(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0062461
(43) 공개일자 2017년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/56 (2006.01) *A23L 2/60* (2006.01)
A23L 27/30 (2016.01) *C07H 1/00* (2006.01)
C07H 15/24 (2006.01) *C07H 15/256* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 19/56 (2013.01)
A23L 2/60 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7008543
(22) 출원일자(국제) 2015년10월02일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년03월28일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/053767
(87) 국제공개번호 WO 2016/054534
국제공개일자 2016년04월07일
(30) 우선권주장
62/059,498 2014년10월03일 미국(US)
62/098,929 2014년12월31일 미국(US)

(71) 출원인
코나겐 인크.
미국 01730 메사추세츠주 베드포드 딘겔로 드라이브 15
(72) 발명자
마오 구오홍
미국 매사추세츠주 01803 벌링턴 팜스 드라이브 503
유 시아오단
미국 매사추세츠주 02421 렉싱턴 렉싱턴 리지 드라이브 6231
(74) 대리인
특허법인아주김장리

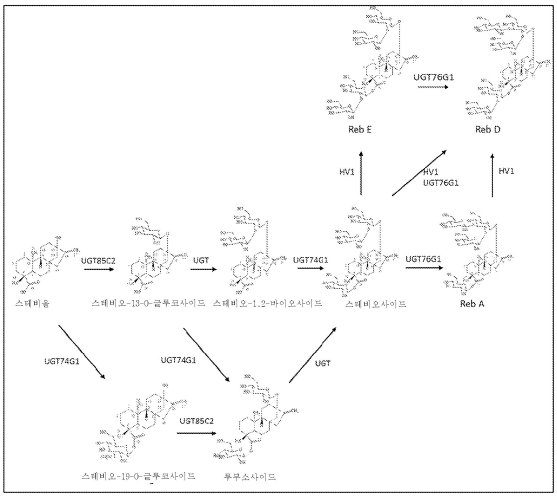
전체 청구항 수 : 총 46 항

(54) 발명의 명칭 **비칼로리 감미료 및 합성 방법**

(57) 요 약

레바우디오사이드 V 및 레바우디오사이드 W라 칭해지는 스테비올 글라이코사이드가 개시되어 있다. 레바우디오사이드 M(Reb M), 레바우디오사이드 G(Reb G), 레바우디오사이드 KA(Reb KA), 레바우디오사이드 V(Reb V) 및 레바우디오사이드(Reb W)를 제조하는 방법이 또한 개시되어 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A23L 27/36 (2016.08)
C07H 1/00 (2013.01)
C07H 15/24 (2013.01)
C07H 15/256 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

루부소사이드로부터 혼합물 스테비오사이드 및 레바우디오사이드 KA를 합성하는 방법으로서,

루부소사이드, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, EUGT11 및 UDP-글라이코실전환효소 융합 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및

스테비오사이드와 레바우디오사이드 KA의 혼합물을 제조하기에 충분한 시간 동안 상기 반응 혼합물을 항온처리하는 단계로서, 글루코스는 레바우디오사이드 KA를 제조하도록 루부소사이드의 C2'-19-O-글루코스에 공유 커플링되고, 글루코스는 스테비오사이드를 제조하도록 루부소사이드의 C2'-13-O-글루코스에 공유 커플링된, 상기 항온처리하는 단계를 포함하는, 루부소사이드로부터 혼합물 스테비오사이드 및 레바우디오사이드 KA를 합성하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 수크로스 생성효소를 상기 반응 혼합물에 첨가하는 단계를 추가로 포함하는, 루부소사이드로부터 혼합물 스테비오사이드 및 레바우디오사이드 KA를 합성하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 수크로스 생성효소는 아라비돕시스(*Arabidopsis*) 수크로스 생성효소 1; 아라비돕시스 수크로스 생성효소 3; 및 비그나 라디에이트(*Vigna radiate*) 수크로스 생성효소로 이루어진 군으로부터 선택되는, 루부소사이드로부터 혼합물 스테비오사이드 및 레바우디오사이드 KA를 합성하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 수크로스 생성효소는 아라비돕시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*) 수크로스 생성효소 1인, 루부소사이드로부터 혼합물 스테비오사이드 및 레바우디오사이드 KA를 합성하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 UDP-글라이코실전환효소 융합 효소는 수크로스 생성효소 도메인에 커플링된 EUGT11 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 루부소사이드로부터 혼합물 스테비오사이드 및 레바우디오사이드 KA를 합성하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 수크로스 생성효소 도메인은 아라비돕시스 수크로스 생성효소 1; 아라비돕시스 수크로스 생성효소 3; 및 비그나 라디에이트 수크로스 생성효소로 이루어진 군으로부터 선택되는, 루부소사이드로부터 혼합물 스테비오사이드 및 레바우디오사이드 KA를 합성하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 수크로스 생성효소 도메인은 아라비돕시스 탈리아나 수크로스 생성효소 1인, 루부소사이드로부터 혼합물 스테비오사이드 및 레바우디오사이드 KA를 합성하는 방법.

청구항 8

루부소사이드로부터 레바우디오사이드 KA를 합성하는 방법으로서,

루부소사이드, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질; 및 HV1을 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및

레바우디오사이드 KA를 제조하기에 충분한 시간 동안 상기 반응 혼합물을 항온처리하는 단계로서, 글루코스는 레바우디오사이드 KA를 제조하도록 루부소사이드의 C2'-19-O-글루코스에 공유 커플링된, 상기 항온처리하는 단계를 포함하는, 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 KA를 합성하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 수크로스 생성효소를 상기 반응 혼합물에 첨가하는 단계를 추가로 포함하는, 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 KA를 합성하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 수크로스 생성효소는 아라비돕시스 수크로스 생성효소 1; 아라비돕시스 수크로스 생성효소 3; 및 비그나 라디에이트 수크로스 생성효소로 이루어진 군으로부터 선택되는, 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 KA를 합성하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 수크로스 생성효소는 아라비돕시스 탈리아나 수크로스 생성효소 1인, 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 KA를 합성하는 방법.

청구항 12

루부소사이드로부터 레바우디오사이드 G를 합성하는 방법으로서,

루부소사이드, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, UGT76G1 및 UDP-글라이코실전환효소 생성효소 융합 효소로부터 선택된 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및

레바우디오사이드 G를 제조하기에 충분한 시간 동안 상기 반응 혼합물을 항온처리하는 단계로서, 글루코스는 레바우디오사이드 G를 제조하도록 루부소사이드의 C3'-13-O-글루코스에 공유 커플링된, 상기 항온처리하는 단계를 포함하는, 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 G를 합성하는 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 수크로스 생성효소를 상기 반응 혼합물에 첨가하는 단계를 추가로 포함하는, 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 G를 합성하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 수크로스 생성효소는 아라비돕시스 수크로스 생성효소 1; 아라비돕시스 수크로스 생성효소 3; 및 비그나 라디에이트 수크로스 생성효소로 이루어진 군으로부터 선택되는, 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 G를 합성하는 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 수크로스 생성효소는 아라비돕시스 탈리아나 수크로스 생성효소 1인, 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 G를 합성하는 방법.

청구항 16

제12항에 있어서, 상기 UDP-글라이코실전환효소 융합 효소는 수크로스 생성효소 도메인에 커플링된 UGT76G1 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 G를 합성하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 수크로스 생성효소 도메인은 아라비돕시스 수크로스 생성효소 1; 아라비돕시스 수크로스 생성효소 3; 및 비그나 라디에이트 수크로스 생성효소로 이루어진 군으로부터 선택되는, 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 G를 합성하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 수크로스 생성효소 도메인은 아라비돕시스 탈리아나 수크로스 생성효소 1인, 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 G를 합성하는 방법.

청구항 19

레바우디오사이드 D로부터 레바우디오사이드 M을 합성하는 방법으로서,

레바우디오사이드 D; 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP), 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스), 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 기질; 및 UGT76G1, UDP-글라이코실전환효소 융합 효소, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소(UDP-글라이코실전환효소)를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및

레바우디오사이드 M을 제조하기에 충분한 시간 동안 상기 반응 혼합물을 항온처리하는 단계로서, 글루코스는 레바우디오사이드 M을 제조하도록 상기 레바우디오사이드 D에 공유 커플링된, 상기 항온처리하는 단계를 포함하는, 레바우디오사이드 D로부터 레바우디오사이드 M을 합성하는 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 수크로스 생성효소를 상기 반응 혼합물에 첨가하는 단계를 추가로 포함하는, 레바우디오사이드 D로부터 레바우디오사이드 M을 합성하는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 수크로스 생성효소는 아라비돕시스 수크로스 생성효소 1; 아라비돕시스 수크로스 생성효소 3; 및 비그나 라디에이트 수크로스 생성효소로 이루어진 군으로부터 선택되는, 레바우디오사이드 D로부터 레바우디오사이드 M을 합성하는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 수크로스 생성효소는 아라비돕시스 탈리아나 수크로스 생성효소 1인, 레바우디오사이드 D로부터 레바우디오사이드 M을 합성하는 방법.

청구항 23

제19항에 있어서, 상기 UDP-글라이코실전환효소 융합 효소는 수크로스 생성효소 도메인에 커플링된 UGT76G1 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소 도메인인, 레바우디오사이드 D로부터 레바우디오사이드 M을 합성하는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 수크로스 생성효소 도메인은 아라비돕시스 수크로스 생성효소 1; 아라비돕시스 수크로스 생성효소 3; 및 비그나 라디에이트 수크로스 생성효소로 이루어진 군으로부터 선택되는, 레바우디오사이드 D로부터 레바우디오사이드 M을 합성하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 수크로스 생성효소 도메인은 아라비돕시스 탈리아나 수크로스 생성효소 1인, 레바우디오사이드 D로부터 레바우디오사이드 M을 합성하는 방법.

청구항 26

레바우디오사이드 E로부터 레바우디오사이드 M을 합성하는 방법으로서,

레바우디오사이드 E; 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP), 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스), 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 기질; 및 UGT76G1, UDP-글라이코실전환효소 융합 효소, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소(UDP-글라이코실전환효소)를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및

레바우디오사이드 M을 제조하기에 충분한 시간 동안 상기 반응 혼합물을 항온처리하는 단계로서, 글루코스는 레바우디오사이드 D를 제조하도록 상기 레바우디오사이드 E에 공유 커플링되고, 글루코스는 레바우디오사이드 M을 제조하도록 상기 레바우디오사이드 D에 공유 커플링된, 상기 항온처리하는 단계를 포함하는, 레바우디오사이드 E로부터 레바우디오사이드 M을 합성하는 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 수크로스 생성효소를 상기 반응 혼합물에 첨가하는 단계를 추가로 포함하는, 레바우디오사이드 E로부터 레바우디오사이드 M을 합성하는 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 수크로스 생성효소는 아라비돕시스 수크로스 생성효소 1; 아라비돕시스 수크로스 생성효소 3; 및 비그나 라디에이트 수크로스 생성효소로 이루어진 군으로부터 선택되는, 레바우디오사이드 E로부터 레바우디오사이드 M을 합성하는 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 수크로스 생성효소는 아라비돕시스 탈리아나 수크로스 생성효소 1인, 레바우디오사이드 E로부터 레바우디오사이드 M을 합성하는 방법.

청구항 30

제26항에 있어서, 상기 UDP-글라이코실전환효소 융합 효소는 수크로스 생성효소 도메인에 커플링된 UGT76G1 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소 도메인인, 레바우디오사이드 E로부터 레바우디오사이드 M을 합성하는 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 수크로스 생성효소 도메인은 아라비돕시스 수크로스 생성효소 1; 아라비돕시스 수크로스 생성효소 3; 및 비그나 라디에이트 수크로스 생성효소로 이루어진 군으로부터 선택되는, 레바우디오사이드 E로부터 레바우디오사이드 M을 합성하는 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 수크로스 생성효소 도메인은 아라비돕시스 탈리아나 수크로스 생성효소 1인, 레바우디오사이드 E로부터 레바우디오사이드 M을 합성하는 방법.

청구항 33

스테비오사이드로부터 바우디오사이드 M을 제조하는 방법으로서,

스테비오사이드; 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP), 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스), 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 기질; 및 UGT76G1, HV1, UDP-글라이코실전환효소 융합 효소, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소(UDP-글라이코실전환효소)를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및

레바우디오사이드 M을 제조하기에 충분한 시간 동안 상기 반응 혼합물을 항온처리하는 단계로서, 글루코스는 레바우디오사이드 A를 제조하도록 UGT76G1 또는 상기 융합 효소에 의해 상기 스테비오사이드에 공유 커플링되고, 글루코스는 레바우디오사이드 D를 제조하도록 HV1에 의해 상기 레바우디오사이드 A에 공유 커플링되고, 글루코스는 레바우디오사이드 M을 제조하도록 UGT76G1 또는 상기 융합 효소에 의해 상기 레바우디오사이드 D에 공유 커플링된, 상기 항온처리하는 단계를 포함하는, 스테비오사이드로부터 바우디오사이드 M을 제조하는 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 수크로스 생성효소를 상기 반응 혼합물에 첨가하는 단계를 추가로 포함하는, 스테비오사이드로부터 바우디오사이드 M을 제조하는 방법.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 수크로스 생성효소는 아라비돕시스 수크로스 생성효소 1; 아라비돕시스 수크로스 생성효소 3; 및 비그나 라디에이트 수크로스 생성효소로 이루어진 군으로부터 선택되는, 스테비오사이드로부터 바우디오사이드 M을 제조하는 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 수크로스 생성효소는 아라비돕시스 탈리아나 수크로스 생성효소 1인, 스테비오사이드로부터 바우디오사이드 M을 제조하는 방법.

청구항 37

제33항에 있어서, 상기 UDP-글라이코실전환효소 융합 효소는 수크로스 생성효소 도메인에 커플링된 UGT76G1 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소 도메인인, 스테비오사이드로부터 바우디오사이드 M을 제조하는 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 상기 수크로스 생성효소 도메인은 아라비돕시스 수크로스 생성효소 1; 아라비돕시스 수크로스 생성효소 3; 및 비그나 라디에이트 수크로스 생성효소로 이루어진 군으로부터 선택되는, 스테비오사이드로부터 바우디오사이드 M을 제조하는 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, 상기 수크로스 생성효소 도메인은 아라비돕시스 탈리아나 수크로스 생성효소 1인, 스테비오사이드로부터 바우디오사이드 M을 제조하는 방법.

청구항 40

레바우디오사이드 A로부터 레바우디오사이드 M을 제조하는 방법으로서,

레바우디오사이드 A; 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP), 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스), 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 기질; 및 UGT76G1, HV1, UDP-글라이코실전환효소 융합 효소, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소(UDP-글라이코실전환효소)를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및

레바우디오사이드 M을 제조하기에 충분한 시간 동안 상기 반응 혼합물을 항온처리하는 단계이되, 글루코스는 레바우디오사이드 D를 제조하도록 HV1에 의해 상기 레바우디오사이드 A에 공유 커플링되고, 글루코스는 레바우디오사이드 M을 제조하도록 UGT76G1 또는 상기 융합 효소에 의해 상기 레바우디오사이드 D에 공유 커플링된, 상기 항온처리하는 단계를 포함하는, 레바우디오사이드 A로부터 레바우디오사이드 M을 제조하는 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 수크로스 생성효소를 상기 반응 혼합물에 첨가하는 단계를 추가로 포함하는, 레바우디오사이드 A로부터 레바우디오사이드 M을 제조하는 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 수크로스 생성효소는 아라비돕시스 수크로스 생성효소 1; 아라비돕시스 수크로스 생성효소 3; 및 비그나 라디에이트 수크로스 생성효소로 이루어진 군으로부터 선택되는, 레바우디오사이드 A로부터 레바우디오사이드 M을 제조하는 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 상기 수크로스 생성효소는 아라비돕시스 탈리아나 수크로스 생성효소 1인, 레바우디오사이드 A로부터 레바우디오사이드 M을 제조하는 방법.

청구항 44

제40항에 있어서, 상기 UDP-글라이코실전환효소 융합 효소는 수크로스 생성효소 도메인에 커플링된 UGT76G1 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소 도메인인, 레바우디오사이드 A로부터 레바우디오사이드 M을 제조하는

방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 수크로스 생성효소 도메인은 아라비돕시스 수크로스 생성효소 1; 아라비돕시스 수크로스 생성효소 3; 및 비그나 라디에이트 수크로스 생성효소로 이루어진 군으로부터 선택되는, 레바우디오사이드 A로부터 레바우디오사이드 M을 제조하는 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 수크로스 생성효소 도메인은 아라비돕시스 탈리아나 수크로스 생성효소 1인, 레바우디오사이드 A로부터 레바우디오사이드 M을 제조하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본원은 발명의 명칭이 "비칼로리 감미료 및 합성 방법(NON-CALORIC SWEETENERS AND METHODS FOR SYNTHESIZING)"인 2014년 10월 3일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/059,498호 및 발명의 명칭이 "비칼로리 감미료 및 합성 방법"인 2014년 12월 31일에 출원된 미국 가특허 출원 제62/098,929호(이들의 개시내용은 그 전문이 참고로 본 명세서에 포함됨)에 대한 우선권을 주장한다.

[0003] 서열 목록의 제출을 위한 지지의 성명

[0004] (마이크로소프트 윈도우(MICROSOFT WINDOWS)(등록상표) 익스플로어(EXPLORER)에서 측정된 바와 같은) 크기가 60,601바이트인 "19452382_1.txt"의 명칭의 파일을 함유하는, 서열 목록의 종이 사본 및 서열 목록의 컴퓨터 판독 가능한 형태가 본 명세서에 제공되고, 본 명세서에서 참고로 포함된다. 이 서열 목록은 서열 번호 1 내지 12로 이루어진다.

배 경 기 술

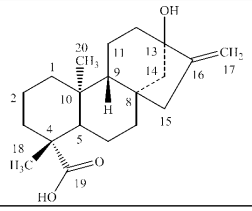
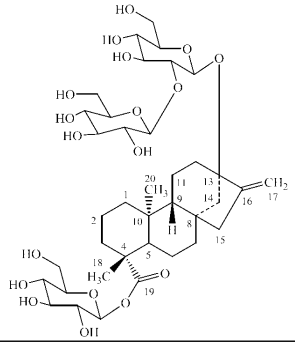
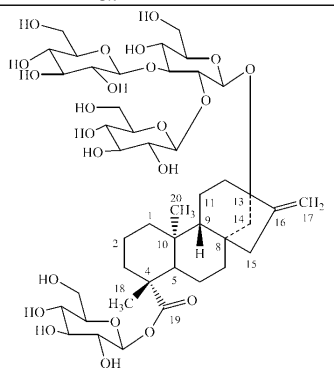
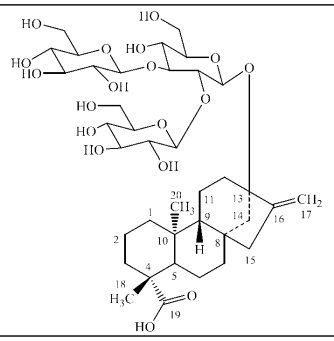
[0005] 본 개시내용은 일반적으로 천연 감미료에 관한 것이다. 더 특히, 본 개시내용은 비칼로리 감미료 및 비칼로리 감미료를 합성하는 방법에 관한 것이다.

[0006] 스테비올 글라이코사이드는 스테비아 레바우디아나(Stevia rebaudiana) 잎에서 단리된 천연 생성물이다. 스테비올 글라이코사이드는 고농도의 저칼로리 감미료로서 널리 사용되고, 수크로스보다 상당히 더 달다. 천연 감미료로서, 상이한 스테비올 글루코사이드는 상이한 정도의 당도 및 뒷맛을 가진다. 스테비올 글라이코사이드의 당도는 수크로스보다 상당히 더 높다. 예를 들어, 스테비오사이드는 쓴 뒷맛을 가지는 수크로스보다 100배 내지 150배 더 달다. 레바우디오사이드 C는 수크로스보다 40배 내지 60배 더 달다. 둘코사이드 A는 수크로스보다 약 30배 더 달다.

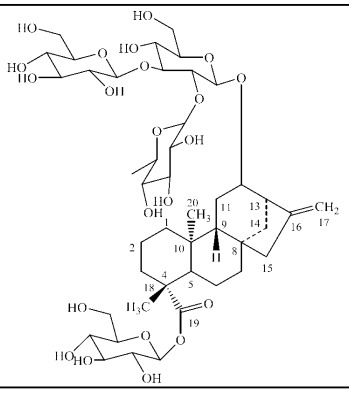
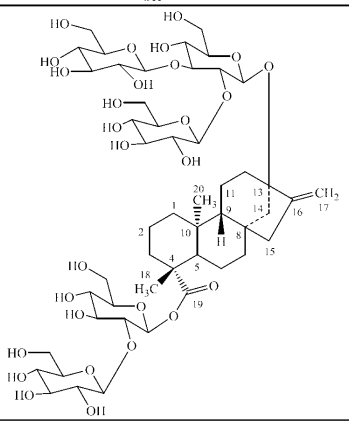
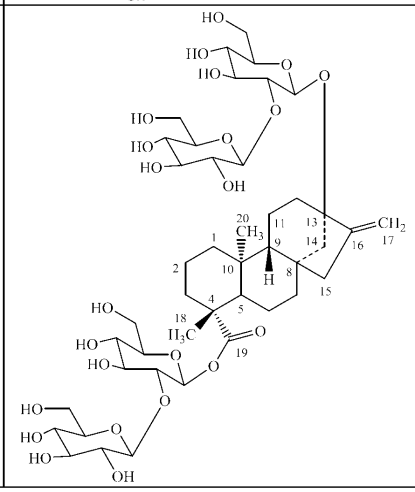
[0007] 천연 발생 스테비올 글라이코사이드는 동일한 기본적인 스테비올 구조를 공유하지만, C13 및 C19 위치에서 탄수화물 잔기(예를 들어, 글루코스, 람노스 및 자일로스 잔기)의 함량이 다르다. 공지된 구조를 가지는 스테비올 글라이코사이드는 스테비올, 스테비오사이드, 레바우디오사이드 A, 레바우디오사이드 B, 레바우디오사이드 C, 레바우디오사이드 D, 레바우디오사이드 E, 레바우디오사이드 F 및 둘코사이드 A를 포함한다(예를 들어, 표 1 참조). 다른 스테비올 글라이코사이드는 레바우디오사이드 M, 레바우디오사이드 N 및 레바우디오사이드 O이다.

표 1

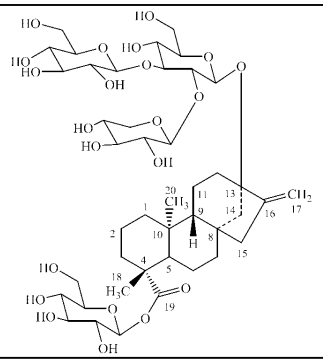
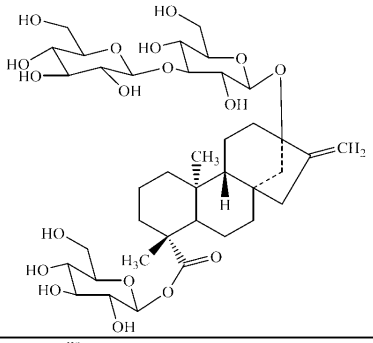
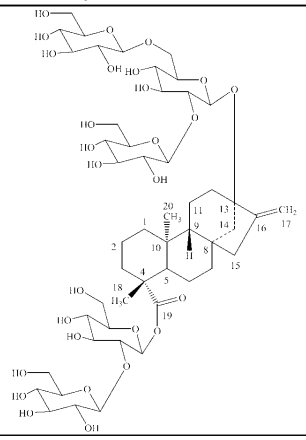
스테비올 글라이코사이드

명칭	구조	분자식	분자량
스테비올		$C_{20}H_{30}O_3$	318
스테비오사이드		$C_{38}H_{60}O_{18}$	804
레바우디오사이드 A		$C_{44}H_{70}O_{23}$	966
레바우디오사이드 B		$C_{38}H_{60}O_{18}$	804

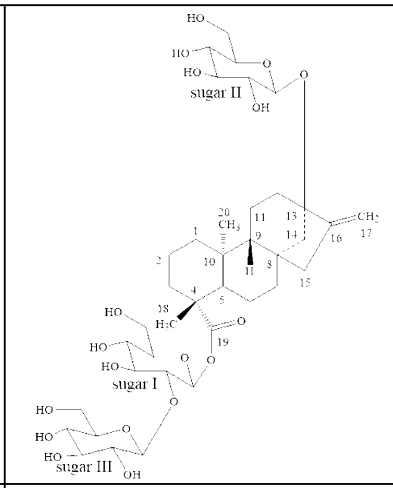
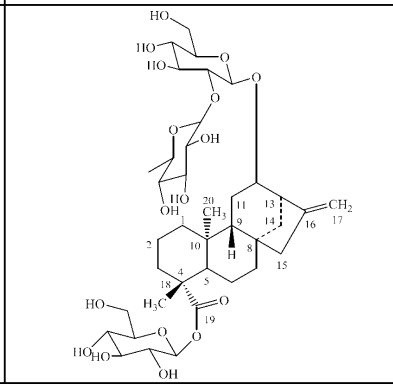
[0008]

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

[0009]

레바우디오사이드 F		$C_{43}H_{68}O_{22}$	936
레바우디오사이드 G		$C_{38}H_{60}O_{18}$	804
레바우디오사이드 D2		$C_{50}H_{80}O_{28}$	1128

[0010]

레바우디오사이드 KA		$C_{38}H_{60}O_{18}$	804
둘코사이드 A		$C_{38}H_{60}O_{17}$	788

[0011]

[0012] 건조 중량 기준으로, 스테비오사이드, 레바우디오사이드 A, 레바우디오사이드 C 및 둘코사이드 A는 각각 잎에서 스테비올 글라이코사이드의 전체 중량의 9.1%, 3.8%, 0.6% 및 0.3%를 차지하지만, 다른 스테비올 글라이코사이드는 훨씬 적은 양으로 존재한다. 스테비아 레바우디아나 식물로부터의 추출물은 상업적으로 구입 가능하고, 주요 화합물로서 통상적으로 스테비오사이드 및 레바우디오사이드 A를 함유한다. 다른 스테비올 글라이코사이드는 소량 성분으로서 통상적으로 스테비아 추출물에 존재한다. 예를 들어, 상업 제제에서의 레바우디오사이드 A의 양은 전체 스테비올 글라이코사이드 함량의 약 20% 내지 90% 초과로 변할 수 있지만, 레바우디오사이드 B의 양은 약 1% 내지 2%일 수 있고, 레바우디오사이드 C의 양은 약 7% 내지 15%일 수 있고, 레바우디오사이드 D의 양은 전체 스테비올 글라이코사이드의 약 2%일 수 있다.

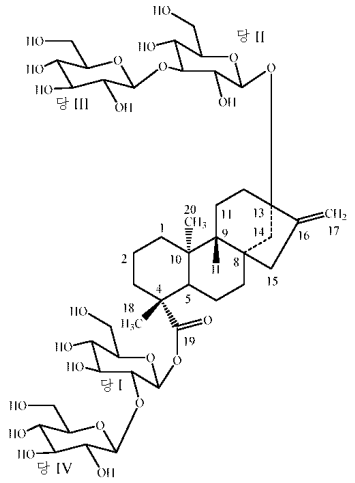
[0013] 대부분의 스테비올 글라이코사이드는, 당 모이어티의 도너로서 유리딘 5'-다이포스포글루코스(UDP-글루코스)를 사용하여 UDP-글라이코실전환효소(UGT)에 의해 통상적으로 촉매화된, 스테비올의 여러 글라이코실화 반응에 의해 형성된다. 식물에서의 UGT는 UDP-글루코스로부터 스테비올로 글루코스 잔기를 전달하는 효소의 매우 다양한 그룹을 구성한다. 예를 들어, 스테비오사이드의 C-13-O-글루코스의 C-3'의 글라이코실화는 레바우디오사이드 A를 생성시키고; 스테비오사이드의 19-O-글루코스의 C-2'의 글라이코실화는 레바우디오사이드 E를 생성시킨다. (C-2'-19-O-글루코스에서의) 레바우디오사이드 A 또는 (C-3'-13-O-글루코스에서의) 레바우디오사이드 E의 추가의 글라이코실화는 레바우디오사이드 D를 생성한다. (도 1).

[0014] 대안적인 감미료는 고당 식품 및 음료의 소모와 연관된 많은 질환의 인식으로 인해 주의가 증가하고 있다. 인공 감미료가 이용 가능하지만, 많은 인공 감미료, 예컨대 둘신, 나트륨 사이클라메이트 및 사카린은 이의 안전성에 대한 관심으로 인해 몇몇 나라에 의해 금지되거나 제한된다. 따라서, 천연 기원의 비칼로리 감미료는 점점 인기가 있다. 스테비아 감미료의 광범위한 사용에 대한 주요 장애 중 하나는 이의 바람직하지 않은 맛 속성이다. 따라서, 당도 효력 및 향 프로필의 최고의 조합을 제공하기 위한 대안적인 감미료 및 이의 제조 방법을 개발할 수요가 존재한다.

발명의 내용

[0015] 본 개시내용은 일반적으로 천연 감미료에 관한 것이다. 더 특히, 본 개시내용은 비칼로리 감미료 및 비칼로리 감미료를 합성하는 방법에 관한 것이다.

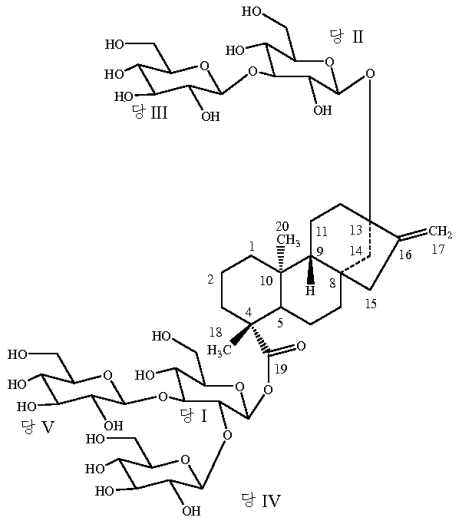
[0016] **합성 레바우디오사이드 V.** 일 양태에서, 본 개시내용은 하기 화학 구조로 이루어진 합성 레바우디오사이드(레바우디오사이드 V)에 관한 것이다:



Reb V

[0017] .

[0018] **합성 레바우디오사이드 W.** 일 양태에서, 본 개시내용은 하기 화학 구조로 이루어진 합성 합성 레바우디오사이드(레바우디오사이드 W)에 관한 것이다:



Reb W

[0019] .

[0020] **레바우디오사이드 G로부터 레바우디오사이드 V를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 G로부터 레바우디오사이드 V를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소(sucrose synthase; SUS)와 함께 또는 이것 없이 레바우디오사이드 G, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, 및 HV1 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 V를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 V를 제조하도록 레바우디오사이드 G에 공유 커플링됨)를 포함한다.

[0021] **레바우디오사이드 G로부터 레바우디오사이드 V를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 G로부터 레바우디오사이드 V를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소(SUS)와 함께 또는 이것 없이 레바우디오사이드 G, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소(EUGT11), UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소(SUS) 융합 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 유리딘 다이포스포 글라

이코실전환효소(UDP-글라이코실전환효소)를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 V를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 V를 제조하도록 레바우디오사이드 G에 공유 커플링됨)를 포함한다.

[0022] **레바우디오사이드 KA로부터 레바우디오사이드 V를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 KA로부터 레바우디오사이드 V를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소(SUS)와 함께 또는 이것 없이 레바우디오사이드 KA, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, UDP-글라이코실전환효소(UGT76G1; 서열 번호 1) 및 UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소(UDP-글라이코실전환효소)를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 V를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 V를 제조하도록 레바우디오사이드 KA에 공유 커플링됨)를 포함한다.

[0023] **루부소사이드로부터 레바우디오사이드 V를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 V를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소(SUS)와 함께 또는 이것 없이 루부소사이드, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, UDP-글라이코실전환효소(UGT76G1), HV1 및 UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소(UDP-글라이코실전환효소)를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 V를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 KA를 제조하도록 루부소사이드에 공유 커플링됨)를 포함한다. 계속해서, 글루코스는 레바우디오사이드 V를 제조하도록 레바우디오사이드 KA에 공유 커플링된다. 글루코스는 레바우디오사이드 G를 제조하도록 루부소사이드에 공유 커플링된다. 계속해서, 글루코스는 레바우디오사이드 V를 제조하도록 레바우디오사이드 G에 공유 커플링된다.

[0024] **루부소사이드로부터 레바우디오사이드 V를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 V를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 루부소사이드, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, UDP-글라이코실전환효소(UGT76G1), EUGT11 및 UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소(UDP-글라이코실전환효소)를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 V를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 KA를 제조하도록 루부소사이드에 공유 커플링되고, 글루코스는 레바우디오사이드 V를 제조하도록 레바우디오사이드 KA에 공유 커플링됨)를 포함한다. 글루코스는 레바우디오사이드 G를 제조하도록 루부소사이드에 공유 커플링되고, 글루코스는 레바우디오사이드 V를 제조하도록 레바우디오사이드 G에 공유 커플링된다.

[0025] **레바우디오사이드 V로부터 레바우디오사이드 W를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 V로부터 레바우디오사이드 W를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 레바우디오사이드 V, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, UDP-글라이코실전환효소(UGT76G1) 및 UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소(UDP-글라이코실전환효소)를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 W를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 W를 제조하도록 레바우디오사이드 V에 공유 커플링됨)를 포함한다.

[0026] **레바우디오사이드 G로부터 레바우디오사이드 W를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 G로부터 레바우디오사이드 W를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 레바우디오사이드 G, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, UDP-글라이코실전환효소(UGT76G1), UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소 및 HV1로 이루어진 군으로부터 선택된 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소(UDP-글라이코실전환효소)를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 W를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 HV1에 의해 레바우디오사이드 V를 제조하도록 레바우디오사이드 G에 공유 커플링됨)를 포함한다. 계속해서, 글루코스는 UGT76G1에 의해 레바우디오사이드 W를 제조하도록 레바우디오사이드 V에 공유 커플링된다.

[0027] **레바우디오사이드 G로부터 레바우디오사이드 W를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 G로부터 레바우디오사이드 W를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 레바우디오사이드 G, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, UGT76G1, EUGT11 및 UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소(UDP-글라이코실전환효소)를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 W를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 EUGT11에 의해 레바우디오사이드 V를 제조하도록 레바우디오사이드 G에 공유 커플링됨)를 포함한다. 계속해서, 글루코스는 UGT76G1에 의해 레바우디오사이드 W를 제조하도록 레바우디오사이드 V에 공유 커플링된다.

[0028] **레바우디오사이드 KA로부터 레바우디오사이드 W를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 KA로부터 레바우디오사이드 W를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 레바우디오사이드 KA; 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질; UDP-글라이코실전환효소(UGT76G1) 및 UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소(UDP-글라이코실전환효소)를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 W를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 V를 제조하도록 레바우디오사이드 KA에 공유 커플링됨)를 포함한다. 계속해서, 글루코스는 레바우디오사이드 W를 제조하도록 레바우디오사이드 V에 공유 커플링된다.

[0029] **루부소사이드로부터 레바우디오사이드 W를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 D를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 루부소사이드, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, UGT76G1, HV1 및 UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소(UDP-글라이코실전환효소)를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 W를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계를 포함한다.

[0030] **루부소사이드로부터 레바우디오사이드 W를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 W를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 루부소사이드, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, UGT76G1, EUGT11 및 UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소(UDP-글라이코실전환효소)를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 W를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계를 포함한다.

[0031] **루부소사이드로부터 스테비오사이드와 레바우디오사이드 KA의 혼합물을 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 루부소사이드로부터 스테비오사이드와 레바우디오사이드 KA의 혼합물을 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 루부소사이드, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, EUGT11 및 UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 스테비오사이드와 레바우디오사이드 KA의 혼합물을 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 KA를 제조하도록 루부소사이드의 C2'-19-O-글루코스에 공유 커플링되고; 글루코스는 스테비오사이드를 제조하도록 루부소사이드의 C2'-13-O-글루코스에 공유 커플링됨)를 포함한다.

[0032] **루부소사이드로부터 레바우디오사이드 KA를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 KA를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 루부소사이드, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, 및 HV1을 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 KA를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 KA를 제조하도록 루부소사이드의 C2'-19-O-글루코스에 공유 커플링됨)를 포함한다.

[0033] **루부소사이드로부터 레바우디오사이드 G를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 G를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이

루부소사이드, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, UGT76G1 및 UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 G를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 G를 제조하도록 루부소사이드의 C3'-13-O-글루코스에 공유 커플링됨)를 포함한다.

[0034] **레바우디오사이드 KA로부터 레바우디오사이드 E를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 KA로부터 레바우디오사이드 E를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 레바우디오사이드 KA, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, 및 HV1 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 E를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 E를 제조하도록 레바우디오사이드 KA의 C2' 13-O-글루코스에 공유 커플링됨)를 포함한다.

[0035] **레바우디오사이드 KA로부터 레바우디오사이드 E를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 KA로부터 레바우디오사이드 E를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 레바우디오사이드 KA, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, EUGT11 및 UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 E를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 E를 제조하도록 레바우디오사이드 KA의 C2' 13-O-글루코스에 공유 커플링됨)를 포함한다.

[0036] **루부소사이드로부터 레바우디오사이드 E를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 E를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 루부소사이드, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, 및 EUGT11 및 UDP-글라이코실전환효소-수크로스 합성 융합 효소의 군으로부터의 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 E를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 KA와 스테비오사이드의 혼합물을 제조하도록 루부소사이드에 공유 커플링됨)를 포함한다. 계속해서, 글루코스는 레바우디오사이드 E를 제조하도록 레바우디오사이드 KA 및 스테비오사이드에 공유 커플링된다.

[0037] **루부소사이드로부터 레바우디오사이드 E를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 E를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 루부소사이드, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, 및 HV1 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 레바우디오사이드 E를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 KA를 제조하도록 루부소사이드에 공유 커플링됨); 및 추가로 레바우디오사이드 KA를 HV1과 항온처리하여 레바우디오사이드 E를 제조하는 단계를 포함한다.

[0038] **루부소사이드로부터 레바우디오사이드 D2를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 D2를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 루부소사이드, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, EUGT11 및 UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소의 군으로부터의 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 스테비오사이드와 레바우디오사이드 D2의 혼합물을 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 스테비오사이드와 레바우디오사이드 KA의 혼합물을 제조하도록 루부소사이드에 공유 커플링됨); 추가로 스테비오사이드와 레바우디오사이드 KA의 혼합물을 EUGT11과 항온처리하여 레바우디오사이드 E를 제조하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 E를 제조하도록 스테비오사이드 및 레바우디오사이드 KA에 공유 커플링됨); 및 추가로 레바우디오사이드 E를 EUGT11과 항온처리하여 레바우디오사이드 D2를 제조하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 D2를 제조하도록 레바우디오사이드 E에 공유 커플링됨)를 포함한다.

[0039] **레바우디오사이드 KA로부터 레바우디오사이드 D2를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 KA로부터 레바우디오사이드 D2를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 레바우디오사이드 KA, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글

루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, EUGT11 및 UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 레바우디오사이드 D2를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 E를 제조하도록 레바우디오사이드 KA에 공유 커플링됨); 및 추가로 레바우디오사이드 E의 혼합물을 EUGT11과 항온처리하여 레바우디오사이드 D2를 제조하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 D2를 제조하도록 레바우디오사이드 E에 공유 커플링됨)를 포함한다.

[0040] **레바우디오사이드 E로부터 레바우디오사이드 Z를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 E로부터 레바우디오사이드 Z를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 레바우디오사이드 E, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, HV1 및 수크로스 생성효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 Z를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 Z1을 제조하도록 레바우디오사이드 E의 C2'-13-O-글루코스에 공유 커플링됨)를 포함한다. 글루코스는 레바우디오사이드 Z2를 제조하도록 레바우디오사이드 E의 C2'-19-O-글루코스에 공유 커플링된다.

[0041] **레바우디오사이드 D로부터 레바우디오사이드 M을 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 D로부터 레바우디오사이드 M을 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 레바우디오사이드 D, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP), 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스), 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, 및 UGT76G1, UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 M을 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 M을 제조하도록 레바우디오사이드 D에 공유 커플링됨)를 포함한다.

[0042] **스테비오사이드로부터 레바우디오사이드 D 및 레바우디오사이드 M을 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 스테비오사이드로부터 레바우디오사이드 D 및 레바우디오사이드 M을 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 스테비오사이드, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP), 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스), 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, 및 HV1, UGT76G1, UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 M을 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 글루코스는 레바우디오사이드 A 및/또는 레바우디오사이드 E를 제조하도록 스테비오사이드에 공유 커플링된다. 계속해서, 글루코스는 레바우디오사이드 D를 제조하도록 레바우디오사이드 A 및/또는 레바우디오사이드 E에 공유 커플링되고, 글루코스는 레바우디오사이드 M을 제조하도록 레바우디오사이드 D에 공유 커플링된다.

[0043] **레바우디오사이드 A로부터 레바우디오사이드 D 및 레바우디오사이드 M을 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 A로부터 레바우디오사이드 D 및 레바우디오사이드 M을 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 레바우디오사이드 A, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP), 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스), 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, 및 HV1, UGT76G1, UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 M을 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 D를 제조하도록 레바우디오사이드 A에 공유 커플링되고, 글루코스는 레바우디오사이드 M을 제조하도록 레바우디오사이드 D에 공유 커플링됨)를 포함한다.

[0044] **레바우디오사이드 E로부터 레바우디오사이드 D 및 레바우디오사이드 M을 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 E로부터 레바우디오사이드 D 및 레바우디오사이드 M를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 레바우디오사이드 E, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP), 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스), 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, 및 UGT76G1, UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 M을 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 D를 제조하도록 레바우디오사이드 E에 공유 커플링되고, 글루코스는 레바우디오사이드 M을 제조하도록 레바우디오사이드 D에

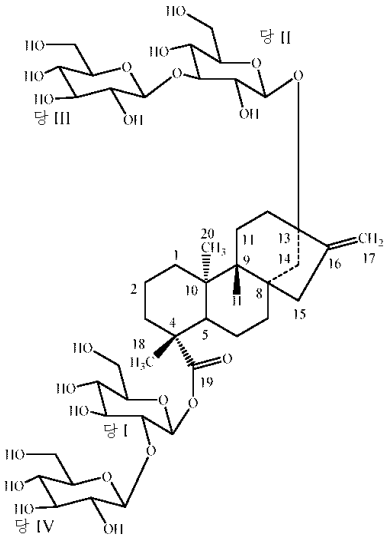
공유 커플링됨)를 포함한다.

[0045] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 V, 레바우디오사이드 W, 레바우디오사이드 G, 레바우디오사이드 KA, 레바우디오사이드 M, 및 이들의 조합으로부터 선택된 레바우디오사이드의 감미양을 포함하는 경구 소모성 제품에 관한 것이고, 경구 소모성 제품은 음료 제품 및 소모성 제품으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0046] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 V, 레바우디오사이드 W, 레바우디오사이드 G, 레바우디오사이드 KA, 레바우디오사이드 M, 및 이들의 조합으로부터 선택된 레바우디오사이드의 감미양을 포함하는 음료 제품에 관한 것이다. 레바우디오사이드는 약 5ppm 내지 약 100ppm의 농도로 음료 제품에 존재한다. 몇몇 실시형태에서, 낮은 농도, 예를 들어 100ppm 미만의 레바우디오사이드는 10,000 내지 30,000ppm의 농도를 가지는 수크로스 용액과 등가 당도를 가진다.

[0047] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 V, 레바우디오사이드 W, 레바우디오사이드 G, 레바우디오사이드 KA, 레바우디오사이드 M, 및 이들의 조합으로부터 선택된 레바우디오사이드의 감미양을 포함하는 소모성 제품에 관한 것이다. 레바우디오사이드는 약 5ppm 내지 약 100ppm의 농도로 소모성 제품에 존재한다. 몇몇 실시형태에서, 낮은 농도, 예를 들어 100ppm 미만의 레바우디오사이드는 10,000 내지 30,000ppm의 농도를 가지는 수크로스 용액과 등가 당도를 가진다.

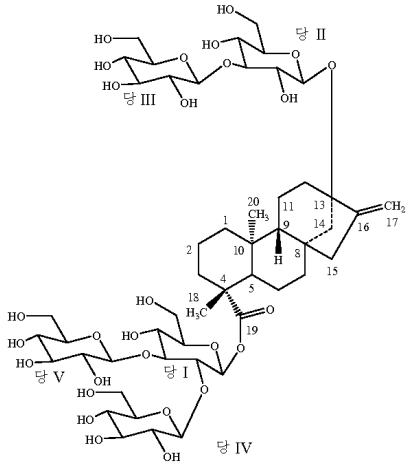
[0048] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 하기 화학 구조로 이루어진 감미료에 관한 것이다:



Reb V

[0049] .

[0050] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 하기 화학 구조로 이루어진 감미료에 관한 것이다:



Reb W

[0051] .

[0052] 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 레바우디오사이드 V 또는 레바우디오사이드 W 또는 레바우디오사이드 G 또는 레바우디오사이드 KA 또는 레바우디오사이드 M은 유일한 감미료일 수 있고, 생성물은 약 1% 내지 약 4%(w/v-%)의 수크로스 용액과 등가인 당도 강도를 가진다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 경구 소모성 제품은 추가적인 감미료를 추가로 포함할 수 있고, 상기 제품은 약 1% 내지 약 10%(w/v-%)의 수크로스 용액과 등가인 당도 강도를 가진다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 상기 제품 내의 모든 감미 성분은 고농도의 감미료일 수 있다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 상기 제품 내의 모든 감미 성분은 천연 고농도의 감미료일 수 있다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 추가적인 감미료는 스테비아 추출물, 스테비올 글라이코사이드, 스테비오사이드, 레바우디오사이드 A, 레바우디오사이드 B, 레바우디오사이드 C, 레바우디오사이드 D, 레바우디오사이드 D2, 레바우디오사이드 E, 레바우디오사이드 F, 레바우디오사이드 G, 레바우디오사이드 KA, 레바우디오사이드 M, 둘코사이드 A, 루부소사이드, 스테비올비오사이드, 수크로스, 고 프럭토스 옥수수 시럽, 프럭토스, 글루코스, 자일로스, 아라비노스, 람노스, 에리쓰리톨, 자일리톨, 만니톨, 소르비톨, 이노시톨, AceK, 아스파르탐, 네오탐, 수크랄로스, 사카린, 나린긴 다이하이드로칼콘(NarDHC), 네오헤스페리딘 다이하이드로칼콘(NDHC), 루부소사이드, 모그로사이드 IV, 시아메노사이드 I, 모그로사이드 V, 모나틴, 타우마틴, 모넬린, 브라제인, L-알리닌, 글라이신, 로 한 구오(Lo Han Guo), 헤르난둘신, 필로둘신, 트릴롭타인, 및 이들의 조합으로부터 선택된 1종 이상의 감미료일 수 있다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 음료 제품 및 소모성 제품은 탄수화물, 폴리올, 아미노산 또는 이의 염, 폴리-아미노산 또는 이의 염, 당 산 또는 이의 염, 뉴클레오타이드, 유기 산, 무기 산, 유기 염, 유기 산염, 유기 염기염, 무기 염, 쓴 화합물, 향미료, 향료 성분, 수렴제 화합물, 단백질, 단백질 가수분해물, 계면활성제, 유화제, 플라보노이드, 알코올, 중간체, 및 이들의 조합으로부터 선택된 1종 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 레바우디오사이드 V는 상기 제품에 첨가되기 전에 약 50% 내지 약 100중량%의 순도를 가진다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, W는 상기 제품에 첨가되기 전에 약 50% 내지 약 100중량%의 순도를 가진다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 상기 제품 내의 레바우디오사이드 V는 레바우디오사이드 V 다형 또는 비결정질 레바우디오사이드 V이다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 상기 제품 내의 레바우디오사이드 V는 레바우디오사이드 V 입체이성질체이다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 상기 제품 내의 레바우디오사이드 W는 레바우디오사이드 W 다형 또는 비결정질 레바우디오사이드 W이다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 상기 제품 내의 레바우디오사이드 W는 레바우디오사이드 W 입체이성질체이다.

[0053] 본 개시내용의 다른 양태는 상기 제품으로 또는 음료 제품 및 소모성 제품을 제조하기 위한 성분으로 레바우디오사이드 V, 레바우디오사이드 W, 레바우디오사이드 KA, 레바우디오사이드 M 및 레바우디오사이드 G로부터 선택된 합성된 레바우디오사이드를 포함시킴으로써 음료 제품 및 소모성 제품을 제조하는 방법에 관한 것이고, 레바우디오사이드 V, 레바우디오사이드 W, 레바우디오사이드 KA, 레바우디오사이드 M 및 레바우디오사이드 G로부터 선택된 레바우디오사이드는 약 5ppm 내지 약 100ppm의 농도로 상기 제품에 존재한다. 본 개시내용의 다른 양태는 음료 제품 및 소모성 제품에 레바우디오사이드 V, 레바우디오사이드 W, 레바우디오사이드 KA, 레바우디오사이드 M 및 레바우디오사이드 G로부터 선택된 합성된 레바우디오사이드의 약 5ppm 내지 약 100ppm을 첨가함으로써 음료 제품 및 소모성 제품의 당도를 증대시키는 방법에 관한 것이고, 레바우디오사이드 V, 레바우디오사이드 W, 레바우디오사이드 KA, 레바우디오사이드 M 및 레바우디오사이드 G로부터 선택된 첨가된 합성된 레바우디오사이드는, 레바우디오사이드 V, 레바우디오사이드 W, 레바우디오사이드 KA, 레바우디오사이드 M 및 레바우디오사이드 G로부터 합성된 레바우디오사이드가 결여된 상응하는 음료 제품 및 소모성 제품과 비교하여, 음료 제품 및 소모성 제품의 당도를 증대시킨다.

[0054] 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 레바우디오사이드 V는 유일한 감미료이고, 상기 제품은 약 1% 내지 약 4%(w/v-%)의 수크로스 용액과 등가인 당도 강도를 가진다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 레바우디오사이드 KA는 유일한 감미료이고, 상기 제품은 약 1% 내지 약 4%(w/v-%)의 수크로스 용액과 등가인 당도 강도를 가진다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 레바우디오사이드 G는 유일한 감미료이고, 상기 제품은 약 1% 내지 약 4%(w/v-%)의 수크로스 용액과 등가인 당도 강도를 가진다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 레바우디오사이드 W는 유일한 감미료이고, 상기 제품은 약 1% 내지 약 4%(w/v-%)의 수크로스 용액과 등가인 당도 강도를 가진다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 레바우디오사이드 M은 유일한 감미료이고, 상기 제품은 약 1% 내지 약 4%(w/v-%)의 수크로스 용액과 등가인 당도 강도를 가진다. 임의의 이전의 실시

형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 상기 방법은 추가적인 감미료를 첨가하는 단계를 추가로 포함하고, 상기 제품은 약 1% 내지 약 10%(w/v-%)의 수크로스 용액과 등가인 당도 강도를 가진다.

[0055] 본 개시내용의 다른 양태는 a) 1종 이상의 감미료를 함유하는 음료 제품 또는 소모성 제품을 제공하는 단계; 및 b) 레바우디오사이드 V, 레바우디오사이드 W, 레바우디오사이드 KA, 레바우디오사이드 M 및 레바우디오사이드 G, 및 이들의 조합으로부터 선택된 합성된 레바우디오사이드의 약 5ppm 내지 약 100ppm을 음료 제품 또는 소모성 제품에 첨가하는 단계에 의해 감미 음료 제품 또는 감미 소모성 제품을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0056] 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 상기 방법은 음료 제품 또는 소모성 제품에 1종 이상의 첨가제를 첨가하는 단계를 추가로 포함한다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 경구 소모성 제품은 1종 이상의 첨가제를 추가로 함유하다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 1종 이상의 첨가제는 탄수화물, 폴리올, 아미노산 또는 이의 염, 폴리-아미노산 또는 이의 염, 당 산 또는 이의 염, 뉴클레오타이드, 유기 산, 무기 산, 유기 염, 유기 산염, 유기 염기염, 무기 염, 쓴 화합물, 향미료, 향료 성분, 수렴제 화합물, 단백질, 단백질 가수분해물, 계면활성제, 유화제, 플라보노이드, 알코올, 중간체, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 상기 제품 내의 모든 감미 성분은 고농도의 감미료이다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 상기 제품 내의 모든 감미 성분은 천연 고농도의 감미료이다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 감미료는 스테비아 추출물, 스테비올 글라이코사이드, 스테비오사이드, 레바우디오사이드 A, 레바우디오사이드 B, 레바우디오사이드 C, 레바우디오사이드 D, 레바우디오사이드 D2, 레바우디오사이드 E, 레바우디오사이드 F, 레바우디오사이드 G, 레바우디오사이드 KA, 레바우디오사이드 M, 둘코사이드 A, 루부소사이드, 스테비올비오사이드, 수크로스, 고 프럭토스 옥수수 시럽, 프럭토스, 글루코스, 자일로스, 아라비노스, 람노스, 에리쓰리톨, 자일리톨, 만니톨, 소르비톨, 이노시톨, AceK, 아스파르탐, 네오탐, 수크랄로스, 사카린, 나린긴 다이하이드로칼콘(NarDHC), 네오헤스페리딘 다이하이드로칼콘(NDHC), 루부소사이드, 모그로사이드 IV, 시아메노사이드 I, 모그로사이드 V, 모나틴, 타우마틴, 모넬린, 브라제인, L-알리닌, 글라이신, 로 한 구오, 헤르난둘신, 필로둘신, 트릴롭타인, 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 레바우디오사이드 V는 상기 제품에 첨가되기 전에 약 50% 내지 약 100중량%의 순도를 가진다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 상기 제품 내의 레바우디오사이드 V는 레바우디오사이드 V 다형 또는 비결정질 레바우디오사이드 V이다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 레바우디오사이드 W는 상기 제품에 첨가되기 전에 약 50% 내지 약 100중량%의 순도를 가진다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 상기 제품 내의 레바우디오사이드 W는 레바우디오사이드 W 다형 또는 비결정질 레바우디오사이드 W이다.

도면의 간단한 설명

[0057] 본 개시내용은 이의 하기 상세한 설명을 고려할 때 더 잘 이해될 것이고, 상기 기재된 것 이외의 특징, 양태 및 이점이 명확해질 것이다. 이러한 상세한 설명은 하기 도면을 참조한다:

도 1은 스테비올로부터의 스테비올 글라이코사이드 생합성 경로를 도시한다.

도 2는 화살표로 표시된 정제된 재조합 단백질의 SDS-PAGE 분석을 도시한다: A: HV1, B: UGT76G1, C: EUGT11, D: AtSUS1, E: UGT76G1-SUS1 (GS), F: EUGT11-SUS1 (EUS).

도 3은 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 KA("Reb KA") 및 레바우디오사이드 E("Reb E")를 제조하기 위한 HV1 촉매작용 반응을 도시한다. A-C: 루부소사이드("Rub"), 스테비오사이드("Ste") 및 레바우디오사이드 E("Reb E") 표준품의 HPLC 보유 시간을 보여줌. 6시간(D), 12시간(F) 및 24시간(H)에 HV1 단독에 의해 효소로 생성된 Reb KA; Reb KA 및 6시간(E), 12시간(G) 및 24시간(I)에 UGT-SUS(HV1-AtSUS1) 커플링 시스템에 의해 효소로 생성된 Reb E.

도 4는 HV1에 의한 레바우디오사이드 Z로의 Reb E의 전환을 도시한다. (A): 레바우디오사이드 E("Reb E")의 HPLC 보유 시간을 보여준다. 3시간(B), 7시간(C), 24시간(D) 및 44시간(E)에 HV1-AtSUS1 커플링 시스템에서 HV1에 의해 효소로 생성된 레바우디오사이드 Z("Reb Z").

도 5는 HV1에 의한 Reb E로의 Reb KA의 전환을 도시한다. (A-B): 레바우디오사이드 KA("Reb KA") 및 레바우디오사이드 E("Reb E") 표준품의 HPLC 보유 시간을 보여준다. 12시간에 HV1 단독에 의해 효소로 생성된 Reb E(C); 12시간에 UGT-SUS(HV1-AtSUS1) 커플링 시스템에 의해 효소로 생성된 Reb E(D).

도 6은 루부소사이드로부터 Reb KA 및 스테비오사이드를 제조하기 위한 EUGT11 촉매작용 반응을 도시한다. (A-F): 루부소사이드("Rub"), 스테비오사이드("Ste"), 레바우디오사이드 G("Reb G"), 레바우디오사이드 E("Reb E"), 레바우디오사이드 D("Reb D") 및 레바우디오사이드 D2("Reb D2") 표준품의 HPLC 보유 시간을 보여준다. 12시간(G) 및 48시간(J)에 EUGT11 단독에 의한 효소 반응; 12시간(H) 및 48시간(K)에 UGT-SUS(EUGT11-AtSUS1) 커플링 시스템에 의한 효소 반응; 12시간(I) 및 48시간(L)에 EUS 융합 단백질에 의한 효소 반응.

도 7은 EUGT11 및 EUS 융합 단백질에 의한 Reb E 및 Reb D2로의 Reb KA의 전환을 도시한다. (A-C): 레바우디오사이드 KA("Reb KA"), 레바우디오사이드 E("Reb E") 및 레바우디오사이드 D2("Reb D2") 표준품의 HPLC 보유 시간을 보여준다. 12시간(D) 및 48시간(G)에 EUGT11 단독에 의한 효소 반응; 12시간(E) 및 48시간(H)에 UGT-SUS(EUGT11-AtSUS1) 커플링 시스템에 의한 효소 반응; 12시간(F) 및 48시간(I)에 EUS 융합 단백질에 의한 효소 반응.

도 8은 시험관내 레바우디오사이드 G의 UGT76G1 생성을 도시한다. (A-B): 루부소사이드("Rub") 및 레바우디오사이드 G("Reb G") 표준품의 HPLC 보유 시간을 보여준다. 12시간(C) 및 24시간(F)에 UGT76G1 단독에 의한 효소 반응; 12시간(D) 및 24시간(G)에 UGT-SUS(EUGT11-AtSUS1) 커플링 시스템에 의한 효소 반응; 12시간(E) 및 48시간(H)에 GS 융합 단백질에 의한 효소 반응.

도 9는 레바우디오사이드 KA(A-D)로부터 스테비올 글라이코사이드 Reb V 및 Reb W를 제조하기 위한 UGT76G1 촉매작용 반응을 도시한다: 루부소사이드("Rub"), 레바우디오사이드 D("Reb D"), 레바우디오사이드 E("Reb E") 및 레바우디오사이드 KA ("Reb KA") 표준품의 HPLC 보유 시간을 보여준다. 6시간(E) 및 12시간(H)에 UGT76G1 단독에 의한 효소 반응; 6시간(F) 및 12시간(I)에 UGT-SUS(UGT76G1-AtSUS1) 커플링 시스템에 의한 효소 반응; 6시간(G) 및 12시간(J)에 GS 융합 단백질에 의한 효소 반응.

도 10은 시험관내 Reb W로의 Reb V의 UGT76G1 전환을 도시한다. (A-B): Reb V 및 Reb W의 HPLC 보유 시간을 보여준다. (C): 6시간에 UGT76G1-AtSUS1 커플링 시스템에 의한 효소 반응.

도 11은 Reb V로의 Reb G의 HV1 전환을 도시한다. (A-C): 레바우디오사이드 G("Reb G"), 레바우디오사이드 A("Reb A") 및 레바우디오사이드 E("Reb E") 표준품의 HPLC 보유 시간을 보여준다. 12시간(D) 및 24시간(F)에 HV1 단독에 의한 효소 반응; 12시간(E) 및 24시간(G)에 UGT-SUS(HV1-AtSUS1) 커플링 시스템에 의한 효소 반응.

도 12는 Reb V로의 Reb G의 EUGT11 전환을 도시한다. (A-D): 레바우디오사이드 G("Reb G"), 레바우디오사이드 A("Reb A"), 레바우디오사이드 E("Reb E") 및 레바우디오사이드 D("Reb D") 표준품의 HPLC 보유 시간을 보여준다. 12시간(E) 및 24시간(H)에 EUGT11 단독에 의한 효소 반응; 12시간(F) 및 24시간(I)에 UGT-SUS(EUGT11-AtSUS1) 커플링 시스템에 의한 효소 반응; 12시간(G) 및 24시간(J)에 EUS 융합 효소에 의한 효소 반응.

도 13은 재조합 HV1 폴리펩타이드, 재조합 UGT76G1, GS 융합 효소 및 재조합 AtSUS1의 조합에 의해 촉매화된 루부소사이드로부터의 Reb W의 시험관내 생성을 도시한다. (A-F): 루부소사이드("Rub"), 스테비오사이드("Ste"), 레바우디오사이드 G("Reb G"), 레바우디오사이드 A("Reb A"), 레바우디오사이드 D("Reb D") 및 레바우디오사이드 E("Reb E")의 표준품을 보여준다. 6시간(G), 12시간(I) 및 24시간(K)에 HV1, UGT76G1 및 AtSUS1에 의해 효소로 생성된 Reb W; 6시간(H), 12시간(J) 및 24시간(L)에 HV1 및 GS 융합 단백질에 의해 효소로 생성된 Reb W.

도 14는 재조합 EUGT11 폴리펩타이드, 재조합 UGT76G1, GS 융합 효소 및 재조합 AtSUS1의 조합에 의해 촉매화된 루부소사이드로부터의 Reb W의 시험관내 생성을 도시한다. (A-E): 루부소사이드("Rub"), 스테비오사이드("Ste"), 레바우디오사이드 G("Reb G"), 레바우디오사이드 E("Reb E") 및 레바우디오사이드 D("Reb D")의 표준품을 보여준다. 12시간(F) 및 48시간(H)에 EUGT11, UGT76G1 및 AtSUS1에 의해 효소로 생성된 Reb W; 12시간(G) 및 48시간(I)에 EUGT11 및 GS 융합 단백질에 의해 효소로 생성된 Reb W.

도 15는 재조합 HV1 폴리펩타이드, 재조합 UGT76G1, GS 융합 효소 및 재조합 AtSUS1의 조합에 의해 촉매화된 Reb G로부터의 Reb W의 시험관내 생성을 도시한다. A-D는 레바우디오사이드 G("Reb G"), 레바우디오사이드 A("Reb A"), 레바우디오사이드 D("Reb D"), 레바우디오사이드 및 레바우디오사이드 E("Reb E")의 표준품을 보여준다. 6시간(E), 12시간(G) 및 36시간(I)에 HV1, UGT76G1 및 AtSUS1에 의해 효소로 생성된 Reb V 및 Reb W; 6시간(F), 12시간(H) 및 36시간(J)에 HV1 및 GS 융합 단백질에 의해 효소로 생성된 Reb V 및 Reb W.

도 16은 재조합 EUGT11 폴리펩타이드, 재조합 UGT76G1, GS 융합 효소 및 재조합 AtSUS1의 조합에 의해 촉매화된 Reb G로부터의 Reb W의 시험관내 생성을 도시한다. (A-D): 레바우디오사이드 G("Reb G"), 레바우디오사이드 A("Reb A"), 레바우디오사이드 E("Reb E") 및 레바우디오사이드 D("Reb D")의 표준품을 보여준다. 12시간 (E)

및 48시간(G)에 EUGT11, UGT76G1 및 AtSUS1에 의해 효소로 생성된 Reb W; 12시간 (F) 및 48시간(H)에 EUGT11 및 GS 융합 단백질에 의해 효소로 생성된 Reb W.

도 17은 Reb V 및 Reb G의 구조를 도시한다.

도 18은 Reb V의 중요한 TOCSY 및 HMBC 상관관계를 도시한다.

도 19는 Reb W 및 Reb V의 구조를 도시한다.

도 20은 Reb W의 중요한 TOCSY 및 HMBC 상관관계를 도시한다.

도 21은 스테비올 글라이코사이드의 생합성 경로를 도시한다.

도 22는 UGT76G1 및 GS 융합 효소에 의해 촉매화된 Reb D로부터의 Reb M의 시험관내 생성을 도시한다. (A-B): 레바우디오사이드 D("Reb D") 및 레바우디오사이드 M("Reb M) 표준품의 HPLC 보유 시간을 보여준다. 3시간(C) 및 6시간(F)에 UGT76G1 단독에 의한 효소 반응; 3시간(D) 및 6시간(G)에 UGT-SUS(UGT76G1-AtSUS1) 커플링 시스템에 의한 효소 반응; 3시간(E) 및 6시간(H)에 GS 융합 효소에 의한 효소 반응.

도 23은 UGT76G1 및 GS 융합 효소에 의해 촉매화된 Reb E로부터의 Reb D 및 Reb M의 시험관내 생성을 도시한다. (A-C): 레바우디오사이드 E("Reb E"), 레바우디오사이드 D("Reb D") 및 레바우디오사이드 M("Reb M) 표준품의 HPLC 보유 시간을 보여준다. 3시간(D), 12시간(G) 및 24시간(J)에 UGT76G1 단독에 의한 효소 반응; 3시간(E), 12시간(H) 및 24시간(K)에 UGT-SUS(UGT76G1-AtSUS1) 커플링 시스템에 의한 효소 반응; 3시간(F), 12시간(I) 및 24시간(L)에 GS 융합 효소에 의한 효소 반응.

도 24는 재조합 HV1, 재조합 UGT76G1, GS 융합 효소 및/또는 재조합 AtSUS1의 조합에 의해 촉매화된 스테비오사이드로부터의 Reb D 및 Reb M의 시험관내 생성을 도시한다. (A-D): 스테비오사이드("Ste"), 레바우디오사이드 A("Reb A"), 레바우디오사이드 D("Reb D") 및 레바우디오사이드 M("Reb M) 표준품의 HPLC 보유 시간을 보여준다. 6시간(E), 12시간(H) 및 24시간(K)에 UGT-SUS 커플링 시스템에서 HV1 및 UGT76G1에 의한 효소 반응; 6시간(F), 12시간(I) 및 24시간(L)에 HV1 및 GS 융합 효소에 의한 효소 반응. 6시간(G), 12시간(J) 및 24시간(M)에 UGT76G1 및 HV1에 의한 효소 반응.

도 25는 재조합 HV1, 재조합 UGT76G1, GS 융합 효소 및/또는 재조합 AtSUS1의 조합에 의해 촉매화된 레바우디오사이드 A으로부터의 Reb D 및 Reb M의 시험관내 생성을 도시한다. (A-C): 레바우디오사이드 A("Reb A"), 레바우디오사이드 D("Reb D") 및 레바우디오사이드 M("Reb M) 표준품의 HPLC 보유 시간을 보여준다. 6시간(D), 12시간(G) 및 24시간(J)에 UGT-SUS 커플링 시스템에서 HV1 및 UGT76G1에 의한 효소 반응; 6시간(E), 12시간(H) 및 24시간(K)에 HV1 및 GS 융합 효소에 의한 효소 반응. 6시간(F), 12시간(I) 및 24시간(J)에 UGT76G1 및 HV1에 의한 효소 반응.

도 26은 Reb M의 구조를 도시한다.

도 27은 Reb M의 중요한 TOCSY 및 HMBC 상관관계를 도시한다.

본 개시내용이 다양한 변형 및 대안적인 형태에 허용되지만, 이의 특정한 실시형태는 도면의 예로서 도시되어 있고, 본 명세서에서 하기 자세히 기재되어 있다. 그러나, 특정한 실시형태의 설명이 첨부된 청구항에 의해 정의된 바대로 본 개시내용의 정신 및 범위 내에 해당하는 모든 변형, 균등물 및 대안을 다루도록 본 개시내용을 제한하도록 의도되지 않는 것으로 이해되어야 한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 달리 정의되지 않은 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 개시내용이 속하는 당해 분야의 당업자가 흔히 이해하는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료가 본 개시내용의 실행 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 바람직한 재료 및 방법이 하기 기재되어 있다.

[0059] 용어 "상보성"은 당해 분야의 당업자가 이해하는 바와 같은 이의 일상적이고 관습적인 의미에 따라 사용되고, 서로에 하이브리드화할 수 있는 뉴클레오타이드 염기 사이의 관계를 기재하도록 제한 없이 사용된다. 예를 들어, DNA와 관련하여, 아데노신은 타이민에 상보성이고, 사이토신은 구아닌에 상보성이다. 따라서, 해당 기술은 동반된 서열 목록에 보고된 바와 같은 완전한 서열, 및 실질적으로 유사한 핵산 서열에 상보성인 단리된 핵산 단편을 또한 포함한다.

[0060] 용어 "핵산" 및 "뉴클레오타이드"는 당해 분야의 당업자가 이해하는 바와 같은 이의 각각의 일상적이고 관습적

인 의미에 따라 사용되고, 제한 없이 단일 또는 이중 가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 및 이들의 중간체를 의미하도록 사용된다. 구체적으로 언급되지 않은 한, 상기 용어는 기준 핵산과 유사한 결합 특성을 가지고 천연 발생 뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오타이드의 공지된 유사체를 함유하는 핵산을 포함한다. 달리 표시되지 않은 한, 특정한 핵산 서열은 이의 보존적으로 변형된 또는 축퇴성 변이체(예를 들어, 축퇴성 코돈 치환) 및 상보성 서열, 및 명확히 표시된 서열을 또한 암시적으로 포함한다.

[0061] 용어 "단리된"은 당해 분야의 당업자가 이해하는 바와 같은 이의 일상적이고 관습적인 의미에 따라 사용되고, 단리된 핵산 또는 단리된 폴리펩타이드의 맥락에서 사용될 때, 사람의 손에 의해 이의 네이티브 환경에서 벗어나 존재하고 따라서 천연의 생성물이 아닌 핵산 또는 폴리펩타이드를 의미하도록 사용된다. 단리된 핵산 또는 폴리펩타이드는 정제된 형태로 존재할 수 있거나, 비네이티브 환경에서, 예컨대 형질전환 숙주 세포 등에서 존재할 수 있다.

[0062] 용어 "항온처리하는" 및 "항온처리"는, 본 명세서에 사용된 바대로, 2개 이상의 화학적 또는 생물학적 집합체(예컨대, 화학 화합물 및 효소)의 혼합 및 스테비올 글라이코사이드 조성물을 생성하기에 양호한 조건 하에 이들이 상호작용하게 하는 것의 과정을 의미한다.

[0063] 용어 "축퇴성 변이체"는 하나 이상의 축퇴성 코돈 치환에 의해 기준 핵산 서열과 다른 잔기 서열을 가지는 핵산 서열을 의미한다. 축퇴성 코돈 치환은 하나 이상의 선택된(또는 모든) 코돈의 제3 위치가 혼합 염기 및/또는 데옥시이노신 잔기에 의해 치환된 서열을 생성함으로써 달성될 수 있다. 핵산 서열 및 이의 축퇴성 변이체의 전부는 동일한 아미노산 또는 폴리펩타이드를 발현할 것이다.

[0064] 용어 "폴리펩타이드", "단백질" 및 "펩타이드"는 당해 분야의 당업자가 이해하는 바와 같은 이의 각각의 일상적이고 관습적인 의미에 따라 사용되고; 3개의 용어는 때때로 상호 교환되어 사용되고, 제한 없이 이의 크기 또는 기능과 무관하게 아미노산의 중간체 또는 아미노산 유사체를 의미하도록 사용된다. "단백질"이 대개 비교적 큰 폴리펩타이드의 언급에서 사용되고, "펩타이드"가 대개 작은 폴리펩타이드의 언급에서 사용되지만, 이들 용어의 사용은 당해 분야에서 겹치고 변한다. 용어 "폴리펩타이드"는, 본 명세서에 사용된 바대로, 달리 표시되지 않은 한, 펩타이드, 폴리펩타이드 및 단백질을 의미한다. 용어 "단백질", "폴리펩타이드" 및 "펩타이드"는 폴리뉴클레오타이드 생성물을 언급할 때 본 명세서에서 상호 교환되어 사용된다. 따라서, 예시적인 폴리펩타이드는 폴리뉴클레오타이드 생성물, 천연 발생 단백질, 동족체, 오솔로그(ortholog), 파라로그(paralog), 단편 및 상기의 다른 균등물, 변이체 및 유사체를 포함한다.

[0065] 용어 "폴리펩타이드 단편" 및 "단편"은, 기준 폴리펩타이드의 언급 시 사용될 때, 당해 분야의 당업자에 대한 이의 일상적이고 관습적인 의미에 따라 사용되고, 제한 없이 아미노산 잔기가 기준 폴리펩타이드 자체와 비교하여 결실되지만, 남은 아미노산 서열이 기준 폴리펩타이드에서의 상응하는 위치와 보통 동일한 폴리펩타이드를 의미하도록 사용된다. 이러한 결실은 기준 폴리펩타이드의 아미노 말단 또는 카복시 말단, 또는 대안적으로 둘 다에서 발생할 수 있다.

[0066] 용어 폴리펩타이드 또는 단백질의 "기능적 단편"은 전장 폴리펩타이드 또는 단백질의 일부이고, 실질적으로 동일한 생물학적 활성을 가지거나, 전장 폴리펩타이드 또는 단백질과 실질적으로 동일한 기능을 수행(예를 들어, 동일한 효소 반응으르 수행)하는 펩타이드 단편을 의미한다.

[0067] 상호 교환되어 사용되는 용어 "변이체 폴리펩타이드", "변형된 아미노산 서열" 또는 "변형된 폴리펩타이드"는 하나 이상의 아미노산에 의해, 예를 들어 하나 이상의 아미노산 치환, 결실 및/또는 추가에 의해 기준 폴리펩타이드와 다른 아미노산 서열을 의미한다. 일 양태에서, 변이체는 기준 폴리펩타이드의 능력 중 일부 또는 전부를 보유하는 "기능적 변이체"이다.

[0068] 용어 "기능적 변이체"는 보존적으로 치환된 변이체를 추가로 포함한다. 용어 "보존적으로 치환된 변이체"는 기준 펩타이드와 하나 이상의 보존적 아미노산 치환에 의해 다르고, 기준 펩타이드의 활성의 일부 또는 전부를 보유하는 아미노산 서열을 가지는 펩타이드를 의미한다. "보존적 아미노산 치환"은 기능적으로 유사한 잔기에 의한 아미노산 잔기의 치환이다. 보존적 치환의 예는 하나의 비극성(소수성) 잔기, 예컨대 아이소류신, 발린, 류신 또는 메티오닌의 또 다른 것에 대한 치환; 하나의 하전 또는 극성(친수성) 잔기의 또 다른 것, 예컨대 아르기닌과 라이신 사이, 글루타민과 아스파라긴 사이, 트레오닌과 세린 사이의 치환; 하나의 염기성 잔기, 예컨대 라이신 또는 아르기닌의 또 다른 것에 대한 치환; 또는 하나의 산성 잔기, 예컨대 아스파르트산 또는 글루탐산의 또 다른 것에 대한 치환; 또는 하나의 방향족 잔기, 예컨대 페닐알리닌, 타이로신, 또는 트립토판의 또 다른

것에 대한 치환을 포함한다. 이러한 치환은 단백질 또는 폴리펩타이드의 겉보기 분자량 또는 등전점에 적은 영향을 가지거나 가지지 않는 것으로 예상된다. 구절 "보존적으로 치환된 변이체"는 또한 화학적으로 유도체화된 잔기에 의해 잔기가 대체된 펩타이드를 포함하되, 단 생성된 펩타이드는 본 명세서에 기재된 바와 같은 기준 펩타이드의 활성의 일부 또는 전부를 유지한다.

[0069] 용어 "변이체"는, 해당 기술의 폴리펩타이드와 연관되어, 기준 폴리펩타이드의 아미노산 서열과 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 및 심지어 100% 동일한 아미노산 서열을 가지는 기능적 활성 폴리펩타이드를 추가로 포함한다.

[0070] 용어 "상동성"은, 모든 이의 문법 형태 및 스펠링 변형에서, 슈퍼패밀리로부터의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 및 상이한 종으로부터의 상동성 폴리뉴클레오타이드 또는 단백질을 포함하는, "일반 진화 기원"을 부여하는, 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 사이의 관계를 의미한다(Reeck et al., Cell 50:667, 1987). 이러한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 보존된 위치에서의 특정한 아미노산 또는 모티프의 존재의 면이든 또는 동일성 백분율의 면이든 이의 서열 유사성에 의해 반영된 바대로 서열 상동성을 가진다. 예를 들어, 2개의 상동성 폴리펩타이드는 적어도 75%, 적어도 76%, 적어도 77%, 적어도 78%, 적어도 79%, 적어도 80%, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 및 심지어 100% 동일한 아미노산 서열을 가질 수 있다.

[0071] "아미노산 서열 동일성 백분율(%)"은, 해당 기술의 변이체 폴리펩타이드 서열과 관련하여, 최대 서열 동일성 백분율을 달성하기 위해, 서열 동일성의 일부로서 임의의 보존적 치환을 고려하지 않고, 서열을 정렬하고 필요한 경우 갭을 도입한 후 기준 폴리펩타이드의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열에서의 아미노산 잔기의 백분율을 의미한다.

[0072] 아미노산 서열 동일성 백분율을 결정할 목적을 위한 정렬은 예를 들어 공중에게 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 또는 Megalign(DNASTAR) 소프트웨어를 사용하여 당해 분야의 기술 내에 있는 다양한 방식으로 달성될 수 있다. 당해 분야의 당업자는 비교되는 서열의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여 정렬을 측정하기 위한 적절한 매개변수를 결정할 수 있다. 예를 들어, % 아미노산 서열 동일성은 서열 비교 프로그램 NCBI-BLAST2를 사용하여 결정될 수 있다. NCBI-BLAST2 서열 비교 프로그램은 ncbi.nlm.nih.gov.로부터 다운로드될 수 있다. NCBI BLAST2는 몇몇 조사 매개변수를 사용하고, 이 조사 매개변수의 전부는 예를 들어 마스킹 없이 예, 스트랜드 = 전부, 예상 발생 10, 최소 낮은 복잡성 길이 = 15/5, 다중 통과 e-값 = 0.01, 다중 통과의 상수 = 25, 최종 갭핑된 정렬의 드랍오프 = 25 및 스코어링 매트릭스 = BLOSUM62를 포함하는 디폴트 값으로 설정된다. NCBI-BLAST2가 아미노산 서열 비교에 사용되는 상황에서, 소정의 아미노산 서열 B와, 이것에 의해 또는 이것에 대항하여 소정의 아미노산 서열 A의 % 아미노산 서열 동일성(소정의 아미노산 서열 B와, 이것에 의해 또는 이것에 대항하여 소정의 % 아미노산 서열 동일성을 가지거나 함유하는 소정의 아미노산 서열 A로서 대안적으로 표현될 수 있음)은 하기와 같이 계산된다: X/Y 비율의 100배(여기서, X는 A 및 B의 이 프로그램의 정렬에서 서열 정렬 프로그램 NCBI-BLAST2에 의한 동일한 일치로 기록된 아미노산 잔기의 수이고, Y는 B에서의 아미노산 잔기의 전체 수임). 아미노산 서열 A의 길이가 아미노산 서열 B의 길이와 동일하지 않은 경우, B에 대한 A의 % 아미노산 서열 동일성은 A에 대한 B의 % 아미노산 서열 동일성과 동일하지 않는 것으로 이해될 것이다.

[0073] 이런 의미에서, 아미노산 서열 "유사성"을 결정하기 위한 기법은 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 일반적으로, "유사성"은 적절한 위치에서의 2개 이상의 폴리펩타이드의 아미노산 비교와 정확한 아미노산을 의미하고, 여기서 아미노산은 동일하거나, 유사한 화학적 및/또는 물리적 특성, 예컨대 전하 또는 소수화도를 보유한다. 소위 "유사성 백분율"은 이후 비교된 폴리펩타이드 서열 사이에 결정될 수 있다. 핵산 및 아미노산 서열 동일성을 결정하기 위한 기법은 또한 당해 분야에 널리 공지되어 있고, (보통 cDNA 중간체를 통해) 그 유전자에 대한 mRNA의 뉴클레오타이드 서열을 결정하는 것 및 이것 내에 코딩된 아미노산 서열을 결정하는 것, 및 이것을 제2 아미노산 서열과 비교하는 것을 포함한다. 일반적으로, "동일성"은 각각 2개의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열의 정확한 뉴클레오타이드 대 뉴클레오타이드 또는 아미노산 대 아미노산 연관성을 의미한다. 2개 이상의 폴리뉴클레오타이드 서열은 2개 이상의 아미노산 서열에서처럼 이들의 "동일성 백분율"을 결정함으로써 비교될 수 있다. 위스콘신 서열 분석 패키지(Wisconsin Sequence Analysis Package), 버전 8에서 구입 가능한 프로그램(Genetics Computer Group(위스콘신주 매디슨)으로부터 구입 가능), 예를 들어 GAP 프로그램은 각각 2개의

폴리뉴클레오타이드 사이의 동일성 및 2개의 폴리펩타이드 서열 사이의 동일성 및 유사성 둘 다를 계산할 수 있다. 서열 사이의 동일성 또는 유사성을 계산하기 위한 다른 프로그램은 당해 분야의 당업자에게 공지되어 있다.

[0074] 기준 위치에 "상응하는" 아미노산 위치는 아미노산 서열을 정렬함으로써 확인된 바와 같은 기준 서열과 정렬되는 위치를 의미한다. 이러한 정렬은 손에 의해 또는 널리 공지된 서열 정렬 프로그램, 예컨대 ClustalW2, Blast 2 등을 사용함으로써 수행될 수 있다.

[0075] 달리 기재되지 않은 한, 2개의 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 서열의 동일성 백분율은 더 짧은 2개의 서열의 전체 길이에 걸쳐 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드의 백분율을 의미한다.

[0076] "코딩 서열"은 당해 분야의 당업자가 이해하는 바와 같은 이의 일상적이고 관습적인 의미에 따라 사용되고, 제한 없이 특정한 아미노산 서열을 코딩하는 DNA 서열을 의미하도록 사용된다.

[0077] "적합한 조절 서열"은 당해 분야의 당업자가 이해하는 바와 같은 이의 일상적이고 관습적인 의미에 따라 사용되고, 제한 없이 코딩 서열의 상류(5' 비코딩 서열)에, 내에 또는 하류(3' 비코딩 서열)에 위치하고, 연관 코딩 서열의 전사, RNA 처리 또는 안정성, 또는 번역에 영향을 미치는, 뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 조절 서열은 프로모터, 번역 리더 서열, 인트론 및 폴리아데닐화 인식 서열을 포함할 수 있다.

[0078] "프로모터"는 당해 분야의 당업자가 이해하는 바와 같은 이의 일상적이고 관습적인 의미에 따라 사용되고, 제한 없이 코딩 서열 또는 기능적 RNA의 발현을 제어할 수 있는 DNA 서열을 의미한다. 일반적으로, 코딩 서열은 프로모터 서열의 3'에 위치한다. 프로모터가 이의 전부가 네이티브 유전자로부터 유래하거나, 자연에서 발견된 상이한 프로모터로부터 유래한 상이한 구성요소로 이루어지거나, 심지어 합성 DNA 분절을 포함할 수 있다. 상이한 프로모터가 상이한 세포 유형에서, 또는 상이한 발생 단계에서, 또는 상이한 환경 조건에 반응하여 유전자의 발현을 지시할 수 있다는 것이 당해 분야의 당업자에 의해 이해된다. 대부분의 시기에 대부분의 세포 유형에서 유전자가 발현되게 하는 프로모터는 "구성적 프로모터"라 흔히 칭해진다. 대부분의 경우에 조절 서열의 정확한 경계가 완전히 규정되지 않았으므로, 상이한 길이의 DNA 단편이 동일한 프로모터 활성을 가질 수 있는 것으로 추가로 인식된다.

[0079] 용어 "작동적으로 연결된"은 하나의 기능이 다른 것에 의해 영향을 받도록 단일 핵산 단편에서의 핵산 서열의 회합을 의미한다. 예를 들어, 프로모터는 그 코딩 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있을 때(즉, 그 코딩 서열은 프로모터의 전사 제어 하에 있음) 코딩 서열과 작동적으로 연결된다. 코딩 서열은 센스 배향 또는 안티센스 배향에서 조절 서열에 작동적으로 연결될 수 있다.

[0080] 용어 "발현"은, 본 명세서에 사용된 바대로, 당해 분야의 당업자가 이해하는 바와 같은 이의 일상적이고 관습적인 의미에 따라 사용되고, 제한 없이 당해 기술의 핵산 단편으로부터 유래한 센스 RNA(mRNA) 또는 안티센스 RNA의 전사 및 안정한 축적을 의미하도록 사용된다. "과발현"은 일반 유기체 또는 비형질전환된 유기체에서 생성의 수준을 넘는 형질전환 또는 재조합 유기체에서의 유전자 생성물의 생성을 의미한다.

[0081] "형질전환"은 당해 분야의 당업자가 이해하는 바와 같은 이의 일상적이고 관습적인 의미에 따라 사용되고, 제한 없이 표적 세포로의 폴리뉴클레오타이드의 전달을 의미하도록 사용된다. 전달된 폴리뉴클레오타이드는 표적 세포의 게놈 또는 염색체 DNA로 혼입되어서, 유전적으로 안정한 유전을 생성시킬 수 있거나, 이것은 숙주 염색체와 독립적으로 복제할 수 있다. 형질전환된 핵산 단편을 함유하는 숙주 유기체는 "형질전환" 또는 "재조합" 또는 "형질전환된" 유기체라 칭해진다.

[0082] 용어 "형질전환된", "형질전환" 및 "재조합"은, 숙주 세포와 연결되어 본 명세서에 사용될 때, 당해 분야의 당업자가 이해하는 바와 같은 이의 일상적이고 관습적인 의미에 따라 사용되고, 제한 없이 비상동성 핵산 분자가 도입된 숙주 유기체의 세포, 예컨대 식물 또는 미생물 세포를 의미한다. 핵산 분자는 숙주 세포의 게놈으로 안정하게 통합될 수 있거나, 핵산 분자는 염색체외 분자로서 존재할 수 있다. 이러한 염색체외 분자는 자가 복제할 수 있다. 형질전환된 세포, 조직 또는 대상체는 형질전환 과정의 최종 생성물뿐만 아니라 이의 형질전환 자손을 포함하는 것으로 이해된다.

[0083] 용어 "재조합", "비상동성" 및 "외인성"은, 폴리뉴클레오타이드과 연결되어 본 명세서에 사용될 때, 당해 분야의 당업자가 이해하는 바와 같은 이의 일상적이고 관습적인 의미에 따라 사용되고, 제한 없이, 특정한 숙주 세포에 대해 외래인 공급원 유래인, 또는 동일한 공급원 유래인 경우에는, 이의 원래 형태로부터 변형된, 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, DNA 서열 또는 유전자)를 의미하도록 사용된다. 따라서, 숙주 세포에서의 비상동성 유전자는 특정한 숙주 세포에 외인성이지만 예를 들어 부위 지정 돌연변이유발 또는 다른 재조합 기법의 사용을 통해 변형된 유전자를 포함한다. 상기 용어는 또한 천연 발생 DNA 서열의 비천연 발생의 다수의 카피를 포함한

다. 따라서, 상기 용어는, 세포에 외래 또는 비상동성인, 또는 구성요소가 원래 발견되지 않는 숙주 세포 내에 위치 또는 형태에서가 아니라 세포에 상동성인 DNA 분절을 의미한다.

[0084] 유사하게, 용어 "재조합", "비상동성" 및 "외인성"은, 폴리펩타이드 또는 아미노산 서열과 연결되어 본 명세서에 사용될 때, 특정한 숙주 세포에 대해 외래인 공급원 유래인, 또는 동일한 공급원 유래인 경우에는, 이의 원래 형태로부터 변형된, 폴리펩타이드 또는 아미노산 서열을 의미한다. 따라서, 재조합 DNA 분절은 재조합 폴리펩타이드를 생성하기 위해 숙주 세포에서 발현될 수 있다.

[0085] 용어 "플라스미드", "벡터" 및 "카세트"는 당해 분야의 당업자가 이해하는 바와 같은 이의 일상적이고 관습적인 의미에 따라 사용되고, 제한 없이, 보통 원형 이중 가닥 DNA 분자의 형태인, 세포의 중추 대사의 일부가 아닌 유전자를 대개 보유하는 염색체외 구성요소를 의미하도록 사용된다. 이러한 구성요소는 자동 복제 서열, 게놈 통합 서열, 파지 또는 뉴클레오타이드 서열, 임의의 공급원 유래의 선형 또는 환형의 단일 또는 이중 가닥 DNA 또는 RNA(여기서, 뉴클레오타이드 서열의 수는 선택된 유전자 생성물에 대한 프로모터 단편 및 DNA 서열을 적절한 3' 비번역 서열과 함께 세포로 도입할 수 있는, 독특한 구성으로 합쳐지거나 재조합됨)일 수 있다. "형질전환 카세트"는 외래 유전자를 함유하고 특정한 숙주 세포의 형질전환을 수월하게 하는 외래 유전자 이외의 구성요소를 가지는 특정한 벡터를 의미한다. "발현 카세트"는 외래 유전자를 함유하고 외래 숙주에서 그 유전자의 발현 증대를 허용하는 외래 유전자 이외의 구성요소를 가지는 특정한 벡터를 의미한다.

[0086] 본 명세서에 사용된 표준 재조합 DNA 및 분자 클로닝 기법은 당해 분야에 널리 공지되어 있고, 예를 들어 문헌[Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 (hereinafter "Maniatis")]; 및 문헌[Silhavy, T. J., Bennan, M. L. and Enquist, L. W. Experiments with Gene Fusions; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N.Y., 1984; 및 Ausubel, F. M. et al., In Current Protocols in Molecular Biology, 발행(Greene Publishing and Wiley-Interscience), 1987](이들 각각의 전체내용은 이것이 본원과 일치하는 정도로 참고로 본 명세서에서 본원에 포함됨)에 의해 기재되어 있다.

[0087] 본 명세서에 사용된 바대로, "합성" 또는 "유기적으로 합성된" 또는 "화학적으로 합성된" 또는 "유기적으로 합성" 또는 "화학적으로 합성" 또는 "유기 합성" 또는 "화학 합성"은 일련의 화학 반응을 통한 화합물의 제조를 의미하도록 사용되고; 이것은 예를 들어 천연 공급원으로부터 화합물을 추출하는 것을 포함하지 않는다.

[0088] 용어 "경구 소모성 제품"은, 본 명세서에 사용된 바대로, 입으로 취해지고 후속하여 입으로부터 나오는 물질 및 마시거나 먹거나 삼키거나 달리 섭취하는 물질을 포함하여, 사람 또는 동물의 입과 접촉하고; 일반적으로 허용 가능한 범위의 농도에서 사용될 때 인간 또는 동물 소비에 안전한, 임의의 음료, 식품 제품, 식이 보충제, 영향학적, 약제학적, 조성물, 치과 위생 조성물 및 화장품을 의미한다.

[0089] 용어 "식품 제품"은, 본 명세서에 사용된 바대로, 과일, 야채, 주스, 육류 제품, 예컨대 햄, 베이컨 및 소시지; 난제품, 과일 농축물질, 젤라틴 및 젤라틴 유사 제품, 예컨대 잼, 젤리, 프리서브 등; 유제품, 예컨대 아이스크림, 사워 크림, 요거트 및 셔벗; 당제품, 당밀을 포함하는 시럽; 옥수수, 밀, 호밀, 대두, 귀리, 쌀 및 보리 제품, 시리얼 제품, 견과 살 및 견과 제품, 케이크, 쿠키, 과자류, 예컨대 캔디, 검, 과일 가향 알사탕, 및 초코릿, 츄잉 검, 민트, 크림, 당제품, 아이스크림, 파이 및 빵을 의미한다. "식품 제품"은 또한 조미료, 예컨대 허브, 향신료 및 양념, 화학 조미료, 예컨대 모노나트륨 글루타메이트를 의미한다. "식품 제품"은 추가로, 물과 재구성 시 비탄산 드링크, 인스턴트 푸딩 믹스, 인스턴트 커피 및 차, 커피 화이트너, 몰트 밀크 믹스, 애완동물 사료, 가축 사료, 담배, 및 제빵 분야를 위한 재료, 예컨대 빵, 쿠키, 케이크, 팬케이크, 도넛 등의 제조를 위한 분말 베이킹 믹스를 제공하는, 준비된 포장 제품, 예컨대 식이성 감미료, 액체 감미료, 테이블탑 착향료, 과립 향 믹스를 또한 포함하는 것을 의미한다. "식품 제품"은 또한 수크로스를 적게 함유하거나 가지지 않는 식이 또는 저칼로리 식품 및 음료를 의미한다.

[0090] 본 명세서에 사용된 바대로, 용어 "입체이성질체"는 공간에서의 이의 원자의 배열이 오직 다른 개별 분자의 모든 이성질체에 대한 일반 용어이다. "입체이성질체"는 거울상이성질체 및 서로와 거울상이 아닌 하나 초과의 키랄 중심을 가지는 화합물의 이성질체(부분입체이성질체)를 포함한다.

[0091] 본 명세서에 사용된 바대로, 용어 "비결정질 레바우디오사이드 V"는 레바우디오사이드 V의 비결정질 고체 형태를 의미한다. 본 명세서에 사용된 바대로, 용어 "비결정질 레바우디오사이드 W"는 레바우디오사이드 W의 비결정질 고체 형태를 의미한다.

[0092] 본 명세서에 사용된 바대로, 용어 "당도 강도"는 개체, 예를 들어 인간이 관찰하거나 경험한 단맛 감각의 상대

강도, 또는 예를 들어 브릭스(Brix) 스케일에서 테이스터에 의해 검출된 당도의 정도 또는 양을 의미한다.

[0093] 본 명세서에 사용된 바대로, 용어 "당도의 증대"는 레바우디오사이드 V 및/또는 레바우디오사이드 W를 함유하지 않는 상응하는 경구 소모성 제품과 비교하여 이의 성질 또는 품질을 변경하지 않으면서 본 개시내용의 음료 제품 또는 소모성 제품의 하나 이상의 당도 특징의 감각 인지를 증가시키고/시키거나, 증대시키고/시키거나, 강화시키고/시키거나, 강조하고/하거나, 확대시키고/시키거나, 강력하게 한다는 점에서 레바우디오사이드 V 및/또는 레바우디오사이드 W의 효과를 의미한다.

[0094] 본 명세서에 사용된 바대로, 용어 "오프-테이스트(off-taste)(들)"는 본 개시내용의 음료 제품 또는 소모성 제품에서 특징적으로 또는 보통 발견되지 않는 맛의 양 또는 정도를 의미한다. 예를 들어, 오프-테이스트는 소비자에게 대한 감미 소모성 제품의 바람직하지 않은 맛, 예컨대 쓴맛, 감초 유사 맛, 금속성 맛, 혐오적 맛, 수렴제 맛, 지연 당도 발생, 오래 가는 달은 뒷맛 등이다.

[0095] 본 명세서에 사용된 바대로, 용어 "w/v-%"는 이러한 화합물을 함유하는 본 개시내용의 액체 경구 소모성 제품의 매 100㎖당 (그램 단위의) 화합물, 예컨대 당의 중량을 의미한다. 본 명세서에 사용된 바대로, 용어 "w/w-%"는 이러한 화합물을 함유하는 본 개시내용의 경구 소모성 제품의 매 그램당 (그램 단위의) 화합물, 예컨대 당의 중량을 의미한다.

[0096] 본 명세서에 사용된 바대로, 용어 "ppm"은 중량 기준으로, 예를 들어 이러한 화합물을 함유하는 본 개시내용의 경구 소모성 제품의 킬로그램당 화합물, 예컨대 레바우디오사이드 V 및/또는 레바우디오사이드 W(밀리그램 단위)의 중량(즉, mg/kg) 또는 이러한 화합물을 함유하는 본 개시내용의 경구 소모성 제품의 리터당 화합물, 예컨대 레바우디오사이드 V 및/또는 레바우디오사이드 W(밀리그램 단위)의 중량(즉, mg/ℓ); 또는 용적 기준으로, 예를 들어 이러한 화합물을 함유하는 본 개시내용의 경구 소모성 제품의 리터당 화합물, 예컨대 레바우디오사이드 V 및/또는 레바우디오사이드 W(밀리리터 단위)의 용적(즉, ㎖/ℓ)의 백만분율(들)을 의미한다.

[0097] 본 개시내용에 따라, 비칼로리 감미료 및 비칼로리 감미료를 합성하는 방법이 개시되어 있다. 또한, 본 개시내용에 따라, 비칼로리 감미료를 제조하기 위한 효소 및 효소를 사용하는 방법이 개시되어 있다.

[0098] 합성 비칼로리 감미료: 합성 레바우디오사이드 V

[0099] 일 양태에서, 본 개시내용은 합성 비칼로리 감미료에 관한 것이다. 합성 비칼로리 감미료는 합성 레바우디오사이드 유형 스테비올 글라이코사이드이고, "레바우디오사이드 V"의 명칭이 제공된다. 레바우디오사이드 V("Reb V")는 아글리콘 스테비올에 연결된 구조에서 4개의 β-D-글루코실 단위를 가지는 스테비올 글라이코사이드이고, 스테비올 아글리콘 모이어티는 에터 연결의 형태의 C-13 위치에서 Glc β1-3-Glc β1 단위 및 에스터 연결의 형태의 C-19 위치에서 또 다른 Glc β1-2-Glc β1 단위를 가진다.

[0100] 레바우디오사이드 V는 광범위한 1D 및 2D NMR, 및 고해상 질량 스펙트럼 데이터 및 가수분해 연구에 기초하여 분자식 $C_{44}H_{70}O_{23}$ 및 13-[(3-*O*-β-D-글루코피라노실-β-D-글루코피라노실)옥시] *엔트*-카우르-16-엔-19-온산-(2-*O*-β-D-글루코피라노실-β-D-글루코피라노실) 에스터의 IUPAC 명칭을 가진다.

[0101] 합성 비칼로리 감미료: 합성 레바우디오사이드 W

[0102] 일 양태에서, 본 개시내용은 합성 비칼로리 감미료에 관한 것이다. 합성 비칼로리 감미료는 합성 레바우디오사이드 유형 스테비올 글라이코사이드이고, "레바우디오사이드 W"의 명칭이 제공된다. 레바우디오사이드 W("Reb W")는 아글리콘 스테비올에 연결된 구조에서 5개의 β-D-글루코실 단위를 가지는 스테비올 글라이코사이드이고, 스테비올 아글리콘 모이어티는 에터 연결의 형태의 C-13 위치에서 Glc β1-3-Glc β1 단위 및 에스터 연결의 형태의 C-19 위치에서 Glc β1-2(Glc β1-3)-Glc β1 단위를 가진다.

[0103] 레바우디오사이드 W는 분자식 $C_{50}H_{80}O_{28}$ 및 13-[(3-*O*-β-D-글루코피라노실-β-D-글루코피라노실)옥시] *엔트*-카우르-16-엔-19-온산-[(2-*O*-β-D-글루코피라노실-3-*O*-β-D-글루코피라노실-β-D-글루코피라노실) 에스터의 IUPAC 명칭을 가진다.

[0104] 합성 비칼로리 감미료: 합성 레바우디오사이드 KA

[0105] 일 양태에서, 본 개시내용은 합성 비칼로리 감미료에 관한 것이다. 합성 비칼로리 감미료는 합성 레바우디오사이드 유형 스테비올 글라이코사이드이고, "레바우디오사이드 KA"의 명칭이 제공된다. 레바우디오사이드 KA("Reb KA")는 아글리콘 스테비올에 연결된 구조에서 3개의 β-D-글루코실 단위를 가지는 스테비올 글라이코사이드이고, 스테비올 아글리콘 모이어티는 에터 연결의 형태의 C-13에서 Glc β1 단위 및 에터 연결의

형태의 C-19에서 Glc β1-2-Glc β1 단위를 가진다. 레바우디오사이드 KA는 광범위한 1D 및 2D NMR, 및 고해상 질량 스펙트럼 데이터 및 가수분해 연구에 기초하여 분자식 $C_{38}H_{60}O_{18}$ 및 13-β-D-글루코피라노실옥시] *엔트*-카우르-16-엔-19-온산-(2-*O*-β-D-글루코피라노실-β-D-글루코피라노실) 에스터의 IUPAC 명칭을 가진다.

[0106] 합성 비칼로리 감미료: 합성 레바우디오사이드 G

[0107] 일 양태에서, 본 개시내용은 합성 비칼로리 감미료에 관한 것이다. 합성 비칼로리 감미료는 합성 레바우디오사이드 유형 스테비올 글라이코사이드이고, "레바우디오사이드 G"의 명칭이 주어진다. 레바우디오사이드 G("Reb G")는 아글리콘 스테비올에 연결된 구조에서 3개의 β-D-글루코실 단위를 가지는 스테비올 글라이코사이드이고, 스테비올 아글리콘 모이어티는 에터 연결의 형태의 C-13에서 Glc β1-3-Glc β1 단위 및 에터 연결의 형태의 C-19에서 Glc β1 단위를 가진다.

[0108] 레바우디오사이드 G는 광범위한 1D 및 2D NMR, 및 고해상 질량 스펙트럼 데이터 및 가수분해 연구에 기초하여 분자식 $C_{38}H_{60}O_{18}$ 및 13-[(3-*O*-β-D-글루코피라노실-β-D-글루코피라노실)옥시] *엔트*-카우르-16-엔-19-온산-β-D-글루코피라노실) 에스터의 IUPAC 명칭을 가진다.

[0109] 합성 비칼로리 감미료: 합성 레바우디오사이드 M

[0110] 일 양태에서, 본 개시내용은 합성 비칼로리 감미료에 관한 것이다. 합성 비칼로리 감미료는 합성 레바우디오사이드 유형 스테비올 글라이코사이드이고, "레바우디오사이드 M"의 명칭이 주어진다. 레바우디오사이드 M("Reb M")은 아글리콘 스테비올에 연결된 구조에서 6개의 β-D-글루코실 단위를 가지는 스테비올 글라이코사이드이고, 스테비올 아글리콘 모이어티는 에터 연결의 형태의 C-13 위치에서 Glc β1-2(Glc β1-3)-Glc β1 단위 및 에스터 연결의 형태의 C-19 위치에서 Glc β1-2(Glc β1-3)-Glc β1 단위를 가진다.

[0111] 레바우디오사이드 M은 광범위한 1D 및 2D NMR, 및 고해상 질량 스펙트럼 데이터 및 가수분해 연구에 기초하여 분자식 $C_{56}H_{90}O_{33}$ 및 13-[(2-*O*-β-D-글루코피라노실-3-*O*-β-D-글루코피라노실-β-D-글루코피라노실)옥시] *엔트*-카우르-16-엔-19-온산-[(2-*O*-β-D-글루코피라노실-3-*O*-β-D-글루코피라노실-β-D-글루코피라노실)에스터의 IUPAC 명칭을 가진다.

[0112] 스테비올 글라이코사이드를 합성하는 방법

[0113] **레바우디오사이드 G로부터 레바우디오사이드 V를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 G로부터 레바우디오사이드 V를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소(SUS)와 함께 또는 이것 없이 레바우디오사이드 G; 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질; 및 HV1 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 V를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 V를 제조하도록 레바우디오사이드 G에 공유 커플링됨)를 포함한다.

[0114] **레바우디오사이드 G로부터 레바우디오사이드 V를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 G로부터 레바우디오사이드 V를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소(SUS)와 함께 또는 이것 없이 레바우디오사이드 G; 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질; EUGT11, UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소(SUS) 융합 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소(UDP-글라이코실전환효소)를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 V를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 V를 제조하도록 레바우디오사이드 G에 공유 커플링됨)를 포함한다.

[0115] **레바우디오사이드 KA로부터 레바우디오사이드 V를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 KA로부터 레바우디오사이드 V를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소(SUS)와 함께 또는 이것 없이 레바우디오사이드 KA; 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질; UDP-글라이코실전환효소(UGT76G1) 및 UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소(UDP-글라이코실전환효소)를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 V를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 V를 제조하도록 레바우디오사이드 KA에 공유 커플링됨)를 포함한다.

[0116] **루부소사이드로부터 레바우디오사이드 V를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 V를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소(SUS)와 함께 또는 이것 없이 루부소사이드; 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질; UDP-글라이코실전환효소(UGT76G1), HV1 및 UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소(들)(UDP-글라이코실전환효소)를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 V를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 KA를 제조하도록 루부소사이드에 공유 커플링됨)를 포함한다. 계속해서, 글루코스는 레바우디오사이드 V를 제조하도록 레바우디오사이드 KA에 공유 커플링된다.

[0117] **루부소사이드로부터 레바우디오사이드 V를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 A와 레바우디오사이드 V의 혼합물을 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 루부소사이드; 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질; UDP-글라이코실전환효소(UGT76G1), EUGT11 및 UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소(들)(UDP-글라이코실전환효소)를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 V를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 KA를 제조하도록 루부소사이드에 공유 커플링하고, 글루코스는 레바우디오사이드 V를 제조하도록 레바우디오사이드 KA에 공유 커플링됨)를 포함한다. 글루코스는 레바우디오사이드 G를 제조하도록 루부소사이드에 공유 커플링된다. 계속해서, 글루코스는 레바우디오사이드 V를 제조하도록 레바우디오사이드 G에 공유 커플링된다.

[0118] **레바우디오사이드 V로부터 레바우디오사이드 W를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 V로부터 레바우디오사이드 W를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 레바우디오사이드 V; 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질; UDP-글라이코실전환효소(UGT76G1) 및 UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소(UDP-글라이코실전환효소)를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 W를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 W를 제조하도록 레바우디오사이드 V에 공유 커플링함)를 포함한다.

[0119] **레바우디오사이드 G로부터 레바우디오사이드 W를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 G로부터 레바우디오사이드 W를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 레바우디오사이드 G; 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질; 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소(UGT76G1), UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소 및 HV1로 이루어진 군으로부터 선택된 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소(UDP-글라이코실전환효소)를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 W를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 HV1에 의해 레바우디오사이드 V를 제조하도록 레바우디오사이드 G에 공유 커플링됨)를 포함한다. 계속해서, 글루코스는 UGT76G1에 의해 레바우디오사이드 W를 제조하도록 레바우디오사이드 V에 공유 커플링된다.

[0120] **레바우디오사이드 G로부터 레바우디오사이드 W를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 G로부터 레바우디오사이드 W를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 레바우디오사이드 G; 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질; UGT76G1, EUGT11 및 UDP- 글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소(UDP-글라이코실전환효소)를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 W를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 EUGT11에 의해 레바우디오사이드 V를 제조하도록 레바우디오사이드 G에 공유 커플링됨)를 포함한다. 계속해서, 글루코스는 UGT76G1에 의해 레바우디오사이드 W를 제조하도록 레바우디오사이드 V에 공유 커플링된다.

[0121] **레바우디오사이드 KA로부터 레바우디오사이드 W를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 KA로부터 레바우디오사이드 W를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 레바우디오사이드 KA; 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질; 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소(UGT76G1) 및 UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 유리딘 다이포스포 글라이

코실전환효소(UDP-글라이코실전환효소)를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 W를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 V를 제조하도록 레바우디오사이드 KA에 공유 커플링됨)를 포함한다. 계속해서, 글루코스는 레바우디오사이드 W를 제조하도록 레바우디오사이드 V에 공유 커플링한다.

[0122] **루부소사이드로부터 레바우디오사이드 W를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 W를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 루부소사이드; 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질; UGT76G1, HV1 및 UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 W의 혼합물을 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계를 포함한다.

[0123] **루부소사이드로부터 레바우디오사이드 W를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 W를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 루부소사이드; 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질; UGT76G1, EUGT11 및 UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 W를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계를 포함한다.

[0124] **루부소사이드로부터 스테비오사이드와 레바우디오사이드 KA의 혼합물을 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 루부소사이드로부터 스테비오사이드와 레바우디오사이드 KA의 혼합물을 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 루부소사이드; 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질; EUGT11 및 UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 스테비오사이드와 레바우디오사이드 KA의 혼합물을 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 KA를 제조하도록 루부소사이드의 C2'-19-O-글루코스에 공유 커플링되고; 글루코스는 스테비오사이드를 제조하도록 루부소사이드의 C2'-13-O-글루코스에 공유 커플링됨)를 포함한다.

[0125] **루부소사이드로부터 레바우디오사이드 KA를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 KA를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 루부소사이드; 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질; 및 HV1 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 KA를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 KA를 제조하도록 루부소사이드의 C2'-19-O-글루코스에 공유 커플링됨)를 포함한다.

[0126] **루부소사이드로부터 레바우디오사이드 G를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 G를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 루부소사이드; 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질; UGT76G1 및 UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 G를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 G를 제조하도록 루부소사이드의 C3'-13-O-글루코스에 공유 커플링됨)를 포함한다.

[0127] **레바우디오사이드 KA로부터 레바우디오사이드 E를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 KA로부터 레바우디오사이드 E를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 레바우디오사이드 KA; 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질; 및 HV1 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 E를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 E를 제조하도록 레바우디오사이드 KA의 C2' 13-O-글루코스에 공유 커플링됨)를 포함한다.

[0128] **레바우디오사이드 KA로부터 레바우디오사이드 E를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 KA로부터 레바우디오사이드 E를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 레바우디오사이드 KA; 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코

스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질; EUGT11 및 UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소의 군으로부터의 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 E를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 E를 제조하도록 레바우디오사이드 KA의 C2' 13-O-글루코스에 공유 커플링됨)를 포함한다.

[0129] **루부소사이드로부터 레바우디오사이드 E를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 E를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 루부소사이드; 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질; 및 EUGT11 및 UDP-글라이코실전환효소-수크로스 합성 융합 효소의 군으로부터의 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 레바우디오사이드 E를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 KA와 스테비오사이드의 혼합물을 제조하도록 루부소사이드에 공유 커플링됨)를 포함한다. 계속해서, 글루코스는 레바우디오사이드 E를 제조하도록 레바우디오사이드 KA 및 스테비오사이드에 공유 커플링된다.

[0130] **루부소사이드로부터 레바우디오사이드 E를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 E를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 루부소사이드; 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질; 및 HV1 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 레바우디오사이드 E를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 KA를 제조하도록 루부소사이드에 공유 커플링됨); 및 추가로 레바우디오사이드 KA를 HV1과 항온처리하여 레바우디오사이드 E를 제조하는 단계를 포함한다.

[0131] **루부소사이드로부터 레바우디오사이드 D2를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 D2를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 루부소사이드; 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질; EUGT11 및 UDP-글라이코실전환효소-수크로스 합성 융합 효소의 군으로부터의 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 레바우디오사이드 D2를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 스테비오사이드와 레바우디오사이드 KA의 혼합물을 제조하도록 루부소사이드에 공유 커플링됨); 추가로 스테비오사이드와 레바우디오사이드 KA의 혼합물을 EUGT11과 항온처리하여 레바우디오사이드 E를 제조하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 E를 제조하도록 스테비오사이드 및 레바우디오사이드 KA에 공유 커플링됨); 및 추가로 레바우디오사이드 E를 EUGT11과 항온처리하여 레바우디오사이드 D2를 제조하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 D2를 제조하도록 레바우디오사이드 E에 공유 커플링됨)를 포함한다.

[0132] **레바우디오사이드 KA로부터 레바우디오사이드 D2를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 KA로부터 레바우디오사이드 D2를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 레바우디오사이드 KA, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, EUGT11 및 UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 레바우디오사이드 D2를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 KA에 공유 커플링되어 레바우디오사이드 E를 생성함); 및 추가로 레바우디오사이드 E의 혼합물을 EUGT11과 항온처리하여 레바우디오사이드 D2를 제조하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 D2를 제조하도록 레바우디오사이드 E에 공유 커플링됨)를 포함한다.

[0133] **레바우디오사이드 E로부터 레바우디오사이드 Z를 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 E로부터 레바우디오사이드 Z를 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 레바우디오사이드 E; 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP) 및 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스)로 이루어진 군으로부터 선택된 기질; 및 HV1 UDP-글라이코실전환효소; 및 수크로스 생성효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계, 및 레바우디오사이드 Z를 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 Z를 제조하도록 레바우디오사이드 E에 공유 커플링되고, 글루코스는 레바우디오사이드 Z1을 제조하도록 레바우디오사이드 E의 C2'-13-O-글루코스에 공유 커플링됨)를 포함한다. 글루코스는 레바우디오사이드 Z2를 제조하도록 레바우디오사이드 E의 C2'-19-O-글루코스에 공유 커플링된다.

[0134] **레바우디오사이드 D로부터 레바우디오사이드 M을 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오

사이드 D로부터 레바우디오사이드 M을 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 레바우디오사이드 D, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP), 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스), 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, 및 UGT76G1, UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 M을 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계(여기서, 글루코스는 레바우디오사이드 M을 제조하도록 레바우디오사이드 D에 공유 커플링됨)를 포함한다.

[0135] **스테비오사이드로부터 레바우디오사이드 D 및 레바우디오사이드 M을 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 스테비오사이드로부터 레바우디오사이드 D 및 레바우디오사이드 M을 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 스테비오사이드, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP), 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스), 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, 및 HV1, UGT76G1, UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 D 및/또는 레바우디오사이드 M을 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 실시형태에서, 반응 혼합물은 레바우디오사이드 D를 제조하기에 충분한 시간 동안 항온처리될 수 있고, 레바우디오사이드 D를 포함하는 반응 혼합물은 레바우디오사이드 M을 제조하도록 (예를 들어, UGT76G1 및/또는 융합 효소와) 추가로 항온처리될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 반응 혼합물은 HV1 및 UGT76G1을 포함할 것이다. 다른 실시형태에서, 반응 혼합물은 HV1 및 융합 효소를 포함할 것이다.

[0136] 소정의 실시형태에서, 글루코스는 레바우디오사이드 A 및/또는 레바우디오사이드 E를 제조하도록 스테비오사이드에 공유 커플링된다. 예를 들어, 글루코스는 레바우디오사이드 A를 제조하도록 UGT76G1 또는 융합 효소에 의해 스테비오사이드에 공유 커플링될 수 있고/있거나, 글루코스는 레바우디오사이드 E를 제조하도록 HV1에 의해 스테비오사이드에 공유 커플링될 수 있다. 계속해서, 글루코스는 레바우디오사이드 D를 제조하도록 HV1에 의해 레바우디오사이드 A에 공유 커플링될 수 있고/있거나, 글루코스는 레바우디오사이드 D를 제조하도록 UGT76G1 또는 융합 효소에 의해 레바우디오사이드 E에 공유 커플링될 수 있다. 글루코스는 레바우디오사이드 M을 제조하도록 UGT76G1 또는 융합 효소에 의해 레바우디오사이드 D에 추가로 공유 커플링될 수 있다.

[0137] **레바우디오사이드 A로부터 레바우디오사이드 D 및 레바우디오사이드 M을 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 A로부터 레바우디오사이드 D 및 레바우디오사이드 M을 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 레바우디오사이드 A, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP), 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스), 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, 및 HV1, UGT76G1, UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 UDP-글라이코실전환효소포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 D 및/또는 레바우디오사이드 M을 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 실시형태에서, 반응 혼합물(예를 들어, HV1 포함)은 레바우디오사이드 D를 제조하기에 충분한 시간 동안 항온처리될 수 있고, 레바우디오사이드 D를 포함하는 반응 혼합물은 레바우디오사이드 M을 제조하도록 (예를 들어, UGT76G1 및/또는 융합 효소와) 추가로 항온처리될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 반응 혼합물은 HV1 및 UGT76G1을 포함할 것이다. 다른 실시형태에서, 반응 혼합물은 HV1 및 융합 효소를 포함할 것이다.

[0138] 글루코스는 레바우디오사이드 D를 제조하도록 레바우디오사이드 A에 공유 커플링된다. 예를 들어, 글루코스는 레바우디오사이드 D를 제조하도록 HV1에 의해 레바우디오사이드 A에 공유 커플링될 수 있다. 계속해서, 글루코스는 레바우디오사이드 M을 제조하도록 UGT76G1 또는 융합 효소에 의해 레바우디오사이드 D에 공유 커플링될 수 있다.

[0139] **레바우디오사이드 E로부터 레바우디오사이드 D 및 레바우디오사이드 M을 제조하는 방법.** 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 E로부터 레바우디오사이드 D 및 레바우디오사이드 M을 합성하는 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 수크로스 생성효소와 함께 또는 이것 없이 레바우디오사이드 E, 수크로스, 유리딘 다이포스페이트(UDP), 유리딘 다이포스페이트-글루코스(UDP-글루코스), 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 기질, 및 UGT76G1, UDP-글라이코실전환효소-수크로스 생성효소 융합 효소, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 UDP-글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물을 제조하는 단계; 및 레바우디오사이드 D 및/또는 레바우디오사이드 M을 제조하기에 충분한 시간 동안 반응 혼합물을 항온처리하는 단계를 포함한다. 예를 들어, 실시형태에서, 반응 혼합물(예를 들어, UGT76G1 및/또는 융합 효소 포함)은 레바우디오사이드 D를 제조하기에 충분한 시간 동안 항온처리될 수 있고, 레바우디오사이드 D를 포함하는 반응 혼합물은 레바우디오사이드 M을 제

조하도록 추가로 항온처리될 수 있다.

[0140] 글루코스는 레바우디오사이드 D를 제조하도록 레바우디오사이드 E에 공유 커플링된다. 예를 들어, 글루코스는 레바우디오사이드 D를 제조하도록 UGT76G1 또는 융합 효소에 의해 레바우디오사이드 E에 공유 커플링될 수 있다. 계속해서, 글루코스는 레바우디오사이드 M을 제조하도록 UGT76G1 또는 융합 효소에 의해 레바우디오사이드 D에 공유 커플링될 수 있다.

[0141] 대부분의 스테비올 글라이코사이드는, 당 모이어티의 도너로서 유리딘 5'-다이포스포글루코스(UDP-글루코스)를 사용하여 UDP-글라이코실전환효소(UGT)에 의해 통상적으로 촉매화된, 스테비올의 몇몇 글라이코실화 반응에 의해 형성된다. 식물에서, UGT는 UDP-글루코스로부터 스테비올로 글루코스 잔기를 전달하는 매우 다양한 그룹의 효소이다.

[0142] 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소(UGT76G1)는 관련 글라이코사이드(레바우디오사이드 A 및 D)를 제조하도록 1,3-13-O-글루코스 글라이코실화 활성을 가지는 UGT이다. 놀랍게도 그리고 예상치 못하게, UGT76G1이 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 G를 제조하는, 그리고 레바우디오사이드 D로부터 레바우디오사이드 M을 제조하는 1,3-19-O-글루코스 글라이코실화 활성을 또한 가지는 것으로 발견되었다. UGT76G1은 레바우디오사이드 KA를 Reb V로 전환시키고 Reb W를 계속해서 형성할 수 있다. 특히 적합한 UGT76G1은 서열 번호 1의 아미노산 서열을 가진다.

[0143] (WO 2013022989에 기재된) EUGT11은 1,2-19-O-글루코스 및 1,2-13-O-글루코스 글라이코실화 활성을 가지는 UGT이다. EUGT11은 레바우디오사이드 E로의 스테비오사이드의 제조 및 레바우디오사이드 D로의 레바우디오사이드 A의 제조를 촉매화하는 것으로 공지되어 있다. 놀랍게도 그리고 예상치 못하게, 새로운 효소 활성(β1,6-13-O-글루코스 글라이코실화 활성)에 의해 레바우디오사이드 E로부터 레바우디오사이드 D2를 합성하도록 EUGT11이 시험관내 사용될 수 있다는 것이 발견되었다(미국 특허 출원 제14/269,435호(Conagen, Inc.에 허여)). EUGT11은 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 KA를 제조하도록 1,2-19-O-글루코스 글라이코실화 활성을 가진다. 특히 적합한 EUGT11은 서열 번호 3의 아미노산 서열을 가진다.

[0144] HV1은 관련 스테비올 글라이코사이드(레바우디오사이드 E, D 및 Z)를 제조하도록 1,2-19-O-글루코스 글라이코실화 활성을 가지는 UGT이다. 놀랍게도 그리고 예상치 못하게, HV1이 루부소사이드로부터 레바우디오사이드 KA를 제조하도록 1,2-19-O-글루코스 글라이코실화 활성을 또한 가진다는 것이 발견되었다. HV1은 또한 Reb G를 Reb V로 전환시키고, Reb KA를 Reb E로 전환시킬 수 있다. 특히 적합한 HV1은 서열 번호 5의 아미노산 서열을 가진다.

[0145] 상기 방법은 수크로스 생성효소를 유리딘 다이포스포(UDP) 글라이코실전환효소를 함유하는 반응 혼합물에 첨가하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 수크로스 생성효소는 NDP 및 수크로스를 제조하도록 NDP-글루코스과 D-프럭토스 사이의 화학 반응을 촉매화한다. 수크로스 생성효소는 글라이코실전환효소이다. 이 효소 종류의 계통 명칭은 NDP-글루코스:D-프럭토스 2-알파-D-글루코실전환효소이다. 일반 사용 시 다른 명칭은 UDP 글루코스-프럭토스 글루코실전환효소, 수크로스 합성효소, 수크로스-UDP 글루코실전환효소, 수크로스-유리딘 다이포스페이트 글루코실전환효소 및 유리딘 다이포스포글루코스-프럭토스 글루코실전환효소를 포함한다. 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소를 포함하는 반응 혼합물에 대한 수크로스 생성효소의 첨가는 "UGT-SUS 커플링 시스템"을 생성한다. UGT-SUS 커플링 시스템에서, UDP-글루코스는 UDP 및 수크로스로부터 재생될 수 있어서, 반응 혼합물에 대한 과량의 UDP-글루코스의 첨가의 생략 또는 이 반응 혼합물에서의 UDP의 사용을 허용한다. 적합한 수크로스 생성효소는 예를 들어 아라비돕시스 수크로스 생성효소 1; 아라비돕시스 수크로스 생성효소 3; 및 비그나 라디에이트 수크로스 생성효소일 수 있다. 특히 적합한 수크로스 생성효소는 예를 들어 아라비돕시스 수크로스 생성효소 1일 수 있다. 특히 적합한 아라비돕시스 수크로스 생성효소 1은 서열 번호 7의 아미노산 서열을 가지는 아라비돕시스 탈리아나(*Arabidopsis thaliana*) 수크로스 생성효소 1(AtSUS1)이다.

[0146] 또 다른 양태에서, 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소 융합 효소는 상기 방법에서 사용될 수 있다. 특히 적합한 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소 융합 효소는 UGT-SUS1 융합 효소일 수 있다. UDP-글라이코실전환효소는 수크로스 생성효소 도메인에 커플링된 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소 도메인을 포함하는 UDP-글라이코실전환효소 융합 효소일 수 있다. 특히, UDP-글라이코실전환효소 융합 효소는 수크로스 생성효소 도메인에 커플링된 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소 도메인을 포함한다. 추가적으로, UGT-SUS1 융합 효소는 수크로스 생성효소 활성을 가지고, 따라서 UDP 및 수크로스로부터 UDP-글루코스를 재생할 수 있다. 특히 적합한 UGT-SUS1 융합 효소는 예를 들어 서열 번호 9의 아미노산 서열을 가지는 UGT76G1-AtSUS1 융합 효소("GS"라 칭함)일 수 있다. 또 다른 특히 적합한 UGT-SUS1 융합 효소는 예를 들어 서열 번호 11의 아미노산 서열을 가지는

EUGT11-SUS1("EUS"라 칭함)일 수 있다.

[0147] 적합한 수크로스 생성효소 도메인은 예를 들어 아라비돕시스 수크로스 생성효소 1; 아라비돕시스 수크로스 생성효소 3; 및 비그나 라디에이트 수크로스 생성효소일 수 있다. 특히 적합한 수크로스 생성효소 도메인은 예를 들어 아라비돕시스 수크로스 생성효소 1일 수 있다. 특히 적합한 아라비돕시스 수크로스 생성효소 1은 서열 번호 7의 아미노산 서열을 가지는 아라비돕시스 탈리아나 수크로스 생성효소 1 (AtSUS1)이다.

[0148] UGT76G1-AtSUS1 ("GS") 융합 효소는 서열 번호 9에 기재된 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 및 심지어 100% 동일한 폴리펩타이드 서열을 가질 수 있다. 적합하게, UGT-AtSUS1 융합 효소의 아미노산 서열은 서열 번호 9와 적어도 80%의 동일성을 가진다. 더 적합하게, UGT-AtSUS1 융합 효소의 아미노산 서열은 서열 번호 9에 기재된 아미노산 서열과 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 및 심지어 100%의 아미노산 서열 동일성을 가진다.

[0149] 단리된 핵산은 서열 번호 10에 기재된 핵산 서열에 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 및 심지어 100%의 서열 상동성을 가지는 핵산 서열을 가지는 UGT-AtSUS1 융합 효소의 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 적합하게, 단리된 핵산은 서열 번호 9에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80%의 서열 동일성인 아미노산 서열을 가지는 UDP-글라이코실전환효소 융합 효소의 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 더 적합하게, 단리된 핵산은 서열 번호 9에 기재된 아미노산 서열과 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 및 심지어 100%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 가지는 UDP-글라이코실전환효소 융합 효소의 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 단리된 핵산은 따라서 서열 번호 10의 기능성 단편, 서열 번호 9의 기능성 변이체, 또는 서열 번호 9와 예를 들어 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 및 심지어 100%의 서열 동일성을 가지는 다른 상동성 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 당해 분야의 당업자에 의해 공지된 것처럼, UDP-글라이코실전환효소를 코딩하는 핵산 서열은 적합한 숙주 유기체, 예컨대 박테리아 및 효모 등에서 발현에 대해 코돈 최적화될 수 있다.

[0150] EUGT11-SUS1("EUS") 융합 효소는 서열 번호 11에 기재된 아미노산 서열과 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 및 심지어 100% 동일한 폴리펩타이드 서열을 가질 수 있다. 적합하게, EUGT11-SUS1 융합 효소의 아미노산 서열은 서열 번호 11과 적어도 80%의 동일성을 가진다. 더 적합하게, EUGT11-SUS1 융합 효소의 아미노산 서열은 서열 번호 11에 기재된 아미노산 서열과 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 및 심지어 100%의 아미노산 서열 동일성을 가진다.

[0151] 단리된 핵산은 서열 번호 12에 기재된 핵산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 및 심지어 100%의 서열 상동성을 가지는 핵산 서열을 가지는 EUGT11-SUS1 융합 효소의 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 적합하게, 단리된 핵산은 서열 번호 11에 기재된 아미노산 서열과 적어도 80% 서열 동일성인 아미노산 서열을 가지는 EUGT11-SUS1 융합 효소의 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 더 적합하게, 단리된 핵산은 서열 번호 11에 기재된 아미노산 서열과 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 및 심지어 100%의 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 가지는 EUGT11-SUS1 융합 효소의 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 단리된 핵산은 따라서 서열 번호 11의 기능성 단편, 서열 번호 11의 기능성 변이체, 또는 서열 번호 11과 예를 들어 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 및 심지어 100%의 서열 동일성을 가지는 다른 상동성 폴리펩타이드를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 당해 분야의 당업자에 의해 공지된 것처럼, EUGT11-SUS1을 코딩하는 핵산 서열은 적합한 숙주 유기체, 예컨대 박테리아 및 효모 등에서 발현에 대해 코돈 최적화될 수 있다.

[0152] 경구 소모성 제품

[0153] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 음료 제품 및 소모성 제품으로 이루어진 군으로부터 선택된 레바우디오사이드 V의 감미양을 가지는 경구 소모성 제품에 관한 것이다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 음료 제품 및 소모성 제품으로 이루어진 군으로부터 선택된 레바우디오사이드 W의 감미양을 가지는 경구 소모성 제품에 관한 것이다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 음료 제품 및 소모성 제품으로 이루어진 군으로부터 선택된 레바우디오사이드 KA의 감미양을 가지는 경구 소모성 제품에 관한 것이다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 음료 제품 및 소모성 제품으로 이루어진 군으로부터 선택된 레바우디오사이드 G의 감미양을 가지는 경구 소모성 제품에 관한 것이다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 음료 제품 및 소모성 제품으로 이루어진 군으로부터 선택된 레바우디오사이드 M의 감미양을 가지는 경구 소모성 제품에 관한 것이다.

[0154] 경구 소모성 제품은 약 1%(w/v-%) 내지 약 4%(w/v-%)의 수크로스 용액과 등가인 당도 강도를 가질 수 있다.

[0155] 경구 소모성 제품은 약 5ppm 내지 약 100ppm의 레바우디오사이드 V를 가질 수 있다. 경구 소모성 제품은 약 5ppm 내지 약 100ppm의 레바우디오사이드 W를 가질 수 있다. 경구 소모성 제품은 약 5ppm 내지 약 100ppm의 레바우디오사이드 KA를 가질 수 있다. 경구 소모성 제품은 약 5ppm 내지 약 100ppm의 레바우디오사이드 G를 가질 수 있다. 경구 소모성 제품은 약 5ppm 내지 약 100ppm의 레바우디오사이드 M을 가질 수 있다.

[0156] 레바우디오사이드 V는 경구 소모성 제품에서 유일한 감미료일 수 있다. 레바우디오사이드 W는 경구 소모성 제품에서 유일한 감미료일 수 있다. 레바우디오사이드 KA는 경구 소모성 제품에서 유일한 감미료일 수 있다. 레바우디오사이드 G는 경구 소모성 제품에서 유일한 감미료일 수 있다. 레바우디오사이드 M은 경구 소모성 제품에서 유일한 감미료일 수 있다.

[0157] 경구 소모성 제품은 또한 적어도 하나의 추가적인 감미료를 가질 수 있다. 적어도 하나의 추가적인 감미료는 예를 들어 천연 고농도의 감미료일 수 있다. 추가적인 감미료는 스테비아 추출물, 스테비올 글라이코사이드, 스테비오사이드, 레바우디오사이드 A, 레바우디오사이드 B, 레바우디오사이드 C, 레바우디오사이드 D, 레바우디오사이드 D2, 레바우디오사이드 E, 레바우디오사이드 F, 둘코사이드 A, 루부소사이드, 스테비올비오사이드, 수크로스, 고 프럭토스 옥수수 시럽, 프럭토스, 글루코스, 자일로스, 아라비노스, 람노스, 에리쓰리톨, 자일리톨, 만니톨, 소르비톨, 이노시톨, AceK, 아스파르탐, 네오탐, 수크랄로스, 사카린, 나린긴 다이하이드로칼콘(NarDHC), 네오헤스페리딘 다이하이드로칼콘(NDHC), 루부소사이드, 모그로사이드 IV, 시아메노사이드 I, 모그로사이드 V, 모나틴, 타우마틴, 모넬린, 브라제인, L-알리닌, 글라이신, 로 한 구오, 헤르난둘신, 필로둘신, 트릴롭타인, 및 이들의 조합으로부터 선택될 수 있다.

[0158] 경구 소모성 제품은 또한 적어도 하나의 첨가제를 가질 수 있다. 첨가제는 예를 들어 탄수화물, 폴리올, 아미노산 또는 이의 염, 폴리아미노산 또는 이의 염, 당 산 또는 이의 염, 뉴클레오타이드, 유기 산, 무기 산, 유기 염, 유기 산염, 유기 염기염, 무기 염, 쓴 화합물, 향미료, 향료 성분, 수렴제 화합물, 단백질, 단백질 가수분해물, 계면활성제, 유화제, 플라보노이드, 알코올, 중간체, 및 이들의 조합일 수 있다.

[0159] 일 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 V의 감미양을 포함하는 음료 제품에 관한 것이다. 일 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 W의 감미양을 포함하는 음료 제품에 관한 것이다. 일 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 KA의 감미양을 포함하는 음료 제품에 관한 것이다. 일 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 G의 감미양을 포함하는 음료 제품에 관한 것이다. 일 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 M의 감미양을 포함하는 음료 제품에 관한 것이다.

[0160] 음료 제품은 예를 들어 탄산 음료 제품 및 비탄산 음료 제품일 수 있다. 음료 제품은 또한 예를 들어 소프트 드링크, 파운틴 음료, 냉동 음료; 즉석 음료; 냉동 및 즉석 음료, 커피, 차, 유제품 음료, 분말 소프트드링크, 액체 농축물, 가향 물, 강화수(enhanced water), 과일 주스, 과일 주스 가향 드링크, 스포츠 음료 및 에너지 음료일 수 있다.

[0161] 몇몇 실시형태에서, 본 개시내용의 음료 제품은 하나 이상의 음료 성분, 예컨대 산미료, 과일 주스 및/또는 야채 주스, 펄프 등, 향, 색, 보존제, 비타민, 미네랄, 전해질, 에리쓰리톨, 타가토스, 글리세린 및 이산화탄소 등을 포함할 수 있다. 이러한 음료 제품은 임의의 적합한 형태, 예컨대 음료 농축물 및 탄산 즉석 음료로 제공될 수 있다.

[0162] 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 음료 제품은 임의의 다양한 상이한 특정한 제형 또는 구성성분을 가질 수 있다. 본 개시내용의 음료 제품의 제형은 생성물의 의도되는 시장 구획, 이의 원하는 영양학적 특징, 향 프로필 등과 같은 인자에 따라 소정의 정도로 변할 수 있다. 예를 들어, 소정의 실시형태에서, 일반적으로 특정한 음료 제품의 제형에 추가로 성분을 첨가하는 것은 옵션일 수 있다. 예를 들어, 추가적인(즉, 더 많은 및/또는 다른)

감미료가 첨가될 수 있고, 가향제, 전해질, 비타민, 과일 주스 또는 다른 과일 제품, 맛내기 성분(tastent), 차폐제 등, 향 증대제 및/또는 탄소화는 통상적으로 맛, 입맛, 영양학적 특징 등을 변화시키도록 임의의 이러한 제형에 첨가될 수 있다. 실시형태에서, 음료 제품은 물, 약 5ppm 내지 약 100ppm의 레바우디오사이드 V, 산미료 및 가향제를 함유하는 콜라 음료일 수 있다. 실시형태에서, 음료 제품은 물, 약 5ppm 내지 약 100ppm의 레바우디오사이드 W, 산미료 및 가향제를 함유하는 콜라 음료일 수 있다. 실시형태에서, 음료 제품은 물, 약 5ppm 내지 약 100ppm의 레바우디오사이드 M, 산미료 및 가향제를 함유하는 콜라 음료일 수 있다. 예시적인 가향료는 예를 들어 콜라 가향료, 시트러스 가향료 및 앙념 가향료일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 이산화탄소의 형태의 탄산화는 발포성을 위해 첨가될 수 있다. 다른 실시형태에서, 보존제는 다른 성분, 생성 기법, 원하는 유효기간 등에 따라 첨가될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 카페인이 첨가될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 음료 제품은 탄산수, 감미료, 콜라 열매 추출물 및/또는 다른 가향료, 카라멜 가향료, 하나 이상의 산, 및 임의로 다른 성분을 특징적으로 함유하는 콜라 가향 탄산 음료일 수 있다.

[0163] 음료 제품에 존재하는 레바우디오사이드 V, 레바우디오사이드 W, 레바우디오사이드 KA, 레바우디오사이드 M 또는 레바우디오사이드 G의 적합한 양은 예를 들어 약 5ppm 내지 약 100ppm일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 낮은 농도, 예를 들어 100ppm 미만의 레바우디오사이드 V, 레바우디오사이드 W, 레바우디오사이드 KA, 레바우디오사이드 M 또는 레바우디오사이드 G는 10,000ppm 내지 30,000ppm의 농도를 가지는 수크로스 용액에 대한 등가 당도를 가진다. 최종 농도는 약 5ppm 내지 약 100ppm, 약 5ppm 내지 약 95ppm, 약 5ppm 내지 약 90ppm, 약 5ppm 내지 약 85ppm, 약 5ppm 내지 약 80ppm, 약 5ppm 내지 약 75ppm, 약 5ppm 내지 약 70ppm, 약 5ppm 내지 약 65ppm, 약 5ppm 내지 약 60ppm, 약 5ppm 내지 약 55ppm, 약 5ppm 내지 약 50ppm, 약 5ppm 내지 약 45ppm, 약 5ppm 내지 약 40ppm, 약 5ppm 내지 약 35ppm, 약 5ppm 내지 약 30ppm, 약 5ppm 내지 약 25ppm, 약 5ppm 내지 약 20ppm, 약 5ppm 내지 약 15ppm, 또는 약 5ppm 내지 약 10ppm의 범위이다. 대안적으로, 레바우디오사이드 V 또는 레바우디오사이드 W는 약 5ppm 내지 약 100ppm, 약 10ppm 내지 약 100ppm, 약 15ppm 내지 약 100ppm, 약 20ppm 내지 약 100ppm, 약 25ppm 내지 약 100ppm, 약 30ppm 내지 약 100ppm, 약 35ppm 내지 약 100ppm, 약 40ppm 내지 약 100ppm, 약 45ppm 내지 약 100ppm, 약 50ppm 내지 약 100ppm, 약 55ppm 내지 약 100ppm, 약 60ppm 내지 약 100ppm, 약 65ppm 내지 약 100ppm, 약 70ppm 내지 약 100ppm, 약 75ppm 내지 약 100ppm, 약 80ppm 내지 약 100ppm, 약 85ppm 내지 약 100ppm, 약 90ppm 내지 약 100ppm, 또는 약 95ppm 내지 약 100ppm의 범위의 최종 농도로 본 개시내용의 음료 제품에 존재할 수 있다.

[0164] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 V의 감미양을 포함하는 소모성 제품에 관한 것이다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 W의 감미양을 포함하는 소모성 제품에 관한 것이다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 KA의 감미양을 포함하는 소모성 제품에 관한 것이다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 G의 감미양을 포함하는 소모성 제품에 관한 것이다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 레바우디오사이드 M의 감미양을 포함하는 소모성 제품에 관한 것이다. 소모성 제품은 예를 들어 식품 제품, 영양제, 의약품, 식이 보충제, 치아 위생 조성물, 식용 겔 조성물, 화장품 및 테이블탑 가향제일 수 있다.

[0165] 본 명세서에 사용된 바대로, "식이 보충제(들)"는 식이를 보충하도록 의도되고, 식이에서 없을 수 있거나 충분한 분량으로 소비되지 않을 수 있는, 영양소, 예컨대 비타민, 미네랄, 섬유, 지방산, 아미노산 등을 제공하는 화합물을 의미한다. 당해 분야에 공지된 임의의 적합한 식이 보충제를 사용할 수 있다. 적합한 식이 보충제의 예는 예를 들어 영양소, 비타민, 미네랄, 섬유, 지방산, 허브, 약초, 아미노산 및 대사물질일 수 있다.

[0166] 본 명세서에 사용된 바대로, "영양제(들)"는 질환 또는 장애(예를 들어, 피로, 불면, 노화의 영향, 기억 손실, 기분 장애, 심혈관 질환 및 높은 수치의 혈중 콜레스테롤, 당뇨병, 골다공증, 염증, 자가면역 장애 등)의 예방 및/또는 치료를 포함하는 의학적 또는 건강 이익을 제공할 수 있는 임의의 식품 또는 식품의 일부를 포함하는 화합물을 의미한다. 당해 분야에 공지된 임의의 적합한 영양제를 사용할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 영양제는 식품 및 음료에 대한 보충제로서 및 고체 제형, 예컨대 캡슐 또는 정제일 수 있는 장용 또는 비경구 분야를 위한 약제학적 제형으로서, 또는 액체 제형, 예컨대 용액 또는 현탁액으로서 사용될 수 있다.

[0167] 몇몇 실시형태에서, 식이 보충제 및 영양제는 보호성 하이드로콜로이드(예컨대, 검, 단백질, 변형 전분), 결합제, 필름 형성 물질, 캡슐화제/재료, 벽/쉘 재료, 매트릭스 화합물, 코팅, 유화제, 표면 활성제, 가용화제(오일, 지방, 왁스, 레시틴 등), 흡착제, 캐리어, 충전제, 합성물, 분산제, 습윤제, 가공 조제(용매), 유동화제, 맛 차폐제, 중량제, 젤리화제, 겔 형성제, 항산화제 및 항균제를 추가로 함유할 수 있다.

[0168] 본 명세서에 사용된 바대로, "겔"은 입자의 네트워크가 액체 매질의 용적에 걸쳐 있는 콜로이드성 시스템을 의

미한다. 겔이 주로 액체로 이루어지고, 따라서 액체와 유사한 밀도를 나타내므로, 겔은 액체 매질에 걸쳐 있는 입자의 네트워크로 인해 고체의 구조적 응집을 가진다. 이러한 이유로, 겔은 일반적으로 고체의 젤리 유사 재료인 것으로 보인다. 겔은 다수의 분야에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 겔은 식품, 페인트 및 접착제에서 사용될 수 있다. 섭취될 수 있는 겔은 "식용 겔 조성물이라 칭해진다". 식용 겔 조성물은 통상적으로 스낵으로서, 디저트로서, 주식의 일부로서, 또는 주식과 함께 섭취된다. 적합한 식용 겔 조성물의 예는 예를 들어 겔 디저트, 푸딩, 잼, 젤리, 페이스트, 트라이플, 아스픽, 버섯, 검 캔디 등일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 식용 겔 믹스는 일반적으로 식용 겔 조성물을 형성하기 위해 유체가 첨가될 수 있는 분말 또는 과립 고체이다. 적합한 유체의 예는 예를 들어 물, 유제품 유체, 유제품 유사 유체, 주스, 알코올, 알코올성 음료, 및 이들의 조합일 수 있다. 적합한 유제품 유체의 예는 예를 들어 우유, 발효유, 크림, 유체 유청, 및 이들의 혼합물일 수 있다. 적합한 유제품 유사 유체의 예는 예를 들어 두유 및 비유제품 커피 화이트너일 수 있다.

[0169] 본 명세서에 사용된 바대로, 용어 "겔화 성분"은 액체 매질 내에 콜로이드성 시스템을 형성할 수 있는 임의의 재료를 의미한다. 적합한 겔화 성분의 예는 예를 들어 젤라틴, 알기네이트, 카라기난, 검, 펙틴, 곤약, 한천, 식품 산, 레닛, 전분, 전분 유도체, 및 이들의 조합일 수 있다. 식용 겔 믹스 또는 식용 겔 조성물에서 사용되는 겔화 성분의 양은 다수의 인자, 예컨대 사용된 특정한 겔화 성분, 사용된 특정한 유체 기제, 및 겔의 원하는 특성 등에 따라 상당히 변할 수 있는 것으로 당해 분야의 당업자에게 널리 공지되어 있다.

[0170] 본 개시내용의 겔 믹스 및 겔 조성물은 당해 분야에 공지된 임의의 적합한 방법에 의해 제조될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 본 개시내용의 식용 겔 믹스 및 식용 겔 조성물은 겔화제 이외에 다른 성분을 사용하여 제조될 수 있다. 다른 적합한 성분의 예는 예를 들어 식품 산, 식품 산의 염, 완충 시스템, 벌크화제, 봉쇄제(sequestrant), 가교결합제, 하나 이상의 향, 하나 이상의 색상, 및 이들의 조합일 수 있다.

[0171] 당해 분야에 공지된 임의의 적합한 약제학적 조성물을 사용할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 약제학적 조성물은 약 5ppm 내지 약 100ppm의 레바우디오사이드 V, 및 1종 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 함유할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 약제학적 조성물은 약 5ppm 내지 약 100ppm의 레바우디오사이드 W, 및 1종 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 함유할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 약제학적 조성물은 약 5ppm 내지 약 100ppm의 레바우디오사이드 KA, 및 1종 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 함유할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 약제학적 조성물은 약 5ppm 내지 약 100ppm의 레바우디오사이드 G, 및 1종 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 함유할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 본 개시내용의 약제학적 조성물은 약 5ppm 내지 약 100ppm의 레바우디오사이드 M, 및 1종 이상의 약제학적으로 허용되는 부형제를 함유할 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 본 개시내용의 약제학적 조성물은 생물학적 효과를 발휘하는 1종 이상의 활성제를 함유하는 약제학적 약물을 제형화하도록 사용될 수 있다. 따라서, 몇몇 실시형태에서, 본 개시내용의 약제학적 조성물은 생물학적 효과를 발휘하는 1종 이상의 활성제를 함유할 수 있다. 적합한 활성제는 당해 분야에 널리 공지되어 있다(예를 들어, 의사 처방 참고서(The Physician's Desk Reference)). 이러한 조성물은 예를 들어 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., USA]에 기재된 바대로 당해 분야에 널리 공지된 절차에 따라 제조될 수 있다.

[0172] 레바우디오사이드 V, 레바우디오사이드 W, 레바우디오사이드 KA, 레바우디오사이드 M 또는 레바우디오사이드 G는 당해 분야에 공지된 임의의 적합한 치아 및 구강 위생 조성물과 사용될 수 있다. 적합한 치아 및 구강 위생 조성물의 예는 예를 들어 치약, 치아 광택제, 치실, 마우스워시, 구강 린스, 덴트리피스(dentrifice), 구강 스프레이, 구강 청결제, 플라크 린스, 치과용 진통제 등일 수 있다.

[0173] 소모성 제품에 존재하는 레바우디오사이드 V, 레바우디오사이드 W, 레바우디오사이드 KA, 레바우디오사이드 M 또는 레바우디오사이드 G의 적합한 양은 예를 들어 약 5백만분율(ppm) 내지 약 100백만분율(ppm)일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 낮은 농도, 예를 들어 100ppm 미만의 레바우디오사이드 V, 레바우디오사이드 W, 레바우디오사이드 KA, 레바우디오사이드 M 또는 레바우디오사이드 G는 10,000ppm 내지 30,000ppm의 농도를 가지는 수크로스 용액에 대한 등가 당도를 가진다. 최종 농도는 약 5ppm 내지 약 100ppm, 약 5ppm 내지 약 95ppm, 약 5ppm 내지 약 90ppm, 약 5ppm 내지 약 85ppm, 약 5ppm 내지 약 80ppm, 약 5ppm 내지 약 75ppm, 약 5ppm 내지 약 70ppm, 약 5ppm 내지 약 65ppm, 약 5ppm 내지 약 60ppm, 약 5ppm 내지 약 55ppm, 약 5ppm 내지 약 50ppm, 약 5ppm 내지 약 45ppm, 약 5ppm 내지 약 40ppm, 약 5ppm 내지 약 35ppm, 약 5ppm 내지 약 30ppm, 약 5ppm 내지 약 25ppm, 약 5ppm 내지 약 20ppm, 약 5ppm 내지 약 15ppm, 또는 약 5ppm 내지 약 10ppm의 범위이다. 대안적으로, 레바우디오사이드 V 또는 레바우디오사이드 W는 약 5ppm 내지 약 100ppm, 약 10ppm 내지 약 100ppm, 약 15ppm 내지 약 100ppm, 약 20ppm 내지 약 100ppm, 약 25ppm 내지 약 100ppm, 약 30ppm 내지 약 100ppm, 약 35ppm 내지 약 100ppm, 약 40ppm 내지 약 100ppm, 약 45ppm 내지 약 100ppm, 약 50ppm 내지 약 100ppm, 약 55ppm 내지

약 100ppm, 약 60ppm 내지 약 100ppm, 약 65ppm 내지 약 100ppm, 약 70ppm 내지 약 100ppm, 약 75ppm 내지 약 100ppm, 약 80ppm 내지 약 100ppm, 약 85ppm 내지 약 100ppm, 약 90ppm 내지 약 100ppm, 또는 약 95ppm 내지 약 100ppm의 범위의 최종 농도로 본 개시내용의 소모성 제품에 존재할 수 있다.

[0174] 소정의 실시형태에서, 약 5ppm 내지 약 100ppm의 레바우디오사이드 V, 레바우디오사이드 W, 레바우디오사이드 KA, 레바우디오사이드 M 또는 레바우디오사이드 G는 식품 제품 조성물에 존재한다. 본 명세서에 사용된 바대로, "식품 제품 조성물(들)"은 영양학적 가치를 가져야 하는 것은 아니지만 가질 수 있고 인간 및 동물에 의한 소비에 의도되는 임의의 고체 또는 액체의 섭취 가능한 재료를 의미한다.

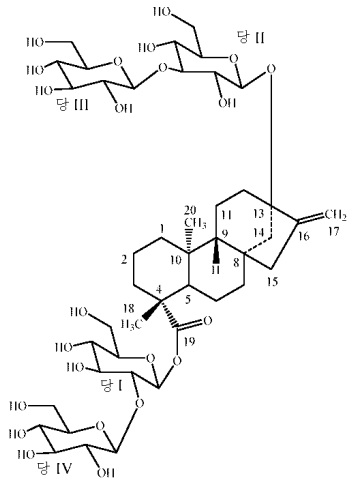
[0175] 적합한 식품 제품 조성물의 예는 예를 들어 과자류 조성물, 예컨대 캔디, 민트, 과일 가향 알사탕, 코코아 생성물, 초코릿 등; 조미료, 예컨대 케첩, 머스타드, 마요네즈 등; 츄잉 검; 시리얼 조성물; 제빵 제품, 예컨대 빵, 케이크, 파이, 쿠키 등; 유제품, 예컨대 우유, 치즈, 크림, 아이스크림, 사워 크림, 요구르트, 셔벗 등; 테이블탑 감미료 조성물; 스프; 스튜; 즉석 식품; 육류, 예컨대 햄, 베이컨, 소시지, 육포 등; 젤라틴 및 젤라틴 유사 제품, 예컨대 잼, 젤리, 프리저브 등; 과일; 야채; 난제품; 당제품; 당밀을 포함하는 시럽; 스낵; 견과 살 및 견과 제품; 및 동물 사료일 수 있다.

[0176] 식품 제품 조성물은 또한 조미료, 예컨대 허브, 향신료 및 양념, 천연 및 합성 향, 및 향 증대제, 예컨대 모노나트륨 글루타메이트일 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 식품 제품 조성물은 예를 들어 준비된 포장 제품, 예컨대 식이성 감미료, 액체 감미료, 과립 향 믹스, 애완동물 사료, 가축 사료, 담배, 및 제빵 분야를 위한 재료, 예컨대 빵, 쿠키, 케이크, 팬케이크, 도넛 등을 위한 분말 베이킹 믹스일 수 있다. 다른 실시형태에서, 식품 제품 조성물은 또한 수크로스를 적게 함유하거나 가지지 않는 식이 및 저칼로리 식품 및 음료일 수 있다.

[0177] 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 레바우디오사이드 V, 레바우디오사이드 W, 레바우디오사이드 KA, 레바우디오사이드 M 또는 레바우디오사이드 G는 유일한 감미료이고, 생성물은 약 1% 내지 약 4%(w/v-%)의 수크로스 용액과 등가인 당도 강도를 가진다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 소모성 제품 및 음료 제품은 추가적인 감미료를 추가로 포함할 수 있고, 생성물은 약 1% 내지 약 10%(w/v-%)의 수크로스 용액과 등가인 당도 강도를 가진다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 생성물 내의 모든 감미 성분은 고농도의 감미료이다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 생성물 내의 모든 감미 성분은 천연 고농도의 감미료일 수 있다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 추가적인 감미료는 스테비아 추출물, 스테비올 글라이코사이드, 스테비오사이드, 레바우디오사이드 A, 레바우디오사이드 B, 레바우디오사이드 C, 레바우디오사이드 D, 레바우디오사이드 D2, 레바우디오사이드 F, 둘코사이드 A, 루부소사이드, 스테비올비오사이드, 수크로스, 고 프럭토스 옥수수 시럽, 프럭토스, 글루코스, 자일로스, 아라비노스, 람노스, 에리쓰리톨, 자일리톨, 만니톨, 소르비톨, 이노시톨, AceK, 아스파르탐, 네오탐, 수크랄로스, 사카린, 나린긴 다이하이드로칼콘(NarDHC), 네오헤스페리딘 다이하이드로칼콘(NDHC), 루부소사이드 모그로사이드 IV, 시아메노사이드 I, 모그로사이드 V, 모나틴, 타우마틴, 모넬린, 브라제인, L-알리닌, 글라이신, 로 한 구오, 헤르난둘신, 필로둘신, 트릴롭타인, 및 이들의 조합으로부터 선택된 1종 이상의 감미료를 함유한다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 소모성 제품 및 음료 제품은 탄수화물, 폴리올, 아미노산 또는 이의 염, 폴리-아미노산 또는 이의 염, 당 산 또는 이의 염, 뉴클레오타이드, 유기 산, 무기 산, 유기 염, 유기 산염, 유기 염기염, 무기 염, 쓴 화합물, 향미료, 향료 성분, 수렴제 화합물, 단백질, 단백질 가수분해물, 계면활성제, 유화제, 플라보노이드, 알코올, 중간체, 및 이들의 조합으로부터 선택된 1종 이상의 첨가제를 추가로 함유할 수 있다. 임의의 이전의 실시형태와 조합될 수 있는 소정의 실시형태에서, 레바우디오사이드 D2는 생성물에 첨가되기 전에 약 50% 내지 약 100중량%의 순도를 가진다.

[0178] 감미료

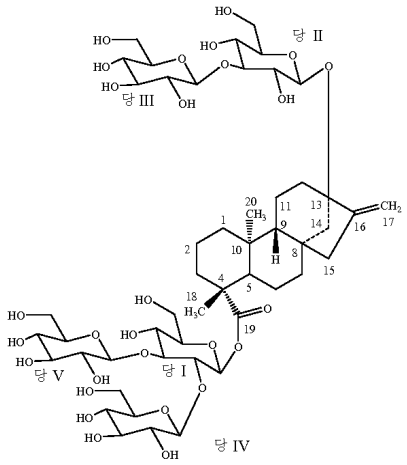
[0179] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 하기 화학 구조로 이루어진 감미료에 관한 것이다:



Reb V

[0180] .

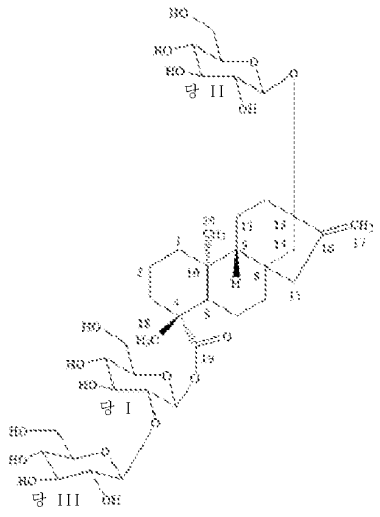
[0181] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 하기 화학 구조로 이루어진 감미료에 관한 것이다:



Reb W

[0182] .

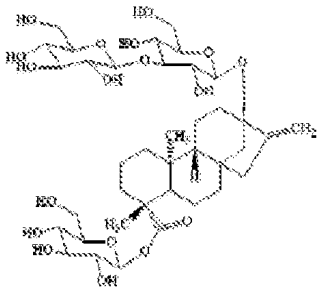
[0183] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 하기 화학 구조로 이루어진 감미료에 관한 것이다:



Reb KA

[0184] .

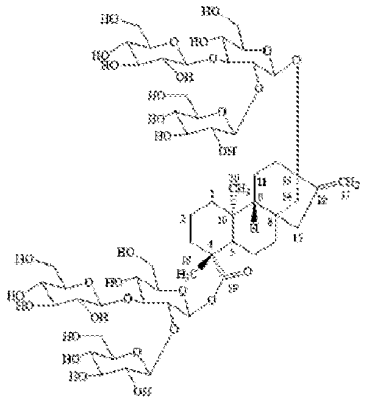
[0185] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 하기 화학 구조로 이루어진 감미료에 관한 것이다:



Reb G

[0186]

[0187] 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 하기 화학 구조로 이루어진 감미료에 관한 것이다:



Reb M

[0188]

[0189] 소정의 실시형태에서, 감미료는 충전제, 벌크화제 및 케이크형성방지제 중 적어도 1종을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 충전제, 벌크화제 및 케이크형성방지제가 당해 분야에 공지되어 있다.

[0190] 소정의 실시형태에서, 레바우디오사이드 V, 레바우디오사이드 W, 레바우디오사이드 KA, 레바우디오사이드 M 또는 레바우디오사이드 G 감미료는 소모성 제품 및 음료 제품의 당도를 달게 하고/하거나, 증대시키기에 충분한 최종 농도로 포함되고/되거나 첨가될 수 있다. 레바우디오사이드 V, 레바우디오사이드 W, 레바우디오사이드 KA, 레바우디오사이드 M 또는 레바우디오사이드 G의 "최종 농도"는 최종 소모성 제품 및 음료 제품에 존재하는(즉, 소모성 제품 및 음료 제품을 제조하기 위해 모든 성분 및/또는 화합물이 첨가된 후) 레바우디오사이드 V, 레바우디오사이드 W, 레바우디오사이드 KA, 레바우디오사이드 M 또는 레바우디오사이드 G의 농도를 의미한다. 따라서, 소정의 실시형태에서, 레바우디오사이드 V, 레바우디오사이드 W, 레바우디오사이드 KA, 레바우디오사이드 M 또는 레바우디오사이드 G는 소모성 제품 및 음료 제품을 제조하기 위해 사용된 화합물 또는 성분에 포함되고/되거나 첨가된다. 레바우디오사이드 V, 레바우디오사이드 W, 레바우디오사이드 KA, 레바우디오사이드 M 또는 레바우디오사이드 G는 단일 화합물 또는 성분, 또는 복수의 화합물 및 성분에 존재할 수 있다. 다른 실시형태에서, 레바우디오사이드 V, 레바우디오사이드 W, 레바우디오사이드 KA, 레바우디오사이드 M 또는 레바우디오사이드 G는 소모성 제품 및 음료 제품에 포함되고/되거나 첨가된다. 소정의 바람직한 실시형태에서, 레바우디오사이드 V, 레바우디오사이드 W, 레바우디오사이드 KA, 레바우디오사이드 M 또는 레바우디오사이드 G는 약 5ppm 내지 약 100ppm, 약 5ppm 내지 약 95ppm, 약 5ppm 내지 약 90ppm, 약 5ppm 내지 약 85ppm, 약 5ppm 내지 약 80ppm, 약 5ppm 내지 약 75ppm, 약 5ppm 내지 약 70ppm, 약 5ppm 내지 약 65ppm, 약 5ppm 내지 약 60ppm, 약 5ppm 내지 약 55ppm, 약 5ppm 내지 약 50ppm, 약 5ppm 내지 약 45ppm, 약 5ppm 내지 약 40ppm, 약 5ppm 내지 약 35ppm, 약 5ppm 내지 약 30ppm, 약 5ppm 내지 약 25ppm, 약 5ppm 내지 약 20ppm, 약 5ppm 내지 약 15ppm, 또는 약 5ppm 내지 약 10ppm의 범위의 최종 농도로 포함되고/되거나 첨가된다. 대안적으로, 레바우디오사이드 V 또는 레바우디오사이드 W는 약 5ppm 내지 약 100ppm, 약 10ppm 내지 약 100ppm, 약 15ppm 내지 약 100ppm, 약 20ppm 내지 약 100ppm, 약 25ppm 내지 약 100ppm, 약 30ppm 내지 약 100ppm, 약 35ppm 내지 약 100ppm, 약 40ppm 내지 약 100ppm, 약 45ppm 내지 약 100ppm, 약 50ppm 내지 약 100ppm, 약 55ppm 내지 약 100ppm, 약 60ppm 내지 약 100ppm, 약 65ppm 내지 약 100ppm, 약 70ppm 내지 약 100ppm, 약 75ppm 내지 약 100ppm, 약 80ppm 내지 약

100ppm, 약 85ppm 내지 약 100ppm, 약 90ppm 내지 약 100ppm, 또는 약 95ppm 내지 약 100ppm의 범위의 최종 농도로 포함되고/되거나 첨가된다. 예를 들어, 레바우디오사이드 V 또는 레바우디오사이드 W는 약 5ppm, 약 10ppm, 약 15ppm, 약 20ppm, 약 25ppm, 약 30ppm, 약 35ppm, 약 40ppm, 약 45ppm, 약 50ppm, 약 55ppm, 약 60ppm, 약 65ppm, 약 70ppm, 약 75ppm, 약 80ppm, 약 85ppm, 약 90ppm, 약 95ppm, 또는 약 100ppm의 범위 및 이들 값 사이의 임의의 범위의 최종 농도로 포함되고/되거나 첨가된다.

[0191] 소정의 실시형태에서, 레바우디오사이드 V, 레바우디오사이드 W, 레바우디오사이드 KA, 레바우디오사이드 M 또는 레바우디오사이드 G는 소모성 제품 및 음료 제품에 포함되고/되거나 첨가되는 유일한 감미료이다. 이러한 실시형태에서, 소모성 제품 및 음료 제품은 약 1% 내지 약 4%(w/v-%)의 수크로스 용액, 약 1% 내지 약 3%(w/v-%)의 수크로스 용액, 또는 약 1% 내지 약 2%(w/v-%)의 수크로스 용액과 등가인 당도 강도를 가진다. 대안적으로, 소모성 제품 및 음료 제품은 약 1% 내지 약 4%(w/v-%)의 수크로스 용액, 약 2% 내지 약 4%(w/v-%)의 수크로스 용액, 약 3% 내지 약 4%(w/v-%)의 수크로스 용액, 또는 약 4%오 등가인 당도 강도를 가진다. 예를 들어, 소모성 제품 및 음료 제품은 약 1%, 약 2%, 약 3%, 또는 약 4%(w/v-%)의 수크로스 용액 및 이들 값 사이의 임의의 범위와 등가인 당도 강도를 가질 수 있다.

[0192] 본 개시내용의 소모성 제품 및 음료 제품은 바람직한 당도 강도, 영양학적 특징, 맛 프로필, 입맛, 또는 다른 감각수용성 인자를 달성하기에 충분한 비율로 레바우디오사이드 V, 레바우디오사이드 W, 레바우디오사이드 KA, 레바우디오사이드 M 또는 레바우디오사이드 G와 본 개시내용의 1종 이상의 감미료의 혼합물을 포함할 수 있다.

[0193] 본 개시내용은 하기 비제한적인 실시예를 고려 시 더 완전히 이해될 것이다.

[0194] 실시예

[0195] 실시예 1

[0196] 이 실시예에서, 모든 후보 UGT 유전자의 전장 DNA 단편을 합성하였다.

[0197] 구체적으로, 이. 콜라이 발현(Genscript(뉴저지주 피스카타웨이))을 위해 cDNA를 코돈 최적화하였다. 합성된 DNA를 박테리아 발현 벡터 pETite N-His 수모 칸 벡터(SUMO Kan Vector)(Lucigen)로 클로닝하였다. UDP-글라이코실전환효소 융합 효소(UGT76G1-AtSUS1 및 EUGT11-AtSUS1)를 코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 경우, (뉴클레오타이드 서열: ggttctggt에 의해 코딩된) GSG-링커를 유리딘 다이포스포 글라이코실전환효소 도메인을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열과 에이. 탈리아나(AtSUS1)로부터 수크로스 생성효소 1을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열 사이에 삽입하였다. 표 2는 단백질 및 서열 식별자 번호를 요약한 것이다.

표 2

명칭	서열 번호	설명
UGT76G1	서열 번호 1	아미노산
UGT76G1	서열 번호 2	핵산
EUGT11	서열 번호 3	아미노산
EUGT11	서열 번호 4	핵산
HV1	서열 번호 5	아미노산
HV1	서열 번호 6	핵산
AtSUS1	서열 번호 7	아미노산
AtSUS1	서열 번호 8	핵산
GS 융합 효소	서열 번호 9	아미노산
GS 융합 효소	서열 번호 10	핵산
EUS 융합 효소	서열 번호 11	아미노산
EUS 융합 효소	서열 번호 12	핵산

[0198]

[0199] 각각의 발현 작제물을 이. 콜라이 BL21(DE3)로 형질전환시키고, 이것을 후속하여 0.8-1.0의 OD_{600}에 도달할 때까지 37℃에서 50㎍/㎖의 카나마이신을 함유하는 LB 배지에서 성장시켰다. 단백질 발현을 1mM 아이소프로필 β-D-1-티오갈락토피라노사이드(IPTG)의 첨가에 의해 유도하고, 배양물을 22시간 동안 16℃에서 추가로 성장시켰다. 세포를 원심분리(3,000 x g; 10분; 4℃)에 의해 수확하였다. 세포 펠렛을 수집하고, 즉시 사용하거나 -80℃에서 저장하였다.

[0200] 세포 펠렛을 용해 완충제(50mM 인산칼륨 완충제, pH 7.2, 25㎍/㎖의 라이소자임, 5㎍/㎖의 DNase I, 20mM 이미다졸, 500mM NaCl, 10% 글라이세롤 및 0.4% TRITON X-100) 중에 재현탁시켰다. 세포를 4℃에서 음파처리에 의해 파괴시키고, 세포 부스러기를 원심분리(18,000 x g; 30분)에 의해 깨끗하게 하였다. 상청액을 평형인(평형 완충제: 50mM 인산칼륨 완충제, pH 7.2, 20mM 이미다졸, 500mM NaCl, 10% 글라이세롤) Ni-NTA (Qiagen) 친화도 칼럼에 로딩하였다. 단백질 샘플의 로딩 후, 칼럼을 평형 완충제에 의해 세척하여 비결합 오염물질 단백질을 제거하였다. His 태그화 UGT 재조합 폴리펩타이드를 250mM 이미다졸을 함유하는 평형 완충제에 의해 용리시켰다. 정제된 HV1(61.4kD), UGT76G1(65.4kD), AtSUS1(106.3kD), EUGT11(62kD), UGT76G1-SUS1(GS)(157.25kD) 및 EUGT11-AtSUS1(155kD) 융합 단백질이 도 2에 도시되어 있다.

[0201] 실시예 2

[0202] 이 실시예에서, 기질로서 시험된 스테비올 글라이코사이드를 사용함으로써 글라이코실전환효소 활성에 대해 후보 UGT 재조합 폴리펩타이드를 평가하였다.

[0203] 통상적으로, 200㎕의 시험관내 반응 시스템에서 재조합 폴리펩타이드(10㎍)를 시험하였다. 반응 시스템은 50mM 인산칼륨 완충제, pH 7.2, 3mM $MgCl_2$, 1 mg/㎖의 스테비올 글라이코사이드 기질, 1mM UDP-글루코스를 함유한다. 반응을 30℃에서 수행하고 200㎕의 1-뷰탄올을 첨가함으로써 종결시켰다. 샘플을 200㎕의 1-뷰탄올에 의해 3회 추출하였다. 혼주된 분획을 건조시키고, 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 분석을 위해 70㎕의 80% 메탄올 중에 용해시켰다. 루부소사이드(99%, 블루 캘리포니아(Blue California), 캘리포니아주), 정제된 Reb G(98.8%), Reb KA(98.4%) 및 Reb V(80%)를 시험관내 반응에서 기질로서 사용하였다.

[0204] UGT 촉매화 글라이코실화 반응을 수크로스 생성효소(예컨대, AtSUS1)에 의해 촉매화된 UDP-글루코스 생성 반응에 커플링시켰다. 이 방법에서, UDP-글루코스는 수크로스 및 UDP로부터 생성되어서, 초과의 UDP-글루코스의 첨가가 생략될 수 있다. 검정에서, 재조합 AtSUS1을 UGT 반응 시스템에 첨가하고, UDP-글루코스를 UDP로부터 재생할 수 있다. AtSUS1 서열(Bieniawska et al., Plant J. 2007, 49: 810-828)을 합성하고 박테리아 발현 벡터로 삽입하였다. 재조합 AtSUS1 단백질을 발현시키고 친화도 크로마토그래피에 의해 정제하였다.

[0205] 4원 펌프, 온도 제어 칼럼 구획, 오토샘플러 및 UV 흡수 검출기를 포함하는 디오넥스(Dionex) UPLC 얼티메이트 3000 시스템(캘리포니아주 서니베일)을 사용하여 HPLC 분석을 수행하였다. 스테비올 글라이코사이드의 규명을 위해 가드 칼럼이 구비된 페노메넥스 루나(Phenomenex Luna) NH_2, 루나 C18 또는 시너지(Synergi) 하이드로-RP 칼럼을 사용하였다. 물 또는 Na_3PO_4 완충제 중의 아세토나이트릴을 HPLC 분석에서 등용매 용리에 사용하였다. 검출 파장은 210㎚이었다.

[0206] 실시예 3

[0207] 이 실시예에서, AtSUS1의 존재 하에 또는 부재 하에 모든 반응 조건에서 레바우디오사이드 KA를 제조하기 위해 위해 당 모이어티를 루부소사이드로 전달하기 위해 재조합 HV1 폴리펩타이드를 분석하였다("Minor diterpene glycosides from the leaves of Stevia rebaudiana". Journal of Natural Products (2014), 77(5), 1231-1235).

[0208] 도 3에 도시된 바대로, 재조합 HV1 폴리펩타이드는 AtSUS1의 존재 하에 또는 부재 하에 모든 반응 조건에서 Reb KA를 제조하기 위해 당 모이어티를 루부소사이드로 전달하였다. 루부소사이드는 UGT-SUS 커플링 반응 시스템(G, I)에서 재조합 HV1에 의해 Reb KA 및 Reb E로 완전히 전환되었다. 그러나, 오직 부분의 루부소사이드가 AtSUS1에 커플링되지 않으면서 재조합 HV1 폴리펩타이드 단독에 의해 24시간 후 Reb KA로 전환되어서(H), AtSUS1이 UGT-SUS 커플링 시스템에서 전환 효율을 증대시킨다는 것을 나타낸다. HV1-AtSUS1 커플링 반응 시스템에서, 제조된 Reb KA는 계속해서 Reb E로 전환될 수 있다.

[0209] 실시예 4

[0210] 이 실시예에서, 기질로서 Reb E를 사용하여 HV1 활성을 분석하였다.

[0211] 상기 실시예에서 사용된 것과 유사한 조건 하에 Reb E 기질(0.5㎎/㎖)을 UGT-SUS 커플링 반응 시스템(200㎕)에서 재조합 HV1 폴리펩타이드(20㎍) 및 AtSUS1(20㎍)과 항온처리하였다. 도 4에 도시된 바대로, 재조합 HV1 폴리펩타이드 및 AtSUS1의 조합에 의해 Reb Z를 제조하였다. 이 결과는 HV1이 RZ를 형성하기 위해 글루코스 모이어티를 Reb E로 전달할 수 있다는 것을 나타낸다. 도 4는 레바우디오사이드 Z("Reb Z")가 HV1-AtSUS1 커플링 반응 시스템에서 재조합 HV1 폴리펩타이드 및 재조합 AtSUS1에 의해 촉매화된 레바우디오사이드 E("Reb E")로부터 제조될 수 있다는 것을 보여준다. HV1은 Reb Z, 60:40 내지 70:30의 비율의 Reb Z1과 Reb Z2의 혼합물을 제조하기 위해 글루코스를 Reb E로 전달할 수 있다(미국 가특허 출원 제61/898,571호(Conagen Inc.에 허여)).

[0212] 실시예 5

[0213] 이 실시예에서, Reb E로의 Reb KA의 전환을 확인하기 위해, 정제된 Reb KA 기질을 AtSUS1의 존재 하에 또는 부재 하에 재조합 HV1과 항온처리하였다. 도 5에 도시된 바대로, 반응 조건 둘 다에서 재조합 HV1 폴리펩타이드에 의해 Reb E를 제조하였다. 그러나, UGT-SUS 커플링 반응 시스템에서의 AtSUS1 폴리펩타이드는 반응 효율을 증대시킬 수 있다. 모든 Reb KA 기질은 UGT-SUS 커플링 시스템(D)에서 Reb E로 완전히 전환될 수 있다.

[0214] 실시예 6

[0215] 이 실시예에서, 기질로서 루부소사이드를 사용하여 EUGT11 활성을 분석하였다.

[0216] 도 6에 도시된 바대로, EUGT11은 AtSUS1의 존재 하에 또는 부재 하에 모든 반응 조건에서 Reb KA 및 스테비오사이드를 제조하기 위해 당 모이어티를 루부소사이드로 전달할 수 있다. AtSUS1은 UGT-SUS 커플링 시스템에서 전환 효율을 증대시켰다. HV1-AtSUS1 커플링 반응 시스템에서, Reb E는 EUGT11에 의해 계속해서 전환될 수 있다. EUS 융합 단백질은 동일한 반응 조건 하에 더 높은 활성을 나타냈다. 모든 제조된 Reb KA 및 스테비오사이드는 48시간에 EUS에 의해 Reb E로 완전히 전환되었다. Reb E는 Reb D2로 계속해서 전환될 수 있다.

[0217] 실시예 7

[0218] 이 실시예에서, 기질로서 Reb KA를 사용하여 EUGT11 활성을 분석하였다.

[0219] EUGT11은 관련 스테비올 글라이코사이드를 제조하도록 1,2-19-O-글루코스 글라이코실화 활성을 가지는 UGT이다(PCT 공개 출원 제WO2013/022989호(Evolva SA에 허여)). 예를 들어, EUGT11은 스테비오사이드로부터 Reb E를 제조하기 위해 반응을 촉매화할 수 있다. EUGT11은 또한 레바우디오사이드 D2를 형성하기 위해 글루코스 분자를 레바우디오사이드 E로 전달할 수 있는 1,6-13-O-글루코스 글라이코실화 활성을 가진다(미국 특허 출원 제14/269,435호(Conagen, Inc.에 허여)). 실험에서, 본 발명자들은 EUGT11이 Reb E를 형성하기 위해 글루코스 잔기를 Reb KA로 전달할 수 있다는 것을 발견하였다. 도 7에 도시된 바대로, EUGT11은 AtSUS1의 존재(E, H) 또는 부재(D, G) 하에 모든 반응 조건에서 Reb E를 제조하기 위해 당 모이어티를 Reb KA로 전달할 수 있다. AtSUS1은 UGT-SUS 커플링 시스템(E, H)에서 전환 효율을 증대시켰다. EUGT11-AtSUS1 커플링 반응 시스템(E, H) 및 EUS 융합 반응 시스템(F, I)에서, 모든 Reb KA는 완전히 전환되었고, 제조된 Reb E는 Reb D2로 계속해서 전환될 수 있다.

[0220] 실시예 8

[0221] 이 실시예에서, 기질로서 루부소사이드를 사용하여 UGT76G1 활성을 분석하였다.

[0222] UGT76G1은 레바우디오사이드 A를 형성하기 위해 스테비오사이드로 그리고 레바우디오사이드 D를 형성하기 위해 Reb E로 글루코스 분자를 전달할 수 있는 1,3-13-O-글루코스 글라이코실화 활성을 가진다. 실시예에서, 본 발명자들은 UGT76G1이 레바우디오사이드 G를 형성하기 위해 글루코스 잔기를 루부소사이드로 전달할 수 있다는 것을 발견하였다.

[0223] 도 8에 도시된 바대로, UGT76G1은 AtSUS1의 존재(D, G) 또는 부재(C, F) 하에 모든 반응 조건에서 Reb G를 제조하기 위해 당 모이어티를 루부소사이드로 전달할 수 있다. AtSUS1은 UGT-SUS 커플링 시스템에서 전환 효율을 증대시켰다. GS 융합 단백질은 동일한 반응 조건 하에 더 높은 활성을 나타냈다(E, H). 모든 루부소사이드는 12시간에 GS에 의해 Reb G로 완전히 전환되었다(E).

[0224] 실시예 9

[0225] 이 실시예에서, 기질로서 레바우디오사이드 KA를 사용하여 UGT76G1 활성을 분석하였다.

[0226] UGT76G1의 효소 활성을 추가로 확인하기 위해, 기질로서 레바우디오사이드 KA를 사용하여 시험관내 검정을 수행

하였다. 놀랍게도, 신규한 스테비올 글라이코사이드(레바우디오사이드 V "Reb V")가 초기 시점에 제조되었다. 후기 시점에, 반응에서 제조된 Reb V는 또 다른 신규한 스테비올 글라이코사이드(레바우디오사이드 W "RebW")로 전환되었다.

[0227] 도 9에 도시된 바대로, UGT76G1은 AtSUS1의 존재(F, I) 또는 부재(E, H) 하에 모든 반응 조건에서 Reb V를 제조하기 위해 당 모이어티를 Reb KA로 전달할 수 있다. AtSUS1은 UGT-SUS 커플링 시스템(F, I)에서 전환 효율을 증대시켰다. UGT76G1-AtSUS1 커플링 반응 시스템(I) 및 GS 융합 반응 시스템(J)에서, 제조된 Reb V는 12시간에 Reb W로 완전히 전환되었다.

[0228] 실시예 10

[0229] 이 실시예에서, 기질로서 Reb V를 사용하여 UGT76G1 활성을 분석하였다.

[0230] 기질로서 정제된 Reb V를 반응 시스템에서 도입하였다. 도 10C에 도시된 바대로, Reb V는 놀랍게도 6시간에 UGT-SUS1 커플링 시스템에서 UGT76G1 재조합 폴리펩타이드에 의해 Reb W로 전환되었다.

[0231] 실시예 11

[0232] 이 실시예에서, 기질로서 Reb G를 사용하여 HV1 활성을 분석하였다.

[0233] 도 11에 도시된 바대로, 재조합 HV1 폴리펩타이드는 AtSUS1의 존재 또는 부재 하에 모든 반응 조건에서 Reb V를 제조하기 위해 당 모이어티를 레바우디오사이드 G로 전달하였다. Reb G는 UGT-SUS 커플링 반응 시스템(E, G)에서 재조합 HV1에 의해 Reb V로 완전히 전환되었다. 그러나, 오직 부분의 Reb G가 AtSUS1에 커플링되지 않으면서 재조합 HV1 폴리펩타이드 단독에 의해 24시간 후 Reb V로 전환되어서(F), AtSUS1이 UGT-SUS 커플링 시스템에서 전환 효율을 증대시킨다는 것을 나타낸다.

[0234] 실시예 12

[0235] 이 실시예에서, 기질로서 Reb G를 사용하여 EUGT11 활성을 분석하였다.

[0236] 도 12에 도시된 바대로, 재조합 EUGT11 폴리펩타이드는 AtSUS1의 존재(F, I) 또는 부재(E, H) 하에 모든 반응 조건에서 Reb V를 제조하기 위해 당 모이어티를 레바우디오사이드 G로 전달하였다. 더 많은 Reb G가 UGT-SUS 커플링 반응 시스템(F, I)에서 재조합 EUGT11에 의해 Reb V로 전환되었다. 그러나, 오직 부분의 Reb G가 AtSUS1에 커플링되지 않으면서 재조합 EUGT11 폴리펩타이드 단독에 의해 Reb V로 전환되어서(E, H), AtSUS1이 UGT-SUS 커플링 시스템에서 전환 효율을 증대시킨다는 것을 나타낸다. EUS 융합 단백질은 동일한 반응 조건 하에 더 높은 활성을 나타냈다(G, J). 반응 시스템에서 모든 Reb G는 24시간에 EUS에 의해 Reb V로 완전히 전환되었다(J).

[0237] 실시예 13

[0238] 이 실시예에서, 기질로서 루부소사이드를 사용하여 UGT76G1과 조합된 HV1 활성을 분석하였다.

[0239] 레부소사이드 기질을 상기 실시예에 사용된 것과 유사한 조건 하에 UGT-SUS 커플링 반응 시스템에서 재조합 HV1 폴리펩타이드, UGT76G1 및 AtSUS1과 항온처리하였다. HPLC에 의해 생성물을 분석하였다. 도 13에 도시된 바대로, 재조합 HV1 폴리펩타이드, UGT76G1 및 AtSUS1의 조합에 의해 Reb V 및 Reb W를 제조하였다. 따라서, 1,2-19-O-글루코스 및 1,2-13-O-글루코스 글라이코실화 활성을 나타낸, 재조합 HV1 폴리펩타이드를 스테비올 글라이코사이드의 복잡한 다단계 생합성을 위해 다른 UGT 효소(예컨대, 1,3-13-O-글루코스 및 1,3-19-O-글루코스 글라이코실화 활성을 나타낸, UGT76G1)와 조합하여 사용할 수 있다. HV1 재조합 단백질이 반응 시스템에서 GS 융합 단백질과 조합될 때, Reb V 및 Reb W는 이들 UGT 효소에 의해 또한 제조되어서, UGT-SUS 커플링 반응이 GS 융합 단백질에 의해 생성될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0240] 실시예 14

[0241] 이 실시예에서, 기질로서 루부소사이드를 사용하여 UGT76G1과 조합된 EUGT11 활성을 분석하였다.

[0242] 레부소사이드 기질을 상기 실시예에 사용된 것과 유사한 조건 하에 UGT-SUS 커플링 반응 시스템에서 재조합 EUGT11 폴리펩타이드, UGT76G1 및 AtSUS1과 항온처리하였다. HPLC에 의해 생성물을 분석하였다. 도 14에 도시된 바대로, 재조합 EUGT11 폴리펩타이드, UGT76G1 및 AtSUS1의 조합에 의해 Reb W를 제조하였다. 따라서, 1,2-19-O-글루코스 및 1, 2-13-O-글루코스 글라이코실화 활성을 나타낸, 재조합 EUGT11 폴리펩타이드를 스테비올 글라이코사이드의 복잡한 다단계 생합성을 위해 다른 UGT 효소(예컨대, 1,3-13-O-글루코스 및 1,3-19-O-글루코스 글라이코실화 활성을 나타낸, UGT76G1)와 조합하여 사용할 수 있다. EUGT11 재조합 단백질이 반응 시스템에서 GS

융합 단백질과 조합될 때, Reb W는 이들 UGT 효소에 의해 또한 제조되어서, UGT-SUS 커플링 반응이 GS 융합 단백질에 의해 생성될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0243] 실시예 15

[0244] 이 실시예에서, 기질로서 Reb G를 사용하여 UGT76G1과 조합된 HV1 활성을 분석하였다.

[0245] Reb G 기질을 상기 실시예에 사용된 것과 유사한 조건 하에 UGT-SUS 커플링 반응 시스템에서 재조합 HV1 폴리펩타이드, UGT76G1 및 AtSUS1과 항온처리하였다. HPLC에 의해 생성물을 분석하였다. 도 15에 도시된 바대로, 재조합 HV1 폴리펩타이드, UGT76G1 및 AtSUS1의 조합에 의해 Reb V 및 Reb W를 제조하였다. 12시간 후, 모든 루부소사이드 기질을 Reb V로 전환시키고, 36시간 후, 모든 제조된 Reb V를 Reb W로 전환시켰다. 따라서, 1,2-19-O-글루코스 및 1,2-13-O-글루코스 글라이코실화 활성을 나타낸, 재조합 HV1 폴리펩타이드를 스테비올 글라이코사이드의 복잡한 다단계 생합성을 위해 다른 UGT 효소(예컨대, 1,3-13-O-글루코스 및 1,3-19-O-글루코스 글라이코실화 활성을 나타낸, UGT76G1)와 조합하여 사용할 수 있다. HV1 재조합 단백질이 반응 시스템에서 GS 융합 단백질과 조합될 때, Reb V 및 Reb W는 이들 UGT 효소에 의해 또한 제조되어서, UGT-SUS 커플링 반응이 GS 융합 단백질에 의해 생성될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0246] 실시예 16

[0247] 이 실시예에서, 기질로서 Reb G를 사용하여 UGT76G1과 조합된 EUGT11 활성을 분석하였다.

[0248] Reb G 기질을 상기 실시예에 사용된 것과 유사한 조건 하에 UGT-SUS 커플링 반응 시스템에서 재조합 EUGT11 폴리펩타이드, UGT76G1 및 AtSUS1과 항온처리하였다. HPLC에 의해 생성물을 분석하였다. 도 16에 도시된 바대로, 재조합 EUGT11 폴리펩타이드, UGT76G1 및 AtSUS1의 조합에 의해 Reb W를 제조하였다. 따라서, 1,2-19-O-글루코스 및 1, 2-13-O-글루코스 글라이코실화 활성을 나타낸, 재조합 EUGT11 폴리펩타이드를 스테비올 글라이코사이드의 복잡한 다단계 생합성을 위해 다른 UGT 효소(예컨대, 1,3-13-O-글루코스 및 1,3-19-O-글루코스 글라이코실화 활성을 나타낸, UGT76G1)와 조합하여 사용할 수 있다. EUGT11 재조합 단백질이 반응 시스템에서 GS 융합 단백질과 조합될 때, Reb W는 이들 UGT 효소에 의해 또한 제조되어서, UGT-SUS 커플링 반응이 GS 융합 단백질에 의해 생성될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0249] 실시예 17

[0250] 이 실시예에서, 기질로서 Reb D를 사용하여 UGT76G1 및 GS 융합 효소 활성을 분석하였다.

[0251] Reb D 기질을 상기 실시예에 사용된 것과 유사한 조건 하에 재조합 UGT76G1과 항온처리하였다. HPLC에 의해 생성물을 분석하였다. 도 22에 도시된 바대로, Reb M을 반응에서 AtSUS1의 존재(도 22 D 및 G) 또는 부재(도 22 C 및 F) 하에 UGT76G1에 의해 제조하였다. 따라서, 1,3-19-O-글루코스 글라이코실화 활성을 나타낸, 재조합 UGT76G1 폴리펩타이드를 레바우디오사이드 M의 생합성에서 사용할 수 있다. Reb D는 UGT-SUS 커플링 반응 시스템에서 재조합 UGT76G1에 의해 Reb M으로 완전히 전환되었다(도 22G). 그러나, 오직 부분의 Reb D가 AtSUS1에 커플링되지 않으면서 재조합 UGT76G1 폴리펩타이드 단독에 의해 6시간 후 Reb M으로 전환되어서(F), AtSUS1이 UGT-SUS 커플링 시스템에서 전환 효율을 증대시킨다는 것을 나타낸다. GS 융합 단백질은 동일한 반응 조건 하에 UGT76G1-AtSUS1 커플링 반응과 유사한 활성을 나타냈다(E, H). 모든 Reb D는 6시간에 GS에 의해 Reb M으로 완전히 전환되어서(H), UGT-SUS 커플링 반응이 GS 융합 단백질에 의해 생성될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0252] 실시예 18

[0253] 이 실시예에서, 기질로서 Reb E를 사용하여 UGT76G1 및 GS 융합 효소 활성을 분석하였다.

[0254] Reb E 기질을 상기 실시예에 사용된 것과 유사한 조건 하에 재조합 UGT76G1 또는 GS 융합 효소와 항온처리하였다. HPLC에 의해 생성물을 분석하였다. 도 23에 도시된 바대로, Reb D를 AtSUS1 존재(도 23 E, H 및 K) 또는 부재(도 22 D, G 및 J) 및 GS 융합 효소 부재(도 23 F, I 및 L) 하에 UGT76G1에 의해 제조하였다. 더욱이, Reb M은 반응에서 제조된 Reb D로부터 형성되었다. 따라서, 1,3-13-O-글루코스 및 1,3-19-O-글루코스 글라이코실화 활성을 나타낸, 재조합 UGT76G1 폴리펩타이드를 레바우디오사이드 D 및 레바우디오사이드 M의 생합성에서 사용할 수 있다. Reb E는 24시간 후 UGT-SUS 커플링 반응 시스템에서 재조합 UGT76G1에 의해 Reb M으로 완전히 전환되었다(도 23K). 그러나, 오직 Reb D가 AtSUS1에 커플링되지 않으면서 재조합 UGT76G1 폴리펩타이드 단독에 의해 24시간 후 완전히 Reb E로부터 전환되어서(J), AtSUS1이 계속적인 UDPG 제조를 통해 UGT-SUS 커플링 시스템에서 전환 효율을 증대시킨다는 것을 나타낸다. GS 융합 단백질은 동일한 반응 조건 하에 UGT76G1-AtSUS1 커플링 반응과 유사한 활성을 나타내어서(도 23 F, I 및 L), UGT-SUS 커플링 반응이 GS 융합 단백질에 의해 생성될

수 있다는 것을 나타낸다.

[0255] 실시예 19

[0256] 이 실시예에서, 기질로서 스테비오사이드를 사용하여 UGT76G1과 조합된 HV1 활성을 분석하였다.

[0257] 스테비오사이드 기질을 상기 실시예에 사용된 것과 유사한 조건 하에 재조합 HV1 폴리펩타이드 및 UGT76G1 또는 GS 융합 효소와 항온처리하였다. HPLC에 의해 생성물을 분석하였다. 도 24에 도시된 바대로, Reb A를 모든 반응에서 재조합 HV1 폴리펩타이드 및 UGT76G1의 조합에 의해 제조하였다. 더욱이, Reb D 및 Reb M은 재조합 HV1 폴리펩타이드, UGT76G1 폴리펩타이드 및 AtSUS1의 조합(도 24 E, H 및 K) 또는 재조합 GS 융합 효소 및 HV1 폴리펩타이드의 조합(도 24 F, I 및 L)을 사용하여 반응에서 검출되었다. 1,2-19-O-글루코스 글라이코실화 활성을 나타낸, 재조합 HV1 폴리펩타이드를 레바우디오사이드 D 및 레바우디오사이드 M의 복잡한 다단계 생합성을 위해 다른 UGT 효소(예컨대, 1,3-13-O-글루코스 및 1,3-19-O-글루코스 글라이코실화 활성을 나타낸, UGT76G1)와 조합하여 사용할 수 있다. 결과는 또한 AtSUS1이 계속적인 UDPG 제조를 통해 UGT-SUS 커플링 시스템에서 전환 효율을 증대시킨다는 것을 나타낸다(도 24 E, H 및 K). GS 융합 단백질이 동일한 반응 조건 하에 UGT76G1-AtSUS1 커플링 반응과 유사한 활성을 나타내어서(도 24 F, I 및 L), UGT-SUS 커플링 반응이 GS 융합 단백질에 의해 생성될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0258] 실시예 20

[0259] 이 실시예에서, 기질로서 Reb A를 사용하여 UGT76G1과 조합된 HV1 활성을 분석하였다.

[0260] Reb A 기질을 상기 실시예에 사용된 것과 유사한 조건 하에 재조합 HV1 폴리펩타이드 및 UGT76G1 또는 GS 융합 효소와 항온처리하였다. HPLC에 의해 생성물을 분석하였다. 도 25에 도시된 바대로, Reb D를 모든 반응에서 재조합 HV1 폴리펩타이드 및 UGT76G1의 조합에 의해 제조하였다. 더욱이, Reb M은 재조합 HV1 폴리펩타이드, UGT76G1 폴리펩타이드 및 AtSUS1의 조합(도 25 D, G 및 J) 또는 재조합 GS 융합 효소 및 HV1 폴리펩타이드의 조합(도 25 E, H 및 K)을 사용하여 반응에서 검출되었다. 1,2-19-O-글루코스 글라이코실화 활성을 나타낸, 재조합 HV1 폴리펩타이드를 레바우디오사이드 D 및 레바우디오사이드 M의 복잡한 다단계 생합성을 위해 다른 UGT 효소(예컨대, 1,3-19-O-글루코스 글라이코실화 활성을 나타낸, UGT76G1)와 조합하여 사용할 수 있다. 결과는 또한 AtSUS1이 계속적인 UDPG 제조를 통해 UGT-SUS 커플링 시스템에서 전환 효율을 증대시킨다는 것을 나타낸다(도 25 D, G 및 J). GS 융합 단백질이 동일한 반응 조건 하에 UGT76G1-AtSUS1 커플링 반응과 유사한 활성을 나타내어서(도 25 E, H 및 K), UGT-SUS 커플링 반응이 GS 융합 단백질에 의해 생성될 수 있다는 것을 나타낸다.

[0261] 실시예 21

[0262] 이 실시예에서, NMR에 의해 Reb V의 구조를 분석하였다.

[0263] Reb V의 규명에 사용된 재료를 Reb G의 효소 전환으로부터 제조하고 HPLC에 의해 정제하였다. HRMS 데이터를 이의 해상을 30k로 설정하면서 LTQ 오비트랩 디스커버리(Orbitrap Discovery) HRMS 장치에 의해 생성시켰다. 포지티브 이온 전기분무 방식으로 *m/z* 150 내지 1500의 스캐닝된 데이터. 니들 전압을 4kV로 설정하고; 다른 소스 조건은 시쓰 가스(sheath gas) = 25, 옥스 가스(aux gas) = 0, 스위프 가스(sweep gas) = 5(임의 단위의 모든 가스 흐름), 모세관 전압 = 30V, 모세관 온도 = 300℃, 및 관 렌즈 전압 = 75이었다. 샘플을 2:2:1 아세토나이트릴:메탄올:물(인퓨전 용리제와 동일)에 의해 희석하고 50마이크로리터를 주입하였다. NMR 스펙트럼을 표준 펄스 서열을 사용하여 브루커 어드밴스(Bruker Avance) DRX 500 MHz 또는 배리언 이노바(Varian INOVA) 600 MHz 장치에서 획득하였다. 1D (^{1}H 및 ^{13}C) 및 2D (TOCSY, HMQC, 및 HMBC) NMR 스펙트럼을 C_5D_5N 중에 수행하였다.

[0264] Reb V의 분자식은 이의 포지티브 고해상(HR) 질량 스펙트럼에 기초하여 $C_{44}H_{70}O_{23}$으로 추론되었고, 이것은 *m/z* 989.4198에서 $[M+Na]^+$에 상응하는 부가물 이온을 나타내고; 이 조성물은 ^{13}C NMR 스펙트럼 데이터에 의해 지지되었다. Reb V의 ^{1}H NMR 스펙트럼 데이터는 스테비아 속으로부터 조기에 *엔트*-카우란 다이테르페노이드에 대해 특징적인 δ 0.97 및 1.40에서의 2개의 메틸 일중항, 엑소사이클릭 이중 결합의 δ 5.06 및 5.71에서의 일중항으로서 2개의 올레핀성 양성자, 9개의 sp3 메틸렌 및 δ 0.74-2.72의 2개의 sp3 메틴 양성자의 존재를 보여주었다. *엔트*-카우란 다이테르페노이드의 기본 골격은 중요한 상관관계를 나타낸 COSY 및 TOCSY 연구에 의해 지지되었다: 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 V의 ^{1}H NMR 스펙트럼은 또한 δ 5.08, 5.38, 5.57 및 6.23에서 공명하는 4개의 아노머 양성자의 존재를 보여주고; 이의 구조에서 4개의 당 단위를 제

안하였다. 5% H_2SO_4에 의한 Reb V의 산 가수분해는 TLC에 의한 어센틱 샘플과의 직접 비교에 의해 확인된 D-글루코스를 제공하였다. Reb V의 효소 가수분해는 표준 화합물과의 ^{1}H NMR 및 공동-TLC의 비교에 의해 스테비올로서 확인된 아글리콘을 제공하였다. δ 5.08 (d, *J*=7.8 Hz), 5.38 (d, *J*=8.1 Hz), 5.57 (d, *J*=8.0 Hz) 및 6.23 (d, *J*=7.8 Hz)에서의 글루코스 모이어티의 4개의 아노머 양성자에 대해 관찰된 큰 커플링 상수는 스테비올 글라이코사이드에 대해 보고된 바대로 이의 β-배향을 제안하였다. Reb V에 대한 ^{1}H 및 ^{13}C NMR 값은 TOCSY, HMQC 및 HMBC 데이터에 기초하여 배정되고, 표 3에 기재되어 있다.

표 3

Reb V 및 Reb G에 대한 ^{1}H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼 데이터(화학 이동 및 커플링 상수)[a-c].

위치	Reb V		Reb G	
	^{1}H NMR	^{13}C NMR	^{1}H NMR	^{13}C NMR
1	0.74 m, 1.66 m	41.1	0.78 m, 1.69 m	41.3
2	1.43 m, 2.18 m	20.4	1.44 m, 2.20 m	20.0
3	1.06 m, 2.72 d (12.8)	38.4	1.05 m, 2.70 d (11.6)	38.8
4	---	44.8	---	44.9
5	1.32 m	57.9	1.32 m	57.8
6	1.84 m, 2.20 m	22.7	1.87 m, 2.24 m	22.6
7	1.06 m, 1.70 m	42.2	1.07 m, 1.72 m	42.2
8	---	42.5	---	43.1
9	0.91 d (7.8)	54.5	0.92 d (7.6)	54.4
10	---	40.2	---	40.4
11	1.72 m	21.0	1.75 m	21.2
12	2.18 m, 2.38 m	38.3	2.26 m, 2.38 m	37.7
13	---	87.6	---	86.4
14	1.68 m, 2.43 m	44.8	1.78 m, 2.50 m	44.6
15	1.96 m, 2.24 m	48.9	2.06 m, 2.32 m	48.2
16	---	153.7	---	155.0
17	5.06 s, 5.71 s	105.7	5.00 s, 5.49 s	104.8
18	1.40 s	29.6	1.32 s	28.8
19	---	176.4	---	177.4
20	0.97 s	16.7	1.25 s	16.2
1'	6.23 d (7.8)	94.2	6.16 d (7.6)	96.4
2'	3.98 m	74.5	4.01 m	74.5
3'	4.14 m	79.3	4.09 m	79.3
4'	4.36 m	71.6	4.34 m	71.6
5'	4.24 m	79.9	4.22 m	79.9
6'	4.06 m, 4.48 m	62.6	4.04 m, 4.44 dd (3.2, 7.6)	62.6
1"	5.08 d (7.8)	99.6	5.06 d (7.4)	99.9
2"	3.94 m	74.7	3.92 m	74.5
3"	4.04 m	89.3	4.06 m	89.5
4"	4.28 m	71.2	4.23 m	71.0
5"	4.00 m	78.2	4.02 m	78.1
6"	4.24 m, 4.58 m	63.0	4.27 m, 4.56 dd (2.8, 8.4)	63.1
1"'	5.38 d (8.1)	106.4	5.27 d (8.4)	106.5
2"'	4.16 m	76.1	4.14 m	76.0
3"'	4.34 m	79.2	4.37 m	79.3
4"'	4.26 m	72.2	4.28 m	72.2
5"'	3.78 m	78.8	3.89 m	78.8
6"'	4.14 m, 4.44 m	63.2	4.18 m, 4.48 m	63.2
1""	5.57 d (8.0)	105.7		

[0265]

2""	3.96 m	76.5		
3""	4.32 m	79.6		
4""	4.20 m	72.5		
5""	3.87 m	79.0		
6""	4.12 m, 4.46 m	63.5		

[a] TOCSY, HMQC 및 HMBC 상관관계에 기초하여 이루어진 배정; [b] 화학 이동 값은 δ (ppm) 단위이고; [c] 커플링 상수는 Hz 단위이다.

[0266]

[0267] Reb V의 NMR 스펙트럼 데이터 및 가수분해 실험으로부터의 결과에 기초하여, 아글리콘 스테비올에 연결된 이의 구조에서 4개의 β-D-글루코실 단위가 있다는 것이 결론지어졌다. Reb V와 Reb G의 ^{1}H 및 ^{13}C NMR 값의 면밀한 비교는, 제4 β-D-글루코실 모이어티의 배정을 남기면서, 에터 연결의 형태의 C-13에서의 3-O-β-D-글루코바이오실 단위 및 에스터 연결의 형태의 C-19 위치에서의 또 다른 β-D-글루코실 단위를 가지는 스테비올 아글리콘 모이어티의 존재를 제안하였다(도 17). β-D-글루코실 모이어티의 당 I의 2-위치에서의 ^{1}H 및 ^{13}C 화학 이동 둘 다에 대한 하향 이동은 이 위치에서 β-D-글루코실 단위의 존재를 지지하였다. 구조는 도 18에 도시된 바대로 중요한 TOCSY 및 HMBC 상관관계에 의해 추가로 지지되었다. NMR 및 질량 스펙트럼 데이터, 및 가수분해 연구의 결과에 기초하여, Reb G의 효소 전환에 의해 생성된 Reb V의 구조는 13-[(3-*O*-β-D-글루코피라노실-β-D-글루코피라노실)옥시] *엔트*-카우르-16-엔-19-온산-(2-*O*-β-D-글루코피라노실-β-D-글루코피라노실) 에스터로서 추론되었다.

[0268] Reb V의 산 가수분해. MeOH(10mℓ) 중의 Reb V(5mg)의 용액에 3mℓ의 5% H_2SO_4를 첨가하고, 혼합물을 24시간 동안 환류시켰다. 이후, 반응 혼합물을 포화 탄산나트륨에 의해 중화시키고, 에틸 아세테이트(EtOAc)(2x25mℓ)에 의해 추출하여 당을 함유하는 수성 분획 및 아글리콘 부분을 함유하는 EtOAc 분획을 제공하였다. 수상을 농축하고 TLC 시스템 EtOAc/*n*-뷰탄올/물(2:7:1) 및 CH_2Cl_2/MeOH/물(10:6:1)을 사용하여 표준 당과 비교하고; 당은 D-글루코스로서 확인되었다.

[0269] Reb V의 효소 가수분해. Reb V(1mg)를 10mℓ의 0.1M 아세트산나트륨 완충제(pH 4.5) 중에 용해시키고, 아스퍼질러스 니게르(Aspergillus niger)로부터의 미정제 펙티나제(50㎕, Sigma-Aldrich, P2736)를 첨가하였다. 혼합물을 50℃에서 96시간 동안 교반하였다. 1의 가수분해로부터의 반응 동안 침전된 생성물은 표준 화합물과의 이의 공동-TLC의 비교 및 ^{1}H NMR 스펙트럼 데이터에 의해 스테비올로서 확인되었다. Reb V라 칭해진 화합물은, 광범위한 1D 및 2D NMR, 및 고해상 질량 스펙트럼 데이터 및 가수분해 연구에 기초하여, 13-[(3-*O*-β-D-글루코피라노실-β-D-글루코피라노실)옥시] *엔트*-카우르-16-엔-19-온산-(2-*O*-β-D-글루코피라노실-β-D-글루코피라노실) 에스터로서 확인되었다.

[0270] 실시예 22

[0271] 이 실시예에서, NMR에 의해 Reb W의 구조를 분석하였다.

[0272] Reb W의 규명에 사용된 재료를 Reb V의 효소 전환으로부터 제조하고 HPLC에 의해 정제하였다. HRMS 데이터를 이의 해상을 30k로 설정하면서 LTQ 오비트랩 디스커버리 HRMS 장치에 의해 생성시켰다. 포지티브 이온 전기분무 방식으로 *m/z* 150 내지 1500의 스캐닝된 데이터. 니들 전압을 4kV로 설정하고; 다른 소스 조건은 시쓰 가스 = 25, 옥스 가스 = 0, 스위프 가스 = 5(임의 단위의 모든 가스 흐름), 모세관 전압 = 30V, 모세관 온도 = 300℃, 및 관 렌즈 전압 = 75이었다. 샘플을 2:2:1 아세토나이트릴:메탄올:물(인퓨전 용리제와 동일)에 의해 희석하고 50마이크로리터를 주입하였다. NMR 스펙트럼을 표준 펄스 서열을 사용하여 브루커 어드밴스 DRX 500 MHz 또는 배리언 이노바 600 MHz 장치에서 획득하였다. 1D (^{1}H 및 ^{13}C) 및 2D (TOCSY, HMQC, 및 HMBC) NMR 스펙트럼을 C_5D_5N 중에 수행하였다.

[0273] Reb W의 분자식은 이의 포지티브 고해상(HR) 질량 스펙트럼에 기초하여 $C_{50}H_{80}O_{28}$로 추론되었고, 이것은 *m/z* 1151.4708에서 $[M+Na]^{+}$에 상응하는 부가물 이온을 나타내고; 이 조성물은 ^{13}C NMR 스펙트럼 데이터에 의해 지지되었다. Reb W의 ^{1}H NMR 스펙트럼은 스테비아 속으로부터 조기에 단리된 *엔트*-카우란 다이테르페노이드에 대해 특징적인 δ 0.92 및 1.39에서의 2개의 메틸 일중항, 엑소사이클릭 이중 결합의 δ 5.10 및 5.73에서의 일중항으로서 2개의 올레핀성 양성자, 9개의 sp3 메틸렌 및 δ 0.72-2.72의 2개의 sp3 메틴 양성자의 존재를 보여주었

다. *엔트-카우란* 다이테르페노이드의 기본 골격은 중요한 상관관계를 나타낸 TOCSY 연구에 의해 지지되었다: 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 W의 ^{1}H NMR 스펙트럼은 또한 δ 5.10, 5.34, 5.41, 5.81 및 6.14에서 공명하는 5개의 아노머 양성자의 존재를 보여주고; 이의 구조에서 5개의 당 단위를 제안하였다. 5% H_2SO_4에 의한 Reb W의 산 가수분해는 TLC에 의한 어센틱 샘플과의 직접 비교에 의해 확인된 D-글루코스를 제공하였다. Reb W의 효소 가수분해는 표준 화합물과의 공동-TLC의 비교에 의해 스테비올로서 확인된 아글리콘을 제공하였다. δ 5.10 (d, *J*=7.4 Hz), 5.34 (d, *J*=7.9 Hz), 5.41 (d, *J*=7.9 Hz), 5.89 (d, *J*=7.9 Hz) 및 6.14 (d, *J*=7.9 Hz)에서의 글루코스 모이어티의 5개의 아노머 양성자에 대해 관찰된 큰 커플링 상수는 스테비올 글라이코사이드[1-5, 9-13]에 대해 보고된 바대로 이의 β-배향을 제안하였다. Reb W에 대한 ^{1}H 및 ^{13}C NMR 값은 TOCSY, HMQC 및 HMBC 데이터에 기초하여 배정되고, 표 4에 기재되어 있다.

표 4

Reb W 및 Reb V에 대한 ^{1}H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼 데이터(화학 이동 및 커플링 상수)[a-c].

위치	Reb W		Reb V	
	^{1}H NMR	^{13}C NMR	^{1}H NMR	^{13}C NMR
1	0.72 m, 1.67 m	41.0	0.78 m, 1.69 m	41.1
2	1.42 m, 2.18 m	20.4	1.44 m, 2.20 m	20.4
3	1.06 m, 2.72 d (13.4)	38.6	1.05 m, 2.70 d (11.6)	38.4
4	---	44.8	---	44.8
5	1.34 m	57.9	1.32 m	57.9
6	1.84 m, 2.18 m	22.8	1.87 m, 2.24 m	22.7
7	1.07 m, 1.69 m	42.3	1.07 m, 1.72 m	42.2
8	---	42.4	---	42.5
9	0.90 d (5.8)	54.5	0.92 d (7.6)	54.5
10	---	40.1	---	40.2
11	1.66 m	21.0	1.75 m	21.0
12	2.20 m, 2.39 m	38.3	2.26 m, 2.38 m	38.3
13	---	87.8	---	87.6
14	1.63 m, 2.06 m	44.8	1.78 m, 2.50 m	44.8
15	2.06 m, 2.04 m	48.8	2.06 m, 2.32 m	48.9
16	---	153.5	---	153.7
17	5.10 s, 5.73 s	105.9	5.00 s, 5.49 s	105.7
18	1.39 s	29.4	1.32 s	29.6
19	---	176.5	---	176.4
20	0.92 s	16.6	1.25 s	16.7
1'	6.14 d (7.9)	94.1	6.16 d (7.6)	94.2
2'	3.98 m	79.6	4.01 m	80.7
3'	4.20 m	88.9	4.09 m	79.3
4'	4.34 m	70.0	4.34 m	71.2
5'	4.24 m	79.4	4.22 m	79.9
6'	4.02 m, 4.39	62.6	4.04 m, 4.44 dd (3.2, 7.6)	62.6
1"	5.10 d (7.4)	99.5	5.06 d (7.4)	99.6
2"	3.90 m	74.7	3.92 m	74.7
3"	4.04 m	89.3	4.06 m	89.3
4"	4.25 m	70.4	4.23 m	70.3
5"	3.98 m	78.6	4.02 m	78.2
6"	4.27 m, 4.54 m	62.9	4.27 m, 4.56 dd (2.8, 8.4)	63.0
1"'	5.34 d (7.9)	106.3	5.27 d (8.4)	106.4
2"'	4.12 m	76.1	4.14 m	76.1
3"'	4.33 m	79.2	4.37 m	79.2
4"'	4.25 m	72.1	4.28 m	72.2
5"'	3.88 m	78.8	3.89 m	78.8
6"'	4.16 m, 4.53 m	63.0	4.18 m, 4.48 m	63.2
1""	5.41 d (7.9)	105.3	5.27 d (8.4)	105.7

[0274]

2""	4.12 m	73.4	4.14 m	76.5
3""	4.28 m	88.9	4.37 m	79.6
4""	4.20 m	72.1	4.28 m	72.5
5""	3.78 m	79.0	3.89 m	79.0
6""	4.08 m, 4.42 m	62.9	4.18 m, 4.48 m	63.5
1""'	5.81 d (7.9)	104.0		
2""'	4.09 m	77.2		
3""'	4.24 m	79.3		
4""'	4.14 m	72.0		
5""'	3.76 m	79.2		
6""'	4.04 m, 4.36 m	62.3		

[a] TOCSY, HMQC 및 HMBC 상관관계에 기초하여 이루어진 배정; [b] 화학 이동 값은 δ (ppm) 단위이고; [c] 커플링 상수는 Hz 단위이다.

[0275]

[0276] Reb W의 NMR 스펙트럼 데이터 및 가수분해 실험으로부터의 결과에 기초하여, 아글리콘 스테비올에 연결된 이의 구조에서 5개의 β-D-글루코실 단위가 있다는 것이 결론지어졌다. Reb W와 Reb V의 ^{1}H 및 ^{13}C NMR 값의 면밀한 비교는, 제5 β-D-글루코실 모이어티의 배정을 남기면서, 에터 연결의 형태의 C-13에서의 3-O-β-D-글루코바이오실 단위 및 에스터 연결의 형태의 C-19 위치에서의 2-O-β-D-글루코바이오실 단위를 가지는 스테비올 아글리콘 모이어티의 존재를 제안하였다(도 19). β-D-글루코실 모이어티의 당 I의 3-위치에서의 ^{1}H 및 ^{13}C 화학 이동 둘 다에 대한 하향 이동은 이 위치에서 β-D-글루코실 단위의 존재를 지지하였다. 구조는 도 20에 도시된 바대로 중요한 TOCSY 및 HMBC 상관관계에 의해 추가로 지지되었다. NMR 및 질량 스펙트럼 데이터, 및 가수분해 연구의 결과에 기초하여, Reb V의 효소 전환에 의해 생성된 Reb W의 구조는 13-[(3-*O*-β-D-글루코피라노실-β-D-글루코피라노실)옥시] *엔트*-카우르-16-엔-19-온산-[(2-*O*-β-D-글루코피라노실-3-*O*-β-D-글루코피라노실-β-D-글루코피라노실) 에스터로서 추론되었다.

[0277] Reb W의 산 가수분해. MeOH(10㎖) 중의 Reb W(5mg)의 용액에 3㎖의 5% H_2SO_4 를 첨가하고, 혼합물을 24시간 동안 환류시켰다. 이후, 반응 혼합물을 포화 탄산나트륨에 의해 중화시키고, 에틸 아세테이트(EtOAc)(2x25㎖)에 의해 추출하여 당을 함유하는 수성 분획 및 아글리콘 부분을 함유하는 EtOAc 분획을 제공하였다. 수상을 농축하고 TLC 시스템 EtOAc/*n*-뷰탄올/물(2:7:1) 및 CH_2Cl_2/MeOH/물(10:6:1)을 사용하여 표준 당과 비교하고; 당은 D-글루코스로서 확인되었다.

[0278] Reb W의 효소 가수분해. Reb W(1mg)를 10㎖의 0.1M 아세트산나트륨 완충제(pH 4.5) 중에 용해시키고, 아스퍼질러스 니게르로부터의 미정제 펙티나제(50㎕, Sigma-Aldrich, P2736)를 첨가하였다. 혼합물을 50℃에서 96시간 동안 교반하였다. 생성물을 반응 동안 침전시키고 여과시키고 이후 결정화시켰다. Reb W의 가수분해로부터 얻은 생성된 생성물은 표준 화합물과의 이의 공동-TLC의 비교 및 ^{1}H NMR 스펙트럼 데이터에 의해 스테비올로서 확인되었다. Reb W라 칭해진 화합물은, 광범위한 1D 및 2D NMR, 및 고해상 질량 스펙트럼 데이터 및 가수분해 연구에 기초하여, 13-[(3-*O*-β-D-글루코피라노실-β-D-글루코피라노실)옥시] *엔트*-카우르-16-엔-19-온산-[(2-*O*-β-D-글루코피라노실-3-*O*-β-D-글루코피라노실-β-D-글루코피라노실) 에스터로서 확인되었다.

[0279] NMR 분석 후, Reb V 및 Reb W의 구조는 신규한 스테비올 글라이코사이드로서 확인되었다. 상기 결과는 UGT76G1이 1,3-13-O-글루코스 글라이코실화 활성뿐만 아니라, 1,3-19-O-글루코스 글라이코실화 활성을 가진다는 것을 추가로 입증하였다.

[0280] 실시예 23

[0281] 이 실시예에서, NMR에 의해 Reb M의 구조를 분석하였다.

[0282] Reb M의 규명에 사용된 재료를 Reb D의 효소 전환으로부터 제조하고 HPLC에 의해 정제하였다. HRMS 데이터를 이의 해상을 30k로 설정하면서 LTQ 오비트랩 디스커버리 HRMS 장치에 의해 생성시켰다. 포지티브 이온 전기분무 방식으로 m/z 150 내지 1500의 스캐닝된 데이터. 니들 전압을 4kV로 설정하고; 다른 소스 조건은 시쓰 가스 = 25, 옥스 가스 = 0, 스위프 가스 = 5(임의 단위의 모든 가스 흐름), 모세관 전압 = 30V, 모세관 온도 = 300℃, 및 관 렌즈 전압 = 75이었다. 샘플을 2:2:1 아세토나이트릴:메탄올:물(인퓨전 용리제와 동일)에 의해 희석하고 50마이크로리터를 주입하였다.

[0283] NMR 스펙트럼을 표준 펄스 서열을 사용하여 브루커 어드밴스 DRX 500 MHz 또는 배리언 이노바 600 MHz 장치에서 획득하였다. 1D (^{1}H 및 ^{13}C) 및 2D (COSY, HMQC 및 HMBC) NMR 스펙트럼을 C_5D_5N 중에 수행하였다.

[0284] 화합물 Reb M의 분자식은 이의 포지티브 고해상(HR) 질량 스펙트럼에 기초하여 $C_{56}H_{90}O_{33}$으로 추론되었고, 이것은 m/z 1349.5964에서 $[M+NH_4+CH_3CN]^+$ 이온을 나타내고; 이 조성물은 ^{13}C NMR 스펙트럼 데이터에 의해 지지되었다.

[0285] Reb M의 ^{1}H NMR 스펙트럼은 스테비아 속으로부터 조기에 단리된 엔트-카우란 다이테르페노이드에 대해 특징적인 δ 1.35 및 1.42에서의 2개의 메틸 일중항, 엑소사이클릭 이중 결합의 δ 4.92 및 5.65에서의 일중항으로서 2개의 올레핀성 양성자, 9개의 메틸렌 및 δ 0.77-2.77의 2개의 메틴 양성자의 존재를 보여주었다. 엔트-카우란 다이테르페노이드의 기본 골격은 COSY(H-1/H-2; H-2/H-3; H-5/H-6; H-6/H-7; H-9/H-11; H-11/H-12) 및 HMBC(H-1/C-2, C-10; H-3/C-1, C-2, C-4, C-5, C-18, C-19; H-5/C-4, C-6, C-7, C-9, C-10, C-18, C-19, C-20; H-9/C-8, C-10, C-11, C-12, C-14, C-15; H-14/C-8, C-9, C-13, C-15, C-16 및 H-17/C-13, C-15, C-16) 상관관계에 의해 지지되었다. Reb M의 ^{1}H NMR 스펙트럼은 또한 δ 5.33, 5.47, 5.50, 5.52, 5.85 및 6.43에서 공명하는 아노머 양성자의 존재를 보여주고; 이의 구조에서 6개의 당 단위를 제안하였다. Reb M의 효소 가수분해는 표준 화합물과의 공동-TLC의 비교에 의해 스테비올로서 확인된 아글리콘을 제공하였다. 5% H_2SO_4에 의한 Reb M의 산 가수분해는 TLC에 의한 어센틱 샘플에 의한 직접 비교에 의해 확인된 글루코스를 제공하였다. Reb M에서의 선택된 양성자 및 탄소에 대한 ^{1}H 및 ^{13}C NMR 값은 TOCSY, HMQC 및 HMBC 상관관계에 기초하여 배정되었다(표 5).

[0286] Reb M의 NMR 스펙트럼 데이터로부터의 결과에 기초하여, 이의 구조에서 6개의 글루코실 단위가 있다는 것이 결론지어졌다(도 26). Reb M과 레바우디오사이드 D의 ^{1}H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼의 면밀한 비교는 Reb M이 또한, 추가적인 글루코실 모이어티의 배정을 남기면서, 2,3-분지된 글루코트리오실 치환기로서 C-13 하이드록실에서 부착된 3개의 글루코스 잔기 및 C-19에서 에스터의 형태의 2-치환된 글루코바이오실 모이어티를 가지는 스테비올 글라이코사이드라는 것을 제안하였다. 도 27에 도시된 중요한 TOCSY 및 HMBC 상관관계는 당 I의 C-3 위치에서 제6 글루코실 모이어티의 배치를 제안하였다. δ 5.33 (d, J=8.4 Hz), 5.47 (d, J=7.8 Hz), 5.50 (d, J=7.4 Hz), 5.52 (d, J=7.4 Hz), 5.85 (d, J=7.4 Hz) 및 6.43 (d, J=7.8 Hz)에서 글루코스 모이어티의 6개의 아노머 양성자에 대해 관찰된 큰 커플링 상수는 스테비올 글라이코사이드에 대해 보고된 이의 β-배향을 제안하였다. 문헌으로부터 보고된 레바우디오사이드 M의 스펙트럼 값과의 비교하여 그리고 NMR 및 질량 스펙트럼 여누의 결과에 기초하여, 효소 반응에 의해 생성된 Reb M의 구조는 13-[(2-O-β-D-글루코피라노실-3-O-β-D-글루코피라노실-β-D-글루코피라노실)옥시] *엔트*-카우르-16-엔-19-온산-[(2-O-β-D-글루코피라노실-3-O-β-D-글루코피라노실-β-D-글루코피라노실) 에스터로서 배정되었다.

표 5

효소 반응에 의해 제조된 Reb M 에 대한 ^{1}H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼 데이터(화학 이동 및 커플링 상수)[a-c].

위치	^{1}H NMR	^{13}C NMR
1	0.77 t (12.4), 1.78 m	40.7
2	1.35 m, 2.24 m	20.0
3	1.01 m, 2.32 m	38.8
4	---	44.7
5	1.08 d (12.4)	57.8
6	2.23 m, 2.45 q (12.8)	23.9
7	1.44 m, 1.83 m	43.0
8	---	41.6
9	0.93 d (7.4)	54.7
10	---	40.1
11	1.68 m, 1.82 m	20.7
12	1.86 m, 2.28 m	38.8
13	---	88.0
14	2.04 m, 2.77 m	43.7
15	1.91 m, 2.03 m	46.8
16	---	153.8
17	4.92 s, 5.65 s	105.2
18	1.35 s	28.7
19	---	177.4
20	1.42 s	17.2
1'	6.43 d (7.8)	95.4
2'	4.54 m	77.3
3'	4.58 m	89.1
4'	4.22 m	70.5
5'	4.16 m	78.8
6'	4.18 m, 4.35 m	62.1
1"	5.50 d (7.4)	96.7
2"	4.19 m	81.9
3"	5.03 m	88.4
4"	4.12 m	70.8
5"	3.98 m	78.1
6"	4.22 m, 4.36 m	62.9
1"'	5.52 d (7.4)	105.4
2"'	4.24 m	76.0
3"'	4.16 m	78.9
4"'	4.02 m	73.6
5"'	3.78 ddd (2.8, 6.4, 9.4)	78.0
6"'	4.32 m, 4.54 m	64.4
1""	5.47 d (7.8)	104.4
2""	4.00 m	75.9
3""	4.40 m	78.2
4""	4.12 m	71.6

[0287]

5""	3.96 m	78.4
6""	4.20 m, 4.32 m	62.5
1""'	5 d (7.4)	104.7
2""'	4.20 m	75.9
3""'	4.30 m	78.9
4""'	4.14 m	73.7
5""'	3.94 ddd (2.8, 6.4, 9.9)	78.3
6""'	4.32 m, 4.67 d (10.6)	64.4
1"""	5.33 d (8.4)	104.6
2"""	3.98 m	76.2
3"""	4.43 m	78.5
4"""	4.16 m	71.7
5"""	3.88 ddd (2.1, 6.4, 9.4)	78.9
6"""	4.10 m, 4.35 m	62.5

[a] TOCSY, HSQC 및 HMBC 상관관계에 기초하여 이루어진 배정; [b] 화학 이동 값은 δ (ppm) 단위이고; [c] 커플링 상수는 Hz 단위이다.

[0288]

[0289] 화합물 1의 산 가수분해: MeOH(10㎖) 중의 생성된 Reb M(5mg)의 용액에 3㎖의 5% H_2SO_4 를 첨가하고, 혼합물을 24시간 동안 환류시켰다. 이후, 반응 혼합물을 포화 탄산나트륨에 의해 중화시키고, 에틸 아세테이트(EtOAc)(2x25㎖)에 의해 추출하여 당을 함유하는 수성 분획 및 아글리콘 부분을 함유하는 EtOAc 분획을 제공하였다. 수상을 농축하고 TLC 시스템 EtOAc/n-뷰탄올/물(2:7:1) 및 CH_2Cl_2/MeOH/물(10:6:1)을 사용하여 표준 당과 비교하고; 당은 D-글루코스로서 확인되었다.

[0290] 화합물의 효소 가수분해: 생성된 Reb M(1mg)을 10㎖의 0.1 M 아세트산나트륨 완충제(pH 4.5) 중에 용해시키고, 아스퍼질러스 니게르로부터의 미정제 펙티나제(50㎕, Sigma-Aldrich, P2736)를 첨가하였다. 혼합물을 50℃에서 96시간 동안 교반하였다. 1의 가수분해로부터 반응 동안 침전된 생성물은 표준 화합물과의 이의 공동-TLC의 비교 및 ^{1}H NMR 스펙트럼 데이터에 의해 스테비올로서 확인되었다.

[0291] 레바우디오사이드 M(Reb M)이라 칭하는 화합물이 바이오전환에 의해 얻어지고 제조되었다. 레바우디오사이드 M(Reb M)에 대한 완전한 ^{1}H 및 ^{13}C NMR 스펙트럼 배정은 광범위한 1D 및 2D NMR, 및 고해상 질량 스펙트럼 데이터에 기초하여 이루어지고, 이것은 13-[(2-O-β-D-글루코피라노실-3-O-β-D-글루코피라노실-β-D-글루코피라노실)옥시]
엔트-카우르-16-엔-19-온산-[(2-O-β-D-글루코피라노실-3-O-β-D-글루코피라노실-β-D-글루코피라노실)에스터로서 구조를 제시하였다.

[0292] 실시예 24

[0293] 이 실시예에서, 스테비올 글라이코사이드의 생합성 경로가 기재되어 있다.

[0294] 도 21은 루부소사이드로부터의 스테비올 글라이코사이드 생합성의 신규한 경로를 예시하는 반응식이다. 본 명세서에 기재된 바대로, 재조합 HV1 폴리펩타이드("HV1")는 레바우디오사이드 KA("Reb KA")를 제조하기 위해 제2 글루코사이드 모이어티를 루부소사이드의 19-O-글루코스의 C-2'로 전달하는 1,2-O-글루코스 글라이코실화 활성을 함유하거나; 재조합 EUGT11 폴리펩타이드("EUGT11")는 레바우디오사이드 KA를 제조하기 위해 제2 글루코스 모이어티를 루부소사이드의 19-O-글루코스의 C-2'로 전달하는 1,2-O-글루코스 글라이코실화 활성을 함유하거나; 스테비오사이드를 제조하기 위해 제2 글루코스 모이어티를 루부소사이드의 13-O-글루코스의 C-2'로 전달하거나; 재조합 UGT76G1 효소("UGT76G1")는 레바우디오사이드 G("Reb G")를 제조하기 위해 제2 글루코스 모이어티를 루부소사이드의 13-O-글루코스의 C-3'으로 전달하는 1,3-O-글루코스 글라이코실화 활성을 함유한다. HV1 및 EUGT11 둘 다는 레바우디오사이드 V("Reb V")를 제조하기 위해 제2 당 모이어티를 레바우디오사이드 G의 19-O-글루코스의 C-2'로 전달하거나, 레바우디오사이드 E("Reb E")를 제조하기 위해 제2 글루코스 모이어티를 레바우디오사이드 KA의 13-O-글루코스의 C-2'로 전달한다. 도 21은 또한 재조합 UGT76G1 효소가 레바우디오사이드 W("Reb W")를 제조하기 위해 제3 당 모이어티를 레바우디오사이드 V의 C-19-O-글루코스의 C-3'로 전달하는 반응을 촉매화하고, EUGT11은 레바우디오사이드 D2를 제조하기 위해 제3 글루코스 모이어티를 레바우디오사이드 E의 C-13-O-글루코스의 C-6'으로 계속해서 전달할 수 있다는 것을 보여준다. HV1은 레바우디오사이드 Z1("Reb Z1")

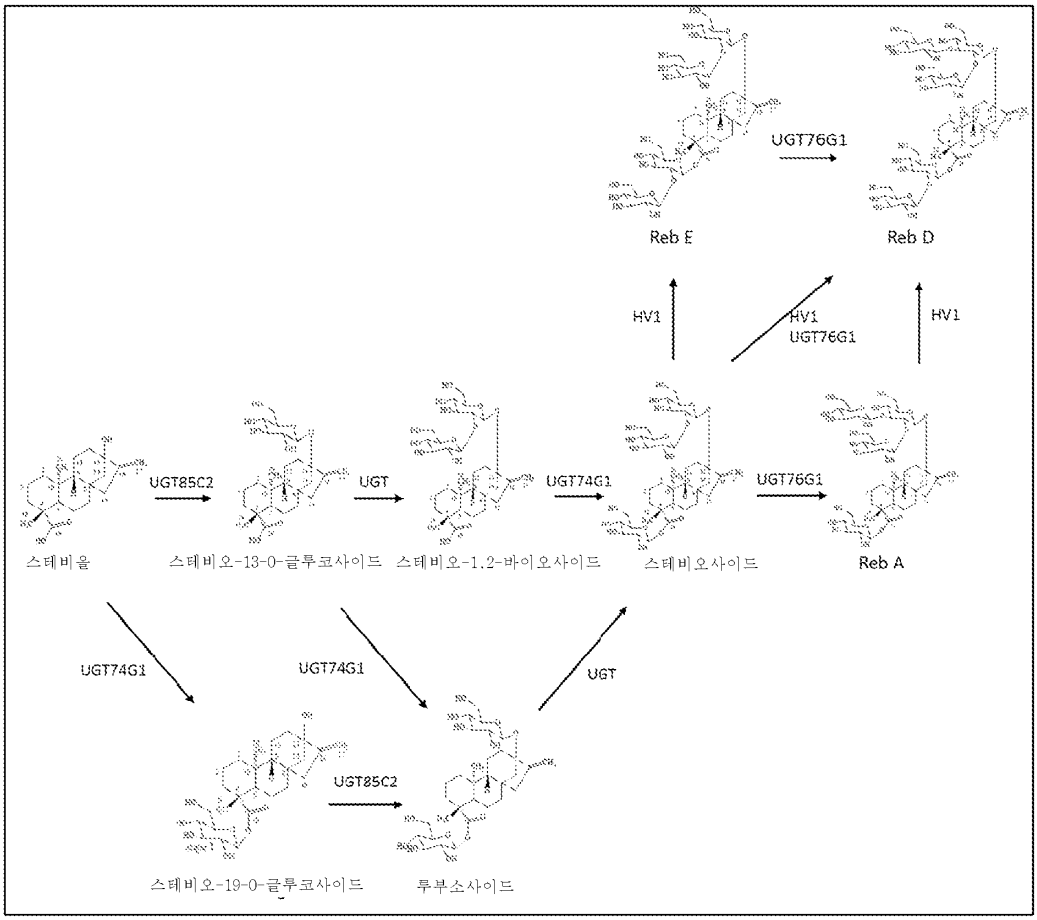
을 제조하기 위해 제3 글루코스 모이어티를 레바우디오사이드 E의 C-13-O-글루코스의 C-2'로 전달할 수 있고, 레바우디오사이드 Z2("Reb Z2")를 제조하기 위해 제3 글루코스 모이어티를 레바우디오사이드 E의 C-19-O-글루코스의 C-2'로 전달할 수 있다. HV1 및 EUGT11 둘 다는 Reb E로의 스테비오사이드의 전환 및 레바우디오사이드 D("Reb D")로의 레바우디오사이드 A("Reb A")의 전환을 촉매화할 수 있다. UGT76G1은 레바우디오사이드 D("Reb D")를 형성하기 위해 제3 글루코스 모이어티를 레바우디오사이드 E("Reb E")의 C-13-O-글루코스의 C-3'으로 전달할 수 있다. UGT76G1은 또한 레바우디오사이드("Reb A")로의 스테비오사이드의 전환 및 레바우디오사이드 M("Reb M")으로의 레바우디오사이드 D("Reb D")의 전환을 촉매화한다.

[0295] 상기의 관점에서, 본 개시내용의 여러 이점이 달성되고 다른 유리한 결과가 획득된다는 것을 볼 수 있다. 본 개시내용의 범위를 벗어나지 않으면서 상기 방법 및 시스템에서 다양한 변경이 이루어지면서, 상기 설명에 함유되고 수반된 도면에 도시된 모든 대상이 예시적으로 해석되고 제한 의미로 해석되지 않아야 하는 것으로 의도된다.

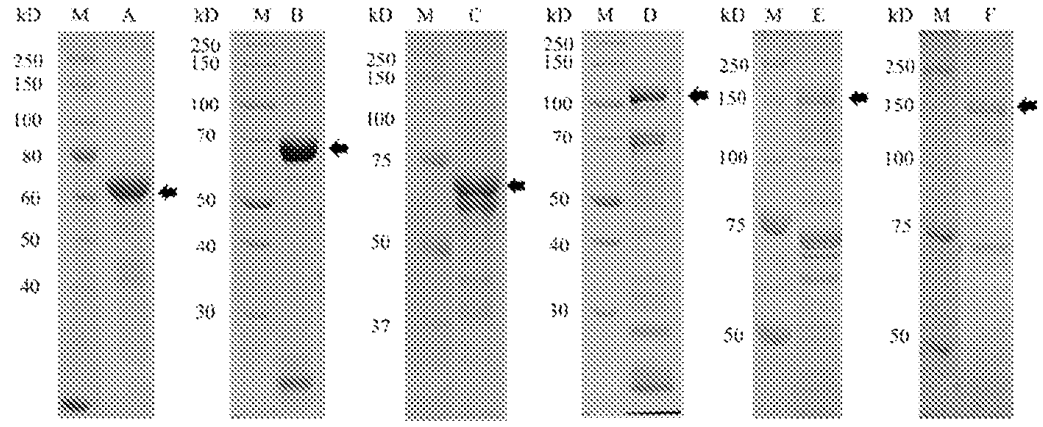
[0296] 본 개시내용 또는 이의 다양한 버전, 실시형태(들) 또는 양태의 구성요소를 도입할 때, 관사 "일", "하나", "이" 및 "상기"는 구성요소 중 하나 이상이 존재한다는 것을 의미하도록 의도된다. 용어 "포함하는", "함유하는" 및 "가지는"은 포함이도록 의도되고, 기재된 구성요소 이외의 추가적인 구성요소일 수 있다는 것을 의미한다.

도면

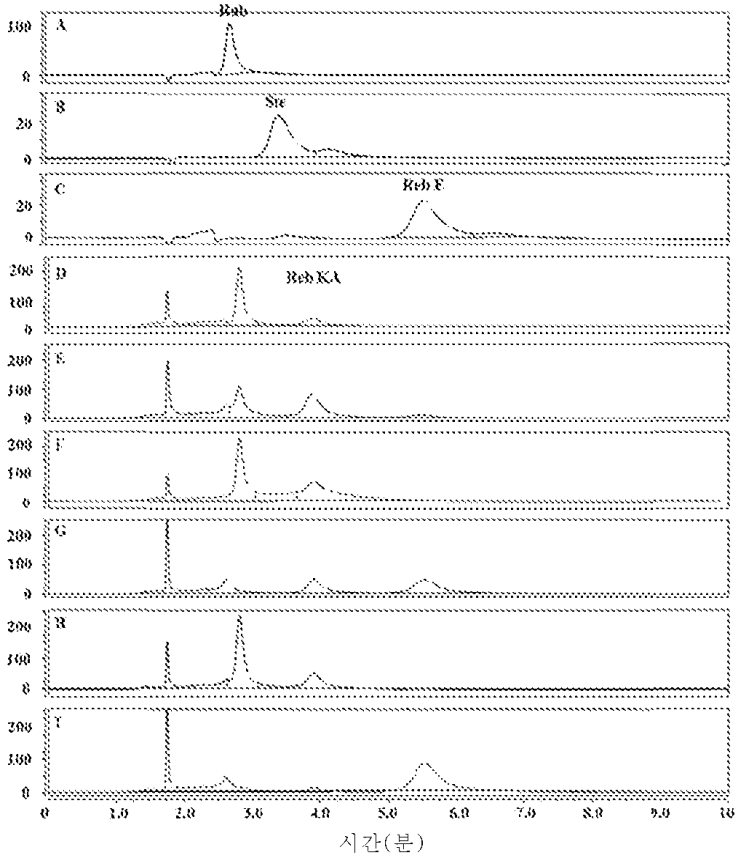
도면1



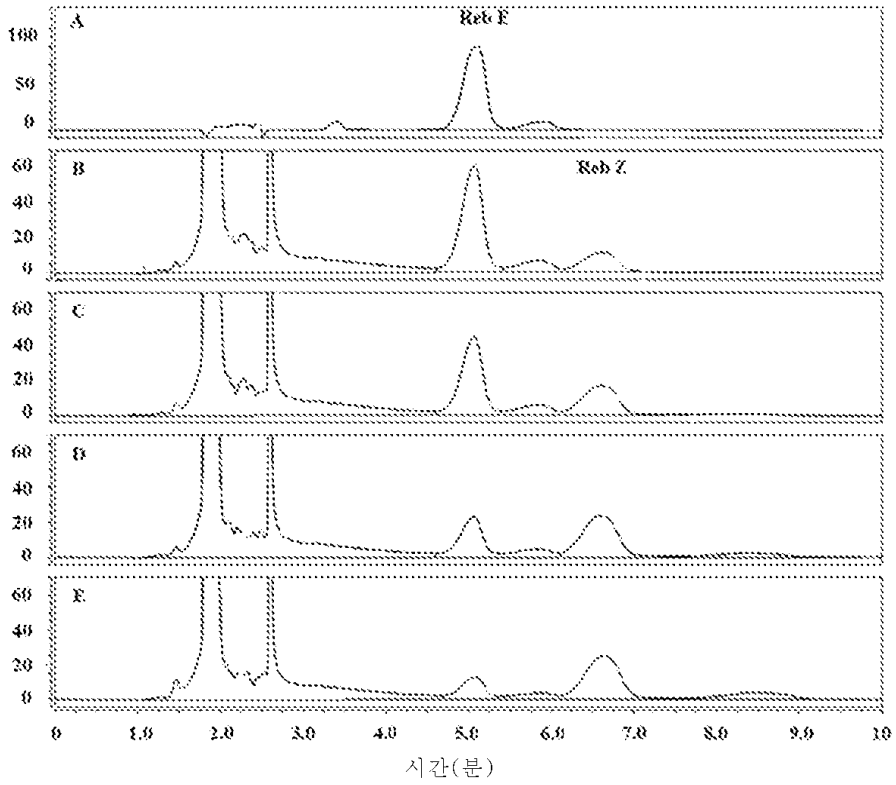
도면2


kD
M
A
B
C
D
E
F
250
150
100
80
70
60
50
40
30
75
37

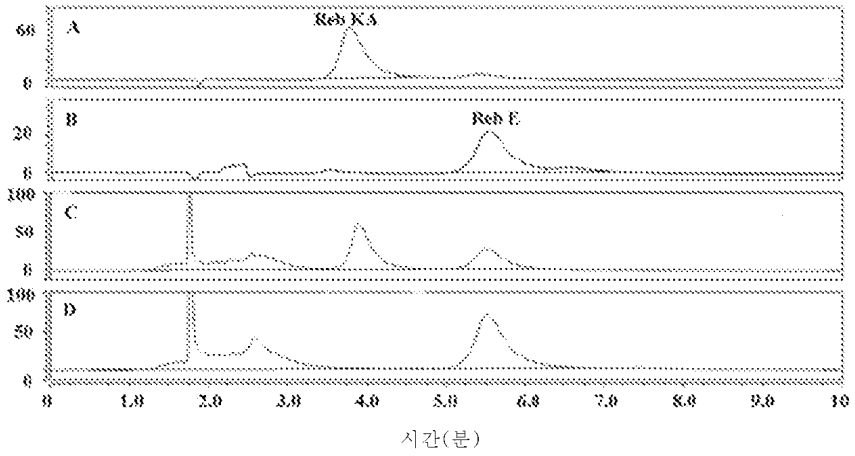
도면3


Rab
Ste
Reb E
Reb KA
A
B
C
D
E
F
G
H
I
시간(분)

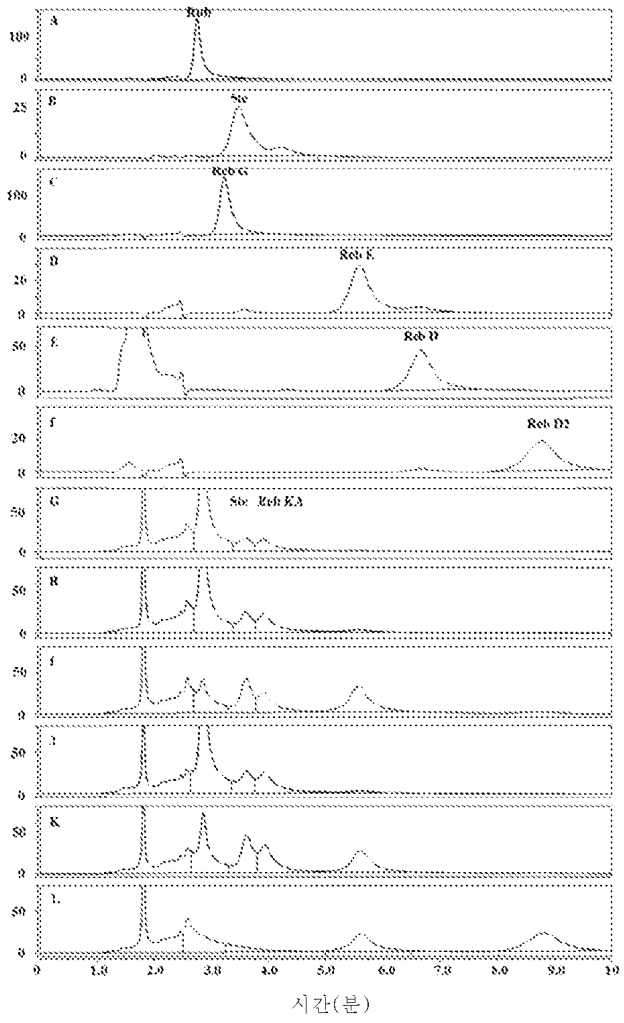
도면4



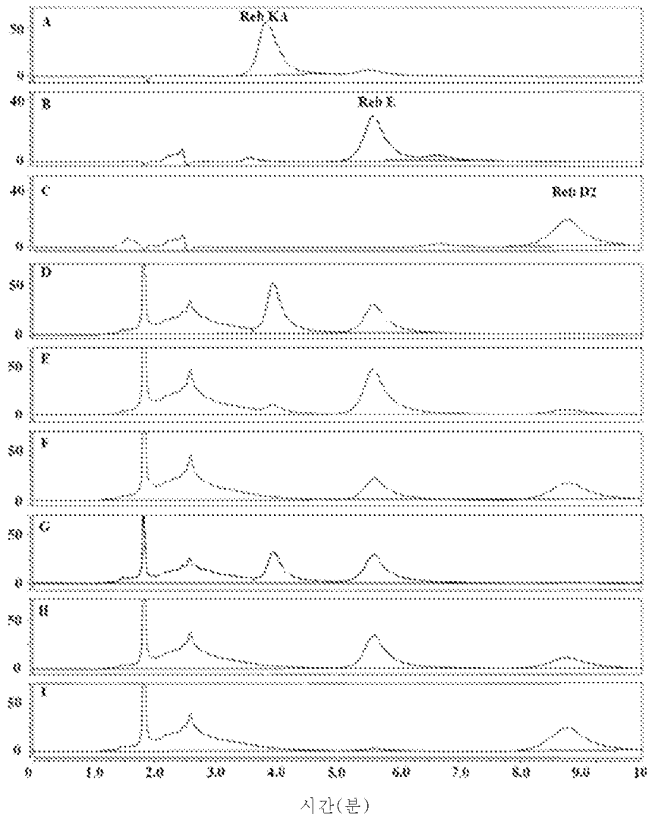
도면5



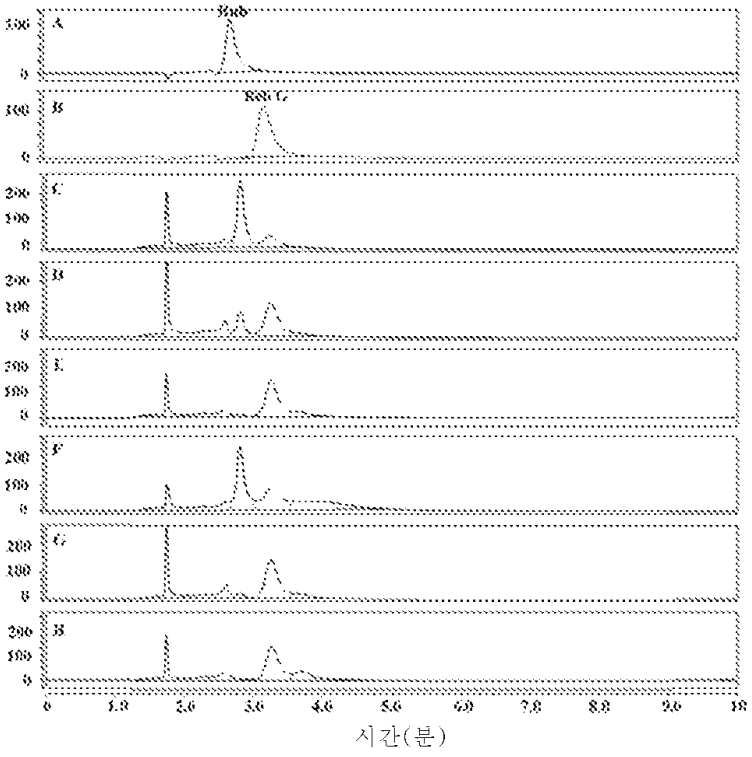
도면6


A
Reb A
B
Ste
C
Reb G
D
Reb E
E
Reb D
F
Reb D2
G
Ste Reb EA
H
I
J
K
L
0
1.0
2.0
3.0
4.0
5.0
6.0
7.0
8.0
9.0
10
시간(분)

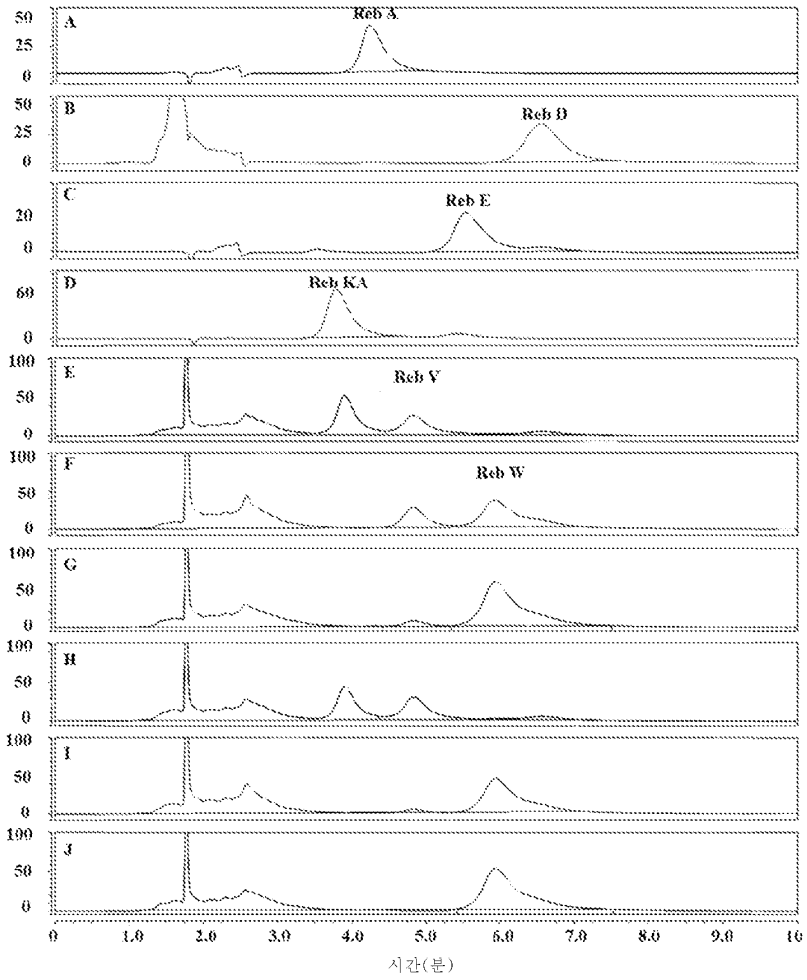
도면7


A
Reb KA
B
Reb E
C
Reb DZ
D
E
F
G
H
I
0
1.0
2.0
3.0
4.0
5.0
6.0
7.0
8.0
9.0
10
시간(분)

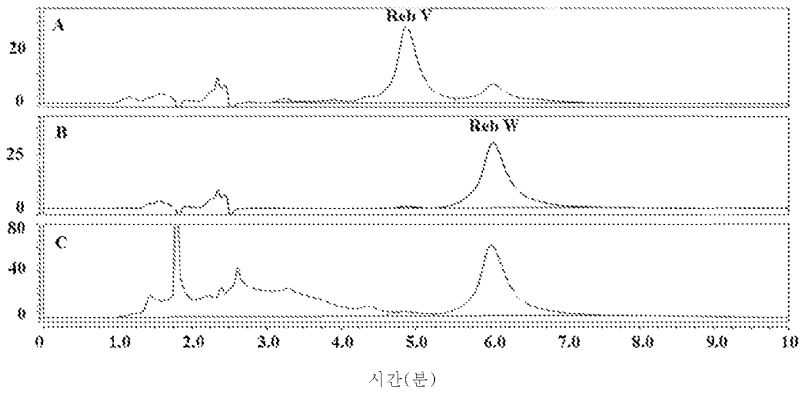
도면8


A
Reb
B
Reb G
C
D
E
F
G
H
0
1.0
2.0
3.0
4.0
5.0
6.0
7.0
8.0
9.0
10
시간(분)

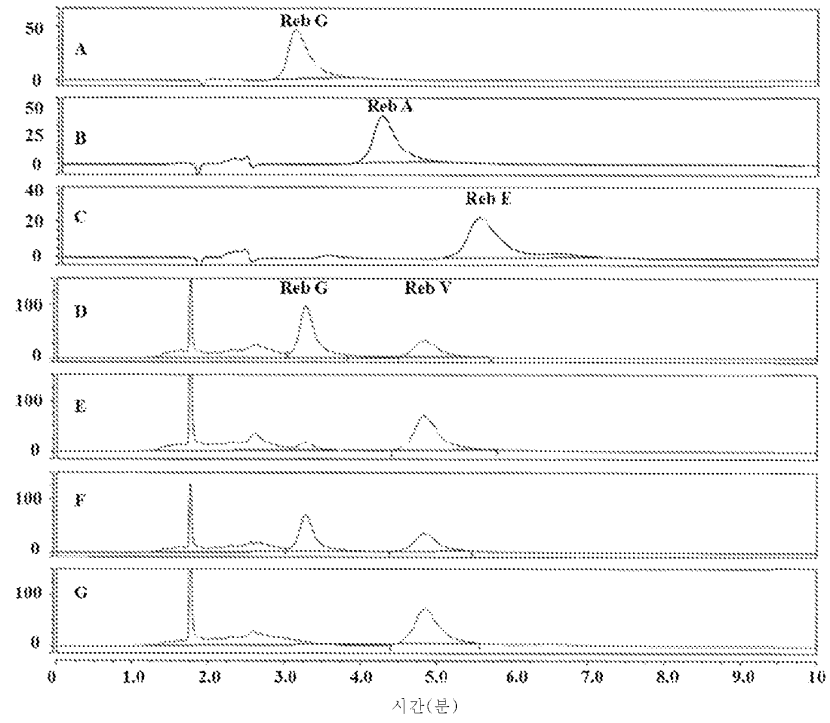
도면9


A
Reb A
B
Reb D
C
Reb E
D
Reb KA
E
Reb V
F
Reb W
G
H
I
J
시간(분)

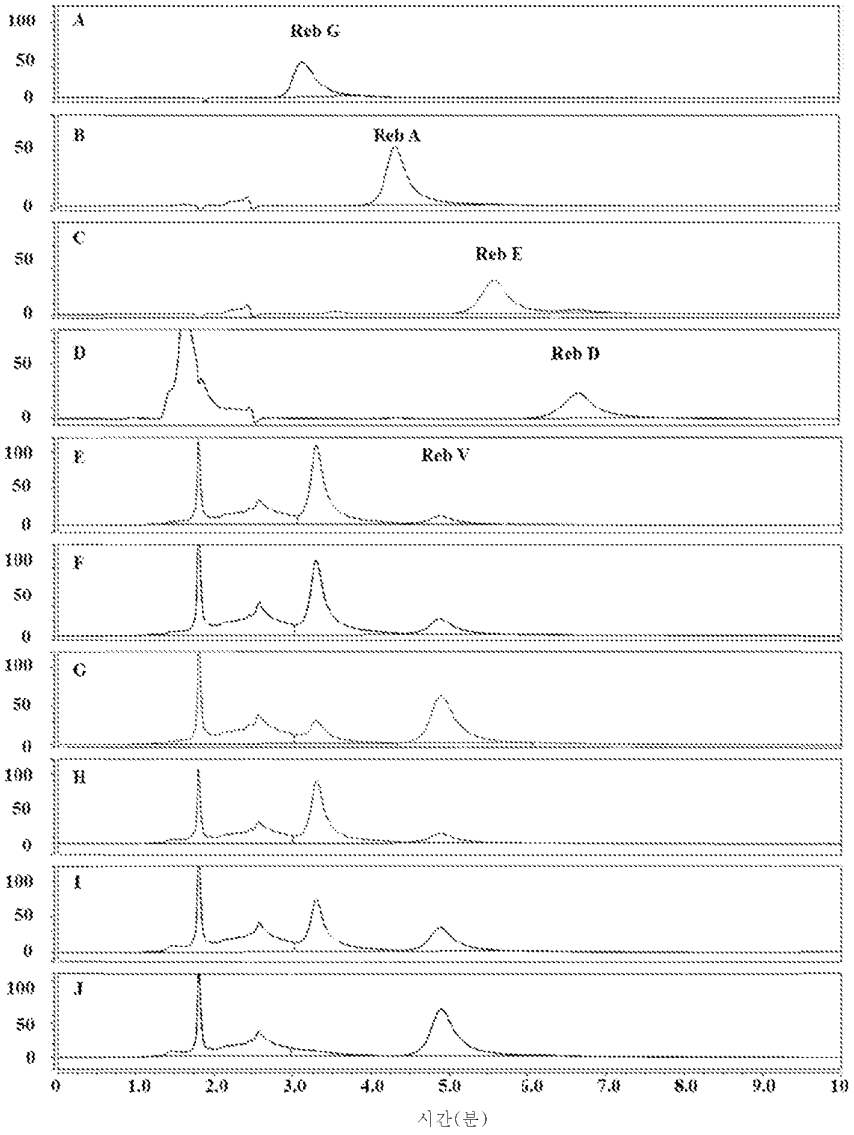
도면10


A
Reb V
B
Reb W
C
시간(분)

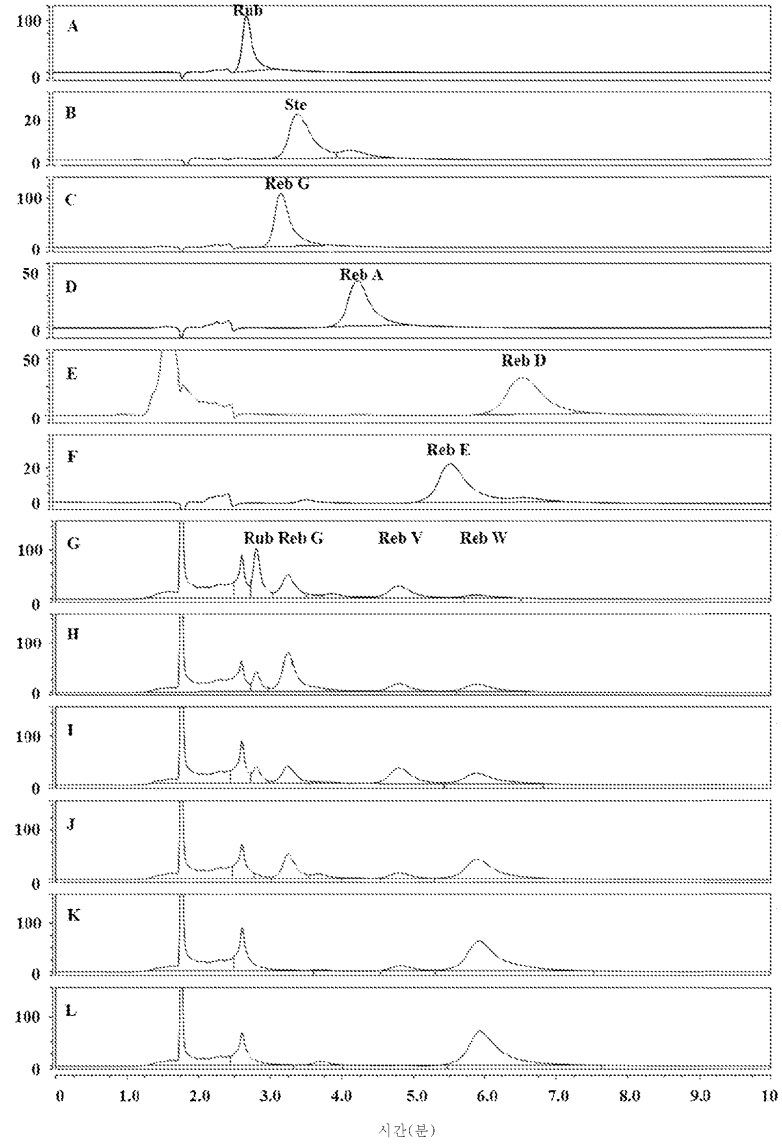
도면11


Reb G
A
50
0
Reb A
B
50
25
0
Reb E
C
40
20
0
Reb G
Reb V
D
100
0
E
100
0
F
100
0
G
100
0
0
1.0
2.0
3.0
4.0
5.0
6.0
7.0
8.0
9.0
10
시간(분)

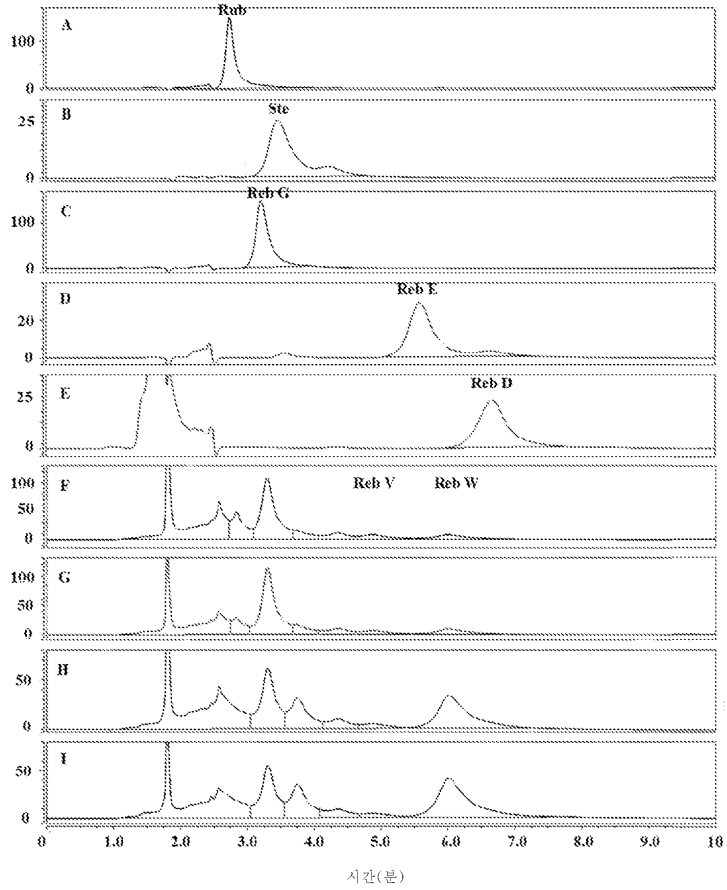
도면12


A
Reb G
B
Reb A
C
Reb E
D
Reb D
E
Reb V
F
G
H
I
J
100
50
0
0
1.0
2.0
3.0
4.0
5.0
6.0
7.0
8.0
9.0
10
시간(분)

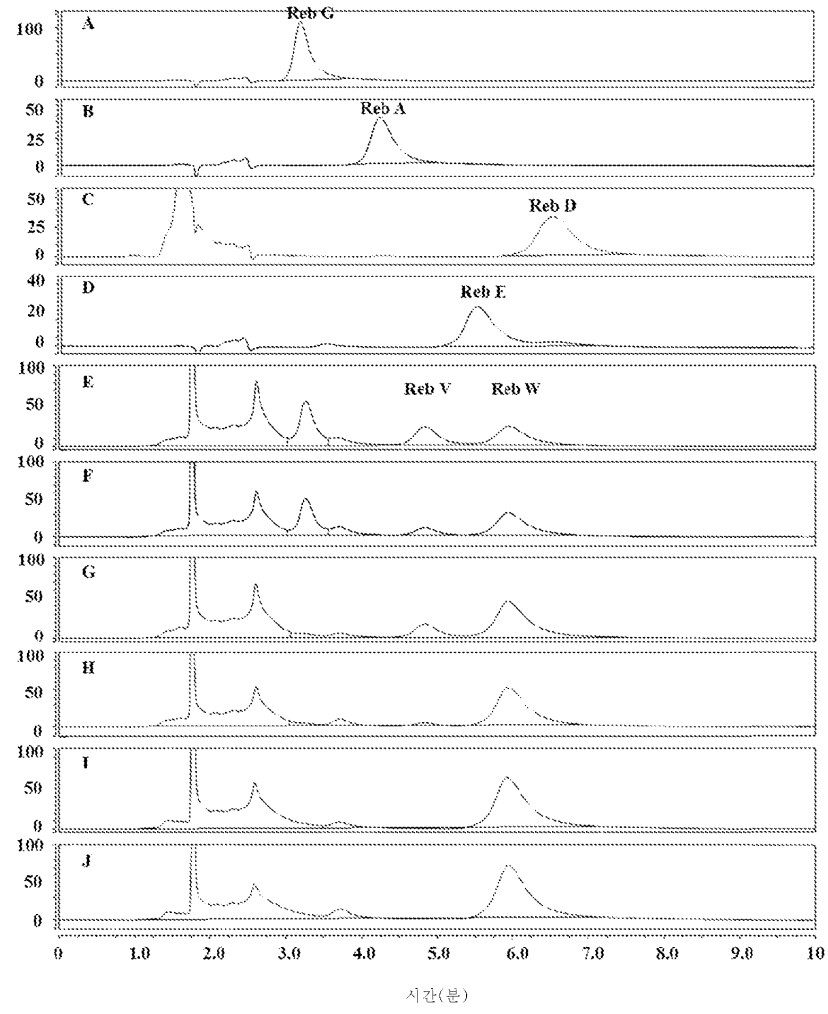
도면13


A
Rub
B
Ste
C
Reb G
D
Reb A
E
Reb D
F
Reb E
G
Rub Reb G
Reb V
Reb W
H
I
J
K
L
100
0
20
50
0
1.0
2.0
3.0
4.0
5.0
6.0
7.0
8.0
9.0
10
시간(분)

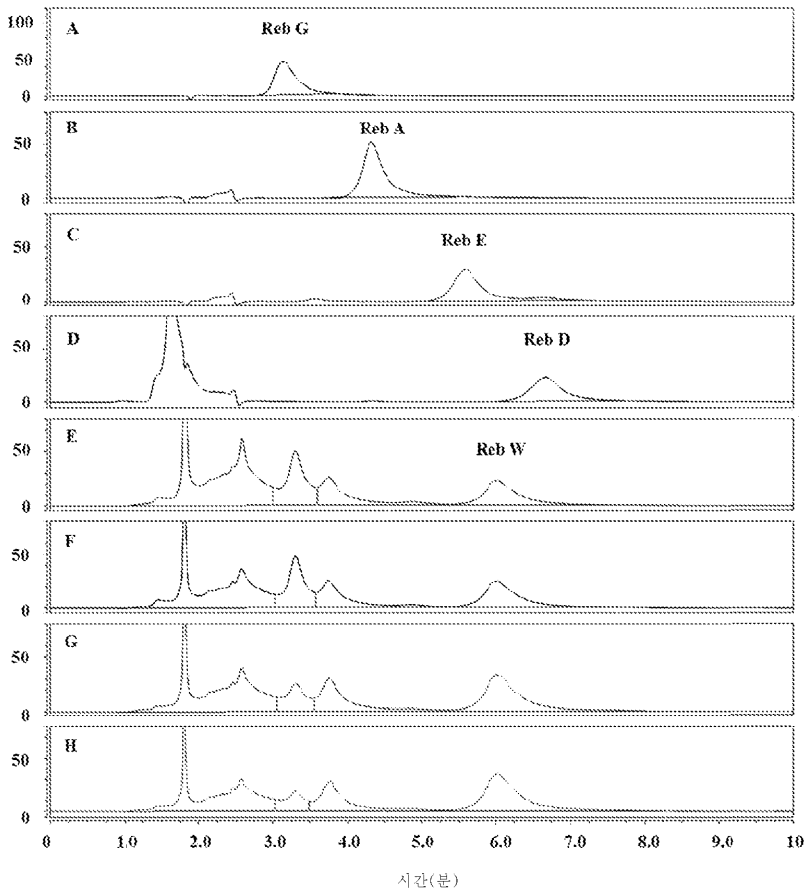
도면14


Reb
A
100
0
B
Ste
25
0
Reb G
C
100
0
D
Reb E
20
0
E
Reb D
25
0
F
Reb V
Reb W
100
50
0
G
100
50
0
H
50
0
I
50
0
0
1.0
2.0
3.0
4.0
5.0
6.0
7.0
8.0
9.0
10
시간(분)

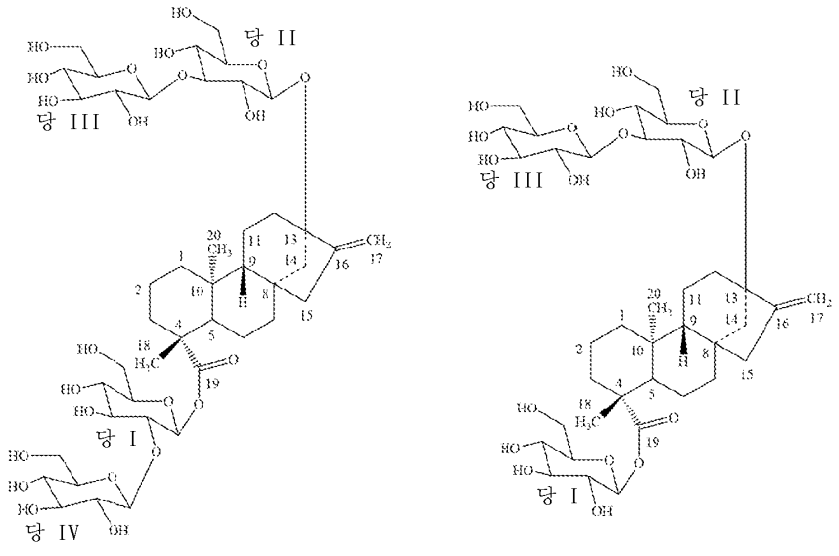
도면15


A
Reb G
B
Reb A
C
Reb D
D
Reb E
E
Reb V
Reb W
F
G
H
I
J
100
50
0
25
40
20
0
1.0
2.0
3.0
4.0
5.0
6.0
7.0
8.0
9.0
10
시간(분)

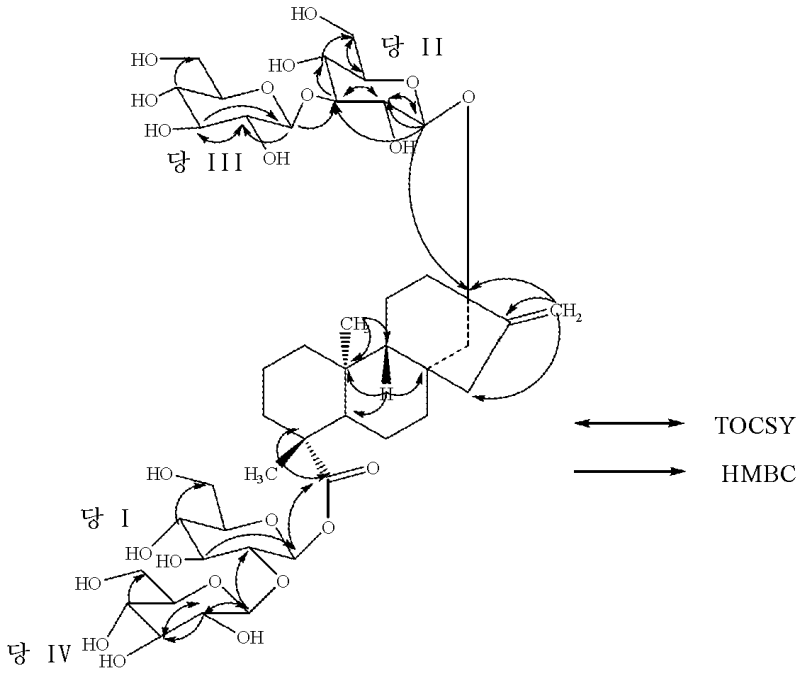
도면16


A
Reb G
B
Reb A
C
Reb E
D
Reb D
E
Reb W
F
G
H
100
50
0
0
1.0
2.0
3.0
4.0
5.0
6.0
7.0
8.0
9.0
10
시간(분)

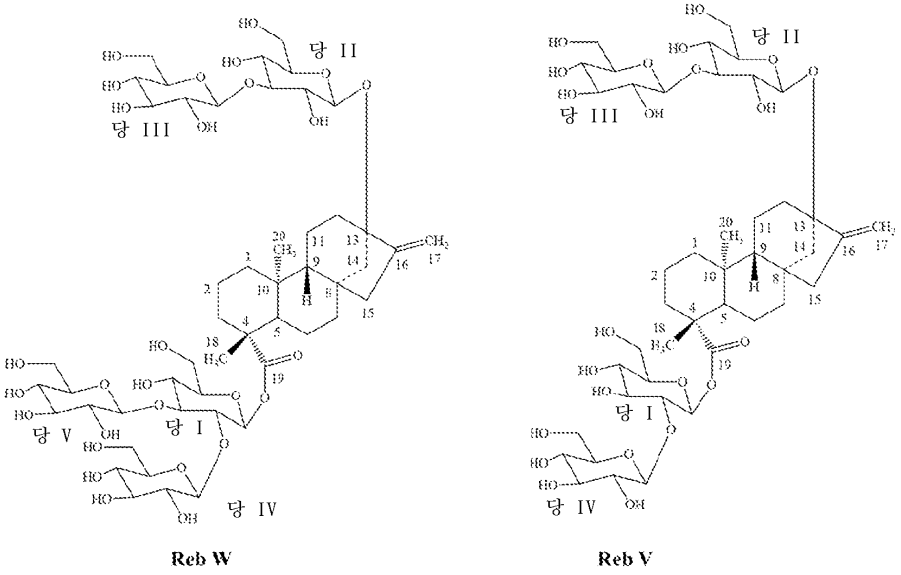
도면17


당 II
당 III
당 I
당 IV
Reb V
당 II
당 III
당 I
Reb G

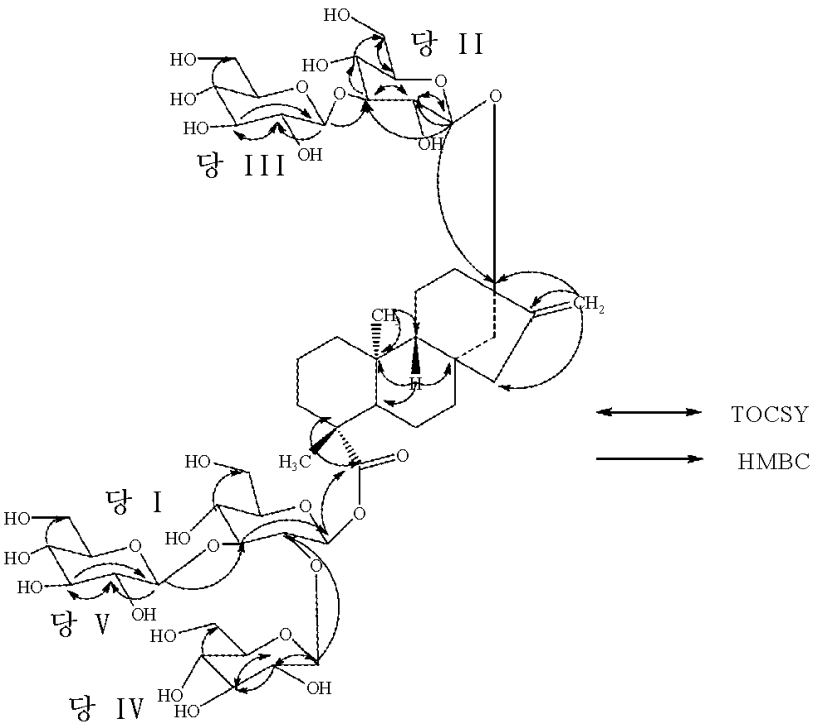
도면18



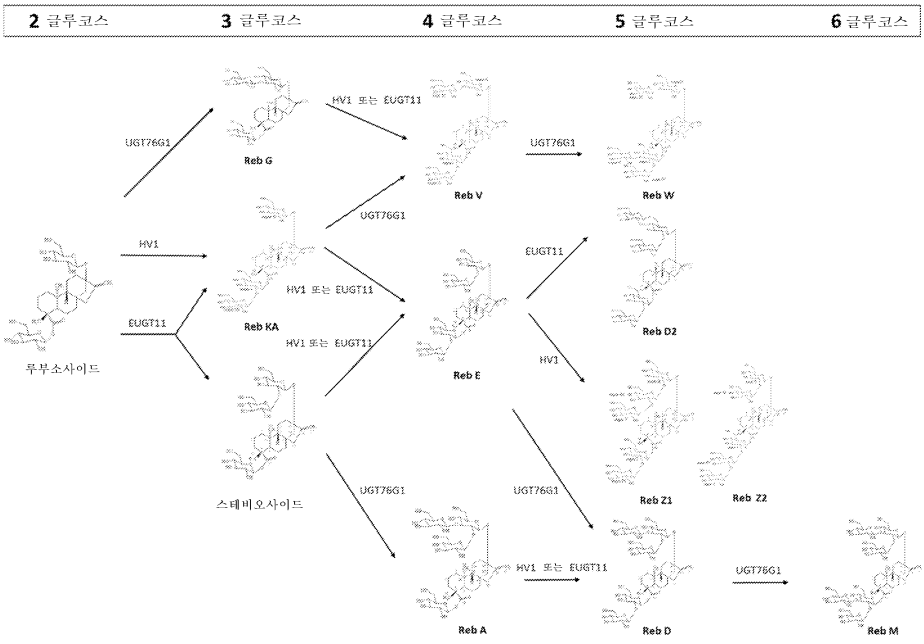
도면19



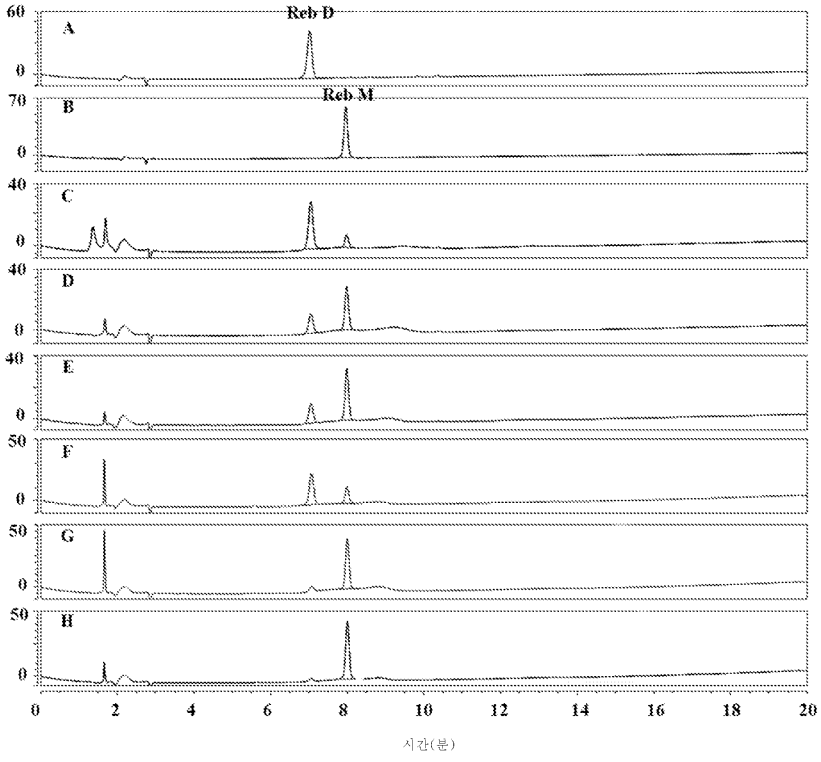
도면20


당 II
당 III
당 I
당 V
당 IV
TOCSY
HMBC

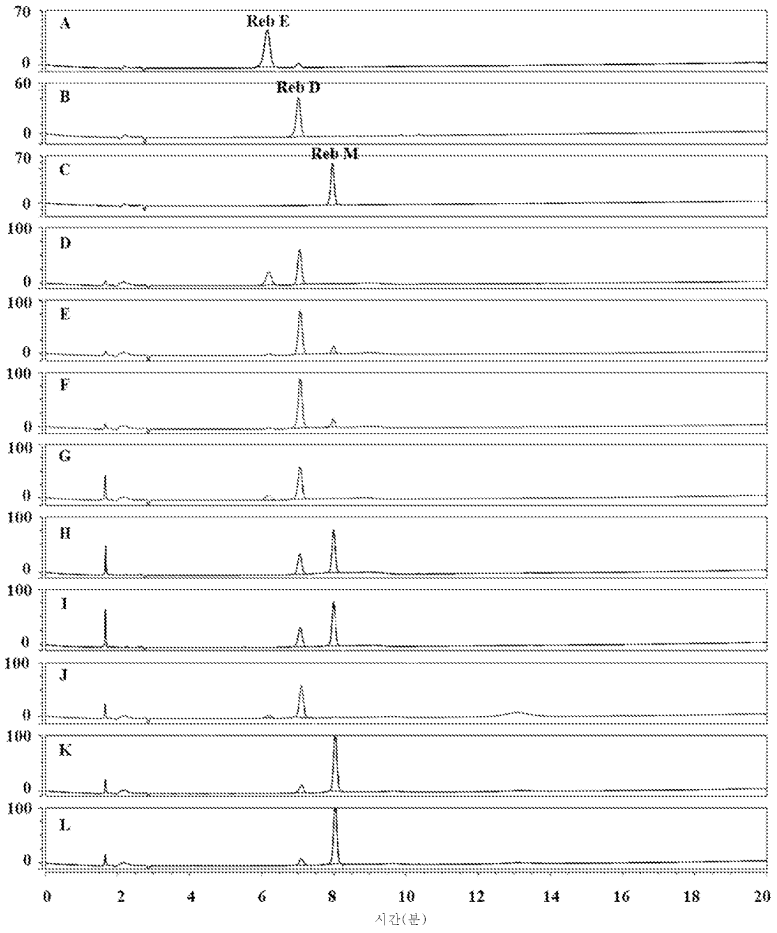
도면21


2 글루코스
3 글루코스
4 글루코스
5 글루코스
6 글루코스
UGT76G1
HV1
EUGT11
HV1 또는 EUGT11
Reb G
Reb V
Reb W
Reb KA
Reb E
Reb D2
Reb Z1
Reb Z2
Reb A
Reb D
Reb M
루부소사이드
스테비오사이드

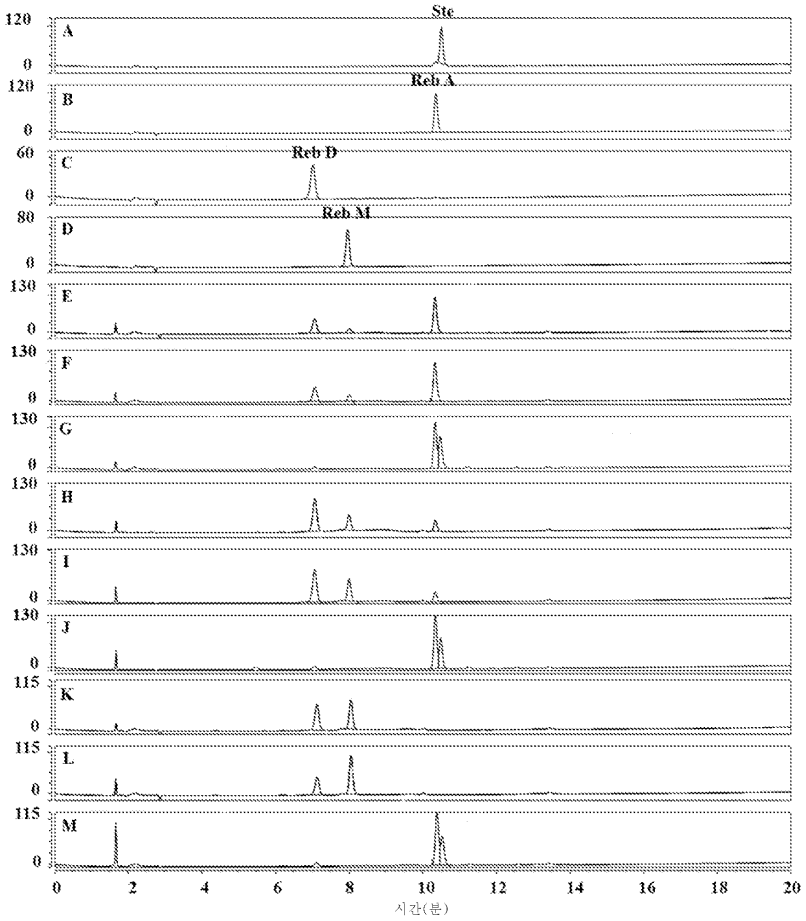
도면22


Reb D
Reb M
A
B
C
D
E
F
G
H
60
0
70
0
40
0
40
0
40
0
50
0
50
0
50
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
시간(분)

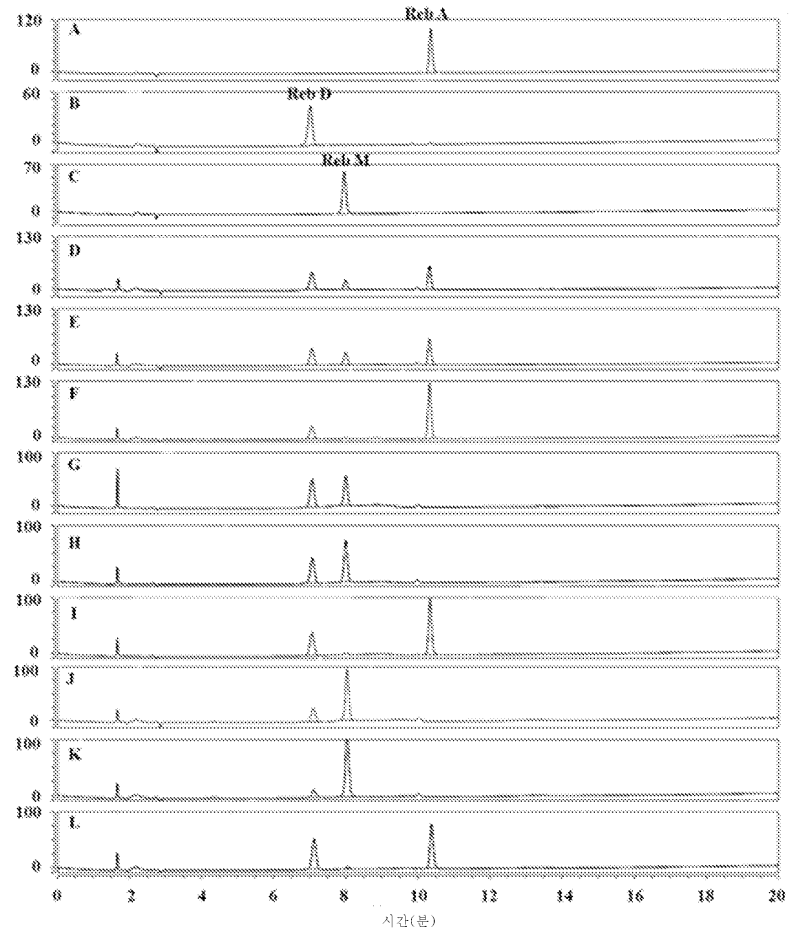
도면23


A
Reb E
B
Reb D
C
Reb M
D
E
F
G
H
I
J
K
L
70
0
60
0
70
0
100
0
100
0
100
0
100
0
100
0
100
0
100
0
100
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
시간(분)

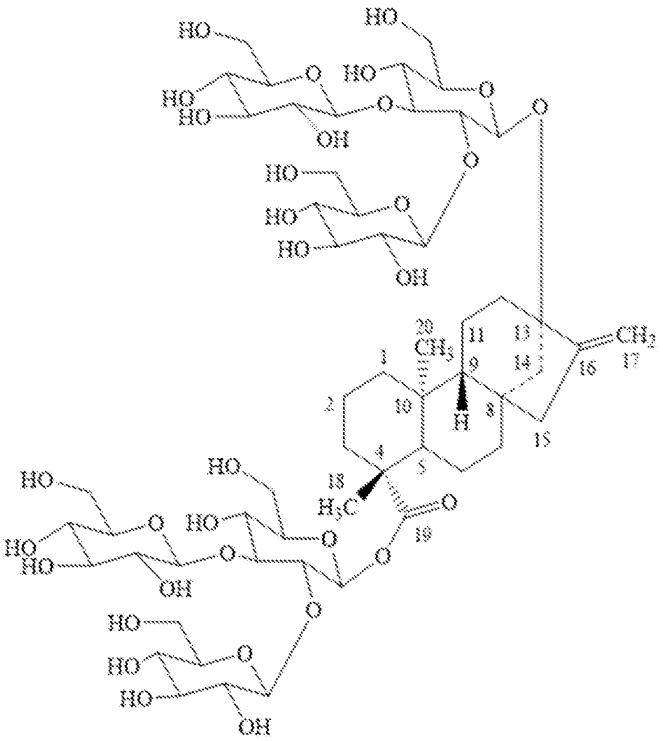
도면24


Ste
Reb A
Reb D
Reb M
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
M
120
0
120
0
60
0
80
0
130
0
130
0
130
0
130
0
130
0
130
0
115
0
115
0
115
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
시간(분)

도면25

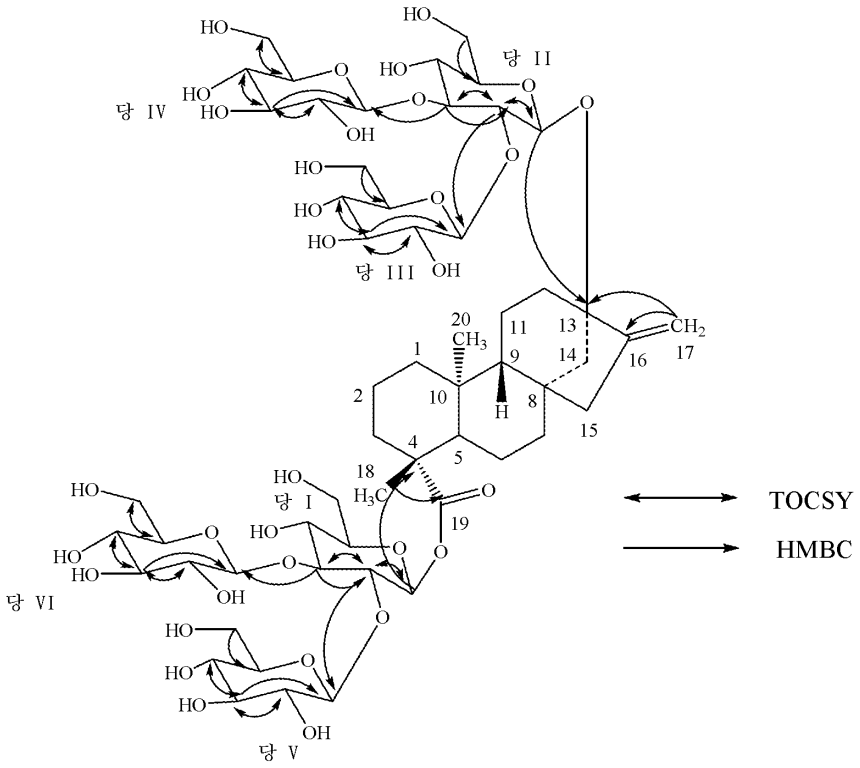

Reb A
Reb D
Reb M
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
K
L
120
0
60
0
70
0
130
0
130
0
130
0
100
0
100
0
100
0
100
0
100
0
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
시간(분)

도면26



Reb M

도면27



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Conagen Inc.

<120> NON-CALORIC SWEETENERS AND METHODS FOR SYNTHESIZING

<130> WO 2016/054534

<140> PCT/US2015/053767

<141> 2015-10-02

<150> US 62/059,498

<151> 2014-10-03

<150> US 62/098,929

<151> 2014-12-31

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 458

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 1

Met Glu Asn Lys Thr Glu Thr Thr Val Arg Arg Arg Arg Arg Ile Ile
1 5 10 15

Leu Phe Pro Val Pro Phe Gln Gly His Ile Asn Pro Ile Leu Gln Leu
20 25 30

Ala Asn Val Leu Tyr Ser Lys Gly Phe Ser Ile Thr Ile Phe His Thr
35 40 45

Asn Phe Asn Lys Pro Lys Thr Ser Asn Tyr Pro His Phe Thr Phe Arg
50 55 60

Phe Ile Leu Asp Asn Asp Pro Gln Asp Glu Arg Ile Ser Asn Leu Pro
65 70 75 80

Thr His Gly Pro Leu Ala Gly Met Arg Ile Pro Ile Ile Asn Glu His
85 90 95

Gly Ala Asp Glu Leu Arg Arg Glu Leu Glu Leu Leu Met Leu Ala Ser

100 105 110

Glu Glu Asp Glu Glu Val Ser Cys Leu Ile Thr Asp Ala Leu Trp Tyr

115 120 125

Phe Ala Gln Ser Val Ala Asp Ser Leu Asn Leu Arg Arg Leu Val Leu

130 135 140

Met Thr Ser Ser Leu Phe Asn Phe His Ala His Val Ser Leu Pro Gln

145 150 155 160

Phe Asp Glu Leu Gly Tyr Leu Asp Pro Asp Asp Lys Thr Arg Leu Glu

165 170 175

Glu Gln Ala Ser Gly Phe Pro Met Leu Lys Val Lys Asp Ile Lys Ser

180 185 190

Ala Tyr Ser Asn Trp Gln Ile Leu Lys Glu Ile Leu Gly Lys Met Ile

195 200 205

Lys Gln Thr Lys Ala Ser Ser Gly Val Ile Trp Asn Ser Phe Lys Glu

210 215 220

Leu Glu Glu Ser Glu Leu Glu Thr Val Ile Arg Glu Ile Pro Ala Pro

225 230 235 240

Ser Phe Leu Ile Pro Leu Pro Lys His Leu Thr Ala Ser Ser Ser Ser

245 250 255

Leu Leu Asp His Asp Arg Thr Val Phe Gln Trp Leu Asp Gln Gln Pro

260 265 270

Pro Ser Ser Val Leu Tyr Val Ser Phe Gly Ser Thr Ser Glu Val Asp

275 280 285

Glu Lys Asp Phe Leu Glu Ile Ala Arg Gly Leu Val Asp Ser Lys Gln

290 295 300

Ser Phe Leu Trp Val Val Arg Pro Gly Phe Val Lys Gly Ser Thr Trp

305 310 315 320

Val Glu Pro Leu Pro Asp Gly Phe Leu Gly Glu Arg Gly Arg Ile Val

325 330 335

Lys Trp Val Pro Gln Gln Glu Val Leu Ala His Gly Ala Ile Gly Ala

340 345 350

Phe Trp Thr His Ser Gly Trp Asn Ser Thr Leu Glu Ser Val Cys Glu
355 360 365

Gly Val Pro Met Ile Phe Ser Asp Phe Gly Leu Asp Gln Pro Leu Asn
370 375 380

Ala Arg Tyr Met Ser Asp Val Leu Lys Val Gly Val Tyr Leu Glu Asn
385 390 395 400

Gly Trp Glu Arg Gly Glu Ile Ala Asn Ala Ile Arg Arg Val Met Val
405 410 415

Asp Glu Glu Gly Glu Tyr Ile Arg Gln Asn Ala Arg Val Leu Lys Gln
420 425 430

Lys Ala Asp Val Ser Leu Met Lys Gly Gly Ser Ser Tyr Glu Ser Leu
435 440 445

Glu Ser Leu Val Ser Tyr Ile Ser Ser Leu
450 455

<210> 2

<211> 1377

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 2

atggagaata agacagaaac aaccgtaaga cggaggcgga ggattatctt gttccctgta 60

ccatttcagg gccatattaa tccgatcctc caattagcaa acgtcctcta ctccaaggga 120

ttttcaataa caatcttcca tactaacttt aacaagccta aaacgagtaa ttatcctcac 180

tttacattca ggttcattct agacaacgac cctcaggatg agcgtatctc aaatttacct 240

acgcatggcc ccttggcagg tatgcgaata ccaataatca atgagcatgg agccgatgaa 300

ctccgtcgcg agttagagct tctcatgctc gcaagtgagg aagacgagga agtttcgtgc 360

ctaataactg atgcgctttg gtacttcgcc caatcagtcg cagactcact gaatctacgc 420

cgtttggtcc ttatgacaag ttcattattc aactttcacg cacatgtatc actgccgcaa 480

tttgacgagt tgggttacct ggacccggat gacaaaacgc gattggagga acaagcgtcg 540

ggcttcccca tgctgaaagt caaagatatt aagagcgctt atagtaattg gcaaattctg 600

aaagaaattc tcggaaaaat gataaagcaa accaaagcgt cctctggagt aatctggaac 660

tccttcaagg agttagagga atctgaactt gaaacggtca tcagagaaat ccccgctccc 720

tcgttcttaa ttccactacc caagcacctt actgcaagta gcagttccct cctagatcat 780

gaccgaaccg tgtttcagtg gctggatcag caacccccgt cgtcagttct atatgtaagc 840

tttgggagta cttcggaagt ggatgaaaag gacttcttag agattgcgcg agggctcgtg 900

gatagcaaac agagcttcct gtgggtagtg agaccgggat tcgttaaggg ctcgacgtgg 960

gtcgagccgt tgccagatgg ttttctaggg gagagaggga gaatcgtgaa atgggttcca 1020

cagcaagagg ttttggctca cggagctata ggggcctttt ggacccactc tggttggaat 1080

tctactcttg aaagtgtctg tgaaggcgtt ccaatgatat tttctgattt tgggcttgac 1140

cagcctctaa acgctcgcta tatgtctgat gtgttgaagg ttggcgtgta cctggagaat 1200

ggttgggaaa ggggggaaat tgccaacgcc atacgccggg taatggtgga cgaggaaggt 1260

gagtacatac gtcagaacgc tcgggtttta aaacaaaaag cggacgtcag ccttatgaag 1320

ggaggtagct cctatgaatc cctagaatcc ttggtaagct atatatcttc gttataa 1377

<210> 3

<211> 462

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 3

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

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

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

450 455 460

<210> 4

<211> 1389

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

atggattcgg gttactcttc ctcctatgcg gcggctgcgg gtatgcacgt tgttatctgt 60

ccgtggctgg cttttggtca cctgctgccg tgcctggatc tggcacagcg tctggcttca 120

cgcggccatc gtgtcagctt cgtgtctacc ccgcgcaata tttcgcgtct gccgccggtt 180

cgtccggcac tggctccgct ggttgcattt gtcgctctgc cgctgccgcg cgtggaaggt 240

ctgccggatg gtgcggaaag taccaacgac gtgccgcatg atcgcccgga catggttgaa 300

ctgcaccgtc gtgcattcga tggtctggca gcaccgtttt ccgaatttct gggtacggcg 360

tgcgccgatt gggtgatcgt tgacgtcttt catcactggg cggcggcggc ggcgctggaa 420

cataaagttc cgtgtgcaat gatgctgctg ggctcagctc acatgattgc gtcgatcgca 480

gaccgtcgcc tggaacgtgc agaaaccgaa agtccggctg cggccggcca gggtcgcccg 540

gcagctgcgc cgaccttcga agtggcccgc atgaaactga ttcgtacgaa aggcagctct 600

ggtatgagcc tggcagaacg ctttagtctg accctgtccc gtagttccct ggtggttggt 660

cgcagttgcg ttgaatttga accggaaacc gtcccgctgc tgtccacgct gcgtggtaaa 720

ccgatcacct ttctgggtct gatgccgccg ctgcatgaag gccgtcgcga agatggtgaa 780

gacgcaacgg tgcgttggct ggatgcacag ccggctaaaa gcgtcgtgta tgtcgccctg 840

ggctctgaag tgccgctggg tgtggaaaaa gttcacgaac tggcactggg cctggaactg 900

gctggcaccc gcttcctgtg ggcactgcgt aaaccgacgg gtgtgagcga tgcggacctg 960

ctgccggccg gttttgaaga acgtacccgc ggccgtggtg ttgtcgcaac gcgttgggtc 1020

ccgcaaatga gcattctggc gcatgccgca gtgggcgcct 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

aaagactaa 1389

<210> 5

<211> 459

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

Met Asp Gly Asn Ser Ser Ser Ser Pro Leu His Val Val Ile Cys Pro
1 5 10 15

Trp Leu Ala Leu Gly His Leu Leu Pro Cys Leu Asp Ile Ala Glu Arg

20 25 30

Leu Ala Ser Arg Gly His Arg Val Ser Phe Val Ser Thr Pro Arg Asn
35 40 45

Ile Ala Arg Leu Pro Pro Leu Arg Pro Ala Val Ala Pro Leu Val Asp
50 55 60

Phe Val Ala Leu Pro Leu Pro His Val Asp Gly Leu Pro Glu Gly Ala
65 70 75 80

Glu Ser Thr Asn Asp Val Pro Tyr Asp Lys Phe Glu Leu His Arg Lys

85 90 95

Ala Phe Asp Gly Leu Ala Ala Pro Phe Ser Glu Phe Leu Arg Ala Ala

100 105 110

```
Cys Ala Glu Gly Ala Gly Ser Arg Pro Asp Trp Leu Ile Val Asp Thr
        115                 120                 125
Phe His His Trp Ala Ala Ala Ala Ala Val Glu Asn Lys Val Pro Cys
    130                 135                 140
Val Met Leu Leu Leu Gly Ala Ala Thr Val Ile Ala Gly Phe Ala Arg

145                 150                 155                 160
Gly Val Ser Glu His Ala Ala Ala Ala Val Gly Lys Glu Arg Pro Ala
                165                 170                 175
Ala Glu Ala Pro Ser Phe Glu Thr Glu Arg Arg Lys Leu Met Thr Thr
            180                 185                 190
Gln Asn Ala Ser Gly Met Thr Val Ala Glu Arg Tyr Phe Leu Thr Leu
        195                 200                 205
Met Arg Ser Asp Leu Val Ala Ile Arg Ser Cys Ala Glu Trp Glu Pro

    210                 215                 220
Glu Ser Val Ala Ala Leu Thr Thr Leu Ala Gly Lys Pro Val Val Pro
225                 230                 235                 240
Leu Gly Leu Leu Pro Pro Ser Pro Glu Gly Gly Arg Gly Val Ser Lys
                245                 250                 255
Glu Asp Ala Ala Val Arg Trp Leu Asp Ala Gln Pro Ala Lys Ser Val
            260                 265                 270
Val Tyr Val Ala Leu Gly Ser Glu Val Pro Leu Arg Ala Glu Gln Val

        275                 280                 285
His Glu Leu Ala Leu Gly Leu Glu Leu Ser Gly Ala Arg Phe Leu Trp
    290                 295                 300
Ala Leu Arg Lys Pro Thr Asp Ala Pro Asp Ala Ala Val Leu Pro Pro
305                 310                 315                 320
Gly Phe Glu Glu Arg Thr Arg Gly Arg Gly Leu Val Val Thr Gly Trp
                325                 330                 335
Val Pro Gln Ile Gly Val Leu Ala His Gly Ala Val Ala Ala Phe Leu

            340                 345                 350
Thr His Cys Gly Trp Asn Ser Thr Ile Glu Gly Leu Leu Phe Gly His
```

355 360 365

Pro Leu Ile Met Leu Pro Ile Ser Ser Asp Gln Gly Pro Asn Ala Arg

370 375 380

Leu Met Glu Gly Arg Lys Val Gly Met Gln Val Pro Arg Asp Glu Ser

385 390 395 400

Asp Gly Ser Phe Arg Arg Glu Asp Val Ala Ala Thr Val Arg Ala Val

405 410 415

Ala Val Glu Glu Asp Gly Arg Arg Val Phe Thr Ala Asn Ala Lys Lys

420 425 430

Met Gln Glu Ile Val Ala Asp Gly Ala Cys His Glu Arg Cys Ile Asp

435 440 445

Gly Phe Ile Gln Gln Leu Arg Ser Tyr Lys Ala

450 455

<210> 6

<211> 1380

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 6

atggatggta actcctcctc ctcgccgctg catgtggtca tttgtccgtg gctggctctg 60

ggtcacctgc tgccgtgtct ggatattgct gaacgtctgg cgtcacgcgg ccatcgtgtc 120

agttttgtgt ccaccccgcg caacattgcc cgtctgccgc cgctgcgtcc ggctgttgca 180

ccgctggttg atttcgtcgc actgccgctg ccgcatgttg acggtctgcc ggagggtgcg 240

gaatcgacca atgatgtgcc gtatgacaaa tttgaactgc accgtaaggc gttcgatggt 300

ctggcggccc cgtttagcga atttctgcgt gcagcttgcg cagaaggtgc aggttctcgc 360

ccggattggc tgattgtgga cacctttcat cactgggcgg cggcggcggc ggtggaaaac 420

aaagtgccgt gtgttatgct gctgctgggt gcagcaacgg tgatcgctgg tttcgcgcgt 480

ggtgttagcg aacatgcggc ggcggcggtg ggtaaagaac gtccggctgc ggaagccccg 540

agttttgaaa ccgaacgtcg caagctgatg accacgcaga atgcctccgg catgaccgtg 600

gcagaacgct atttcctgac gctgatgcgt agcgatctgg ttgccatccg ctcttgcgca 660

gaatgggaac cggaaagcgt ggcagcactg accacgctgg caggtaaacc ggtggttccg 720

ctgggtctgc tgccgccgag tccggaaggc ggtcgtggcg tttccaaaga agatgctgcg 780

gtccgttggc tggacgcaca gccggcaaag tcagtcgtgt acgtcgcact gggttcggaa 840

gtgccgctgc gtgcggaaca agttcacgaa ctggcactgg gcctggaact gagcggtgct 900
cgctttctgt gggcgctgcg taaaccgacc gatgcaccgg acgccgcagt gctgccgccg 960
ggtttcgaag aacgtacccg cggccgtggt ctggttgtca cgggttgggt gccgcagatt 1020
ggcgttctgg ctcatggtgc ggtggctgcg tttctgaccc actgtggctg gaactctacg 1080
atcgaaggcc tgctgttcgg tcatccgctg attatgctgc cgatcagctc tgatcagggt 1140
ccgaatgcgc gcctgatgga aggccgtaaa gtcggtatgc aagtgccgcg tgatgaatca 1200
gacggctcgt ttcgtcgcga agatgttgcc gcaaccgtcc gcgccgtggc agttgaagaa 1260

gacggtcgtc gcgtcttcac ggctaacgcg aaaaagatgc aagaaattgt ggccgatggc 1320
gcatgccacg aacgttgtat tgacggtttt atccagcaac tgcgcagtta caaggcgtga 1380

<210> 7
<211> 808
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 7

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

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
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
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> 8

<211> 2427

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 8

atggcaaacg ctgaacgtat gataacgcgc gtccacagcc aacgtgagcg tttgaacgaa 60

acgcttgttt ctgagagaaa cgaagtcctt gccttgcttt ccagggttga agccaaaggt 120

aaaggtattt tacaacaaaa ccagatcatt gctgaattcg aagctttgcc tgaacaaacc 180

cggaagaaac ttgaaggtgg tcctttcttt gaccttctca aatccactca ggaagcaatt 240

gtgttgccac catgggttgc tctagctgtg aggccaaggc ctggtgtttg ggaatactta 300

cgagtcaatc tccatgctct tgtcgttgaa gaactccaac ctgctgagtt tcttcatttc 360

aaggaagaac tcgttgatgg agttaagaat ggtaatttca ctcttgagct tgatttcgag 420

ccattcaatg cgtctatccc tcgtccaaca ctccacaaat acattggaaa tggtgttgac 480

ttccttaacc gtcatttatc ggctaagctc ttccatgaca aggagagttt gcttccattg 540

cttaagttcc ttcgtcttca cagccaccag ggcaagaacc tgatgttgag cgagaagatt 600

cagaacctca acactctgca acacaccttg aggaaagcag aagagtatct agcagagctt 660

aagtccgaaa cactgtatga agagtttgag gccaagtttg aggagattgg tcttgagagg 720

ggatggggag acaatgcaga gcgtgtcctt gacatgatac gtcttctttt ggaccttctt 780

gaggcgcctg atccttgcac tcttgagact tttcttggaa gagtaccaat ggtgttcaac 840

gttgtgatcc tctctccaca tggttacttt gctcaggaca atgttcttgg ttaccctgac 900

actggtggac aggttgttta cattcttgat caagttcgtg 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 caaacttggt gtcactcagt gtaccattgc tcatgctctt 1320

gagaaaacaa agtacccgga ttctgatatc tactggaaga agcttgacga caagtaccat 1380

ttctcatgcc agttcactgc ggatattttc gcaatgaacc acactgattt 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 gttgagtggt acgggaagaa cacccgcttg 1800

cgtgagctag ctaacttggt tgttgttgga ggagacagga ggaaagagtc aaaggacaat 1860

gaagagaaag cagagatgaa gaaaatgtat gatctcattg aggaatacaa gctaaacggt 1920

cagttcaggt ggatctcctc tcagatggac cgggtaagga acggtgagct gtaccggtac 1980

atctgtgaca ccaagggtgc ttttgtccaa cctgcattat atgaagcctt tgggttaact 2040

gttgtggagg ctatgacttg tggtttaccg actttcgcca cttgcaaagg tggtccagct 2100

gagatcattg tgcacggtaa atcgggtttc cacattgacc cttaccatgg tgatcaggct 2160

gctgatactc ttgctgattt cttcaccaag tgtaaggagg atccatctca ctgggatgag 2220

atctcaaaag gagggcttca gaggattgag gagaaataca cttggcaaat ctattcacag 2280

aggctcttga cattgactgg tgtgtatgga ttctggaagc atgtctcgaa ccttgaccgt 2340

cttgaggctc gccgttacct tgaaatgttc tatgcattga agtatcgccc attggctcag 2400

gctgttcctc ttgcacaaga tgattga 2427

<210> 9

<211> 1268

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 9

Met Glu Asn Lys Thr Glu Thr Thr Val Arg Arg Arg Arg Arg Ile Ile
1 5 10 15

Leu Phe Pro Val Pro Phe Gln Gly His Ile Asn Pro Ile Leu Gln Leu
20 25 30

Ala Asn Val Leu Tyr Ser Lys Gly Phe Ser Ile Thr Ile Phe His Thr
35 40 45

Asn Phe Asn Lys Pro Lys Thr Ser Asn Tyr Pro His Phe Thr Phe Arg
50 55 60

Phe Ile Leu Asp Asn Asp Pro Gln Asp Glu Arg Ile Ser Asn Leu Pro
65 70 75 80

Thr His Gly Pro Leu Ala Gly Met Arg Ile Pro Ile Ile Asn Glu His
85 90 95

Gly Ala Asp Glu Leu Arg Arg Glu Leu Glu Leu Leu Met Leu Ala Ser
100 105 110

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

Phe Ala Gln Ser Val Ala Asp Ser Leu Asn Leu Arg Arg Leu Val Leu
130 135 140
Met Thr Ser Ser Leu Phe Asn Phe His Ala His Val Ser Leu Pro Gln
145 150 155 160
Phe Asp Glu Leu Gly Tyr Leu Asp Pro Asp Asp Lys Thr Arg Leu Glu
165 170 175

Glu Gln Ala Ser Gly Phe Pro Met Leu Lys Val Lys Asp Ile Lys Ser
180 185 190
Ala Tyr Ser Asn Trp Gln Ile Leu Lys Glu Ile Leu Gly Lys Met Ile
195 200 205
Lys Gln Thr Lys Ala Ser Ser Gly Val Ile Trp Asn Ser Phe Lys Glu
210 215 220
Leu Glu Glu Ser Glu Leu Glu Thr Val Ile Arg Glu Ile Pro Ala Pro
225 230 235 240

Ser Phe Leu Ile Pro Leu Pro Lys His Leu Thr Ala Ser Ser Ser Ser
245 250 255
Leu Leu Asp His Asp Arg Thr Val Phe Gln Trp Leu Asp Gln Gln Pro
260 265 270
Pro Ser Ser Val Leu Tyr Val Ser Phe Gly Ser Thr Ser Glu Val Asp
275 280 285
Glu Lys Asp Phe Leu Glu Ile Ala Arg Gly Leu Val Asp Ser Lys Gln
290 295 300

Ser Phe Leu Trp Val Val Arg Pro Gly Phe Val Lys Gly Ser Thr Trp
305 310 315 320
Val Glu Pro Leu Pro Asp Gly Phe Leu Gly Glu Arg Gly Arg Ile Val
325 330 335
Lys Trp Val Pro Gln Gln Glu Val Leu Ala His Gly Ala Ile Gly Ala
340 345 350
Phe Trp Thr His Ser Gly Trp Asn Ser Thr Leu Glu Ser Val Cys Glu
355 360 365

Gly Val Pro Met Ile Phe Ser Asp Phe Gly Leu Asp Gln Pro Leu Asn

370 375 380

Ala Arg Tyr Met Ser Asp Val Leu Lys Val Gly Val Tyr Leu Glu Asn

385 390 395 400

Gly Trp Glu Arg Gly Glu Ile Ala Asn Ala Ile Arg Arg Val Met Val

405 410 415

Asp Glu Glu Gly Glu Tyr Ile Arg Gln Asn Ala Arg Val Leu Lys Gln

420 425 430

Lys Ala Asp Val Ser Leu Met Lys Gly Gly Ser Ser Tyr Glu Ser Leu

435 440 445

Glu Ser Leu Val Ser Tyr Ile Ser Ser Leu Gly Ser Gly Ala Asn Ala

450 455 460

Glu Arg Met Ile Thr Arg Val His Ser Gln Arg Glu Arg Leu Asn Glu

465 470 475 480

Thr Leu Val Ser Glu Arg Asn Glu Val Leu Ala Leu Leu Ser Arg Val

485 490 495

Glu Ala Lys Gly Lys Gly Ile Leu Gln Gln Asn Gln Ile Ile Ala Glu

500 505 510

Phe Glu Ala Leu Pro Glu Gln Thr Arg Lys Lys Leu Glu Gly Gly Pro

515 520 525

Phe Phe Asp Leu Leu Lys Ser Thr Gln Glu Ala Ile Val Leu Pro Pro

530 535 540

Trp Val Ala Leu Ala Val Arg Pro Arg Pro Gly Val Trp Glu Tyr Leu

545 550 555 560

Arg Val Asn Leu His Ala Leu Val Val Glu Glu Leu Gln Pro Ala Glu

565 570 575

Phe Leu His Phe Lys Glu Glu Leu Val Asp Gly Val Lys Asn Gly Asn

580 585 590

Phe Thr Leu Glu Leu Asp Phe Glu Pro Phe Asn Ala Ser Ile Pro Arg

595 600 605

Pro Thr Leu His Lys Tyr Ile Gly Asn Gly Val Asp Phe Leu Asn Arg

610 615 620

His Leu Ser Ala Lys Leu Phe His Asp Lys Glu Ser Leu Leu Pro Leu
625 630 635 640
Leu Lys Phe Leu Arg Leu His Ser His Gln Gly Lys Asn Leu Met Leu
645 650 655
Ser Glu Lys Ile Gln Asn Leu Asn Thr Leu Gln His Thr Leu Arg Lys
660 665 670
Ala Glu Glu Tyr Leu Ala Glu Leu Lys Ser Glu Thr Leu Tyr Glu Glu
675 680 685

Phe Glu Ala Lys Phe Glu Glu Ile Gly Leu Glu Arg Gly Trp Gly Asp
690 695 700
Asn Ala Glu Arg Val Leu Asp Met Ile Arg Leu Leu Leu Asp Leu Leu
705 710 715 720
Glu Ala Pro Asp Pro Cys Thr Leu Glu Thr Phe Leu Gly Arg Val Pro
725 730 735
Met Val Phe Asn Val Val Ile Leu Ser Pro His Gly Tyr Phe Ala Gln
740 745 750

Asp Asn Val Leu Gly Tyr Pro Asp Thr Gly Gly Gln Val Val Tyr Ile
755 760 765
Leu Asp Gln Val Arg Ala Leu Glu Ile Glu Met Leu Gln Arg Ile Lys
770 775 780
Gln Gln Gly Leu Asn Ile Lys Pro Arg Ile Leu Ile Leu Thr Arg Leu
785 790 795 800
Leu Pro Asp Ala Val Gly Thr Thr Cys Gly Glu Arg Leu Glu Arg Val
805 810 815

Tyr Asp Ser Glu Tyr Cys Asp Ile Leu Arg Val Pro Phe Arg Thr Glu
820 825 830
Lys Gly Ile Val Arg Lys Trp Ile Ser Arg Phe Glu Val Trp Pro Tyr
835 840 845
Leu Glu Thr Tyr Thr Glu Asp Ala Ala Val Glu Leu Ser Lys Glu Leu
850 855 860
Asn Gly Lys Pro Asp Leu Ile Ile Gly Asn Tyr Ser Asp Gly Asn Leu

865 870 875 880

Val Ala Ser Leu Leu Ala His Lys Leu Gly Val Thr Gln Cys Thr Ile
885 890 895
Ala His Ala Leu Glu Lys Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Asp Ile Tyr Trp
900 905 910
Lys Lys Leu Asp Asp Lys Tyr His Phe Ser Cys Gln Phe Thr Ala Asp
915 920 925
Ile Phe Ala Met Asn His Thr Asp Phe Ile Ile Thr Ser Thr Phe Gln
930 935 940

Glu Ile Ala Gly Ser Lys Glu Thr Val Gly Gln Tyr Glu Ser His Thr
945 950 955 960
Ala Phe Thr Leu Pro Gly Leu Tyr Arg Val Val His Gly Ile Asp Val
965 970 975
Phe Asp Pro Lys Phe Asn Ile Val Ser Pro Gly Ala Asp Met Ser Ile
980 985 990
Tyr Phe Pro Tyr Thr Glu Glu Lys Arg Arg Leu Thr Lys Phe His Ser
995 1000 1005

Glu Ile Glu Glu Leu Leu Tyr Ser Asp Val Glu Asn Lys Glu His
1010 1015 1020
Leu Cys Val Leu Lys Asp Lys Lys Lys Pro Ile Leu Phe Thr Met
1025 1030 1035
Ala Arg Leu Asp Arg Val Lys Asn Leu Ser Gly Leu Val Glu Trp
1040 1045 1050
Tyr Gly Lys Asn Thr Arg Leu Arg Glu Leu Ala Asn Leu Val Val
1055 1060 1065

Val Gly Gly Asp Arg Arg Lys Glu Ser Lys Asp Asn Glu Glu Lys
1070 1075 1080
Ala Glu Met Lys Lys Met Tyr Asp Leu Ile Glu Glu Tyr Lys Leu
1085 1090 1095
Asn Gly Gln Phe Arg Trp Ile Ser Ser Gln Met Asp Arg Val Arg
1100 1105 1110

Asn Gly Glu Leu Tyr Arg Tyr Ile Cys Asp Thr Lys Gly Ala Phe
1115 1120 1125

Val Gln Pro Ala Leu Tyr Glu Ala Phe Gly Leu Thr Val Val Glu
1130 1135 1140
Ala Met Thr Cys Gly Leu Pro Thr Phe Ala Thr Cys Lys Gly Gly
1145 1150 1155
Pro Ala Glu Ile Ile Val His Gly Lys Ser Gly Phe His Ile Asp
1160 1165 1170
Pro Tyr His Gly Asp Gln Ala Ala Asp Thr Leu Ala Asp Phe Phe
1175 1180 1185

Thr Lys Cys Lys Glu Asp Pro Ser His Trp Asp Glu Ile Ser Lys
1190 1195 1200
Gly Gly Leu Gln Arg Ile Glu Glu Lys Tyr Thr Trp Gln Ile Tyr
1205 1210 1215
Ser Gln Arg Leu Leu Thr Leu Thr Gly Val Tyr Gly Phe Trp Lys
1220 1225 1230
His Val Ser Asn Leu Asp Arg Leu Glu Ala Arg Arg Tyr Leu Glu
1235 1240 1245

Met Phe Tyr Ala Leu Lys Tyr Arg Pro Leu Ala Gln Ala Val Pro
1250 1255 1260
Leu Ala Gln Asp Asp
1265

<210> 10
<211> 3807
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 10
atggagaata agacagaaac aaccgtaaga cggaggcgga ggattatctt gttccctgta 60
ccatttcagg gccatattaa tccgatcctc caattagcaa acgtcctcta ctccaaggga 120
ttttcaataa caatcttcca tactaacttt aacaagccta aaacgagtaa ttatcctcac 180

tttacattca ggttcattct agacaacgac cctcaggatg agcgtatctc aaatttacct 240

acgcatggcc ccttggcagg tatgcgaata ccaataatca atgagcatgg agccgatgaa 300

ctccgtcgcg agttagagct tctcatgctc gcaagtgagg aagacgagga agtttcgtgc 360

ctaataactg atgcgctttg gtacttcgcc caatcagtcg cagactcact gaatctacgc 420

cgtttggtcc ttatgacaag ttcattattc aactttcacg cacatgtatc actgccgcaa 480

tttgacgagt tgggttacct ggacccggat gacaaaacgc gattggagga acaagcgtcg 540

ggcttcccca tgctgaaagt caaagatatt aagagcgctt atagtaattg gcaaattctg 600

aaagaaattc tcggaaaaat gataaagcaa accaaagcgt cctctggagt aatctggaac 660

tccttcaagg agttagagga atctgaactt gaaacggtca tcagagaaat ccccgctccc 720

tcgttcttaa ttccactacc caagcacctt actgcaagta gcagttccct cctagatcat 780

gaccgaaccg tgtttcagtg gctggatcag caacccccgt cgtcagttct atatgtaagc 840

tttgggagta cttcggaagt ggatgaaaag gacttcttag agattgcgcg agggctcgtg 900

gatagcaaac agagcttcct gtgggtagtg agaccgggat tcgttaaggg ctcgacgtgg 960

gtcgagccgt tgccagatgg ttttctaggg gagagaggga gaatcgtgaa atgggttcca 1020

cagcaagagg ttttggctca cggagctata ggggcctttt ggacccactc tggttggaat 1080

tctactcttg aaagtgtctg tgaaggcgtt ccaatgatat tttctgattt tgggcttgac 1140

cagcctctaa acgctcgcta tatgtctgat gtgttgaagg ttggcgtgta cctggagaat 1200

ggttgggaaa ggggggaaat tgccaacgcc atacgccggg taatggtgga cgaggaaggt 1260

gagtacatac gtcagaacgc tcgggtttta aaacaaaaag cggacgtcag ccttatgaag 1320

ggaggtagct cctatgaatc cctagaatcc ttggtaagct atatatcttc gttaggttct 1380

ggtgcaaacg ctgaacgtat gataacgcgc gtccacagcc aacgtgagcg tttgaacgaa 1440

acgcttgttt ctgagagaaa cgaagtcctt gccttgcttt ccagggttga agccaaaggt 1500

aaaggtattt tacaacaaaa ccagatcatt gctgaattcg aagctttgcc tgaacaaacc 1560

cggaagaaac ttgaaggtgg tcctttcttt gaccttctca aatccactca ggaagcaatt 1620

gtgttgccac catgggttgc tctagctgtg aggccaaggc ctggtgtttg ggaatactta 1680

cgagtcaatc tccatgctct tgtcgttgaa gaactccaac ctgctgagtt tcttcatttc 1740

aaggaagaac tcgttgatgg agttaagaat ggtaatttca ctcttgagct tgatttcgag 1800

ccattcaatg cgtctatccc tcgtccaaca ctccacaaat acattggaaa tggtgttgac 1860

ttccttaacc gtcatttatc ggctaagctc ttccatgaca aggagagttt gcttccattg 1920

cttaagttcc ttcgtcttca cagccaccag ggcaagaacc tgatgttgag cgagaagatt 1980

cagaacctca acactctgca acacaccttg aggaaagcag aagagtatct agcagagctt 2040

aagtccgaaa cactgtatga agagtttgag gccaagtttg aggagattgg tcttgagagg 2100

ggatggggag acaatgcaga gcgtgtcctt gacatgatac gtcttctttt ggaccttctt 2160

gaggcgcctg atccttgcac tcttgagact tttcttggaa gagtaccaat ggtgttcaac 2220

gttgtgatcc tctctccaca tggttacttt gctcaggaca atgttcttgg ttaccctgac 2280

actggtggac aggttgttta cattcttgat caagttcgtg ctctggagat agagatgctt 2340

caacgtatta agcaacaagg actcaacatt aaaccaagga ttctcattct aactcgactt 2400

ctacctgatg cggtaggaac tacatgcggt gaacgtctcg agagagttta tgattctgag 2460

tactgtgata ttcttcgtgt gcccttcaga acagagaagg gtattgttcg caaatggatc 2520

tcaaggttcg aagtctggcc atatctagag acttacaccg aggatgctgc ggttgagcta 2580

tcgaaagaat tgaatggcaa gcctgacctt atcattggta actacagtga tggaaatctt 2640

gttgcttctt tattggctca caaacttggt gtcactcagt gtaccattgc tcatgctctt 2700

gagaaaacaa agtacccgga ttctgatatc tactggaaga agcttgacga caagtaccat 2760

ttctcatgcc agttcactgc ggatattttc gcaatgaacc acactgattt catcatcact 2820

agtactttcc aagaaattgc tggaagcaaa gaaactgttg ggcagtatga aagccacaca 2880

gcctttactc ttcccggatt gtatcgagtt gttcacggga ttgatgtgtt tgatcccaag 2940

ttcaacattg tctctcctgg tgctgatatg agcatctact tcccttacac agaggagaag 3000

cgtagattga ctaagttcca ctctgagatc gaggagctcc tctacagcga tgttgagaac 3060

aaagagcact tatgtgtgct caaggacaag aagaagccga ttctcttcac aatggctagg 3120

cttgatcgtg tcaagaactt gtcaggtctt gttgagtggt acgggaagaa cacccgcttg 3180

cgtgagctag ctaacttggt tgttgttgga ggagacagga ggaaagagtc aaaggacaat 3240

gaagagaaag cagagatgaa gaaaatgtat gatctcattg aggaatacaa gctaaacggt 3300

cagttcaggt ggatctcctc tcagatggac cgggtaagga acggtgagct gtaccggtac 3360

atctgtgaca ccaagggtgc ttttgtccaa cctgcattat atgaagcctt tgggttaact 3420

gttgtggagg ctatgacttg tggtttaccg actttcgcca cttgcaaagg tggtccagct 3480

gagatcattg tgcacggtaa atcgggtttc cacattgacc cttaccatgg tgatcaggct 3540

gctgatactc ttgctgattt cttcaccaag tgtaaggagg atccatctca ctgggatgag 3600

atctcaaaag gagggcttca gaggattgag gagaaataca cttggcaaat ctattcacag 3660

aggctcttga cattgactgg tgtgtatgga ttctggaagc atgtctcgaa ccttgaccgt 3720

cttgaggctc gccgttacct tgaaatgttc tatgcattga agtatcgccc attggctcag 3780

gctgttcctc ttgcacaaga tgattga 3807

<210> 11

<211> 1272

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 11

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

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

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

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

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
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> 12
<211> 3819
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic
<400> 12
atggattcgg gttactcttc ctcctatgcg gcggctgcgg gtatgcacgt tgttatctgt 60
ccgtggctgg cttttggtca cctgctgccg tgcctggatc tggcacagcg tctggcttca 120
cgcggccatc gtgtcagctt cgtgtctacc ccgcgcaata tttcgcgtct gccgccggtt 180
cgtccggcac tggctccgct ggttgcattt gtcgctctgc cgctgccgcg cgtggaaggt 240
ctgccggatg gtgcggaaag taccaacgac gtgccgcatg atcgcccgga catggttgaa 300
ctgcaccgtc gtgcattcga tggtctggca gcaccgtttt ccgaatttct gggtacggcg 360

tgcgccgatt gggtgatcgt tgacgtcttt catcactggg cggcggcggc ggcgctggaa 420
cataaagttc cgtgtgcaat gatgctgctg ggctcagctc acatgattgc gtcgatcgca 480
gaccgtcgcc tggaacgtgc agaaaccgaa agtccggctg cggccggcca gggtcgcccg 540
gcagctgcgc cgaccttcga agtggcccgc atgaaactga ttcgtacgaa aggcagctct 600
ggtatgagcc tggcagaacg ctttagtctg accctgtccc gtagttccct ggtggttggt 660
cgcagttgcg ttgaatttga accggaaacc gtcccgctgc tgtccacgct gcgtggtaaa 720
ccgatcacct ttctgggtct gatgccgccg ctgcatgaag gccgtcgcga agatggtgaa 780

gacgcaacgg tgcgttggct ggatgcacag ccggctaaaa gcgtcgtgta tgtcgccctg 840

ggctctgaag tgccgctggg tgtggaaaaa gttcacgaac tggcactggg cctggaactg 900

gctggcaccc gcttcctgtg ggcactgcgt aaaccgacgg gtgtgagcga tgcggacctg 960

ctgccggccg gttttgaaga acgtacccgc ggccgtggtg ttgtcgcaac gcgttgggtc 1020

ccgcaaatga gcattctggc gcatgccgca gtgggcgcct 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

aaagacggtt ctggtgcaaa cgctgaacgt atgataacgc gcgtccacag ccaacgtgag 1440

cgtttgaacg aaacgcttgt ttctgagaga aacgaagtcc ttgccttgct ttccagggtt 1500

gaagccaaag gtaaaggtat tttacaacaa aaccagatca ttgctgaatt cgaagctttg 1560

cctgaacaaa cccggaagaa acttgaaggt ggtcctttct ttgaccttct caaatccact 1620

caggaagcaa ttgtgttgcc accatgggtt gctctagctg tgaggccaag gcctggtgtt 1680

tgggaatact tacgagtcaa tctccatgct cttgtcgttg aagaactcca acctgctgag 1740

tttcttcatt tcaaggaaga actcgttgat ggagttaaga atggtaattt cactcttgag 1800

cttgatttcg agccattcaa tgcgtctatc 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

ggtcttgaga ggggatgggg agacaatgca gagcgtgtcc ttgacatgat acgtcttctt 2160

ttggaccttc ttgaggcgcc tgatccttgc actcttgaga cttttcttgg aagagtacca 2220

atggtgttca acgttgtgat cctctctcca catggttact ttgctcagga caatgttctt 2280

ggttaccctg acactggtgg acaggttgtt tacattcttg atcaagttcg tgctctggag 2340

atagagatgc ttcaacgtat taagcaacaa ggactcaaca ttaaaccaag gattctcatt 2400

ctaactcgac ttctacctga tgcggtagga actacatgcg gtgaacgtct cgagagagtt 2460

tatgattctg agtactgtga tattcttcgt gtgcccttca gaacagagaa gggtattgtt 2520

cgcaaatgga tctcaaggtt 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

tttgatccca agttcaacat tgtctctcct ggtgctgata tgagcatcta cttcccttac 3000

acagaggaga agcgtagatt gactaagttc cactctgaga tcgaggagct cctctacagc 3060

gatgttgaga acaaagagca cttatgtgtg ctcaaggaca agaagaagcc gattctcttc 3120

acaatggcta ggcttgatcg tgtcaagaac ttgtcaggtc ttgttgagtg gtacgggaag 3180

aacacccgct tgcgtgagct agctaacttg gttgttgttg gaggagacag gaggaaagag 3240

tcaaaggaca atgaagagaa agcagagatg aagaaaatgt atgatctcat tgaggaatac 3300

aagctaaacg gtcagttcag gtggatctcc tctcagatgg accgggtaag gaacggtgag 3360

ctgtaccggt acatctgtga caccaagggt gcttttgtcc aacctgcatt atatgaagcc 3420

tttgggttaa ctgttgtgga ggctatgact tgtggtttac cgactttcgc cacttgcaaa 3480

ggtggtccag ctgagatcat tgtgcacggt aaatcgggtt tccacattga cccttaccat 3540

ggtgatcagg ctgctgatac tcttgctgat ttcttcacca agtgtaagga ggatccatct 3600

cactgggatg agatctcaaa aggagggctt cagaggattg aggagaaata cacttggcaa 3660

atctattcac agaggctctt gacattgact ggtgtgtatg gattctggaa gcatgtctcg 3720

aaccttgacc gtcttgaggc tcgccgttac cttgaaatgt tctatgcatt gaagtatcgc 3780

ccattggctc aggctgttcc tcttgcacaa gatgattga 3819