制备用于液相色谱/质谱法(LC/MS)以及核磁共振(NMR)分析。

[0181] 从扩大的体外反应中纯化莱鲍迪苷(莱鲍迪苷D2)。通过HPLC分析监测该体外反应。在所需时间点, Reb D2化合物通过层析柱纯化并通过真空干燥浓缩。经纯化的Reb D2是具有95%纯度的白色粉末。将收集的Reb D2化合物用于高分辨质谱(HRMS)分析。HRMS数据由LTQ Orbitrap Discovery HRMS仪器生成, 其中其分辨率设为30k, 并以正离子电喷模式从 m/z 150至1500扫描数据。针电压设为4 kV; 其它源条件为: 屏蔽气 = 25、辅助气 = 0、吹扫气 = 5 (所有气流采用任意单位)、毛细管电压 = 30V、毛细管温度 = 300°C 和 管透镜电压 = 75。将样品用2:2: 1的乙腈: 甲醇: 水(与输注液相同)稀释, 并注入50微升样品。使用Bruker Avance DRX 500 MHz仪器或Varian INOVA 600 MHz仪器、使用标准脉冲序列采集核磁共振(NMR)光谱。1D (^1H 和 ^{13}C) 和2D (TOCSY、HMQC和HMBC) NMR光谱在吡啶- d_5 (也称为 $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) 中进行。

[0182] Reb D2的分子式根据其正高分辨质谱(HRMS)而被推断为 $\text{C}_{50}\text{H}_{80}\text{O}_{28}$, 其显示出分别在 m/z 1146.5169 和 1151.4721对应于 $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ 和 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 的加合离子; 此组成得到 ^{13}C NMR光谱数据的支持。Reb D2的 ^1H NMR光谱数据显示出存在位于 δ 1.10和1.44的两个甲基单峰、位于 δ 5.09和5.72的环外双键的两个烯烃质子单峰、位于 δ 0.74-2.80之间的九个 sp^3 亚甲基和两个 sp^3 次甲基质子, 这是分离自甜菊属的*ent*-贝壳杉烷型二萜的特征。

[0183] *ent*-贝壳杉烷型二萜的基本骨架得到TOCSY研究的支持, 其显示出关键的相关性: H-1/H-2; H-2/H-3; H-5/H-6; H-6/H-7; H-9/H-11; H-11/H-12。Reb D2的 ^1H NMR光谱还显示出存在位于 δ 5.04、5.10、5.21、5.48和6.30的端基质子共振; 表明其结构中有五个糖类单位。用5% H_2SO_4 酸水解Reb D2得到D-葡萄糖, 其通过由TLC与真实样品直接比较而被鉴别出。在 δ 5.04 (d, $J=7.5$ Hz)、5.10 (d, $J=7.4$ Hz)、5.21 (d, $J=7.9$ Hz)、5.48 (d, $J=7.9$ Hz) 和6.30 (d, $J=7.9$ Hz) 观察到的葡萄糖部分的五个端基质子的大耦合常数表明其如其它甜菊醇糖苷所报道的 β -取向。Reb D2的 ^1H 和 ^{13}C NMR值是根据TOCSY、HMQC和HMBC数据分配的并汇总于表3中。

表3: Reb D2和Reb E的 ^1H 和 ^{13}C NMR 值.

位置	Reb D2 (1)		Reb E(2)	
	^1H NMR	^{13}C NMR	^1H NMR	^{13}C NMR
1	0.74 t (12.8), 1.67 m	41.2	0.73 t (13.3), 1.68 m	41
2	1.48 m, 2.12 m	20.6	1.46 m, 2.13 m	20.6
3	1.13 m, 2.80 d (12.8)	38.4	1.12 m, 2.78 d (12.8)	38.2
4	--	44.9	--	44.8
5	0.98 d (11.8)	58.1	0.97 d (11.8)	38.2
6	1.87 m, 2.10 m	22.6	1.85 m, 2.09 m	22.6
7	1.28 m, 1.64 m	42.2	1.27 m, 1.63 m	42.1
8	--	43.3	--	43
9	0.88 d, (7.5)	54.5	0.88 br s	54.5
10	--	40.3	--	40.2
11	1.66 m	21.2	1.65 m	21.1
12	1.91 m, 2.22 m	38.2	1.96 m, 2.16 m	37.8
13	--	86.8	--	86.6
14	1.69 d, (11.4), 2.49 d, (11.0)	44.9	1.74 d, (11.4), 2.54 d, (11.0)	44.8
15	2.04 m, 2.16 m	48.6	2.04 m, 2.12 m	48.5
16	--	155	--	154.9
17	5.09 s, 5.72 s	105.4	5.09 s, 5.76 s	105.4
18	1.44 s	29.9	1.43 s	29.8
19	--	176.3	--	176.2
20	1.10 s	17.3	1.10 s	17.2
1'	6.30 d (7.9)	93.9	6.30 d (7.9)	93.9
2'	4.38 m	81.5	4.38 m	81.7
3'	4.27 m	78.5	4.26 m	78.4
4'	4.24 m	72	4.22 m	72.1
5'	3.94 m	79.6	3.92 m	79.5
6'	4.33 m, 4.43 m	62.7	4.33 m, 4.43 m	62.6
1''	5.10 d	98.3	5.16 d	98.4

[0184]

[0185]

	(7.4)		(7.5)	
2''	4.18 m	84.8	4.17 m	84.9
3''	4.29 m	78.6	4.32 m	78.5
4''	4.20 m	71.3	4.22 m	71.8
5''	3.78 m	78.5	3.72 m	78.2
6''	4.32 m, 4.57 m	69.8	4.26 m, 4.35 m	62.9
1'''	5.21 d (7.9)	107.2	5.32 d (7.5)	107.2
2'''	4.14 t (8.4)	77.6	4.15 t (8.4)	77.7
3'''	4.25 m	78.7	4.26 m	78.6
4'''	4.34 m	72.4	4.36 m	72.3
5'''	3.94 m	79.1	3.96 m	79
6'''	4.43 m, 4.53 m	63.3	4.46 m, 4.56 m	63.2
1''''	5.48 d (7.9)	106.2	5.48 d (7.9)	106.2
2''''	4.04 t (7.9)	76.8	4.06 t (7.9)	76.8
3''''	4.22 m	78.8	4.25 m	78.7
4''''	4.32 m	71.2	4.31 m	71.2
5''''	3.99 m	79.1	4.02 m	79.1
6''''	4.38 m, 4.55 m	63.5	4.42 m, 4.54 m	63.4
1'''''	5.04 d (7.5)	105.9		
2'''''	4.02 m	77		
3'''''	4.21 m	78.6		
4'''''	4.25 m	72.2		
5'''''	3.96 m	79.1		
6'''''	4.34 m, 4.48 m	63.3		

[0186] 根据充分的1D (^1H 和 ^{13}C)、2D NMR (TOCSY、HMQC和HMBC) 和高分辨质谱 (HRMS) 数据, 鉴别出Reb D2的结构并将其与莱鲍迪苷E的结构进行比较 (参见, 图6)。

[0187] 根据Reb D2的NMR光谱数据和水解实验的结果, 结论是: 其结构中存在连接至无糖基甜菊醇的五个 β -D-葡萄糖基单元。Reb D2与莱鲍迪苷E的 ^1H 和 ^{13}C NMR值的仔细比较 (参见, 表2) 表明存在这样的甜菊醇无糖基部分, 其在C13以醚键的形式具有2-O- β -D-葡萄糖二糖基单元并在C19以酯键的形式具有另一个2-O- β -D-葡萄糖二糖基单元, 而留下额外的 β -D-葡萄糖基单元未分配。此外, Reb D2的 ^{13}C NMR光谱数据显示糖类部分的五个氧化次甲基 (oxymethine) 碳之一出现在位于 δ 69.8的低场 (downfield), 表明该额外的 β -D-葡萄糖基单元位于此位置。Reb D2和Reb E中两个糖I和IV的相同质子和碳光谱数据表明该额外的 β -D-葡萄糖基单元位于糖II或糖III的6-位置。 β -D-葡萄糖基部分的糖II的6-位置处的 ^1H 和 ^{13}C 化学位移的同时低场位移表明该额外的 β -D-葡萄糖基单元被附接至此位置。所述结构得到关键TOCSY和HMBC相关性的进一步支持, 如图7中所示。

[0188] 根据NMR和质谱数据以及水解研究的结果, 通过莱鲍迪苷E的酶转化产生的Reb D2

的结构被推断为:13-[(2-*O*-β-D-吡喃葡萄糖基-6-*O*-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)氧基] *ent*-16-贝壳杉烯-19-酸-(2-*O*-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)酯。

[0189] 13-[(2-*O*-β-D-吡喃葡萄糖基-6-*O*-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)氧基] *ent*-16-贝壳杉烯-19-酸-(2-*O*-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)酯 (Reb D2)。白色粉末;¹H-NMR (600 MHz, C₅D₅N, δ ppm) 和 ¹³C-NMR (150 MHz, C₅D₅N, δ ppm) 光谱数据参见表2;HRMS (M+NH₄)⁺*m/z* 1146.5169 (针对C₅₀H₈₄O₂₈N计算为:1146.5180)、(M+Na)⁺*m/z* 1151.4721 (针对C₅₀H₈₀O₂₈Na计算为:1151.4734)。

[0190] 向Reb D2 (5 mg)的MeOH溶液(10 ml)中加入3 ml的5% H₂SO₄,并使混合物回流24小时。然后用饱和碳酸钠中和反应混合物并用乙酸乙酯(EtOAc) (2 x 25 ml)萃取以得到含有糖的水性级分和含有无糖基部分的EtOAc级分。将水相浓缩并使用TLC系统EtOAc/正丁醇/水(2:7:1)和CH₂Cl₂/MeOH/水(10:6:1)将其与标准品糖进行比较;所述糖被鉴别为D-葡萄糖。

[0191] 根据充分的1D (¹H和¹³C)和2D NMR (TOCSY、HMQC和HMBC)以及高分辨质谱数据和水解研究,将Reb D2的结构确认为13-[(2-*O*-β-D-吡喃葡萄糖基-6-*O*-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)氧基] *ent*-16-贝壳杉烯-19-酸-(2-*O*-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)酯。

[0192] 实施例6

[0193] 在本实施例中,将莱鲍迪苷(莱鲍迪苷D2)的结构与Reb-E和Reb-D进行了比较。

[0194] 根据甜菊醇糖苷数据库,仅Reb-D在其结构中含有连接至无糖基甜菊醇的五个β-D-葡萄糖基单元:两个糖苷残基位于无糖基甜菊醇的C19位置,而三个糖苷残基位于C13位置。来自甜菊的UGT76G1已经被鉴别为这样的酶,其将糖类残基转移至Reb E的C13 *O*-葡萄糖的C-3'以形成莱鲍迪苷D(参见,图5F和5J)。Reb D2是也含有五个D-糖苷残基的甜菊醇糖苷,其与莱鲍迪苷D相比具有不同的结构(参见,图8)。莱鲍迪苷D2的第五个糖苷残基(“糖V”)通过1,6 β糖苷键而位于Reb E的C-13-*O*葡萄糖的C-6',而莱鲍迪苷D的第五个糖苷残基(“糖V”)通过1,3 β糖苷键而位于Reb E的C13 *O*-葡萄糖的C-3' (参见,图8)。如本文所述,EUGT11和EUG均可以直接将Reb E体外转化成Reb D2。

[0195] 实施例7

[0196] 在本实施例中,对Reb D2进行了味道测试。

[0197] 使用蔗糖作为对照,进行了Reb D2的感官评价。蔗糖样品购自Sigma-Aldrich,并于室温下在瓶装水中被制备成三种不同浓度的对照样品:1.0%、3.0%和6.0%的蔗糖。通过向1000 mL的瓶装水中添加对应的质量制备了300和600 ppm的甜菊醇糖苷Reb D2用于感官评价。将混合物在室温下搅拌并随后由九名志愿者组成的评审团针对若干种对照蔗糖样品(1.0%、3.0%和6.0%)评价了所述甜菊醇糖苷样品。

[0198] 盲测结果显示九名志愿者中的大多数在两种不同浓度的(300和600 ppm) Reb D2上得到一致结果;总的%甜度当量(SE)平均值分别是约2.4和5.4。该结果表明,莱鲍迪苷D2比蔗糖甜约80-90倍。

[0199] 实施例8

[0200] 在本实施例中,将Reb D2的溶解度与Reb D进行了比较。

[0201] 将Reb D2和Reb D加入水中以制备含0.25 mM、0.5 mM、1 mM、1.5 mM、2 mM、5 mM和

10 mM Reb D2和Reb D的溶液。Reb D2粉末立刻完全溶解在水中,然而仅0.25 mM Reb D完全溶解在水中。另外,当在30℃加热72小时,浓度为0.5 mM、1 mM、1.5 mM、2 mM、5 mM和10 mM的Reb D溶液不溶解。

[0202] 这些结果表明,Reb D2在水中具有高于Reb D的溶解度。

[0203] 根据上文,可以看出实现了本公开的若干优点并且获得了其它的有利结果。可以在上述方法和系统中做出各种改动而不脱离本公开的范围,在上述说明中包含的以及在附图中所示的所有内容旨在应当被解释为示例性而非限制性的。

[0204] 当引入本公开的要素或其各种版本、实施方案或方面时,冠词“一个(种)”、“该”和“所述”旨在表示存在一个(种)或多个(种)要素。术语“包含”、“包括”和“具有”旨在是包容性的并表示可能存在所列举要素以外的额外的要素。

序列表

<110> Conagen, Inc.
Mao, Guohong
Chaturvedula, Venkata Sai Prakash
Yu, Oiver

<120> 无热量甜味剂

<130> 32559-11

<160> 6

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 462

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1

Met Asp Ser Gly Tyr Ser Ser Ser Tyr Ala Ala Ala Ala Gly Met His
1 5 10 15

[0001]

Val Val Ile Cys Pro Trp Leu Ala Phe Gly His Leu Leu Pro Cys Leu
20 25 30

Asp Leu Ala Gln Arg Leu Ala Ser Arg Gly His Arg Val Ser Phe Val
35 40 45

Ser Thr Pro Arg Asn Ile Ser Arg Leu Pro Pro Val Arg Pro Ala Leu
50 55 60

Ala Pro Leu Val Ala Phe Val Ala Leu Pro Leu Pro Arg Val Glu Gly
65 70 75 80

Leu Pro Asp Gly Ala Glu Ser Thr Asn Asp Val Pro His Asp Arg Pro
85 90 95

Asp Met Val Glu Leu His Arg Arg Ala Phe Asp Gly Leu Ala Ala Pro
100 105 110

Phe Ser Glu Phe Leu Gly Thr Ala Cys Ala Asp Trp Val Ile Val Asp
115 120 125

Val Phe His His Trp Ala Ala Ala Ala Ala Leu Glu His Lys Val Pro
130 135 140

Cys Ala Met Met Leu Leu Gly Ser Ala His Met Ile Ala Ser Ile Ala
145 150 155 160

[0002]

Asp Arg Arg Leu Glu Arg Ala Glu Thr Glu Ser Pro Ala Ala Ala Gly
 165 170 175
 Gln Gly Arg Pro Ala Ala Ala Pro Thr Phe Glu Val Ala Arg Met Lys
 180 185 190
 Leu Ile Arg Thr Lys Gly Ser Ser Gly Met Ser Leu Ala Glu Arg Phe
 195 200 205
 Ser Leu Thr Leu Ser Arg Ser Ser Leu Val Val Gly Arg Ser Cys Val
 210 215 220
 Glu Phe Glu Pro Glu Thr Val Pro Leu Leu Ser Thr Leu Arg Gly Lys
 225 230 235 240
 Pro Ile Thr Phe Leu Gly Leu Met Pro Pro Leu His Glu Gly Arg Arg
 245 250 255
 Glu Asp Gly Glu Asp Ala Thr Val Arg Trp Leu Asp Ala Gln Pro Ala
 260 265 270
 Lys Ser Val Val Tyr Val Ala Leu Gly Ser Glu Val Pro Leu Gly Val
 275 280 285
 Glu Lys Val His Glu Leu Ala Leu Gly Leu Glu Leu Ala Gly Thr Arg
 290 295 300
 Phe Leu Trp Ala Leu Arg Lys Pro Thr Gly Val Ser Asp Ala Asp Leu
 305 310 315 320
 Leu Pro Ala Gly Phe Glu Glu Arg Thr Arg Gly Arg Gly Val Val Ala
 325 330 335
 Thr Arg Trp Val Pro Gln Met Ser Ile Leu Ala His Ala Ala Val Gly
 340 345 350
 Ala Phe Leu Thr His Cys Gly Trp Asn Ser Thr Ile Glu Gly Leu Met
 355 360 365
 Phe Gly His Pro Leu Ile Met Leu Pro Ile Phe Gly Asp Gln Gly Pro
 370 375 380
 Asn Ala Arg Leu Ile Glu Ala Lys Asn Ala Gly Leu Gln Val Ala Arg
 385 390 395 400
 Asn Asp Gly Asp Gly Ser Phe Asp Arg Glu Gly Val Ala Ala Ala Ile

[0003]

	405	410	415
Arg Ala Val	Ala Val Glu Glu Glu	Ser Ser Lys Val Phe	Gln Ala Lys
	420	425	430
Ala Lys Lys	Leu Gln Glu Ile	Val Ala Asp Met	Ala Cys His Glu Arg
	435	440	445
Tyr Ile Asp Gly	Phe Ile Gln Gln	Leu Arg Ser	Tyr Lys Asp
	450	455	460

<210> 2
 <211> 1389
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 2
 atggattcgg gttactcttc ctctatgcg gcggtcgcg gtatgcacgt tggtatctgt 60
 ccgtggctgg cttttggtca cctgctgccg tgcctggatc tggcacagcg tctggcttca 120
 cgcggccatc gtgtcagctt cgtgtctacc ccgcgcaata ttctcgctct gccgccgggt 180
 cgtccggcac tggctccgct gggtgcattt gtcgctctgc cgctgccgcg cgtggaaggt 240
 ctgccggatg gtgcggaaag taccaacgac gtgccgatg atcgcccgga catggttgaa 300
 ctgcaccgtc gtgcattcga tggcttgga gcaccgtttt ccgaatttct gggtagcgcg 360
 tgcgccgatt ggggtgatcgt tgacgtcttt catcactggg cggcggcggc ggcgctggaa 420
 cataaagttc cgtgtgcaat gatgctgctg ggctcagctc acatgattgc gtcgatcgca 480
 gaccgtcgcc tggaacgtgc agaaaccgaa agtccggctg cggccggcca gggtcgcccc 540
 gcagctgcgc cgaccttcga agtggcccg c atgaaactga ttcgtacgaa aggcagctct 600
 ggtatgagcc tggcagaacg ctttagtctg accctgtccc gtagttccct ggtggttggt 660
 cgcagttgcy ttgaatttga accggaaacc gtcccgctgc tgtccacgct gcgtggtaaa 720
 ccgatcacct ttctgggtct gatgccgccg ctgcatgaag gccgtcgca agatgggtgaa 780
 gacgcaacgg tgcgttggtt ggatgcacag ccggctaaaa gcgtcgtgta tgcgcccctg 840
 ggctctgaag tgccgctggg tgtggaaaaa gttcacgaac tggcactggg cctggaactg 900
 gctggcacc gcttctctgt ggactgcgt aaaccgacgg gtgtgagcga tgcggacctg 960
 ctgccggccg gttttgaaga acgtaccgc ggccgtggtg ttgtcgcaac gcgttgggtc 1020
 ccgcaaatga gcattctggc gcatgccgca gtgggcgcct ttctgacca ctgtggttgg 1080
 aacagcacga tcgaaggcct gatgtttggt caccgctga ttatgctgcc gatcttcggc 1140
 gatcagggtc cgaacgcacg tctgattgaa gcgaaaaatg ccggcctgca agttgcgcgc 1200

[0004]

```

aacgatggcg acggttcttt cgaccgtgag ggtgtggctg cggccattcg cgcagtggct      1260
gttgaagaag aatcatcgaa agtttttcag gcgaaagcca aaaaactgca agaaatcgtc      1320
gcggatatgg cctgccacga acgctacatt gatggtttca ttcagcaact gcgctcctac      1380
aaagactaa                                     1389

```

<210> 3
 <211> 808
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 3

```

Met Ala Asn Ala Glu Arg Met Ile Thr Arg Val His Ser Gln Arg Glu
1          5          10          15

```

```

Arg Leu Asn Glu Thr Leu Val Ser Glu Arg Asn Glu Val Leu Ala Leu
20          25          30

```

```

Leu Ser Arg Val Glu Ala Lys Gly Lys Gly Ile Leu Gln Gln Asn Gln
35          40          45

```

```

Ile Ile Ala Glu Phe Glu Ala Leu Pro Glu Gln Thr Arg Lys Lys Leu
50          55          60

```

```

Glu Gly Gly Pro Phe Phe Asp Leu Leu Lys Ser Thr Gln Glu Ala Ile
65          70          75          80

```

```

Val Leu Pro Pro Trp Val Ala Leu Ala Val Arg Pro Arg Pro Gly Val
85          90          95

```

```

Trp Glu Tyr Leu Arg Val Asn Leu His Ala Leu Val Val Glu Glu Leu
100         105         110

```

```

Gln Pro Ala Glu Phe Leu His Phe Lys Glu Glu Leu Val Asp Gly Val
115         120         125

```

```

Lys Asn Gly Asn Phe Thr Leu Glu Leu Asp Phe Glu Pro Phe Asn Ala
130         135         140

```

```

Ser Ile Pro Arg Pro Thr Leu His Lys Tyr Ile Gly Asn Gly Val Asp
145         150         155         160

```

```

Phe Leu Asn Arg His Leu Ser Ala Lys Leu Phe His Asp Lys Glu Ser
165         170         175

```

[0005]

Leu Leu Pro Leu Leu Lys Phe Leu Arg Leu His Ser His Gln Gly Lys
 180 185 190

Asn Leu Met Leu Ser Glu Lys Ile Gln Asn Leu Asn Thr Leu Gln His
 195 200 205

Thr Leu Arg Lys Ala Glu Glu Tyr Leu Ala Glu Leu Lys Ser Glu Thr
 210 215 220

Leu Tyr Glu Glu Phe Glu Ala Lys Phe Glu Glu Ile Gly Leu Glu Arg
 225 230 235 240

Gly Trp Gly Asp Asn Ala Glu Arg Val Leu Asp Met Ile Arg Leu Leu
 245 250 255

Leu Asp Leu Leu Glu Ala Pro Asp Pro Cys Thr Leu Glu Thr Phe Leu
 260 265 270

Gly Arg Val Pro Met Val Phe Asn Val Val Ile Leu Ser Pro His Gly
 275 280 285

Tyr Phe Ala Gln Asp Asn Val Leu Gly Tyr Pro Asp Thr Gly Gly Gln
 290 295 300

Val Val Tyr Ile Leu Asp Gln Val Arg Ala Leu Glu Ile Glu Met Leu
 305 310 315 320

Gln Arg Ile Lys Gln Gln Gly Leu Asn Ile Lys Pro Arg Ile Leu Ile
 325 330 335

Leu Thr Arg Leu Leu Pro Asp Ala Val Gly Thr Thr Cys Gly Glu Arg
 340 345 350

Leu Glu Arg Val Tyr Asp Ser Glu Tyr Cys Asp Ile Leu Arg Val Pro
 355 360 365

Phe Arg Thr Glu Lys Gly Ile Val Arg Lys Trp Ile Ser Arg Phe Glu
 370 375 380

Val Trp Pro Tyr Leu Glu Thr Tyr Thr Glu Asp Ala Ala Val Glu Leu
 385 390 395 400

Ser Lys Glu Leu Asn Gly Lys Pro Asp Leu Ile Ile Gly Asn Tyr Ser
 405 410 415

Asp Gly Asn Leu Val Ala Ser Leu Leu Ala His Lys Leu Gly Val Thr
 420 425 430

[0006]

Gln Cys Thr Ile Ala His Ala Leu Glu Lys Thr Lys Tyr Pro Asp Ser
 435 440 445

Asp Ile Tyr Trp Lys Lys Leu Asp Asp Lys Tyr His Phe Ser Cys Gln
 450 455 460

Phe Thr Ala Asp Ile Phe Ala Met Asn His Thr Asp Phe Ile Ile Thr
 465 470 475 480

Ser Thr Phe Gln Glu Ile Ala Gly Ser Lys Glu Thr Val Gly Gln Tyr
 485 490 495

Glu Ser His Thr Ala Phe Thr Leu Pro Gly Leu Tyr Arg Val Val His
 500 505 510

Gly Ile Asp Val Phe Asp Pro Lys Phe Asn Ile Val Ser Pro Gly Ala
 515 520 525

Asp Met Ser Ile Tyr Phe Pro Tyr Thr Glu Glu Lys Arg Arg Leu Thr
 530 535 540

Lys Phe His Ser Glu Ile Glu Glu Leu Leu Tyr Ser Asp Val Glu Asn
 545 550 555 560

Lys Glu His Leu Cys Val Leu Lys Asp Lys Lys Lys Pro Ile Leu Phe
 565 570 575

Thr Met Ala Arg Leu Asp Arg Val Lys Asn Leu Ser Gly Leu Val Glu
 580 585 590

Trp Tyr Gly Lys Asn Thr Arg Leu Arg Glu Leu Ala Asn Leu Val Val
 595 600 605

Val Gly Gly Asp Arg Arg Lys Glu Ser Lys Asp Asn Glu Glu Lys Ala
 610 615 620

Glu Met Lys Lys Met Tyr Asp Leu Ile Glu Glu Tyr Lys Leu Asn Gly
 625 630 635 640

Gln Phe Arg Trp Ile Ser Ser Gln Met Asp Arg Val Arg Asn Gly Glu
 645 650 655

Leu Tyr Arg Tyr Ile Cys Asp Thr Lys Gly Ala Phe Val Gln Pro Ala
 660 665 670

Leu Tyr Glu Ala Phe Gly Leu Thr Val Val Glu Ala Met Thr Cys Gly

[0007]

675	680	685
Leu Pro Thr Phe Ala Thr Cys Lys Gly Gly Pro Ala Glu Ile Ile Val 690 695 700		
His Gly Lys Ser Gly Phe His Ile Asp Pro Tyr His Gly Asp Gln Ala 705 710 715 720		
Ala Asp Thr Leu Ala Asp Phe Phe Thr Lys Cys Lys Glu Asp Pro Ser 725 730 735		
His Trp Asp Glu Ile Ser Lys Gly Gly Leu Gln Arg Ile Glu Glu Lys 740 745 750		
Tyr Thr Trp Gln Ile Tyr Ser Gln Arg Leu Leu Thr Leu Thr Gly Val 755 760 765		
Tyr Gly Phe Trp Lys His Val Ser Asn Leu Asp Arg Leu Glu Ala Arg 770 775 780		
Arg Tyr Leu Glu Met Phe Tyr Ala Leu Lys Tyr Arg Pro Leu Ala Gln 785 790 795 800		
Ala Val Pro Leu Ala Gln Asp Asp 805		

<210> 4
 <211> 2427
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 4
 atggcaaacg ctgaacgtat gataacgcgc gtccacagcc aacgtgagcg tttgaacgaa 60
 acgcttgttt ctgagagaaa cgaagtcctt gccttgcttt ccagggttga agccaaaggt 120
 aaagggtat tacaacaaaa ccagatcatt gctgaattcg aagctttgcc tgaacaaacc 180
 cggaagaaac ttgaagggtg tcttttcttt gaccttctca aatccactca ggaagcaatt 240
 gtgttgccac catgggttgc tctagctgtg aggccaaggc ctggtgtttg ggaataactta 300
 cgagtcaatc tccatgctct tgcgttgaa gaactccaac ctgctgagtt tcttcatttc 360
 aaggaagaac tcgttgatgg agttaagaat ggtaatttca ctcttgagct tgatttcgag 420
 ccattcaatg cgtctatccc tcgtccaaca ctccacaaat acattggaaa tgggtgttgac 480
 ttccttaacc gtcatttatc ggctaagctc ttccatgaca aggagagttt gcttccattg 540
 cttaagttcc ttcgtcttca cagccaccag ggcaagaacc tgatgttgag cgagaagatt 600

[0008]

cagaacctca acactctgca acacaccttg aggaaagcag aagagtatct agcagagctt	660
aagtccgaaa cactgtatga agagtttgag gccaaagttg aggagattgg tcttgagagg	720
ggatggggag acaatgcaga gcgtgtcctt gacatgatac gtcttctttt ggaccttctt	780
gaggcgcttg atccttgacac tcttgagact tttcttgga gagtaccaat ggtgttcaac	840
gttgatgacc tctctccaca tggttacttt gctcaggaca atgttcttgg ttacctgac	900
actggtggac aggttgttta cattcttgat caagtctgtg ctctggagat agagatgctt	960
caacgtatta agcaacaagg actcaacatt aaaccaagga ttctcattct aactcgactt	1020
ctacctgatg cggtaggaac tacatgcggt gaacgtctcg agagagttta tgattctgag	1080
tactgtgata ttcttcgtgt gcccttcaga acagagaagg gtattgttcg caaatggatc	1140
tcaaggttcg aagtctggcc atatctagag acttacaccg aggatgctgc ggttgagcta	1200
tcgaaagaat tgaatggcaa gcctgacctt atcattggta actacagtga tggaaatctt	1260
gttgcttctt tattggctca caaacttgggt gtcactcagt gtaccattgc tcatgctctt	1320
gagaaaacaa agtaccgga ttctgatatc tactggaaga agcttgacga caagtaccat	1380
ttctcatgcc agttcactgc ggatattttc gcaatgaacc aactgattt catcatcact	1440
agtactttcc aagaaattgc tggaagcaaa gaaactgttg ggcagtatga aagccacaca	1500
gcctttactc ttcccggatt gtatcgagtt gttcacggga ttgatgtgtt tgatcccaag	1560
ttcaacattg tctctcctgg tgctgatatg agcatctact tcccttacac agaggagaag	1620
cgtagattga ctaagttcca ctctgagatc gaggagctcc tctacagcga tgttgagaac	1680
aaagagcact tatgtgtgct caaggacaag aagaagccga ttctcttcac aatggctagg	1740
cttgatcgtg tcaagaactt gtcaggtctt gttgagtgg acgggaagaa caccgccttg	1800
cgtgagctag ctaacttgggt tggttggtga ggagacagga ggaaagagtc aaaggacaat	1860
gaagagaaag cagagatgaa gaaaatgtat gatctcattg aggaatacaa gctaaacggt	1920
cagttcaggt ggatctctc tcagatggac cgggtaagga acggtgagct gtaccggtac	1980
atctgtgaca ccaaggggtgc ttttgtccaa cctgcattat atgaagcctt tgggttaact	2040
gttggtggagg ctatgacttg tggtttaccg actttcgcca cttgcaaagg tgggtccagct	2100
gagatcattg tgcacggtaa atcgggtttc cacattgacc cttaccatgg tgatcaggct	2160
gctgatactc ttgctgattt cttcaccaag tgtaaggagg atccatctca ctgggatgag	2220
atctcaaaag gagggttca gaggattgag gagaaataca cttggcaa atctattcacag	2280
aggctcttga cattgactgg tgtgtatgga ttctggaagc atgtctcgaa ccttgaccgt	2340
cttgaggctc gccgttacct tgaaatgttc tatgcattga agtatcgccc attggctcag	2400
gctgttcctc ttgcacaaga tgattga	2427

<210> 5
 <211> 1272
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成的

<400> 5

Met Asp Ser Gly Tyr Ser Ser Ser Tyr Ala Ala Ala Ala Gly Met His
 1 5 10 15

Val Val Ile Cys Pro Trp Leu Ala Phe Gly His Leu Leu Pro Cys Leu
 20 25 30

Asp Leu Ala Gln Arg Leu Ala Ser Arg Gly His Arg Val Ser Phe Val
 35 40 45

Ser Thr Pro Arg Asn Ile Ser Arg Leu Pro Pro Val Arg Pro Ala Leu
 50 55 60

Ala Pro Leu Val Ala Phe Val Ala Leu Pro Leu Pro Arg Val Glu Gly
 65 70 75 80

[0009]

Leu Pro Asp Gly Ala Glu Ser Thr Asn Asp Val Pro His Asp Arg Pro
 85 90 95

Asp Met Val Glu Leu His Arg Arg Ala Phe Asp Gly Leu Ala Ala Pro
 100 105 110

Phe Ser Glu Phe Leu Gly Thr Ala Cys Ala Asp Trp Val Ile Val Asp
 115 120 125

Val Phe His His Trp Ala Ala Ala Ala Ala Leu Glu His Lys Val Pro
 130 135 140

Cys Ala Met Met Leu Leu Gly Ser Ala His Met Ile Ala Ser Ile Ala
 145 150 155 160

Asp Arg Arg Leu Glu Arg Ala Glu Thr Glu Ser Pro Ala Ala Ala Gly
 165 170 175

Gln Gly Arg Pro Ala Ala Ala Pro Thr Phe Glu Val Ala Arg Met Lys
 180 185 190

Leu Ile Arg Thr Lys Gly Ser Ser Gly Met Ser Leu Ala Glu Arg Phe
 195 200 205

[0010]

Ser	Leu	Thr	Leu	Ser	Arg	Ser	Ser	Leu	Val	Val	Gly	Arg	Ser	Cys	Val
210						215					220				
Glu	Phe	Glu	Pro	Glu	Thr	Val	Pro	Leu	Leu	Ser	Thr	Leu	Arg	Gly	Lys
225					230					235					240
Pro	Ile	Thr	Phe	Leu	Gly	Leu	Met	Pro	Pro	Leu	His	Glu	Gly	Arg	Arg
				245					250					255	
Glu	Asp	Gly	Glu	Asp	Ala	Thr	Val	Arg	Trp	Leu	Asp	Ala	Gln	Pro	Ala
			260					265					270		
Lys	Ser	Val	Val	Tyr	Val	Ala	Leu	Gly	Ser	Glu	Val	Pro	Leu	Gly	Val
		275					280					285			
Glu	Lys	Val	His	Glu	Leu	Ala	Leu	Gly	Leu	Glu	Leu	Ala	Gly	Thr	Arg
	290					295					300				
Phe	Leu	Trp	Ala	Leu	Arg	Lys	Pro	Thr	Gly	Val	Ser	Asp	Ala	Asp	Leu
305					310					315					320
Leu	Pro	Ala	Gly	Phe	Glu	Glu	Arg	Thr	Arg	Gly	Arg	Gly	Val	Val	Ala
				325					330					335	
Thr	Arg	Trp	Val	Pro	Gln	Met	Ser	Ile	Leu	Ala	His	Ala	Ala	Val	Gly
			340					345					350		
Ala	Phe	Leu	Thr	His	Cys	Gly	Trp	Asn	Ser	Thr	Ile	Glu	Gly	Leu	Met
		355					360					365			
Phe	Gly	His	Pro	Leu	Ile	Met	Leu	Pro	Ile	Phe	Gly	Asp	Gln	Gly	Pro
	370					375					380				
Asn	Ala	Arg	Leu	Ile	Glu	Ala	Lys	Asn	Ala	Gly	Leu	Gln	Val	Ala	Arg
385					390					395					400
Asn	Asp	Gly	Asp	Gly	Ser	Phe	Asp	Arg	Glu	Gly	Val	Ala	Ala	Ala	Ile
				405					410					415	
Arg	Ala	Val	Ala	Val	Glu	Glu	Glu	Ser	Ser	Lys	Val	Phe	Gln	Ala	Lys
			420					425					430		
Ala	Lys	Lys	Leu	Gln	Glu	Ile	Val	Ala	Asp	Met	Ala	Cys	His	Glu	Arg
		435					440					445			
Tyr	Ile	Asp	Gly	Phe	Ile	Gln	Gln	Leu	Arg	Ser	Tyr	Lys	Asp	Gly	Ser
	450					455					460				

Gly Ala Asn Ala Glu Arg Met Ile Thr Arg Val His Ser Gln Arg Glu
 465 470 475 480
 Arg Leu Asn Glu Thr Leu Val Ser Glu Arg Asn Glu Val Leu Ala Leu
 485 490 495
 Leu Ser Arg Val Glu Ala Lys Gly Lys Gly Ile Leu Gln Gln Asn Gln
 500 505 510
 Ile Ile Ala Glu Phe Glu Ala Leu Pro Glu Gln Thr Arg Lys Lys Leu
 515 520 525
 Glu Gly Gly Pro Phe Phe Asp Leu Leu Lys Ser Thr Gln Glu Ala Ile
 530 535 540
 Val Leu Pro Pro Trp Val Ala Leu Ala Val Arg Pro Arg Pro Gly Val
 545 550 555 560
 Trp Glu Tyr Leu Arg Val Asn Leu His Ala Leu Val Val Glu Glu Leu
 565 570 575
 Gln Pro Ala Glu Phe Leu His Phe Lys Glu Glu Leu Val Asp Gly Val
 580 585 590
 Lys Asn Gly Asn Phe Thr Leu Glu Leu Asp Phe Glu Pro Phe Asn Ala
 595 600 605
 Ser Ile Pro Arg Pro Thr Leu His Lys Tyr Ile Gly Asn Gly Val Asp
 610 615 620
 Phe Leu Asn Arg His Leu Ser Ala Lys Leu Phe His Asp Lys Glu Ser
 625 630 635 640
 Leu Leu Pro Leu Leu Lys Phe Leu Arg Leu His Ser His Gln Gly Lys
 645 650 655
 Asn Leu Met Leu Ser Glu Lys Ile Gln Asn Leu Asn Thr Leu Gln His
 660 665 670
 Thr Leu Arg Lys Ala Glu Glu Tyr Leu Ala Glu Leu Lys Ser Glu Thr
 675 680 685
 Leu Tyr Glu Glu Phe Glu Ala Lys Phe Glu Glu Ile Gly Leu Glu Arg
 690 695 700
 Gly Trp Gly Asp Asn Ala Glu Arg Val Leu Asp Met Ile Arg Leu Leu
 705 710 715 720

[0011]

[0012]

Leu Asp Leu Leu Glu Ala Pro Asp Pro Cys Thr Leu Glu Thr Phe Leu
 725 730 735
 Gly Arg Val Pro Met Val Phe Asn Val Val Ile Leu Ser Pro His Gly
 740 745 750
 Tyr Phe Ala Gln Asp Asn Val Leu Gly Tyr Pro Asp Thr Gly Gly Gln
 755 760 765
 Val Val Tyr Ile Leu Asp Gln Val Arg Ala Leu Glu Ile Glu Met Leu
 770 775 780
 Gln Arg Ile Lys Gln Gln Gly Leu Asn Ile Lys Pro Arg Ile Leu Ile
 785 790 795 800
 Leu Thr Arg Leu Leu Pro Asp Ala Val Gly Thr Thr Cys Gly Glu Arg
 805 810 815
 Leu Glu Arg Val Tyr Asp Ser Glu Tyr Cys Asp Ile Leu Arg Val Pro
 820 825 830
 Phe Arg Thr Glu Lys Gly Ile Val Arg Lys Trp Ile Ser Arg Phe Glu
 835 840 845
 Val Trp Pro Tyr Leu Glu Thr Tyr Thr Glu Asp Ala Ala Val Glu Leu
 850 855 860
 Ser Lys Glu Leu Asn Gly Lys Pro Asp Leu Ile Ile Gly Asn Tyr Ser
 865 870 875 880
 Asp Gly Asn Leu Val Ala Ser Leu Leu Ala His Lys Leu Gly Val Thr
 885 890 895
 Gln Cys Thr Ile Ala His Ala Leu Glu Lys Thr Lys Tyr Pro Asp Ser
 900 905 910
 Asp Ile Tyr Trp Lys Lys Leu Asp Asp Lys Tyr His Phe Ser Cys Gln
 915 920 925
 Phe Thr Ala Asp Ile Phe Ala Met Asn His Thr Asp Phe Ile Ile Thr
 930 935 940
 Ser Thr Phe Gln Glu Ile Ala Gly Ser Lys Glu Thr Val Gly Gln Tyr
 945 950 955 960
 Glu Ser His Thr Ala Phe Thr Leu Pro Gly Leu Tyr Arg Val Val His

	965	970	975
	Gly Ile Asp Val Phe Asp Pro Lys Phe Asn Ile Val Ser Pro Gly Ala 980 985 990		
	Asp Met Ser Ile Tyr Phe Pro Tyr Thr Glu Glu Lys Arg Arg Leu Thr 995 1000 1005		
	Lys Phe His Ser Glu Ile Glu Glu Leu Leu Tyr Ser Asp Val Glu 1010 1015 1020		
	Asn Lys Glu His Leu Cys Val Leu Lys Asp Lys Lys Lys Pro Ile 1025 1030 1035		
	Leu Phe Thr Met Ala Arg Leu Asp Arg Val Lys Asn Leu Ser Gly 1040 1045 1050		
	Leu Val Glu Trp Tyr Gly Lys Asn Thr Arg Leu Arg Glu Leu Ala 1055 1060 1065		
	Asn Leu Val Val Val Gly Gly Asp Arg Arg Lys Glu Ser Lys Asp 1070 1075 1080		
[0013]	Asn Glu Glu Lys Ala Glu Met Lys Lys Met Tyr Asp Leu Ile Glu 1085 1090 1095		
	Glu Tyr Lys Leu Asn Gly Gln Phe Arg Trp Ile Ser Ser Gln Met 1100 1105 1110		
	Asp Arg Val Arg Asn Gly Glu Leu Tyr Arg Tyr Ile Cys Asp Thr 1115 1120 1125		
	Lys Gly Ala Phe Val Gln Pro Ala Leu Tyr Glu Ala Phe Gly Leu 1130 1135 1140		
	Thr Val Val Glu Ala Met Thr Cys Gly Leu Pro Thr Phe Ala Thr 1145 1150 1155		
	Cys Lys Gly Gly Pro Ala Glu Ile Ile Val His Gly Lys Ser Gly 1160 1165 1170		
	Phe His Ile Asp Pro Tyr His Gly Asp Gln Ala Ala Asp Thr Leu 1175 1180 1185		
	Ala Asp Phe Phe Thr Lys Cys Lys Glu Asp Pro Ser His Trp Asp 1190 1195 1200		

[0014]

Glu Ile Ser Lys Gly Gly Leu Gln Arg Ile Glu Glu Lys Tyr Thr
1205 1210 1215

Trp Gln Ile Tyr Ser Gln Arg Leu Leu Thr Leu Thr Gly Val Tyr
1220 1225 1230

Gly Phe Trp Lys His Val Ser Asn Leu Asp Arg Leu Glu Ala Arg
1235 1240 1245

Arg Tyr Leu Glu Met Phe Tyr Ala Leu Lys Tyr Arg Pro Leu Ala
1250 1255 1260

Gln Ala Val Pro Leu Ala Gln Asp Asp
1265 1270

<210> 6
<211> 3819
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的

<400> 6
atggattcgg gttactcttc ctctatgcg gcggctgcgg gtatgcacgt tggtatctgt 60
ccgtggctgg cttttggtca cctgctgccg tgcctggatc tggcacagcg tctggcttca 120
cgcggccatc gtgtcagctt cgtgtctacc ccgcgcaata ttctcgtctt gccgccgggt 180
cgtccggcac tggtccgct ggttgcat ttcgtctctgc cgctgccgcg cgtggaaggt 240
ctgccggatg gtgcggaaag taccaacgac gtgccgatg atcgcccgga catggttgaa 300
ctgcaccgtc gtgcattcga tggcttgga gcaccgtttt ccgaatttct gggtagggcg 360
tgcgccgatt ggggtgatcgt tgacgtcttt catcactggg cggcggcggc ggcgctggaa 420
cataaagttc cgtgtgcaat gatgctgctg ggctcagctc acatgattgc gtcgatcgca 480
gaccgtcgcc tggaacgtgc agaaaccgaa agtccggctg cggccggcca gggtcgcccg 540
gcagctgcgc cgaccttca agtggccgc atgaaactga ttcgtacgaa aggcagctct 600
ggatatgagc tggcagaacg ctttagtctg accctgtccc gtagttccct ggtggttgg 660
cgcagttgct ttgaatttga accggaacc gtcccgctgc tgtccacgct gcgtggtaaa 720
ccgatcacct ttctgggtct gatgccgccg ctgcatgaag gccgtcgcga agatggtgaa 780
gacgcaacgg tgcgttggtt ggatgcacag ccggctaaaa gcgtcgtgta tgcgccctg 840
ggctctgaag tgccgctggg tgtggaaaaa gttcacgaac tggcactggg cctggaactg 900
gctggcacc gtttctgtg ggcactgcgt aaaccgacgg gtgtgagcga tgcggacctg 960
ctgccggccg gttttgaaga acgtaccgc ggccgtggtg ttgtcgcaac gcgttgggtc 1020

[0015]

ccgcaaatga	gcattctggc	gcatgccgca	gtggg'gcct	ttctgaccca	ctgtggttgg	1080
aacagcacga	tcgaaggcct	gatgtttggt	cacccgctga	ttatgctgcc	gatcttcggc	1140
gatcagggtc	cgaacgcacg	tctgattgaa	gcgaaaaatg	ccggcctgca	agttgcgcgc	1200
aacgatggcg	acggttcttt	cgaccgtgag	ggtgtggctg	cggccattcg	cgcagtggct	1260
gttgaagaag	aatcatcgaa	agtttttcag	gcgaaagcca	aaaaactgca	agaaatcgtc	1320
gcggatatgg	cctgccacga	acgctacatt	gatggtttca	ttcagcaact	gcgctcctac	1380
aaagacgggt	ctggtgcaaa	cgctgaacgt	atgataacgc	gcgtccacag	ccaacgtgag	1440
cgtttgaacg	aaacgcttgt	ttctgagaga	aacgaagtcc	ttgccttgct	ttccagggtt	1500
gaagccaaag	gtaaagggtat	tttacaacaa	aaccagatca	ttgctgaatt	cgaagctttg	1560
cctgaacaaa	cccgggaagaa	acttgaagggt	ggtcctttct	ttgaccttct	caaatccact	1620
caggaagcaa	ttgtgttgcc	accatggggt	gctctagctg	tgaggccaag	gcctgggtgtt	1680
tgggaatact	tacgagtcaa	tctccatgct	cttgtcgttg	aagaactcca	acctgctgag	1740
tttcttcatt	tcaaggaaga	actcgttgat	ggagttaaga	atggtaattt	cactcttgag	1800
cttgatttcg	agccattcaa	tgctctatc	cctcgtccaa	cactccacaa	atacattgga	1860
aatggtgttg	acttccttaa	ccgtcattta	tcggctaagc	tcttccatga	caaggagagt	1920
ttgcttccat	tgcttaagtt	ccttcgtctt	cacagccacc	agggcaagaa	cctgatgttg	1980
agcgagaaga	ttcagaacct	caacactctg	caacacacct	tgaggaaagc	agaagagtat	2040
ctagcagagc	ttaagtccga	aacactgtat	gaagagtttg	aggccaagtt	tgaggagatt	2100
ggctcttgaga	ggggatgggg	agacaatgca	gagcgtgtcc	ttgacatgat	acgtcttctt	2160
ttggaccttc	ttgaggcgcc	tgatccttgc	actcttgaga	cttttcttgg	aagagtacca	2220
atggtgttca	acgttgtgat	cctctctcca	catggttact	ttgctcagga	caatgttctt	2280
ggttacccctg	acactgggtg	acagggtgtt	tacattcttg	atcaagttcg	tgctctggag	2340
atagagatgc	ttcaacgtat	taagcaacaa	ggactcaaca	ttaaaccaag	gattctcatt	2400
ctaactcgac	ttctacctga	tgcggtagga	actacatgcg	gtgaacgtct	cgagagagtt	2460
tatgattctg	agtactgtga	tattcttcgt	tgcccttca	gaacagagaa	gggtattgtt	2520
cgcaaatgga	tctcaagggt	cgaagtctgg	ccatatctag	agacttacac	cgaggatgct	2580
gcggttgagc	tatcgaaaga	attgaatggc	aagcctgacc	ttatcattgg	taactacagt	2640
gatggaaatc	ttgttgcttc	tttattggct	cacaaacttg	gtgtcactca	gtgtaccatt	2700
gctcatgctc	ttgagaaaac	aaagtacccg	gattctgata	tctactggaa	gaagcttgac	2760
gacaagtacc	atttctcatg	ccagttcact	gcggatattt	tcgcaatgaa	ccacactgat	2820
ttcatcatca	ctagtacttt	ccaagaaatt	gctggaagca	aagaaactgt	tgggcagtat	2880
gaaagccaca	cagcctttac	tcttcccgga	ttgtatcgag	ttgttcacgg	gattgatgtg	2940

[0016]

tttgatccca agttcaacat tgtctctcct ggtgctgata tgagcatcta cttcccttac	3000
acagaggaga agcgtagatt gactaagttc cactctgaga tcgaggagct cctctacagc	3060
gatgttgaga acaaagagca cttatgtgtg ctcaaggaca agaagaagcc gattctcttc	3120
acaatggcta ggcttgatcg tgtcaagaac ttgtcagggtc ttgttgagtgt gtacgggaag	3180
aacacccgct tgcgtgagct agctaacttg gttgttggtg gaggagacag gaggaagag	3240
tcaaaggaca atgaagagaa agcagagatg aagaaaatgt atgatctcat tgaggaatac	3300
aagctaaacg gtcagttcag gtggatctcc tctcagatgg accgggtaag gaacggtgag	3360
ctgtaccggt acatctgtga caccaagggt gcttttgctc aacctgcatt atatgaagcc	3420
tttgggttaa ctgttggtga ggctatgact tgtgggttac cgactttcgc cacttgcaaa	3480
ggtggtccag ctgagatcat tgtgcacggt aaatcgggtt tccacattga cccttaccat	3540
ggtgatcagg ctgctgatac tcttgctgat ttcttcacca agtgtaagga ggatccatct	3600
cactgggatg agatctcaaa aggagggtt cagaggattg aggagaaata cacttggtgaa	3660
atctattcac agaggctctt gacattgact ggtgtgtatg gattctggaa gcatgtctcg	3720
aaccttgacc gtcttgaggc tcgccgttac cttgaaatgt tctatgcatt gaagtatcgc	3780
ccattggctc aggctgttcc tcttgcaaa gatgattga	3819

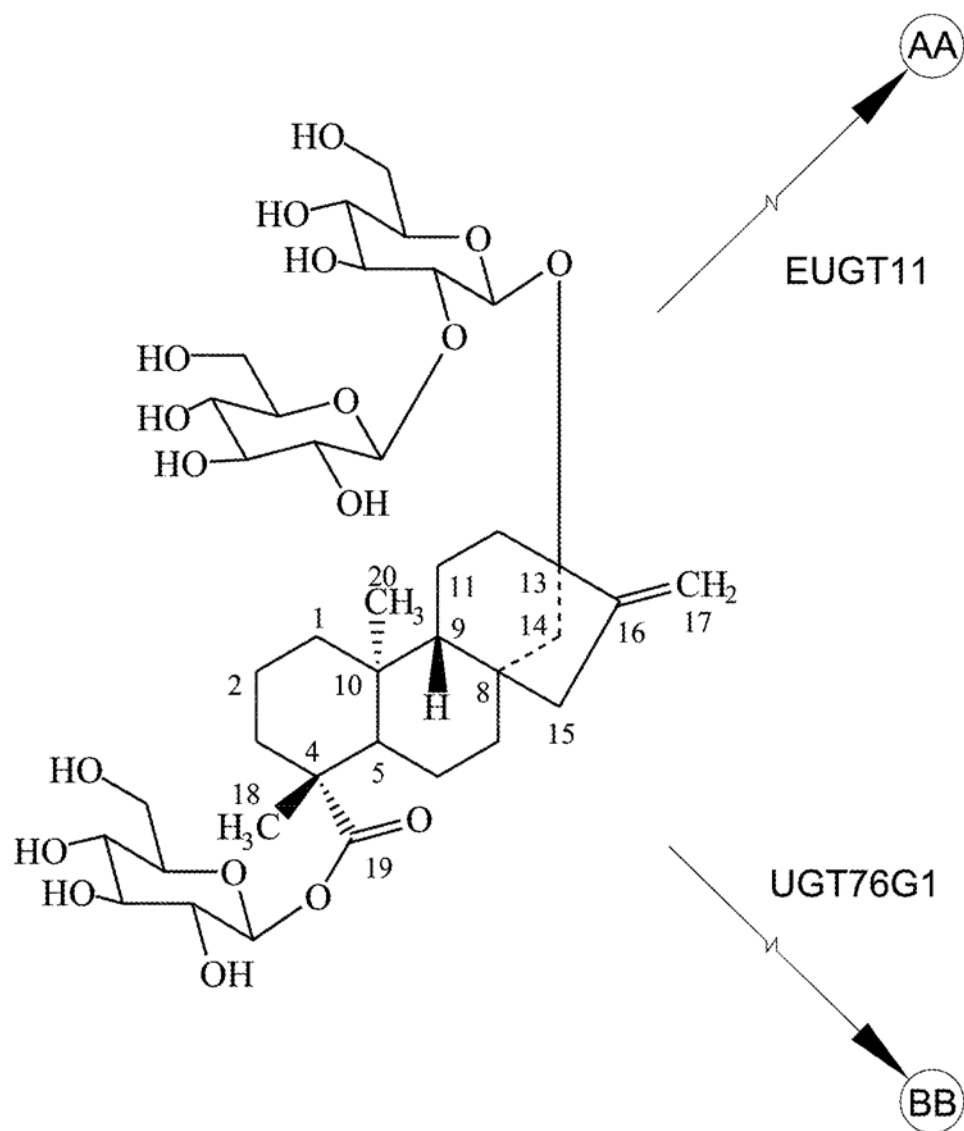


图 1A

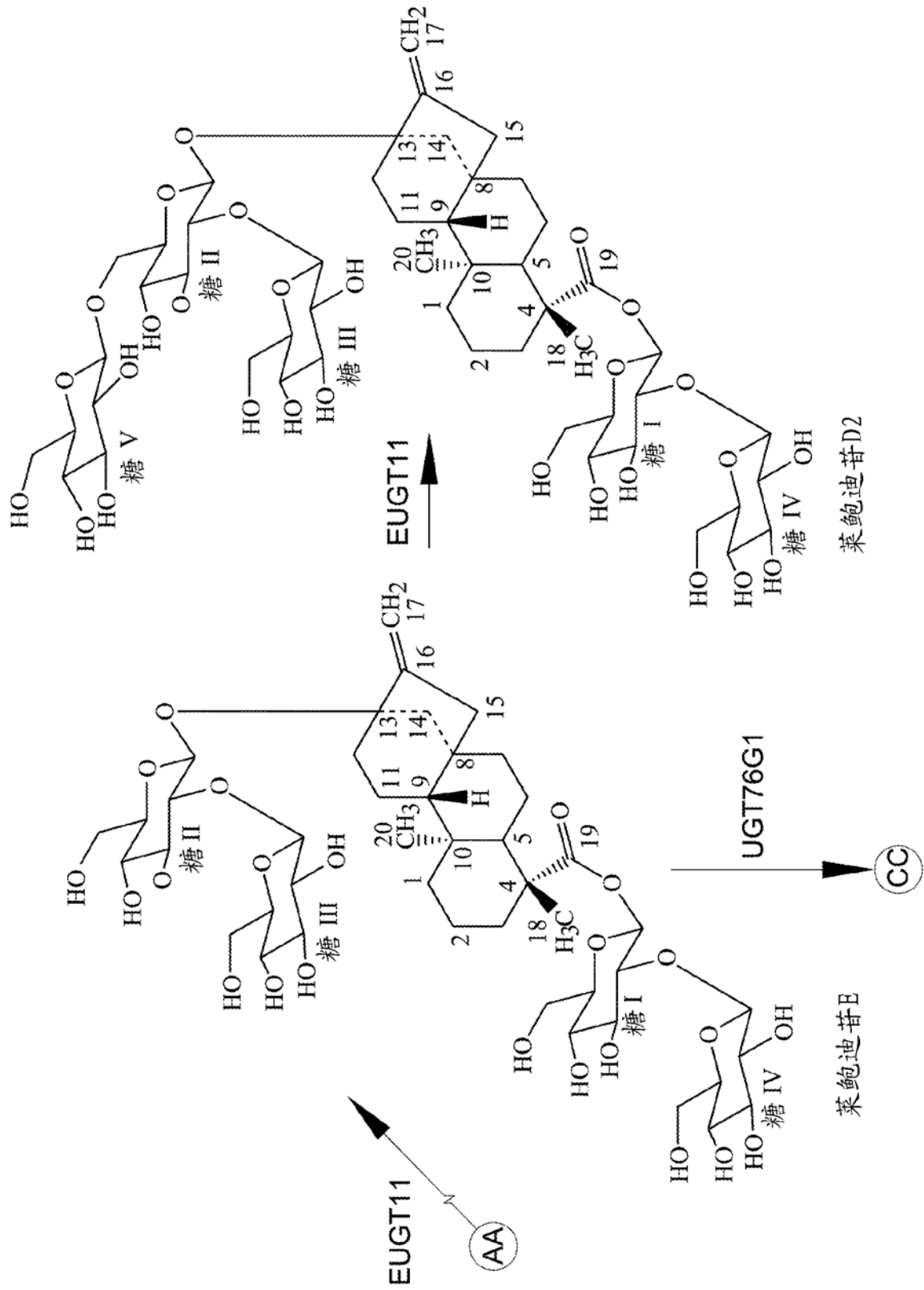


图 1B

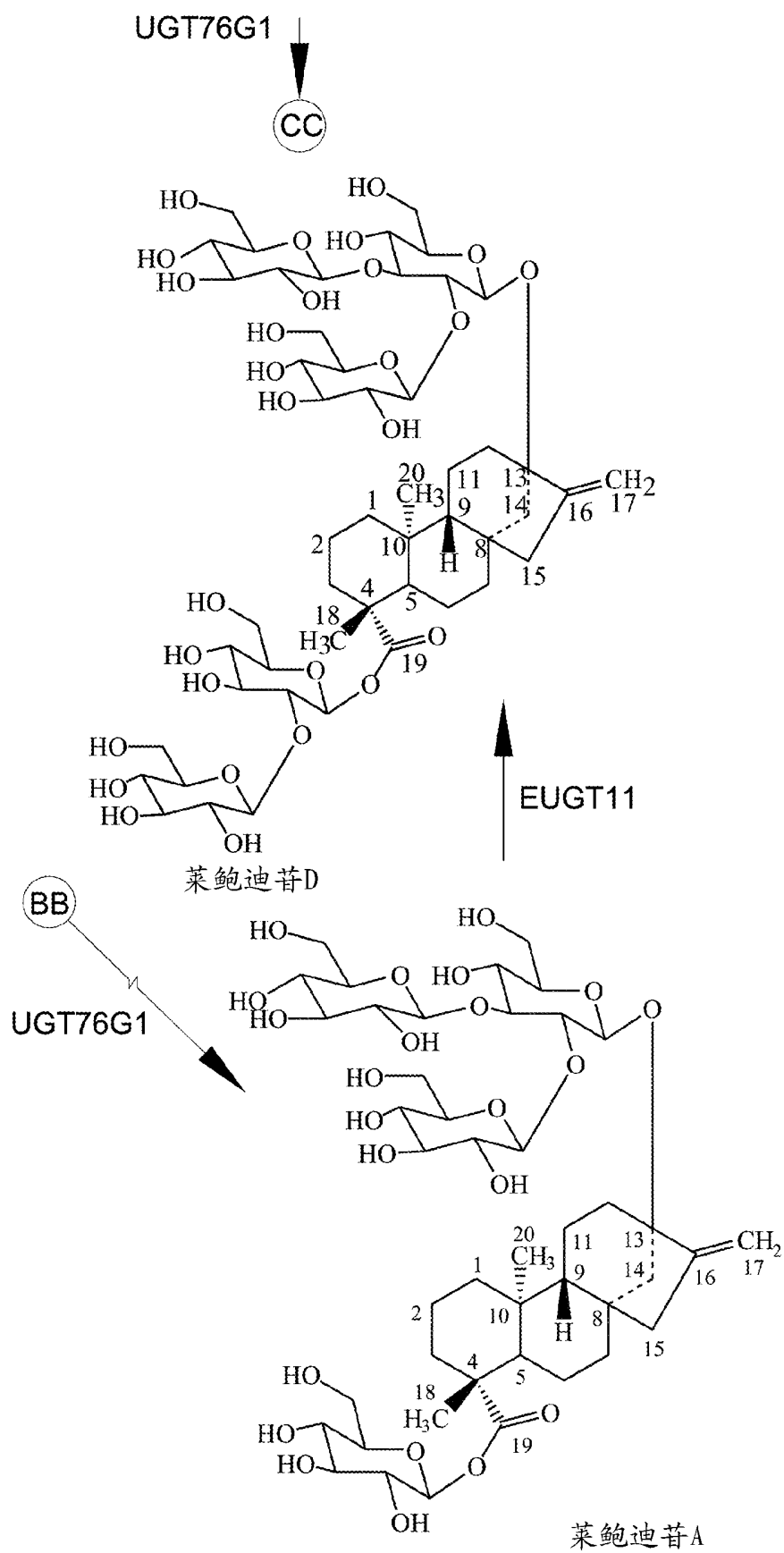


图 1C

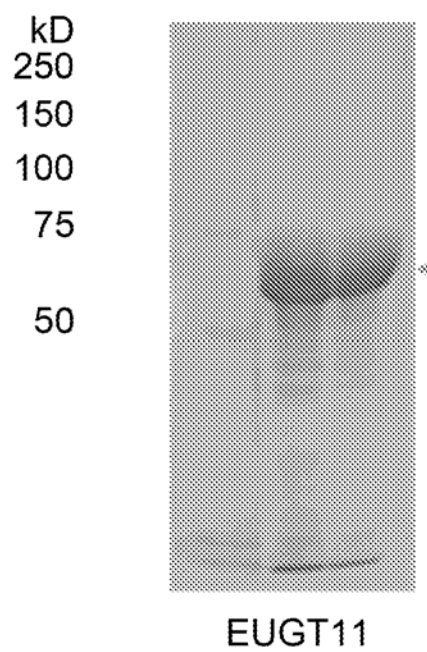


图 2A

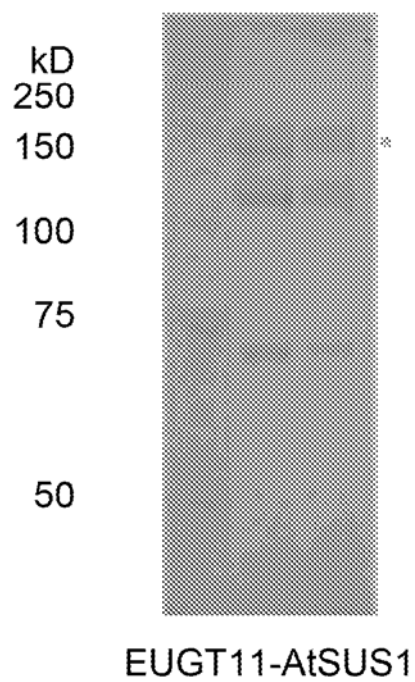


图 2B

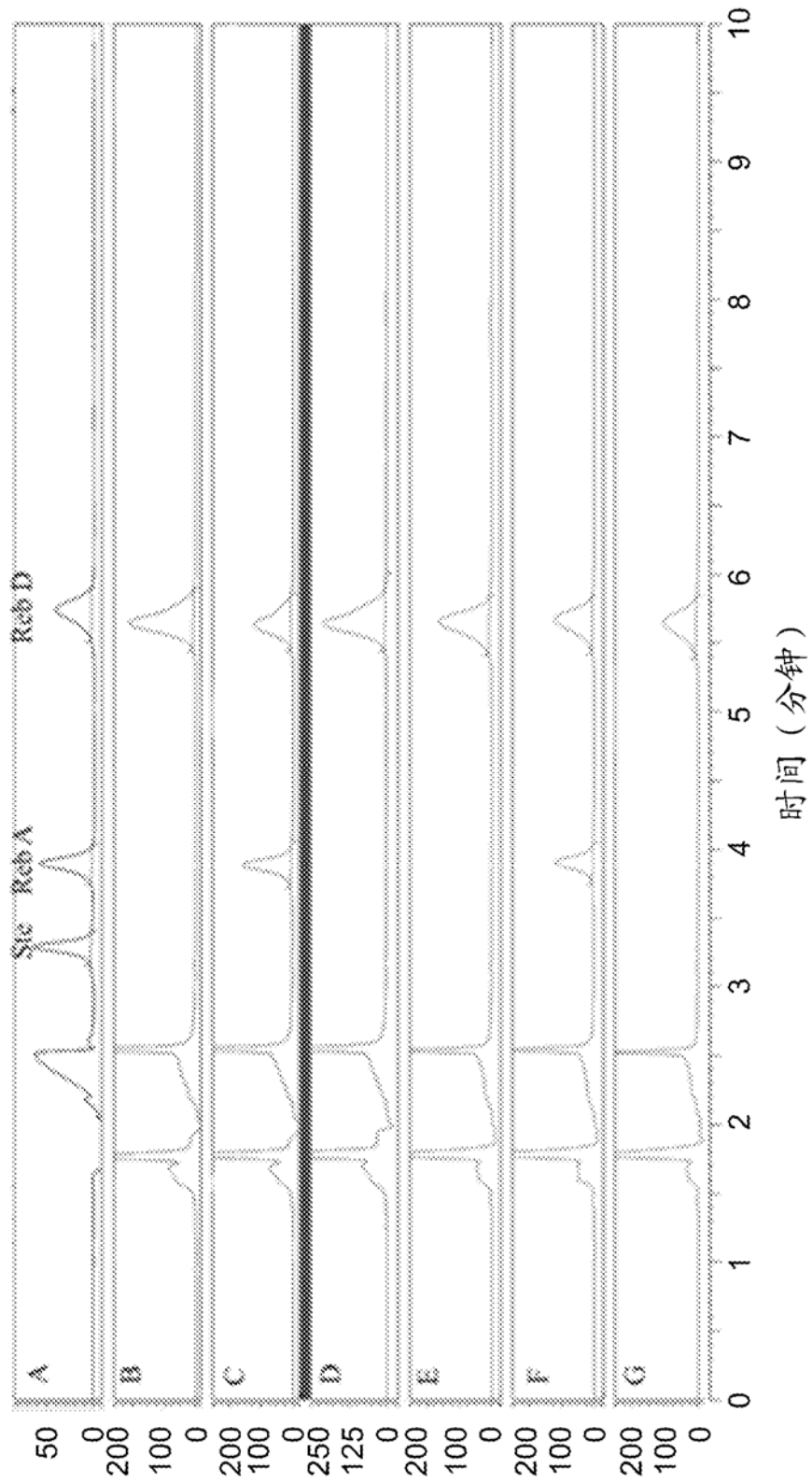


图 3

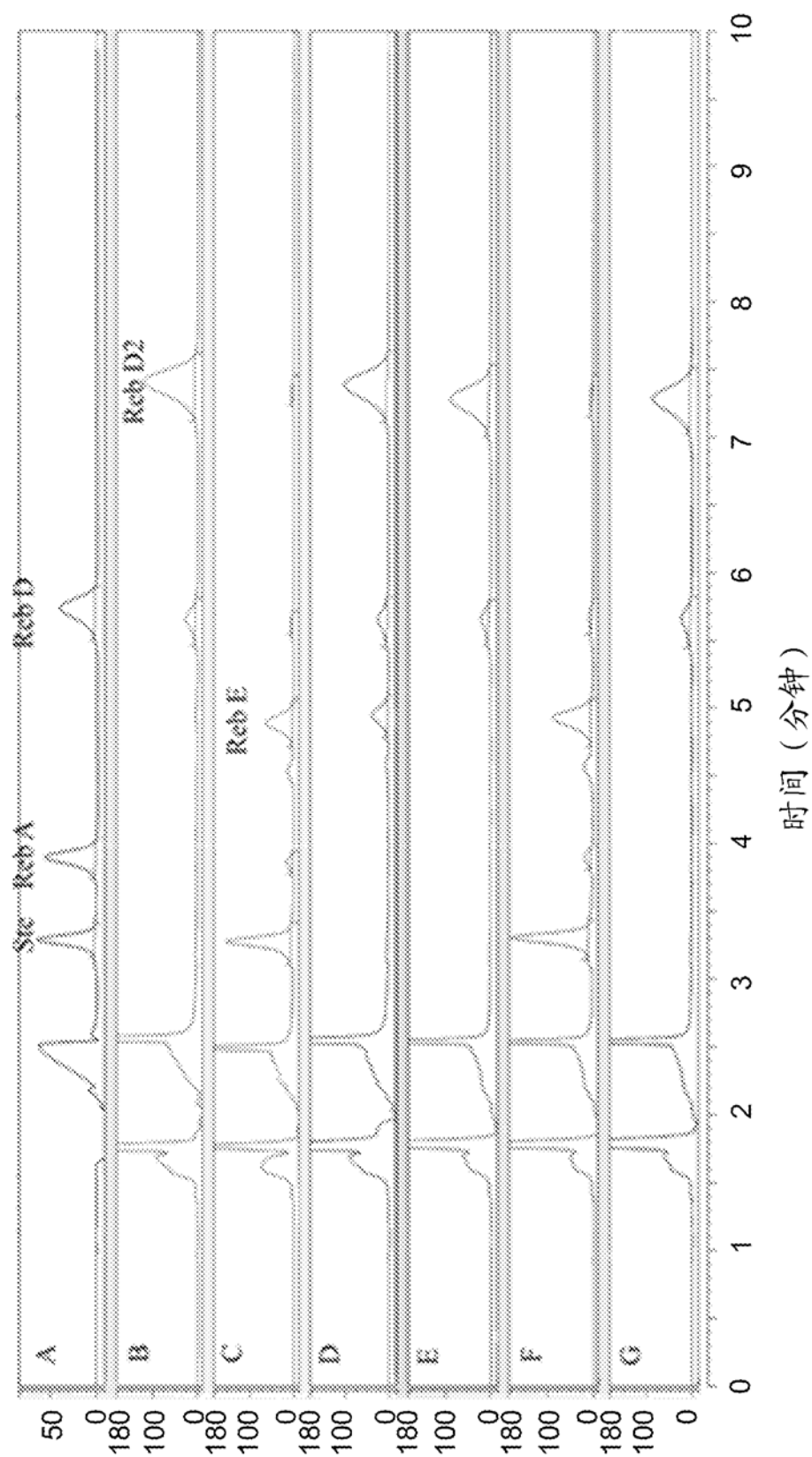


图 4

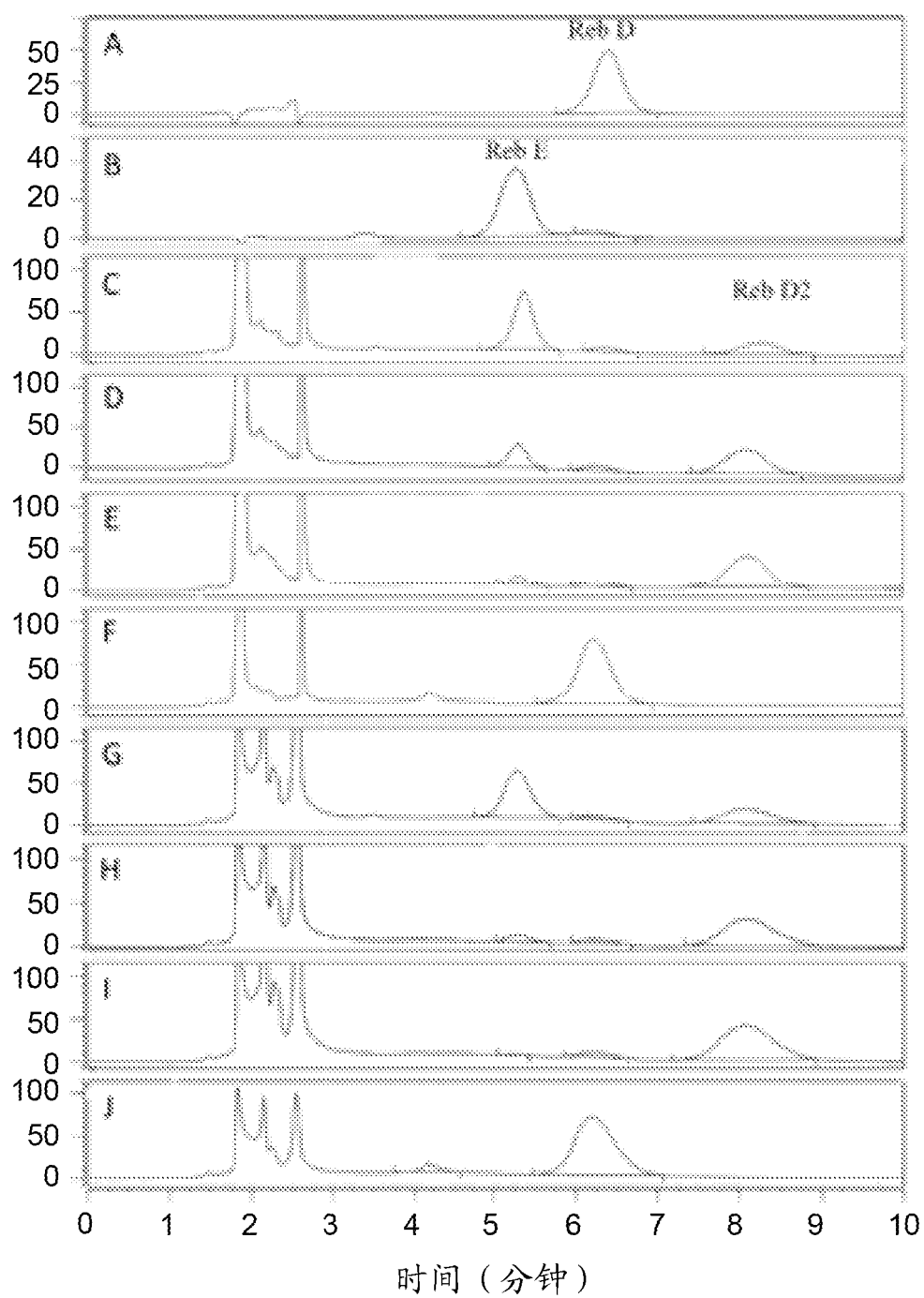
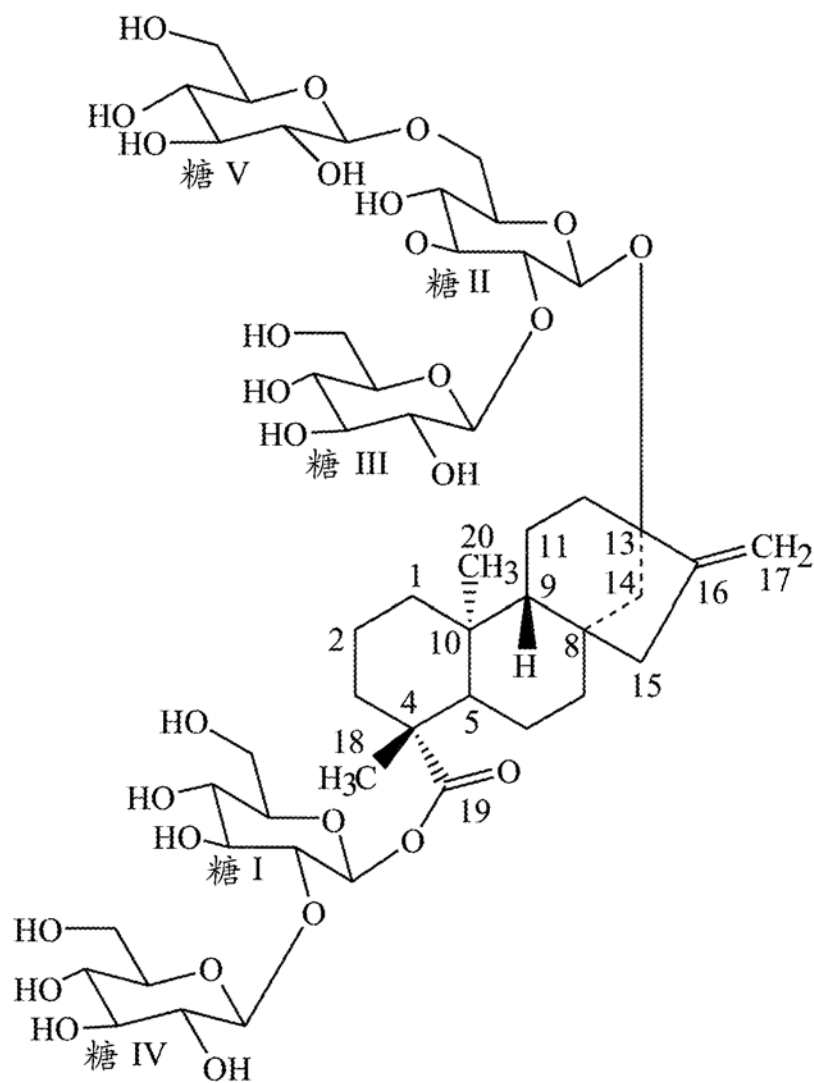
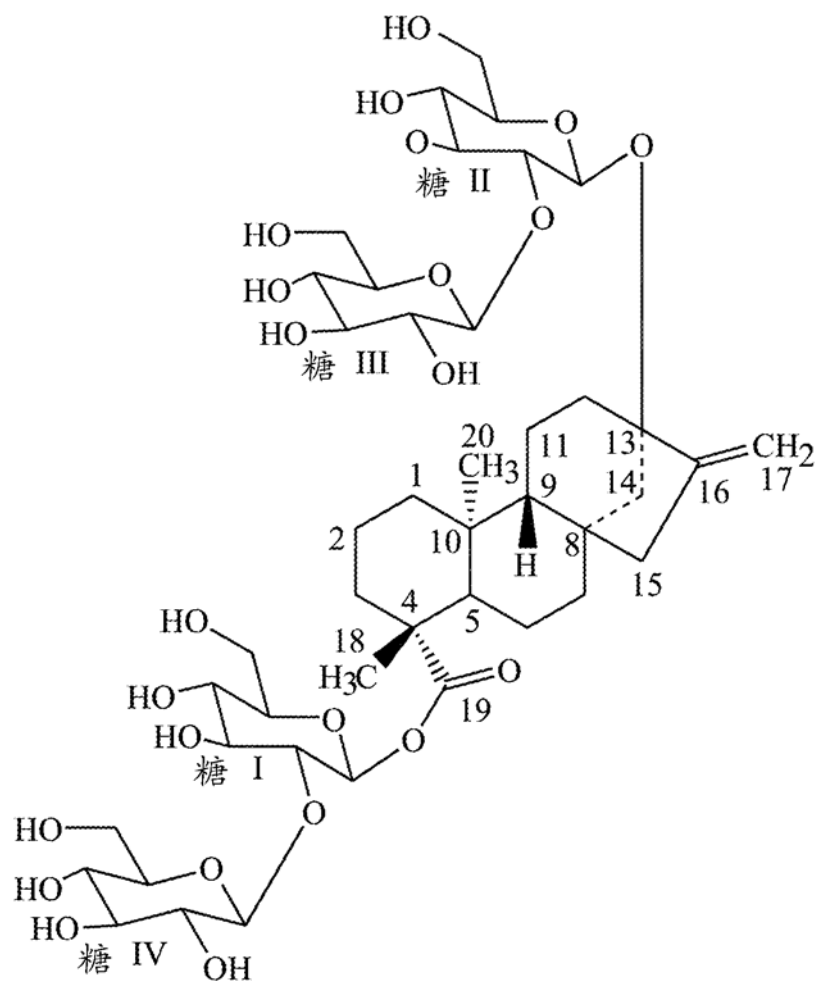


图 5



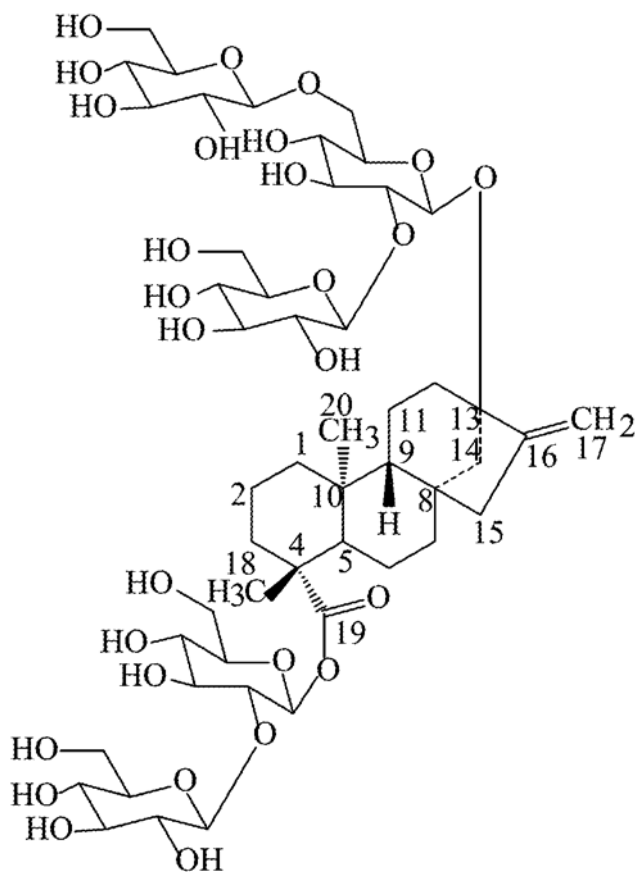
菜鲍迪昔D2

图 6A



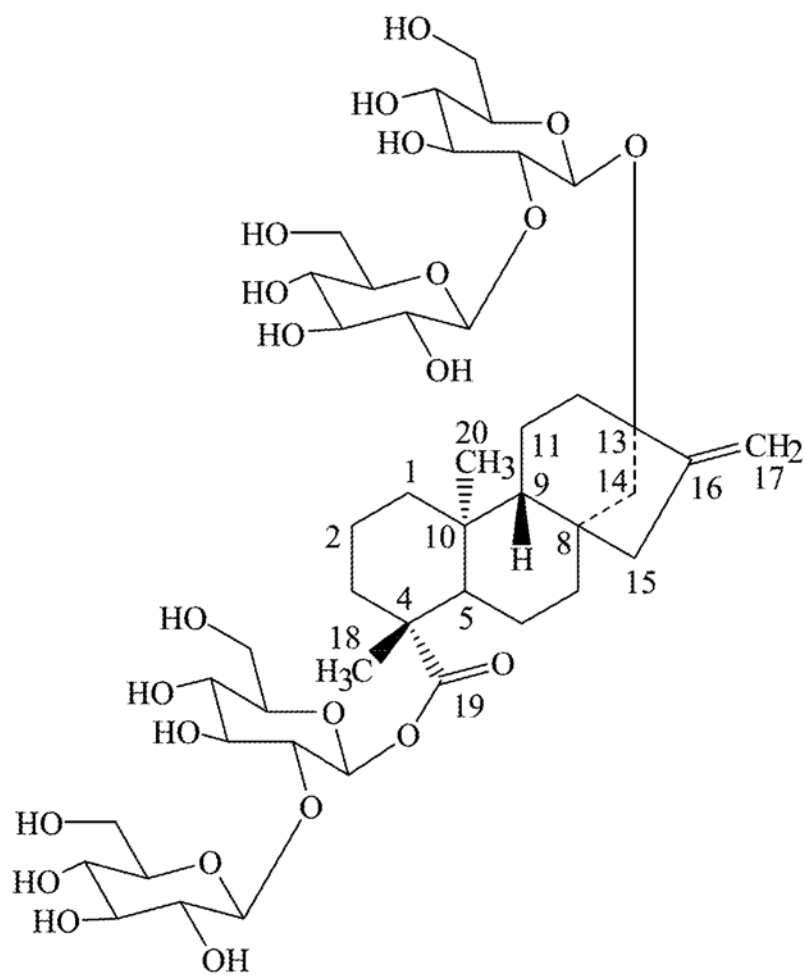
菜鲍迪昔E

图 6B



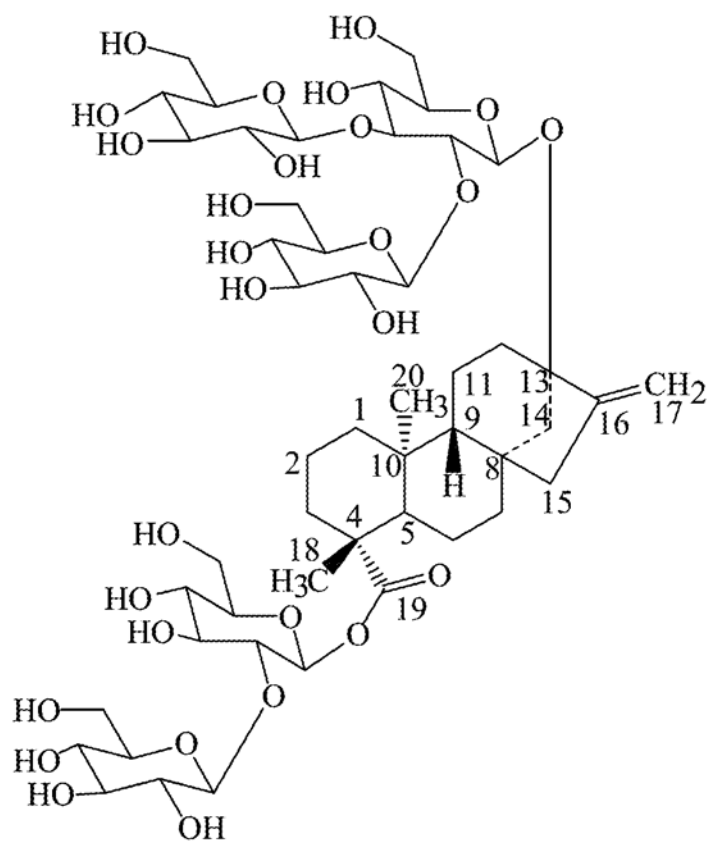
菜鲍迪芬D2

图 8A



菜鲍迪昔E

图 8B



莱鲍迪昔D

图 8C