



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105408339 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 16

(21) 申请号 201480036885. 9

申请人 可口可乐公司

(22) 申请日 2014. 05. 28

(72) 发明人 A·马寇思言 I·普拉卡什

(30) 优先权数据

- 61/827, 922 2013. 05. 28 US
- 61/843, 544 2013. 07. 08 US
- 61/861, 528 2013. 08. 02 US
- 61/881, 166 2013. 09. 23 US
- 61/885, 084 2013. 10. 01 US
- 61/904, 751 2013. 11. 15 US
- 61/913, 482 2013. 12. 09 US
- 61/921, 635 2013. 12. 30 US
- 61/925, 329 2014. 01. 09 US
- 61/939, 855 2014. 02. 14 US
- 14/287, 837 2014. 05. 27 US

C·邦德斯 P·索尼 J·赛里勒  
A·巴蒂 R·泰阿莱

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专  
利商标事务所 11038

代理人 郑天松

(51) Int. Cl.

- C07H 1/06(2006. 01)
- C12N 9/10(2006. 01)
- C12P 19/56(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2015. 12. 28

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2014/039666 2014. 05. 28

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02014/193888 EN 2014. 12. 04

(71) 申请人 谱赛科有限责任公司  
地址 马来西亚森美兰州

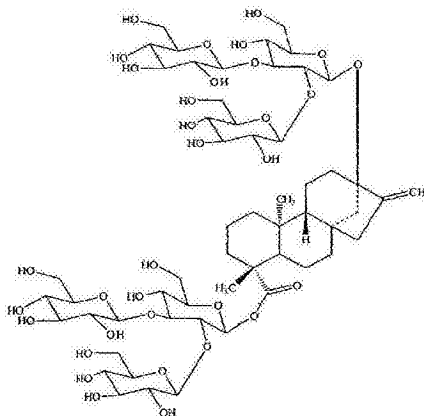
权利要求书6页 说明书103页  
序列表23页 附图68页

(54) 发明名称

高-纯度甜叶菊醇糖苷

(57) 摘要

本发明描述了制备高度纯化的甜叶菊醇糖苷,特别是莱苞迪昔A,D和M的方法。所述方法包括利用将各种起始组合物转变为目标甜叶菊醇糖苷的重组微生物。此外,随制备其的方法公开了新甜叶菊醇糖苷 reb D2 及 reb M2。高度纯化的莱苞迪昔作为非-热量甜味剂在可食用和可咀嚼的组合物诸如任何饮料,糖果,面包产品,曲奇饼干和口香糖中有用。



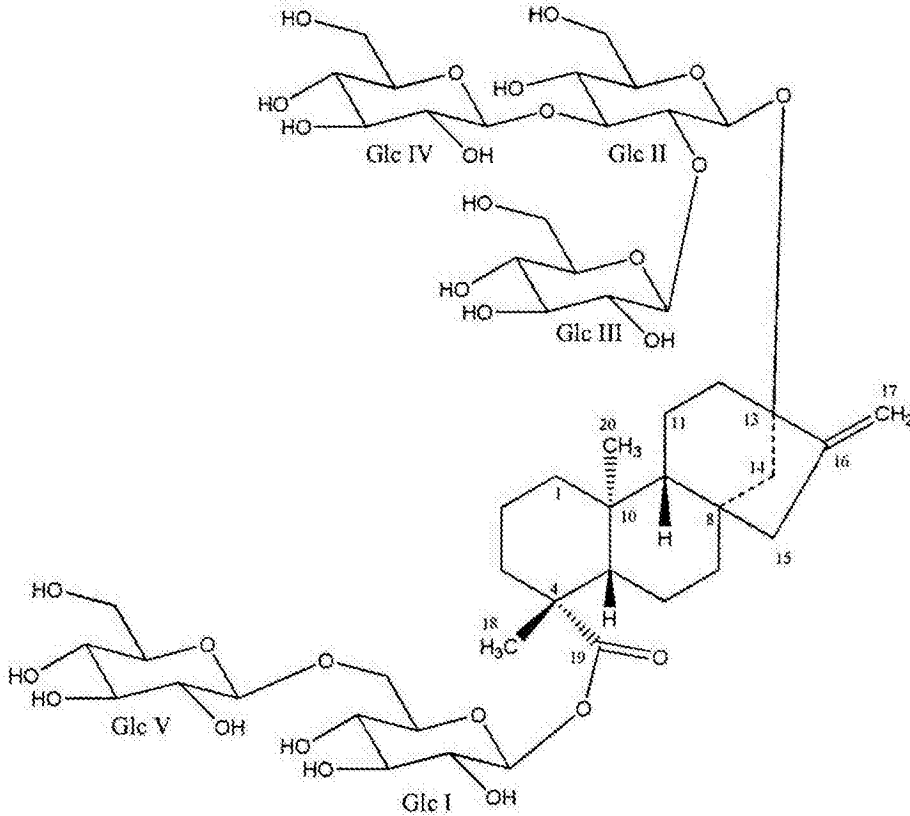
1. 产生高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷的方法,包括下列步骤:
  - (a) 提供起始组合物,其包含具有至少一个碳原子的有机化合物;
  - (b) 提供微生物,其含有选自下列的至少一种酶:甜叶菊醇生物合成酶,UDP-糖基转移酶和任选地 UDP-葡萄糖再循环酶;
  - (c) 使微生物接触含有起始组合物的培养基而产生包含至少一种目标甜叶菊醇糖苷的培养基。
2. 产生高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷的方法,包括下列步骤:
  - (a) 提供起始组合物,其包含具有至少一个碳原子的有机化合物;
  - (b) 提供生物催化剂,其包含选自下列的至少一种酶:甜叶菊醇生物合成酶,UDP-糖基转移酶和任选地 UDP-葡萄糖再循环酶;
  - (c) 使生物催化剂接触含有起始组合物的培养基而产生包含至少一种目标甜叶菊醇糖苷的培养基。
3. 权利要求 1 或 2 的方法,其还包括下列步骤:
  - (d) 自培养基分离目标甜叶菊醇糖苷而提供高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷组合物。
4. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述起始组合物选自:多元醇,碳水化合物,甜叶菊醇,甜叶菊醇糖苷和其组合。
5. 权利要求 1 的方法,其中所述微生物选自:大肠埃希氏菌 (*E. coli*),糖酵母属 (*Saccharomyces sp.*),曲霉属 (*Aspergillus sp.*),毕赤酵母属 (*Pichia sp.*),芽孢杆菌属 (*Bacillus sp.*) 和耶氏酵母属 (*Yarrowia sp.*)。
6. 权利要求 2 的方法,其中所述生物催化剂选自:全细胞悬浮液,粗裂解物或游离的或固定的形式的纯化的酶。
7. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述目标甜叶菊醇糖苷选自:甜叶菊苷,reb A,reb D,reb D2,reb E,reb M,reb M2 和其混合物。
8. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述目标甜叶菊醇糖苷在细胞内或在培养基外产生,及通过使用结晶,由膜分离,离心,提取,层析分离或此类方法的组合分离。
9. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述目标甜叶菊醇糖苷含量是大于约 95 干重%。
10. 权利要求 9 的方法,其中所述目标甜叶菊醇糖苷选自:甜叶菊苷,reb A,reb E,reb D,reb D2,reb M 及 reb M2。
11. 权利要求 9 的方法,其中所述目标甜叶菊醇糖苷是 reb M。
12. 根据权利要求 1 或 2 的方法制备的高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷组合物,其中所述目标甜叶菊醇糖苷含量是大于约 95 干重%。
13. 权利要求 12 的高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷组合物,其中所述目标甜叶菊醇糖苷选自 reb D 及 reb M。
14. 根据权利要求 1 或 2 的方法制备的高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷组合物,其中所述目标甜叶菊醇糖苷是多态性的。
15. 权利要求 14 的高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷组合物,其中所述目标甜叶菊醇糖苷是 reb D 或 reb M。
16. 消费性产品,其包含权利要求 1 或 2 的高度纯化的目标糖苷组合物,其中所述产品选自:食品,饮料,药物组合物,烟草产品,营养物组合物,口腔卫生学组合物,及化妆品组合

物。

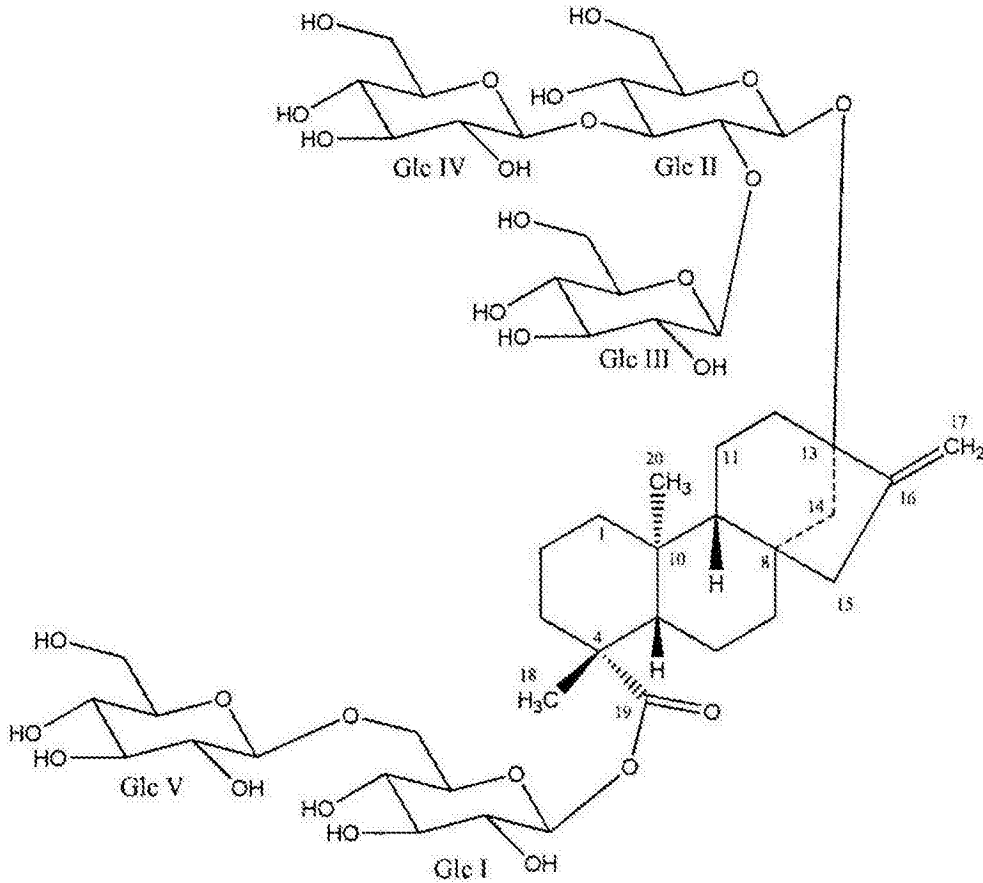
17. 消费性产品,其包含权利要求 1 或 2 的高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷组合物,其中所述产品选自:食品,饮料,药物组合物,烟草产品,营养物组合物,口腔卫生学组合物,及化妆品组合物,且其中所述目标甜叶菊醇糖苷是 reb D。

18. 消费性产品,其包含权利要求 1 或 2 的高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷组合物,其中所述产品选自:食品,饮料,药物组合物,烟草产品,营养物组合物,口腔卫生学组合物,及化妆品组合物,且其中所述目标甜叶菊醇糖苷是 reb M。

19. 分离的及纯化的 reb D2,其具有以下结构:



20. reb D2,其具有以下结构:



21. 消费性产品,其包含 reb D2。

22. 权利要求 21 的消费性产品,其中所述组合物选自:饮料;天然的汁;清爽饮料;碳酸化的软饮料;节食饮料;0 卡路里饮料;卡路里减少的饮料和食品;酸乳饮料;速食汁;速溶咖啡;粉末化的类型的速食饮料;罐装产品;糖浆;发酵的豆瓣酱;大豆酱油;醋;调味品;蛋黄酱;蕃茄酱;咖喱;汤;速溶汤;粉末化的大豆酱油;粉末化的醋;饼干类;大米饼干;薄脆饼干;面包;巧克力;焦糖;糖果;口香糖;果冻;布丁;保存的水果和蔬菜;鲜奶油;果酱;桔子酱;花酱;粉末化的乳;冰淇淋;果汁冰糕;瓶中填充的蔬菜和水果;罐装及热沸的豆;在甜味化的沙司中热沸的肉和食品;农业植物食品;海鲜;火腿;香肠;鱼火腿;鱼香肠;鱼酱;深油炸的鱼产品;干燥的海鲜产品;冷冻的食品;保存的海藻;保存的肉;烟草和药品。

23. 饮料,其包含 reb D2。

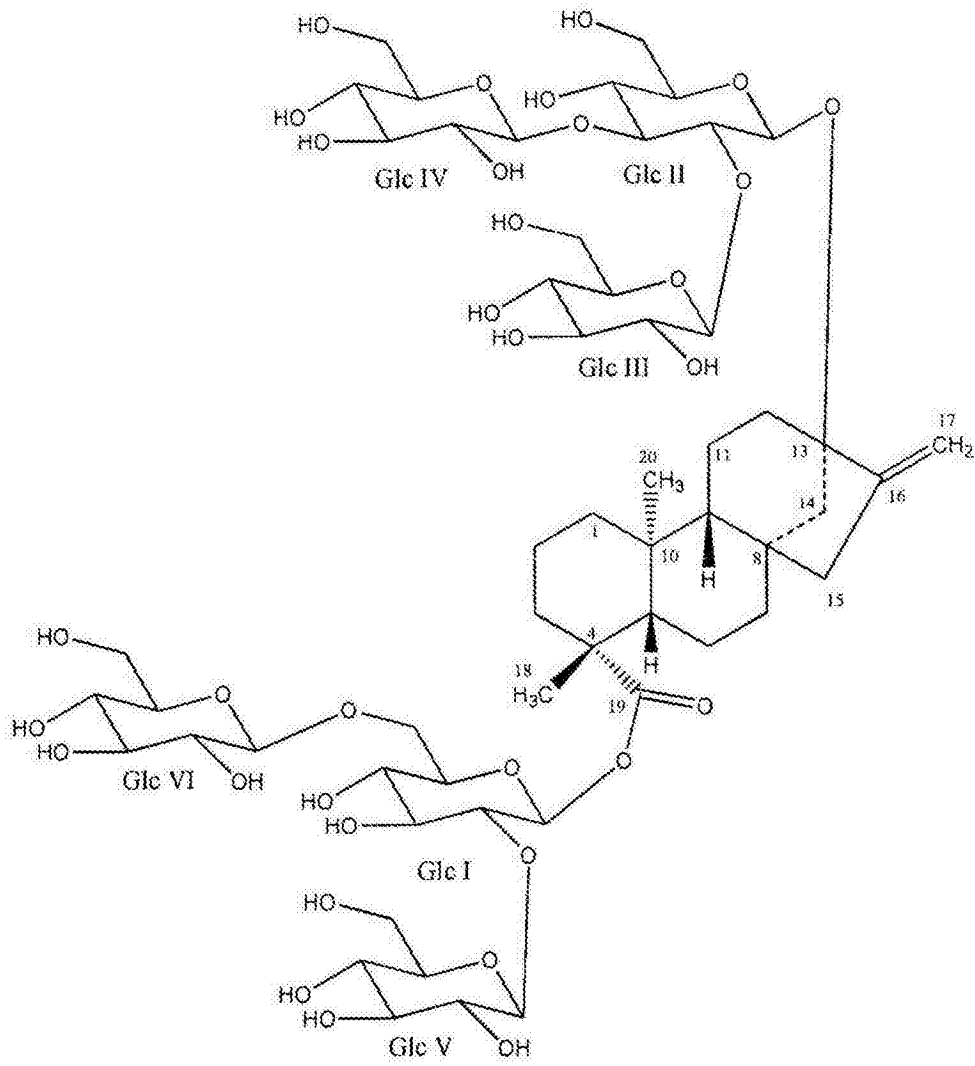
24. 制备 reb D2 的方法,其包括:

(a) 使包含 reb A 的起始组合物接触能将 reb A 转化为 reb D2 的酶,UDP- 葡萄糖和任选地 UDP- 葡萄糖再循环酶而产生包含 reb D2 的组合物;以及

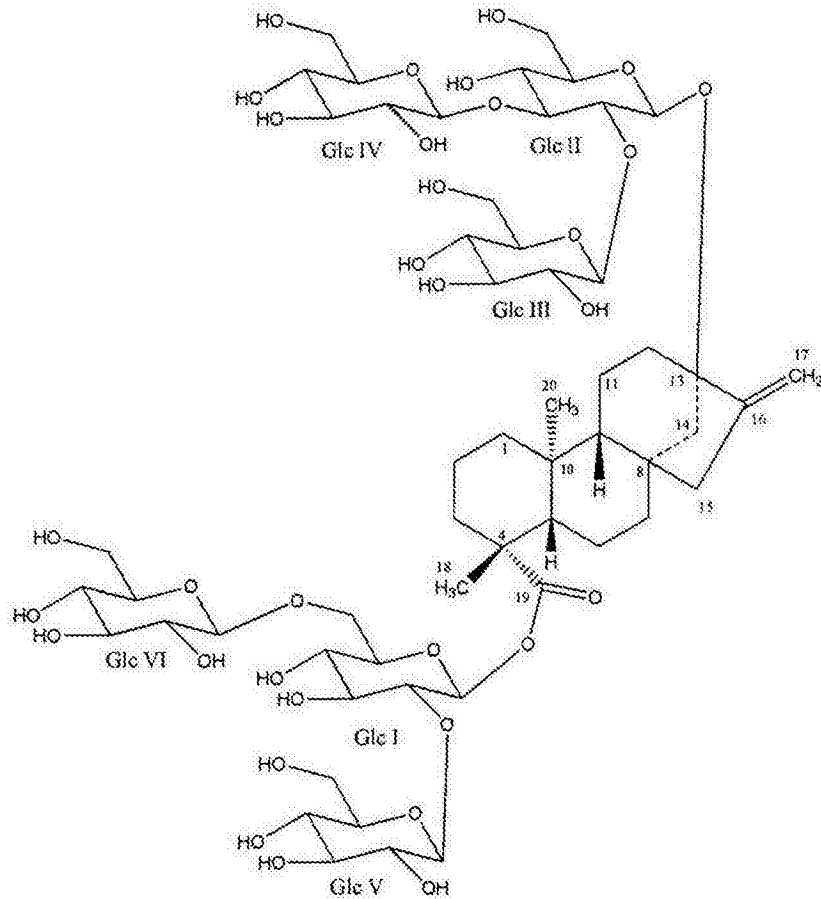
(b) 分离包含 reb D2 的组合物。

25. 权利要求 24 的方法,还包括纯化包含 reb D2 的组合物而提供具有大于约 95 无水重量%的纯度的 reb D2。

26. 分离的及纯化的 reb M2,其具有以下结构:



27. reb M2,其具有以下结构：



28. 消费性产品,其包含 reb M2。

29. 权利要求 28 的消费性产品,其中所述组合物选自:饮料;天然的汁;清爽饮料;碳酸化的软饮料;节食饮料;0 卡路里饮料;卡路里减少的饮料和食品;酸乳饮料;速食汁;速溶咖啡;粉末化的类型的速食饮料;罐装产品;糖浆;发酵的豆瓣酱;大豆酱油;醋;调味品;蛋黄酱;蕃茄酱;咖喱;汤;速溶汤;粉末化的大豆酱油;粉末化的醋;饼干类;大米饼干;薄脆饼干;面包;巧克力;焦糖;糖果;口香糖;果冻;布丁;保存的水果和蔬菜;鲜奶油;果酱;桔子酱;花酱;粉末化的乳;冰淇淋;果汁冰糕;瓶中填充的蔬菜和水果;罐装及热沸的豆;在甜味化的沙司中热沸的肉和食品;农业植物食品;海鲜;火腿;香肠;鱼火腿;鱼香肠;鱼酱;深油炸的鱼产品;干燥的海鲜产品;冷冻的食品;保存的海藻;保存的肉;烟草和药品。

30. 饮料,其包含 reb M2。

31. 制备 reb M2 的方法,其包括:

(a) 使包含 reb D2 的起始组合物接触能将 reb D2 转化为 reb M2 的酶,UDP- 葡萄糖和任选地 UDP- 葡萄糖再循环酶而产生包含 reb M2 的组合物;以及

(b) 分离包含 reb M2 的组合物。

32. 权利要求 31 的方法,还包括纯化包含 reb M2 的组合物而提供具有大于约 95 无水重量%的纯度的 reb M2。

33. 权利要求 21 的消费性产品,还包含选自下列的至少一种添加剂:碳水化合物,多元醇,氨基酸和它们的对应盐,聚-氨基酸和它们的对应盐,糖酸和它们的对应盐,核苷酸,有机酸,无机酸,包括有机酸盐和有机碱盐的有机盐,无机盐,苦化合物,风味剂及调味成分,

收敛化合物,蛋白或蛋白水解产物,表面活性剂,乳化剂,类黄酮,醇,聚合物和其组合。

34. 权利要求 21 的消费性产品,还包含选自下列的至少一种功能成分:皂苷,抗氧化剂,膳食纤维源,脂肪酸,维生素,葡萄糖胺,矿物质,防腐剂,水合剂,益生菌,益生元,体重管理剂,骨质疏松症管理剂,植物雌激素,长链伯脂肪族饱和的醇,植物甾醇和其组合。

35. 权利要求 21 的消费性产品,还包含选自下列的化合物:reb A, reb B, reb D, NSF-02, 罗汉果苷 V, 罗汉果,阿洛酮糖,阿洛糖,D-塔格糖,赤藓糖醇和其组合。

36. 桌面甜味剂组合物,其包含 reb D2。

37. 权利要求 28 的消费性产品,还包含选自下列的至少一种添加剂:碳水化合物,多元醇,氨基酸和它们的对应盐,聚-氨基酸和它们的对应盐,糖酸和它们的对应盐,核苷酸,有机酸,无机酸,包括有机酸盐和有机碱盐的有机盐,无机盐,苦化合物,风味剂及调味成分,收敛化合物,蛋白或蛋白水解产物,表面活性剂,乳化剂,类黄酮,醇,聚合物和其组合。

38. 权利要求 28 的消费性产品,还包含选自下列的至少一种功能成分:皂苷,抗氧化剂,膳食纤维源,脂肪酸,维生素,葡萄糖胺,矿物质,防腐剂,水合剂,益生菌,益生元,体重管理剂,骨质疏松症管理剂,植物雌激素,长链伯脂肪族饱和的醇,植物甾醇和其组合。

39. 权利要求 28 的消费性产品,还包含选自下列的化合物:Reb A, Reb B, Reb D, NSF-02, 罗汉果苷 V, 罗汉果,阿洛酮糖,阿洛糖,D-塔格糖,赤藓糖醇和其组合。

40. 桌面甜味剂组合物,其包含 reb M2。

41. 增强包含甜味剂的饮料的甜度的方法,其包括:

(a) 提供包含甜味剂的饮料;以及

(b) 添加选自下列的甜度增强物:reb D2, reb M2 或其组合,

其中 reb D2 和 / 或 reb M2 以甜度识别阈值或以甜度识别阈值以下的浓度存在。

42. 权利要求 1 或 2 的目标甜叶菊醇糖苷,其组合选自下列的至少一种天然存在的高强度甜味剂:甜叶菊,甜叶菊提取物,甜叶菊醇单苷,甜叶菊双糖苷,悬钩子苷,卫矛醇苷 A, 卫矛醇苷 B, 莱菔迪苷 B, 莱菔迪苷 G, 甜叶菊苷, 莱菔迪苷 C, 莱菔迪苷 F, 莱菔迪苷 A, 莱菔迪苷 I, 莱菔迪苷 E, 莱菔迪苷 H, 莱菔迪苷 L, 莱菔迪苷 K, 莱菔迪苷 J, 莱菔迪苷 M, 莱菔迪苷 M2, 莱菔迪苷 D, 莱菔迪苷 D2, 莱菔迪苷 N 或莱菔迪苷 O, 或甜叶菊 (*Stevia rebaudiana*) 中发现的甜叶菊醇的其他糖苷,罗汉果苷, Oubli 果甜蛋白 (brazzein), 新橙皮苷二氢查耳酮,甘草酸和其盐,祝马丁,紫苏糖,PERNANDULCIN,木库罗苷,白元参苷,糙苏苷-I,二甲基-六氢茱-二羧酸,阿布鲁索苷,巴西甘草甜素,肉质雪胆皂苷,甜茶树苷,皮提罗苷,聚婆朵苷 A, 巴西红木素,甜过江藤甜蛋白,叶甜素,菝葜苷,根皮苷,三叶苷,二氢黄酮醇,二氢槲皮素-3-乙酸,新落新妇苷,反式-桂醛,莫纳汀和其盐,SELLIGUEAIN A, 苏木素,应乐果甜蛋白,水龙骨甜素,皮提罗苷 A, 皮提罗苷 B, 马槟榔甜蛋白,潘塔亭,蜜拉圣果素,仙茅甜蛋白,NEOCULIN,绿原酸,西那林,罗汉果甜味剂,罗汉果苷 V, 罗汉果苷 VI, 光果木鳖皂苷,赛门苷或罗汉果 (*Siraitia grosvenorii*) 中发现的罗汉果醇的其他糖苷和 / 或其组合。

43. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述目标甜叶菊醇糖苷含量是大于约 99 干重%。

## 高 - 纯度甜叶菊醇糖苷

### 【技术领域】

[0001] 本发明涉及制备包含甜叶菊醇糖苷的组合物,包括高度纯化的甜叶菊醇糖苷组合物的生物催化过程。本发明也涉及新甜叶菊醇糖苷,分离其的方法和新甜叶菊醇糖苷的用途。

### 【背景技术】

[0002] 高强度甜味剂具有蔗糖的甜度水平的许多倍的甜度水平。它们基本上是非 - 热量的,及通常在膳食和减小的卡路里产品,包括食品和饮料中使用。高强度甜味剂不引发升胰岛素应答,使它们适合于在面向糖尿病患者和其他对于控制他们的碳水化合物摄入感兴趣的个体的产品中使用。

[0003] 甜叶菊醇糖苷是在甜叶菊 (*Stevia rebaudiana* Bertoni),在南美洲的特定地区天然生长的紫萁科 (Asteraceae) (菊科 (Compositae)) 的多年生灌木的叶中发现的一类化合物。它们结构上表征为单碱基,甜叶菊醇,由在位置 C13 和 C19 碳水化合物残基的存在而不同。它们在甜叶菊属 (*Stevia*) 叶中蓄积,组成大致 10% ~ 20% 的总干重。以干重计,在甜叶菊属 (*Stevia*) 的叶中发现的 4 种主要糖苷一般包括甜叶菊苷 (9.1%), 莱苞迪苷 A (3.8%), 莱苞迪苷 C (0.6 ~ 1.0%) 和卫矛醇苷 A (0.3%)。其他知道的甜叶菊醇糖苷包括莱苞迪苷 B, C, D, E, F 和 M, 甜叶菊双糖苷和悬钩子苷。

[0004] 尽管知道自甜叶菊 (*Stevia rebaudiana*) 制备甜叶菊醇糖苷的方法,许多这些方法不适宜于商业上使用。

[0005] 因此,对于简单,有效和经济的制备包含甜叶菊醇糖苷的组合物,包括高度纯化的甜叶菊醇糖苷组合物的方法仍有需求。

[0006] 此外,对于新甜叶菊醇糖苷和制备及分离其的方法仍有需求。

### 【发明概述】

[0008] 本发明提供制备包含目标甜叶菊醇糖苷的组合物生物催化过程,其通过使包含有机底物的起始组合物接触微生物和 / 或生物催化剂,由此产生包含目标甜叶菊醇糖苷的组合物。

[0009] 起始组合物可为任何包含至少一个碳原子的有机化合物。在一实施方式中,起始组合物选自:多元醇或糖醇,各种碳水化合物。

[0010] 目标甜叶菊醇糖苷可为任何甜叶菊醇糖苷。在一实施方式中,目标甜叶菊醇糖苷是甜叶菊醇单苷,甜叶菊双糖苷,悬钩子苷,卫矛醇苷 B, 卫矛醇苷 A, 莱苞迪苷 B, 莱苞迪苷 G, 甜叶菊苷, 莱苞迪苷 C, 莱苞迪苷 F, 莱苞迪苷 A, 莱苞迪苷 I, 莱苞迪苷 E, 莱苞迪苷 H, 莱苞迪苷 L, 莱苞迪苷 K, 莱苞迪苷 J, 莱苞迪苷 M, 莱苞迪苷 M2, 莱苞迪苷 D, 莱苞迪苷 D2, 莱苞迪苷 N, 莱苞迪苷 O 或合成甜叶菊醇糖苷。

[0011] 在一实施方式中,目标甜叶菊醇糖苷是甜叶菊苷。

[0012] 在另一实施方式中,目标甜叶菊醇糖苷是莱苞迪苷 A。

[0013] 在再一实施方式中,目标甜叶菊醇糖苷是莱苞迪苷 D。

- [0014] 在仍另一实施方式中,目标甜叶菊醇糖苷是莱苞迪昔 M(也被称为莱苞迪昔 X)。
- [0015] 微生物可为具有对于转变起始组合物为目标甜叶菊醇糖苷必需的酶任何微生物。
- [0016] 生物催化剂会包含用于转变起始组合物为目标甜叶菊醇糖苷的至少一种酶。
- [0017] 生物催化剂可位于微生物的表面上和 / 或在细胞内或可分泌到微生物外。
- [0018] 生物催化剂可为全细胞悬浮液,粗裂解物或纯化的酶。
- [0019] 生物催化剂可处于游离的形式或固定到由无机或有机材料制造的固体支持物。
- [0020] 对于转变起始组合物为目标甜叶菊醇糖苷必需的酶包括甜叶菊醇生物合成酶,UDP-糖基转移酶(UGT)和 / 或 UDP-再循环酶。
- [0021] 在一实施方式中,甜叶菊醇生物合成酶包括甲羟戊酸(MVA)通路酶。
- [0022] 在另一实施方式中,甜叶菊醇生物合成酶包括非-甲羟戊酸 2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸通路(MEP/DOXP)酶。
- [0023] 在一实施方式中,甜叶菊醇生物合成酶选自:牻牛儿基牻牛儿基二磷酸合酶,柯巴基二磷酸合酶,贝壳杉烯合酶,贝壳杉烯氧化酶,贝壳杉烯酸 13-羟化酶(KAH),甜叶菊醇合成酶,脱氧木酮糖 5-磷酸合酶(DXS),D-1-脱氧木酮糖 5-磷酸还原异构酶(DXR),4-二磷酸胞苷基-2-C-甲基-D-赤藓糖醇合酶(CMS),4-二磷酸胞苷基-2-C-甲基-D-赤藓糖醇激酶(CMK),4-二磷酸胞苷基-2-C-甲基-D-赤藓糖醇 2,4-环二磷酸合酶(MCS),1-羟基-2-甲基-2(E)-丁烯基 4-二磷酸合酶(HDS),1-羟基-2-甲基-2(E)-丁烯基 4-二磷酸还原酶(HDR),乙酰乙酰-CoA 硫解酶,截短的 HMG-CoA 还原酶,甲羟戊酸激酶,磷酸甲羟戊酸激酶,甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶,细胞色素 P450 还原酶等。
- [0024] UDP-葡萄糖基转移酶可为能向甜叶菊醇及或甜叶菊醇糖苷底物添加至少一个葡萄糖单元而提供目标甜叶菊醇糖苷的任何 UDP-葡萄糖基转移酶。
- [0025] 在一实施方式中,甜叶菊醇生物合成酶和 UDP-葡萄糖基转移酶在微生物中产生。微生物可为,例如,大肠埃希氏菌(*E. coli*),糖酵母属(*Saccharomyces* sp.),曲霉属(*Aspergillus* sp.),毕赤酵母属(*Pichia* sp.),芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.),耶氏酵母属(*Yarrowia* sp.)等。在另一实施方式中,合成 UDP-葡萄糖基转移酶。
- [0026] 在一实施方式中,UDP-葡萄糖基转移酶选自:UGT74G1,UGT85C2,UGT76G1,UGT91D2 和与这些多肽以及编码这些 UGT 的分离的核酸分子具有实质性(>85%)同一性的 UGT。
- [0027] 在一实施方式中,甜叶菊醇生物合成酶,UGT 和 UDP-葡萄糖再循环系统存在于一个微生物中。微生物可为例如,大肠埃希氏菌(*E. coli*),糖酵母属(*Saccharomyces* sp.),曲霉属(*Aspergillus* sp.),毕赤酵母属(*Pichia* sp.),芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.),耶氏酵母属(*Yarrowia* sp.)
- [0028] 在一实施方式中,UDP-葡萄糖基转移酶是能向悬钩子苷添加至少一个葡萄糖单元而形成甜叶菊苷的任何 UDP-葡萄糖基转移酶。在特定实施方式中,UDP-葡萄糖基转移酶是 UGT91D2。
- [0029] 在一实施方式中,UDP-葡萄糖基转移酶是能向甜叶菊苷添加至少一个葡萄糖单元而形成莱苞迪昔 A 的任何 UDP-葡萄糖基转移酶。在特定实施方式中,UDP-葡萄糖基转移酶是 UGT76G1。
- [0030] 在另一实施方式中,UDP-葡萄糖基转移酶是能向莱苞迪昔 A 添加至少一个葡萄糖

单元而形成莱苞迪昔 D 的任何 UDP- 葡萄糖基转移酶。在特定实施方式中, UDP- 葡萄糖基转移酶是 UGT91D2。在另一实施方式中, UGT 是由定向衍化产生的具有更高活性和 / 或选择性的 UGT91D2 的改善的变体。

[0031] 在仍另一实施方式中, UDP- 葡萄糖基转移酶是能向莱苞迪昔 D 添加至少一个葡萄糖单元而形成莱苞迪昔 M 的任何 UDP- 葡萄糖基转移酶。在特定实施方式中, UDP- 葡萄糖基转移酶是 UGT76G1。在另一实施方式中, UGT 是由定向衍化产生的具有更高活性和 / 或选择性的 UGT76G1 的改善的变体。

[0032] 任选地, 本发明的方法还包含再循环 UDP 而提供 UDP- 葡萄糖。在一实施方式中, 方法包括通过提供再循环催化剂和再循环底物再循环 UDP, 使得使用催化性量的 UDP- 葡萄糖基转移酶和 UDP- 葡萄糖 (图 3) 实施甜叶菊醇糖苷底物生物转化为目标甜叶菊醇糖苷。

[0033] 在一实施方式中, 再循环催化剂是蔗糖合酶。

[0034] 在一实施方式中, 再循环底物是蔗糖。

[0035] 任选地, 本发明的方法还包括自起始组合物分离目标甜叶菊醇糖苷。目标甜叶菊醇糖苷可由至少一种适合的方法, 诸如, 例如, 结晶, 由膜分离, 离心, 提取, 层析分离或此类方法的组合分离。

[0036] 在一实施方式中, 目标甜叶菊醇糖苷可在微生物内产生。在另一实施方式中, 目标甜叶菊醇糖苷可分泌出来到培养基中。在另一个实施方式中, 释放的甜叶菊醇糖苷可自培养基连续移出。在仍另一实施方式中, 目标甜叶菊醇糖苷在反应完成之后分离。

[0037] 在一实施方式中, 分离产生组合物包含大于约 80 无水重量%的目标甜叶菊醇糖苷, 即, 高度纯化的甜叶菊醇糖苷组合物。在另一实施方式中, 分离产生包含大于约 90 重量%的目标甜叶菊醇糖苷的组合物。在特定实施方式中, 其组合物包含大于约 95 重量%的目标甜叶菊醇糖苷。在其他实施方式中, 其组合物包含大于约 99 重量%的目标甜叶菊醇糖苷。

[0038] 目标甜叶菊醇糖苷可为任何多态性的或无定形形式, 包括水合物, 溶剂化物, 无水物或其组合。

[0039] 纯化的目标甜叶菊醇糖苷可作为甜味剂用于消费性产品。适合的消费性产品包括, 但不限于, 食品, 饮料, 药物组合物, 烟草产品, 营养物组合物, 口腔卫生学组合物, 及化妆品组合物。

[0040] 本发明也提供新甜叶菊醇糖苷莱苞迪昔 D2 (reb D2, 莱苞迪昔 D 的异构体) 和莱苞迪昔 M2 (reb M2, 莱苞迪昔 M 的异构体), 其分别是 reb D 及 reb M 的异构体。在一实施方式中, 提供分离的及纯化的 reb D2。在另一实施方式中, 提供分离的及纯化的 reb M2。本文公开的 reb D2 及 reb M2 也可存在于任何消费性产品中。在特定实施方式中, 提供包含 reb D2 和 / 或 reb M2 的饮料。

[0041] 本文也提供制备 reb D2 及 reb M2 的方法。二者在 reb A 向 reb D 的生物转化期间形成。reb M2 被认为自 reb D2 的原位生物转化形成。

[0042] 在一实施方式中, 本发明是制备包含 reb D2 的组合物的方法, 其包括: (a) 使包含 reb A 的起始组合物接触能将 reb A 转化为 reb D2 的酶, UDP- 葡萄糖和任选地 UDP- 葡萄糖再循环酶, 而产生包含 reb D2 的组合物, 及 (b) 分离包含 reb D2 的组合物。

[0043] 在另一实施方式中, 本发明是制备包含 reb M2 的组合物的方法, 其包括 (a) 使包

含 reb D2 的起始组合物接触能将 reb D2 转化为 reb M2 的酶,UDP-葡萄糖和任选地 UDP-葡萄糖再循环酶,而产生包含 reb M2 的组合物,及 (b) 及分离包含 reb M2 的组合物。

[0044] 还是制备包含 reb M2 的组合物的方法,包括 (a) 使包含 reb A 的起始组合物接触能将 reb A 转化为 reb D2 的酶,UDP-葡萄糖和任选地 UDP-葡萄糖再循环酶,而产生包含 reb D2 的组合物,(b) 任选地,分离包含 reb D2 的组合物,(c) 使包含 reb D2 的组合物接触能将 reb D2 转化为 reb M2 的酶,UDP-葡萄糖和任选地 UDP-葡萄糖再循环酶而产生包含 reb M2 的组合物,及 (d) 分离包含 reb M2 的组合物。

[0045] 组合物可还被纯化而提供具有大于约 95 干重%的纯度的 reb D2 或 reb M2。

### 【附图说明】

[0046] 包括附图而提供本发明的进一步理解。图例证本发明的实施方式,与说明书一起用于解释本发明的实施方式的原理。

[0047] 图 1 显示 reb M 的结构。

[0048] 图 2 显示自甜叶菊苷生物催化产生 reb M。

[0049] 图 3 显示自甜叶菊苷,使用酶 UGT76G1 生物催化产生 reb A,和相伴的 UDP 向 UDP 葡萄糖经蔗糖合酶的再循环。

[0050] 图 4 显示 reb M 的 IR 谱。

[0051] 图 5. 显示自 reb D 的 reb M 的生物催化产生的产物的 HPLC 层析谱,如详细描述于实施例 14 中。具有 24.165 分钟的保留时间的峰对应于未反应的 reb D。具有 31.325 分钟的保留时间的峰对应于 reb M。

[0052] 图 6. 显示纯化的自 reb D 由生物催化产生的 reb M 的 HPLC 层析谱。

[0053] 图 7 显示 reb M 标准物的 HPLC 层析谱。

[0054] 图 8 显示 reb M 标准物及自 reb D 自生物转化纯化的 reb M 的共注射的 HPLC 层析谱。

[0055] 图 9 显示 reb M 标准物及自 reb D 生物合成后纯化的 reb M 的  $^1\text{H}$  NMR 谱的叠加。

[0056] 图 10 显示自 reb D 生物催化产生后纯化的 reb M 的 HRMS 谱。

[0057] 图 11 显示半-合成甜叶菊醇糖苷混合物,批号 CB-2977-106 的 LC-MS 分析,显示 TIC(A),在 1.8min 的峰的 MS(B),在 4.1min 的 reb M2 峰的 MS(C),在 6.0min 的 reb D 峰的 MS(D),在 7.7min 的 reb D2 峰的 MS(E),在 9.4min 的峰的 MS(F),在 15.2min 的莱苞迪昔 A 峰的 MS(G),在 16.5min 的峰的 MS(H),及在 18.3min 的峰的 MS(I)。

[0058] 图 12 显示半-合成甜叶菊醇糖苷混合物,批号 CB-2977-106 的踪迹。层析谱网格线不是均质的,由于检测器在注射后 14min 再校准。

[0059] 图 13 显示半-合成甜叶菊醇糖苷混合物,批号 CB-2977-106(A),分离的 reb M2(B),分离的 reb D(C) 及分离的 reb D2(D) 的 HPLC 分析。

[0060] 图 14 显示 reb D2 的  $^1\text{H}$  NMR 谱 (500MHz, 吡啶- $d_5$ )。

[0061] 图 15 显示 reb D2 的  $^{13}\text{C}$  NMR 谱 (125MHz, 吡啶- $d_5$ )。

[0062] 图 16 显示 reb D2 的  $^{13}\text{C}$  NMR 谱的放大图 (125MHz, 吡啶- $d_5$ )。

[0063] 图 17 显示 reb D2 的  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY 谱 (500MHz, 吡啶- $d_5$ )。

[0064] 图 18 显示 reb D2 的 HSQC-DEPT 谱 (500MHz, 吡啶- $d_5$ )。

- [0065] 图 19 显示 reb D2 的 HMBC 谱。
- [0066] 图 20 显示 reb D2 (500MHz, 吡啶-d<sub>5</sub>) 的 HMBC 谱的放大图。
- [0067] 图 21 显示 reb M2 的 <sup>1</sup>H NMR 谱 (500MHz, D<sub>2</sub>O)。
- [0068] 图 22 显示 reb M2 的 <sup>13</sup>C NMR 谱 (125MHz, D<sub>2</sub>O/TSP)。
- [0069] 图 23 显示 reb M2 的 <sup>13</sup>C NMR 谱的放大图 (125MHz, D<sub>2</sub>O/TSP)。
- [0070] 图 24 显示 reb M2 的 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 谱 (500MHz, D<sub>2</sub>O)。
- [0071] 图 25 显示 reb M2 的 HSQC-DEPT 谱 (500MHz, D<sub>2</sub>O)。
- [0072] 图 26 显示 reb M2 (500MHz, D<sub>2</sub>O) 的 HMBC 谱。
- [0073] 图 27 显示 reb M2 (500MHz, D<sub>2</sub>O) 的 HMBC 谱的放大图。
- [0074] 图 28 显示 reb M2 的另一 HMBC 谱。
- [0075] 图 29 显示 reb M2 的 <sup>1</sup>H NMR 谱。
- [0076] 图 30 显示 reb M2 的 <sup>13</sup>C NMR 谱。
- [0077] 图 31 显示 reb M2 的另一 <sup>13</sup>C NMR 谱。
- [0078] 图 32 显示 reb M2 的 <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 谱。
- [0079] 图 33 显示 reb M2 的 HSQC-DEPT 谱。
- [0080] 图 34 显示 reb M2 的 HMBC 谱。
- [0081] 图 35 显示 reb M2 的另一 HMBC 谱。
- [0082] 图 36 显示 reb M2 的 1D-TOCSY 谱。
- [0083] 图 37 显示 reb M2 的 1D-TOCSY 谱。
- [0084] 图 38 显示 reb M2 的 1D-TOCSY 谱。
- [0085] 图 39 显示 reb M2 的 1D-TOCSY 谱。
- [0086] 图 40 显示 HPLC (CAD) 分析。
- [0087] 图 41 显示 HPLC (CAD) 分析。
- [0088] 图 42 显示 HPLC (CAD) 分析。
- [0089] 图 43 显示 HPLC (CAD) 分析。
- [0090] 图 44 显示 HPLC (CAD) 分析。
- [0091] 图 45 显示 HPLC (CAD) 分析。
- [0092] 图 46 显示 HPLC (CAD) 分析。
- [0093] 图 47 显示 HPLC (CAD) 分析。
- [0094] 图 48 显示 HPLC (CAD) 分析。
- [0095] 图 49 显示 HPLC (CAD) 分析。
- [0096] 图 50 显示 HPLC (CAD) 分析。
- [0097] 图 51 显示 HPLC (CAD) 分析。
- [0098] 图 52 显示 HPLC (CAD) 分析。
- [0099] 图 53 显示 LCMS 层析谱。
- [0100] 图 54 显示 LCMS 层析谱。
- [0101] 图 55 显示 LCMS 层析谱。
- [0102] 图 56 显示 LCMS 层析谱。
- [0103] 图 57 显示反应特征。

- [0104] 图 58 显示 HPLC (CAD) 分析。  
[0105] 图 59 显示 HPLC (CAD) 分析。  
[0106] 图 60 显示 HPLC (CAD) 分析。  
[0107] 图 61 显示 HPLC (CAD) 分析。  
[0108] 图 62 显示 HPLC (CAD) 分析。  
[0109] 图 63 显示 LCMS 层析谱。  
[0110] 图 64 显示 HPLC (CAD) 分析。  
[0111] 图 65 显示 HPLC (CAD) 分析。  
[0112] 图 66 显示 HPLC (CAD) 分析。  
[0113] 图 67 显示 HPLC (CAD) 分析。  
[0114] 图 68 显示 HPLC (CAD) 分析。  
[0115] 图 69 显示 HPLC 分析的结果。

[0116] **【发明详述】**

[0117] 本发明提供制备包含目标甜叶菊醇糖苷的组合物的生物催化过程,其通过使起始组合物,包含有机底物,接触微生物和 / 或生物催化剂,由此产生包含目标甜叶菊醇糖苷的组合物。

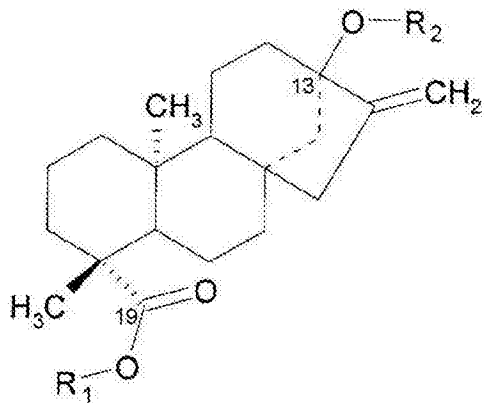
[0118] 本发明的一个目的是提供自各种起始组合物制备甜叶菊醇糖苷,特别是甜叶菊苷, reb E, reb A, reb D, reb D2, reb M 及 reb M2 的有效生物催化方法。

[0119] 如本文所用,“生物催化”或“生物催化”指称使用天然的或遗传加工的生物催化剂,诸如细胞,蛋白酶,而对有机化合物实施单或多步骤化学转化。生物催化包括发酵,生物合成和生物转化过程。使用游离的以及固定的形式的生物催化剂的分离的酶和全体 - 细胞生物催化方法二者为本领域所知。生物催化剂蛋白酶可为天然存在的或重组蛋白。

[0120] 如本文所用,术语“甜叶菊醇糖苷”指称甜叶菊醇的糖苷,包括但不限于天然存在的甜叶菊醇糖苷,例如甜叶菊醇单苷,甜叶菊双糖苷,悬钩子苷,卫矛醇苷 B,卫矛醇苷 A,莱苞迪苷 B,莱苞迪苷 G,甜叶菊苷,莱苞迪苷 C,莱苞迪苷 F,莱苞迪苷 A,莱苞迪苷 I,莱苞迪苷 E,莱苞迪苷 H,莱苞迪苷 L,莱苞迪苷 K,莱苞迪苷 J,莱苞迪苷 M,莱苞迪苷 M2,莱苞迪苷 D,莱苞迪苷 D2,莱苞迪苷 N,莱苞迪苷 O,合成甜叶菊醇糖苷,例如酶学地葡萄糖基化的甜叶菊醇糖苷和其组合。

[0121] 甜叶菊醇和其糖苷的化学结构

[0122]



化合物	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
甜叶菊醇	H	H
甜叶菊醇单苷	H	β-Glc
甜叶菊醇单葡萄糖基酯	β-Glc	H
悬钩子苷	β-Glc	β-Glc
甜叶菊双糖苷	H	β-Glc-β-Glc (2→1)
甜叶菊苷	β-Glc	β-Glc-β-Glc (2→1)
莱芭迪苷 A	β-Glc	β-Glc-β-Glc (2→1)   β-Glc (3→1)
莱芭迪苷 D	β-Glc-β-Glc (2→1)	β-Glc-β-Glc (2→1)   β-Glc (3→1)
莱芭迪苷 E	β-Glc-β-Glc (2→1)	β-Glc-β-Glc (2→1)
莱芭迪苷 M	β-Glc-β-Glc (2→1)   β-Glc (3→1)	β-Glc-β-Glc (2→1)   β-Glc (3→1)

[0123] (Glc = 葡萄糖)

[0124] 【起始组合物】

[0125] 如本文所用，“起始组合物”指称任何含有一种或更多包含至少一个碳原子的有机化合物的组合物（通常水溶液）。

[0126] 在一实施方式中，起始组合物选自：多元醇和各种碳水化合物。

[0127] 术语“多元醇”指称含有多于一个羟基的分子。多元醇可为二元醇，三元醇，或四元醇，其分别含有 2, 3 和 4 个羟基。多元醇也可含有多于 4 个羟基，诸如五元醇，六元醇，七元醇，等，其分别含有 5, 6 或 7 个羟基。此外，多元醇也可作为糖醇，多羟基醇或是还原型的碳水化合物，其中所述羰基（醛或酮，还原糖）被还原成伯或仲羟基的多元醇。多元醇的例子包括，但不限于，赤藓糖醇，麦芽糖醇，甘露糖醇，山梨糖醇，乳糖醇，木糖醇，肌醇，ISOMALT，丙二醇，甘油，苏糖醇，半乳糖醇，氢化的异麦芽酮糖，还原的异麦芽糖-寡糖，还原的木-寡糖，还原的龙胆-寡糖，还原的麦芽糖糖浆，还原的葡萄糖糖浆，氢化的淀粉水解产物，聚多羟基糖醇和糖醇或任何其他能被还原的碳水化合物。

[0128] 术语“碳水化合物”指称通式  $(\text{CH}_2\text{O})_n$  的用多羟基取代的醛或酮化合物,其中  $n$  是  $3 \sim 30$ ,以及它们的寡聚体和聚合物。本发明的碳水化合物可,此外,在一个或更多位置被取代或脱氧。碳水化合物,如本文所用,包括未修饰的碳水化合物,碳水化合物衍生物,取代的碳水化合物及修饰的碳水化合物。如本文所用,短语“碳水化合物衍生物”,“取代的碳水化合物”和“修饰的碳水化合物”是同义的。修饰的碳水化合物是指其中至少一个原子已被添加,去除或取代的,或其组合的任何碳水化合物。由此,碳水化合物衍生物或取代的碳水化合物包括取代的及未经取代的单糖,二糖,寡糖和多糖。碳水化合物衍生物或取代的碳水化合物任选地可在任何对应 C- 位置脱氧,和 / 或被下列一个或更多部分取代,诸如氢,卤素,卤代烷基,羧基,酰基,酰氧基,氨基,酰胺基,羧基衍生物,烷氨基,二烷基氨基,芳氨基,烷氧基,芳氧基,硝基,氰基,磺基,巯基,亚氨基,磺酰基,次磺酰基,亚硫酰基,氨磺酰基,碳烷氧基,羧酰胺基,膦酰基,亚膦酰基,磷酰基,膦基,硫酯,硫醚,肟基,肟基,氨基甲酰基,磷酸,膦酸根合或任何其他有活力的官能团,只要碳水化合物衍生物或取代的碳水化合物发挥改善甜味剂组合物的甜味的功能。

[0129] 可根据本发明使用的碳水化合物的例包括,但不限于,塔格糖,海藻糖,半乳糖,鼠李糖,各种环糊精,环状寡糖,各种类型的麦芽糊精,葡聚糖,蔗糖,葡萄糖,核酮糖,果糖,蔗糖,阿拉伯糖,木糖,来苏糖,阿洛糖,阿卓糖,甘露糖,艾杜糖,乳糖,麦芽糖,转化糖,异海藻糖,新海藻糖,异麦芽酮糖,赤藓糖,脱氧核糖,古洛糖,艾杜糖,塔罗糖,赤藓酮糖,木酮糖,阿洛酮糖,松二糖,纤维二糖,支链淀粉,葡萄糖胺,甘露糖胺,岩藻糖,葡萄糖醛酸,葡萄糖酸,葡萄糖酸-内酯,阿比可糖,半乳糖胺,甜菜寡糖,异麦芽糖-寡糖(异麦芽糖,异麦芽糖丙糖,潘糖等),木-寡糖(木三糖,木二糖等),木-终结的寡糖,龙胆-寡糖(龙胆二糖,龙胆三糖,龙胆四糖等),山梨糖,黑曲霉-寡糖,异麦芽酮糖寡糖,果糖寡糖(蔗果三糖,霉菌赤藓醛糖等),麦芽四醇,麦芽三醇,麦芽糖-寡糖(麦芽三糖,麦芽四糖,麦芽五糖,麦芽六糖,麦芽七糖等),淀粉,菊粉,菊粉-寡糖,乳果糖,蜜二糖,棉子糖,核糖,异构化的液体糖诸如高果糖玉米糖浆,偶联糖和大豆寡糖。此外,本文所用的碳水化合物可为 D- 或 L- 构型。

[0130] 起始组合物可为合成或纯化的(部分或完全),可商购的或制备的。

[0131] 在一实施方式中,起始组合物是甘油。

[0132] 在另一实施方式中,起始组合物是葡萄糖。

[0133] 在再一实施方式中,起始组合物是蔗糖。

[0134] 在仍另一实施方式中,起始组合物是淀粉。

[0135] 在另一实施方式中,起始组合物是麦芽糊精。

[0136] 起始组合物的有机化合物作为用于产生目标甜叶菊醇糖苷的底物,如本文所述。

[0137] 【目标甜叶菊醇糖苷】

[0138] 本方法的目标甜叶菊醇糖苷可为可由本文公开的方法制备的任何甜叶菊醇糖苷。在一实施方式中,目标甜叶菊醇糖苷选自:甜叶菊醇单苷,甜叶菊双糖苷,悬钩子苷,卫矛醇苷 B,卫矛醇苷 A,莱苞迪苷 B,莱苞迪苷 G,甜叶菊苷,莱苞迪苷 C,莱苞迪苷 F,莱苞迪苷 A,莱苞迪苷 I,莱苞迪苷 E,莱苞迪苷 H,莱苞迪苷 L,莱苞迪苷 K,莱苞迪苷 J,莱苞迪苷 M,莱苞迪苷 M2,莱苞迪苷 D,莱苞迪苷 D2,莱苞迪苷 N 或莱苞迪苷 O,或其他甜叶菊醇的糖苷。

[0139] 在一实施方式中,目标甜叶菊醇糖苷是甜叶菊苷。在另一实施方式中,目标甜叶菊

醇糖苷是 reb A。在再一实施方式中,目标甜叶菊醇糖苷是 reb E。在仍另一实施方式中,目标甜叶菊醇糖苷是 reb D。在仍另一实施方式中,目标甜叶菊醇糖苷是 reb D2。在进一步实施方式中,目标甜叶菊醇糖苷是 reb M。在仍还另一实施方式,目标甜叶菊醇糖苷是 reb M2。

[0140] 目标甜叶菊醇糖苷可处于任何多态性或无定形形式,包括水合物,溶剂化物,无水或其组合。

[0141] 在一实施方式中,本发明是用于产生 reb D 的生物催化过程。

[0142] 在仍另一实施方式中,本发明是用于产生 reb D2 的生物催化过程。

[0143] 在再一实施方式中,本发明是用于产生 reb M 的生物催化过程。

[0144] 在进一步实施方式中,本发明是用于产生 reb M2 的生物催化过程。

[0145] 任选地,本发明的方法还包括自起始组合物分离目标甜叶菊醇糖苷。目标甜叶菊醇糖苷可由任何适合的方法,诸如,例如,结晶,由膜分离,离心,提取,层析分离或此类方法的组合分离。

[0146] 在特定实施方式中,本文所述的方法得到高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷组合物。术语“高度纯化的”,如本文所用,指称组合物具有大于约 80 无水重量%的目标甜叶菊醇糖苷。在一实施方式中,高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷组合物含有大于约 90 无水重量%的目标甜叶菊醇糖苷,诸如,例如,以干重计大于约 91%,大于约 92%,大于约 93%,大于约 94%,大于约 95%,大于约 96%,大于约 97%,大于约 98%或大于约 99%目标甜叶菊醇糖苷含量。

[0147] 在一实施方式中,当目标甜叶菊醇糖苷是 reb M 时,本文所述的方法提供组合物具有以干重计大于约 90% reb M 含量。在另一特定实施方式中,当目标甜叶菊醇糖苷是 reb M 时,本文所述的方法提供组合物包含以干重计大于约 95% reb M 含量。

[0148] 在另一实施方式中,当目标甜叶菊醇糖苷是 reb M2 时,本文所述的方法提供组合物具有以干重计大于约 90% reb M2 含量。在另一特定实施方式中,当目标甜叶菊醇糖苷是 reb M2 时,本文所述的方法提供组合物包含以干重计大于约 95% reb M2 含量。

[0149] 在仍另一实施方式中,当目标甜叶菊醇糖苷是 reb D 时,本文所述的方法提供组合物以干重计大于约 90% reb D 含量。在另一特定实施方式中,当目标甜叶菊醇糖苷是 reb D 时,本文所述的方法提供组合物包含以干重计大于约 99% reb D 含量。

[0150] 在再一实施方式中,当目标甜叶菊醇糖苷是 reb D2 时,本文所述的方法提供组合物以干重计大于约 90% reb D2 含量。在另一特定实施方式中,当目标甜叶菊醇糖苷是 reb D2 时,本文所述的方法提供组合物包含以干重计大于约 95% reb D2 含量。

[0151] 在进一步实施方式中,当目标甜叶菊醇糖苷是 reb A 时,本文所述的方法提供组合物包含以干重计大于约 90% reb A 含量。在另一特定实施方式中,当目标甜叶菊醇糖苷是 reb A 时,本文所述的方法提供组合物包含以干重计大于约 95% reb A 含量。

[0152] 在仍进一步实施方式中,当目标甜叶菊醇糖苷是 reb E 时,本文所述的方法提供组合物包含以干重计大于约 90% reb E 含量。在另一特定实施方式中,当目标甜叶菊醇糖苷是 reb E 时,本文所述的方法提供组合物包含以干重计大于约 95% reb E 含量。

[0153] 在仍进一步实施方式中,当目标甜叶菊醇糖苷是 reb I 时,本文所述的方法提供组合物包含以干重计大于约 90% reb I 含量。在另一特定实施方式中,当目标甜叶菊醇糖苷

是 reb I 时, 本文所述的方法提供组合物包含以干重计大于约 95% reb I 含量。

[0154] 在仍进一步实施方式中, 当目标甜叶菊醇糖苷是甜叶菊苷时, 本文所述的方法提供组合物包含以干重计大于约 90% 甜叶菊苷含量。在另一特定实施方式中, 当目标甜叶菊醇糖苷是甜叶菊苷时, 本文所述的方法提供组合物包含以干重计大于约 95% 甜叶菊苷含量。

[0155] 【微生物和生物催化剂】

[0156] 在本发明的一实施方式中, 将微生物或生物催化剂与起始组合物接触而产生目标甜叶菊醇糖苷。微生物可为任何具有对于转变起始组合物为目标甜叶菊醇糖苷必需的酶的微生物。这些酶在微生物的基因组内编码。

[0157] 在一实施方式中微生物可为, 例如, 大肠埃希氏菌 (*E. coli*), 糖酵母属 (*Saccharomyces sp.*), 曲霉属 (*Aspergillus sp.*), 毕赤酵母属 (*Pichia sp.*), 芽孢杆菌属 (*Bacillus sp.*), 耶氏酵母属 (*Yarrowia sp.*) 等。

[0158] 酶可位于微生物的表面和 / 或在细胞内和 / 或可由微生物分泌出到培养基中。

[0159] 生物催化剂包含至少一种酶和可为全细胞悬浮液, 粗裂解物或纯化的酶。

[0160] 对于转变起始组合物为目标甜叶菊醇糖苷必需的酶包括甜叶菊醇生物合成酶和 UDP- 糖基转移酶 (UGT)。任选地其可包括 UDP 再循环酶。UDP 再循环酶可为蔗糖合酶和再循环底物可为蔗糖。

[0161] 在一实施方式中, 甜叶菊醇生物合成酶包括甲羟戊酸 (MVA) 通路酶。

[0162] 在另一实施方式中, 甜叶菊醇生物合成酶包括非 - 甲羟戊酸 2-C- 甲基 -D- 赤藓糖醇 -4- 磷酸通路 (MEP/DOXP) 酶。

[0163] 在一实施方式中, 甜叶菊醇生物合成酶选自: 牻牛儿基牻牛儿基二磷酸合酶, 柯巴基二磷酸合酶, 贝壳杉烯合酶, 贝壳杉烯氧化酶, 贝壳杉烯酸 13- 羟化酶 (KAH), 甜叶菊醇合成酶, 脱氧木酮糖 5- 磷酸合酶 (DXS), D-1- 脱氧木酮糖 5- 磷酸还原异构酶 (DXR), 4- 二磷酸胞苷基 -2-C- 甲基 -D- 赤藓糖醇合酶 (CMS), 4- 二磷酸胞苷基 -2-C- 甲基 -D- 赤藓糖醇激酶 (CMK), 4- 二磷酸胞苷基 -2-C- 甲基 -D- 赤藓糖醇 2, 4- 环二磷酸合酶 (MCS), 1- 羟基 -2- 甲基 -2(E)- 丁烯基 4- 二磷酸合酶 (HDS), 1- 羟基 -2- 甲基 -2(E)- 丁烯基 4- 二磷酸还原酶 (HDR), 乙酰乙酰 -CoA 硫解酶, 截短的 HMG-CoA 还原酶, 甲羟戊酸激酶, 磷酸甲羟戊酸激酶, 甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶, 细胞色素 P450 还原酶等。

[0164] UDP- 葡萄糖基转移酶可为能向甜叶菊醇及或甜叶菊醇糖苷底物添加至少一个葡萄糖单元而提供目标甜叶菊醇糖苷的任何 UDP- 葡萄糖基转移酶。

[0165] 在一实施方式中, 微生物是游离的。在另一实施方式中, 微生物固定。例如, 微生物可固定到由无机或有机材料制造的固体支持物。适合于固定微生物的固体支持物的非限制性例包括衍生的纤维素或玻璃, 陶瓷, 金属氧化物或膜。微生物可, 例如, 由共价连接, 吸附, 交联, 获集或包裹固定到固体支持物。

[0166] 在一实施方式中, 微生物在包含水和各种选自下列的组分的水性介质中: 碳源, 能源, 氮源, 微量元素, 维生素, 核苷, 磷酸核苷, 二磷酸核苷, 三磷酸核苷, 有机和无机盐, 有机和无机酸, 碱等。碳源包括甘油, 葡萄糖, 二氧化碳, 碳酸盐, 碳酸氢盐。氮源可包括硝酸盐, 亚硝酸盐, 氨基酸, 肽, 脌或蛋白。

[0167] 在特定实施方式中, 培养基包含缓冲剂。适合的缓冲剂包括, 但不限于, PIPES 缓

冲剂,乙酸缓冲液和磷酸缓冲液。在特定实施方式中,培养基包含磷酸缓冲液。

[0168] 在一实施方式中,培养基也可包括有机溶剂。

[0169] 在一实施方式中,UDP-葡萄糖基转移酶是能向悬钩子苷添加至少一个葡萄糖单元,由此产生甜叶菊苷的任何UDP-葡萄糖基转移酶。UDP-葡萄糖基转移酶可为,例如,UGT91D2。

[0170] 在另一实施方式中,UDP-葡萄糖基转移酶是能向悬钩子苷添加至少一个葡萄糖单元,由此产生莱菔迪苷E的任何UDP-葡萄糖基转移酶。UDP-葡萄糖基转移酶可为,例如,UGTSL2。

[0171] 在再一实施方式中,UDP-葡萄糖基转移酶是能向莱菔迪苷E添加至少一个葡萄糖单元,由此产生莱菔迪苷D的任何UDP-葡萄糖基转移酶。UDP-葡萄糖基转移酶可为,例如,UGT76G1。

[0172] 在仍实施方式中,UDP-葡萄糖基转移酶是能向甜叶菊苷添加至少一个葡萄糖单元,由此产生莱菔迪苷A的任何UDP-葡萄糖基转移酶。UDP-葡萄糖基转移酶可为,例如,UGT76G1。

[0173] 在进一步实施方式中,UDP-葡萄糖基转移酶是能向莱菔迪苷A添加至少一个葡萄糖单元,由此产生莱菔迪苷D和/或莱菔迪苷D2和/或莱菔迪苷M2的任何UDP-葡萄糖基转移酶。UDP-葡萄糖基转移酶可为,例如,UGT91D2或UGTSL2。

[0174] 在另一实施方式中,能向莱菔迪苷A添加至少一个葡萄糖单元的UDP-葡萄糖基转移酶选自以下GenInfo标识符号的列表,优选自表1显示的组,及更优选自表2显示的组。

[0175]

397567	30680413	115480946	147798902	218193594	225443294
454245	32816174	116310259	147811764	218193942	225444853
1359905	32816178	116310985	147827151	219885307	225449296
1685003	34393978	116788066	147836230	222615927	225449700
1685005	37993665	116788606	147839909	222619587	225454338
2191136	37993671	116789315	147846163	222623142	225454340
2501497	37993675	119394507	147855977	222625633	225454342
2911049	39104603	119640480	148905778	222625635	225454473
4218003	41469414	122209731	148905999	222636620	225454475
4314356	41469452	125526997	148906835	222636621	225458362
13492674	42566366	125534279	148907340	222636628	225461551
13492676	42570280	125534461	148908935	222636629	225461556
15217773	42572855	125540090	148909182	224053242	225461558
15217796	44890129	125541516	148909920	224053386	225469538
15223396	46806235	125545408	148910082	224055535	225469540
15223589	50284482	125547340	148910154	224056138	226316457
15227766	51090402	125547520	148910612	224056160	226492603
15230017	51090594	125554547	148910769	224067918	226494221
15231757	52839682	125557592	156138791	224072747	226495389
15234056	56550539	125557593	156138797	224080189	226495945
15234195	62734263	125557608	156138799	224091845	226502400
15234196	62857204	125559566	156138803	224094703	226507980
15238503	62857206	125563266	165972256	224100653	226531147
15239523	62857210	125571055	168016721	224100657	226532094
15239525	62857212	125579728	171674071	224101569	238477377
15239543	75265643	125588307	171906258	224103105	240254512

[0176]

15239937	75285934	125589492	183013901	224103633	242032615
15240305	75288884	125599469	183013903	224103637	242032621
15240534	77550661	125601477	186478321	224109218	242038423
15982889	77556148	126635837	187373030	224114583	242043290
18086351	82791223	126635845	187373042	224116284	242044836
18418378	83778990	126635847	190692175	224120552	242051252
18418380	89953335	126635863	194701936	224121288	242056217
18418382	110741436	126635867	195620060	224121296	242056219
19743740	110743955	126635883	209954691	224121300	242056663
19911201	115438196	126635887	209954719	224130358	242059339
20149064	115438785	133874210	209954725	224140703	242059341
20260654	115441237	133874212	209954733	224143404	242060922
21435782	115454819	145358033	210063105	224143406	242067411
21553613	115456047	147772508	210063107	224144306	242067413
21593514	115457492	147776893	212275846	224285244	242076258
22759895	115459312	147776894	216296854	225431707	242076396
23955910	115464719	147776895	217074506	225435532	242084750
26452040	115471069	147786916	218185693	225436321	242091005
28393204	115471071	147798900	218187075	225440041	242095206
30679796	115474009	147798901	218189427	225441116	242345159
242345161	297724601	326492035	356523945	357140904	359486938
255536859	297725463	326493430	356523957	357165849	359487055
255538228	297728331	326500410	356523959	357165852	359488135
255541676	297738632	326506816	356523961	357168415	359488708
255547075	297745347	326507826	356523963	357437837	359493630
255552620	297745348	326508394	356524387	357442755	359493632
255552622	297795735	326509445	356524403	357442757	359493634
255555343	297796253	326511261	356527181	357445729	359493636
255555361	297796257	326511866	356533209	357445731	359493815
255555363	297796261	326512412	356533852	357445733	359495856
255555365	297797587	326517673	356534718	357446799	359495858
255555369	297798502	326518800	356535480	357446805	359495869
255555373	297799226	326521124	356542996	357452779	359495871
255555377	297805988	326525567	356543136	357452781	359497638
255556812	297807499	326525957	356543932	357452783	359807261
255556818	297809125	326526607	356549841	357452787	374256637
255563008	297809127	326527141	356549843	357452789	377655465
255564074	297811403	326530093	356554358	357452791	378405177
255564531	297820040	326534036	356554360	357452797	378829085
255572878	297821483	326534312	356558606	357452799	387135070
255577901	297825217	332071132	356560333	357470367	387135072

[0177]

255583249	297832276	339715876	356560599	357472193	387135078
255583253	297832280	342306012	356560749	357472195	387135092
255583255	297832518	342306016	356566018	357474295	387135094
255585664	297832520	343457675	356566169	357474493	387135098
255585666	297840825	343457677	356566173	357474497	387135100
255634688	297840827	350534960	356567761	357474499	387135134
255644801	297847402	356498085	356574704	357490035	387135136
255645821	297849372	356499771	356576401	357493567	387135174
255647456	300078590	356499777	356577660	357497139	387135176
255648275	300669727	356499779	357114993	357497581	387135184
260279126	302142947	356501328	357115447	357497671	387135186
260279128	302142948	356502523	357115451	357500579	387135188
261343326	302142950	356503180	357115453	357504663	387135190
283132367	302142951	356503184	357116080	357504691	387135192
283362112	302765302	356503295	357116928	357504699	387135194
289188052	302796334	356504436	357117461	357504707	387135282
295841350	302811470	356504523	357117463	357505859	387135284
296088529	302821107	356504765	357117829	357510851	387135294
296090415	302821679	356511113	357117839	357516975	387135298
296090524	319759260	356515120	357125059	359477003	387135300
296090526	319759266	356517088	357126015	359477998	387135302
297599503	320148814	356520732	357134488	359478043	387135304
297601531	326489963	356522586	357135657	359478286	387135312
297611791	326490273	356522588	357138503	359484299	387135314
297722841	326491131	356522590	357139683	359486936	387135316
387135318	449440433	460376293	460413408	462423864	475546199
387135320	449445896	460378310	460416351	470101924	475556485
387135322	449446454	460380744	462394387	470102280	475559699
387135324	449447657	460381726	462394433	470102858	475578293
387135326	449449002	460382093	462394557	470104211	475591753
387135328	449449004	460382095	462395646	470104264	475593742
388493506	449449006	460382754	462395678	470104266	475612072
388495496	449451379	460384935	462396388	470106317	475622476
388498446	449451589	460384937	462396389	470106357	475622507
388499220	449451591	460385076	462396419	470115448	475623787
388502176	449451593	460385872	462396542	470130404	482550481
388517521	449453712	460386018	462397507	470131550	482550499
388519407	449453714	460389217	462399998	470136482	482550740
388521413	449453716	460394872	462400798	470136484	482550999
388827901	449453732	460396139	462401217	470136488	482552352
388827903	449457075	460397862	462402118	470136492	482554970

[0178]

388827907	449467555	460397864	462402237	470137933	482555336
388827909	449468742	460398541	462402284	470137937	482555478
388827913	449495638	460403139	462402416	470140422	482556454
393887637	449495736	460403141	462404228	470140426	482557289
393887646	449499880	460403143	462406358	470140908	482558462
393887649	449502786	460403145	462408262	470141232	482558508
393990627	449503471	460405998	462409325	470142008	482558547
397746860	449503473	460407578	462409359	470142010	482561055
397789318	449515857	460407590	462409777	470142012	482561555
413924864	449518643	460409128	462411467	470143607	482562795
414590349	449519559	460409134	462414311	470143939	482562850
414590661	449522783	460409136	462414416	470145404	482565074
414591157	449524530	460409459	462414476	473923244	482566269
414879558	449524591	460409461	462415526	474114354	482566296
414879559	449528823	460409463	462415603	474143634	482566307
414879560	449528825	460409465	462415731	474202268	482568689
414888074	449534021	460409467	462416307	474299266	482570049
431812559	460365546	460410124	462416920	474363119	482570572
449432064	460366882	460410126	462416922	474366157	482575121
449432066	460369823	460410128	462416923	474429346	
449433069	460369829	460410130	462416924	475432777	
449436944	460369831	460410132	462417401	475473002	
449438665	460369833	460410134	462419769	475489790	
449438667	460370755	460410213	462420317	475511330	
449440431	460374714	460411200	462423366	475516200	

[0179] 表 1

[0180]

GI 号	登录	来源
190692175	ACE87855.1	甜叶菊 ( <i>Stevia rebaudiana</i> )
41469452	AAS07253.1	水稻 ( <i>Oryza sativa</i> )
62857204	BAD95881.1	牵牛 ( <i>Ipomoea nil</i> )
62857206	BAD95882.1	圆叶牵牛 ( <i>Ipomoea purpurea</i> )
56550539	BAD77944.1	雏菊 ( <i>Bellis perennis</i> )
115454819	NP_001051010.1	粳稻 ( <i>Oryza sativa Japonica</i> ) 组
115459312	NP_001053256.1	粳稻 ( <i>Oryza sativa Japonica</i> ) 组
115471069	NP_001059133.1	粳稻 ( <i>Oryza sativa Japonica</i> ) 组
115471071	NP_001059134.1	粳稻 ( <i>Oryza sativa Japonica</i> ) 组
116310985	CAH67920.1	籼稻 ( <i>Oryza sativa Indica</i> ) 组
116788066	ABK24743.1	北美云杉 ( <i>Picea sitchensis</i> )

[0181]

122209731	Q2V6J9.1	草莓 ( <i>Fragaria x ananassa</i> )
125534461	EAY81009.1	籼稻 ( <i>Oryza sativa Indica</i> ) 组
125559566	EAZ05102.1	籼稻 ( <i>Oryza sativa Indica</i> ) 组
125588307	EAZ28971.1	粳稻 ( <i>Oryza sativa Japonica</i> ) 组
148907340	ABR16806.1	北美云杉 ( <i>Picea sitchensis</i> )
148910082	ABR18123.1	北美云杉 ( <i>Picea sitchensis</i> )
148910612	ABR18376.1	北美云杉 ( <i>Picea sitchensis</i> )
15234195	NP_194486.1	拟南芥 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )
15239523	NP_200210.1	拟南芥 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )
15239937	NP_196793.1	拟南芥 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )
1685005	AAB36653.1	烟草 ( <i>Nicotiana tabacum</i> )
183013903	ACC38471.1	蔊菜苜蓿 ( <i>Medicago truncatula</i> )
186478321	NP_172511.3	拟南芥 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )
187373030	ACD03249.1	糙伏毛燕麦 ( <i>Avena strigosa</i> )
194701936	ACF85052.1	玉米 ( <i>Zea mays</i> )
19743740	AAL92461.1	番茄 ( <i>Solanum lycopersicum</i> )
212275846	NP_001131009.1	玉米 ( <i>Zea mays</i> )
222619587	EEE55719.1	粳稻 ( <i>Oryza sativa Japonica</i> ) 组
224055535	XP_002298527.1	毛果杨 ( <i>Populus trichocarpa</i> )
224101569	XP_002334266.1	毛果杨 ( <i>Populus trichocarpa</i> )
224120552	XP_002318358.1	毛果杨 ( <i>Populus trichocarpa</i> )
224121288	XP_002330790.1	毛果杨 ( <i>Populus trichocarpa</i> )
225444853	XP_002281094	葡萄 ( <i>Vitis vinifera</i> )
225454342	XP_002275850.1	葡萄 ( <i>Vitis vinifera</i> )
225454475	XP_002280923.1	葡萄 ( <i>Vitis vinifera</i> )
225461556	XP_002285222	葡萄 ( <i>Vitis vinifera</i> )
225469540	XP_002270294.1	葡萄 ( <i>Vitis vinifera</i> )
226495389	NP_001148083.1	玉米 ( <i>Zea mays</i> )
226502400	NP_001147674.1	玉米 ( <i>Zea mays</i> )
238477377	ACR43489.1	小麦 ( <i>Triticum aestivum</i> )
240254512	NP_565540.4	拟南芥 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )
2501497	Q43716.1	碧冬茄 ( <i>Petunia x hybrida</i> )
255555369	XP_002518721.1	蓖麻 ( <i>Ricinus communis</i> )
26452040	BAC43110.1	拟南芥 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )
296088529	CBI37520.3	葡萄 ( <i>Vitis vinifera</i> )
297611791	NP_001067852.2	粳稻 ( <i>Oryza sativa Japonica</i> ) 组
297795735	XP_002865752.1	琴叶拟南芥琴叶亚种 ( <i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i> )

[0182]

297798502	XP_002867135.1	琴叶拟南芥琴叶亚种 ( <i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i> )
297820040	XP_002877903.1	琴叶拟南芥琴叶亚种 ( <i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i> )
297832276	XP_002884020.1	琴叶拟南芥琴叶亚种 ( <i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i> )
302821107	XP_002992218.1	江南卷柏 ( <i>Selaginella moellendorffii</i> )
30680413	NP_179446.2	拟南芥 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )
319759266	ADV71369.1	葛麻姆 ( <i>Pueraria montana</i> var. <i>lobata</i> )
326507826	BAJ86656.1	大麦大麦亚种 ( <i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>Vulgare</i> )
343457675	AEM37036.1	芜菁油菜亚种 ( <i>Brassica rapa</i> subsp. <i>oleifera</i> )
350534960	NP_001234680.1	番茄 ( <i>Solanum lycopersicum</i> )
356501328	XP_003519477.1	大豆 ( <i>Glycine max</i> )
356522586	XP_003529927.1	大豆 ( <i>Glycine max</i> )
356535480	XP_003536273.1	大豆 ( <i>Glycine max</i> )
357445733	XP_003593144.1	蒺藜苜蓿 ( <i>Medicago truncatula</i> )
357452783	XP_003596668.1	蒺藜苜蓿 ( <i>Medicago truncatula</i> )
357474493	XP_003607531.1	蒺藜苜蓿 ( <i>Medicago truncatula</i> )
357500579	XP_003620578.1	蒺藜苜蓿 ( <i>Medicago truncatula</i> )
357504691	XP_003622634.1	蒺藜苜蓿 ( <i>Medicago truncatula</i> )
359477998	XP_003632051.1	葡萄 ( <i>Vitis vinifera</i> )
359487055	XP_002271587	葡萄 ( <i>Vitis vinifera</i> )
359495869	XP_003635104.1	葡萄 ( <i>Vitis vinifera</i> )
387135134	AFJ52948.1	亚麻 ( <i>Linum usitatissimum</i> )
387135176	AFJ52969.1	亚麻 ( <i>Linum usitatissimum</i> )
387135192	AFJ52977.1	亚麻 ( <i>Linum usitatissimum</i> )
387135282	AFJ53022.1	亚麻 ( <i>Linum usitatissimum</i> )
387135302	AFJ53032.1	亚麻 ( <i>Linum usitatissimum</i> )
387135312	AFJ53037.1	亚麻 ( <i>Linum usitatissimum</i> )
388519407	AFK47765.1	蒺藜苜蓿 ( <i>Medicago truncatula</i> )
393887646	AFN26668.1	欧洲山芥弓形亚种 ( <i>Barbarea vulgaris</i> subsp. <i>arcuata</i> )
414888074	DAA64088.1	玉米 ( <i>Zea mays</i> )
42572855	NP_974524.1	拟南芥 ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )
449440433	XP_004137989.1	黄瓜 ( <i>Cucumis sativus</i> )
449446454	XP_004140986.1	黄瓜 ( <i>Cucumis sativus</i> )

[0183]

449449004	XP_004142255.1	黄瓜 ( <i>Cucumis sativus</i> )
449451593	XP_004143546.1	黄瓜 ( <i>Cucumis sativus</i> )
449515857	XP_004164964.1	黄瓜 ( <i>Cucumis sativus</i> )
460382095	XP_004236775.1	番茄 ( <i>Solanum lycopersicum</i> )
460409128	XP_004249992.1	番茄 ( <i>Solanum lycopersicum</i> )
460409461	XP_004250157.1	番茄 ( <i>Solanum lycopersicum</i> )
460409465	XP_004250159.1	番茄 ( <i>Solanum lycopersicum</i> )
462396388	EMJ02187.1	桃 ( <i>Prunus persica</i> )
462402118	EMJ07675.1	桃 ( <i>Prunus persica</i> )
462409359	EMJ14693.1	桃 ( <i>Prunus persica</i> )
462416923	EMJ21660.1	桃 ( <i>Prunus persica</i> )
46806235	BAD17459.1	梗稻 ( <i>Oryza sativa Japonica</i> ) 组
470104266	XP_004288529.1	野草莓野亚种 ( <i>Fragaria vesca subsp. vesca</i> )
470142008	XP_004306714.1	野草莓野亚种 ( <i>Fragaria vesca subsp. vesca</i> )
475432777	EMT01232.1	节节麦 ( <i>Aegilops tauschii</i> )
51090402	BAD35324.1	梗稻 ( <i>Oryza sativa Japonica</i> ) 组

[0184] 表 2

[0185]

GI 号	登录	来源	内部参照
460409128	XP.004249992.1	番茄 ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	UGTSL
460386018	XP.004238697.1	番茄 ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	-
460409134	XP.004249995.1	番茄 ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	-
460410132	XP.004250485.1	番茄 ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	UGTSL2
460410130	XP.004250484.1	番茄 ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	-
460410128	XP.004250483.1	番茄 ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	-
460378310	XP.004234916.1	番茄 ( <i>Solanum lycopersicum</i> )	-
209954733	BAG80557.1	宁夏枸杞 ( <i>Lycium barbarum</i> )	UGTLB
209954725	BAG80553.1	宁夏枸杞 ( <i>Lycium barbarum</i> )	-

[0186] 在仍另一实施方式中,UDP-葡萄糖基转移酶是能向莱菔迪昔 D 添加至少一个葡萄糖单元而形成莱菔迪昔 M 和 / 或莱菔迪昔 M2 的任何 UDP-葡萄糖基转移酶。UDP-葡萄糖基转移酶可为,例如,UGT76G1。

[0187] 任选地,本发明的方法还包括再循环 UDP 而提供 UDP-葡萄糖。在一实施方式中,方

法包括再循环 UDP, 其通过提供再循环催化剂, 即, 能 UDP- 葡萄糖过度产生的生物催化剂, 及再循环底物, 使得使用催化性量的 UDP- 葡萄糖基转移酶和 UDP- 葡萄糖实施底物甜叶菊醇糖苷转变为目标甜叶菊醇糖苷 (图 3)。

[0188] 在一实施方式中, UDP- 葡萄糖再循环催化剂是蔗糖合酶。

[0189] 在一实施方式中, 再循环底物是蔗糖。

[0190] 在一实施方式中, 生物催化剂包含多于一种 UDP- 葡萄糖基转移酶。

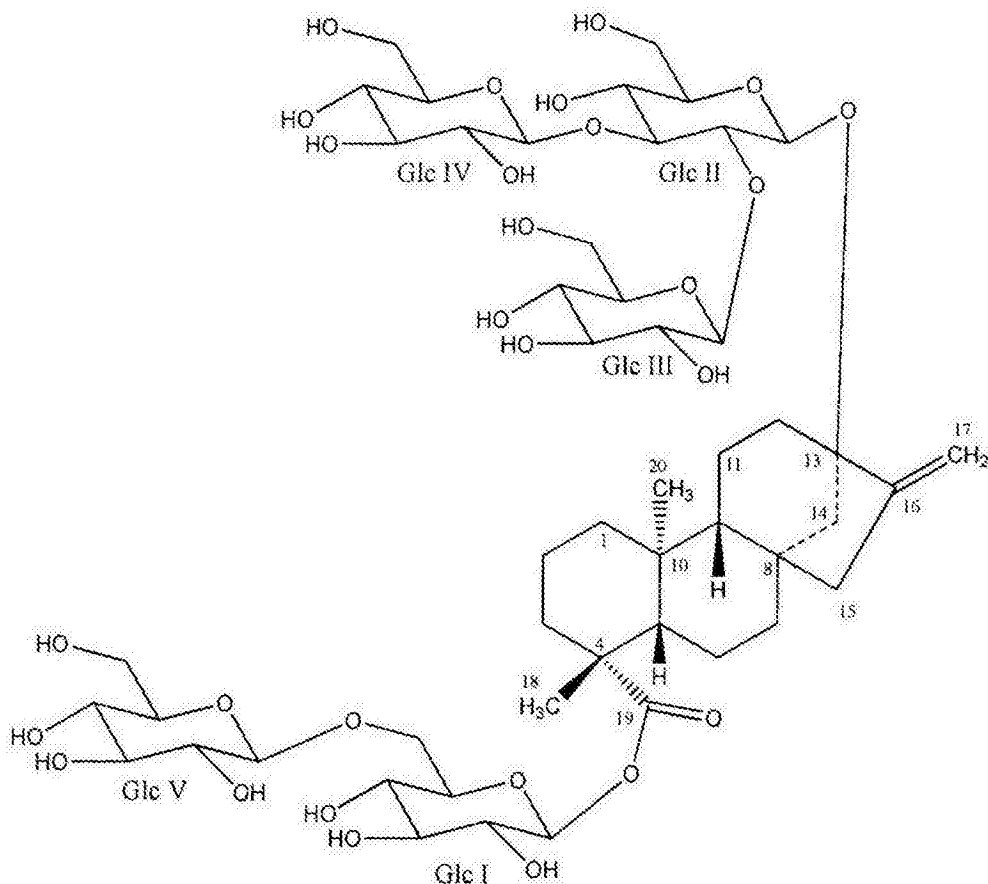
[0191] 在实施方式中, 生物催化剂包含多于一种 UDP- 葡萄糖基转移酶和 UDP- 葡萄糖再循环催化剂。

[0192] 目标甜叶菊醇糖苷任选地自得到的组合物纯化。目标甜叶菊醇糖苷自反应培养基的纯化可由至少一种适合的方法实现而提供高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷组合物。适合的方法包括结晶, 由膜分离, 离心, 提取 (液体或固相), 层析分离, HPLC (制备性或分析) 或此类方法的组合。

[0193] 【化合物和方法】

[0194] 本发明也提供分离的及高度纯化的 reb D2。reb D2 是 reb D 的异构体及, 其具有以下结构:

[0195]



[0196] 13-[(2-O-β-D-吡喃葡萄糖基-3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)氧基]对映-贝壳杉-16-烯-19-酸-[(6-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)酯]

[0197] 在另一实施方式中, 本发明提供具有大于约 95 无水重量%的纯度的 reb D2, 诸

如,例如,大于约 96 重量%,大于约 97 重量%,大于约 98 重量%或大于约 99 重量%。

[0198] 在再一实施方式中,本发明提供在甜叶菊醇糖苷混合物中具有大于约 95 重量%的纯度的 reb D2,诸如,例如,大于约 96 重量%,大于约 97 重量%,大于约 98 重量%或大于约 99 重量%。

[0199] 本发明也提供包含 reb D2 的组合物。

[0200] 在一实施方式中,本发明提供制备 reb D2 的方法,其包括:

[0201] (a) 使包含 reb A 的起始组合物接触能将 reb A 转化为 reb D2 的酶,UDP-葡萄糖和任选地 UDP-葡萄糖再循环酶,而产生包含 reb D2 的组合物;以及

[0202] (b) 分离包含 reb D2 的组合物。

[0203] 在一些实施方式中,能将 reb A 转化为 reb D2 的酶是 UDP-葡萄糖基转移酶,诸如,例如,UGT91D2, UGTSL, UGTSL\_Sc, UGTSL2 (GI No. 460410132 版本 XP\_004250485.1), GI No. 460409128 (UGTSL) 版本 XP\_004249992.1, GI No. 115454819 版本 NP\_001051010.1, GI No. 187373030, 版本 ACD03249.1。GI No. 222619587 版本 EEE55719.1, GI No. 297795735 版本 XP\_002865752.1 或 EUGT11。

[0204] 能将 reb A 转化为 reb D2 的酶可固定或在重组微生物中。

[0205] 在一实施方式中,固定酶。在另一实施方式中,酶在重组微生物中。

[0206] 在一实施方式中,微生物是游离的。在另一实施方式中,固定微生物。例如,微生物可固定到由无机或有机材料制造的固体支持物。适合于固定微生物的固体支持物的非限制性例包括衍生的纤维素或玻璃,陶瓷,金属氧化物或膜。微生物可,例如,由共价连接,吸附,交联,获集或包裹固定到固体支持物。

[0207] 适合的微生物包括,但不限于,大肠埃希氏菌 (*E. coli*),糖酵母属 (*Saccharomyces* sp.),曲霉属 (*Aspergillus* sp.),毕赤酵母属 (*Pichia* sp.),芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.),耶氏酵母属 (*Yarrowia* sp.)。

[0208] 在一实施方式中,微生物在包含水和选自下列的各种组分的水性介质中:碳源,能源,氮源,微量元素,维生素,核苷,磷酸核苷,二磷酸核苷,三磷酸核苷,有机和无机盐,有机和无机酸,碱等。碳源包括甘油,葡萄糖,二氧化碳,碳酸盐,碳酸氢盐。氮源可包括硝酸盐,亚硝酸盐,氨基酸,肽,朊或蛋白。

[0209] 在特定实施方式中,培养基包含缓冲剂。适合的缓冲剂包括,但不限于,PIPES 缓冲剂,乙酸缓冲液和磷酸缓冲液。在特定实施方式中,培养基包含磷酸缓冲液。

[0210] 在一实施方式中,培养基也可包括有机溶剂。

[0211] 在特定实施方式中,酶是能将 reb A 转化为 reb D2 的 UDP-葡萄糖基转移酶。

[0212] 在更特定实施方式中,酶选自 UGT91D2, UGTSL, UGTSL\_Sc, UGTSL2 (GI No. 460410132 版本 XP\_004250485.1), GI No. 460409128 (UGTSL) verison XP\_004249992.1, GI No. 115454819 版本 NP\_001051010.1, GI No. 187373030, 版本 ACD03249.1。GI No. 222619587 版本 EEE55719.1, GI No. 297795735 版本 XP\_002865752.1 或 EUGT11 和 UGT 与这些具有实质性 (>85%) 序列同一性。

[0213] 在再更特定实施方式中,酶是 UGTSL2 或由定向衍化产生的及具有更高活性的其改善的变体。

[0214] 在一实施方式中,目标甜叶菊醇糖苷可在微生物内产生。在另一实施方式中,目标

甜叶菊醇糖苷可分泌出到培养基中。在另一个实施方式中,释放的甜叶菊醇糖苷可自培养基连续移出。在仍另一实施方式中,目标甜叶菊醇糖苷在反应完成之后分离。

[0215] reb D2 自反应培养基的分离可由任何适合的方法实现而提供包含 reb D2 的组合物。适合的方法包括,但不限于,裂解,结晶,由膜分离,离心,提取(液体或固相),层析分离,HPLC(制备性或分析)或此类方法的组合。在特定实施方式中,分离可由裂解和离心达到。

[0216] 在一些实施方式中,分离可导致小于约 95 无水重量%的 reb D2 纯度,及组合物可含有,例如,甜叶菊醇糖苷和 / 或残留的反应产物。包含 reb D2 的组合物可还被纯化而提供高度纯化的 reb D2,即具有大于约 95 无水重量%的纯度的 reb D2。在一些实施方式中,包含 reb D2 的组合物可还被纯化而提供具有大于约 96%,大于约 97%,大于约 98%或大于约 99 无水重量%的纯度的 reb D2。

[0217] 纯化可受本领域技术人员知道的任何手段影响,包括但不限于结晶,由膜分离,离心,提取(液体或固相),层析分离,HPLC(制备性或分析)或此类方法的组合。在特定实施方式中,HPLC 用于纯化 reb D2。在更特定实施方式中,半-制备性 HPLC 用于纯化 reb D2。

[0218] 例如,可使用 2- 步骤半-制备性 HPLC 纯化。第 1 步骤利用使用以下梯度含有 A(水中 25% MeCN) 和 B(水中 30% MeCN) 的移动相的 C18 柱:

[0219]

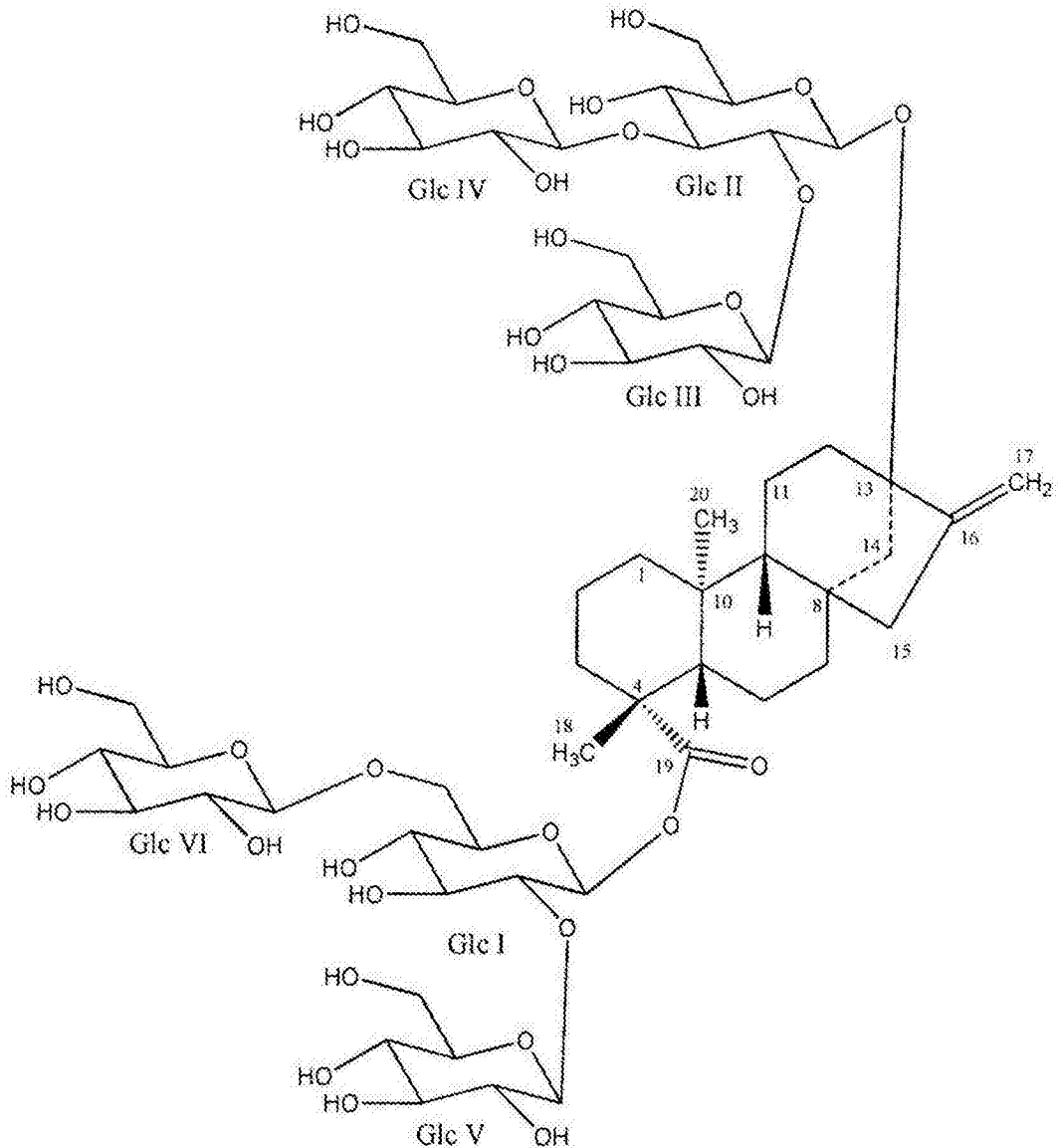
时间 (min)	% A	% B
0.0-5.0	100	0
20	20	80
25	20	80
30	100	0

[0220] 第二步骤利用相同的柱和条件,但仅用等度移动相:水中 20% MeCN。

[0221] 本领域技术人员会认可,特定柱,移动相,注射体积和其他 HPLC 参数可改变。

[0222] 在一实施方式中,本发明提供分离的及高度纯化的 reb M2。reb M2 是 reb M 的异构体,且其具有以下结构:

[0223]



[0224] (13-[2-O-β-D-吡喃葡萄糖基-3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)氧基]对映-贝壳杉-16-烯-19-酸-[(2-O-β-D-吡喃葡萄糖基-6-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)酯]

[0225] 在另一实施方式中,本发明提供具有大于约 95 无水重量%的纯度的 reb M2,诸如,例如,大于约 96 重量%,大于约 97 重量%,大于约 98 重量%或大于约 99 重量%。

[0226] 在再一实施方式中,本发明提供在甜叶菊醇糖苷混合物中具有大于约 95 重量%的纯度的 reb M2,诸如,例如,大于约 96 重量%,大于约 97 重量%,大于约 98 重量%或大于约 99 重量%。

[0227] 在仍另一实施方式中,本发明提供在甜叶菊提取物中具有大于约 95 重量%的纯度的 reb M2,诸如,例如,大于约 96 重量%,大于约 97 重量%,大于约 98 重量%或大于约 99 重量%。

[0228] 本发明也提供包含 reb M2 的组合物。

[0229] 已发现,reb M2 在 reb A 向 reb D 的生物转化期间产生。如上所述,reb A 向 reb D 的生物转化也产生 reb D2。因此,在一实施方式中,本发明提供制备 reb M2 的方法,其包括:

[0230] (a) 使包含 reb A 和 / 或 reb D2 的起始组合物接触能将 reb A 和 / 或 reb D2 转化为 reb M2 的酶, UDP- 葡萄糖和任选地 UDP- 葡萄糖再循环酶而产生包含 reb M2 的组合物; 以及

[0231] (b) 分离包含 reb M2 的组合物。

[0232] 不被理论束缚, 目前相信, 通路始于 reb A 转化为 reb D2, 之后是 reb D2 转化为 reb M2。因此, 在一实施方式中, 本发明提供制备 reb M2 的方法, 其包括:

[0233] (a) 使包含 reb D2 的起始组合物接触能将 reb D2 转化为 reb M2 的酶, UDP- 葡萄糖和任选地 UDP- 葡萄糖再循环酶而产生包含 reb M2 的组合物; 以及

[0234] (b) 分离包含 reb M2 的组合物。

[0235] 在仍另一实施方式中, 制备 reb M2 的方法包括:

[0236] (a) 使包含 reb A 的起始组合物接触能将 reb A 转化为 reb D2 的酶, UDP- 葡萄糖和任选地 UDP- 葡萄糖再循环酶而产生包含 reb D2 的组合物;

[0237] (b) 任选地, 分离包含 reb D2 的组合物;

[0238] (c) 使包含 reb D2 的组合物接触能将 reb D2 转化为 reb M2 的酶, UDP- 葡萄糖和任选地 UDP- 葡萄糖再循环酶而产生包含 reb M2 的组合物; 以及

[0239] (d) 分离包含 reb M2 的组合物。

[0240] 酶可为 UDP- 葡萄糖基转移酶, 诸如, 例如, UGT91D2, UGTSL, UGTSL\_Sc, UGTSL2 (GI No. 460410132 版本 XP\_004250485.1), GI No. 460409128 (UGTSL) 版本 XP\_004249992.1, GI No. 115454819 版本 NP\_001051010.1, GI No. 187373030, 版本 ACD03249.1, GI No. 222619587 版本 EEE55719.1, GI No. 297795735 版本 XP\_002865752.1 或 EUGT11。

[0241] 酶可固定或在重组微生物中。

[0242] 在一实施方式中, 将酶固定。在另一实施方式中, 酶在重组微生物中。

[0243] 在一实施方式中, 微生物是游离的。在另一实施方式中, 将微生物固定。例如, 微生物可固定到由无机或有机材料制造的固体支持物。适合于固定微生物的固体支持物的非限制性例包括衍生的纤维素或玻璃, 陶瓷, 金属氧化物或膜。微生物可, 例如, 由共价连接, 吸附, 交联, 获集或包裹固定到固体支持物。

[0244] 适合的微生物包括, 但不限于, 大肠埃希氏菌 (*E. coli*), 糖酵母属 (*Saccharomyces* sp.), 曲霉属 (*Aspergillus* sp.), 毕赤酵母属 (*Pichia* sp.), 芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.), 耶氏酵母属 (*Yarrowia* sp.)。

[0245] 在一实施方式中, 微生物在包含水和选自下列的各种组分的水性介质中: 碳源, 能源, 氮源, 微量元素, 维生素, 核苷, 磷酸核苷, 二磷酸核苷, 三磷酸核苷, 有机和无机盐, 有机和无机酸, 碱等。碳源包括甘油, 葡萄糖, 二氧化碳, 碳酸盐, 碳酸氢盐。氮源可包括硝酸盐, 亚硝酸盐, 氨基酸, 肽, 胨或蛋白。

[0246] 在特定实施方式中, 培养基包含缓冲剂。适合的缓冲剂包括, 但不限于, PIPES 缓冲剂, 乙酸缓冲液和磷酸缓冲液。在特定实施方式中, 培养基包含磷酸缓冲液。

[0247] 在一实施方式中, 培养基也可包括有机溶剂。

[0248] 在特定实施方式中, 酶是能将 reb A 和 / 或 reb D2 转化为 reb M2 及含于大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 中的 UDP- 葡萄糖基转移酶。

[0249] 在更特定实施方式中, 酶选自 UGT91D2, UGTSL, UGTSL\_Sc, UGTSL2 (GI

No. 460410132 版本 XP\_004250485.1), GI No. 460409128 (UGTSL) version XP\_004249992.1, GI No. 115454819 版本 NP\_001051010.1, GI No. 187373030, 版本 ACD03249.1。GI No. 222619587 版本 EEE55719.1, GI No. 297795735 版本 XP\_002865752.1 或 EUGT11。

[0250] 在再更特定实施方式中,酶是 UGTSL2 或由定向衍化产生的及具有更高活性的其改善的变体。

[0251] 在一实施方式中,目标甜叶菊醇糖苷 reb M2 可在微生物内产生。在另一实施方式中,目标甜叶菊醇糖苷可分泌出到培养基中。在另一个实施方式中,释放的甜叶菊醇糖苷可自培养基连续移出。在仍另一实施方式中,目标甜叶菊醇糖苷在反应完成之后分离。

[0252] 自反应培养基的 reb M2 的分离可由任何适合的方法实现而提供包含 reb M2 的组合物。适合的方法包括,但不限于,裂解,结晶,由膜分离,离心,提取(液体或固相),层析分离,HPLC(制备性或分析)或此类方法的组合。在特定实施方式中,分离可由裂解和离心达到。

[0253] 在一些实施方式中,分离可导致 reb M2 纯度小于约 95 无水重量%,及组合物可含有,例如,甜叶菊醇糖苷和/或残留的反应产物。

[0254] 包含 reb M2 的组合物可还被纯化而提供高度纯化的 reb M2,即具有大于约 95 无水重量%的纯度的 reb M2。在一些实施方式中,包含 reb M2 的组合物可还被纯化而提供具有大于约 96%,大于约 97%,大于约 98%或大于约 99 无水重量%的纯度的 reb M2。

[0255] 纯化可受任何本领域技术人员知道的手段影响,包括但不限于结晶,由膜分离,离心,提取(液体或固相),层析分离,HPLC(制备性或分析)或此类方法的组合。在特定实施方式中,HPLC 用于纯化 reb M2。在更特定实施方式中,半-制备性 HPLC 用于纯化 reb M2。

[0256] 例如,可使用 2-步骤半-制备性 HPLC 纯化。第 1 步骤利用使用以下列梯度:含有 A(水中 25% MeCN) 和 B(水中 30% MeCN) 的移动相的 C18 柱。

[0257]

时间 (min)	% A	% B
0.0-5.0	100	0
20	20	80
25	20	80
30	100	0

[0258] 第二步骤利用相同的柱和条件,但仅有等度移动相:水中 20% MeCN。

[0259] 本领域技术人员会认可,可改变特定柱,移动相,注射体积和其他 HPLC 参数。

[0260] 根据本发明制备的纯化的甜叶菊醇糖苷可用于各种消费性产品,包括但不限于食品,饮料,药物组合物,烟草产品,营养物组合物,口腔卫生学组合物,及化妆品组合物。

[0261] 在本发明中获得的高纯度 reb M,具有 1291.29 的分子量,  $C_{56}H_{90}O_{33}$  的分子式, CAS 登录号 1220616-44-3,及结构显示于图 1,处于白色和无气味粉的形式。当与 10% 蔗糖溶液比较时,化合物是糖的甜度的约 200 倍。红外线吸收谱显示于图 4。

[0262] 纯 reb M 化合物的其他性质包括 249 ~ 250 °C 的熔点,及在 50% 乙醇中  $[\alpha]$

$[\alpha]_D^{25} -19.0^\circ$  的比旋光 ( $C = 1.0$ )。reb M 在水中的溶解度是约 0.3%，及随温度增加而增加。

[0263] reb M 在甲醇,乙醇, n-丙醇和异丙醇的稀释的溶液中是可溶性的。但是,其在丙酮,苯,氯仿和醚中不溶。

[0264] 根据本发明获得的 reb M 是热和 pH-稳定的。

[0265] 根据本发明获得的高度纯化的目标糖苷,特别是,reb D,reb D2,reb M 和 / 或 reb M2 可“如”甜味剂,香料,食品成分一样被使用,或与至少一种甜味剂,香料,食品成分和 / 或其组合组合使用。

[0266] 香料的非限制性例包括石灰,柠檬,橙,果实,香蕉,葡萄,梨,菠萝,芒果,浆果,苦杏仁,可乐,肉桂,糖,棉花糖和香兰香料和 / 或其组合。

[0267] 其他食品成分的非限制性例包括选自下列的至少一种:香料,酸化剂,有机和氨基酸,着色剂,填充剂,修饰的淀粉,胶,组织形成剂,防腐剂,抗氧化剂,乳化剂,稳定剂,增稠剂及胶凝剂和 / 或其组合。

[0268] 根据本发明获得的高度纯化的目标糖苷,特别是,reb D,reb D2,reb M 和 / 或 reb M2 可以各种多态形式制备,包括但不限于水合物,溶剂化物,无水,无定形形式和 / 或其组合。

[0269] 根据本发明获得的高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷,特别是,reb D, reb D2, reb M 和 / 或 reb M2 可作为高强度天然的甜味剂掺入食料,饮料,药物组合物,化妆品,口香糖,表顶部产物,谷物,乳产品,牙膏和其他口腔腔组合物等。

[0270] 高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷,特别是,reb D, reb D2, reb M 和 / 或 reb M2 可作为单独的甜味剂用作甜味化合物,或其可与至少一种天然存在的高强度甜味剂一起使用,诸如甜叶菊苷,reb A, reb B, reb C, reb D, reb E, reb F,甜叶菊双糖苷,卫矛醇苷 A,悬钩子苷,罗汉果苷, Oubli 果甜蛋白 (brazzein),新橙皮苷二氢查耳酮,甘草酸和其盐,祝马丁,紫苏糖,PERNANDULCIN,木库罗苷,白元参苷,糙苏苷 -I,二甲基 - 六氢苈 - 二羧酸,阿布鲁索苷,巴西甘草甜素,肉质雪胆皂苷,甜茶树苷,皮提罗苷,聚婆朵苷 A,巴西红木素,甜过江藤甜蛋白,叶甜素,菝葜苷,根皮苷,三叶苷,二氢黄酮醇,二氢槲皮素 -3- 乙酸,新落新妇苷,反式 - 桂醛,莫纳汀和其盐,SELLIGUEAIN A,苏木素,应乐果甜蛋白,水龙骨甜素,皮提罗苷 A,皮提罗苷 B,马槟榔甜蛋白,潘塔亭,蜜拉圣果素,仙茅甜蛋白,NEOCULIN,绿原酸,西那林,罗汉果甜味剂,罗汉果苷 V,赛门苷和 / 或其组合。

[0271] 在特定实施方式中,reb D2 和 / 或 reb M2 可在甜味剂组合物中一起使用,其包含选自下列的化合物:reb A, reb B, reb D, NSF-02,罗汉果苷 V,赤藓糖醇和 / 或其组合。

[0272] 高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷,特别是,reb D,reb D2,reb M 和 / 或 reb M2 也可与合成高强度甜味剂组合使用,诸如三氯半乳糖,乙酰舒泛钾,阿司帕坦,阿力甜,糖精,新橙皮苷二氢查耳酮,环己氨基磺酸,新特姆,甘素,SUOSAN ADVANTAME,它们的盐等。

[0273] 而且,高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷,特别是,reb D,reb D2,reb M 和 / 或 reb M2 可与天然的甜味剂抑制物组合使用,诸如匙羹藤酸,勿甜素,枣甜素,LACTISOLE 等。reb D, reb D2, reb M 和 / 或 reb M2 也可与各种鲜味增强物组合。reb D, reb D2, reb M 和 / 或 reb M2 可与鲜味品尝及甜氨基酸混合,诸如谷氨酸,天冬氨酸,甘氨酸,丙氨酸,苏氨酸,脯氨酸,丝氨酸,谷氨酸,赖氨酸和色氨酸。

[0274] 高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷,特别是,reb D, reb D2, reb M 可与一种或更多选

自下列的添加剂组合使用：碳水化合物，多元醇，氨基酸和它们的对应盐，聚-氨基酸和它们的对应盐，糖酸和它们的对应盐，核苷酸，有机酸，无机酸，包括有机酸盐和有机碱盐的有机盐，无机盐，苦化合物，风味剂及调味成分，收敛化合物，蛋白或蛋白水解产物，表面活性剂，乳化剂，类黄酮，醇，聚合物和其组合。

[0275] 高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷，特别是，reb D, reb D2, reb M 和 / 或 reb M2 可与多元醇或糖醇组合。术语“多元醇”指称含有多于一个羟基的分子。多元醇可为二元醇，三元醇，或四元醇，其分别含有 2, 3 和 4 个羟基。多元醇也可含有多于 4 个羟基，诸如五元醇，六元醇，七元醇，等，其分别含有 5, 6 或 7 个羟基。此外，多元醇也可为糖醇，多羟基醇或是还原型的碳水化合物，其中所述羰基（醛或酮，还原糖）被还原为伯或仲羟基的多元醇。多元醇的例包括，但不限于，赤藓糖醇，麦芽糖醇，甘露糖醇，山梨糖醇，乳糖醇，木糖醇，肌醇，ISOMALT，丙二醇，甘油，苏糖醇，半乳糖醇，氢化的异麦芽酮糖，还原的异麦芽糖-寡糖，还原的木-寡糖，还原的龙胆-寡糖，还原的麦芽糖糖浆，还原的葡萄糖糖浆，氢化的淀粉水解产物，聚多羟糖醇和糖醇或任何其他不不利地影响甜味剂组合物的味道的能被还原的碳水化合物。

[0276] 高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷，特别是，reb D, reb D2, reb M 和 / 或 reb M2 可与卡路里减少的甜味剂组合，诸如 D-塔格糖，阿洛酮糖，阿洛糖，L-糖，L-山梨糖，L-阿拉伯糖等。

[0277] 高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷，特别是，reb D, reb D2, reb M 和 / 或 reb M2 也可与各种碳水化合物组合。术语“碳水化合物”通常指称通式  $(\text{CH}_2\text{O})_n$  的经多羟基取代的醛或酮化合物，其中 n 是 3 ~ 30，以及它们的寡聚体和聚合物。本发明的碳水化合物可，此外，在一个或更多位置被取代或脱氧。碳水化合物，如本文所用，包括未修饰的碳水化合物，碳水化合物衍生物，取代的碳水化合物及修饰的碳水化合物。如本文所用，短语“碳水化合物衍生物”，“取代的碳水化合物”和“修饰的碳水化合物”是同义的。修饰的碳水化合物是指其中至少一个原子已被添加，去除的或取代的，或其组合的任何碳水化合物。由此，碳水化合物衍生物或取代的碳水化合物包括取代的及未经取代的单糖，二糖，寡糖和多糖。碳水化合物衍生物或取代的碳水化合物任选地可在任何对应 C-位置脱氧，和 / 或被一个或更多下列部分取代，诸如氢，卤素，卤代烷基，羧基，酰基，酰氧基，氨基，酰胺基，羧基衍生物，烷氨基，二烷基氨基，芳氨基，烷氧基，芳氧基，硝基，氰基，磺基，巯基，亚氨基，磺酰基，次磺酰基，亚硫酸基，氨磺酰基，碳烷氧基，羧酰胺基，膦酰基，亚膦酰基，磷酰基，膦基，硫酸酯，硫酸醚，胍基，胍基，氨基甲酰基，磷酸，磷酸根合或任何其他有活力的官能团，只要碳水化合物衍生物或取代的碳水化合物发挥改善甜味剂组合物的甜味的功能。

[0278] 可根据本发明使用的碳水化合物的例包括，但不限于，阿洛酮糖，松二糖，阿洛酮糖，阿洛糖，D-塔格糖，海藻糖，半乳糖，鼠李糖，各种环糊精，环状寡糖，各种类型的麦芽糊精，葡聚糖，蔗糖，葡萄糖，核酮糖，果糖，苏糖，阿拉伯糖，木糖，来苏糖，阿洛糖，阿卓糖，甘露糖，艾杜糖，乳糖，麦芽糖，转化糖，异海藻糖，新海藻糖，异麦芽酮糖，赤藓糖，脱氧核糖，古洛糖，艾杜糖，塔罗糖，赤藓酮糖，木酮糖，阿洛酮糖，松二糖，纤维二糖，支链淀粉，葡萄糖胺，甘露糖胺，岩藻糖，葡萄糖醛酸，葡萄糖酸，葡萄糖酸-内酯，阿比可糖，半乳糖胺，甜菜寡糖，异麦芽糖-寡糖（异麦芽糖，异麦芽糖丙糖，潘糖等），木-寡糖（木三糖，木二糖等），木-终结的寡糖，龙胆-寡糖（龙胆二糖，龙胆三糖，龙胆四糖等），山梨糖，黑曲

霉-寡糖,异麦芽酮糖寡糖,果糖寡糖(蔗果三糖,霉菌赤藓醛糖等),麦芽四醇,麦芽三醇,麦芽糖-寡糖(麦芽三糖,麦芽四糖,麦芽五糖,麦芽六糖,麦芽七糖等),淀粉,菊粉,菊粉-寡糖,乳果糖,蜜二糖,棉子糖,核糖,异构化的液体糖诸如高果糖玉米糖浆,偶联糖和大豆寡糖。此外,本文所用的碳水化合物可为D-或L-构型。

[0279] 根据本发明获得的高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷,特别是,reb D, reb D2, reb M和/或reb M2可与各种生理学活性物质或功能成分组合使用。功能成分通常分类为以下类别,诸如类胡萝卜素,膳食纤维,脂肪酸,皂苷,抗氧化剂,营养物,类黄酮,异硫氰酸盐,苯酚,种植甾醇和甾烷醇(植物甾醇和植物甾烷醇);多元醇;益生元,益生菌;植物雌激素;大豆蛋白;硫化物/氢硫基;氨基酸;蛋白;维生素;及矿物质。功能成分也可基于它们的健康益处分类,诸如心血管,胆甾醇-降低和抗-炎性。例示功能成分提供于W02013/096420,其内容在此通过引用合并。

[0280] 根据本发明获得的高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷,特别是,reb D, reb D2, reb M和/或reb M2可作为高强度甜味剂应用而产生具有改善的品尝特征的0卡路里,卡路里减少的或糖尿病性饮料和食品。其也可用于饮料,食料,药物和无法使用糖的其他产品。此外,可将高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷,特别是,reb D,reb D2,reb M和/或reb M2不仅用作人消费专用的饮料,食料和其他产品的甜味剂,而且用于具有改善的特征的动物饲料和饲料。

[0281] 高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷,特别是,reb D,reb D2,reb M和/或reb M2可用作甜味化合物的消费性产品的例包括,但不限于,酒精饮料诸如伏特加酒,葡萄酒,啤酒,液和SAKE等;天然的汁;清爽饮料;碳酸化的软饮料;节食饮料;0卡路里饮料;卡路里减少的饮料和食品;酸乳饮料;速食汁;速溶咖啡;粉末化的类型的速食饮料;罐装产品;糖浆;发酵的豆瓣酱;大豆酱油;醋;调味品;蛋黄酱;蕃茄酱;咖喱;汤;速溶汤;粉末化的大豆酱油;粉末化的醋;饼干类;大米饼干;薄脆饼干;面包;巧克力;焦糖;糖果;口香糖;果冻;布丁;保存的水果和蔬菜;鲜奶油;果酱;桔子酱;花酱;粉末化的乳;冰淇淋;果汁冰糕;瓶中填充的蔬菜和水果;罐装及热沸的豆;在甜味化的沙司中热沸的肉和食品;农业植物食品;海鲜;火腿;香肠;鱼火腿;鱼香肠;鱼酱;深油炸的鱼产品;干燥的海鲜产品;冷冻的食品;保存的海藻;保存的肉;烟草;药品;及许多其他。原则上其可具有无限的应用。

[0282] 在产品诸如食料,饮料,药物,化妆品,表顶部产物,及口香糖生产期间,可使用常规方法诸如混合,揉捏,溶解,酸浸,渗透,渗滤,洒,雾化,输注及其他方法。

[0283] 而且,在本发明中获得的高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷,特别是,reb D, reb D2, reb M和/或reb M2可以干或液体形式使用。在一实施方式中,提供包含reb D2的桌面甜味剂。在另一实施方式中,提供包含reb M2的桌面甜味剂。

[0284] 高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷可在食品热处理之前或之后添加。高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷,特别是,reb D,reb D2,reb M和/或reb M2的量依赖于利用目的。如上所述,其可单独或其他化合物组合添加。

[0285] 本发明也针对在饮料中使用reb D2进行甜度增强。本发明也针对在饮料中使用reb M2进行甜度增强。因此,本发明提供包含甜味剂及reb D2和/或reb M2作为甜度增强物的饮料,其中reb D2和/或reb M2以它们的相应甜度识别阈值或以它们的相应甜度识别阈值以下的浓度存在。

[0286] 如本文所用,术语“甜度增强物”指称能增强或加强在组合物,诸如饮料中甜味的感觉的化合物。术语“甜度增强物”与术语“甜味增强剂”、“甜度增强剂”、“甜度放大剂”和“甜度加强剂”同义。

[0287] 如本文所用的术语“甜度识别阈值浓度”通常是可由人味觉感觉到的甜化合物的最低知道的浓度,一般约 1.0%蔗糖当量 (1.0% SE)。一般而言,甜度增强物当以给定甜度增强物的甜度识别阈值浓度或以给定甜度增强物的甜度识别阈值浓度以下存在时,可增强或增强甜味剂的甜味而不本身提供任何可检测的甜味;但是,甜度增强物可以它们的甜度识别阈值浓度以上的浓度本身提供甜味。甜度识别阈值浓度特异于特定增强物和可基于饮料基质改变。甜度识别阈值浓度可容易由给定增强物的味道测试增加浓度测定,直到在给定饮料基质中检测到大于 1.0%蔗糖当量。提供约 1.0%蔗糖当量的浓度被认为是甜度识别阈值。

[0288] 在一些实施方式中,甜味剂以约 0.5%~约 12 重量%,诸如,例如,约 1.0 重量%,约 1.5 重量%,约 2.0 重量%,约 2.5 重量%,约 3.0 重量%,约 3.5 重量%,约 4.0 重量%,约 4.5 重量%,约 5.0 重量%,约 5.5 重量%,约 6.0 重量%,约 6.5 重量%,约 7.0 重量%,约 7.5 重量%,约 8.0 重量%,约 8.5 重量%,约 9.0 重量%,约 9.5 重量%,约 10.0 重量%,约 10.5 重量%,约 11.0 重量%,约 11.5 重量%或约 12.0 重量%的量存在于饮料中。

[0289] 在特定实施方式中,甜味剂以约 0.5%至约 10%,诸如例如,自约 2%~约 8%,自约 3%~约 7%或自约 4%~约 6 重量%的量存在于饮料中。在特定实施方式中,甜味剂以约 0.5%~约 8 重量%的量存在于饮料中。在另一特定实施方式中,甜味剂以约 2%~约 8 重量%的量存在于饮料中。

[0290] 在一实施方式中,甜味剂是传统热量甜味剂。适合的甜味剂包括,但不限于,蔗糖,果糖,葡萄糖,高果糖玉米糖浆和高果糖淀粉糖浆。

[0291] 在另一实施方式中,甜味剂是赤藓糖醇。

[0292] 在再一实施方式中,甜味剂是罕见糖。适合的罕见糖包括,但不限于,D-阿洛糖,D-阿洛酮糖,L-核糖,D-塔格糖,L-葡萄糖,L-岩藻糖,L-阿拉伯糖,D-松二糖,D-明串珠菌二糖和其组合。

[0293] 涵盖的是,甜味剂可单独或与其他甜味剂组合使用。

[0294] 在一实施方式中,罕见糖是 D-阿洛糖。在更特定实施方式中,D-阿洛糖以约 0.5%~约 10 重量%,诸如,例如,约 2%~约 8%的量存在于饮料中。

[0295] 在另一实施方式中,罕见糖是 D-阿洛酮糖。在更特定实施方式中,D-阿洛酮糖以约 0.5%~约 10 重量%,诸如,例如,约 2%~约 8%的量存在于饮料中。

[0296] 在再一实施方式中,罕见糖是 D-核糖。在更特定实施方式中,D-核糖以约 0.5%~约 10 重量%,诸如,例如,约 2%~约 8%的量存在于饮料中。

[0297] 在仍另一实施方式中,罕见糖是 D-塔格糖。在更特定实施方式中,D-塔格糖以约 0.5%~约 10 重量%,诸如,例如,约 2%~约 8%的量存在于饮料中。

[0298] 在进一步实施方式中,罕见糖是 L-葡萄糖。在更特定实施方式中,L-葡萄糖以约 0.5%~约 10 重量%,诸如,例如,约 2%~约 8%的量存在于饮料中。

[0299] 在一实施方式中,罕见糖是 L-岩藻糖。在更特定实施方式中,L-岩藻糖以约 0.5%~约 10 重量%,诸如,例如,约 2%~约 8%的量存在于饮料中。

[0300] 在另一实施方式中, 罕见糖是 L- 阿拉伯糖。在更特定实施方式中, L- 阿拉伯糖以约 0.5%~约 10 重量%, 诸如, 例如, 约 2%~约 8% 的量存在于饮料中。

[0301] 在仍另一实施方式中, 罕见糖是 D- 松二糖。在更特定实施方式中, D- 松二糖以约 0.5%~约 10 重量%, 诸如, 例如, 约 2%~约 8% 的量存在于饮料中。

[0302] 在仍另一实施方式中, 罕见糖是 D- 明串珠菌二糖。在更特定实施方式中, D- 明串珠菌二糖以约 0.5%~约 10 重量%, 诸如, 例如, 约 2%~约 8% 的量存在于饮料中。

[0303] 相比缺失甜度增强物的对应饮料, 其甜度识别阈值或其甜度识别阈值以下的浓度的甜度增强物的添加增加包含甜味剂和甜度增强物的饮料的检测到的蔗糖当量。而且, 在缺失任何甜味剂的情况下, 甜度可由多于含有相同的浓度的至少一种甜度增强物的溶液的可检测的甜度的量增加。

[0304] 因此, 本发明也提供增强包含甜味剂的饮料的甜度的方法, 包括提供包含甜味剂的饮料及添加选自下列的甜度增强物: reb D2, reb M2 或其组合, 其中 reb D2 及 reb M2 以它们的甜度识别阈值或它们的甜度识别阈值以下的浓度存在。

[0305] 以甜度识别阈值或甜度识别阈值以下的浓度向含有甜味剂的饮料添加 reb D2 和 / 或 reb M2 可增加约 1.0%~约 5.0%, 诸如, 例如, 约 1.0%, 约 1.5%, 约 2.0%, 约 2.5%, 约 3.0%, 约 3.5%, 约 4.0%, 约 4.5% 或约 5.0% 的检测的蔗糖当量。

[0306] 下列实施例例证制备高度纯化的目标甜叶菊醇糖苷, 特别是, reb D, reb D2, reb M 和 / 或 reb M2 的本发明的优选的实施方式。需知本发明不限于实施例中设置的材料, 比例, 条件和过程, 其仅是例证性的。

## 【实施例】

[0307] 【实施例 1 : UGT76G1 的体内产生】

[0308] 将 NcoI 和 NdeI 限制侧加入原核酸序列, 如描述于 Genbank 登录 no. AAR06912. 1。在密码子优化之后, 获得以下核酸序列 (SEQ ID NO: 1) :

[0309] CCATGGCCCATATGGAAAAACAAACCGAAACCACCGTTCGTCGTCGTCGCCGTATTATTCTGTTTCCGG  
TTCCGTTTCAGGGTCATATTAATCCGATTCTGCAGCTGGCAAATGTGCTGTATAGCAAAGGTTTTAGCATTACCATT  
TTTCATACCAATTTTAAACAAACCGAAAAACCGAAATTATCCGCATTTTACCTTTTCGCTTTATTCTGGATAATGATCC  
GCAGGATGAACGCATTAGCAATCTGCCGACACATGGTCCGCTGGCAGGTATGCGTATTCCGATTATTAACGAACATG  
GTGCAGATGAACTGCGTCGTGAACTGGAAGTCTGATGCTGGCAAGCGAAGAAGATGAAGAAGTTAGCTGTCTGATT  
ACCGATGCACTGTGGTATTTTGCACAGAGCGTTGCAGATAGCCTGAATCTGCGTCGTCGTTCTGATGACCAGCAG  
CCTGTTTAACTTTTCATGCACATGTTAGCCTGCCGAGTTTGATGAACTGGGTTATCTGGATCCGGATGATAAAACCC  
GTCTGGAAGAACAGGCAAGCGGTTTTCCGATGCTGAAAGTGAAAGATATCAAAAGCGCCTATAGCAATTGGCAGATT  
CTGAAAGAAATTCTGGGCAAAATGATTAACAGACCAAAGCAAGCAGCGGTGTTATTTGGAATAGCTTTAAAGAACT  
GGAAGAAAGCGAACTGGAAACCGTGATTTCGTGAAATTCGGGCACCGAGCTTTCTGATTCCGCTGCCGAAACATCTGA  
CCGCAAGCAGCAGCAGCCTGCTGGATCATGATCGTACCGTTTTTCAGTGGCTGGATCAGCAGCCTCCGAGCAGCGTT  
CTGTATGTTAGCTTTGGTAGCACCAGCGAAGTTGATGAAAAAGATTTTCTGGAAATTGCCCGTGGTCTGGTTGATAG  
CAAACAGAGCTTTCTGTGGGTTGTTTCGTCGGGTTTTGTTAAAGGTAGCACCTGGGTTGAACCGCTGCCGGATGGTT  
TTCTGGGTGAACGTGGTCGTATTGTTAAATGGGTTCCGCAGCAAGAAGTTCTGGCACACGGCGCAATTGGTGCATTT  
TGGACCCATAGCGGTTGGAATAGCACCTGGAAAGCGTTTTGTGAAGGTGTTCCGATGATTTTTAGCGATTTTGGTCT

GGATCAGCCGCTGAATGCACGTTATATGAGTGATGTTCTGAAAAGTGGGTGTGTATCTGGAAAATGGTTGGGAACGTG  
GTGAAATTGCAAAATGCAATTCGTCGTGTTATGGTGGATGAAGAAGGTGAATATATTCGTCAGAATGCCCGTGTCTG  
AAACAGAAAGCAGATGTTAGCCTGATGAAAGGTGGTAGCAGCTATGAAAGCCTGGAAAGTCTGGTTAGCTATATTAG  
CAGCCTGTAATAACTCGAG

[0310] 在基因合成及使用 NdeI 和 XhoI 克隆位点亚克隆进 pET30A+ 载体之后,通过电穿孔在大肠埃希氏菌 (*E. coli*)BL21 (DE3) 和大肠埃希氏菌 (*E. coli*)EC100 中导入 UGT76G1\_pET30a+ 质粒。获得的细胞在陪替 - 皿中,在卡那霉素的存在生长,选择适合的集落,及允许在液体 LB 培养基中生长 (锥形瓶)。将甘油加入悬浮液作为冷冻保护剂,将 400  $\mu$ L 等份存储于  $-20^{\circ}\text{C}$  和于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。

[0311] 将含有 pET30A+\_UGT76G1 质粒的大肠埃希氏菌 (*E. coli*)BL21 (DE3) 的存储等份解冻,及添加到 30mL 的 LBGKP 培养基 (20g/L Luria 肉汤 Lennox ;50mM PIPES 缓冲剂 pH7.00 ;50mM 磷酸缓冲液 pH7.00 ;2.5g/L 葡萄糖和 50mg/L 的卡那霉素)。使此培养物以 135rpm 于  $30^{\circ}\text{C}$  振摇 8h。

[0312] 生产培养基含有 60g/L 的过夜表达即时 TB 培养基 (Novagen),10g/L 的甘油和 50mg/L 的卡那霉素。培养基允许取样品的同时于  $20^{\circ}\text{C}$  搅拌,以测量 OD 和 pH。培养物显著生长,获得良好 OD。在 40h 之后,通过离心收获细胞,及冷冻而产生 12.7g 的细胞湿重。

[0313] 通过添加 Bugbuster Master 混合物 (Novagen) 实施裂解,通过离心回收裂解物,及保持冷冻。用解冻的裂解物实施活性测试。

[0314] 【实施例 2 :UGT76G1 的体外产生】

[0315] 使用来自 Promega 的 S30T7 高产率蛋白表达系统试剂盒。将 4  $\mu$ g 的来自大肠埃希氏菌 (*E. coli*)EC100 的 UGT76G1\_pET30a+ 质粒与 80  $\mu$ L 的 S30 预混物加混合,添加 72  $\mu$ L 的 S30T7 提取物。添加无核酸酶的水,以便获得 200  $\mu$ L 的总体积,将得到的溶液于  $30^{\circ}\text{C}$  温育 2h。将 180  $\mu$ L 用于催化性测试反应。

[0316] 【实施例 3 :UGT91D2 的体外产生】

[0317] 将 NcoI 和 NdeI 限制侧加入原核酸序列,如描述于 Genbank 登录 NO. ACE87855.1。在密码子优化之后,获得以下核酸序列 (SEQ ID NO:2) :

[0318] CCATGGCACATATGGCAACCAGCGATAGCATTGTTGATGATCGTAAACAGCTGCATGTTGCAACCTTTC  
CGTGGCTGGCATTGTTGGTCATATTCTGCCGTATCTGCAGCTGAGCAAAGTGCAGAAAAAGGTCATAAAGTGAGC  
TTTCTGAGCACCACCCGTAATATTCAGCGTCTGAGCAGCCATATTAGTCCGCTGATTAATGTTGTTTCAGCTGACCCT  
GCCTCGTGTTCAAGAACTGCCGGAAGATGCCGAAGCAACCACCGATGTTTCATCCGGAAGATATTCGGTATCTGAAAA  
AAGCAAGTGATGGTCTGCAGCCGGAAGTTACCCGTTTTCTGGAACAGCATAGTCCGGATTGGATCATCTATGATTAT  
ACCCATTATTGGCTGCCGAGCATTGCAGCAAGCCTGGGTATTAGCCGTGCACATTTTAGCGTTACCACCCCGTGGGC  
AATTGCATATATGGGTCCGAGCGCAGATGCAATGATTAATGGTAGTGATGGTTCGTACCACCGTTGAAGATCTGACCA  
CCCCTCCGAAATGGTTTTCCGTTTTCCGACCAAAGTTGTTGGCGTAAACATGATCTGGCACGTCTGGTTCCGTATAAA  
GCACCGGGTATTAGTGATGGTTATCGTATGGGTCTGGTTCTGAAAGGTAGCGATTGTCTGCTGAGCAAATGCTATCA  
TGAATTTGGCACCCAGTGGCTGCCGCTGCTGGAAACCCTGCATCAGGTTCCGGTTGTTCCGGTGGGTCTGCTGCCTC  
CGGAAGTTCCGGGTGATGAAAAAGATGAAACCTGGGTAGCATCAAAAAATGGCTGGATGGTAAACAGAAAGGTAGC  
GTGGTTTTATGTTGCACTGGGTAGCGAAGTTCTGGTTAGCCAGACCGAAGTTGTTGAACTGGCACTGGGTCTGAACT  
GAGCGGTCTGCCGTTTTGTTGGGCATATCGTAAACCGAAAAGGTCCGGCAAAAAAGCGATAGCGTTGAACTGCCGGATG

GTTTTGTTGAACGTACCCGTGATCGTGGTCTGGTTTGGACCAGCTGGGCACCTCAGCTGCGTATTCTGAGCCATGAA  
 AGCGTTTGTGGTTTTCTGACCCATTGTGGTAGCGGTAGCATTGTGGAAGGTCTGATGTTTGGTCATCCGCTGATTAT  
 GCTGCCGATTTTTGGTGATCAGCCGCTGAATGCACGTCTGCTGGAAGATAAACAGGTTGGTATTGAAATTCGCGTA  
 ATGAAGAAGATGGTTGCCTGACCAAAGAAAGCGTTGCACGTAGCCTGCGTAGCGTTGTTGTTGAAAAAGAAGGCGAA  
 ATCTATAAAGCCAATGCACGTGAACTGAGCAAAATCTATAATGATACCAAAGTGAAAAAGAATATGTGAGCCAGTT  
 CGTGGATTATCTGGAAAAAACACCCGTGCAGTTGCCATTGATCACGAAAAGCTAATGACTCGAG

[0319] 在基因合成及使用 NcoI 和 XhoI 克隆位点亚克隆进 pET30A+ 载体之后, 将 UGT91D2\_pET30a+ 质粒通过电穿孔导入大肠埃希氏菌 (E. coli) EC100。获得的细胞在卡那霉素的存在下生长, 选择适合的集落, 及允许在液体 LB 培养基 (锥形瓶) 中生长。将甘油加入悬浮液作为冷冻保护剂, 400  $\mu$ L 等份存储于  $-20^{\circ}\text{C}$  和于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。

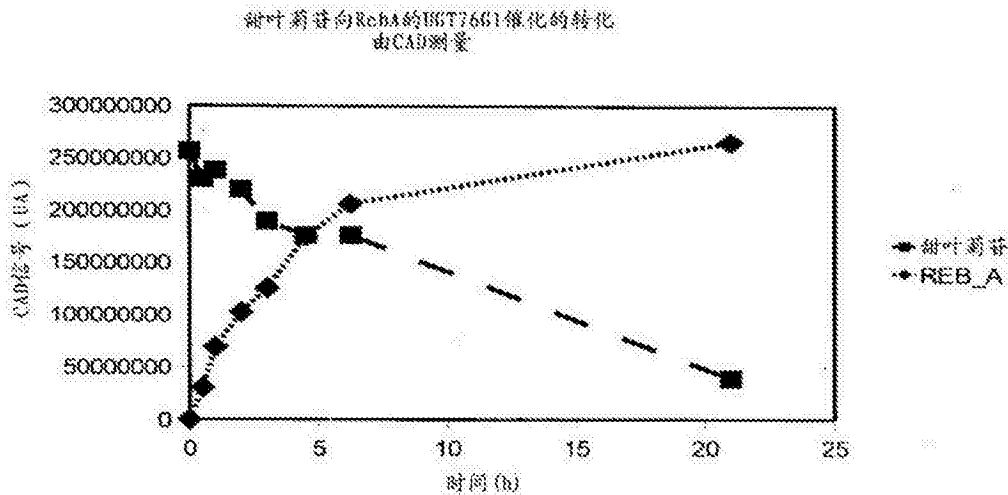
[0320] 将来自 Promega 的 S30T7 高产率蛋白表达系统试剂盒用于体外蛋白合成。

[0321] 将 4  $\mu$ g 的 UGT91D2\_pET30a+ 质粒与 80  $\mu$ L 的 S30 预混物加混合, 添加 72  $\mu$ L 的 S30T7 提取物。添加无核酸酶的水, 以便获得 200  $\mu$ L 的总体积, 将得到的溶液于  $30^{\circ}\text{C}$  温育 2h。将 5  $\mu$ L 用于 SDS-page 分析, 而余下 45  $\mu$ L 用于催化性测试反应。

[0322] 【实施例 4: 用体内产生的 UGT76G1 的催化性反应】

[0323] 反应的总体积是 5.0mL, 有以下组成: 50mM 磷酸钠缓冲液 pH7.2, 3mM  $\text{MgCl}_2$ , 2.5mM UDP-葡萄糖, 0.5mM 甜叶菊苷和 500  $\mu$ L 的 UGT76G1 解冻的裂解物。反应于  $30^{\circ}\text{C}$ , 在轨道摇床上, 以 135rpm 运行。对于各样品, 用 40  $\mu$ L 的 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  和 420  $\mu$ L 的甲醇/水 (6/4) 骤冷 460  $\mu$ L 的反应混合物。样品立即离心, 及在由 HPLC (CAD) 分析之前于  $10^{\circ}\text{C}$  保持。HPLC 指示甜叶菊苷向莱苞迪昔 A 的几乎完全转变, 如见于图 40。

[0324]



【图 40】

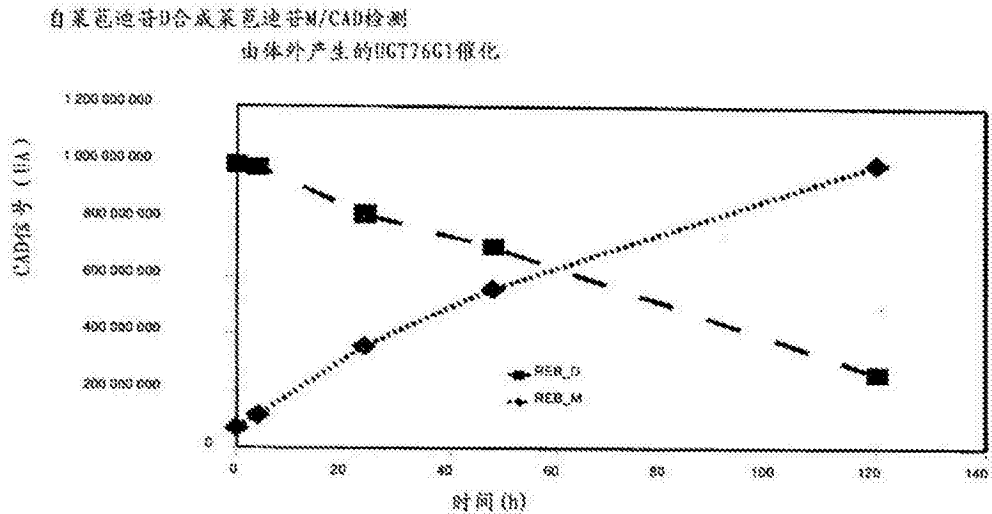
[0325] 【实施例 5: 用体外产生的 UGT91D2 的催化性反应】

[0326] 反应总体积是 0.5mL, 含以下组成: 50mM 磷酸钠缓冲液 pH7.2, 3mM  $\text{MgCl}_2$ , 3.8mM UDP-葡萄糖, 0.1mM 莱苞迪昔 A 和 180  $\mu$ L 的体外产生的 UGT91D2。反应于  $30^{\circ}\text{C}$ , 在轨道摇床上, 以 135rpm 运行。对于各样品, 450  $\mu$ L 的反应混合物骤冷用 45  $\mu$ L 的 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  和 405  $\mu$ L 的 60% MeOH。在离心之后, 上清液由 HPLC (CAD) 分析。HPLC 指示在 120h 之后莱苞迪昔 A 向莱苞迪昔 D 的 4.7% 转变。

[0327] 【实施例 6: 用体外产生的 UGT76G1 的催化性反应】

[0328] 反应总体积是 2mL, 含以下组成: 50mM 磷酸钠缓冲液 pH7.2, 3mM  $MgCl_2$ , 3.8mM UDP-葡萄糖, 0.5mM 莱苞迪昔 D 和 180  $\mu L$  的体外产生的 UGT76G1。反应于 30°C, 在轨道摇床上, 以 135rpm 运行。对于各样品, 400  $\mu L$  的反应混合物骤冷用 40  $\mu L$  的 2N  $H_2SO_4$  和 360  $\mu L$  的 60% MeOH。在离心之后, 上清液由 HPLC(CAD) 分析。HPLC 指示在 120h 之后莱苞迪昔 D 向莱苞迪昔 M 的 80% 转变, 如见于图 41。

[0329]



【图 41】

[0330] 对于实施例 7 至 12, 使用以下缩写:

[0331] LBGKP 培养基: 20g/L Luria 肉汤 Lennox; 50mM PIPES 缓冲剂 pH7.00; 50mM 磷酸缓冲液 pH7.00; 2.5g/L 葡萄糖和 50mg/L 的卡那霉素或氨苄西林

[0332] LB 培养基: (20g/L Luria 肉汤 Lennox)

[0333] 【实施例 7: 由 pET30a+ 质粒和 BL21 (DE3) 表达株制备的 UGT76G1 的制备和活性】

[0334] 将 pET30a+\_UGT76G1 质粒转化进 BL21 (DE3) 表达株 (Lucigen E. **Cloni**<sup>®</sup> EXPRESS 电感受态细胞)。获得的细胞在陪替-皿中的 LB Agar 培养基上, 在卡那霉素的存在下生长。选择适合的集落, 及允许在含有卡那霉素的液体 LBGKP 培养基中生长。添加甘油, 及将 400  $\mu L$  等份存储于 -20°C 和于 -80°C。

[0335] 将存储等份解冻, 及添加到 30mL 的 LBGKP 培养基。使此培养物于 30°C 振摇 8h, 随后用于接种 400mL 的含有 60g/L 的“过夜表达即时 TB 培养基” (Novagen, 参照 71491-5), 10g/L 的甘油和 50mg/L 的卡那霉素的生产培养基。于 20°C 取样品的同时搅拌培养基, 以测量 OD (600nm) 和 pH。在 40h 之后, 将细胞通过离心收获, 及冷冻。获得的细胞湿重是 10.58g。

[0336] 将 3.24g 的获得的沉淀通过添加 8.1mL 的“Bugbuster Master 混合物” (Novagen, 参照 71456) 和 3.5mL 的水裂解。将裂解物通过离心回收, 及保持冷冻。

[0337] 【实施例 8: 由 pET30a+ 质粒和 Tuner (DE3) 表达株制备的 UGT76G1 的制备和活性】

[0338] 将 pET30a+\_UGT76G1 质粒由热休克处理转化进 Tuner (DE3) 表达株 (Novagen Tuner<sup>™</sup> (DE3) 感受态细胞)。使获得的细胞在陪替-皿中, 在卡那霉素存在下生长在 LB Agar 培养基上。选择适合的集落, 及使在含有卡那霉素的液体 LBGKP 培养基中生长。添加甘油, 及将 400  $\mu L$  等份于 -20°C 和于 -80°C 存储。

[0339] 将存储等份解冻, 及添加到 100mL 的含有 50mg/L 的卡那霉素的 LB 培养基。使此培养物于 30°C 振摇 15h。将 4.4mL 的此培养用于接种 200mL 的含有 LB 的生产培养基。此

培养基于 37℃ 搅拌,直到获得 0.9 的 OD(600nm),之后添加 400  $\mu$ L 的 100mM IPTG 溶液,及培养基于 30℃ 搅拌 4h。将细胞通过离心收获,及冷冻。获得的细胞湿重是 1.38g。

[0340] 将获得的沉淀通过添加 4.9mL 的“Bugbuster Master 混合物”(Novagen, 参照 71456) 和 2.1mL 的水裂解。将裂解物通过离心回收,及保持冷冻。

[0341] 【实施例 9 :由 pMAL 质粒和 BL21 表达株制备的 UGT76G1 的制备和活性】

[0342] 在将合成的 UGT76G1 基因使用 Nde1 和 Sal1 克隆位点亚克隆进 pMAL 质粒之后,将 pMAL\_UGT76G1 质粒由热休克处理转化进 BL21 表达株 (New England Biolabs BL21 感受态大肠埃希氏菌 (E. coli))。获得的细胞在陪替 - 皿中在 LB Agar 培养基上在氨苄西林的存在下生长。选择适合的集落,使在含有氨苄西林的液体 LBGKP 培养基中生长。添加甘油,400  $\mu$ L 等份存储于 -20℃ 和于 -80℃。

[0343] 将存储等份解冻,及添加到 30mL 的 LBGKP 培养基。此培养于 30℃ 振摇 8h,随后用来接种 400mL 的含有 60g/L 的“过夜表达立即 TB 培养基”(Novagen, 参照 71491-5),10g/L 的甘油和 50mg/L 的氨苄西林的生产培养基。培养基取样品的同时于 20℃ 搅拌,以测量 OD 和 pH。在 40h 之后,将细胞通过离心收获,及冷冻。获得的细胞湿重是 5.86g。

[0344] 2.74g 的获得的沉淀通过添加 9.6mL 的“Bugbuster Master Mix”(Novagen, 参照 71456) 和 4.1mL 的水裂解。将裂解物通过离心回收,及保持冷冻。

[0345] 【实施例 10 :由 pMAL 质粒和 ArcticExpress 表达株制备的 UGT76G1 的制备和活性】

[0346] 将 pMAL\_UGT76G1 质粒由热休克处理转化进 ArcticExpress 表达株 (Agilent ArcticExpress 感受态细胞)。获得的细胞在陪替 - 皿中在 LB Agar 培养基上在氨苄西林和遗传霉素的存在下生长。选择适合的集落,在含有氨苄西林和遗传霉素的液体 LBGKP 培养基中生长。添加甘油,将 400  $\mu$ L 等份存储于 -20℃ 和于 -80℃。

[0347] 将存储等份解冻,及添加到 30mL 的 LBGKP 培养基 (含氨苄西林和遗传霉素)。此培养物于 30℃ 振摇 8h,随后用来接种 400mL 的含有 60g/L 的“过夜表达立即 TB 培养基”(Novagen, 参照 71491-5),10g/L 的甘油和 50mg/L 的氨苄西林的生产培养基。培养基取样品的同时于 12℃ 搅拌,以测量 OD(600nm) 和 pH。在 68h 之后,将细胞通过离心收获,及冷冻。获得的细胞湿重是 8.96g。

[0348] 2.47g 的获得的沉淀通过添加 8.73mL 的“Bugbuster Master Mix”(Novagen, 参照 71456) 和 3.79mL 的水裂解。将裂解物通过离心回收,及保持冷冻。

[0349] 【实施例 11 :由 pCOLDIII 质粒和 ArcticExpress 表达株制备的 UGT76G1 的制备和活性】

[0350] 在将合成的 UGT76G1 基因使用 Nde1 和 Xho1 克隆位点亚克隆进 pCOLDIII 质粒之后,将 pCOLDIII\_UGT76G1 质粒由热休克处理转化进 ArcticExpress 表达株 (Agilent ArcticExpress 感受态细胞)。获得的细胞在陪替 - 皿中在 LB Agar 培养基上在氨苄西林和遗传霉素的存在下生长。选择适合的集落,使在含有氨苄西林和遗传霉素的液体 LBGKP 培养基中生长。添加甘油,将 400  $\mu$ L 等份存储于 -20℃ 和于 -80℃。

[0351] 将存储等份解冻,及添加到 30mL 的 LBGKP 培养基 (含氨苄西林和遗传霉素)。此培养于 30℃ 振摇 8h,随后用来接种 400mL 的含有 60g/L 的“过夜表达立即 TB 培养基”(Novagen, 参照 71491-5),10g/L 的甘油和 50mg/L 的卡那霉素的生产培养基。培养基取样品的同时于 12℃ 搅拌,以测量 OD(600nm) 和 pH。在 63h 之后,将细胞通过离心收获,及

冷冻。获得的细胞湿重是 6.54g。

[0352] 2.81g 的获得的沉淀通过添加 9.8mL 的“Bugbuster Master Mix”(Novagen, 参照 71456) 和 4.2mL 的水裂解。将裂解物通过离心回收, 及保持冷冻。

[0353] 【实施例 12 : 由 pCOLDIII 质粒和 Origami2 (DE3) 表达株制备的 UGT76G1 的制备和活性】

[0354] 将 pCOLDIII\_UGT76G1 质粒由热休克处理转化进 Origami2 (DE3) 表达株 (Novagen Origami™2 (DE3) 感受态细胞)。获得的细胞在陪替 - 皿中在 LB Agar 培养基上在氨苄西林的存在下生长。选择适合的集落, 使在含有氨苄西林的液体 LBGKP 培养基中生长。添加甘油, 将 400  $\mu$ L 等份存储于  $-20^{\circ}\text{C}$  和于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。

[0355] 将存储等份解冻, 及添加到 30mL 的 LBGKP 培养基 (含氨苄西林)。此培养于  $30^{\circ}\text{C}$  振摇 8h, 随后用来接种 400mL 的含有 60g/L 的“过夜表达立即 TB 培养基”(Novagen, 参照 71491-5), 10g/L 的甘油和 50mg/L 的卡那霉素的生产培养基。培养基取样品的同时于  $12^{\circ}\text{C}$  搅拌, 以测量 OD (600nm) 和 pH。在 68h 之后, 将细胞通过离心收获, 及冷冻。获得的细胞湿重是 2.53g。

[0356] 1.71g 的获得的沉淀通过添加 6.0mL 的“Bugbuster Master 混合物”(Novagen, 参照 71456) 和 1.9mL 的水裂解。将裂解物通过离心回收, 及保持冷冻。

[0357] 【实施例 13 : 活性的测定】

[0358] 在 5mL 规模, 使用用于甜叶菊苷向莱苞迪昔 A 和莱苞迪昔 D 向莱苞迪昔 M 转化的 500  $\mu$ L 的解冻的裂解物, 使用 0.5mM 的底物, 2.5mM 的 UDP- 葡萄糖和 3mM  $\text{MgCl}_2$ , 在 pH7.2 的 50mM 磷酸钠缓冲液中实施活性测试。取样品及由 HPLC 分析。UGT76G1 的不同制备物的结果总结于以下表。

[0359]

实施例	质粒	表达株	转化活性*	
			甜叶菊苷向莱苞迪昔 A	莱苞迪昔 D 向莱苞迪昔 M
7	pET30a+	BL21 (DE3)	29U mL <sup>-1</sup>	0.31U mL <sup>-1</sup>
8	pET30a+	Tuner (DE3)	33U mL <sup>-1</sup>	0.40U mL <sup>-1</sup>
9	pMAL	BL21	20U mL <sup>-1</sup>	0.15U mL <sup>-1</sup>
10	pMAL	ArticExpress	15U mL <sup>-1</sup>	0.25U mL <sup>-1</sup>
11	pCOLDIII	ArticExpress	15U mL <sup>-1</sup>	0.11U mL <sup>-1</sup>
12	pCOLDIII	Origami2 (DE3)	37U mL <sup>-1</sup>	0.20U mL <sup>-1</sup>

[0360] \*注

[0361] 提及每 mL 的裂解物的甜叶菊苷和莱苞迪昔 M 的转化活性。1U 会在 1 小时于  $30^{\circ}\text{C}$  和 pH7.2 转化 1  $\mu$ mol 的底物。

[0362] 【实施例 14 : 用于莱苞迪昔 D 向莱苞迪昔 M 的转化的 50mL 规模反应】

[0363] 在 50mL 规模, 使用 5mL 的实施例 12 的裂解物将莱苞迪昔 D 转化为莱苞迪昔 M。反应培养基由 50mM 磷酸钠缓冲液 pH7.2, 3mM 的  $\text{MgCl}_2$ , 2.5mM 的 UDP- 葡萄糖和 0.5mM 的莱苞迪昔 D 组成。使反应于  $30^{\circ}\text{C}$  振摇 90h 后, 添加 50mL 的乙醇, 及将得到的混合物于  $-20^{\circ}\text{C}$  搅拌 1h。在以 5000g 离心 10min 之后, 将上清液经超滤 (Vivaflow MWC0 30000) 纯化。获得 78mL 的渗透物, 及将 9mL 的渗余物用 9mL 的乙醇稀释, 及使再经历超滤 (Vivaflow MWC0 30000)。获得另一 14mL 的滤出液, 将其与第 1 渗透物组合。组合的渗透物在减压于  $30^{\circ}\text{C}$  浓

缩,直到获得 32mL 的清澈的溶液。

[0364] 产物混合物的 HPLC 踪迹显示于图 5。HPLC 在装备双泵,自动采样器和恒温器柱隔室的 Agilent 1200 系列上实施。方法是等度的,有 70%水(0.1%甲酸):30%乙腈组成的移动相。流速是 0.1  $\mu$ L/min。使用的柱是 Phenomenex Prodigy 5  $\mu$  ODS(3) 100A ;250x2mm。柱温度维持于 40°C。注射体积是 20 ~ 40  $\mu$ l。

[0365] 【实施例 15 :使用 pMAL 质粒和 BL21 表达株的 UGT91D2 的制备】

[0366] 在将合成 UGT91D2 基因使用 NdeI 和 SalI 克隆位点亚克隆进 pMAL 质粒之后,将 pMAL\_UGT91D2 质粒由热休克处理转化进 BL21 表达株 (New England Biolabs BL21 感受态大肠埃希氏菌 (*E. coli*))。获得的细胞在陪替 - 皿中在 LB Agar 培养基上在氨苄西林的存在下生长。选择适合的集落,使在含有氨苄西林的液体 LBGKP 培养基中生长。添加甘油,将 400  $\mu$ L 等份存储于 -20°C 和于 -80°C。

[0367] 将存储等份解冻,及添加到 30mL 的 LBGKP 培养基。此培养物于 30°C 振摇 8h,随后用来接种 400mL 的含有 60g/L 的“过夜表达立即 TB 培养基”(Novagen, 参照 71491-5),10g/L 的甘油和 50mg/L 的氨苄西林的生产培养基。培养基取样品的同时于 20°C 搅拌,以测量 OD 和 pH。在 40h 之后,将细胞通过离心收获,及冷冻。获得的细胞湿重是 12.32g。

[0368] 2.18g 的获得的沉淀通过添加 7.7mL 的“Bugbuster Master Mix”(Novagen, 参照 71456) 和 3.2mL 的水裂解。将裂解物通过离心回收,及直接用于活性测试。

[0369] 【实施例 16 :使用 pMAL 质粒和 ArcticExpress 表达株的 UGT91D2 的制备】

[0370] 将 pMAL\_UGT91D2 质粒由热休克处理转化进 ArcticExpress 表达株 (Agilent ArcticExpress 感受态细胞)。获得的细胞在陪替 - 皿中在 LB Agar 培养基上在氨苄西林和遗传霉素的存在下生长。选择适合的集落,使在含有氨苄西林和遗传霉素的液体 LBGKP 培养基中生长。添加甘油,将 400  $\mu$ L 等份存储于 -20°C 和于 -80°C。

[0371] 将存储等份解冻,及添加到 30mL 的 LBGKP 培养基(含氨苄西林和遗传霉素)。此培养于 30°C 振摇 8h,随后用来接种 400mL 的含有 60g/L 的“过夜表达立即 TB 培养基”(Novagen, 参照 71491-5),10g/L 的甘油和 50mg/L 的氨苄西林的生产培养基。培养基允许于 20°C 搅拌 16h,之后是取样品的同时于 12°C 搅拌另一 50h,以测量 OD(600nm) 和 pH。将细胞通过离心收获,及冷冻。获得的细胞湿重是 15.77g。

[0372] 2.57g 的获得的沉淀通过添加 9.0mL 的“Bugbuster Master Mix”(Novagen, 参照 71456) 和 3.8mL 的水裂解。将裂解物通过离心回收,及直接用于活性测试。

[0373] 【实施例 17 :使用 pET30a+ 质粒和 Tuner (DE3) 表达株的 UGT91D2 的制备】

[0374] 将 pET30a+\_UGT91D2 质粒由热休克处理转化进 Tuner (DE3) 表达株 (Novagen Tuner™ (DE3) 感受态细胞)。使获得的细胞在陪替 - 皿中,在卡那霉素存在下生长在 LB Agar 培养基上。选择适合的集落,及使在液体 LBGKP 培养基(含卡那霉素)中生长。添加甘油,及将 400  $\mu$ L 等份于 -20°C 和于 -80°C 存储。

[0375] 将存储等份解冻,及添加到 100mL 的含有 50mg/L 的卡那霉素的 LB 培养基。此培养物于 30°C 振摇 15h。将 6.2mL 的此培养物用于接种 500mL 的含有 LB 的生产培养基。将此培养基于 37°C 搅拌,直到获得 0.9 的 OD(600nm),之后添加 500  $\mu$ L 的 100mM IPTG 溶液(培养基中的 IPTG 浓度是 100  $\mu$ M),培养基于 30°C 搅拌 4h,将细胞通过离心收获,及冷冻。获得的细胞湿重是 4.02g。

[0376] 1.92g 的获得的沉淀通过添加 6.8mL 的“Bugbuster Master 混合物”(Novagen, 参照 71456) 和 2.8mL 的水裂解。将裂解物通过离心回收, 及直接测试活性。

[0377] 【实施例 18 :使用 pET30a+ 质粒和 ArcticExpress 表达株的 UGT91D2 的制备】

[0378] 将 pET30a+\_UGT91D2 质粒由热休克处理转化进 ArcticExpress (DE3) 表达株 (Agilent ArcticExpress 感受态细胞)。获得的细胞在陪替 - 皿中在 LB Agar 培养基上在卡那霉素和遗传霉素存在下生长。选择适合的集落, 在含有卡那霉素和遗传霉素的液体 LBGKP 培养基中生长。添加甘油, 将 400  $\mu$ L 等份存储于  $-20^{\circ}\text{C}$  和于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。

[0379] 将存储等份解冻, 及添加到 30mL 的 LBGKP 培养基 (含卡那霉素和遗传霉素)。此培养于  $30^{\circ}\text{C}$  振摇 8h, 随后用来接种 400mL 的含有 60g/L 的“过夜表达立即 TB 培养基” (Novagen, 参照 71491-5), 10g/L 的甘油和 50mg/L 的氨苄西林的生产培养基。培养基于  $20^{\circ}\text{C}$  搅拌 16h, 之后是取样品的同时于  $12^{\circ}\text{C}$  搅拌另一 50h, 以测量 OD(600nm) 和 pH。在 60h 之后, 将细胞通过离心收获, 及冷冻。获得的细胞湿重是 16.07g。

[0380] 3.24g 的获得的沉淀通过添加 11.4mL 的“Bugbuster Master Mix” (Novagen, 参照 71456) 和 4.8mL 的水裂解。将裂解物通过离心回收, 及直接用于活性测试。

[0381] 【实施例 19 :UGT91D2 的体内制备的活性的测定】

[0382] 以 5mL 规模, 用 1000  $\mu$ L 的用于将悬钩子苷转化为甜叶菊苷的裂解物, 使用 0.5mM 的底物, 2.5mM 的 UDP- 葡萄糖和 3mM  $\text{MgCl}_2$ , 在 pH7.2 的 50mM 磷酸钠缓冲液中实施活性测试。取样品, 及由 HPLC 分析。UGT91D2 的不同制备物的结果总结于以下表。

[0383]

实施例	质粒	表达株	转化活性*
			悬钩子苷向甜叶菊苷
15	pMAL	BL21	9mU mL <sup>-1</sup>
16	pMAL	ArcticExpress	60mU mL <sup>-1</sup>
17	pET30a+	Tuner (DE3)	28mU mL <sup>-1</sup>
18	pET30a+	ArcticExpress (DE3)	21mU mL <sup>-1</sup>

[0384] \*注 :活性以每 mL 裂解物提及。1U 会在 1 小时于  $30^{\circ}\text{C}$  和 pH7.2 转化 1  $\mu\text{mol}$  的底物。

[0385] 【实施例 20 :用于莱苞迪昔 A 向莱苞迪昔 D 转变的其他酶】

[0386] 由公共数据库鉴定以下 UDP- 葡萄糖基转移酶的基因, 由 DNA2.0 合成, 和随后在 pET30a+ 载体中亚克隆。

[0387]

微平板	位置	基因名称	内部参照	RebA 向的 RebD 转变
C908201	A1	gi115454819_NP_001051010.1	S115N01A1	有活性的
C908201	G2	gi187373030_ACD03249.1	S115N01G2	有活性的
C908201	A7	gi460409128_XP_004249992.1	S115N05A7	有活性的
C912666	E1	gi2222619587_EEE55719.1	S115N06E1	有活性的

C912666	C2	gi297795735_XP_002865752.1	S115N06C2	有活性的
---------	----	----------------------------	-----------	------

[0388] 氨基酸序列如下：

[0389] SEQ ID NO:3

[0390] >gi|115454819|ref|NP\_001051010.1|Os03g0702500[ 粳稻 (*Oryza sativa Japonica*) 组 ]

[0391] MDDAHSSQSPLHVVFIPWLAFGHLLPCLDLAERLAARGHRVSFVSTPRNLARLPPVRPELAELVDLV  
ALPLPRVDGLPDGAEATSDVPFDKFEHLHRKAFDGLAAPPFAFLDTACAGGKRPDWWLADLMHHWVALASQERGVP  
CAMILPCSAAVVASSAPPTTESSADQREAIVRSMGTAAPSFSAKRATEEFATEGASGVSIMTRYSLTLQRSKLVAM  
RSCPELEPGAFITLRFYKPVVFPGLLPPRPDGARGVSKNGKHDAIMQWLDAQPAKSVVYVALGSEAPMSADLL  
RELAHGLDLAGTRFLWAMRKPAGVDADSVLPAGFLGRTGERGLVTTRWAPQVSI LAHAAVCAFLTHCGWGSVVEG  
LQFGHPLIMLPILGDQGNARILEGRKLGVAVPRNDEDGSFDRGGVAGAVRAVVVEEGKTFANARKLQEI VAD  
REREERCIDEFVQHLTSWNELEKNSDGGQYP

[0392] SEQ ID NO:4

[0393] >gi|187373030|gb|ACD03249.1|UDP- 糖基转移酶 [ 糙伏毛燕麦 (*Avena strigosa*) ]

[0394] MAVKDEQQSPLHILLFPFLAPGHLIPIADMAALFASRGVRCITLTPVNAAIIRSAVDRANDAFRGSDC  
PAIDISVVPFPDVGLPPGVENGNALTSPADRLLKFFQVAELREPFDRFLADNHPDAVSDSFFHWSTDAAAEHGVPR  
LGFLGSSMFAGSCNESTLHNNPLETAADDPDALVSLPGLPHRVELRRSQMMDPKKRPDHWALLESVNAADQKSFGEV  
FNSFHELEPDYVEHYQTTLGRRTWLVGVALASKDMAGRGSTSARSPDADSCLRWLDTKQPGSVVYVSFGTLIRFSP  
AELHELARGLDLSGKNFVWVLRAGPDSSEWMPQGFADLITPRGDRGFIIRGWAPQMLILNHRALGGFVTHCGWNST  
LESVSAGVPMVTWPRFADQFQNEKLIVEVLKVGVSIGAKDYSGSIEHNDVIRGEVIAESIGKLMGSSEESDAIQRKA  
KDLGAEARSAVENGGSSYNDVGRLMDELMARRSSVKVGEDIIPTNDGL

[0395] SEQ ID NO:5

[0396] >gi|460409128|ref|XP\_004249992.1| 预测的 :花青素 -3-0- 葡萄糖苷 2-0- 葡萄  
糖醛酸基转移酶 - 样 [ 番茄 (*Solanum lycopersicum*) ]

[0397] MSPKLHKELFFHSLYKTRSNHTMATLKVLMFPFLAYGHI SPYLNVAKKLADRGLIYFCSTPINK  
STIEKIPEKYADSIHLIELHLELPQLPPHYHTTNGLPPNLNQLVQKALKMSKPNFSKILQNLKPDLVIIYDILQR  
WAKHVANEQNIPAVKLLTSGAAVFSYFFNVLKKPGVEFPFPGIYLRKIEQVRLSEMMSKSDKEKELEDDDDDDDL  
LVDGNMQIMLMSTSRTEAKYIDFCTALTNWKVVPVGPVQDLITNDVDDMELIDWLGTKDENSTVFSFGSEYF  
LSKEDMEEVAFALLESNVNFIWVARFPKGEERNLEDALPKGFLERIGERGRVLDKFAQQPRILNHPSTGGFISHC  
GWNSAMESIDFGVPIIAMPMLDQPMNARLIVELGVAVEIVRDDDGIHRGEIAETLKGVI TGTGTEKLRKVRD  
ISKNLKTIRDEEMDAAAEEIQLCRNGN

[0398] SEQ ID NO:6

[0399] >gi|222619587|gb|EEE55719.1| 假想蛋白 OsJ\_04191[ 粳稻 (*Oryza sativa Japonica*) 组 ]

[0400] MHVVMLPWLAFGHILPFAEFAKRVARQGHRVTLFSTPRNTRRLIDVPPSLAGRIRVVDIPLRVEHL  
PEHAEATIDLPSNDLRPYLRRAYDEAFSRELSRLLETGSPRPDWLADYAAWAPAAAASRHGVPCAFSLFGAA  
ALCFFGPAETLQGRGPYAKTEPAHLTAVPEYVFPPTTVAFRGNEARELFKPSLIPDESGVSESYRFSQSIEGCQL  
VAVRSNQEFEPWLELLGELYQKPVIPIGMFP PPPPPQDVAGHEETLRWLDRQEPNSVVYAAFVSEVKLTAEQ LQR

IALGLEASELPIWAFRAPPDAGDGDGLPGGFKERVNGRGRVVCRGWVPQVKFLAHASVGGFLTHAGWNSIAEGLA  
NGVRLVLLPLMFEQGLNARQLAEKKVAVEVARDEDDGSFAANDIVDALRRVMVGEEGDEFGVKVKELAKVFGDDE  
VNDRYVRDFLKCLSEYKMQRQG

[0401] SEQ ID NO:7

[0402] >gi|297795735|ref|XP\_002865752.1|UDP-葡萄糖醛酸基/UDP-葡萄糖基转移酶  
家族蛋白 [琴叶拟南芥琴叶亚种 (*Arabidopsis lyrata* subsp. *lyrata*)]

[0403] MDDKKEEVMHIAMFPWLAMGHLLPFLRLSKLLAQKGHKISFISTPRNLRPLKPSNLSSSITFVSFPL  
PSISGLPPSSESSMDVPYNKQQSLKAAFDLLQPPLTEFLRLSSPDWIIYDYASHWLPSTAKELGISKAFFSLFNAAT  
LCFMGPSSSLIEESRSTPEDFTVVPWPVPFKSTIVFRYHEVSRYVEKTDEDVTGVSDSVRFGYITDGSDAVFRSCP  
EFEPEWFSLLQDLRKPVPFIPGLPPVIEDDDDDTTWVRIKEWLDKQRVNSVVYVSLGTEASLRREELTELALGLEK  
SETPFFWVLRNEPQIPDGFEEVKGRGMVHVGVWPQVKILSHESVGGFLTHCGWNSVVEGIGFGKVPIFLPVLNEQG  
LNTRLLQGKGLGVEVLRDERDGSFGSDSVADSVRLVMIDDAGEEIREKVKLMKGLFGNMDENIRYVDELVGFMRNDE  
SSQLKEEEEEEDDCSDQSSEVSSETDEKELNLDLKEEKRRISVYKSLSSSEFDDYVANEKMG

[0404] 在微孔板中接收测试的质粒,在各分离的孔中含有质粒作为冷冻干燥的固体。

[0405] 质粒的悬浮液。向各孔添加 24  $\mu\text{L}$  的超纯无菌水,和微孔板于室温振摇 30 分钟。  
随后,将板于 4 $^{\circ}\text{C}$  温育 1 小时。还通过抽吸移液混合各孔的内容物。由 Qubit2.0 分析,使用  
1  $\mu\text{L}$  的悬浮液实施质粒定量。质粒的测定的量是:

[0406]

微孔板	位置	内部参照	[质粒]ng/ $\mu\text{L}$
C908201	A1	S115N01A1	32.8
C908201	G2	S115N01G2	41.0
C908201	A7	S115N05A7	56.6
C912666	E1	S115N06E1	64.0
C912666	C2	S115N06C2	31.4

[0407] 用质粒转化感受态细胞。从 -80 $^{\circ}\text{C}$  冷冻器获取化学感受态 EC100 细胞的等份,及  
存储在冰上。使细胞在冰上解冻 10 分钟。将 10  $\mu\text{L}$  的以上描述的质粒溶液的稀释物加入  
1.5mL 的无菌微型管(为了用 50pg 的 DNA 转化各细胞),及存储在冰上。将 100  $\mu\text{L}$  的化学  
感受态细胞加入各微型管。在化学感受态细胞质粒混合物在冰上温育 20min 之后,于 42 $^{\circ}\text{C}$   
实施 30s 热休克。

[0408] 还在冰上实施温育 2 分钟。向各微型管添加 300  $\mu\text{L}$  的 SOC 培养基,及将得到的混  
合物转移到无菌 15mL 管。在以 135rpm 振摇着于 37 $^{\circ}\text{C}$  温育 1 小时之后,将混合物铺到含有  
卡那霉素 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的固体 Luria 肉汤培养基上。将陪替 - 皿于 37 $^{\circ}\text{C}$  温育 16 小时。

[0409] 甘油中浓储物溶液的制备和质粒的纯化。向 50mL 无菌 Falcon 管添加 10mL 的含  
有 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的卡那霉素的 Luria 肉汤培养基。将培养基用自以上描述的平皿分离的集落  
接种,将培养物以 135rpm 振摇着于 37 $^{\circ}\text{C}$  温育 16 小时。

[0410] 向 1.5mL 的含有 300  $\mu$ L 的 60% 无菌甘油溶液的无菌微型管中添加 600  $\mu$ L 的培养。浓储物溶液存储于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。

[0411] 余部的培养物以 5,525g 于  $10^{\circ}\text{C}$  离心 10 分钟, 及在移出上清液之后, 沉淀存储在冰上。产生的质粒根据 Qiagen Qiaprep Spin Miniprep 试剂盒 (ref:27106) 纯化, 和在 260nm 处测量质粒产率。质粒溶液存储于  $4^{\circ}\text{C}$ 。如下测定质粒量:

[0412]

微孔板	位置	测试的内部参照	[质粒]ng/ $\mu$ L
C908201	A1	S115N01A1	115.7
C908201	G2	S115N01G2	120.4
C908201	A7	S115N05A7	293.8
C912666	E1	S115N06E1	126.1
C912666	C2	S115N06C2	98.8

[0413] 酶的体外表达。将 18  $\mu$ L 的质粒溶液 (含有大致 1.5  $\mu$ g 的质粒) 用于根据 Promega S30T7 高 - 产率蛋白表达系统 (ref:L1110) 试剂盒体外表达。表达培养基如下产生:

[0414]

	S30 预混物加	T7S30 提取物	总
试验	30 $\mu$ L	27 $\mu$ L	57 $\mu$ L
参照	20 $\mu$ L	18 $\mu$ L	38 $\mu$ L

[0415] 将制备的表达培养基混合物加入质粒溶液, 和每 45 分钟混合混合物着使溶液于  $30^{\circ}\text{C}$  温育 3 小时。冷冻 5  $\mu$ L 的混合物, 然而余部用于莱苞迪昔 A 向莱苞迪昔 D 的转变的催化性测试。

[0416] 对于莱苞迪昔 A 向莱苞迪昔 D 的转化的催化性测试。将含有 0.5mM 莱苞迪昔 A, 3mM  $\text{MgCl}_2$ , 50mM 磷酸缓冲液 (pH7.2) 和 2.5mM UDP-葡萄糖的 430  $\mu$ L 的反应混合物添加到 1.5mL 无菌微型管。添加 52  $\mu$ L 的酶表达培养基, 及使得到的混合物于  $30^{\circ}\text{C}$  反应 24 小时。在 2 小时, 16 小时和 24 小时之后取 125  $\mu$ L 样品, 及添加到 115  $\mu$ L 的 60% 甲醇和 10  $\mu$ L 的 2N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 。将骤冷的样品于室温以 18,000g 离心 2 分钟。将 200  $\mu$ L 转移到 HPLC 管形瓶及分析。

[0417] HPLC 分析。HPLC 测定如下实施:

[0418] 设备

[0419]

设备	提供商	参照	Lot#
Elite	日立	L-2130	NA

光电二极管阵列	日立	L-2455	NA
电晕 CAD 检测器	ESA	70-6186A	CO-2044
注射器 100 $\mu$ L	日立		NA
Column Synergy 4 $\mu$ 氢 -RP 80A(250 $\times$ 4.60mm)	Phenomenex	00G-4375-E0	588582-12

[0420] 仪器条件

[0421]

柱温度	55 $^{\circ}$ C
检测	UV 205nm ;bw 400nm CAD 检测
分析持续时间	15min
注射的体积	10 $\mu$ L
流速	1mL/min

[0422] 移动相梯度程序

[0423]

时间 (min)	%含有 0.04%乙酸的水	%甲醇
0	40	60
8	25	75
10	25	75
11	40	60
15	40	60

[0424] 以下提供 HPLC 测定结果：

[0425]

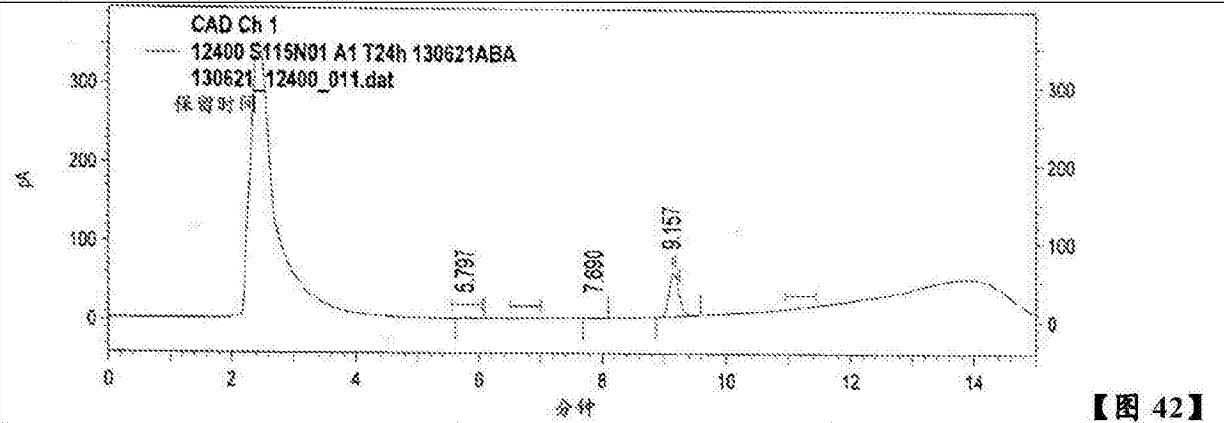
内部参照	在反应混合物中的甜叶菊醇糖苷转变 (%面积)		
	Reb D	Reb UNK	Reb A
<b>S115N01 A1</b>	<b>2.1</b>	<b>ND</b>	<b>96.7</b>
<b>S115N01 G2</b>	<b>0.6</b>	<b>ND</b>	<b>99.4</b>
<b>S115N05 A7</b>	<b>22.4</b>	<b>23.3</b>	<b>46.7</b>
<b>S115N06 E1</b>	<b>0.14</b>	<b>7.0</b>	<b>92.8</b>
<b>S115N06 C2</b>	<b>0.28</b>	<b>3.9</b>	<b>95.8</b>

[0426] 酶 S115N05A7 对于 Reb A 向 Reb D 转变具有最高活性 (约 22.4%)。

[0427] 随 reb D 而至少 3 种酶产生显著量的未知的糖苷 (标记为 Reb UNK ;随后鉴定为 reb D2), 如见于图 42 ~ 46。

[0428]

样品: 12400 S115N01A1 T24h 130621ABA  
 gi|115454819|ref|NP\_001051010.1| Os03g0702500 [ 稷稻 (*Oryza sativa Japonica*) 组 ]  
 文件名: 130621\_12400\_011.dat

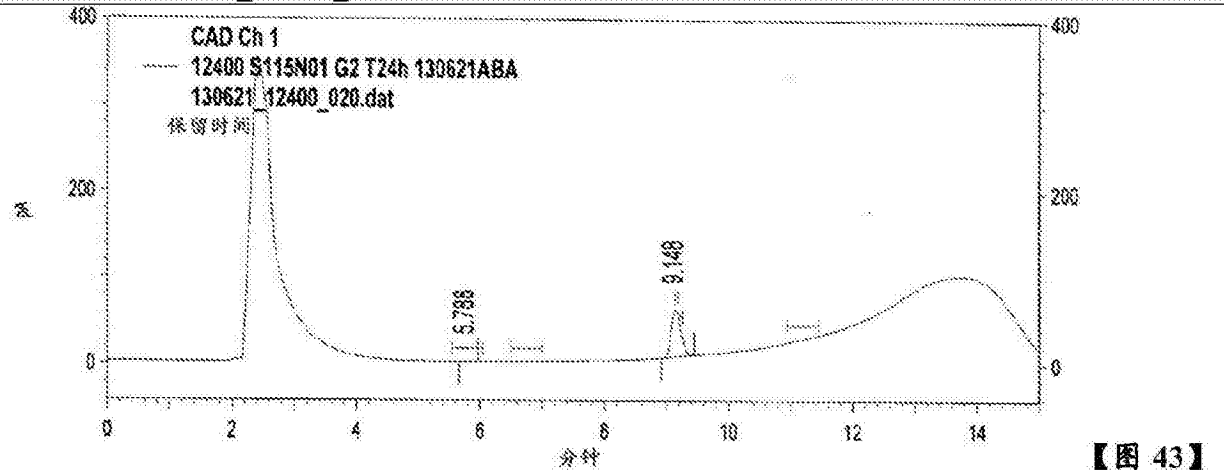


【图 42】

CAD Ch 1 结果		
化合物	保留时间	整合(区)
莱芭迪昔 D	5.797	13,532,277
未知的@RT7.890	7.890	7,094,778
莱芭迪昔 A	9.157	613,483,011
总		634,110,066

[0429]

样品: 12400 S115N01G2 T24h 130621ABA  
 >gi|187373030|gb|ACD03249.1| UDP-糖基转移酶 [ 糙伏毛燕麦 (*Avena strigosa*) ]  
 文件名: 130621\_12400\_020.dat

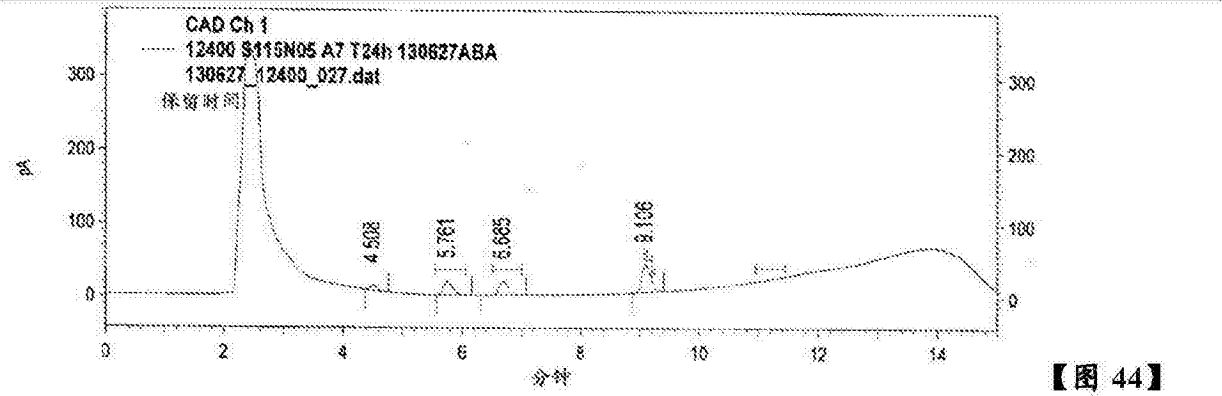


【图 43】

CAD Ch 1 结果		
化合物	保留时间	整合(区)
莱芭迪昔 D	5.788	3,547,834
莱芭迪昔 A	9.148	585,285,463
总		588,833,297

[0430]

样品: 12400 S115N05A7 T24h 130627ABA  
 >gi460409128|ref|XP\_004249992.1|预测的: 花青素-3-O-葡萄糖苷 2-O-葡萄糖醛酸基转移酶-样 [ 番茄 (*Solanum lycopersicum*) ]  
 文件名: 130627\_12400\_027.dat

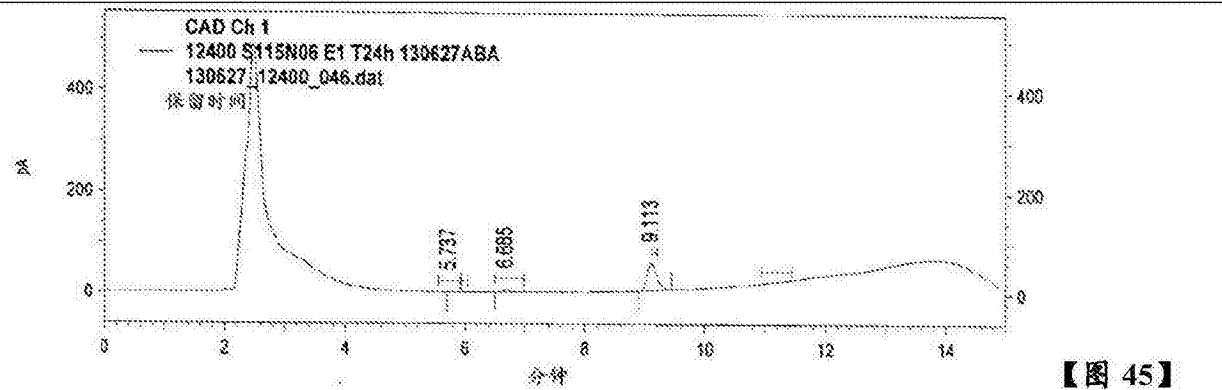


【图 44】

CAD Ch 1 结果		
化合物	保留时间	整合(区)
未知的@RT4.508	4.508	64,361,822
菜苣迪昔 D	5.761	191,273,935
菜苣迪昔 UNK	6.685	198,934,644
菜苣迪昔 A	9.106	398,115,681
总		852,686,082

[0431]

样品: 12400 S115N06E1 T24h 130627ABA  
 >gi222619587|gb|EEE55719.1|假想蛋白 OsJ\_04191 [ 粳稻 (*Oryza sativa Japonica*) 组 ]  
 文件名: 130627\_12400\_046.dat

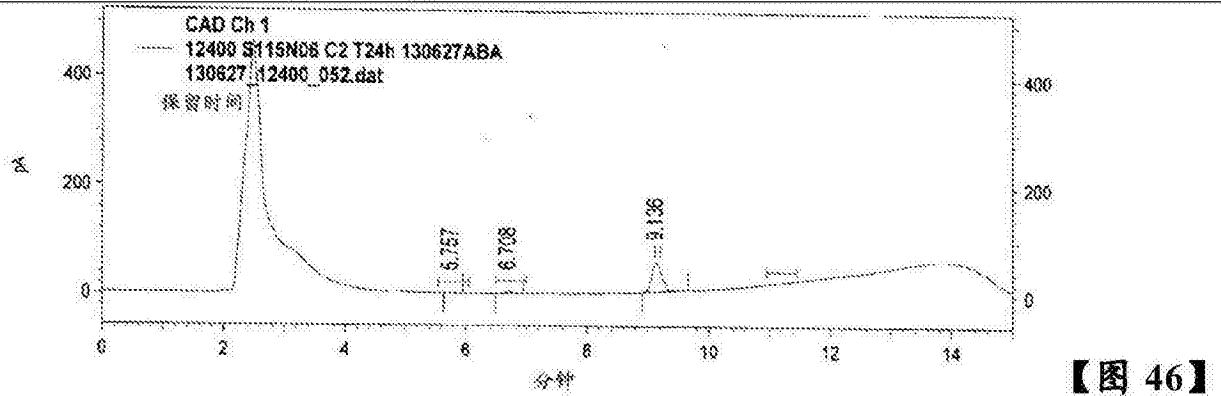


【图 45】

CAD Ch 1 结果		
化合物	保留时间	整合(区)
菜苣迪昔 D	5.737	964,715
菜苣迪昔 UNK	6.685	46,027,361
菜苣迪昔 A	9.113	606,312,523
总		653,304,599

[0432]

样品: 12400 S115N06C2 T24h 130627ABA  
 >gi|297795735|ref|XP\_002865752.1| UDP-葡萄糖醛酸基/UDP-葡萄糖基转移酶家族蛋白 [ 琴叶拟南芥琴叶亚种 (*Arabidopsis lyrata subsp. lyrata*) ]  
 文件名: 130627\_12400\_052.dat



【图 46】

CAD Ch 1 结果		
化合物	保留时间	整合(区)
菜苣迪昔 D	5.757	1,852,407
菜苣迪昔 UNK	6.708	26,033,636
菜苣迪昔 A	9.136	633,014,654
总		660,900,697

[0433] 【实施例 21 :体外产生的 EUGT11 的活性】

[0434] 如描述于专利申请 W0/2013/022989A2 的 EUGT11 基因由 DNA2.0 合成,和随后亚克隆进 pET30a+ 载体。

[0435]

微平板	位置	GI 号	版本	内部参照	RebA 向 RebD 的转变
C912666	G4	41469452	AAS07253.1	S115N08G4	有活性的

[0436] 氨基 - 酸序列如下 :

[0437] SEQ ID NO:8

[0438] >gi|41469452|gb|AAS07253.1| 推定的 UDP- 葡萄糖醛酸基和 UDP- 葡萄糖基转移酶 [ 粳稻 (*Oryza sativa Japonica*) 组 ] EUGT11 酶,来自专利申请 W0/2013/022989A2

[0439] MHVVICPLLAFGHLLPCLDLAQLRACGHRVSFVSTPRNISRLLPVRPSLAPLVSFVALPLPRVEGLP  
 NGAESTHNVPHDRPDMVELHLRAFDGLAAPPSEFLGTACADWVMPSTSSAPRQTLSSNIHRNSSRPGTPAPSGRLL  
 CPITPHSNTLERAEEKLVRSRQNRARSLLAFTSPPLPYRDVFRSLLGLQMGRKQLNIAHETNGRRTGTLPLNL  
 CRWMMWQRRCGKLRPDVEFNTSRSNEAISPIGASLVNLQSIQSPNPRAVLPIASSGVRAVFIGRARTSTPTPPH  
 AKPARSAAPRAHRPPSSVMDSGYSSSYAAAAGMHVVICPWLAFGHLLPCLDLAQLRACGHRVSFVSTPRNISRLL  
 PVRPALAPLVAFVALPLPRVEGLPDGAESTNDVPHDRPDMVELHRRAFDGLAAPPSEFLGTACADWVIVDFVHH  
 WAAAALEHKVPCAMMLLGSAHMIASADRRLERAETESPAAAGQGRPAAAPTFEVARMKLI RTKGSSGMSLAER

FSLTLSRSSLVVGRCSEFEPETVPLLSTLRGKPIITFLGLMPPLHEGRREDGEDATVRWLDAQPAKSVVYVALGS  
 EVPLGVEKVHELALGLELAGTRFLWALRKPTGVSADLLPAGFEERTRGRGVVATRWVPQMSILAAHAAVGAFLTH  
 CGWNSTIEGLMFGHPLIMLPIFGDQGPNARLIEAKNAGLQVARNDGDGSDREGVAAAIRAVAVEEESKVFQAK  
 AKKLQEIVADMACHERYIDGFIQQLRSYKD

[0440] 在微孔板中接收测试的质粒,在分离的孔中含有质粒作为冷冻干燥的固体。

[0441] 质粒的悬浮液。向孔添加 24  $\mu\text{L}$  的超纯无菌水,和微孔板于室温振摇 30 分钟。随后,将板于 4 $^{\circ}\text{C}$  温育 1 小时。孔的内容物还通过抽吸移液混合。质粒定量由 Qubit2.0 分析,使用 1  $\mu\text{L}$  的悬浮液实施。如下测定质粒量:

[0442]

微孔板	位置	测试的内部参照	[质粒]ng/ $\mu\text{L}$
C912666	G4	S115N08G4	19.2

[0443] 用质粒转化感受态细胞。从 -80 $^{\circ}\text{C}$  冷冻器获取化学感受态 EC100 细胞的等份,及存储在冰上。使细胞在冰上解冻 10 分钟。将 10  $\mu\text{L}$  的以上描述的质粒溶液的稀释物加入 1.5mL 的无菌微型管(为了用 50pg 的 DNA 转化各细胞),及存储在冰上。将 100  $\mu\text{L}$  的化学感受态细胞加入微型管。在将化学感受态细胞/质粒混合物在冰上温育 20min 之后,于 42 $^{\circ}\text{C}$  实施 30s 热休克。

[0444] 还在冰上实施 2 分钟温育。向微型管添加 300  $\mu\text{L}$  的 SOC 培养基,及将得到的混合物转移到无菌 15mL 管。在以 135rpm 振摇着于 37 $^{\circ}\text{C}$  温育 1 小时之后,将混合物铺到含有卡那霉素 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的固体 Luria 肉汤培养基上。将平皿于 37 $^{\circ}\text{C}$  温育 16 小时。

[0445] 甘油中浓储物溶液的制备和质粒的纯化。向 50mL 无菌 Falcon 管添加 10mL 的含有 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的卡那霉素的 Luria 肉汤培养基。培养基用自以上描述的平皿分离的集落接种,和使培养物以 135rpm 振摇着于 37 $^{\circ}\text{C}$  温育 16 小时。

[0446] 向 1.5mL 的含有 300  $\mu\text{L}$  的 60% 无菌甘油溶液的无菌微型管添加 600  $\mu\text{L}$  的培养物。浓储物溶液存储于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0447] 余部的培养物以 5,525g 于 10 $^{\circ}\text{C}$  离心 10 分钟,及在移出上清液之后,沉淀存储在冰上。产生的质粒根据 Qiagen Qiaprep Spin Miniprep 试剂盒 (ref:27106) 纯化,和在 260nm 处测量质粒产率。质粒溶液存储于 4 $^{\circ}\text{C}$ 。如下测定质粒量:

[0448]

微孔板	位置	测试的内部参照	[质粒]ng/ $\mu\text{L}$
C912666	G4	S115N08G4	38.4

[0449] EUGT11 的体外表达。将 18  $\mu\text{L}$  的稀释的质粒溶液(含有大致 1.5  $\mu\text{g}$  的质粒)用于根据 Promega S30T7 高-产率蛋白表达系统 (ref:L1110) 试剂盒体外表达。表达培养基如下产生:

[0450]

	S30 预混合物加	T7S30 提取物	DNA 模板	总

试验	30 μL	27 μL	18 μL (~ 1.5 μg)	75 μL
参照	20 μL	18 μL	12 μL (~ 1.0 μg)	50 μL

[0451] 将制备的表达培养基混合物加入质粒溶液,和每 45 分钟混合混合物着使溶液于 30°C 温育 3 小时。冷冻 5 μL 的混合物,然而余部用于莱苞迪昔 A 向莱苞迪昔 D 的转变的催化性测试。

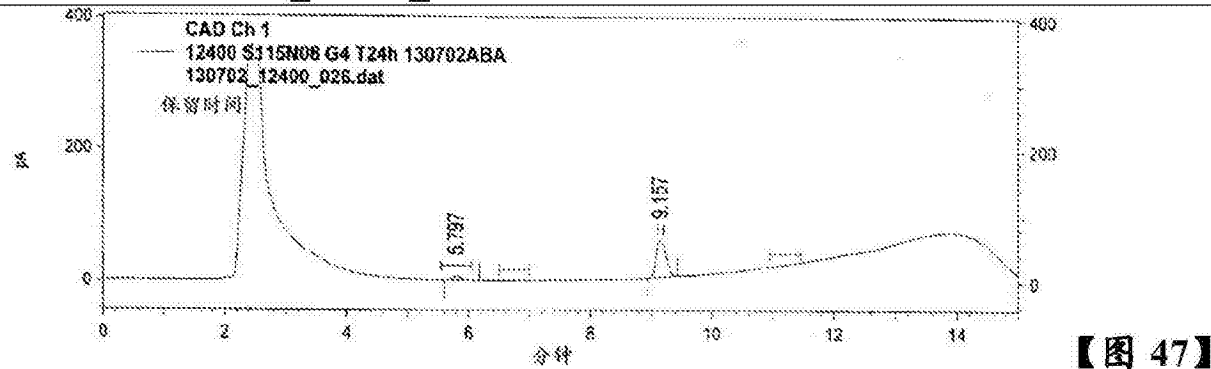
[0452] 对于莱苞迪昔 A 向莱苞迪昔 D 的转化的催化性测试。将 430 μL 的含有 0.5mM 莱苞迪昔 A, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 50mM 磷酸缓冲液 (pH7.2) 和 2.5mM UDP- 葡萄糖的反应混合物添加到 1.5mL 无菌微型管。添加 52 μL 的酶表达培养基,及使得到的混合物于 30°C 反应 24 小时。在 2 小时, 16 小时和 24 小时之后取 125 μL 样品,及添加到 115 μL 的 60% 甲醇和 10 μL 的 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。将骤冷的样品于室温以 18,000g 离心 2 分钟。将 200 μL 转移到 HPLC 管形瓶,及分析,如见于图 47。

[0453] HPLC 分析. HPLC 测定如在实施例 20 中描述实施。

[0454] 以下提供 HPLC 测定结果 :

[0455]

**样品: 12400 S115N08G4 T24h 130702CJA**  
**>gi|41469452|gb|AAS07253.1|推定的 UDP-葡萄糖醛酸基和 UDP-葡萄糖基转移酶 [ 稷稻 (*Oryza sativa Japonica*) 组 ] (EUGT11 酶, 来自专利申请 WO/2013/022989A2)**  
**文件名: 130702\_12400\_026.dat**



**【图 47】**

CAD Ch 1 结果		
化合物	保留时间	整合(区)
莱苞迪昔 D	5.797	54,654,810
莱苞迪昔 A	9.157	633,926,835
总		688,581,645

[0456] 【实施例 22 :酶的体内产生】

[0457] 体内产生实施例 20 中描述的酶。

[0458] 在大肠埃希氏菌 (*E. coli*) BL21 (DE3) 中由热休克导入含有对应于酶的基因的 pET30A+ 载体。获得的细胞在平皿中,在卡那霉素的存在下生长,选择适合的集落,使生长在液体 LB 培养基 (锥形瓶) 中。将甘油加入悬浮液作为冷冻保护剂,及 400 μL 等份存储

于  $-20^{\circ}\text{C}$  和于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。

[0459] 将含有 pET30A+\_UGT 质粒的大肠埃希氏菌 (*E. coli*)BL21 (DE3) 的存储等份解冻, 及添加到 30mL 的 LBGKP 培养基 (20g/L Luria 肉汤 Lennox ;50mM PIPES 缓冲剂 pH7.00 ;50mM 磷酸缓冲液 pH7.00 ;2.5g/L 葡萄糖和 50mg/L 的卡那霉素)。使此培养物于  $30^{\circ}\text{C}$  以 135rpm 振摇 8hrs。

[0460] 生产培养基含有 60g/L 的过夜表达立即 TB 培养基 (Novagen), 10g/L 的甘油和 50mg/L 的卡那霉素。将预培养物添加到 400mL 的此培养基, 和溶液取样品的同时于  $20^{\circ}\text{C}$  搅拌, 以测量 OD 和 pH。培养物显著生长和获得良好 OD。在 40hrs 之后, 将细胞通过离心收获, 及冷冻。以下提及细胞湿重 (CWW) 的以下产率。

[0461]

GI 号	版本	CWW
115454819	NP_001051010.1	9.2g
187373030	ACD03249.1	7.4g
460409128	XP_004249992.1	6.8g
222619587	EEE55719.1	7.5g
297795735	XP_002865752.1	8.8g

[0462] 通过添加 Bugbuster Master 混合物 (Novagen) 实施裂解, 并将裂解物通过离心回收, 及新鲜使用。

[0463] 活性的确定。以 5mL 规模, 用  $1,000\ \mu\text{L}$  的用于转化莱苞迪昔 A 的解冻的裂解物, 使用 0.5mM 的底物, 2.5mM 的 UDP- 葡萄糖和 3mM  $\text{MgCl}_2$ , 在 pH7.2 的 50mM 磷酸钠缓冲液中实施活性测试。取样品, 及由 HPLC 分析, 如见于图 48 ~ 52。

[0464] HPLC 分析. HPLC 测定如在实施例 20 中描述实施。

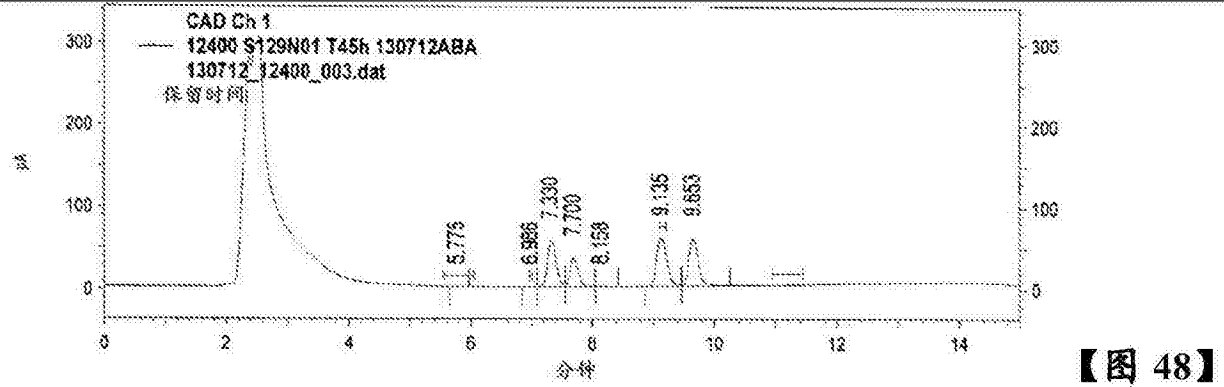
[0465] 以下提供不同酶的结果。

[0466]

GI 号	版本	45hrs 后的转变	Reb D 选择性
115454819	NP_001051010.1	1.1%	100%
187373030	ACD03249.1	0.8%	100%
460409128	XP_004249992.1	62.1%	43.6%
222619587	EEE55719.1	2.9%	Reb D 检测不到
297795735	XP_002865752.1	0.0%	Reb D 检测不到

[0467]

样品: 12400 S129N01 T45h 130712ABA  
 > gi115454819/NP\_001051010.1  
 文件名: 130712\_12400\_003.dat

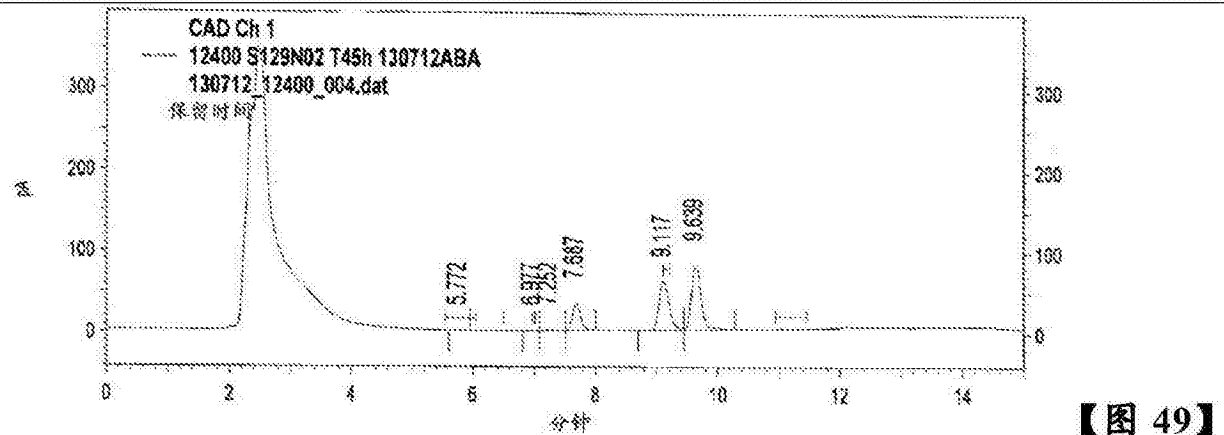


【图 48】

CAD Ch 1 结果		
化合物	保留时间	整合(区)
莱芭迪昔 D	5.775	3,264,475
未知的@RT6.986	6.986	4,110,607
未知的@RT7.330	7.330	564,033,104
未知的@RT7.700	7.700	328,710,539
未知的@RT8.158	8.158	6,344,796
莱芭迪昔 A	9.135	673,271,863
未知的@RT9.653	9.653	616,489,141
总		2,196,224,525

[0468]

样品: 12400 S129N02 T45h 130712ABA  
 > gi187373030/ACD03249.1  
 文件名: 130712\_12400\_004.dat



【图 49】

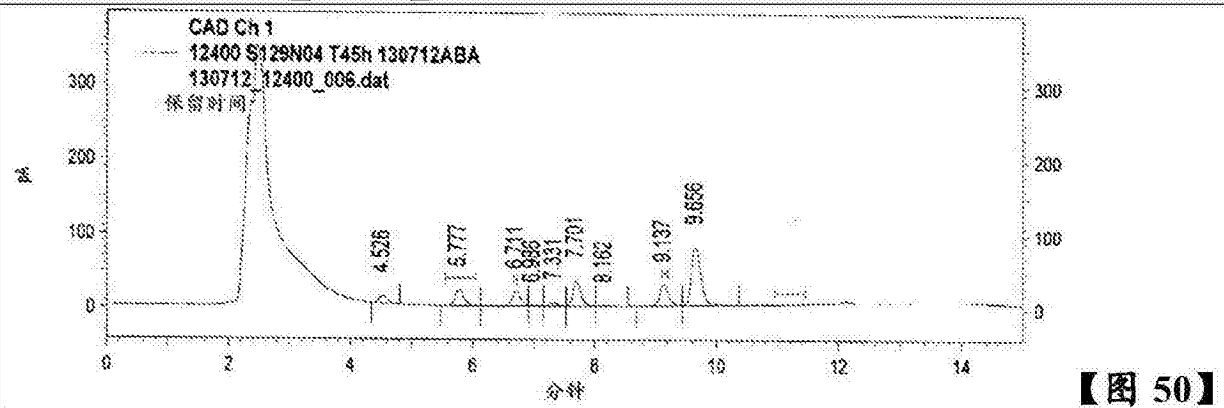
CAD Ch 1 结果		
-------------	--	--

[0469]

化合物	保留时间	整合(区)
莱芭迪昔 D	5.772	1,997,401
未知的@RT6.977	6.977	3,341,419
未知的@RT7.252	7.252	10,576,676
未知的@RT7.687	7.687	298,862,034
莱芭迪昔 A	9.117	675,210,845
未知的@RT9.639	9.639	874,680,345
总		1,864,668,720

[0470]

样品: 12400 S129N04 T45h 130712ABA  
 > gi460409128/XP\_004249992.1  
 文件名: 130712\_12400\_006.dat

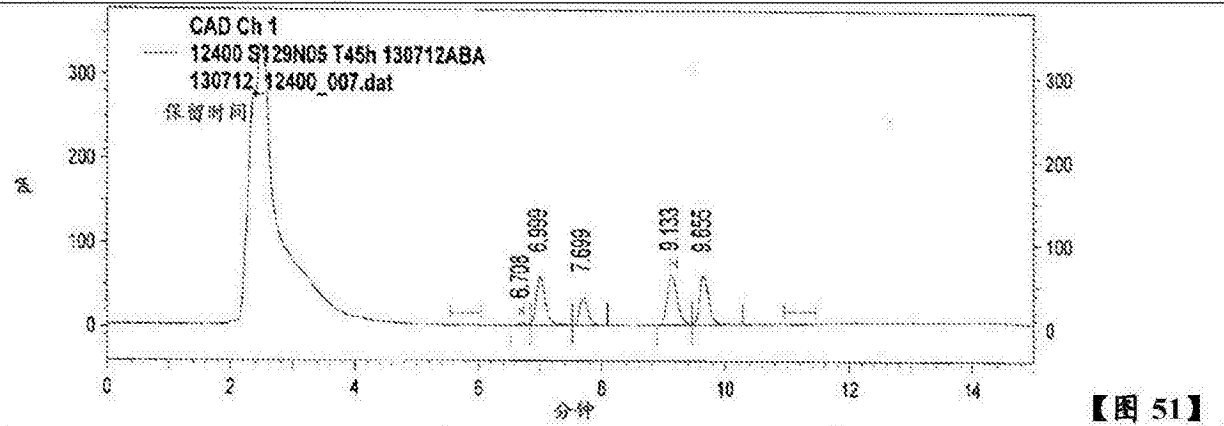


【图 50】

CAD Ch 1 结果		
化合物	保留时间	整合(区)
未知的@RT4.526	4.526	89,809,997
莱芭迪昔 D	5.777	217,830,913
莱芭迪昔 UNK	6.711	192,129,243
未知的@RT6.986	6.986	10,241,417
未知的@RT7.331	7.331	41,195,765
未知的@RT7.701	7.701	310,640,254
未知的@RT8.162	8.162	7,950,609
莱芭迪昔 A	9.137	304,611,760
未知的@RT9.656	9.656	863,496,704
总		2,037,906,662

[0471]

样品: 12400 S129N05 T45h 130712ABA  
 > gi222619587/EEE55719.1  
 文件名: 130712\_12400\_007.dat

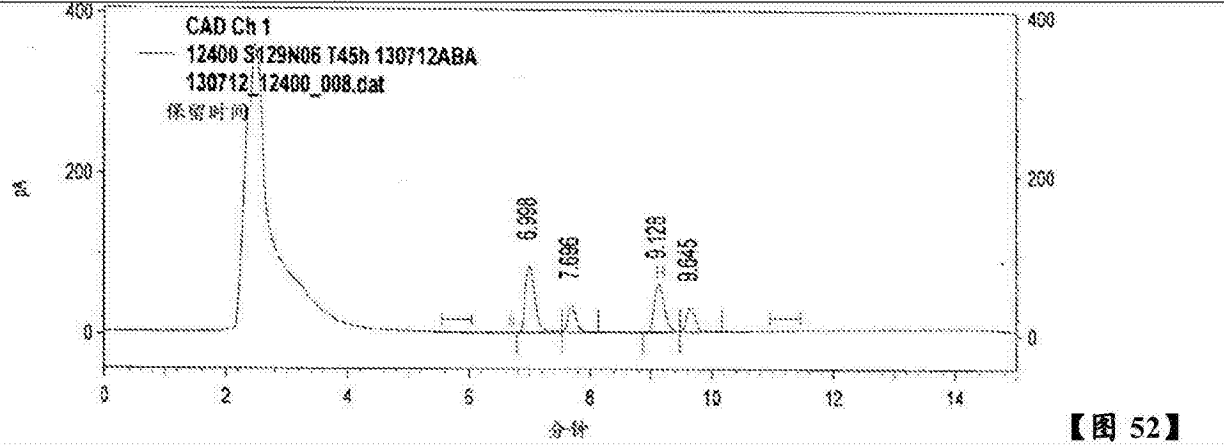


【图 51】

CAD Ch 1 结果		
化合物	保留时间	整合(区)
莱芭迪昔 UNK	6.708	20,047,847
未知的@RT6.999	6.999	598,924,958
未知的@RT7.699	7.699	303,182,042
莱芭迪昔 A	9.133	672,777,773
未知的@RT9.655	9.655	606,371,969
总		2,201,304,589

[0472]

样品: 12400 S129N06 T45h 130712ABA  
 > gi297795735/XP\_002865752.1  
 文件名: 130712\_12400\_008.dat



【图 52】

CAD Ch 1 结果		
化合物	保留时间	整合(区)
未知的@RT6.998	6.998	920,620,332
未知的@RT7.696	7.696	314,421,575
莱芭迪昔 A	9.128	688,195,594
未知的@RT9.645	9.645	308,115,680
总		2,231,353,181

[0473] 【实施例 23:糖苷的鉴定】

[0474] 将表示 GI No. 460409128 的反应混合物,特别是实施例 20 的样品“12400 S115N05A7 T24h 130627ABA”(下文 S115N05A7),及实施例 22 的样品“12400 S129N04 T45h 130712ABA”(下文 S129N04) 由 LC-MS 另外地检定,以鉴定未知的糖苷。使用 Agilent 1200 系列 HPLC 系统,其装备双泵 (G1312B),自动采样器 (G1367D),恒温柱隔室 (G1316B),DAD 检测器 (G1315C),与 Agilent 6110A MSD 连接,及与“LC/MSD Chemstation”软件接入。

[0475] 仪器条件

[0476]

柱	Phenomenex Kinetex 2.6u C18 100A , 4.6mm x 150mm, 2.6μm
柱温度	55°C
检测	DAD 在 210nm 处 bw 360nm MSD (Scan 和 SIM 模式) 模式: ES-API, 负极性 干燥气流: 13.0L/min 雾化器压力: 30 psig 干燥气体温度: 270°C
分析持续时间	25min
注射的体积	2μL
流速	1mL/min

[0477] 移动相梯度程序

[0478]

时间 (min)	A(%) :甲酸 0.1%	B(%) :乙腈
0	75	25
8.5	75	25
10.0	71	29
16.5	70	30

[0479] 在 LCMS 系统上在 3.5min 观察到的化合物对应于样品“S115N05A7”中的化合物“未知的 @4.508”(实施例 20),及样品“S129N04”中的化合物“未知的 @RT4.526”(实施例 22)。LCMS 数据提示,此化合物在其结构中具有 6 个糖苷残基 ( $C_{56}H_{90}O_{33}$ ),及被发现是 reb M 的异构体形式,即 reb M2(见实施例 40 讨论)。

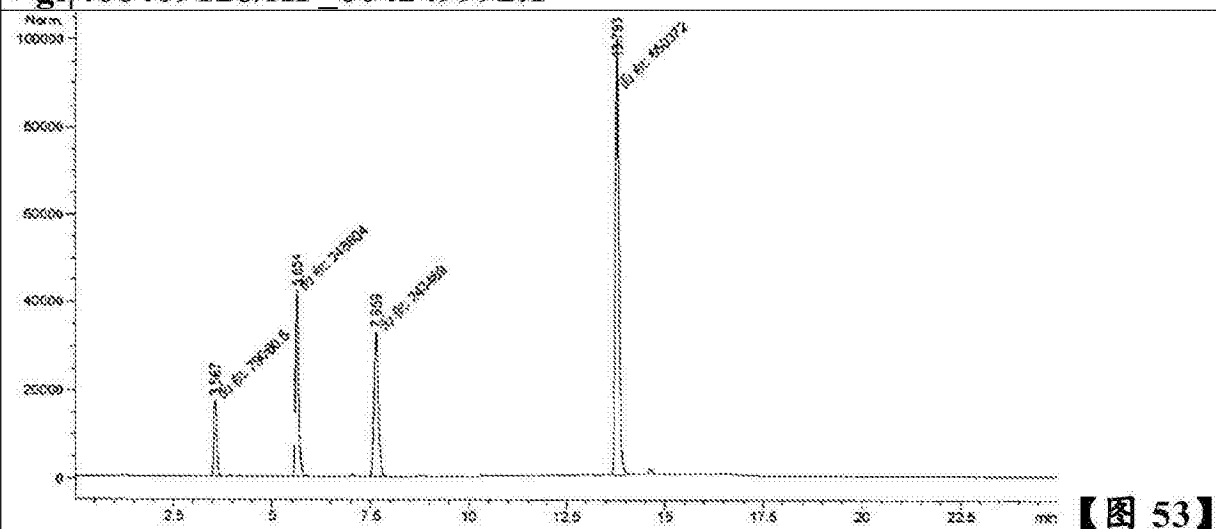
[0480] 然而在 LCMS 系统上,在 7.6min 观察到的化合物,对应于样品“S115N05A7”中的化合物“reb UNK”(实施例 20),及样品“S129N04”中的化合物“reb UNK”(实施例 22),LCMS 数据提示,“reb UNK”在其结构中具有 5 个糖苷残基 ( $C_{50}H_{80}O_{28}$ ),及发现是 reb D 的异构体形式,即 reb D2(见实施例 39 讨论)。以下提供这些化合物的比和 LCMS 层析谱,及显示于图 53 ~ 54。

[0481]

样品	在反应混合物中甜叶菊醇糖苷转变 (%面积)			
	未知的@RT3.5	Reb <i>D</i>	Reb <i>UNK</i>	Reb <i>A</i>
S115N05A7	6.47	20.35	19.93	53.24
S129N04	6.05	23.73	21.22	49.00

[0482]

样品: 12400 S115N05A7 T24h 130627ABA  
>gi|460409128/XP\_004249992.1



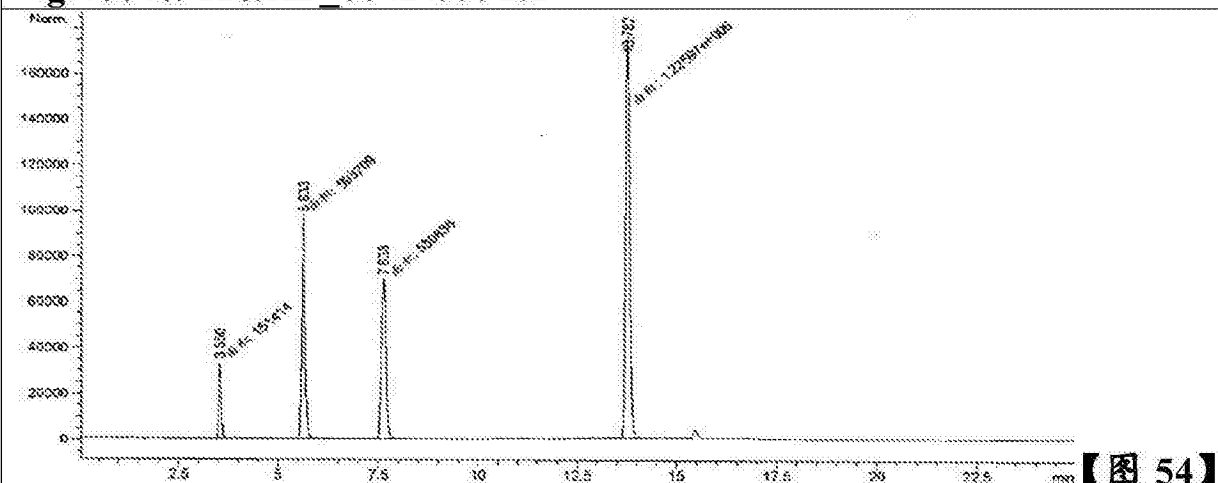
【图 53】

MSD SIM 结果			
化合物	保留时间	MW	整合(区)
未知的@RT3.567	3.567	1,291	79,060
莱芭迪昔 <i>D</i>	5.654	1,129	248,604
莱芭迪昔 <i>UNK</i>	7.659	1,129	243,469
莱芭迪昔 <i>A</i>	13.793	967	650,372
总			1,221,505

[0483]

样品: 12400 S129N04 T45h 130712ABA

> gi460409128/XP\_004249992.1



【图 54】

MSD SIM 结果			
化合物	保留时间	MW	整合(区)
未知的@RT3.550	3.550	1,291	151,414
莱芭迪昔 D	5.633	1,129	593,709
莱芭迪昔 UNK	7.638	1,129	530,836
莱芭迪昔 A	13.782	967	1,225,970
总			2,501,929

[0484] 【实施例 24:糖苷的鉴定】

[0485] 将表示 GI No. 460409128 的反应混合物,特别是实施例 22 的样品“12400S129N04T45h 130712ABA”(下文 S129N04)由 LC-MS 另外地检定,如见于图 55~56, 随由 PureCircle Sdn Bhd(马来西亚)产生的甜叶菊(*Stevia rebaudiana* Bertoni)叶提取物“MLD1”,以确定 S129N04 糖苷的天然发生。

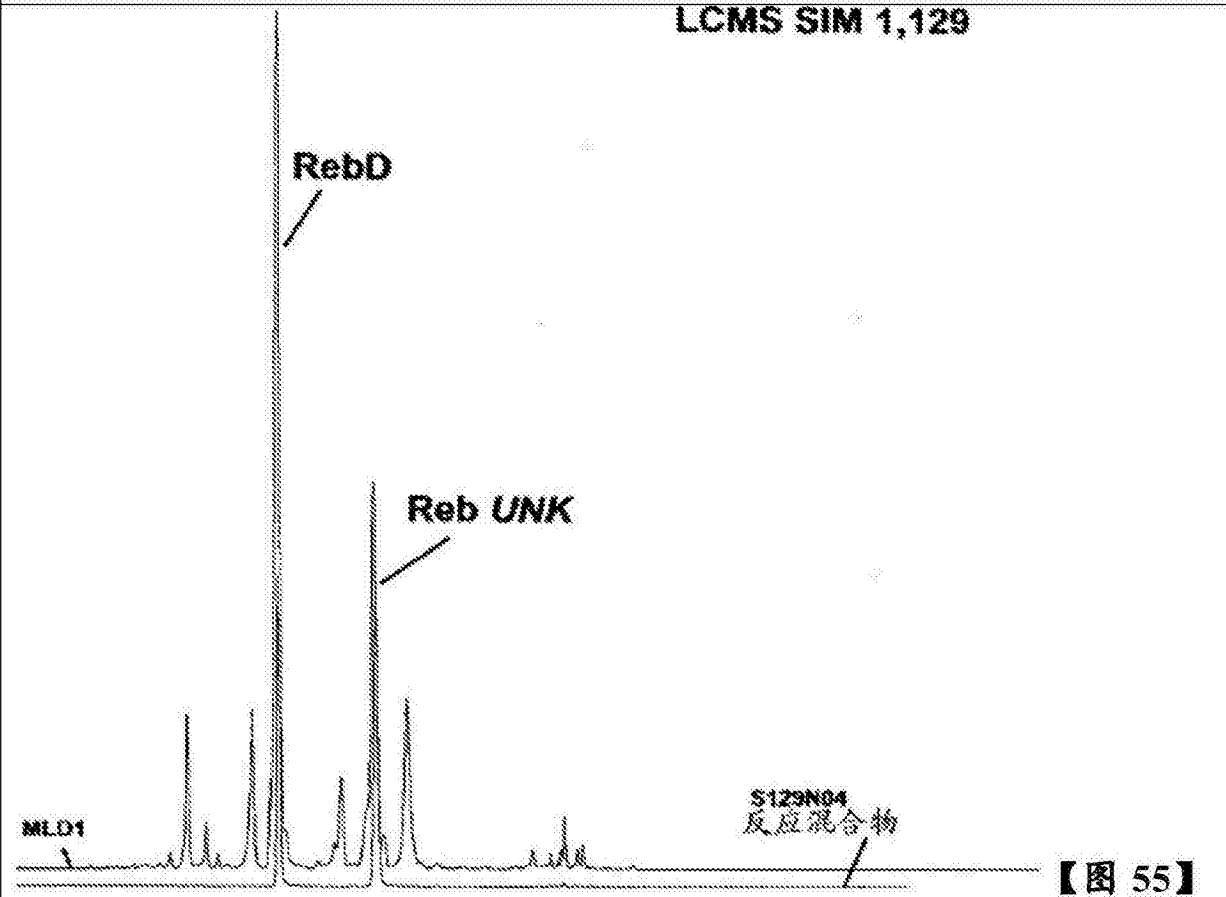
[0486]

样品:

(1) 12400 S129N04 T45h 130712ABA

> gi460409128/XP\_004249992.1

(2) MLD1 甜叶菊 (*Stevia rebaudiana* Bertoni) 提取物



MSD SIM 1,129 结果	
化合物	MW
莱菔迪昔 D	1,129
莱菔迪昔 UNK	1,129

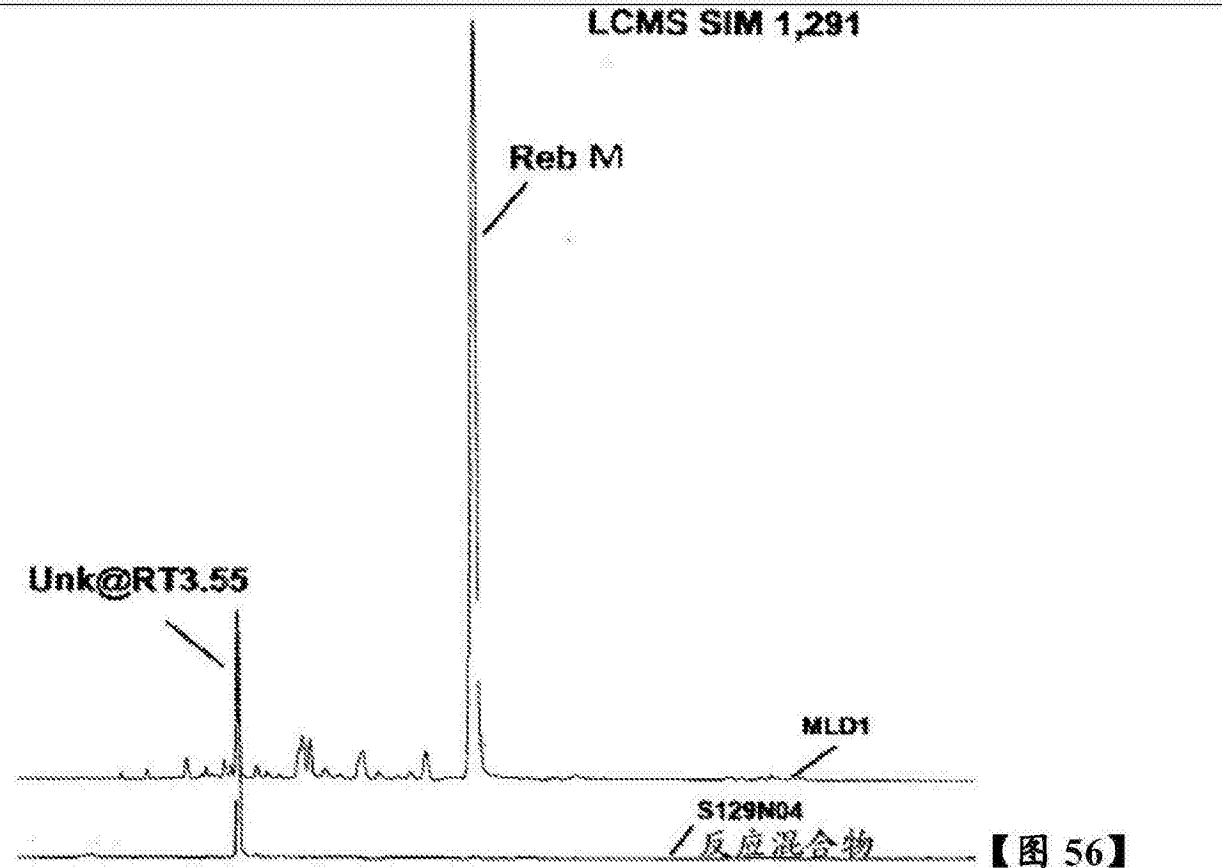
[0487]

样品:

(1) 12400 S129N04 T45h 130712ABA

> gi460409128/XP\_004249992.1

(2) MLD1 甜叶菊 (*Stevia rebaudiana* Bertoni) 提取物



MSD SIM 1,291 结果

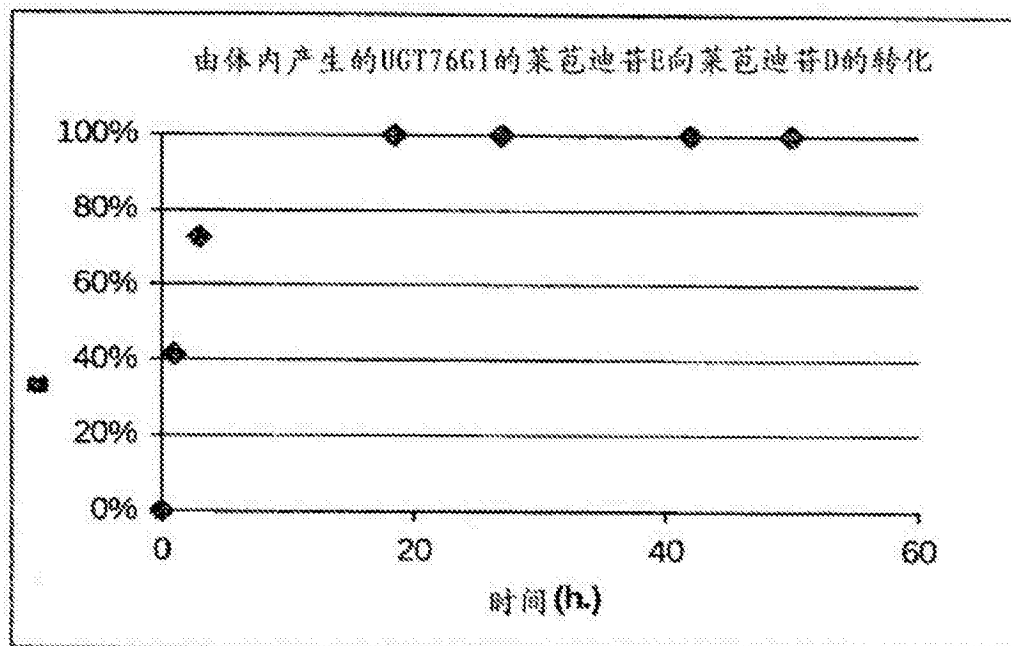
化合物	MW
未知的@RT3.550	1,291
莱苞迪昔 M	1,291

[0488] 测定显示,在实施例 23 中在 LCMS 系统上在 3.5min 观察到的化合物 ( $C_{56}H_{90}O_{33}$ ; 随后确认为 reb M2), 及在实施例 23 中在 LCMS 系统上在 7.6min 观察到的化合物, ( $C_{50}H_{80}O_{28}$ ; reb UNK; 随后确认为 reb D2) 存在于甜叶菊 (*Stevia rebaudiana* Bertoni) 植物的提取物中。

[0489] 【实施例 25: 莱苞迪昔 E 向莱苞迪昔 D 的转变】

[0490] 反应总体积是 5.0mL, 含以下组成: 100mM 磷酸钾缓冲液 pH7.5, 3mM  $MgCl_2$ , 2.5mM UDP-葡萄糖, 0.5mM 莱苞迪昔 E 和 500  $\mu$ L 的 UGT76G1 解冻的裂解物 (在 pET30a+ 载体中克隆 UGT76G1 基因, 及在大肠埃希氏菌 (*E. coli*) BL21 (DE3) 中表达)。反应于 30 $^{\circ}C$ , 在轨道摇床上, 以 135rpm 运行。为采样, 300  $\mu$ L 的反应混合物用 30  $\mu$ L 的 2N  $H_2SO_4$  和 270  $\mu$ L 的甲醇/水 (6/4) 骤冷。样品立即离心, 及在由 HPLC (CAD 检测) 分析之前于 10 $^{\circ}C$  保持。获得对应于莱苞迪昔 E 向莱苞迪昔 D 的完全转变的以下反应特征, 如见于图 57。

[0491]



【图 57】

[0492] 【实施例 26 :为菜苞迪昔 D 向菜苞迪昔 M 的转变的 UGT76G1 的定向衍化】

[0493] 起始于如描述于 Genbank (AAR06912. 1) 的 UGT76G1 的氨基酸序列, 鉴定可改变用于菜苞迪昔 D (Reb D) 向菜苞迪昔 M (Reb M) 转化的酶的活性的在各种氨基酸位置的不同突变。随后使用由 DNA2.0ProteinGPS™策略设计的此突变的列表合成含有为在大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 中表达密码子 - 优化的这些突变中的 3, 4 或 5 个的 96 个变体基因。基因在 pET30a+ 质粒中亚克隆, 及用于转化大肠埃希氏菌 (*E. coli*) BL21 (DE3) 化学感受态细胞。获得的细胞在培替 - 皿中在固体 LB 培养基上在卡那霉素的存在下生长。选择适合的集落, 使在管中的液体 LB 培养基中生长。将甘油加入悬浮液作为冷冻保护剂, 和 400  $\mu$ L 等份存储于  $-20^{\circ}\text{C}$  和于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。

[0494] 将含有 pET30a+\_UGT76G1var 质粒的大肠埃希氏菌 (*E. coli*) BL21 (DE3) 的这些存储等份解冻, 及添加到 LBGP 培养基 (20g/L Luria 肉汤 Lennox ; 50mM PIPES 缓冲剂 pH7.00 ; 50mM 磷酸缓冲液 pH7.00 ; 2.5g/L 葡萄糖和 50mg/L 的卡那霉素)。将此培养物在 96 微孔板中以 135rpm 于  $30^{\circ}\text{C}$  振摇 8h。

[0495] 3.95mL 的含有 60g/L 的过夜 Express™立即 TB 培养基 (Novagen®), 10g/L 的甘油和 50mg/L 的卡那霉素的生产培养基用 50  $\mu$ L 的以上描述的培养物接种。在 48 深孔板中, 将得到的培养于  $20^{\circ}\text{C}$  搅拌。培养物显著生长, 和获得良好 OD (600nm ; 1cm)。在 44h 之后, 将细胞通过离心收获, 及冷冻。

[0496] 通过向解冻的细胞添加 Bugbuster® Master 混合物 (Novagen®) 来实施裂解, 和通过离心回收裂解物。用 100  $\mu$ L 的加入在 50mM 磷酸缓冲液 pH7.2 中菜苞迪昔 D (终浓度 0.5mM),  $\text{MgCl}_2$  (终浓度 3mM) 和 UDP- 葡萄糖 (终浓度 2.5mM) 的溶液的新鲜裂解物实施活性测试。

[0497] 使反应于  $30^{\circ}\text{C}$  运行, 和在 2, 4, 7 和 24h 之后取样品, 以由 HPLC (CAD 检测), 使用以上为菜苞迪昔 D 向菜苞迪昔 M 的转化描述的分析方法测定转变和初速度。结果示于以下表。

[0498]

克隆	突变*	在 24h 后 Reb D 向 Reb M 转变(%)	初速度(Reb M 面积/min)
UGT76G1var1	E224A_F314S_R334K	51.8	5.5E+07
UGT76G1var2	S274G_T284I_L379G	49.3	4.7E+07
UGT76G1var3	I295T_S357C_V366I	9.6	1.6E+06
UGT76G1var4	E224D_E231A_F265I	14.7	8.6E+06
UGT76G1var5	F22Y_I373L_P382M	3.5	2.3E+06
UGT76G1var6	Q266S_S357N_I373L	0.5	1.8E+06
UGT76G1var7	F22L_I43V_A239V	0.2	-6.0E+04
UGT76G1var8	E224A_Q266S_Q342E	0.5	2.3E+04
UGT76G1var9	E231A_D301N_G348P	52.0	4.9E+07
UGT76G1var10	A33G_L246F_Q342E	0.3	-7.7E+02
UGT76G1var11	F22L_A33G_V310I	0.4	3.8E+04
UGT76G1var12	L243P_K303G_A352G	0.5	8.7E+04
UGT76G1var13	L243A_S357C_A385T	0.2	-3.3E+04
UGT76G1var14	A239I_F265I_V396F	5.3	1.5E+06
UGT76G1var15	F41L_L246F_Q425E	5.6	1.5E+06
UGT76G1var16	F265I_P272A_I335V	18.6	5.8E+06
UGT76G1var17	F265L_Q266E_Q342K	0.7	7.2E+05

[0499]

克隆	突变*	在 24h 后 Reb D 向 Reb M 转变(%)	初速度(Reb M 面积/min)
UGT76G1var18	L243P_S274G_N409R	1.9	5.0E+05
UGT76G1var19	E224D_E229A_Q432E	10.5	5.5E+06
UGT76G1var20	S375M_K393G_Y397E	1.8	1.9E+06
UGT76G1var21	A239V_V300A_K303G	41.9	3.3E+07
UGT76G1var22	E231A_V310I_R334K	34.4	2.4E+07
UGT76G1var23	T263S_G348P_A352G	47.8	4.1E+07
UGT76G1var24	A239I_P272A_Q425E	31.0	2.1E+07
UGT76G1var25	T284L_Q342K_Y397Q	0.9	6.3E+04
UGT76G1var26	S241I_F265L_F377C	1.8	7.5E+05
UGT76G1var27	A239I_L379A_V394I	29.0	1.5E+07
UGT76G1var28	L243A_S274G_P382M	6.1	2.4E+06
UGT76G1var29	F22Y_V279I_N409R	41.0	2.9E+07
UGT76G1var30	I43V_E224A_S241I	13.6	5.6E+06
UGT76G1var31	E224D_L243P_V300A	0.4	2.4E+05
UGT76G1var32	A239V_L243A_S375M	0.0	-4.4E+04
UGT76G1var33	A33G_R334H_Y397Q	1.0	7.5E+06
UGT76G1var34	I43V_T284I_I295T	3.4	1.5E+06
UGT76G1var35	T284L_F314S_S357N	0.5	1.8E+05
UGT76G1var36	F265L_L379A_V396F	20.0	8.8E+06
UGT76G1var37	E229A_L379G_I407V	39.1	2.8E+07
UGT76G1var38	F41L_I295M_F377C	8.2	3.7E+06
UGT76G1var39	F22Y_F41L_V366I	7.2	3.3E+06
UGT76G1var40	T263S_Q266E_S375R	47.6	3.3E+07
UGT76G1var41	L246F_A385T_K393G	0.8	1.4E+06
UGT76G1var42	T263S_Q266S_R334H	34.6	2.2E+07
UGT76G1var43	S241I_P272A_V279I	19.9	9.4E+06
UGT76G1var44	I335V_S375R_I407V	35.3	2.3E+07
UGT76G1var45	V279I_D301N_S389E	38.6	2.3E+07
UGT76G1var46	F22L_Q266E_I295M	0.6	9.8E+05
UGT76G1var47	E229A_T284I_S389E	4.8	2.7E+06
UGT76G1var48	V394I_Y397E_Q432E	47.6	3.8E+07
UGT76G1var49	F41L_Q266E_T284I_Y397Q	2.6	1.1E+06
UGT76G1var50	F22Y_V310I_S375M_F377C	1.9	7.9E+05
UGT76G1var51	K303G_S357C_S389E_V396F	18.7	9.5E+06
UGT76G1var52	D301N_I373L_F377C_I407V	12.9	4.6E+06
UGT76G1var53	R334K_A352G_P382M_S389E	9.3	4.1E+06
UGT76G1var54	E229A_T284L_R334K_Q342E	0.7	4.3E+05
UGT76G1var55	I295M_Q342E_V366I_N409R	1.0	2.2E+05
UGT76G1var56	L246F_A352G_S357N_Q432E	0.4	4.1E+04
UGT76G1var57	S241I_T263S_L379G_A385T	0.8	1.5E+05
UGT76G1var58	S357C_S375M_N409R_Q425E	7.5	2.2E+06
UGT76G1var59	I335V_K393G_V394I_Y397Q	33.0	2.7E+07
UGT76G1var60	E231A_L243A_V279I_S357N	0.5	9.5E+04
UGT76G1var61	I43V_F265I_Q266S_L379A	6.4	2.0E+06
UGT76G1var62	L243P_P272A_V394I_V396F	0.1	3.4E+04
UGT76G1var63	F314S_R334H_Q342K_L379G	3.4	1.2E+06
UGT76G1var64	F22L_A239I_R334H_I407V	0.3	3.1E+04
UGT76G1var65	A33G_A239V_P382M_Q425E	1.2	3.3E+05

[0500]

克隆	突变*	在 24h 后 Reb D 向 Reb M 转变(%)	初速度(Reb M 面积/min)
UGT76G1var66	F265L V310I V366I A385T	0.8	3.7E+05
UGT76G1var67	E224D F314S S375R Y397E	-2.1	-5.6E+05
UGT76G1var68	Q342K G348P I373L Y397E	-1.4	-1.1E+05
UGT76G1var69	S274G I295T I335V L379A	24.7	8.3E+06
UGT76G1var70	E224A I295T V300A G348P	24.0	8.4E+06
UGT76G1var71	I295M V300A K393G Q432E	42.9	2.1E+07
UGT76G1var72	T284L D301N K303G S375R	19.2	9.1E+06
UGT76G1var73	F22Y D301N R334H Q342E V396F	0.8	8.7E+05
UGT76G1var74	I295T I373L S375R Y397Q Q432E	0.6	9.6E+04
UGT76G1var75	F41L A239I Q266S S375M P382M	0.8	-1.3E+05
UGT76G1var76	F22Y A239I L246F I295M R334K	2.6	7.2E+05
UGT76G1var77	A239V F265I I295T D301N K393G	1.9	4.4E+05
UGT76G1var78	V279I V300A V310I I335V S357C	3.2	8.2E+05
UGT76G1var79	E224D T284I V366I I373L K393G	8.5	3.8E+06
UGT76G1var80	L243P L379A S389E Q425E Q432E	1.0	2.1E+05
UGT76G1var81	A33G T263S S274G V279I Y397E	15.0	6.5E+06
UGT76G1var82	E224D L243A F265L R334H A352G	1.1	2.5E+05
UGT76G1var83	I43V Q342E S357N S375R L379G	0.5	4.3E+04
UGT76G1var84	F22L Q266S F314S A352G S357C	1.2	2.3E+05
UGT76G1var85	T284L G348P F377C P382M N409R	1.8	4.0E+05
UGT76G1var86	E224A T284L V396F Y397E I407V	1.6	3.8E+05
UGT76G1var87	S241I L243A V300A F314S N409R	35.7	2.1E+07
UGT76G1var88	A239V T284I V310I Q342K L379A	1.6	3.8E+05
UGT76G1var89	F41L E229A E231A F265L P272A	1.2	2.1E+05
UGT76G1var90	E231A S241I S274G Y397Q Q425E	34.5	1.9E+07
UGT76G1var91	E224A L246F T263S F265I Q342K	1.2	2.3E+05
UGT76G1var92	K303G S357N V366I V394I I407V	1.6	3.6E+05
UGT76G1var93	I43V Q266E S375M S389E V394I	1.8	4.5E+05
UGT76G1var94	Q266E P272A R334K G348P L379G	72.0	7.9E+07
UGT76G1var95	A33G I295M K303G I335V A385T	-1.3	-1.7E+05
UGT76G1var96	F22L E229A L243P F377C A385T	1.2	2.7E+05

[0501] \* 突变被标识如下:原氨基酸-位置-新氨基酸:例如在第 33 位的丙氨酸向甘氨酸的突变被标识为 A33G。

[0502] 【实施例 27:UGTSL2 的体内产生】

[0503] SEQ ID NO:9

[0504] UGTSL2(GI\_460410132/XP\_004250485.1) 氨基酸序列:

[0505] MATNLRVLMFPWLAYGHISPFNLIAKQLADRGFLIYLCSTRINLESIKKIPEKYADSIHLIELQLPEL  
PELPPHYHTTNGLPPLNPTLHKALKMSKPNFSRILQNLKPDLLIYDVLQPWAEHVANEQNIPAGKLLTSCAAVFSY  
FFSFRKNPGVEFPFPAIHLPEVEKVKIREILAKEPEEGGRLDEGNKQMLMCTSRTIEAKYIDYCTELCNWVVPVG  
PPFQDLITNDADNKELIDWLGTKHENSTVFVSGSEYFLSKEDMEEVAFALSLNVNFIWVARFPKGEERNLEDALP  
KGFLERIGERGRVLDKFAPQPRILNHPSTGGFISHCGWNSAMESIDFGVPIIAMPINHNDQPINAKLMVELGVAVEIV  
RDDDGGKIHRGEIAETLKSIVTGETGEILRAKVREISKNLKSIRDEEMDAVAEELIQLCRNSNKS

[0506] 在大肠埃希氏菌(E. coli)B121(DE3)中由热休克导入含有UGTSL2基因的pET30A+载体。获得的细胞在陪替-皿中在卡那霉素的存在下生长,选择适合的集落,使生长在液体

LB 培养基（锥形瓶）中。将甘油加入悬浮液作为冷冻保护剂，及 400  $\mu$ L 等份存储于  $-20^{\circ}\text{C}$  和于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。

[0507] 将含有 pET30A+\_UGTSL2 质粒的大肠埃希氏菌 (*E. coli*)BL21 (DE3) 的存储等份解冻，及添加到 30mL 的 LBGKP 培养基 (20g/L Luria 肉汤 Lennox ;50mM PIPES 缓冲剂 pH7.00 ; 50mM 磷酸缓冲液 pH7.00 ;2.5g/L 葡萄糖和 50mg/L 的卡那霉素)。使此培养物以 135rpm 于  $30^{\circ}\text{C}$  振摇 8h。

[0508] 生产培养基含有 60g/L 的过夜表达立即 TB 培养基 (Novagen), 10g/L 的甘油和 50mg/L 的卡那霉素。将预培养物添加到 200mL 的此培养基, 和溶液取样品的同时于  $20^{\circ}\text{C}$  搅拌, 以测量 OD 和 pH。培养物显著生长和获得良好 OD。在 40h 之后, 将细胞通过离心收获, 及冷冻而获得 6.22g 的细胞湿重。

[0509] 对 1.4g 的细胞通过添加 Bugbuster Master 混合物 (Novagen) 实施裂解, 将裂解物通过离心回收, 及新鲜使用。

[0510] 【实施例 28 :用 UGTSL 和 UGTSL2 的甜叶菊苷向莱苞迪昔 E 转变的活性的确定】

[0511] UGTSL 根据实施例 22 制备, 及 UGTSL2 根据实施例 27 制备。

[0512] 以 3mL 规模, 用 600  $\mu$ L 的用于转化甜叶菊苷的裂解物, 使用 0.5mM 的底物, 2.5mM 的 UDP- 葡萄糖和 3mM  $\text{MgCl}_2$ , 在 pH7.2 的 50mM 磷酸钠缓冲液中实施活性测试。取样品, 及由 HPLC 分析。HPLC 分析如显示于图 58 ~ 59。如在实施例 20 中描述实施 HPLC 测定。

[0513] 以下提供不同酶和对应层析谱的结果

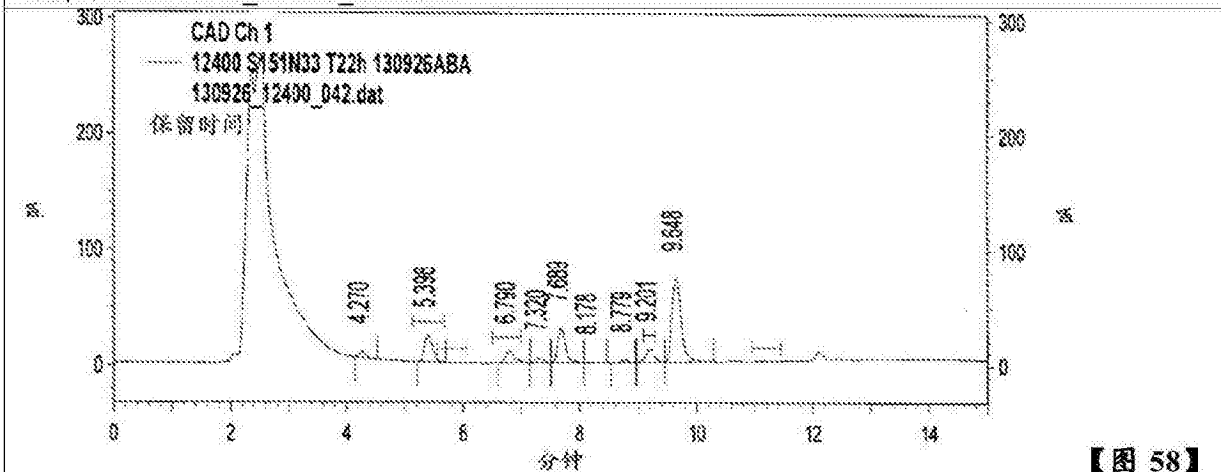
[0514]

酶内部参照	GI 号	版本	甜叶菊苷 conv. <sup>1</sup> (反应时间)	莱苞迪昔 E 形成 <sup>1</sup>
UGTSL	460409128	XP_004249992.1	74% (22h.)	46%
UGTSL2	460410132	XP_004250485.1	77% (2h.)	50%

[0515] 注 :<sup>1</sup>基于甜叶菊苷的初始浓度

[0516]

样品: 12400 S151N33 T22h 130926ABA  
 基因参照: UGTSL (XP\_004249992.1)  
 文件名: 130926\_12400\_042.dat

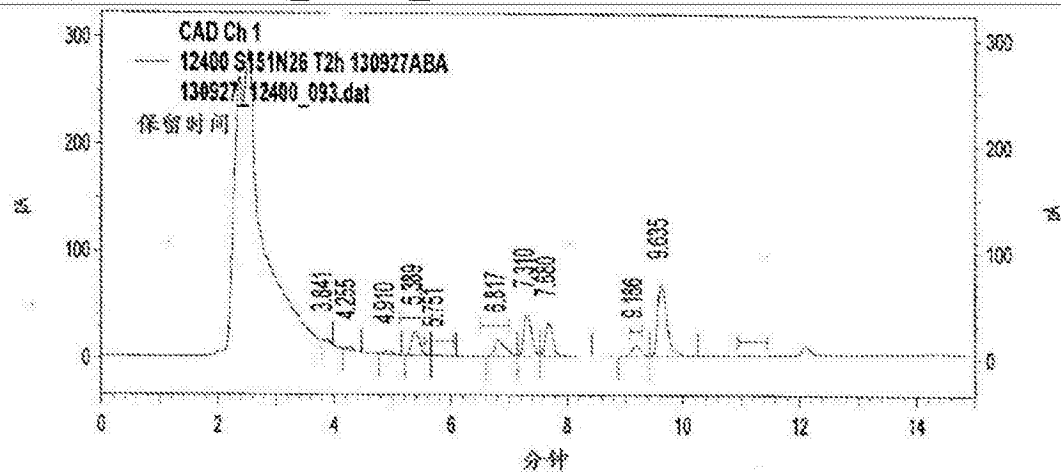


【图 58】

CAD Ch 1 结果		
化合物	保留时间	整合(区)
未知的@RT4.27	4.270	45,634,692
菜芭迪昔 E	5.398	215,079,800
未知的@RT6.79	6.790	11,0326,212
未知的@RT7.32	7.320	33,855,010
未知的@RT7.69	7.689	271,186,269
未知的@RT8.18	8.178	6,003,490
未知的@RT8.78	8.779	20,739,231
甜叶菊苷	9.201	114,734,548
未知的@RT9.65	9.648	779,225,521
总		1,596,784,773

[0517]

样品: 12400 S151N26 T2h 130927ABA  
 基因参照: UGTSL2 (XP\_004250485.1)  
 文件名: 130927\_12400\_093.dat



【图 59】

CAD Ch 1 结果		
化合物	保留时间	整合(区)
未知的@RT3.84	3.841	16,182,482
未知的@RT4.25	4.255	20,078,830
未知的@RT4.91	4.910	27,630,795
莱芭迪昔 E	5.389	203,768,956
未知的@RT5.75	5.751	8,018,638
未知的@RT6.82	6.817	200,959,602
未知的@RT7.31	7.310	370188401
未知的@RT7.68	7.680	294,963,186
甜叶菊苷	9.186	101,729,292
未知的@RT9.63	9.635	727,903,255
总		1,971,423,437

[0518] 【实施例 29 :用 UGTSL 和 UGTSL2 的悬钩子苷向莱芭迪昔 E 转变的活性的确定】

[0519] UGTSL 根据实施例 22 制备, 及 UGTSL2 根据实施例 27 制备。

[0520] 以 3mL 规模, 用 600  $\mu$ L 用于转化悬钩子苷的裂解物, 使用 0.5mM 的底物, 2.5mM 的 UDP- 葡萄糖和 3mM  $MgCl_2$ , 在 pH7.2 的 50mM 磷酸钠缓冲液中实施活性测试。取样品, 及由 HPLC 分析, 如显示于图 60 ~ 61。HPLC 测定如在实施例 20 中描述实施。

[0521] 以下提供不同酶和对应层析谱的结果

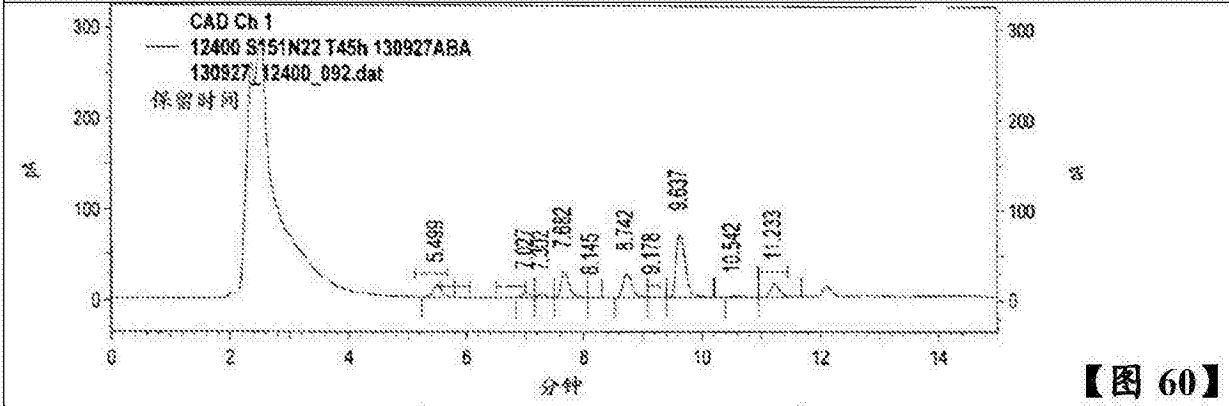
[0522]

酶内部参照	GI 号	版本	悬钩子苷 conv. <sup>1</sup> (反应时 间)	莱芭迪昔 E 形成 <sup>1</sup>
UGTSL	460409128	XP_004249992.1	70% (45h.)	27%
UGTSL2	460410132	XP_004250485.1	80% (2h.)	55%

[0523] 注：<sup>1</sup>基于悬钩子苷的初始浓度

[0524]

样品: 12400 S151N22 T45h 130927ABA  
 基因参照: UGTSL (XP\_004249992.1)  
 文件名: 130927\_12400\_092.dat

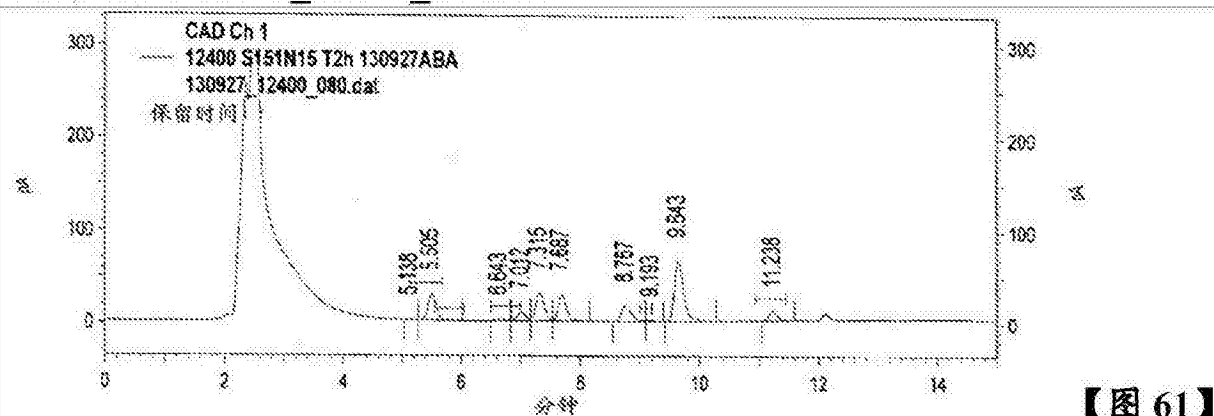


【图 60】

CAD Ch 1 结果		
化合物	保留时间	整合(区)
莱菔迪昔 E	5.499	135,984,743
未知的@RT7.03	7.027	54,448,761
未知的@RT7.30	7.302	41,308,528
未知的@RT7.68	7.682	283,852,603
未知的@RT8.14	8.145	5,484,731
未知的@RT8.74	8.742	290,946,055
甜叶菊苷	9.178	8,774,098
未知的@RT9.64	9.637	761,299,117
未知的@RT10.54	10.542	18,276,224
悬钩子苷	11.233	155,492,389
总		1,755,867,249

[0525]

样品: 12400 S151N15 T2h 130927ABA  
 基因参照: UGTSL2 (XP\_004250485.1)  
 文件名: 130927\_12400\_080.dat



【图 61】

CAD Ch 1 结果		
化合物	保留时间	整合(区)
未知的@RT5.14	5.138	5,555,472
莱苞迪昔 E	5.505	278,529,547
未知的@RT6.64	6.643	23,812,633
未知的@RT7.01	7.012	84,543,823
未知的@RT7.31	7.315	283,724,517
未知的@RT7.69	7.687	264,400,008
未知的@RT8.78	8.767	188,634,123
甜叶菊苷	9.193	9,365,107
未知的@RT9.64	9.643	700,878,865
悬钩子苷	11.238	102,484,386
<b>Totals</b>		<b>1,941,928,481</b>

[0526] 【实施例 30 :用 UGTSL2 的莱苞迪昔 A 向莱苞迪昔 D 转变的活性的确定】

[0527] UGTSL2 根据实施例 27 制备。

[0528] 以 3mL 规模,用 60  $\mu$ L 用于转化莱苞迪昔 A 的裂解物,使用 0.5mM 的底物,2.5mM 的 UDP-葡萄糖和 3mM  $MgCl_2$ ,在 pH7.2 的 50mM 磷酸钠缓冲液中实施活性测试。取样品,及由 HPLC 分析,如显示于图 62。HPLC 测定如在实施例 20 中描述实施。

[0529] 以下提供 23h. 的反应和对应层析谱的结果。

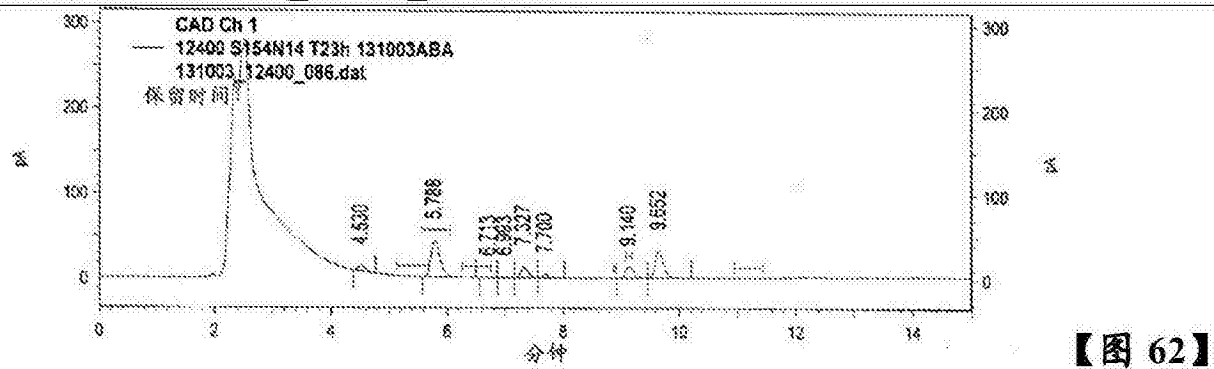
[0530]

酶内部参照	GI 号	版本	莱苞迪昔 A conv. <sup>1</sup> (反应时间)	莱苞迪昔 D 形成 <sup>1</sup>
UGTSL2	460410132	XP_004250485.1	78% (23h.)	75%

[0531] 注:<sup>1</sup>基于莱苞迪昔 A 的初始浓度

[0532]

**样品: 12400 S154N14 T23h 131003ABA**  
**基因参照: UGTS2 (XP\_004250485.1)**  
**文件名: 131003\_12400\_086.dat**



**【图 62】**

<b>CAD Ch 1 结果</b>		
<b>化合物</b>	<b>保留时间</b>	<b>整合(区)</b>
未知的@RT4.53	4.530	55,894,278
莱芭迪昔 D	5.788	461,768,318
未知的@RT6.71	6.713	7,942,480
未知的@RT6.99	6.993	11,192,896
未知的@RT7.33	7.327	120,255,606
未知的@RT7.70	7.700	38,994,186
莱芭迪昔 A	9.140	137,037,966
未知的@RT9.65	9.652	314,468,535
<b>总</b>		<b>1,147,554,265</b>

[0533] **【实施例 31:糖苷的鉴定】**

[0534] 随由 PureCircle Sdn Bhd( 马来西亚 ) 产生的甜叶菊 (Stevia rebaudiana Bertoni) 叶提取物“MLD1”,由 LC-MS 分析根据实施例 30 制备的及温育 45hrs 的反应混合物,以确定天然形成的糖苷的发生。

[0535] 使用 Agilent 1200 系列 HPLC 系统,其装备双泵 (G1312B),自动采样器 (G1367D),恒温柱隔室 (G1316B),DAD 检测器 (G1315C),连接 Agilent 6110A MSD,及接入“LC/MSD Chemstation”软件,及层析谱显示于图 63。

[0536] 仪器条件

[0537]

柱	Phenomenex Prodigy 3u C18 100A, 4.6mm x 250mm, 3 $\mu$ m
柱温度	55°C
检测	DAD 在 210nm 处 bw 360nm MSD (Scan 和 SIM 模式) 模式: ES-API, 负极性 干燥气流: 13.0L/min 雾化器压力: 30 psig 干燥气体温度: 270°C
分析持续时间	75min
注射的体积	10 $\mu$ L
流速	0.5mL/min

[0538] 移动相梯度程序

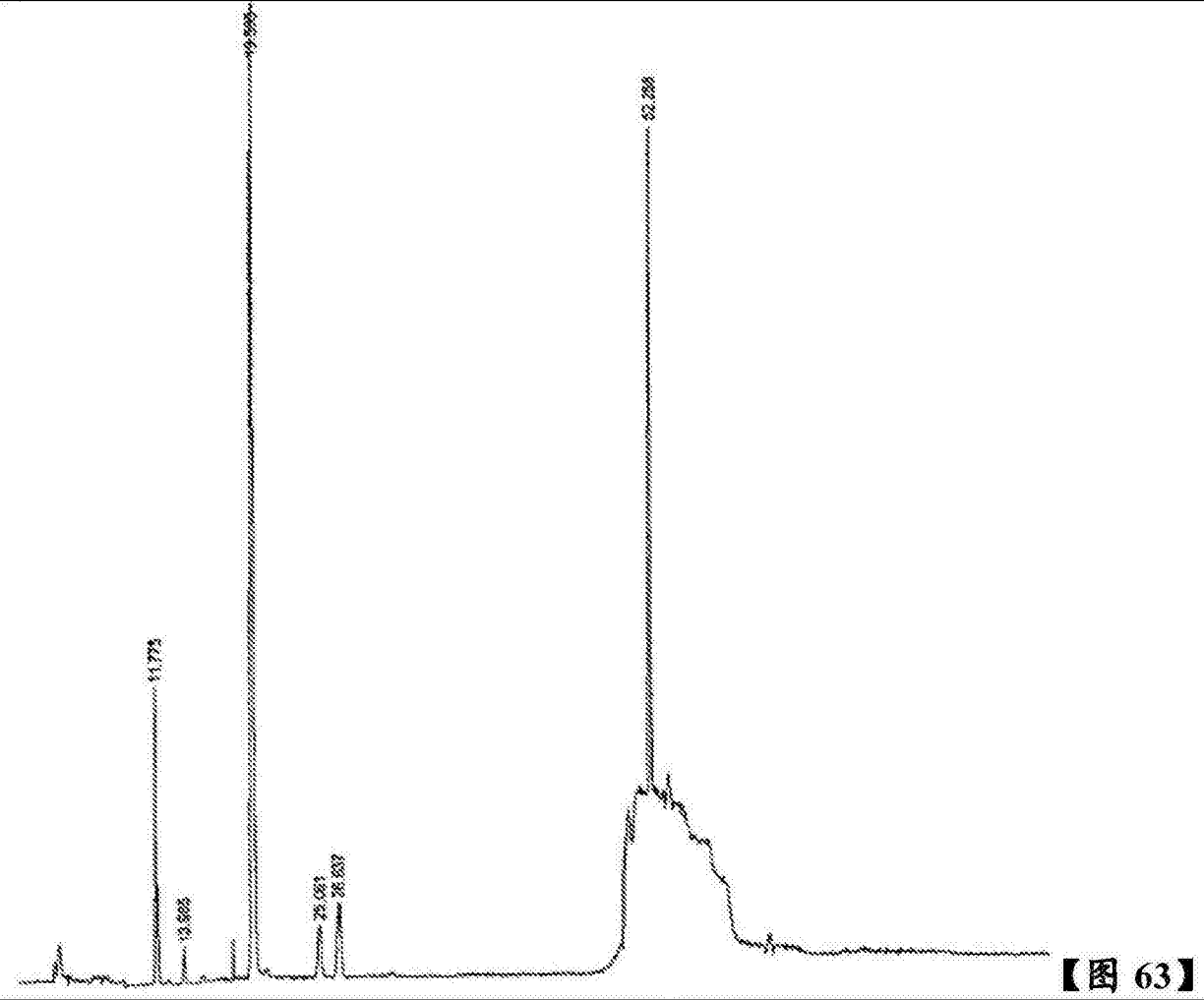
[0539]

时间 (min)	A(%) : 甲酸 0.1%	B(%) : 乙腈
0	75	25
30	75	25
33	68	32
75	68	32

[0540] 测定显示, 在实施例 23 中, 在 LC-MS 系统上在 11.77min 观察到的化合物与在 3.5min 观察到的化合物相同 ( $C_{56}H_{90}O_{33}$ ; 随后确认为 reb M2), 及在实施例 23 中, 在 26.64min 观察到的化合物与在 7.6min 观察到的化合物相同 ( $C_{50}H_{80}O_{28}$ ; reb UNK; 随后确认为 reb D2)。在 13.96min 观察到 reb M 的其他异构体, 和也在 25.06min 观察到 reb D 的另一异构体形式。全部观察到的化合物存在于甜叶菊 (*Stevia rebaudiana* Bertoni) 植物的提取物中。

[0541]

样品:UGTSL2 T45h  
 基因参照: UGTSL2 (XP\_004250485.1)



【图 63】

MSD SIM 结果		
化合物	保留时间	MW
未知的@RT11.77	11.775	1,291
未知的@RT13.96	13.965	1,291
莱芭迪昔 D	19.598	1,129
未知的@RT25.06	25.061	1,129
未知的@RT26.64	26.637	1,129
莱芭迪昔 A	52.258	967

[0542] 【实施例 32 :UGTLB 的体内制备和活性确定】

[0543] SEQ ID NO:10

[0544] UGTLB(GI\_209954733/BAG80557.1) 氨基酸序列

[0545] MGTEVTVHKNTLRVLMFPWLAYGHISPFNLVAKKLVDRGFLIYLCSTAINLKSTIKKIPEKYSDSIQLI  
 ELHLPPELPPHYHTTNGLPPLNHTLQKALKMSKPNFSKILQNLKPDLVYDILLQQWAEGVANEQNIPAVKLLTS  
 GAAVLSYFFNLVKKPGVEFPFPAIYLRKNELEKMSSELLAQSAKDKPDGVDPFADGNMQVLMSTSRILEAKYIDYF  
 SGLSNWKVVPVGPVQDPIADDADEMELIDWLGKKDENSTVFVSGSEYFLSKEDREEIAFGLELSNVNFIWVARFP

KGEEQNLEDALPKGFLERIGDRGRVLDKGFAPQPRILNHPSTGGFISHCGWNSVMESVDFGVPIIAMP IHL DQPMNAR  
LIVELGVAVEIVRDDYDGKIHREEIAEILKDVIAGKSGENLKAKMRDISKNLKSIRDEEMDTAAEELIQLCKNSPKLK

[0546] 在大肠埃希氏菌 (*E. coli*) BL21 (DE3) 中由热休克导入含有 UGTLB 基因的 pET30A+ 载体。使获得的细胞在陪替 - 皿中在卡那霉素的存在下生长, 和选择适合的集落, 使生长在液体 LB 培养基 (锥形瓶) 中。将甘油加入悬浮液作为冷冻保护剂, 及 400  $\mu$ L 等份存储于  $-20^{\circ}\text{C}$  和于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。

[0547] 将含有 pET30A+\_UGTLB 质粒的大肠埃希氏菌 (*E. coli*) BL21 (DE3) 的存储等份解冻, 及添加到 30mL 的 LBGKP 培养基 (20g/L Luria 肉汤 Lennox ;50mM PIPES 缓冲剂 pH7.00 ; 50mM 磷酸缓冲液 pH7.00 ;2.5g/L 葡萄糖和 50mg/L 的卡那霉素)。使此培养物以 135rpm 于  $30^{\circ}\text{C}$  振摇 8h。

[0548] 生产培养基含有 60g/L 的过夜表达立即 TB 培养基 (Novagen), 10g/L 的甘油和 50mg/L 的卡那霉素。将预培养物添加到 200mL 的此培养基, 和溶液取样品的同时于  $20^{\circ}\text{C}$  搅拌, 以测量 OD 和 pH。培养物显著生长和获得良好 OD。在 40h 之后, 将细胞通过离心收获, 及冷冻而获得 5.7g 的细胞湿重。

[0549] 对 1.2g 的细胞通过添加 6mL Bugbuster Master 混合物 (Novagen) 实施裂解, 和将裂解物通过离心回收, 及新鲜使用。

[0550] 【用 UGTLB 的甜叶菊苷向莱菔迪昔 E 转变的活性确定】

[0551] 以 3mL 规模, 用 600  $\mu$ L 用于转化甜叶菊苷的裂解物, 使用 0.5mM 的底物, 2.5mM 的 UDP- 葡萄糖和 3mM  $\text{MgCl}_2$ , 在 pH7.2 的 50mM 磷酸钠缓冲液中实施活性测试。取样品, 及由 HPLC 分析, 如显示于图 64 ~ 66。以下描绘对应层析谱。

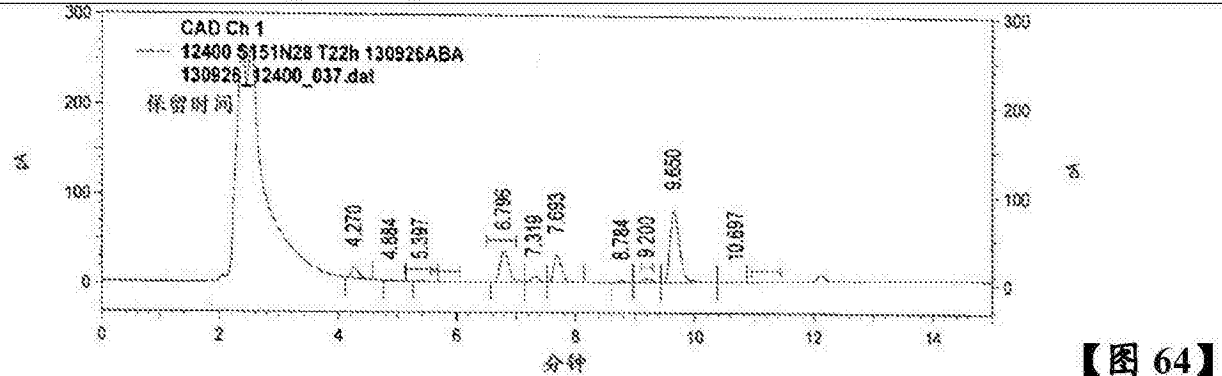
[0552]

酶内部参照	GI 号	版本	甜叶菊苷 conv. <sup>1</sup> (反应时间)	莱菔迪昔 E 形成 <sup>1</sup>
UGTLB	209954733	BAG80557.1	89% (22h.)	3%

[0553] 注:<sup>1</sup>基于甜叶菊苷的初始浓度

[0554]

样品: 12400 S151N28 T22h 130926ABA  
 基因参照: UGTLB (BAG80557.1)  
 文件名: 130926\_12400\_037.dat



【图 64】

CAD Ch 1 结果		
化合物	保留时间	整合(区)
未知的@4.27	4.270	101,580,340
未知的@4.88	4.884	2,979,482
莱苞迪昔 E	5.397	13,747,837
未知的@6.80	6.796	378,936,196
未知的@7.32	7.319	54,838,779
未知的@7.69	7.693	291,189,747
未知的@8.78	8.784	21,079,018
甜叶菊苷	9.200	50,143,248
未知的@9.65	9.650	888,211,556
未知的@10.70	10.697	5,878,160
总		1,808,584,363

[0555] 【用 UGTLB 的悬钩子苷向莱苞迪昔 E 转变的活性确定】

[0556] 以 3mL 规模,用 600  $\mu$ L 用于转化悬钩子苷的裂解物,使用 0.5mM 的底物,2.5mM 的 UDP-葡萄糖和 3mM  $MgCl_2$ ,在 pH7.2 的 50mM 磷酸钠缓冲液中实施活性测试。取样品,及由 HPLC 分析。以下描绘对应层析谱。

[0557]

酶内部参照	GI 号	版本	悬钩子苷 conv. <sup>1</sup> (反应时间)	莱苞迪昔 E 形成 <sup>1</sup>
UGTLB	209954733	BAG80557.1	65% (5h.)	4%

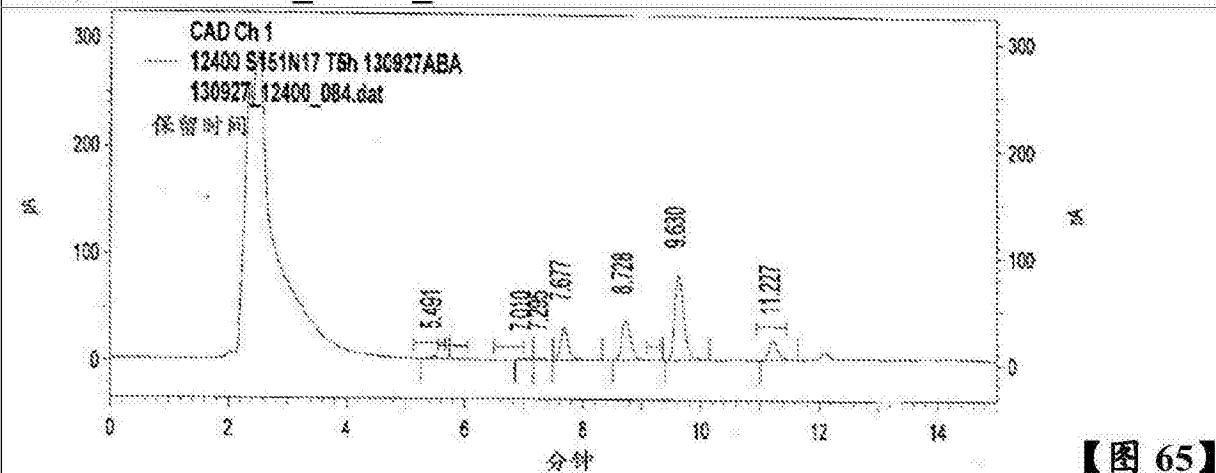
[0558] 注:<sup>1</sup>基于悬钩子苷的初始浓度

[0559]

样品: 12400 S151N17 T5h 130927ABA

基因参照: UGTLB (BAG80557.1)

文件名: 130927\_12400\_084.dat



【图 65】

CAD Ch 1 结果		
化合物	保留时间	整合(区)
莱苞迪昔 E	5.491	21921232
未知的@7.01	7.010	9764063
未知的@7.29	7.295	12510947
未知的@7.68	7.677	283386906
未知的@8.73	8.728	402240506
未知的@9.63	9.630	878990745
悬钩子昔	11.227	176000085
<b>Totals</b>		<b>1784814484</b>

[0560] 【用 UGTLB 的莱苞迪昔 A 向莱苞迪昔 D 转变的活性确定】

[0561] 以 3mL 规模,用 600  $\mu$ L 用于转化莱苞迪昔 A 的裂解物,使用 0.5mM 的底物,2.5mM 的 UDP-葡萄糖和 3mM  $MgCl_2$ ,在 pH7.2 的 50mM 磷酸钠缓冲液中实施活性测试。取样品,及由 HPLC 分析。以下描绘 23h 的反应之后的对应层析谱。

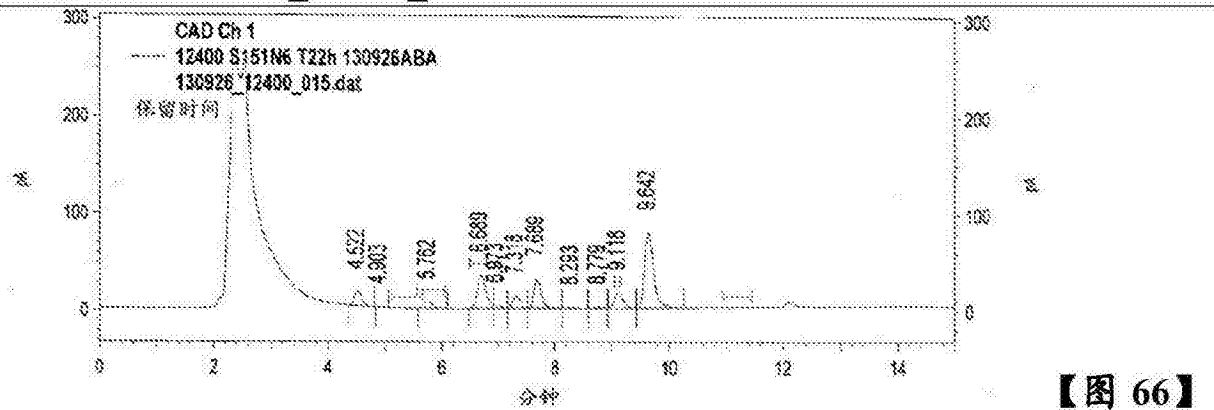
[0562]

酶内部参照	GI 号	版本	莱苞迪昔 A conv. <sup>1</sup> (反应时间)	莱苞迪昔 D 形成 <sup>1</sup>
UGTLB	209954733	BAG80557.1	72% (22h.)	10%

[0563] 注:<sup>1</sup>基于莱苞迪昔 A 的初始浓度

[0564]

样品: 12400 S154N6 T22h 130926ABA  
 基因参照: UGTLB (BAG80557.1)  
 文件名: 130926\_12400\_015.dat



【图 66】

CAD Ch 1 结果		
化合物	保留时间	整合(区)
未知的@4.42	4.522	137,916,950
未知的@4.90	4.903	2,015,271
莱芭迪昔 D	5.762	59,876,764
未知的@6.69	6.689	364,185,331
未知的@6.97	6.973	26,368,965
未知的@7.32	7.318	110,284,197
未知的@7.69	7.689	294,579,799
未知的@8.29	8.293	7,867,452
未知的@8.78	8.779	15,928,550
莱芭迪昔 A	9.118	165,602,247
未知的@9.64	9.642	868,327,712
总		2,052,953,238

[0565] 【实施例 33 :用 UGTSL,UGTSL2 和 UGTLB 的悬钩子苷和甜叶菊苷转变的反应产物的确定】

[0566] 将与实施例 28 类似方式进行用 UGTSL 和 UGTSL2 的甜叶菊苷的转变,及与实施例 29 类似地进行用 UGTSL 和 UGTSL2 的悬钩子苷的转变。与实施例 32 类似地进行用 UGTLB 的悬钩子苷和甜叶菊苷的转变。

[0567] 由 LCMS 分析反应混合物,以测定全部反应产物。

[0568] 【悬钩子苷转变产物】

[0569]

样品 ID	UGT (反应时间)	LC-MS, 峰面积比(%)						
		Rub	Stev	Reb E	Reb D	未知的峰 #1 ( MW804 ) RT 30.70min	未知的峰 #2 ( MW804 ) RT 49.50min	未知的峰 #3 ( MW804 ) RT 50.40min
S151N15	UGTSL2 (2hrs)	3.54	2.12	52.88	6.73	12.02	9.94	12.77
S151N17	UGTLB (5hrs)	13.49	ND	9.21	1.29	4.07	66.67	5.27
S151N22	UGTSL (45hrs)	7.82	2.37	35.88	3.45	20.38	27.75	2.35

[0570] 【甜叶菊苷转变产物】

[0571]

样品 ID	UGT (反应时间)	LC-MS, 峰面积比(%)					
		Stev	Reb E	Reb D	未知的峰 #1 ( MW966 ) RT=22.60min	未知的峰 #2 ( MW966 ) RT=26.50min	未知的峰 #3 ( MW966 ) RT=29.50min
S151N26	UGTSL2 (2hrs)	20.01	42.56	1.70	4.48	5.56	25.70
S151N28	UGTLB (2hrs)	43.11	3.12	ND	ND	53.78	ND
S151N33	UGTSL (22hrs)	25.24	49.68	0.54	3.97	20.56	ND

[0572] 可见,在悬钩子苷转变产物之中,除了甜叶菊苷, Reb E 和 Reb D 之外,有具有 804 的分子量的至少 3 种另外的化合物。这些化合物的保留时间不与 Reb B 匹配,其已知与甜叶菊苷具有相同的分子量。由于这些化合物与甜叶菊苷具有相同的分子量,可推定,这些新甜叶菊醇糖苷是甜叶菊苷的异构体。

[0573] 另一方面,在甜叶菊苷转变产物之中,除了 Reb E 和 Reb D,有具有 966 的分子量的至少 3 种另外的化合物。这些化合物的保留时间不与 Reb A 匹配,已知其与 Reb E 具有相同的分子量。由于这些化合物与 Reb A 和 Reb E 具有相同的分子量,可推定,这些新甜叶菊醇糖苷是 Reb A(Reb E) 的异构体。

[0574] 【实施例 34:啤酒糖酵母 (*S. cerevisiae*) 中 UGT76G1 的体内产生】

[0575] SEQ ID NO:11

[0576] UGT76G1[甜叶菊 (*Stevia rebaudiana*)](gi\_37993653/gb\_AAR06912.1)

[0577] MENKTETT VRRRRRI ILFPVPFQGHINPILQLANVLYSKGFSITIFHTNFKPKTSNYPHFTFRFIL  
DNDPQDERISNLPTHGPLAGMRIPI INEHGADELRRLELEMLLASEEDEEVSLITDALWYFAQSVADSLNLRRL  
VLMTSSLFNFHAHVSLPQFDELGYLDPDDKTRLEEQASGFPMKVKDIKSAYSNWQILKEILGKMIKQTKASSGV  
IWN SFKELEESELETVIREIPAPSFLIPLPKHLTASSSSLLDHDRTVFQWLDQQPPSSVLYVSFGSTSEVDEKDF  
LEIARGLVDSKQSFLWVVRPGFVKGSTWVEPLPDGFLGERGRIVKWPQQEVLHGAIGAFWTHSGWNSTLESVC  
EGVPMIFSDFGLDQPLNARYMSDVLKVGVYLENGWERGE IANA IRRVMVDEEGEYIRQNARVLKQKADVSLMKGG  
SSYESLESLSVSISSL

[0578] 将上述的氨基酸序列为在啤酒糖酵母 (*S. cerevisiae*) 中表达密码子优化。此外酵母共有序列 AACACA 添加在 ATG 起始密码子之前。将合成基因在 pYES2 载体中使用 Hind III 和 Xba I 限制性位点进行亚克隆。将 pYES2\_UGT76G1\_Sc 载体用于转化化学感受态啤酒糖酵母 (*S. cerevisiae*) INVSc1 细胞 (Invitrogen)。

[0579] 使细胞在含有 2% 葡萄糖缺少尿嘧啶的固体合成最小培养基上生长,和挑选单集落,及使在缺少尿嘧啶的液体合成最小培养基(含有 2% 葡萄糖的 SC-U) 中生长。在离心之后,将细胞用 SC-U(含有 2% 葡萄糖)和 60% 甘油/水悬浮。等份存储于 -80°C,及一个等

份用于在 SC-U (含有 2% 葡萄糖) 中于 30°C 起始培养 43h。将部分此培养物离心, 及在诱导培养基 (含有 2% 半乳糖的 SC-U) 中于 30°C 悬浮 19h30。

[0580] 通过离心获得细胞, 和用 5 体积的 CellLyctic™ Y 细胞裂解试剂 (Sigma) 裂解。裂解物直接用于活性测试 (UGT76G1\_Sc)。

[0581] 【实施例 35 : 用于莱苞迪昔 D 向莱苞迪昔 M 的转变的 UGT76G1\_Sc 的活性确定】

[0582] UGT76G1\_Sc 根据实施例 34 制备。以 2mL 规模, 用 200 μL 用于转化莱苞迪昔 D 的裂解物, 使用 0.5mM 的底物, 2.5mM 的 UDP- 葡萄糖和 3mM MgCl<sub>2</sub>, 在 pH7.2 的 50mM 磷酸钠缓冲液中实施活性测试。取样品, 及由 HPLC 分析, 如显示于图 67。以下描绘对应层析谱。

[0583]

酶内部参照	莱苞迪昔 D conv. <sup>1</sup> (反应时间)	莱苞迪昔 M 选择性 <sup>1</sup>
UGT76G1_Sc	85% (21h.)	100%

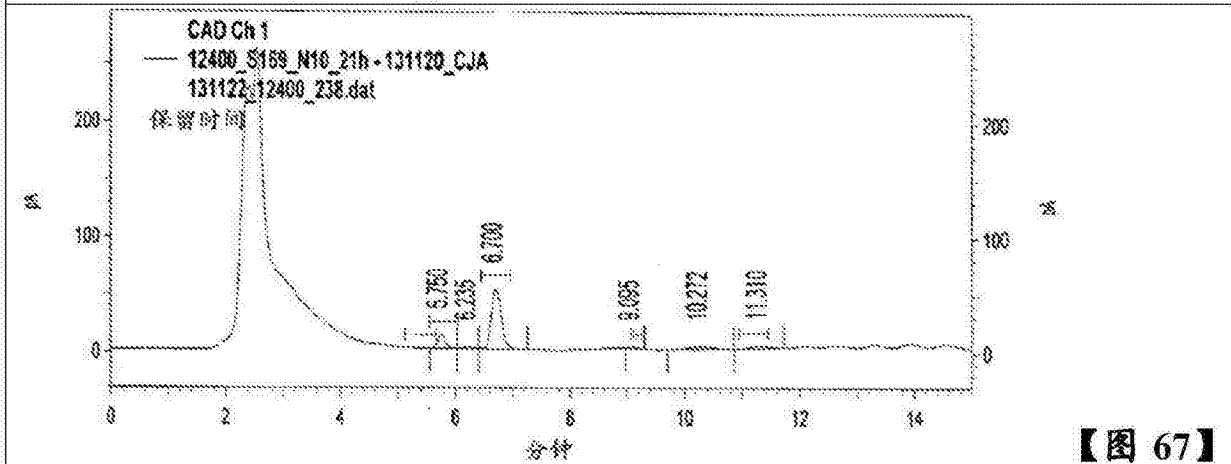
[0584] 注:<sup>1</sup>基于莱苞迪昔 D 的初始浓度

[0585]

样品: 12400 S169N10 T21h 131119CJA

基因参照: UGT76G1\_Sc

文件名: 131122\_12400\_238.dat



【图 67】

CAD Ch 1 结果		
化合物	保留时间	整合(区)
莱苞迪昔 D	5.750	112,094,430
未知的@6.23	6.235	17,886,043
莱苞迪昔 M	6.700	616,583,935
莱苞迪昔 A	9.095	11,183,884
未知的@10.27	10.272	62,863,156
未知的@11.31	11.310	35,839,478
总		856,450,926

[0586] 【实施例 36 : 啤酒糖酵母 (S. cerevisiae) 中 UGTSL 的体内产生】

[0587] SEQ ID NO:12

[0588] UGTSL[番茄 (*Solanum lycopersicum*)](gi\_460409128/XP\_004249992.1

[0589] MSPKLHKELFFHSLYKKTRSNTMATLKVLMFPFLAYGHISPYLNVAKKLADRGFLIYFCSTPINLK  
STIEKIPEKYADSIHLIELHLPQLPPHYHTTNGLPNNLQVLQKALKMSKPNFSKILQNLKPDLVYDILQR  
WAKHVANEQNIPAVKLLTSGAAVFSYFFNVLKKPGVEFPFPGIYLRKIEQVRLSEMMSKSDKEKELEDDDDDDDL  
LVDGNMQIMLMSTSRTEAKYIDFCTALTNWKVVPVGPVQDLITNDVDDMELIDWLGTKDENSTVFSFGSEYF  
LSKEDMEEVAFALNSNVFIWVARFPKGEERNLEDALPKGFLERIGRGRVLDKFPAPQPRILNHPSTGGFISHC  
GWNAMESIDFGVPIIAMPMLDQPMNARLIVELGVAVEIVRDDDGIHRGEIAETLKGVITGKTGEKLRKVRD  
ISKNLKTIRDEEMDAAAELIQLCRNGN

[0590] 将上述的氨基酸序列为在啤酒糖酵母 (*S. cerevisiae*) 中表达密码子优化。此外酵母共有序列 AACACA 添加在 ATG 起始密码子之前。将合成基因使用 Hind III 和 Xba I 限制性位点在 pYES2 载体中进行亚克隆。将 pYES2\_UGTSL\_Sc 载体用于转化化学感受态啤酒糖酵母 (*S. cerevisiae*) INVSc1 细胞 (Invitrogen)。

[0591] 使细胞在含有 2% 葡萄糖, 缺少尿嘧啶的固体合成最小培养基上生长, 和单集落挑选, 及使在缺少尿嘧啶的液体合成最小培养基 (含有 2% 葡萄糖的 SC-U) 中生长。在离心之后, 将细胞用 SC-U (含有 2% 葡萄糖) 和 60% 甘油 / 水悬浮。等份存储于 -80°C, 及一个等份用于在 SC-U (含有 2% 葡萄糖) 中于 30°C 起始培养 43h。将部分此培养物离心, 及于 30°C 在诱导培养基 (含有 2% 半乳糖的 SC-U) 中悬浮 19h30。

[0592] 通过离心获得细胞, 和用 5 体积的 CelLytic™ Y 细胞裂解试剂 (Sigma) 裂解。裂解物直接用于活性测试 (UGTSL\_Sc)。

[0593] 【实施例 37: 用于菜菔迪昔 A 向菜菔迪昔 D 的转变的 UGTSL\_Sc 的活性确定】

[0594] UGTSL\_Sc 制备根据实施例 36。以 2mL 规模, 用 200  $\mu$ L 用于转化菜菔迪昔 A 的裂解物, 使用 0.5mM 的底物, 2.5mM 的 UDP-葡萄糖和 3mM  $MgCl_2$ , 在 pH7.2 的 50mM 磷酸钠缓冲液中实施活性测试。取样品, 及由 HPLC 分析, 如显示于图 68。以下描绘对应层析谱。

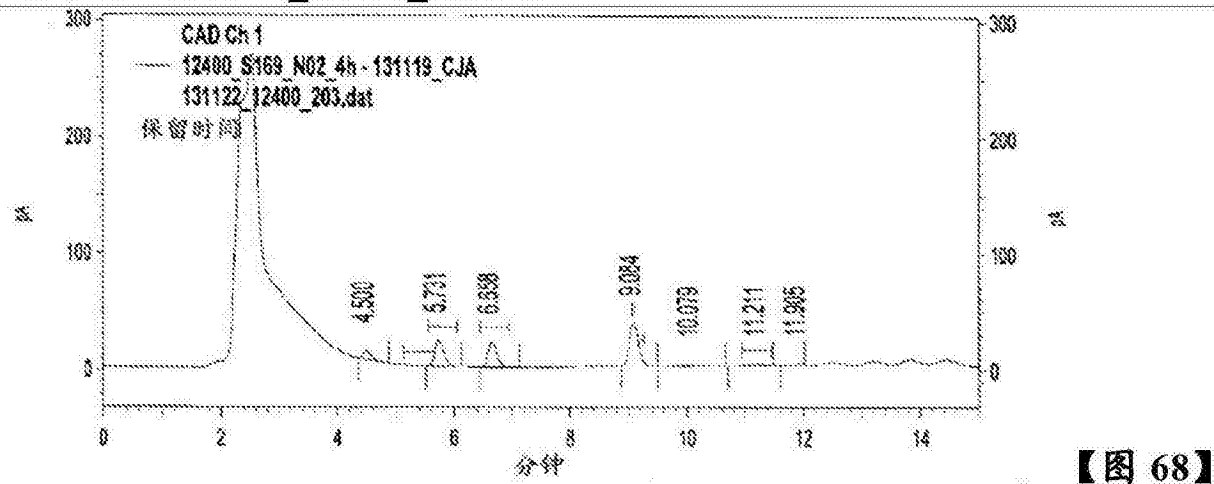
[0595]

酶内部参照	菜菔迪昔 A conv. <sup>1</sup> (反应时间)	菜菔迪昔 D 选择性 <sup>1</sup>
UGTSL_Sc	46% (4h)	42%

[0596] 注:<sup>1</sup>基于菜菔迪昔 A 的初始浓度

[0597]

样品: 12400 S169N02 T4h 131119CJA  
 基因参照: UGTSL\_Sc  
 文件名: 131122\_12400\_203.dat



【图 68】

CAD Ch 1 结果		
化合物	保留时间	整合(区)
未知的@4.50	4.500	75,046,986
莱苞迪昔 D	5.731	223,409,643
未知的@6.66	6.658	228,651,278
莱苞迪昔 A	9.084	404,642,305
未知的@10.08	10.079	43,992,253
未知的@11.21	11.211	29,776,761
未知的@11.90	11.905	2,185,316
总		1,007,704,542

[0598] 【实施例 38 : 莱苞迪昔 M 的分离】

[0599] 实施例 14 的产物混合物的量对于经制备性 HPLC 方法分离不足够大。因此, 将用一系列注射的分析 HPLC 用于分离混合物的组分。根据以上在实施例 14 中所述的方法进行分离, 以提供对应于图 5 的 HPLC 踪迹中的 2 个主要峰的 2 个级分 : 级分 A (保留时间 24.165 分钟) 和级分 B (保留时间 31.325 分钟)。

[0600] 级分 A 的保留时间与 reb D 一致, 指示来自生物转化反应的未反应的原材料。

[0601] 纯化的级分 B 的保留时间 (图 6) 与 reb M 一致, 指示成功的自 reb D 的生物转化。通过纯化的级分 B 与 reb M 标准物 (可自 PureCircle 得到, 图 7 中显示的 reb M 标准物的 HPLC 踪迹) 的共注射确认级分 B 中收集的物质鉴定为 reb M。级分 B 及 reb M 标准物发现以相同的保留时间洗脱 (图 8), 指示级分 B 是 reb M。

[0602] 也独立地由 NMR 和 HRMS 确认级分 B 鉴定为 reb M。为采样, 将级分 B 在旋转蒸发器下浓缩, 冷冻干燥及于 40°C 干燥 40h。

[0603] 将 NMR 样品溶于氘化的吡啶 (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N), 在 Varian Unity 加 600MHz 仪器上使用标准脉冲序列获取谱。将级分 B 的 NMR 谱与 reb M 的 NMR 谱比较。2 个谱的叠加 (图 9) 显示级分 B 与 reb M 的峰的一致性。以下示 reb M 的 NMR 指定的表:

[0604]  $C_5D_5N$  中莱苞迪昔 M 的  $^1H$  和  $^{13}C$  NMR 光谱数据<sup>a c</sup>.

[0605]

位置	$^{13}C$ NMR	$^1H$ NMR
1	40.3	0.75t (13.2) 1.76m
2	19.6	1.35m 2.24m
3	38.4	1.01m 2.30 d (13.3)
4	44.3	---
5	57.4	1.06 d (12.8)
6	23.5	2.23m 2.41 q (13.2)
7	42.6	1.41m 1.80m
8	41.2	---
9	54.3	0.91 d (7.7)
10	39.7	---
11	20.2	1.65m 1.75m
12	38.5	1.86m

[0606]

		2.73m
13	87.6	---
14	43.3	2.02m 2.74m
15	46.5	1.88 d (16.4) 2.03m
16	153.3	---
17	104.9	4.90s 5.69s
18	28.2	1.32s
19	176.9	---
20	16.8	1.38s
1'	94.9	6.39 d (8.2)
2'	76.9	4.51t (8.5)
3'	88.6	5.09t (8.5)
4'	70.1	4.18m
5'	78.4	4.13m
6'	61.8	4.20m 4.31m
1''	96.2	5.46 d (7.1)
2''	81.4	4.13m
3''	87.9	4.98t (8.5)
4''	70.4	4.07t (9.6)
5''	77.7	3.94m
6''	62.6	4.19m 4.32m
1'''	104.8	5.48 d (7.7)
2'''	75.8	4.15m
3'''	78.6	4.13m
4'''	73.2	3.98m
5'''	77.6	3.74 ddd (2.8, 6.4, 9.9)
6'''	64.0	4.27m 4.51m
1''''	103.9	5.45 d (7.5)
2''''	75.6	3.98m
3''''	77.8	4.50t (7.8)
4''''	71.3	4.14m
5''''	78.0	3.99m
6''''	62.1	4.20m 4.32m
1'''''	104.2	5.81 d (7.2)
2'''''	75.5	4.20m
3'''''	78.4	4.20m
4'''''	73.6	4.10m
5'''''	77.8	3.90 ddd (2.8, 6.4, 9.9)
6'''''	64.0	4.32m 4.64 d (10.3)
1''''''	104.1	5.31 d (8.0)
2''''''	75.5	3.95m
3''''''	78.0	4.37t (9.1)

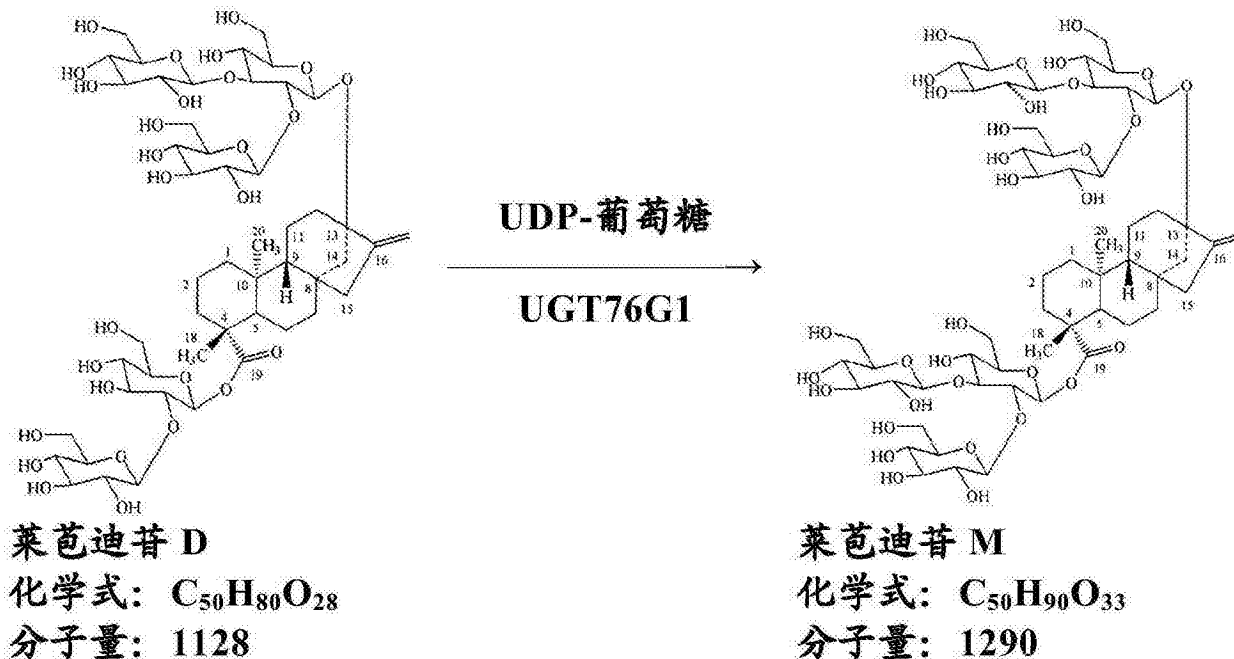
[0607]

<b>4<sup>****</sup></b>	<b>71.1</b>	<b>4.10m</b>
<b>5<sup>****</sup></b>	<b>78.1</b>	<b>3.85 ddd (1.7, 6.1, 9.9)</b>
<b>6<sup>****</sup></b>	<b>62.1</b>	<b>4.10m</b> <b>4.32m</b>

[0608] <sup>a</sup>基于 COSY, HMQC 和 HMBC 关联制造的指定; <sup>b</sup>化学位移值以  $\delta$  (ppm) 表示; <sup>c</sup>偶联常数以 Hz 表示。

[0609] 用装备以阳离子模式操作的电喷射电离源的 Waters Premier Quadropole 飞行时间 (Q-TOF) 质谱仪产生 HRMS (图 10)。将样品溶于甲醇, 及以 2:2:1 甲醇: 乙腈: 水洗脱, 及使用机载注射器泵经输注导入。reb M 的存在由 m/z 1313.5265 的  $[M+Na]^+$  加合物确认, 其对应于  $C_{56}H_{90}O_{33}$  的分子式

[0610]



[0611] 【实施例 39: Reb D2 的分离和表征】

[0612] 粗反应样品。根据实施例 22 用 UGTSL (GI#460409128) 制备用于分离的样品, Lot CB-2977-106。

[0613] HPLC 分析. 通过使用 Waters 2695Alliance 系统, 用以下方法实施样品的初步 HPLC 分析: phenomenex Synergi 氢 -RP,  $4.6 \times 250$ mm,  $4 \mu m$  (p/n 00G-4375-E0); 柱 Temp:  $55^\circ C$ ; 移动 A 相: 水中的 0.0284% 乙酸铵 ( $NH_4OAc$ ) 和 0.0116% 乙酸 ( $HOAc$ ); 移动 B 相: 乙腈 (MeCN); 流速:  $1.0 mL/min$ ; 注射体积:  $10 \mu L$ 。检测由 UV (210nm) 和 CAD 实施。

[0614] 梯度:

[0615]

时间 (min)	% A	% B
0.0-8.5	75	25
10.0	71	29

16.5	70	30
18.5-24.5	66	34
26.5-29.0	48	52
31-37	30	70
38	75	25

[0616] 用以下方法实施半-制备性纯化级分的分析:水 Atlantis dC18, 4.6×100mm, 5 μm(p/n 186001340);移动 A 相:在水中 25% MeCN;移动 B 相:水中 30% MeCN;流速:1.0mL/min;注射体积:10 μL。检测由 CAD 实施。

[0617] 梯度:

[0618]

时间 (min)	% A	% B
0.0-5.0	100	0
20	20	80
25	20	80
30	100	0

[0619] LC-MS. 在具有以阴离子模式操作的 Waters 3100 质量检测器的 Waters AutoPurification HPLC/MS 系统上实施半-合成甜叶菊醇糖苷混合物的初步分析。通过使用以下方法实施样品分析:phenomenex Synergi 氢-RP, 4.6×250mm, 4 μm(p/n 00G-4375-E0);柱 Temp:55℃;移动 A 相:水中的 0.0284% NH<sub>4</sub>OAc 和 0.0116% HOAc;移动 B 相:乙腈;流速:1.0mL/min;注射体积:10 μL。检测由 UV(210nm), 及 MSD(-ESI m/z 500-2000) 实施。梯度条件如以上所列。

[0620] 分离由 HPLC 实施。纯化在 2 步骤中实施。以下总结为半-制备性纯化使用的第 1 方法。柱:水 Atlantis dC18, 30×100mm, 5 μm(p/n186001375);移动 A 相:水中 25% MeCN;移动 B 相:水中 30% MeCN;流速:45mL/min;注射负荷:20mL 的水中溶解的 160mg。检测由 UV(205nm) 实施。

[0621] 梯度:

[0622]

时间 (min)	% A	% B
0.0-5.0	100	0
20	20	80

25	20	80
30	100	0

[0623] 第二纯化使用相同的柱和条件,但等度移动相:水中 20% MeCN。

[0624] 自天然的提取物纯化。纯化在 3 步骤中实施。以下总结为制备性纯化使用的第 1 方法。第一过程:Waters Symmetry C18, 50×250mm, 7 μm (p/n WAT248000); 等度移动相:含 0.05% HOAc 的水中 50% 甲醇 (MeOH); 流速:85mL/min; 注射负荷:在 50mL 的移动相中溶解的 6g 粗提物。检测由 UV (210nm) 实施。洗脱目标分析物之后,将柱用水中 85% MeOH 冲洗。

[0625] 第二过程:Waters Symmetry Shield RP18, 50×250mm, 7 μm (p/n WAT248000); 等度移动相:水中 20% MeCN; 流速:100mL/min; 注射负荷:30mL 的水中溶解的 0.5g 第一级分。检测由 UV (210nm) 实施。

[0626] 第三过程:Waters Symmetry Shield RP18, 50×250mm, 7 μm (p/n WAT248000); 等度移动相:水中 20% MeCN; 流速:100mL/min; 注射负荷:30mL 的水中溶解的 0.5g 第二级分。检测由 UV (210nm) 实施。

[0627] MS 和 MS/MS。MS 和 MS/MS 数据用装备电喷射电离源的 Premier 质谱仪的 Waters QT 产生。样品分析由负 ESI 实施。样品用 H<sub>2</sub>O: 乙腈 (1:1) 稀释 50 倍, 及经输注使用机载注射器泵导入。稀释样品而产生以 0.01mg/mL 的近似的浓度存在的良好 s/n。

[0628] NMR。通过在 150 μL 的吡啶-d<sub>5</sub> 中溶解 1~2mg 来制备样品, 在具有 2.5mm 倒转检测探针的 Bruker Avance 500MHz 仪器上获取 NMR 数据。<sup>1</sup>H NMR 谱参比残留的溶剂信号 (对于吡啶-d<sub>5</sub>, δ<sub>H</sub> 8.74 和 δ<sub>C</sub> 150.35)。

#### [0629] 【结果和讨论】

[0630] 分离和纯化。对根据实施例 22 用 UGTSL (GI#460409128) 制备的甜叶菊醇糖苷混合物 (批号 CB-2977-106) 实施分离。物质由 LC-MS 使用上述方法分析, 结果提供于图 11。目标靶向的峰是在 TIC 层析谱中 7.7min 的那个。此峰的质谱提供 m/z 1127.6 的 [M-H] 离子。提供的样品使用以上提供的第 1 方法条件以单注射 (160mg) 预先处理。此方法将物质分级分离为糖苷的‘极性’和‘非-极性’混合物。然后将‘极性’混合物通过使用以上第 2-步骤条件再处理。半-制备性 HPLC 踪迹提供于图 12。由此半-制备性收集, 以纯度 >99% 分离化合物 (CAD, AUC)。级分分析提供于图 13。纯化后, 将组合的级分由旋转蒸发于 35°C 浓缩, 及冷冻干燥。获得大致 1~2mg 用于表征。

[0631] 质量光谱法。通过输注样品获取的 ESI-TOF 质谱显示 m/z 1127.4709 的 [M-H] 离子。[M-H] 离子的质量与分子式 C<sub>50</sub>H<sub>80</sub>O<sub>28</sub> 良好一致 (计算是 C<sub>50</sub>H<sub>79</sub>O<sub>28</sub>: 1127.4758, 误差: -4.3ppm)。MS 数据确认 1128Da 的标称质量, 分子式是 C<sub>50</sub>H<sub>80</sub>O<sub>28</sub>。

[0632] MS/MS 谱 (选择 m/z 1127.5 的 [M-H] 离子用于片段化) 指示 2 葡萄糖单元的损失, 和 m/z 641.3187, 479.2655 和 317.2065 的 3 个葡萄糖部分的连续损失。

[0633] NMR 光谱学。实施包括 <sup>1</sup>H NMR (图 14), <sup>13</sup>C NMR (图 15 和 16), <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (图 17), HSQC-DEPT (图 18), HMBC (图 19 和 20), NOESY (图 21) 和 1D-TOCSY (图 22~26) 的一系列 NMR 实验, 以允许化合物的指定。在 ~46 小时的样品制备后获取的 <sup>1</sup>H NMR 中 (图 27~28), 解析了 δ<sub>H</sub> 5.04 的异头共振, 其在原谱中被溶剂 (HOD) 遮蔽 (图 14)。

[0634]  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-DEPT 和  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC NMR 数据指示, 糖苷的中心核心是二萜。 $^1\text{H}$  和  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-DEPT 谱中观察到的 5 个异头质子的存在确认在结构中 5 个糖单元。 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-DEPT 谱中  $\delta_c$  69.9 的亚甲基  $^{13}\text{C}$  共振指示结构中 1  $\rightarrow$  6 糖连接的存在。通过使用  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC 和 1D-TOCSY 关联指定糖单元的连接。

[0635] 自  $\delta_H$  1.29 的甲基质子至  $\delta_c$  177.7 的羰基的 HMBC 关联允许叔甲基 (C-18) 之一以及 C-19 的指定, 及提供其余苷元的指定的起点。自甲基质子 (H-18) 至  $\delta_c$  38.9, 45.0 和 57.8 的碳的另外的 HMBC 关联允许 C-3, C-4 和 C-5 的指定。 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-DEPT 数据的分析指示  $\delta_c$  38.9 的碳是亚甲基, 和  $\delta_c$  57.8 的碳是甲炔基, 它们分别指定为 C-3 和 C-5。这使未在 HSQC-DEPT 谱中显示关联的  $\delta_c$  45.0 的碳被指定为四价碳, C-4。C-3 ( $\delta_H$  0.98 和 2j. 36) 和 C-5 ( $\delta_H$  1.04) 的  $^1\text{H}$  化学位移通过使用 HSQC-DEPT 数据指定。H-3 质子之一 ( $\delta_H$  0.98) 和  $\delta_H$  1.43 的质子之间的 COSY 关联允许 H-2 质子之一的指定, 其进而显示与指定为 C-1 的  $\delta_H$  0.75 的质子的关联。C-1 和 C-2 的余下  $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  化学位移然后基于另外的 COSY 和 HSQC-DEPT 关联指定, 及总结于下表。

[0636]  $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  NMR (500 和 125MHz, 吡啶- $d_5$ ), Reb D2 的指定。

[0637]

位置	Reb D2	
	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$
1	41.3	0.75t (11.0) 1.76m
2	19.9	1.43m 2.20m
3	38.9	0.98m 2.36 d (12.1)
4	45.0	---
5	57.8	1.04 d (12.5)
6	22.7	1.92m 2.43m
7	42.2	1.22m

[0638]

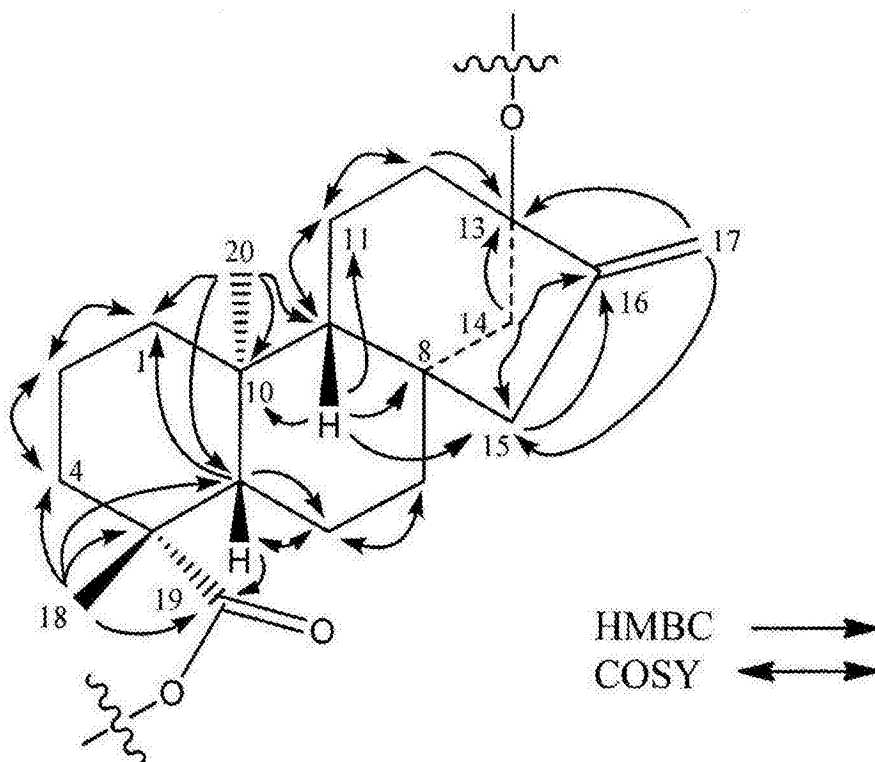
		<b>1.30m</b>
<b>8</b>	<b>43.1</b>	---
<b>9</b>	<b>54.5</b>	<b>0.88 br</b>
<b>10</b>	<b>40.3</b>	---
<b>11</b>	<b>21.1</b>	<b>1.65m</b> <b>1.69m</b>
<b>12</b>	<b>37.5</b>	<b>1.99m</b> <b>2.25m</b>
<b>13</b>	<b>87.1</b>	---
<b>14</b>	<b>44.5</b>	<b>1.80 d (11.7)</b> <b>2.65 d (11.7)</b>
<b>15</b>	<b>48.3</b>	<b>1.31m</b> <b>2.04 br</b>
<b>16</b>	<b>154.7</b>	---
<b>17</b>	<b>105.2</b>	<b>5.01s</b> <b>5.64s</b>
<b>18</b>	<b>28.8</b>	<b>1.29s</b>
<b>19</b>	<b>177.7</b>	---
<b>20</b>	<b>16.0</b>	<b>1.30 s</b>

[0639] 在  $\delta_{\text{H}}$  1.30 观察的其他叔甲基单态显示与 C-1 和 C-5 的 HMBC 关联, 及指定为 C-20。甲基质子显示与四价碳 ( $\delta_{\text{C}}$  40.3) 和甲炔基碳 ( $\delta_{\text{C}}$  54.5) 的另外的 HMBC 关联, 分别指定为 C-10 和 C-9。H-5 ( $\delta_{\text{H}}$  1.04) 和  $\delta_{\text{H}}$  1.92 和 2.43 的质子之间的 COSY 关联然后允许 H-6 质子的指定, 其进而显示与  $\delta_{\text{H}}$  1.22 和 1.30 的质子的关联, 其指定到 C-7。然后自 HSQC-DEPT 数据测定 C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  22.7) 和 C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  42.2) 的  $^{13}\text{C}$  化学位移。H-9 ( $\delta_{\text{H}}$  0.88) 和  $\delta_{\text{H}}$  1.65 和 1.69 的质子之间的 COSY 关联允许 H-11 质子的指定, 其进而显示与  $\delta_{\text{H}}$  1.99 和 2.25 的质子的 COSY 关联, 其指定为 H-12 质子。然后使用 HSQC-DEPT 数据指定 C-11 ( $\delta_{\text{C}}$  21.1) 和 C-12 ( $\delta_{\text{C}}$  37.5)。自 H-12 质子 ( $\delta_{\text{H}}$  2.25) 至  $\delta_{\text{C}}$  87.1 和 154.7 的碳的 HMBC 关联分别允许 C-13 和 C-16 的指定。在  $\delta_{\text{H}}$  5.01 和 5.64 观察的烯质子显示与 C-13 的 HMBC 关联, 及指定到 C-17 (经 HSQC-DEPT 的  $\delta_{\text{C}}$  105.2)。烯质子 H-17 和甲炔基质子 H-9 显示与  $\delta_{\text{C}}$  48.3 的碳的 HMBC 关联, 其指定为 C-15 的。自 H-9 至  $\delta_{\text{C}}$  44.5 的亚甲基碳的另外的 HMBC 关联然后允许 C-14 的指定。在 C-14 ( $\delta_{\text{H}}$  1.80 和 2.65) 和 C-15 ( $\delta_{\text{H}}$  1.31 和 2.04) 的  $^1\text{H}$  化学位移通过使用 HSQC-DEPT 数据指定。

[0640] NOESY 谱中观察到的关联用于指定中心二萜核心的相对立体化学。在 NOESY 谱中, H-14 和 H-20 之间观察到 NOE 关联, 指示 H-14 和 H-20 处于环的相同的面。类似地, 在 H-9 和 H-5, H-9 和 H-18 以及 H-5 和 H-18 之间观察到 NOE 关联, 但在 H-9 和 H-14 之间未观察到 NOE 关联, 指示 H-5, H-9 和 H-18 相比 H-14 和 H-20 而处在环的对面, 如显示于图 21。这些数据由此指示, 中心核心中的相对立体化学在糖基化步骤期间保留。

[0641] 以下提供用来指定苷元区的关键 HMBC 和 COSY 关联:

[0642]



[0643]  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-DEPT 数据的分析确认 5 异头质子的存在。异头质子中的 3 个在  $^1\text{H}$  NMR 谱中以  $\delta_{\text{H}}$  6.02 ( $\delta_{\text{C}}$  96.1), 5.57 ( $\delta_{\text{C}}$  105.3), 及 5.34 ( $\delta_{\text{C}}$  105.3) 良好解析。在  $^1\text{H}$  谱中被溶剂 (HOD) 共振遮蔽的在  $\delta_{\text{H}}$  5.04 ( $\delta_{\text{C}}$  105.6) 和 5.07 ( $\delta_{\text{C}}$  98.7) 观察到的余下 2 异头质子由  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-DEPT 数据鉴定。在  $\delta_{\text{H}}$  6.02 观察到的异头质子显示与 C-19 的 HMBC 关联, 其指示其对应于  $\text{Glc}_I$  的异头质子。类似地, 在  $\delta_{\text{H}}$  5.07 观察到的异头质子显示与 C-13 的 HMBC 关联, 使其被指定为  $\text{Glc}_{II}$  的异头质子。

[0644]  $\text{Glc}_I$  异头质子 ( $\delta_{\text{H}}$  6.02) 显示与  $\delta_{\text{H}}$  4.07 的质子的 COSY 关联被指定为  $\text{Glc}_I$  H-2, 其进而显示与  $\delta_{\text{H}}$  4.22 的质子 ( $\text{Glc}_I$  H-3) 的 COSY 关联, 其显示与  $\delta_{\text{H}}$  4.12 的质子 ( $\text{Glc}_I$  H-4) 的 COSY 关联。由于数据重叠, COSY 谱不允许 H-5 或 H-6 质子的指定。因此, 通过使用  $\text{Glc}_I$  异头质子的选择性辐射, 用几个不同混合时间实施一系列 1D-TOCSY 实验。除了确认  $\text{Glc}_I$  H-2 至 H-4 的指定之外, 1D-TOCSY 数据显示被指定为  $\text{Glc}_I$  H-5 的  $\delta_{\text{H}}$  4.04 的质子和被指定为  $\text{Glc}_I$  H-6 质子的  $\delta_{\text{H}}$  4.68 的质子之一。其后的质子也用于 1D-TOCSY 实验。用几个不同混合时间的 H-6 的选择性辐射也确认  $\text{Glc}_I$  H-1 至 H-5 以及余下 H-6 ( $\delta_{\text{H}}$  4.30) 的亚甲基质子的指定。通过使用  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-DEPT 数据测定  $\text{Glc}_I$  C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  74.2), C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  79.1), C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  72.1), C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  78.5), 及 C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  69.9) 的  $^{13}\text{C}$  化学位移的指定, 以完成  $\text{Glc}_I$  的指定。此外,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-DEPT 谱中在  $\delta_{\text{C}}$  69.9 的亚甲基  $^{13}\text{C}$  共振的存在指示结构中  $\text{Glc}_I$  的 1  $\rightarrow$  6 糖连接。

[0645] 在 4 个余下未指定的葡萄糖部分中, 一个基于  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-DEPT, HMBC 和 1D-TOCSY 关联指定为在  $\text{Glc}_I$  的 C-6 的取代基。HSQC-DEPT 谱中在  $\delta_{\text{C}}$  69.9 的  $\text{Glc}_I$  的亚甲基  $^{13}\text{C}$  共振的相对低磁场位移指示  $\text{Glc}_I$  的 1  $\rightarrow$  6 糖连接。在  $\delta_{\text{H}}$  5.04 观察到的异头质子显示与  $\text{Glc}_I$  C-6 的 HMBC 关联, 及指定为  $\text{Glc}_V$  的异头质子。类似地, 显示与  $\text{Glc}_V$  的异头碳的 HMBC 关联的  $\text{Glc}_I$  的亚甲基质子确认  $\text{Glc}_I$  和  $\text{Glc}_V$  之间 1  $\rightarrow$  6 糖连接的存在。  $\text{Glc}_V$  异头质子显示与  $\delta_{\text{H}}$  4.00 的质子的 COSY 关联, 其指定为  $\text{Glc}_V$  H-2, 其进而显示与  $\delta_{\text{H}}$  4.22 的质子 ( $\text{Glc}_V$  H-3) 的

COSY 关联。由于数据重叠, COSY 谱未允许基于 Glc<sub>v</sub> H-3 的 COSY 关联而 Glc<sub>v</sub> H-4 的指定。但是, 在 HMBC 谱中, Glc<sub>v</sub> H-3 显示与 Glc<sub>v</sub> C-5 ( $\delta_c$  78.9) 的关联。在 HSQC-DEPT 谱中, Glc<sub>v</sub> C-5 显示与  $\delta_H$  3.89 (Glc<sub>v</sub> H-5) 的关联。Glc<sub>v</sub> H-5 显示与  $\delta_H$  4.21, 4.37 和 4.48 的 COSY 关联。在 HSQC-DEPT 谱中,  $\delta_H$  4.21 显示与  $\delta_c$  71.4 (Glc<sub>v</sub> H-4) 的关联, 而  $\delta_H$  4.37 和 4.48 显示与  $\delta_c$  63.1 的关联, 及分别指定为 Glc<sub>v</sub> H-6a 和 H-6b。通过使用 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC-DEPT 数据测定 Glc<sub>v</sub> C-2 ( $\delta_c$  75.7) 和 C-3 ( $\delta_c$  79.1) 的 <sup>13</sup>C 化学位移的指定, 以完成 Glc<sub>v</sub> 的指定。

[0646] 在 C-19 的糖苷的 <sup>1</sup>H 和 <sup>13</sup>C 化学位移的总结显示于以下表:

[0647] <sup>1</sup>H 和 <sup>13</sup>C NMR (500 和 125MHz, 吡啶-d<sub>5</sub>), reb D2C-19 糖苷的指定。

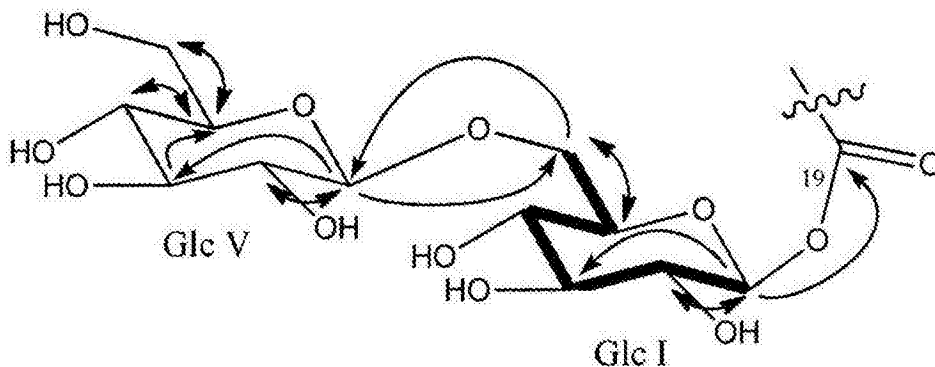
[0648]

Reb D2		
位置	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H
Glc <sub>I</sub> -1	96.1	6.02 d (8.1)
Glc <sub>I</sub> -2	74.2	4.07m
Glc <sub>I</sub> -3	79.1 <sup>#</sup>	4.22m <sup>#</sup>
Glc <sub>I</sub> -4	72.1	4.12m
Glc <sub>I</sub> -5	78.5	4.04m
Glc <sub>I</sub> -6	69.9	4.30m 4.68 d (10.7)
Glc <sub>v</sub> -1	105.6	5.04 (8.1)
Glc <sub>v</sub> -2	75.7	4.00m
Glc <sub>v</sub> -3	79.1 <sup>#</sup>	4.22m <sup>#</sup>
Glc <sub>v</sub> -4	71.4	4.21m
Glc <sub>v</sub> -5	78.9	3.89m
Glc <sub>v</sub> -6	63.1	4.37m 4.48m

[0649] <sup>#</sup>1H 和 <sup>13</sup>C 值可为在位置 Glc<sub>I</sub>-3, Glc<sub>v</sub>-3 和 Glc<sub>IV</sub>-3 之间可交换的。

[0650] 以下提供用来指定 C-19 糖苷区的关键 HMBC, COSY 和 1D-TOCSY 关联的总结。

[0651]



[0652]



[0653]

## =<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY

[0654]

### =<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H 旋转系统基于的 1D-TOCSY

[0655] 以类似方式实施 Glc<sub>II</sub> 的指定。Glc<sub>II</sub> 异头质子 ( $\delta_{\text{H}}$  5.07) 显示与  $\delta_{\text{H}}$  4.37 的质子的 COSY 关联, 被指定为 Glc<sub>II</sub> H-2, 其进而显示与  $\delta_{\text{H}}$  4.18 的质子 (Glc<sub>II</sub> H-3) 的 COSY 关联。此后的质子显示与  $\delta_{\text{H}}$  3.88 的质子 (Glc<sub>II</sub> H-4) 的另外的关联, 其也显示与  $\delta_{\text{H}}$  3.79 的质子 (Glc<sub>II</sub> H-5) 的 COSY 关联。Glc<sub>II</sub> H-5 也显示与 Glc<sub>II</sub> H-6 质子 ( $\delta_{\text{H}}$  4.08 和 4.46) 的 COSY 关联。通过使用 HSQC-DEPT 数据测定 Glc<sub>II</sub> C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  81.3), C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  88.4), C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  71.1), C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  77.9), 及 C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  63.2) 的 <sup>13</sup>C 化学位移的指定。自 Glc<sub>II</sub> H-3 至 C-2 和 C-4 和也自 Glc<sub>II</sub> H-4 至 C-2 和 C-5 的 HMBC 关联确认以上进行的指定。还支持 Glc<sub>II</sub> H-4 与 Glc<sub>II</sub> C-6 的另外的 HMBC 关联, 以完成 Glc<sub>II</sub> 的指定。

[0656] 余下未指定的葡萄糖部分中的 2 个基于 HMBC 关联指定为在 Glc<sub>II</sub> 的 C-2 和 C-3 的取代基。在  $\delta_{\text{H}}$  5.57 观察到的异头质子显示与 Glc<sub>II</sub> C-2 的 HMBC 关联, 及指定为 Glc<sub>III</sub> 的异头质子。在  $\delta_{\text{H}}$  5.34 观察到的异头质子显示与 Glc<sub>II</sub> C-3 的 HMBC 关联, 及指定为 Glc<sub>IV</sub> 的异头质子。也观察到自 Glc<sub>II</sub> H-2 至 Glc<sub>III</sub> 的异头碳及自 Glc<sub>II</sub> H-3 至 Glc<sub>IV</sub> 的异头碳的交互 HMBC 关联。

[0657] Glc<sub>III</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  5.57) 的异头质子显示与  $\delta_{\text{H}}$  4.19 的质子的 COSY 关联, 其指定为 Glc<sub>III</sub> H-2。由于数据重叠, COSY 谱未允许 H-3 至 H-6 质子的指定。因此, 通过使用 Glc<sub>III</sub> 异头质子的选择性辐射, 用几个不同混合时间实施一系列 1D-TOCSY 实验。除了确认 Glc<sub>III</sub> H-2 的指定之外, 1D-TOCSY 数据显示  $\delta_{\text{H}}$  4.24 (Glc<sub>III</sub> H-3),  $\delta_{\text{H}}$  4.27 (Glc<sub>III</sub> H-4), 及  $\delta_{\text{H}}$  3.94 (Glc<sub>III</sub> H-5) 的质子。一旦 H-4 通过使用 1D-TOCSY 数据指定, 自 H-4 至 H-5 和进而至 H-6 的 COSY 关联被用于指定 H-6。在 COSY 谱中, Glc<sub>III</sub> H-4 显示与 Glc<sub>III</sub> H-5 的关联, 其进而显示分别与 Glc<sub>III</sub> H-6a 和 H-6b 的  $\delta_{\text{H}}$  4.41 和 4.50 的 COSY 关联。然后通过使用 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC-DEPT 关联测定 Glc<sub>III</sub> C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  76.8), C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  78.9), C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  72.4), C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  78.8), 及 C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  63.5) 的 <sup>13</sup>C 化学位移, 以完成 Glc<sub>III</sub> 的指定。

[0658] Glc<sub>IV</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  5.34) 的异头质子显示与  $\delta_{\text{H}}$  4.06 的质子的 COSY 关联, 其被指定为 Glc<sub>IV</sub> H-2。由于数据重叠, COSY 谱未允许 H-3 至 H-6 质子的指定。因此, 通过使用 Glc<sub>IV</sub> 异头质子的选择性辐射, 用几个不同混合时间实施一系列 1D-TOCSY 实验。除了确认 Glc<sub>IV</sub> H-2 的指定之外, 1D-TOCSY 数据显示  $\delta_{\text{H}}$  4.22 (Glc<sub>IV</sub> H-3),  $\delta_{\text{H}}$  4.18 (Glc<sub>IV</sub> H-4), 及  $\delta_{\text{H}}$  4.10 (Glc<sub>IV</sub> H-5) 的质子。一旦 H-4 通过使用 1D-TOCSY 数据指定, 自 H-4 至 H-5 和进而至 H-6 的 COSY 关联用于指定 H-6。在 COSY 谱中, Glc<sub>IV</sub> H-4 显示与 Glc<sub>IV</sub> H-5 的关联, 其进而显示分别与  $\delta_{\text{H}}$  4.32 和 4.58, Glc<sub>IV</sub> H-6a 和 H-6b 的 COSY 关联。然后通过使用 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC-DEPT 关联测定 Glc<sub>IV</sub> C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  75.8), C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  78.9), C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  72.0), C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  79.3), 及 C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  62.9) 的 <sup>13</sup>C 化学位移, 以完成 Glc<sub>IV</sub> 的指定。

[0659] 就在  $\delta_{\text{H}}$  6.02 (d, J = 8.1 Hz), 5.57 (d, J = 7.6 Hz), 5.34 (d, J = 7.9 Hz) 和  $\delta_{\text{H}}$  5.04 (d, J = 8.1 Hz) 的葡萄糖部分的异头质子观察到的大偶联常数推荐它们的  $\beta$ -取向 (图 14, 27 和 28)。而余下  $\delta_{\text{H}}$  5.07 的异头质子被溶剂共振 (HDO) 遮蔽, 自 1D TOCSY 数据 (图 24) 得知的其偶联常数 (J = ~ 8 Hz) 也指示  $\beta$ -取向。

[0660] 在 C-13 的糖苷的  $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  化学位移的总结显示于下表：

[0661]  $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  NMR (500 和 125MHz, 吡啶- $d_5$ ), Reb D2C-13 糖苷的指定。

[0662]

<b>Reb D2</b>		
<b>位置</b>	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$
<b>Glc<sub>II</sub>-1</b>	<b>98.7</b>	<b>5.07 (~8)*</b>
<b>Glc<sub>II</sub>-2</b>	<b>81.3</b>	<b>4.37m</b>
<b>Glc<sub>II</sub>-3</b>	<b>88.4</b>	<b>4.18m</b>
<b>Glc<sub>II</sub>-4</b>	<b>71.1</b>	<b>3.88m</b>
<b>Glc<sub>II</sub>-5</b>	<b>77.9</b>	<b>3.79m</b>
<b>Glc<sub>II</sub>-6</b>	<b>63.2</b>	<b>4.08m</b> <b>4.47m</b>
<b>Glc<sub>III</sub>-1</b>	<b>105.3</b>	<b>5.57 d (7.6)</b>
<b>Glc<sub>III</sub>-2</b>	<b>76.8</b>	<b>4.19m</b>
<b>Glc<sub>III</sub>-3</b>	<b>78.9</b>	<b>4.24m</b>
<b>Glc<sub>III</sub>-4</b>	<b>72.4</b>	<b>4.27m</b>

[0663]

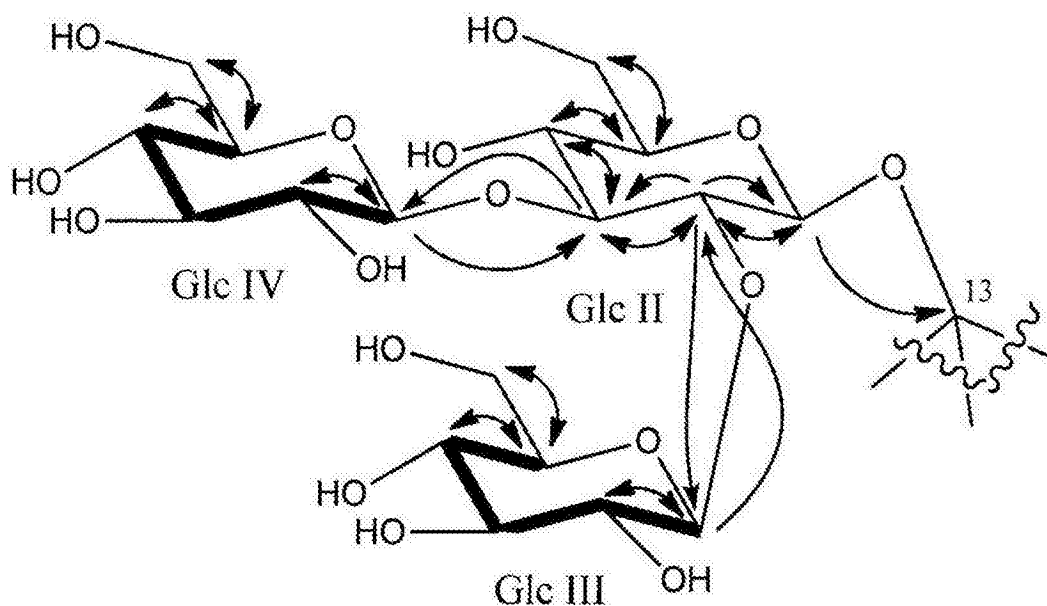
<b>Glc<sub>III</sub>-5</b>	<b>78.8</b>	<b>3.94m</b>
<b>Glc<sub>III</sub>-6</b>	<b>63.5</b>	<b>4.41m</b> <b>4.50m</b>
<b>Glc<sub>IV</sub>-1</b>	<b>105.3</b>	<b>5.34 d (7.9)</b>
<b>Glc<sub>IV</sub>-2</b>	<b>75.8</b>	<b>4.06m</b>
<b>Glc<sub>IV</sub>-3</b>	<b>78.9<sup>#</sup></b>	<b>4.22m<sup>#</sup></b>
<b>Glc<sub>IV</sub>-4</b>	<b>72.0</b>	<b>4.18m</b>
<b>Glc<sub>IV</sub>-5</b>	<b>79.3</b>	<b>4.10m</b>
<b>Glc<sub>IV</sub>-6</b>	<b>62.9</b>	<b>4.32m</b> <b>4.58m</b>

[0664] \* 异头质子被溶剂 (H<sub>2</sub>O) 共振遮蔽, 自 1D-TOCSY 数据获得的偶联恒定值。

[0665] <sup>#</sup> $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  值可为在 Glc<sub>I</sub>-3, Glc<sub>V</sub>-3 和 Glc<sub>IV</sub>-3 之间可交换的。

[0666] 以下提供用来指定 C-13 糖苷区的关键 HMBC, COSY 和 1D-TOCSY 关联的总结：

[0667]



[0668]

↷ =  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  HMBC

[0669]

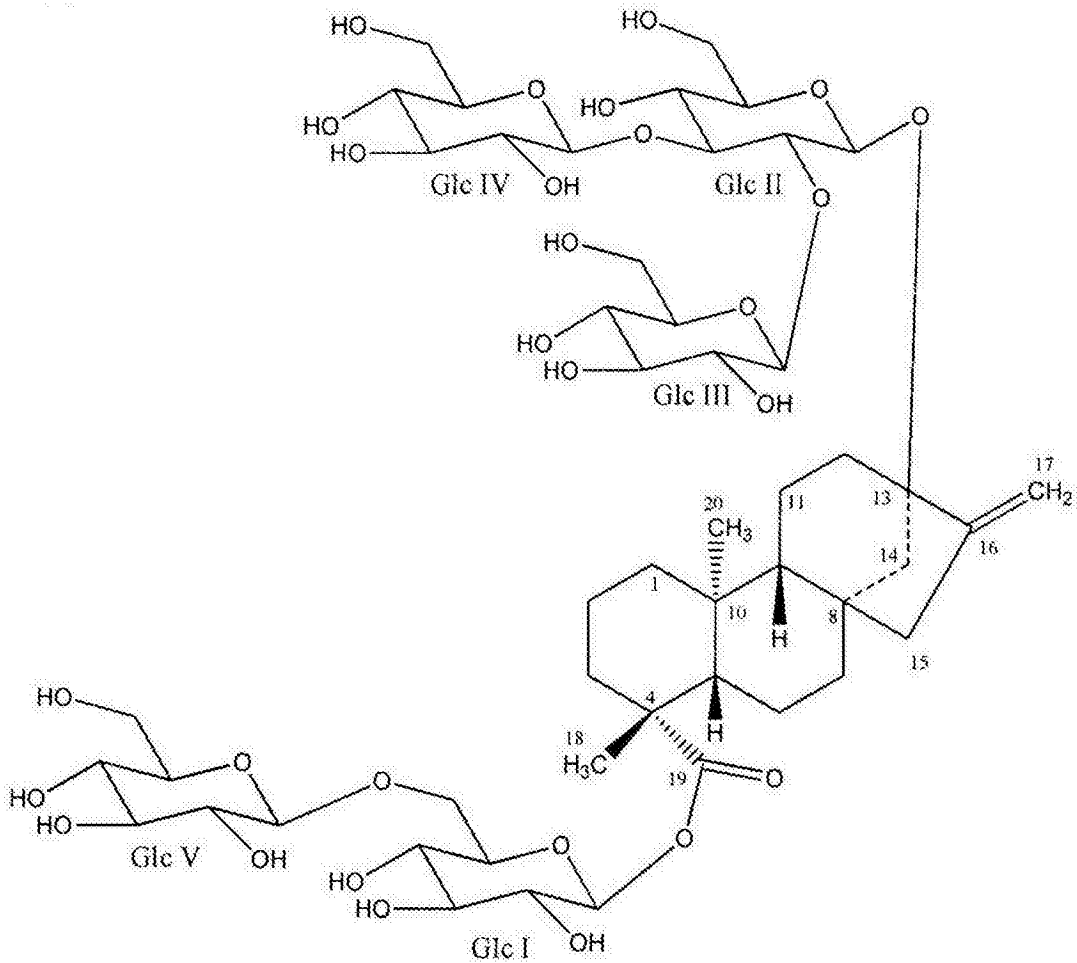
↔ =  $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY

[0670]

—— =  $^1\text{H}-^1\text{H}$  旋转系统基于的 1D-TOCSY

[0671] NMR 和 MS 分析允许以下显示的结构的全指定。化合物的化学名称是 13-[(2-O-β-D-吡喃葡萄糖基-3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)氧基]对映-贝壳杉-16-烯-19-酸-[(6-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)酯](莱苞迪昔 D2 或 reb D2)。化合物是莱苞迪昔 D 的异构体。

[0672]



[0673] 【实施例 40 :Reb M2 的分离和表征】

[0674] 粗反应样品。根据实施例 22 用 UGTSL(GI#460409128) 制备用于分离的样品, Lot CB-2977-106。

[0675] HPLC 分析. 通过使用 Waters 2695Alliance 系统用以下方法实施初步 HPLC 分析: phenomenex Synergi 氢 -RP, 4.6×250mm, 4 μm(p/n 00G-4375-E0); 柱 Temp :55℃; 移动 A 相 :水中的 0.0284% NH<sub>4</sub>OAc 和 0.0116% HOAc; 移动 B 相 :乙腈 (MeCN); 流速 :1.0mL/min; 注射体积 :10 μL。检测由 UV(210nm) 和 CAD 实施。

[0676] 梯度 :

[0677]

时间 (min)	% A	% B
0.0-5.0	100	0
20	20	80
25	20	80
30	100	0

[0678] 用以下方法实施半 - 制备性纯化级分的分析 :水 Atlantis dC18, 4.6×100mm, 5 μm(p/n 186001340); 移动 A 相 :水中 25% MeCN; 移动 B 相 :水中 30% MeCN; 流速 :1.0mL/

min;注射体积:10  $\mu$ L。检测由 CAD 实施。

[0679] 梯度:

[0680]

时间 (min)	% A	% B
0.0-8.5	75	25
10.0	71	29
16.5	70	30
18.5-24.5	66	34
26.5-29.0	48	52
31-37	30	70
38	75	25

[0681] LC-MS. 在具有以阴离子模式操作的 Waters 3100 质量检测器的 Waters AutoPurification HPLC/MS 系统上实施半 - 合成甜叶菊醇糖苷混合物的初步分析。通过使用以下方法实施样品分析:phenomenex Synergi 氢 -RP, 4.6 $\times$ 250mm, 4  $\mu$ m(p/n 00G-4375-E0);柱 Temp :55  $^{\circ}$ C ;移动 A 相 :水中的 0.0284%  $\text{NH}_4\text{OAc}$  和 0.0116%  $\text{HOAc}$  ;移动 B 相 :MeCN ;流速 :1.0mL/min ;注射体积 :10  $\mu$ L。检测由 UV(210nm), 及 MSD(-ESI m/z 500-2000) 实施。梯度条件如以上所列。

[0682] 分离由 HPLC。纯化实施在 2 步骤中。以下总结用于半 - 制备性纯化的第 1 方法。柱 :水 Atlantis dC18, 30 $\times$ 100mm, 5  $\mu$ m(p/n 186001375) ;移动 A 相 :水中 25% MeCN ;移动 B 相 :水中 30% MeCN ;流速 :45mL/min ;注射负荷 :20mL 的水中溶解的 160mg。检测由 UV(205nm) 实施。

[0683] 梯度:

[0684]

时间 (min)	% A	% B
0.0-5.0	100	0
20	20	80
25	20	80
30	100	0

[0685] 第二纯化使用相同的柱和条件,但等度移动相 :水中 20% MeCN。

[0686] MS 和 MS/MS。用装备电喷射电离源的 Premier 质谱仪的 Waters QT 产生 MS 和 MS/MS 数据。样品由负 ESI 分析。样品用  $\text{H}_2\text{O}:\text{MeCN}(1:1)$  稀释 50 倍,及经输注使用机载注射器

泵导入。稀释样品而产生以 0.01mg/mL 的近似的浓度存在的良好 s/n。

[0687] NMR. 通过在 150  $\mu$ L 的 D<sub>2</sub>O 中溶解 ~ 1.0mg 来制备样品, 在具有 2.5mm 倒转检测探针的 Bruker Avance 500MHz 仪器上获取 NMR 数据。<sup>1</sup>H NMR 和 <sup>13</sup>C NMR 谱分别参比残留的溶剂信号 H<sub>2</sub>O ( $\delta_{\text{H}}$  4.79ppm) 和 TSP ( $\delta_{\text{C}}$  0.00ppm)。

[0688] 【结果和讨论】

[0689] 分离和纯化。通过使用根据实施例 22 用 UGTSL(GI#460409128) 制备的甜叶菊醇糖苷混合物 (批号 CB-2977-106) 实施分离。由 LC-MS 使用上述方法分析物质 (图 11)。目标靶向的峰在 TIC 层析谱中在 4.1min 处。此峰的质谱提供在 m/z 1289.7 的 [M-H] 离子。将提供的样品在单注射 (160mg) 中, 使用以上提供的第 1 方法条件预先处理。此方法将物质分级分离为糖苷的 ‘极性’ 和 ‘非-极性’ 混合物。‘极性’ 混合物然后通过使用以上提供的第 2- 步骤条件再处理。半-制备性 HPLC 踪迹显示于图 12。自此半-制备性收集, 分离纯度 >99% 的峰 (CAD, AUC)。级分分析提供于图 13。纯化后, 级分由旋转蒸发于 35°C 浓缩, 及冷冻干燥。获得大致 1mg。

[0690] 质量光谱法. 通过输注 CC-00300 的样品获取的 ESI-TOF 质谱显示在 m/z 1289.5266 的 [M-H] 离子。[M-H] 离子的质量与对 reb M2 预期的分子式 C<sub>56</sub>H<sub>90</sub>O<sub>33</sub> 良好一致 (经计算是 C<sub>56</sub>H<sub>89</sub>O<sub>33</sub>:1289.5286, 误差: -1.6ppm)。MS 数据确认, CC-00300 具有 1290Da 的标称质量, 分子式是 C<sub>56</sub>H<sub>90</sub>O<sub>33</sub>。

[0691] MS/MS 谱 (选择在 m/z 1289.5 的 [M-H] 离子用于片段化) 指示在 m/z 803.3688 的 3 个葡萄糖单元的丢失, 和在 m/z 641.3165, 479.2633 和 317.2082 的 3 个葡萄糖部分的连续丢失。

[0692] NMR 光谱学. 实施包括 <sup>1</sup>H NMR (图 29), <sup>13</sup>C NMR (图 30 和 31), <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (图 32), HSQC-DEPT (图 33), HMBC (图 34 和 35), 及 1D-TOCSY (图 36 ~ 39) 的一系列 NMR 实验, 以允许 reb M2 的指定。

[0693] <sup>1</sup>H, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC-DEPT 和 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC NMR 数据指示, 糖苷的中心核心是二萜。在 <sup>1</sup>H 和 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC-DEPT 谱中观察到的 6 个异头质子的存在确认结构中 6 个糖单元。在 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC-DEPT 谱中  $\delta_{\text{C}}$  70.9 的亚甲基 <sup>13</sup>C 共振指示结构中 1 → 6 糖连接的存在。通过使用 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMBC 和 1D-TOCSY 关联指定糖单元的连接。

[0694] 自  $\delta_{\text{H}}$  1.29 的甲基质子与  $\delta_{\text{C}}$  181.5 的羰基的 HMBC 关联允许叔甲基 (C-18) 以及 C-19 之一的指定, 及提供指定其余苷元的起点。自甲基质子 (H-18) 至  $\delta_{\text{C}}$  39.8, 43.7 和 59.2 的碳的另外的 HMBC 关联允许 C3, C4 和 C5 的指定。<sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC-DEPT 数据的分析指示,  $\delta_{\text{C}}$  39.8 的碳是亚甲基, 和  $\delta_{\text{C}}$  59.2 的碳是甲炔基, 分别指定为 C-3 和 C-5。这使未在 HSQC-DEPT 谱中显示关联的  $\delta_{\text{C}}$  43.7 的碳被指定为四价碳, C-4。通过使用 HSQC-DEPT 数据指定 C-3 ( $\delta_{\text{H}}$  1.16 和 2.28) 和 C-5 ( $\delta_{\text{H}}$  1.24) 的 <sup>1</sup>H 化学位移。H-3 质子之一 ( $\delta_{\text{H}}$  1.16) 和  $\delta_{\text{H}}$  1.49 的质子之间的 COSY 关联允许 H-2 质子之一的指定, 其进而显示与  $\delta_{\text{H}}$  0.92 的质子的关联, 其被指定为 C-1。C-1 和 C-2 的余下 <sup>1</sup>H 和 <sup>13</sup>C 化学位移然后基于另外的 COSY 和 HSQC-DEPT 关联指定, 及总结于下表。

[0695] <sup>1</sup>H NMR (500MHz, D<sub>2</sub>O) 和 <sup>13</sup>C NMR (125MHz, D<sub>2</sub>O/TSP)。Reb M2 苷元的指定。

[0696]

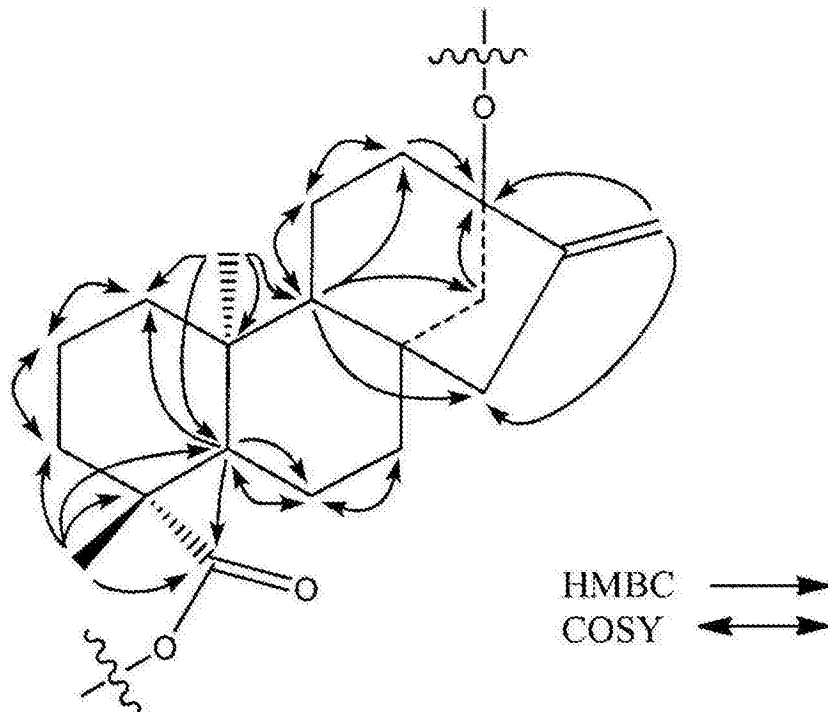
位置	$^{13}\text{C}$	$^1\text{H}$
1	41.9	0.92m 1.93m
2	21.8	1.49m 1.86m
3	39.8	1.16m 2.28 d (13.4)
4	43.7	---
5	59.2	1.24 d (12.1)
6	24.4	1.73m 1.94m
7	44.2	1.49m 1.56m
8	46.9	---
9	55.5	1.09 d (7.7)
10	42.4	---
11	22.6	1.66m 1.70m
12	39.9	1.60m 2.00m
13	90.9	---
14	46.9	1.53 d (12.6) 2.21 d (13.6)
15	49.4	2.15 d (17.2) 2.18 d (18.1)
16	164.0	---
17	107.0	4.98s 5.16s
18	31.0	1.29s
19	181.5	---
20	19.1	0.92s

[0697] 在  $\delta_{\text{H}}$  0.92 观察到的其他叔甲基单态显示与 C-1 和 C-5 的 HMBC 关联, 及指定为 C-20。甲基质子显示与四价碳 ( $\delta_{\text{C}}$  42.4) 和甲炔基 ( $\delta_{\text{C}}$  55.5) 的另外的 HMBC 关联, 分别指定为 C-10 和 C-9。H-5 ( $\delta_{\text{H}}$  1.24) 和  $\delta_{\text{H}}$  1.73 和 1.94 的质子之间的 COSY 关联然后允许 H-6 质子的指定, 其进而显示与  $\delta_{\text{H}}$  1.49 和 1.56 的质子的关联, 其被指定到 C-7。然后自 HSQC-DEPT 数据测定 C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  24.4) 和 C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  44.2) 的  $^{13}\text{C}$  化学位移。H-9 ( $\delta_{\text{H}}$  1.09) 和  $\delta_{\text{H}}$  1.66 和 1.70 的质子之间的 COSY 关联允许 H-11 质子的指定, 其进而显示与  $\delta_{\text{H}}$  1.60 和 2.00 的质子的 COSY 关联, 其被指定为 H-12 质子。然后使用 HSQC-DEPT 数据指定 C-11 ( $\delta_{\text{C}}$  22.6) 和 C-12 ( $\delta_{\text{C}}$  39.9)。在  $\delta_{\text{H}}$  4.98 和 5.16 观察到的烯质子显示与 C-13 ( $\delta_{\text{C}}$  90.9) 的 HMBC 关联, 及指定到 C-17 ( $\delta_{\text{C}}$  107.0 经 HSQC-DEPT)。烯质子 H-17 显示与  $\delta_{\text{C}}$  49.4 的碳的

HMBC 关联,其被指定为 C-15。自 H-9 至  $\delta_c$  46.9 的亚甲基碳的另外的 HMBC 关联然后允许 C-14 的指定。在 C-14 ( $\delta_H$  1.53 和 2.21) 和 C-15 ( $\delta_H$  2.15 和 2.18) 的  $^1H$  化学位移通过使用 HSQC-DEPT 数据指定。

[0698] 以下提供用来指定苷元区的关键 HMBC 和 COSY 关联的总结:

[0699]



[0700]  $^1H$ - $^{13}C$  HSQC-DEPT 数据的分析确认 6 个异头质子的存在。异头质子中的 3 个在  $^1H$  NMR 谱中以  $\delta_H$  5.65 ( $\delta_c$  95.5), 4.92 ( $\delta_c$  104.9), 及 4.50 ( $\delta_c$  105.7) 良好解析。在  $\delta_H$  4.85 ( $\delta_c$  98.4), 4.84 ( $\delta_c$  105.0), 及 4.83 ( $\delta_c$  105.3) 观察到的余下 3 个异头质子在  $^1H$  谱中被残留的溶剂共振重叠。在  $\delta_H$  5.65 观察到的异头质子显示与 C-19 的 HMBC 关联,其指示其对应于 Glc<sub>I</sub> 的异头质子。类似地,在  $\delta_H$  4.85 观察到的异头质子显示与 C-13 的 HMBC 关联,允许其被指定为 Glc<sub>II</sub> 的异头质子。

[0701] Glc<sub>I</sub> 异头质子 ( $\delta_H$  5.65) 显示与  $\delta_H$  3.96 的质子的 COSY 关联,其被指定为 Glc<sub>I</sub> H-2,其进而显示与  $\delta_H$  3.89 的质子 (Glc<sub>I</sub> H-3) 的 COSY 关联,其显示与  $\delta_H$  3.71 的质子 (Glc<sub>I</sub> H-4) 的 COSY 关联。由于数据重叠, COSY 谱未允许 H-5 或 H-6 质子的指定。因此,通过使用 Glc<sub>I</sub> 异头质子的选择性辐射,用几个不同混合时间实施一系列 1D-TOCSY 实验。除了确认 Glc<sub>I</sub> H-2 至 H-4 的指定之外, 1D-TOCSY 数据显示被指定为 Glc<sub>I</sub> H-5 的  $\delta_H$  3.73 的质子和被指定为 Glc<sub>I</sub> H-6 质子的  $\delta_H$  4.15 的质子之一。后来的质子也用于 1D-TOCSY 实验。用几个不同混合时间的 H-6 的选择性辐射也确认 Glc<sub>I</sub> H-1 至 H-5 以及 H-6 ( $\delta_H$  4.00) 的余下亚甲基质子的指定。通过使用  $^1H$ - $^{13}C$  HSQC-DEPT 数据测定 Glc<sub>I</sub> C-2 ( $\delta_c$  80.5), C-3 ( $\delta_c$  79.0), C-4 ( $\delta_c$  71.5), C-5 ( $\delta_c$  79.0), 及 C-6 ( $\delta_c$  70.9) 的  $^{13}C$  化学位移的指定,以完成 Glc<sub>I</sub> 的指定。此外,在  $^1H$ - $^{13}C$  HSQC-DEPT 谱中在  $\delta_c$  70.9 的亚甲基  $^{13}C$  共振的存在指示结构中 Glc<sub>I</sub> 的 1 → 6 糖连接。

[0702] 未指定的葡萄糖部分中的 2 个基于 HMBC 关联被指定为在 Glc<sub>I</sub> 的 C-2 和 C-6 的取代基。在  $\delta_H$  4.83 观察到的异头质子显示与 Glc<sub>I</sub> C-2 的 HMBC 关联,及指定为 Glc<sub>I</sub> 的异头

质子。在  $\delta_{\text{H}}$  4.50 观察到的异头质子显示与 Glc<sub>I</sub> C-6 的 HMBC 关联,及指定为 Glc<sub>VI</sub> 的异头质子。也观察到自 Glc<sub>I</sub> H-2 至 Glc<sub>V</sub> 的异头碳及自 Glc<sub>I</sub> H-6 至 Glc<sub>VI</sub> 的异头碳的交互 HMBC 关联。

[0703] Glc<sub>V</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  4.83) 的异头质子显示与  $\delta_{\text{H}}$  3.32 的质子的 COSY 关联,其被指定为 Glc<sub>V</sub> H-2。Glc<sub>V</sub> H-2 进而显示与  $\delta_{\text{H}}$  3.51 的质子 (Glc<sub>V</sub> H-3) 的 COSY 关联。此后的质子显示与  $\delta_{\text{H}}$  3.38 的质子 (Glc<sub>V</sub> H-4) 的另外的关联。H-4 也显示与  $\delta_{\text{H}}$  3.55 (Glc<sub>V</sub> H-5) 和 Glc<sub>V</sub> H-5 的质子的 COSY 关联,进而显示与 Glc<sub>V</sub> H-6 质子 ( $\delta_{\text{H}}$  3.76 和 3.97) 的 COSY 关联。通过使用 HSQC-DEPT 数据测定 Glc<sub>V</sub> C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  78.5), C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  78.7), C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  72.9), C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  78.8), 及 C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  63.6) 的 <sup>13</sup>C 化学位移的指定。自 Glc<sub>V</sub> H-3 至 C-2 和 C-4 和也自 Glc<sub>V</sub> H-4 至 C-3 和 C-6 的 HMBC 关联确认以上进行的指定,以完成 Glc<sub>V</sub> 的指定。

[0704] 另一葡萄糖部分于 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC-DEPT 和 HMBC 关联指定为 Glc<sub>I</sub> 基的 C-6 的取代基。HSQC-DEPT 谱中在  $\delta_{\text{C}}$  70.9 的 Glc<sub>I</sub> 的亚甲基 <sup>13</sup>C 共振的相对低磁场位移指示 Glc<sub>I</sub> 的 1 → 6 糖连接。在  $\delta_{\text{H}}$  4.50 观察到的异头质子显示与 Glc<sub>I</sub> C-6 的 HMBC 关联,及指定为 Glc<sub>VI</sub> 的异头质子。类似地, Glc<sub>I</sub> 的亚甲基质子显示与 Glc<sub>VI</sub> 的异头碳的 HMBC 关联,和此确认 Glc<sub>I</sub> 和 Glc<sub>VI</sub> 之间的 1 → 6 糖连接的存在。Glc<sub>VI</sub> 异头质子显示与  $\delta_{\text{H}}$  3.33 的质子的 COSY 关联,其被指定为 Glc<sub>VI</sub> H-2,其进而显示与  $\delta_{\text{H}}$  3.49 的质子 (Glc<sub>VI</sub> H-3) 的 COSY 关联。由于数据重叠, COSY 谱未允许基于的 COSY 关联指定 Glc<sub>V</sub> H-4 至 H-6。因此,通过使用 Glc<sub>VI</sub> 异头质子的选择性辐射,用不同混合时间实施一系列 1D-TOCSY 实验。除了确认 Glc<sub>VI</sub> H-2 至 H-3 的指定之外,1D-TOCSY 数据显示为 Glc<sub>VI</sub> H-6 质子指定的  $\delta_{\text{H}}$  3.45 (Glc<sub>VI</sub> H-4) 和  $\delta_{\text{H}}$  3.48 (Glc<sub>VI</sub> H-5) 的质子和  $\delta_{\text{H}}$  3.92 和 3.94 的质子。通过使用 <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC-DEPT 数据测定 Glc<sub>VI</sub> C-2 ( $\delta_{\text{C}}$  78.1), C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  78.6), C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  72.3), C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  78.8), 及 C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  64.1) 的 <sup>13</sup>C 化学位移的指定,以完成 Glc<sub>VI</sub> 的指定。

[0705] 在 C-19 糖苷的 <sup>1</sup>H 和 <sup>13</sup>C 化学位移的总结见于下表:

[0706] <sup>1</sup>H NMR (500MHz, D<sub>2</sub>O) 和 <sup>13</sup>C NMR (125MHz, D<sub>2</sub>O/TSP)。 Reb M2 糖苷的指定。

[0707]

位置	<sup>13</sup> C	<sup>1</sup> H
<b>Glc<sub>I</sub>-1</b>	<b>95.5</b>	<b>5.65 d (7.6)</b>
<b>Glc<sub>I</sub>-2</b>	<b>80.5</b>	<b>3.96m</b>
<b>Glc<sub>I</sub>-3</b>	<b>79.0</b>	<b>3.89m</b>
<b>Glc<sub>I</sub>-4</b>	<b>71.5</b>	<b>3.71m</b>
<b>Glc<sub>I</sub>-5</b>	<b>79.0</b>	<b>3.73m</b>
<b>Glc<sub>I</sub>-6</b>	<b>70.9</b>	<b>4.00m</b> <b>4.15 d (11.7)</b>
<b>Glc<sub>V</sub>-1</b>	<b>105.3*</b>	<b>4.83* d (8.0)</b>
<b>Glc<sub>V</sub>-2</b>	<b>78.5</b>	<b>3.32m</b>
<b>Glc<sub>V</sub>-3</b>	<b>78.7</b>	<b>3.51m</b>
<b>Glc<sub>V</sub>-4</b>	<b>72.9</b>	<b>3.38m</b>
<b>Glc<sub>V</sub>-5</b>	<b>78.8</b>	<b>3.55m</b>

[0708]

<b>Glc<sub>V</sub>-6</b>	<b>63.6</b>	<b>3.76m</b> <b>3.97m</b>
<b>Glc<sub>VI</sub>-1</b>	<b>105.7</b>	<b>4.50 d (7.9)</b>
<b>Glc<sub>VI</sub>-2</b>	<b>78.1</b>	<b>3.33m</b>
<b>Glc<sub>VI</sub>-3</b>	<b>78.6</b>	<b>3.49m</b>
<b>Glc<sub>VI</sub>-4</b>	<b>72.3</b>	<b>3.45m</b>
<b>Glc<sub>VI</sub>-5</b>	<b>78.8</b>	<b>3.48m</b>
<b>Glc<sub>VI</sub>-6</b>	<b>64.1</b>	<b>3.92m</b> <b>3.94m</b>

[0709] \*<sup>1</sup>H 和 <sup>13</sup>C 值可为与以下表的 Glc<sub>IV</sub>-1 可交换的。

[0710] 以下提供用来指定 C-19 糖苷区的关键 HMBC, COSY 和 1D-TOCSY 关联的总结：

[0711] <sup>1</sup>H NMR (500MHz, D<sub>2</sub>O) 和 <sup>13</sup>C NMR (125MHz, D<sub>2</sub>O/TSP)。Reb M2 糖苷的指定。

[0712]

位置	<sup>13</sup> C <sup>#</sup>	<sup>1</sup> H
<b>Glc<sub>II</sub>-1</b>	<b>98.4</b>	<b>4.85 d (7.8)</b>
<b>Glc<sub>II</sub>-2</b>	<b>81.7</b>	<b>3.75m</b>
<b>Glc<sub>II</sub>-3</b>	<b>88.0</b>	<b>3.98m</b>
<b>Glc<sub>II</sub>-4</b>	<b>71.3</b>	<b>3.54m</b>
<b>Glc<sub>II</sub>-5</b>	<b>80.5</b>	<b>3.96m</b>
<b>Glc<sub>II</sub>-6</b>	<b>63.6</b>	<b>3.45m</b> <b>3.77m</b>
<b>Glc<sub>III</sub>-1</b>	<b>104.9</b>	<b>4.92 d (7.9)</b>
<b>Glc<sub>III</sub>-2</b>	<b>76.3</b>	<b>3.32m</b>
<b>Glc<sub>III</sub>-3</b>	<b>78.8</b>	<b>3.51m</b>
<b>Glc<sub>III</sub>-4</b>	<b>73.3</b>	<b>3.26t (9.5)</b>
<b>Glc<sub>III</sub>-5</b>	<b>78.8</b>	<b>3.44m</b>
<b>Glc<sub>III</sub>-6</b>	<b>64.4</b>	<b>3.75m</b> <b>3.94m</b>
<b>Glc<sub>IV</sub>-1</b>	<b>105.0</b>	<b>4.84 d (7.8)</b>
<b>Glc<sub>IV</sub>-2</b>	<b>76.1</b>	<b>3.41m</b>
<b>Glc<sub>IV</sub>-3</b>	<b>78.8</b>	<b>3.46m</b>
<b>Glc<sub>IV</sub>-4</b>	<b>72.5</b>	<b>3.45m</b>
<b>Glc<sub>IV</sub>-5</b>	<b>81.7</b>	<b>3.75m</b>
<b>Glc<sub>IV</sub>-6</b>	<b>65.8</b>	<b>3.55m</b> <b>3.78m</b>

[0713] Glc<sub>II</sub>的指定以类似方式实施。Glc<sub>II</sub>异头质子 ( $\delta_{\text{H}}$  4.85) 显示与  $\delta_{\text{H}}$ 3.75 的质子的 COSY 关联, 其被指定为 Glc<sub>II</sub> H-2, 其进而显示与  $\delta_{\text{H}}$ 3.98 的质子 (Glc<sub>II</sub> H-3) 的 COSY 关联。此后的质子显示与  $\delta_{\text{H}}$  3.54 的质子 (Glc<sub>II</sub> H-4) 的另外的关联。H-4 也显示与  $\delta_{\text{H}}$  3.96 的质子 (Glc<sub>II</sub> H-5) 的 COSY 关联。Glc<sub>II</sub> H-5 也显示与 Glc<sub>II</sub> H-6 质子 ( $\delta_{\text{H}}$  3.77 和 3.45)

的 COSY 关联。通过使用 HSQC-DEPT 数据测定 Glc<sub>II</sub> C-2 ( $\delta_c$  81.7), C-3 ( $\delta_c$  88.0), C-4 ( $\delta_c$  71.3), C-5 ( $\delta_c$  80.5), 及 C-6 ( $\delta_c$  63.6) 的  $^{13}\text{C}$  化学位移的指定。自 Glc<sub>II</sub> H-3 至 C-2 和 C-4 和也自 Glc<sub>II</sub> H-4 至 C-3 和 C-6 的 HMBC 关联确认以上进行的指定, 以完成 Glc<sub>II</sub> 的指定。

[0714] 余下未指定的葡萄糖部分中的 2 个基于 HMBC 关联被指定为在 Glc<sub>II</sub> 的 C-2 和 C-3 的取代基。在  $\delta_H$  4.92 观察到的异头质子显示与 Glc<sub>II</sub> C-2 的 HMBC 关联, 及指定为 Glc<sub>III</sub> 的异头质子。在  $\delta_H$  4.84 观察到的异头质子显示与 Glc<sub>II</sub> C-3 的 HMBC 关联, 及指定为 Glc<sub>IV</sub> 的异头质子。也观察到 Glc<sub>II</sub> H-2 和 Glc<sub>III</sub> 的异头碳之间及 Glc<sub>II</sub> H-3 和 Glc<sub>IV</sub> 的异头碳之间的交互 HMBC 关联。

[0715] Glc<sub>III</sub> ( $\delta_H$  4.92) 的异头质子显示与  $\delta_H$  3.32 的质子的 COSY 关联, 其被指定为 Glc<sub>III</sub> H-2。由于数据重叠, COSY 谱未允许 H-3 至 H-6 质子的指定。因此, 通过使用 Glc<sub>III</sub> 异头质子的选择性辐射, 用不同混合时间实施一系列 1D-TOCSY 实验。除了确认 Glc<sub>III</sub> H-2 的指定之外, 1D-TOCSY 数据显示  $\delta_H$  3.51 (Glc<sub>III</sub> H-3),  $\delta_H$  3.26 (Glc<sub>III</sub> H-4), 及  $\delta_H$  3.44 (Glc<sub>III</sub> H-5) 的质子。一旦 H-4 通过使用 1D-TOCSY 数据指定, 自 H-4 至 H-5 和进而至 H-6 的 COSY 关联用于指定 H-6。在 COSY 谱中, Glc<sub>III</sub> H-4 显示与 Glc<sub>III</sub> H-5 的关联, 其进而显示分别与 Glc<sub>III</sub> H-6a 和 H-6b 的  $\delta_H$  3.94 和 3.75 的 COSY 关联。然后通过使用  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC-DEPT 关联测定 Glc<sub>III</sub> C-2 ( $\delta_c$  76.3), C-3 ( $\delta_c$  78.8), C-4 ( $\delta_c$  73.3), C-5 ( $\delta_c$  78.8), 及 C-6 ( $\delta_c$  64.4) 的  $^{13}\text{C}$  化学位移, 以完成 Glc<sub>III</sub> 的指定。

[0716] 显示与  $\delta_H$  3.41 的质子的 COSY 关联的 Glc<sub>IV</sub> ( $\delta_H$  4.84) 的异头质子被指定为 Glc<sub>IV</sub> H-2, 其进而显示与  $\delta_H$  3.46 的质子 (Glc<sub>IV</sub> H-3) 的 COSY 关联。此后的质子显示与  $\delta_H$  3.45 的质子 (Glc<sub>IV</sub> H-4) 的另外的关联, 其也显示与  $\delta_H$  3.75 的质子 (Glc<sub>IV</sub> H-5) 的 COSY 关联。Glc<sub>IV</sub> H-5 也显示与 Glc<sub>IV</sub> H-6 质子 ( $\delta_H$  3.55 和 3.78) 的 COSY 关联。通过使用 HSQC-DEPT 数据测定 Glc<sub>IV</sub> C-2 ( $\delta_c$  76.1), C-3 ( $\delta_c$  78.8), C-4 ( $\delta_c$  72.5), C-5 ( $\delta_c$  81.7), 及 C-6 ( $\delta_c$  65.8) 的  $^{13}\text{C}$  化学位移的指定。自 Glc<sub>IV</sub> H-3 至 C-4 和 C-5 和也自 Glc<sub>IV</sub> H-4 至 C-3 和 C-6 的 HMBC 关联确认以上进行的指定, 以完成 Glc<sub>IV</sub> 的指定。

[0717] C-13 的糖苷的  $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  化学位移的总结见于以下表:

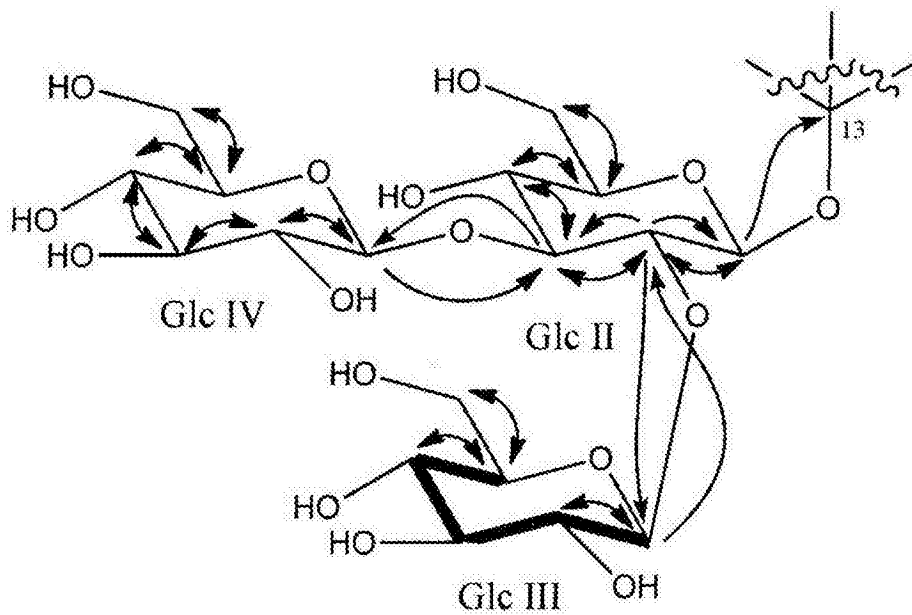
[0718]  $^1\text{H}$  NMR (500MHz, D<sub>2</sub>O) 和  $^{13}\text{C}$  NMR (125MHz, D<sub>2</sub>O/TSP)。Reb M2 糖苷的指定。

[0719]

位置	$^{13}\text{C}^\#$	$^1\text{H}$
Glc <sub>II</sub> -1	98.4	4.85 d (7.8)
Glc <sub>II</sub> -2	81.7	3.75m
Glc <sub>II</sub> -3	88.0	3.98m
Glc <sub>II</sub> -4	71.3	3.54m
Glc <sub>II</sub> -5	80.5	3.96m
Glc <sub>II</sub> -6	63.6	3.45m 3.77m
Glc <sub>III</sub> -1	104.9	4.92 d (7.9)
Glc <sub>III</sub> -2	76.3	3.32m
Glc <sub>III</sub> -3	78.8	3.51m
Glc <sub>III</sub> -4	73.3	3.26t (9.5)
Glc <sub>III</sub> -5	78.8	3.44m
Glc <sub>III</sub> -6	64.4	3.75m 3.94m
Glc <sub>IV</sub> -1	105.0	4.84 d (7.8)
Glc <sub>IV</sub> -2	76.1	3.41m
Glc <sub>IV</sub> -3	78.8	3.46m
Glc <sub>IV</sub> -4	72.5	3.45m
Glc <sub>IV</sub> -5	81.7	3.75m
Glc <sub>IV</sub> -6	65.8	3.55m 3.78m

[0720] 以下提供用来指定 C-13 糖苷区的关键 HMBC, COSY 和 1D-TOCSY 关联的总结：

[0721]



[0722]

$\curvearrowright = ^1\text{H}-^{13}\text{C}$  HMBC

[0723]

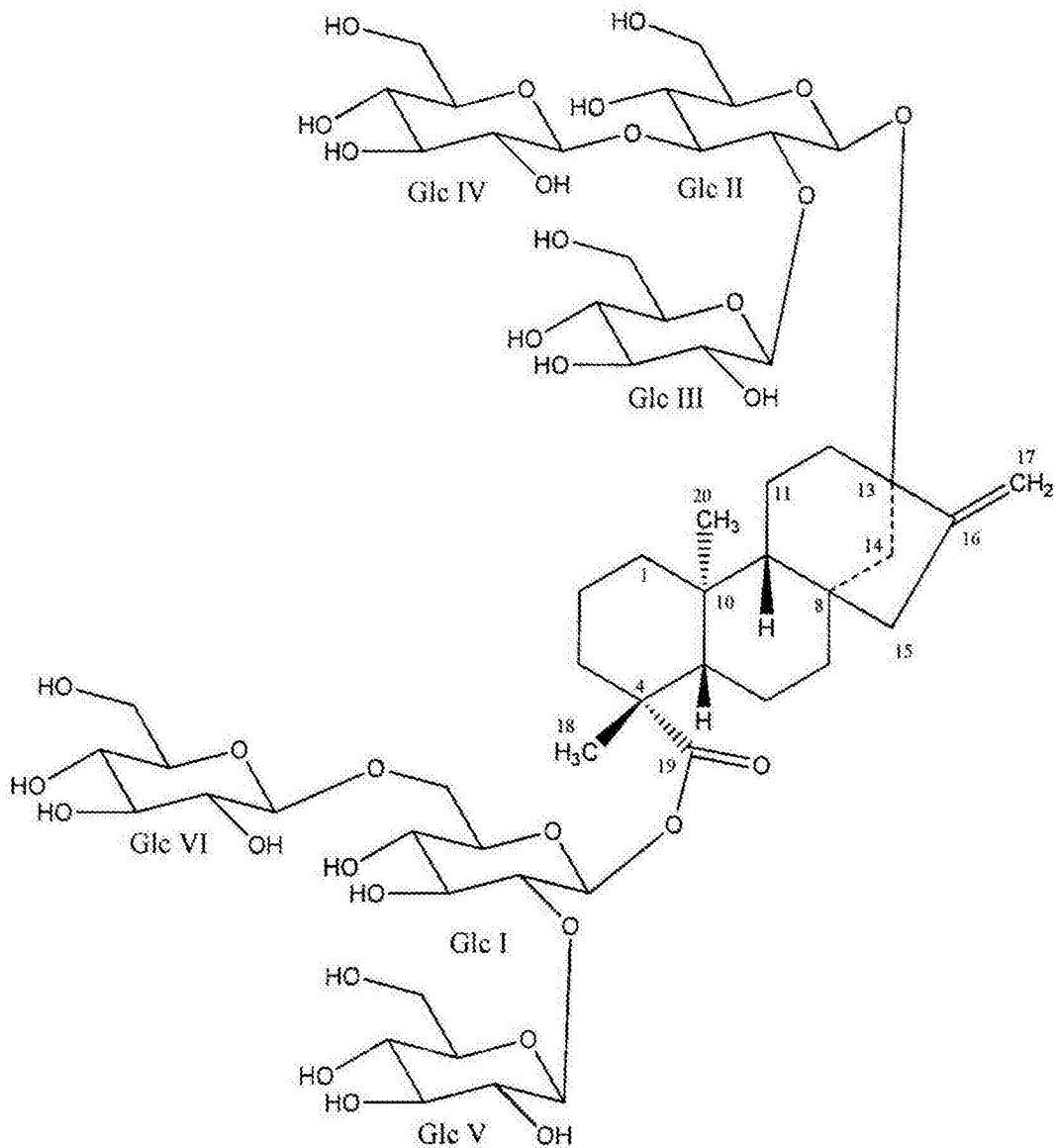


[0724]



[0725] NMR 和 MS 分析允许以下显示的其结构的全指定。化合物的化学名称是 13-[(2-O-β-D-吡喃葡萄糖基-3-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)氧基]对映-贝壳杉-16-烯-19-酸-[(2-O-β-D-吡喃葡萄糖基-6-O-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)酯](莱苞迪昔 M2 或 reb M2)。化合物是莱苞迪昔 M 的异构体。

[0726]



[0727] 【实施例 41 :用于莱苞迪昔 D 向莱苞迪昔 M 的转变的 UGT76G1 的定向衍化 (第 2 轮)】

[0728] 将来自第 1 轮 UGT76G1 的定向衍化 (见实施例 26UGT76G1var94, 其含有突变: Q266E\_P272A\_R334K\_G348P\_L379G) 的最有活性的克隆选择为用于第 2 轮的基线克隆。建立 53 个突变列表, 其含有来自第 1 轮的不同鉴定的阳性突变和由 DNA2.0ProteinGPStm 策略获

得的新突变。此突变列表随后用来设计含有各 3 个不同突变的 92 个变体基因。在为在大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 中表达密码子 - 优化之后,合成基因,在 pET30a+ 质粒中亚克隆,及用于转化大肠埃希氏菌 (*E. coli*)BL21 (DE3) 化学感受态细胞。获得的细胞在陪替 - 皿中在固体 LB 培养基上在卡那霉素的存在下生长。选择适合的集落,使生长在管中的液体 LB 培养基中。将甘油加入悬浮液作为冷冻保护剂,和 400  $\mu$ L 等份存储于  $-20^{\circ}\text{C}$  和于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。

[0729] 将含有 pET30a+\_UGT76G1var 质粒的大肠埃希氏菌 (*E. coli*)BL21 (DE3) 的这些存储等份解冻,及添加到 LBGP 培养基 (20g/L Luria 肉汤 Lennox ;50mM PIPES 缓冲剂 pH7.00 ;50mM 磷酸缓冲液 pH7.00 ;2.5g/L 葡萄糖和 50mg/L 的卡那霉素)。使此培养物在 96 微孔板中于  $30^{\circ}\text{C}$  振摇 8h。

[0730] 将 3.95mL 的含有 60g/L 的过夜 Express™ 立即 TB 培养基 (**Novagen®**), 10g/L 的甘油和 50mg/L 的卡那霉素的生产培养基用 50  $\mu$ L 的以上描述的培养物接种。在 48 深孔板中,将得到的培养物于  $20^{\circ}\text{C}$  搅拌。培养显著生长和获得良好 OD (600nm)。在 44h 之后,将细胞通过离心收获,及冷冻。

[0731] 通过向解冻的细胞添加 **Bugbuster®** Master 混合物 (**Novagen®**) 实施裂解,和通过离心回收裂解物。用 100  $\mu$ L 的被加入在 50mM 磷酸缓冲液 pH7.2 中莱菔迪昔 D (终浓度 0.5mM),  $\text{MgCl}_2$  (终浓度 3mM) 和 UDP- 葡萄糖 (终浓度 2.5mM) 的溶液的新鲜裂解物实施活性测试。

[0732] 使反应于  $30^{\circ}\text{C}$  运行,和在 2, 4, 7 和 24h 之后取样品,以由 HPLC (CAD 检测),使用以上为莱菔迪昔 D 向莱菔迪昔 M 的转化描述的分析方法测定转变和初速度。用基线克隆, Round1-Var94 实施并行实验。在 22h 之后的转变和此基线克隆的初速度定义为 100%, 和第 2 轮克隆的标准化的转变和初速度示于以下表:

[0733]

克隆	突变*	标准化的在 22h 后 Reb D 向 Reb M 的转变	标准化的初速度(0~4h)
Round1-Var94	UGT76G1 ( Q266E_P272A_R334K_G348P_L379G ) 基线克隆	100%	100%
Round2-Var1	Round1-Var94 (A213N P348G I411V)	70%	86%
Round2-Var2	Round1-Var94 (K303G I423M Q425E)	120%	134%
Round2-Var3	Round1-Var94 (V20L_N138K_S147G)	14%	15%

[0734]

克隆	突变*	标准化的在 22h 后 Reb D 向 Reb M 的转变	标准化的初速度(0~4h)
Round2-Var4	Round1-Var94 (I16V V133A L299I)	37%	43%
Round2-Var5	Round1-Var94 (S241V S274G Q432E)	75%	72%
Round2-Var6	Round1-Var94 (I16V L139V I218V)	62%	68%
Round2-Var7	Round1-Var94 (K334R N409K Q432E)	104%	92%
Round2-Var8	Round1-Var94 (I15L R141T I407V)	17%	26%
Round2-Var9	Round1-Var94 (R141T K303G G379L)	31%	42%
Round2-Var10	Round1-Var94 (I190L K303G P348G)	131%	149%
Round2-Var11	Round1-Var94 (E266Q F314S N409R)	106%	132%
Round2-Var12	Round1-Var94 (V133A I295V K303G)	43%	49%
Round2-Var13	Round1-Var94 (I16V S241V N409R)	80%	79%
Round2-Var14	Round1-Var94 (A239V K334R G379L)	58%	55%
Round2-Var15	Round1-Var94 (I190L K393R V396L)	118%	126%
Round2-Var16	Round1-Var94 (L101F I295M K393R)	84%	89%
Round2-Var17	Round1-Var94 (A239V E266Q Q425E)	96%	101%
Round2-Var18	Round1-Var94 (V20L I190L I423M)	98%	98%
Round2-Var19	Round1-Var94 (V20L G379L S456L)	84%	81%
Round2-Var20	Round1-Var94 (K334R P348G N409R)	73%	73%
Round2-Var21	Round1-Var94 (E231A S241V E449D)	53%	50%
Round2-Var22	Round1-Var94 (K188R L299I V394I)	56%	59%
Round2-Var23	Round1-Var94 (E231A S274G V394I)	110%	124%
Round2-Var24	Round1-Var94 (S42A I295V Q432E)	71%	78%
Round2-Var25	Round1-Var94 (A213N A272P K334R)	95%	80%
Round2-Var26	Round1-Var94 (L158Y S274K N409K)	80%	50%
Round2-Var27	Round1-Var94 (K188R I295M Q425E)	132%	116%

[0735]

克隆	突变*	标准化的在 22h 后 Reb D 向 Reb M 的转变	标准化的初速度(0~4h)
Round2-Var28	Round1-Var94 (I15L I295M V394I)	53%	36%
Round2-Var29	Round1-Var94 (V133A A239V V394I)	47%	30%
Round2-Var30	Round1-Var94 (L158Y F314S K316R)	107%	72%
Round2-Var31	Round1-Var94 (L158Y A239V A272P)	54%	30%
Round2-Var32	Round1-Var94 (F46I D301N V396L)	109%	101%
Round2-Var33	Round1-Var94 (L101F I218V Q432E)	78%	54%
Round2-Var34	Round1-Var94 (I16V F46I I295M)	110%	95%
Round2-Var35	Round1-Var94 (A213N E266S I407V)	98%	79%
Round2-Var36	Round1-Var94 (A239V S274K I295M)	102%	89%
Round2-Var37	Round1-Var94 (A239V F314S S450K)	105%	99%
Round2-Var38	Round1-Var94 (L139V K188R D301N)	66%	51%
Round2-Var39	Round1-Var94 (I45V I218V S274K)	87%	58%
Round2-Var40	Round1-Var94 (S241V K303G V394I)	78%	57%
Round2-Var41	Round1-Var94 (R141T S274G K334R)	41%	28%
Round2-Var42	Round1-Var94 (V217L S274G L299I)	47%	34%
Round2-Var43	Round1-Var94 (S274G D301N P348G)	98%	91%
Round2-Var44	Round1-Var94 (E231A N409R S450K)	87%	65%
Round2-Var45	Round1-Var94 (R64H E231A K316R)	88%	64%
Round2-Var46	Round1-Var94 (V394I N409K I411V)	110%	100%
Round2-Var47	Round1-Var94 (I45V I295M K303G)	113%	88%
Round2-Var48	Round1-Var94 (L101F V396L L398V)	46%	43%
Round2-Var49	Round1-Var94 (N27S L101F S447A)	54%	37%
Round2-Var50	Round1-Var94 (S274G F314S L398V)	129%	156%
Round2-Var51	Round1-Var94 (E266Q L299I K393R)	70%	51%

[0736]

克隆	突变*	标准化的在 22h 后 Reb D 向 Reb M 的转变	标准化的初速度(0~4h)
Round2-Var52	Round1-Var94 (V217L E266S V394I)	62%	48%
Round2-Var53	Round1-Var94 (N138K A272P N409R)	118%	102%
Round2-Var54	Round1-Var94 (E266S F314S Q432E)	124%	146%
Round2-Var55	Round1-Var94 (D301N G379L L398V)	56%	45%
Round2-Var56	Round1-Var94 (F46I E266S K334R)	123%	142%
Round2-Var57	Round1-Var94 (A272P V394I Q432E)	133%	142%
Round2-Var58	Round1-Var94 (V394I I407V S456L)	118%	114%
Round2-Var59	Round1-Var94 (I218V E266Q I423M)	106%	98%
Round2-Var60	Round1-Var94 (A272P G379L I407V)	80%	63%
Round2-Var61	Round1-Var94 (E231A K303G S456L)	113%	110%
Round2-Var62	Round1-Var94 (I190L E266Q I407V)	150%	167%
Round2-Var63	Round1-Var94 (N27S L139V I295V)	43%	25%
Round2-Var64	Round1-Var94 (V217L I423M S447A)	67%	51%
Round2-Var65	Round1-Var94 (L158Y E266S E449D)	68%	43%
Round2-Var66	Round1-Var94 (S42A F46I I407V)	160%	203%
Round2-Var67	Round1-Var94 (N138K E231A D301N)	118%	93%
Round2-Var68	Round1-Var94 (K188R G379L N409R)	52%	35%
Round2-Var69	Round1-Var94 (I15L E231A V396L)	38%	22%
Round2-Var70	Round1-Var94 (E231A Q425E Q432E)	115%	119%
Round2-Var71	Round1-Var94 (D301N K316R Q425E)	126%	121%
Round2-Var72	Round1-Var94 (L139V I295M F314S)	76%	91%
Round2-Var73	Round1-Var94 (S147G E266S D301N)	30%	18%
Round2-Var74	Round1-Var94 (R64H S147G S447A)	23%	12%
Round2-Var75	Round1-Var94 (S42A K303G L398V)	95%	110%

[0737]

克隆	突变*	标准化的在 22h 后 Reb D 向 Reb M 的转变	标准化的初速度(0~4h)
Round2-Var76	Round1-Var94 (I45V_D301N_E449D)	62%	60%
Round2-Var77	Round1-Var94 (V133A_E266S_I411V)	37%	28%
Round2-Var78	Round1-Var94 (I45V_N409R_Q425E)	63%	59%
Round2-Var79	Round1-Var94 (R141T_A272P_F314S)	23%	10%
Round2-Var80	Round1-Var94 (E266S_S274G_N409R)	81%	91%
Round2-Var81	Round1-Var94 (N409K_Q425E_S450K)	81%	84%
Round2-Var82	Round1-Var94 (N27S_R64H_K393R)	47%	37%
Round2-Var83	Round1-Var94 (S42A_A213N_V217L)	62%	46%
Round2-Var84	Round1-Var94 (N27S_S274K_I407V)	49%	44%
Round2-Var85	Round1-Var94 (I411V_Q425E_S456L)	75%	81%
Round2-Var86	Round1-Var94 (A239V_K316R_E449D)	83%	72%
Round2-Var87	Round1-Var94 (S147G_A239V_P348G)	18%	7%
Round2-Var88	Round1-Var94 (V20L_S274G_S450K)	71%	68%
Round2-Var89	Round1-Var94 (F314S_V394I_S447A)	88%	123%
Round2-Var90	Round1-Var94 (R64H_E266Q_I295M)	45%	47%
Round2-Var91	Round1-Var94 (N138K_I295V_I407V)	50%	51%
Round2-Var92	Round1-Var94 (I15L_P348G_Q432E)	18%	13%

[0738] \* 突变标识如下：参照基因 - 原氨基酸 - 位置 - 新氨基酸：例如对于来自第 1 轮 UGT76G1 的定向衍化的变体 94 的在第 33 位的丙氨酸向甘氨酸的突变标识为 Round1-Var94 (A33G)

[0739] 这些结果的建模允许获得各突变的效应的排序。以下突变被测定为有益于活性：S42A, F46I, I190L, S274G, I295M, K303G, F314S, K316R, K393R, V394I, I407V, N409K, N409R, Q425E, Q432E, S447A, S456L。

[0740] 【实施例 42 :AtSUS 的体内产生】

[0741] SEQ ID NO:13

[0742] AtSUS

[0743] >gi|79328294|ref|NP\_001031915.1|蔗糖合酶 1[拟南芥 (Arabidopsis thaliana)]

[0744] MANAERMITRVHSQRERLNETLVSERNEVLALLSRVEAKGKGILQQNQIIAEFEALPEQTRKKLEGGPF

FDLLKSTQEATVLPWVALAVRPRPGVWEYLRVNLHALVVEELQPAEFLHFKEELVDGVKNGNFTLELDFEFPNASI  
 PRPTLHKYIIGNVDFLNRHLSAKLFHDKESLLPLLKFLRLHSHQGNMLSEKIQNLNTLQHTLRKAEYYLAELKSE  
 TLYEEFEAKFEEI GLERGWGDNAERVLDMIRLLLDLLEAPDPCTLETFLGRVPMVFNVVILSPHGYFAQDNVLGYPD  
 TGGQVVYILDQVRALEIEMLRQRIKQQGLNIKPRILILTRLLPDAVGTTCGERLERVYDSEYCDILRVPFRTKEGIVR  
 KWISRFEVWPYLETYTEDAAVELSKELNGKPDLIIGNYSDGNLVASLLAHKLGVTQCTIAHALEKTKYPDSDIYWKK  
 LDDKYHFSCQFTADIFAMNHTDFIITSTFQEIAGSKETVGGQYESHTAFTLPLGLYRVVHGIDVFDPKFNIVSPGADMS  
 IYFPYTEEKRRRLTKFHSEIEELLYSDVENKEHLKVLKDKKKPILFTMARLDRVKNLSGLVEWYGKNTLRELANLVV  
 VGGDRRKEKSDNEEKAEMKKMYDLIEEYKLNQFRWISSQMDRVRNGELYRYICDTKGAFVQPALYEAFLTVVEAM  
 TCGLPTFATCKGGPAEIVHKGSGFHIDPYHGDQAADTLADFFTKCKEDPSHWDEISKGGLQRIEEKYTWQIYSQRL  
 LTLTGVIYGFWKHVSNDRLREARRYLEMFYALKYRPLAQAVPLAQDD

[0745] 为在大肠埃希氏菌 (*E. coli*) 中表达密码子优化, 及使用 NdeI 和 XhoI 限制性位点在 pET30a+ 质粒中亚克隆的 AtSuS 的合成基因。将含有 AtSUS 基因的 pET30A+ 载体用于转化电感受态大肠埃希氏菌 (*E. coli*) BL21 (DE3) 细胞。获得的细胞在陪替 - 皿中在卡那霉素的存在下生长, 和选择适合的集落, 使生长在液体 LB 培养基 (锥形瓶) 中。将甘油加入悬浮液作为冷冻保护剂, 和 400  $\mu$ L 等份存储于  $-20^{\circ}\text{C}$  和于  $-80^{\circ}\text{C}$ 。

[0746] 将含有 pET30A+\_AtSUS 质粒的大肠埃希氏菌 (*E. coli*) BL21 (DE3) 的存储等份解冻, 及添加到 30mL 的 LBGKP 培养基 (20g/L Luria 肉汤 Lennox ;50mM PIPES 缓冲剂 pH7.00 ;50mM 磷酸缓冲液 pH7.00 ;2.5g/L 葡萄糖和 50mg/L 的卡那霉素)。使此培养物以 135rpm 于  $30^{\circ}\text{C}$  振摇 8h。

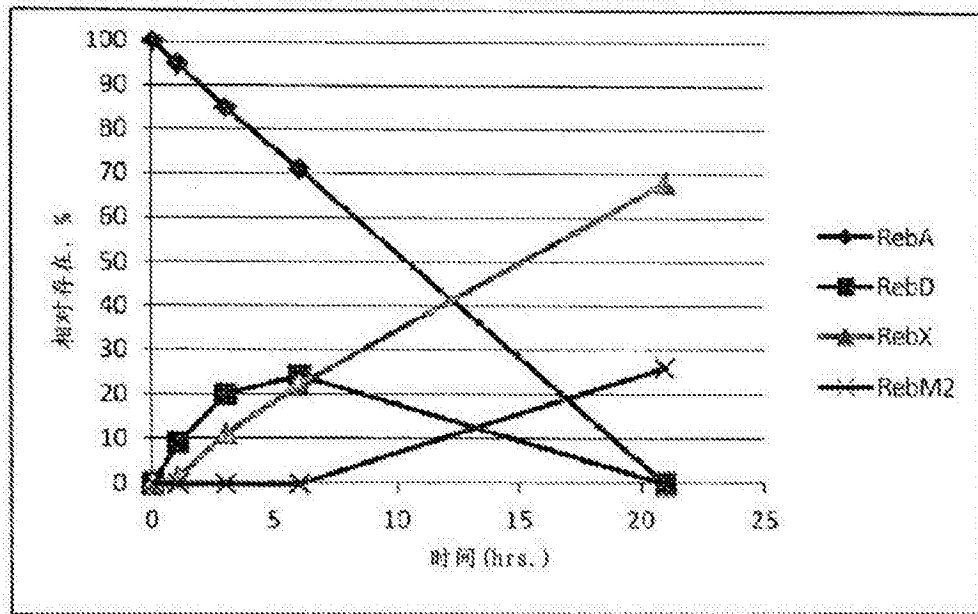
[0747] 生产培养基含有 60g/L 的过夜表达立即 TB 培养基 (Novagen), 10g/L 的甘油和 50mg/L 的卡那霉素。将预培养物添加到 800mL 的此培养基, 和溶液取样品的同时于  $20^{\circ}\text{C}$  搅拌, 以测量 OD 和 pH。培养显著生长和获得良好 OD。在 40h 之后, 将细胞通过离心收获, 及冷冻而获得 30.1g 的细胞湿重。

[0748] 裂解由用 1.0mL 的 50mM Tris 缓冲剂 pH7.5 中 200mg 的细胞的细胞悬浮液的 Fastprep (MP Biomedicals, Lysing matrix B, 速度 6.0,  $3 \times 40\text{s}$ ) 实施。将裂解物通过离心回收, 及新鲜使用。

[0749] 【实施例 43 : 用使用 UGTSL2, UGT76G1-R1-F12 和 AtSUS 原位制备的 UDP- 葡萄糖的莱苞迪昔 A 向莱苞迪昔 M 的转变】

[0750] 以 1mL 规模, 使用 100mM 的蔗糖, 3mM 的  $\text{MgCl}_2$ , 0.25mM 的 UDP 和 0.5mM 的莱苞迪昔 A, 在磷酸钾缓冲液 (50mM 终浓度, pH7.5) 中实施反应。通过添加 15  $\mu$ L 的 UGTSL2 (见实施例 27) 裂解物 (2U/mL), 150  $\mu$ L 的 UGT76G1var94 (见实施例 26) (2.5U/mL) 和 15  $\mu$ L 的 AtSUS (见实施例 42) (400U/mL) 起始反应。反应之后是在将 125  $\mu$ L 样品用 10  $\mu$ L 的  $2\text{N H}_2\text{SO}_4$  和 115  $\mu$ L 的 60% 甲醇猝灭之后 HPLC。在 21h 的反应时间之后获得 68% 的莱苞迪昔 M 和 26% 的莱苞迪昔 M2。结果呈现于图 69。

[0751]



【图 69】

[0752] 尽管在上文中以例证目的公开了本发明的各种实施方式,但需知可在不脱离本发明的精神或范围的情况下实施各种变化,修饰和取代。

[0001]

序列表

<110> PURECIRCLE SDN BHD  
 <120> 高-纯度甜叶菊醇糖苷  
 <130> 39227-35CIP  
 <160> 13  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 1397  
 <212> DNA  
 <213> 大肠埃希氏菌 (Escherichia coli)  
 <400> 1  
 ccattgcccata tatggaaaac aaaaccgaaa ccaccgttcg tcgtctctgc cgtattatc 60  
 tgtttccggt tccgtttcag ggicntatta atccgattct gcagctgcca aatgtgctgt 120  
 atagcaaaag ttttagcatt accatTTTT ataccaatTT taacaaaccg aaaaccagca 180  
 attafccgca ttttaccttt cgcittatTC tggataatga tccgcaggat gaaccgatta 240  
 gcaatctgcc gacacatggT ccgctggcag gtaTgcgtat tccgattatt aacgaacatg 300  
 gtgcagatga actgcgtcgt gaactggaac tctctgatct ggcaagcgaa gaagatgaag 360  
 aagtiagctg tctgattacc gatgcactgt ggtattttgc acagagcgtt gcagatagcc 420  
 tgaatctgeg tegtctggtt ctgatgacca gcagcctggt taactttcat gcacatgTTa 480  
 gccgcccgca gtttgatgaa ctgggitatc tggatccgga tgataaacc cgtctggaag 540  
 aacaggcaag cgttttccg atctgaaaag taaaagatat caaaagcgcC tatagcaatt 600  
 gccagattct gaaagaaatt ctgggcaaaa tgattaaaca gaccaaagca agcagcggTg 660  
 ttatttggaa tagctttaaa gaactggaag aaagcgaact gaaaccgtg atctgtgaaa 720  
 ttccggcaac gagctttctg attccgctgc cgaaacatct gaecgcaage agcagcagcc 780  
 tgctgatca tcatctaac gttttcagt gctctgatca gcagcctccg agcagcgttc 840  
 tgtatgtag ctttgtagc accagcgaag ttgatgaaa agattttctg gaaattgccc 900  
 gtggtctggt tgatagcaaa cagagctttc tgtgggttgt tctctcgggt ttigttaaag 960  
 gtagcacctg gtttgaaccg ctgccgatg gttttctggg tgaacgtggt cgtattgTTa 1020  
 aatgggttcc gcagcaagaa gttctggcAc acggcgcaat tggTgcattt tggaccata 1080  
 gcggttgGaa tagcacctg gaaagcgttt gtgaaggtgt tccgatgatt tttagcgatt 1140  
 ttggctgga tcaagcctg aatgcacgtt atatgagtga tttctgaaa gtgggtgtgt 1200  
 atctgaaaa tggttggGaa ctgggtgaaa ttgcaaatgc aattcgtcgt gttatggtgg 1260  
 atgaagaagg tgaatatatt cgtcagaatg cccgtgttct gaaacagaaa gcagatgTTa 1320  
 gcctgatgaa aggtggtagc agctatgaaa gccctgGaaag tctggttagc tatattagca 1380  
 gcctgtaata actcgag 1397  
 <210> 2  
 <211> 1442  
 <212> DNA  
 <213> 大肠埃希氏菌 (Escherichia coli)  
 <400> 2  
 ccattgcccata tatggcaacc agcagatagca ttgttgatga tctgaaacag ctgcattgtt 60  
 caacctttcc gtggctggca ttgtgnta ttctgcccga tctgcagctg agcaaacTga 120

[0002]

```

ttgcagaaaa aggtcataaa gtgagctttc tgagcaccac ccgtaataat cagcgtctga      180
gcagecatat tagtccgctg attaatgttg ttcagetgac cctgcctcgt gtccaagaac      240
tgccggaaga tgccgaagca accacegatg ttcacccgga agatattccg tatctgaaaa      300
aageaagtga tggctfcgag ccggaagtta cccgttttct ggaacagcat agtccggatt      360
ggaicaceta tgattatacc caattattgc tgccgagcat tgcageaage ctgggtatfa      420
gccgtgcaca ttttagcgtt accaaccctg gggcaattgc atatatgggt ccgagcgcag      480
atgcaatgat taatggtagt gatggtegia ccaccgtga agatctgacc acccctccga      540
aatggttcc gtttccgacc aaagttigtg ggcgtaaac tgatctgca cgtctggttc      600
cgtataaagc accgggtatt agtgatggtt atcgtatggg tetggttctg aaaggtagcg      660
attgtctget gagcaaatgc tateatgaat ttggcaccca gtggetgccg ctgctgaaaa      720
ccctgcacfa ggttccggtt gtcccggtgg gtctgcctgc tccggaagtt ccgggtgatg      780
aaaaagatga aacctgggtt agcatcaaaa aatggctgga tggtaaacag aaaggtagcg      840
tggtttatgt tgcactgggt agcgaagttc tggttagcca gaccgaagtt gtigaactgg      900
cacctggctt ggaactgagc ggtctgccgt ttgtttgggc atatcgtaaa ccgaaaggtc      960
cggcaaaaag cgatagcgtt gaactgccgg atggttttgt tgaactgacc cgtgatcgtg     1020
gtctggtttg gaccagctgg gcacctcagc tgcgtattct gagccatgaa agcgtttgtg     1080
gttttctgac caattgtggt agcggtagca ttgtggaagg tctgatgttt ggtcacccgc     1140
tgattatgct gccgattttt ggtgatcagc cgtgaaatgc acgtctgctg gaagataaac     1200
aggttggfat tgaattccg cgtaatgaag aagatggttg cctgacccaa gaaagcgttg     1260
cacgtagcct gcgtagcgtt gtgttgaaa nagaaggcga natctataaa gccaatgcac     1320
gtgaactgag caaaaatctat aatgatacca aagtggaaaa agaatatgtg agccagttcg     1380
tggattatct ggaaaaaac acccgtgcag ttgccattga tcacgaaagc taatgactcg     1440
ag

```

<210> 3  
<211> 472  
<212> PRT  
<213> 水稻 (*Oryza sativa*)  
<400> 3

Met Asp Asp Ala His Ser Ser Gln Ser Pro Leu His Val Val Ile Phe  
1 5 10 15

Pro Trp Leu Ala Phe Gly His Leu Leu Pro Cys Leu Asp Leu Ala Glu  
20 25 30

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

Asn Leu Ala Arg Leu Pro Pro Val Arg Pro Glu Leu Ala Glu Leu Val  
50 55 60

Asp Leu Val Ala Leu Pro Leu Pro Arg Val Asp Gly Leu Pro Asp Gly  
65 70 75 80

Ala Glu Ala Thr Ser Asp Val Pro Phe Asp Lys Phe Glu Leu His Arg

[0003]

85	90	95
Lys Ala Phe Asp Gly Leu Ala Ala	Pro Phe Ser Ala Phe Leu Asp Thr	
100	105	110
Ala Cys Ala Gly Gly Lys Arg Pro Asp Trp Val Leu Ala Asp Leu Met		
115	120	125
His His Trp Val Ala Leu Ala Ser Gln Glu Arg Gly Val Pro Cys Ala		
130	135	140
Met Ile Leu Pro Cys Ser Ala Ala Val Val Ala Ser Ser Ala Pro Pro		
145	150	155
Thr Glu Ser Ser Ala Asp Gln Arg Glu Ala Ile Val Arg Ser Met Gly		
165	170	175
Thr Ala Ala Pro Ser Phe Glu Ala Lys Arg Ala Thr Glu Glu Phe Ala		
180	185	190
Thr Glu Gly Ala Ser Gly Val Ser Ile Met Thr Arg Tyr Ser Leu Thr		
195	200	205
Leu Gln Arg Ser Lys Leu Val Ala Met Arg Ser Cys Pro Glu Leu Glu		
210	215	220
Pro Gly Ala Phe Thr Ile Leu Thr Arg Phe Tyr Gly Lys Pro Val Val		
225	230	235
Pro Phe Gly Leu Leu Pro Pro Arg Pro Asp Gly Ala Arg Gly Val Ser		
245	250	255
Lys Asn Gly Lys His Asp Ala Ile Met Gln Trp Leu Asp Ala Gln Pro		
260	265	270
Ala Lys Ser Val Val Tyr Val Ala Leu Gly Ser Glu Ala Pro Met Ser		
275	280	285
Ala Asp Leu Leu Arg Glu Leu Ala His Gly Leu Asp Leu Ala Gly Thr		
290	295	300
Arg Phe Leu Trp Ala Met Arg Lys Pro Ala Gly Val Asp Ala Asp Ser		
305	310	315
Val Leu Pro Ala Gly Phe Leu Gly Arg Thr Gly Glu Arg Gly Leu Val		
325	330	335
Thr Thr Arg Trp Ala Pro Gln Val Ser Ile Leu Ala His Ala Ala Val		
340	345	350
Cys Ala Phe Leu Thr His Cys Gly Trp Gly Ser Val Val Glu Gly Leu		
355	360	365
Gln Phe Gly His Pro Leu Ile Met Leu Pro Ile Leu Gly Asp Gln Gly		
370	375	380
Pro Asn Ala Arg Ile Leu Glu Gly Arg Lys Leu Gly Val Ala Val Pro		

[0004]



Arg Ser Gln Met Met Asp Pro Lys Lys Arg Pro Asp His Trp Ala Leu  
 195 200 205

Leu Glu Ser Val Asn Ala Ala Asp Gln Lys Ser Phe Gly Glu Val Phe  
 210 215 220

Asn Ser Phe His Glu Leu Glu Pro Asp Tyr Val Glu His Tyr Gln Thr  
 225 230 235 240

Thr Leu Gly Arg Arg Thr Trp Leu Val Gly Pro Val Ala Leu Ala Ser  
 245 250 255

Lys Asp Met Ala Gly Arg Gly Ser Thr Ser Ala Arg Ser Pro Asp Ala  
 260 265 270

Asp Ser Cys Leu Arg Trp Leu Asp Thr Lys Gln Pro Gly Ser Val Val  
 275 280 285

Tyr Val Ser Phe Gly Thr Leu Ile Arg Phe Ser Pro Ala Glu Leu His  
 290 295 300

Glu Leu Ala Arg Gly Leu Asp Leu Ser Gly Lys Asn Phe Val Trp Val  
 305 310 315 320

Leu Gly Arg Ala Gly Pro Asp Ser Ser Glu Trp Met Pro Gln Gly Phe  
 325 330 335

Ala Asp Leu Ile Thr Pro Arg Gly Asp Arg Gly Phe Ile Ile Arg Gly  
 340 345 350

Trp Ala Pro Gln Met Leu Ile Leu Asn His Arg Ala Leu Gly Gly Phe  
 355 360 365

Val Thr His Cys Gly Trp Asn Ser Thr Leu Glu Ser Val Ser Ala Gly  
 370 375 380

Val Pro Met Val Thr Trp Pro Arg Phe Ala Asp Gln Phe Gln Asn Glu  
 385 390 395 400

Lys Leu Ile Val Glu Val Leu Lys Val Gly Val Ser Ile Gly Ala Lys  
 405 410 415

Asp Tyr Gly Ser Gly Ile Glu Asn His Asp Val Ile Arg Gly Glu Val  
 420 425 430

Ile Ala Glu Ser Ile Gly Lys Leu Met Gly Ser Ser Glu Glu Ser Asp  
 435 440 445

Ala Ile Gln Arg Lys Ala Lys Asp Leu Gly Ala Glu Ala Arg Ser Ala  
 450 455 460

Val Glu Asn Gly Gly Ser Ser Tyr Asn Asp Val Gly Arg Leu Met Asp  
 465 470 475 480

Glu Leu Met Ala Arg Arg Ser Ser Val Lys Val Gly Glu Asp Ile Ile  
 485 490 495

[0006]

Pro Thr Asn Asp Gly Leu  
500

<210> 5  
<211> 470  
<212> PRT  
<213> 番茄 (Solanum lycopersicum)

<400> 5

Met Ser Pro Lys Leu His Lys Glu Leu Phe Phe His Ser Leu Tyr Lys  
1 5 10 15

Lys Thr Arg Ser Asn His Thr Met Ala Thr Leu Lys Val Leu Met Phe  
20 25 30

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

Lys Leu Ala Asp Arg Gly Phe Leu Ile Tyr Phe Cys Ser Thr Pro Ile  
50 55 60

Asn Leu Lys Ser Thr Ile Glu Lys Ile Pro Glu Lys Tyr Ala Asp Ser  
65 70 75 80

Ile His Leu Ile Glu Leu His Leu Pro Glu Leu Pro Gln Leu Pro Pro  
85 90 95

His Tyr His Thr Thr Asn Gly Leu Pro Pro Asn Leu Asn Gln Val Leu  
100 105 110

Gln Lys Ala Leu Lys Met Ser Lys Pro Asn Phe Ser Lys Ile Leu Gln  
115 120 125

Asn Leu Lys Pro Asp Leu Val Ile Tyr Asp Ile Leu Gln Arg Trp Ala  
130 135 140

Lys His Val Ala Asn Glu Gln Asn Ile Pro Ala Val Lys Leu Leu Thr  
145 150 155 160

Ser Gly Ala Ala Val Phe Ser Tyr Phe Phe Asn Val Leu Lys Lys Pro  
165 170 175

Gly Val Glu Phe Pro Phe Pro Gly Ile Tyr Leu Arg Lys Ile Glu Gln  
180 185 190

Val Arg Leu Ser Glu Met Met Ser Lys Ser Asp Lys Glu Lys Glu Leu  
195 200 205

Glu Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Leu Leu Val Asp Gly Asn Met Gln  
210 215 220

Ile Met Leu Met Ser Thr Ser Arg Thr Ile Glu Ala Lys Tyr Ile Asp  
225 230 235 240

Phe Cys Thr Ala Leu Thr Asn Trp Lys Val Val Pro Val Gly Pro Pro  
245 250 255

[0007]

Val Gln Asp Leu Ile Thr Asn Asp Val Asp Asp Met Glu Leu Ile Asp  
 260 265 270

Trp Leu Gly Thr Lys Asp Glu Asn Ser Thr Val Phe Val Ser Phe Gly  
 275 280 285

Ser Glu Tyr Phe Leu Ser Lys Glu Asp Met Glu Glu Val Ala Phe Ala  
 290 295 300

Leu Glu Leu Ser Asn Val Asn Phe Ile Trp Val Ala Arg Phe Pro Lys  
 305 310 315 320

Gly Glu Glu Arg Asn Leu Glu Asp Ala Leu Pro Lys Gly Phe Leu Glu  
 325 330 335

Arg Ile Gly Glu Arg Gly Arg Val Leu Asp Lys Phe Ala Pro Gln Pro  
 340 345 350

Arg Ile Leu Asn His Pro Ser Thr Gly Gly Phe Ile Ser His Cys Gly  
 355 360 365

Trp Asn Ser Ala Met Glu Ser Ile Asp Phe Gly Val Pro Ile Ile Ala  
 370 375 380

Met Pro Met His Leu Asp Gln Pro Met Asn Ala Arg Leu Ile Val Glu  
 385 390 395 400

Leu Gly Val Ala Val Glu Ile Val Arg Asp Asp Asp Gly Lys Ile His  
 405 410 415

Arg Gly Glu Ile Ala Glu Thr Leu Lys Gly Val Ile Thr Gly Lys Thr  
 420 425 430

Gly Glu Lys Leu Arg Ala Lys Val Arg Asp Ile Ser Lys Asn Leu Lys  
 435 440 445

Thr Ile Arg Asp Glu Glu Met Asp Ala Ala Ala Glu Glu Leu Ile Gln  
 450 455 460

Leu Cys Arg Asn Gly Asn  
 465 470

<210> 6  
 <211> 464  
 <212> PRT  
 <213> 水稻 (*Oryza sativa*)

<400> 6

Met His Val Val Met Leu Pro Trp Leu Ala Phe Gly His Ile Leu Pro  
 1 5 10 15

Phe Ala Glu Phe Ala Lys Arg Val Ala Arg Gln Gly His Arg Val Thr  
 20 25 30

Leu Phe Ser Thr Pro Arg Asn Thr Arg Arg Leu Ile Asp Val Pro Pro  
 35 40 45

[0008]

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

Glu His Leu Pro Glu His Ala Glu Ala Thr Ile Asp Leu Pro Ser Asn  
 65 70 75 80

Asp Leu Arg Pro Tyr Leu Arg Arg Ala Tyr Asp Glu Ala Phe Ser Arg  
 85 90 95

Glu Leu Ser Arg Leu Leu Gln Glu Thr Gly Pro Ser Arg Pro Asp Trp  
 100 105 110

Val Leu Ala Asp Tyr Ala Ala Tyr Trp Ala Pro Ala Ala Ala Ser Arg  
 115 120 125

His Gly Val Pro Cys Ala Phe Leu Ser Leu Phe Gly Ala Ala Ala Leu  
 130 135 140

Cys Phe Phe Gly Pro Ala Glu Thr Leu Gln Gly Arg Gly Pro Tyr Ala  
 145 150 155 160

Lys Thr Glu Pro Ala His Leu Thr Ala Val Pro Glu Tyr Val Pro Phe  
 165 170 175

Pro Thr Thr Val Ala Phe Arg Gly Asn Glu Ala Arg Glu Leu Phe Lys  
 180 185 190

Pro Ser Leu Ile Pro Asp Glu Ser Gly Val Ser Glu Ser Tyr Arg Phe  
 195 200 205

Ser Gln Ser Ile Glu Gly Cys Gln Leu Val Ala Val Arg Ser Asn Gln  
 210 215 220

Glu Phe Glu Pro Glu Trp Leu Glu Leu Leu Gly Glu Leu Tyr Gln Lys  
 225 230 235 240

Pro Val Ile Pro Ile Gly Met Phe Pro Pro Pro Pro Gln Asp Val  
 245 250 255

Ala Gly His Glu Glu Thr Leu Arg Trp Leu Asp Arg Gln Glu Pro Asn  
 260 265 270

Ser Val Val Tyr Ala Ala Phe Gly Ser Glu Val Lys Leu Thr Ala Glu  
 275 280 285

Gln Leu Gln Arg Ile Ala Leu Gly Leu Glu Ala Ser Glu Leu Pro Phe  
 290 295 300

Ile Trp Ala Phe Arg Ala Pro Pro Asp Ala Gly Asp Gly Asp Gly Leu  
 305 310 315 320

Pro Gly Gly Phe Lys Glu Arg Val Asn Gly Arg Gly Val Val Cys Arg  
 325 330 335

Gly Trp Val Pro Gln Val Lys Phe Leu Ala His Ala Ser Val Gly Gly  
 340 345 350

[0009]

Phe Leu Thr His Ala Gly Trp Asn Ser Ile Ala Glu Gly Leu Ala Asn  
 355 360 365  
 Gly Val Arg Leu Val Leu Leu Pro Leu Met Phe Glu Gln Gly Leu Asn  
 370 375 380  
 Ala Arg Gln Leu Ala Glu Lys Lys Val Ala Val Glu Val Ala Arg Asp  
 385 390 395 400  
 Glu Asp Asp Gly Ser Phe Ala Ala Asn Asp Ile Val Asp Ala Leu Arg  
 405 410 415  
 Arg Val Met Val Gly Glu Glu Gly Asp Glu Phe Gly Val Lys Val Lys  
 420 425 430  
 Glu Leu Ala Lys Val Phe Gly Asp Asp Glu Val Asn Asp Arg Tyr Val  
 435 440 445  
 Arg Asp Phe Leu Lys Cys Leu Ser Glu Tyr Lys Met Gln Arg Gln Gly  
 450 455 460  
 <210> 7  
 <211> 515  
 <212> PRT  
 <213> 琴叶拟南芥 (*Arabidopsis lyrata*)  
 <400> 7  
 Met Asp Asp Lys Lys Glu Glu Val Met His Ile Ala Met Phe Pro Trp  
 1 5 10 15  
 Leu Ala Met Gly His Leu Leu Pro Phe Leu Arg Leu Ser Lys Leu Leu  
 20 25 30  
 Ala Gln Lys Gly His Lys Ile Ser Phe Ile Ser Thr Pro Arg Asn Ile  
 35 40 45  
 Leu Arg Leu Pro Lys Leu Pro Ser Asn Leu Ser Ser Ser Ile Thr Phe  
 50 55 60  
 Val Ser Phe Pro Leu Pro Ser Ile Ser Gly Leu Pro Pro Ser Ser Glu  
 65 70 75 80  
 Ser Ser Met Asp Val Pro Tyr Asn Lys Gln Gln Ser Leu Lys Ala Ala  
 85 90 95  
 Phe Asp Leu Leu Gln Pro Pro Leu Thr Glu Phe Leu Arg Leu Ser Ser  
 100 105 110  
 Pro Asp Trp Ile Ile Tyr Asp Tyr Ala Ser His Trp Leu Pro Ser Ile  
 115 120 125  
 Ala Lys Glu Leu Gly Ile Ser Lys Ala Phe Phe Ser Leu Phe Asn Ala  
 130 135 140  
 Ala Thr Leu Cys Phe Met Gly Pro Ser Ser Ser Leu Ile Glu Glu Ser  
 145 150 155 160  
 Arg Ser Thr Pro Glu Asp Phe Thr Val Val Pro Pro Trp Val Pro Phe

[0010]

	165		170		175
Lys Ser Thr Ile Val Phe Arg Tyr His Glu Val Ser Arg Tyr Val Glu	180		185		190
Lys Thr Asp Glu Asp Val Thr Gly Val Ser Asp Ser Val Arg Phe Gly	195		200		205
Tyr Thr Ile Asp Gly Ser Asp Ala Val Phe Val Arg Ser Cys Pro Glu	210		215		220
Phe Glu Pro Glu Trp Phe Ser Leu Leu Gln Asp Leu Tyr Arg Lys Pro	225		230		235
Val Phe Pro Ile Gly Phe Leu Pro Pro Val Ile Glu Asp Asp Asp Asp	245		250		255
Asp Thr Thr Trp Val Arg Ile Lys Glu Trp Leu Asp Lys Gln Arg Val	260		265		270
Asn Ser Val Val Tyr Val Ser Leu Gly Thr Glu Ala Ser Leu Arg Arg	275		280		285
Glu Glu Leu Thr Glu Leu Ala Leu Gly Leu Glu Lys Ser Glu Thr Pro	290		295		300
Phe Phe Trp Val Leu Arg Asn Glu Pro Gln Ile Pro Asp Gly Phe Glu	305		310		315
Glu Arg Val Lys Gly Arg Gly Met Val His Val Gly Trp Val Pro Gln	325		330		335
Val Lys Ile Leu Ser His Glu Ser Val Gly Gly Phe Leu Thr His Cys	340		345		350
Gly Trp Asn Ser Val Val Glu Gly Ile Gly Phe Gly Lys Val Pro Ile	355		360		365
Phe Leu Pro Val Leu Asn Glu Gln Gly Leu Asn Thr Arg Leu Leu Gln	370		375		380
Gly Lys Gly Leu Gly Val Glu Val Leu Arg Asp Glu Arg Asp Gly Ser	385		390		395
Phe Gly Ser Asp Ser Val Ala Asp Ser Val Arg Leu Val Met Ile Asp	405		410		415
Asp Ala Gly Glu Glu Ile Arg Glu Lys Val Lys Leu Met Lys Gly Leu	420		425		430
Phe Gly Asn Met Asp Glu Asn Ile Arg Tyr Val Asp Glu Leu Val Gly	435		440		445
Phe Met Arg Asn Asp Glu Ser Ser Gln Leu Lys Glu Glu Glu Glu Glu	450		455		460
Asp Asp Cys Ser Asp Asp Gln Ser Ser Glu Val Ser Ser Glu Thr Asp					

[0011]

465 470 475 480  
 Glu Lys Glu Leu Asn Leu Asp Leu Lys Glu Glu Lys Arg Arg Ile Ser  
 485 490 495  
 Val Tyr Lys Ser Leu Ser Ser Glu Phe Asp Asp Tyr Val Ala Asn Glu  
 500 505 510  
 Lys Met Gly  
 515  
 <210> 8  
 <211> 772  
 <212> PRT  
 <213> 水稻 (Oryza sativa)  
 <400> 8  
 Met His Val Val Ile Cys Pro Leu Leu Ala Phe Gly His Leu Leu Pro  
 1 5 10 15  
 Cys Leu Asp Leu Ala Gln Arg Leu Ala Cys Gly His Arg Val Ser Phe  
 20 25 30  
 Val Ser Thr Pro Arg Asn Ile Ser Arg Leu Pro Pro Val Arg Pro Ser  
 35 40 45  
 Leu Ala Pro Leu Val Ser Phe Val Ala Leu Pro Leu Pro Arg Val Glu  
 50 55 60  
 Gly Leu Pro Asn Gly Ala Glu Ser Thr His Asn Val Pro His Asp Arg  
 65 70 75 80  
 Pro Asp Met Val Glu Leu His Leu Arg Ala Phe Asp Gly Leu Ala Ala  
 85 90 95  
 Pro Phe Ser Glu Phe Leu Gly Thr Ala Cys Ala Asp Trp Val Met Pro  
 100 105 110  
 Thr Ser Ser Ala Pro Arg Gln Thr Leu Ser Ser Asn Ile His Arg Asn  
 115 120 125  
 Ser Ser Arg Pro Gly Thr Pro Ala Pro Ser Gly Arg Leu Leu Cys Pro  
 130 135 140  
 Ile Thr Pro His Ser Asn Thr Leu Glu Arg Ala Ala Glu Lys Leu Val  
 145 150 155 160  
 Arg Ser Ser Arg Gln Asn Ala Arg Ala Arg Ser Leu Leu Ala Phe Thr  
 165 170 175  
 Ser Pro Pro Leu Pro Tyr Arg Asp Val Phe Arg Ser Leu Leu Gly Leu  
 180 185 190  
 Gln Met Gly Arg Lys Gln Leu Asn Ile Ala His Glu Thr Asn Gly Arg  
 195 200 205  
 Arg Thr Gly Thr Leu Pro Leu Asn Leu Cys Arg Trp Met Trp Lys Gln  
 210 215 220

[0012]

Arg Arg Cys Gly Lys Leu Arg Pro Ser Asp Val Glu Phe Asn Thr Ser  
 225 230 235 240  
 Arg Ser Asn Glu Ala Ile Ser Pro Ile Gly Ala Ser Leu Val Asn Leu  
 245 250 255  
 Gln Ser Ile Gln Ser Pro Asn Pro Arg Ala Val Leu Pro Ile Ala Ser  
 260 265 270  
 Ser Gly Val Arg Ala Val Phe Ile Gly Arg Ala Arg Thr Ser Thr Pro  
 275 280 285  
 Thr Pro Pro His Ala Lys Pro Ala Arg Ser Ala Ala Pro Arg Ala His  
 290 295 300  
 Arg Pro Pro Ser Ser Val Met Asp Ser Gly Tyr Ser Ser Ser Tyr Ala  
 305 310 315 320  
 Ala Ala Ala Gly Met His Val Val Ile Cys Pro Trp Leu Ala Phe Gly  
 325 330 335  
 His Leu Leu Pro Cys Leu Asp Leu Ala Gln Arg Leu Ala Ser Arg Gly  
 340 345 350  
 His Arg Val Ser Phe Val Ser Thr Pro Arg Asn Ile Ser Arg Leu Pro  
 355 360 365  
 Pro Val Arg Pro Ala Leu Ala Pro Leu Val Ala Phe Val Ala Leu Pro  
 370 375 380  
 Leu Pro Arg Val Glu Gly Leu Pro Asp Gly Ala Glu Ser Thr Asn Asp  
 385 390 395 400  
 Val Pro His Asp Arg Pro Asp Met Val Glu Leu His Arg Arg Ala Phe  
 405 410 415  
 Asp Gly Leu Ala Ala Pro Phe Ser Glu Phe Leu Gly Thr Ala Cys Ala  
 420 425 430  
 Asp Trp Val Ile Val Asp Val Phe His His Trp Ala Ala Ala Ala  
 435 440 445  
 Leu Glu His Lys Val Pro Cys Ala Met Met Leu Leu Gly Ser Ala His  
 450 455 460  
 Met Ile Ala Ser Ile Ala Asp Arg Arg Leu Glu Arg Ala Glu Thr Glu  
 465 470 475 480  
 Ser Pro Ala Ala Ala Gly Gln Gly Arg Pro Ala Ala Ala Pro Thr Phe  
 485 490 495  
 Glu Val Ala Arg Met Lys Leu Ile Arg Thr Lys Gly Ser Ser Gly Met  
 500 505 510  
 Ser Leu Ala Glu Arg Phe Ser Leu Thr Leu Ser Arg Ser Ser Leu Val  
 515 520 525

[0013]

Val Gly Arg Ser Cys Val Glu Phe Glu Pro Glu Thr Val Pro Leu Leu  
 530 535 540

Ser Thr Leu Arg Gly Lys Pro Ile Thr Phe Leu Gly Leu Met Pro Pro  
 545 550 555 560

Leu His Glu Gly Arg Arg Glu Asp Gly Glu Asp Ala Thr Val Arg Trp  
 565 570 575

Leu Asp Ala Gln Pro Ala Lys Ser Val Val Tyr Val Ala Leu Gly Ser  
 580 585 590

Glu Val Pro Leu Gly Val Glu Lys Val His Glu Leu Ala Leu Gly Leu  
 595 600 605

Glu Leu Ala Gly Thr Arg Phe Leu Trp Ala Leu Arg Lys Pro Thr Gly  
 610 615 620

Val Ser Asp Ala Asp Leu Leu Pro Ala Gly Phe Glu Glu Arg Thr Arg  
 625 630 635 640

Gly Arg Gly Val Val Ala Thr Arg Trp Val Pro Gln Met Ser Ile Leu  
 645 650 655

Ala His Ala Ala Val Gly Ala Phe Leu Thr His Cys Gly Trp Asn Ser  
 660 665 670

Thr Ile Glu Gly Leu Met Phe Gly His Pro Leu Ile Met Leu Pro Ile  
 675 680 685

Phe Gly Asp Gln Gly Pro Asn Ala Arg Leu Ile Glu Ala Lys Asn Ala  
 690 695 700

Gly Leu Gln Val Ala Arg Asn Asp Gly Asp Gly Ser Phe Asp Arg Glu  
 705 710 715 720

Gly Val Ala Ala Ala Ile Arg Ala Val Ala Val Glu Glu Glu Ser Ser  
 725 730 735

Lys Val Phe Gln Ala Lys Ala Lys Lys Leu Gln Glu Ile Val Ala Asp  
 740 745 750

Met Ala Cys His Glu Arg Tyr Ile Asp Gly Phe Ile Gln Gln Leu Arg  
 755 760 765

Ser Tyr Lys Asp  
 770

<210> 9  
 <211> 442  
 <212> PRT  
 <213> 大肠埃希氏菌 (Escherichia coli)

<400> 9

Met Ala Thr Asn Leu Arg Val Leu Met Phe Pro Trp Leu Ala Tyr Gly  
 1 5 10 15

[0014]

His Ile Ser Pro Phe Leu Asn Ile Ala Lys Gln Leu Ala Asp Arg Gly  
 20 25 30  
 Phe Leu Ile Tyr Leu Cys Ser Thr Arg Ile Asn Leu Glu Ser Ile Ile  
 35 40 45  
 Lys Lys Ile Pro Glu Lys Tyr Ala Asp Ser Ile His Leu Ile Glu Leu  
 50 55 60  
 Gln Leu Pro Glu Leu Pro Glu Leu Pro Pro His Tyr His Thr Thr Asn  
 65 70 75 80  
 Gly Leu Pro Pro His Leu Asn Pro Thr Leu His Lys Ala Leu Lys Met  
 85 90 95  
 Ser Lys Pro Asn Phe Ser Arg Ile Leu Gln Asn Leu Lys Pro Asp Leu  
 100 105 110  
 Leu Ile Tyr Asp Val Leu Gln Pro Trp Ala Glu His Val Ala Asn Glu  
 115 120 125  
 Gln Asn Ile Pro Ala Gly Lys Leu Leu Thr Ser Cys Ala Ala Val Phe  
 130 135 140  
 Ser Tyr Phe Phe Ser Phe Arg Lys Asn Pro Gly Val Glu Phe Pro Phe  
 145 150 155 160  
 Pro Ala Ile His Leu Pro Glu Val Glu Lys Val Lys Ile Arg Glu Ile  
 165 170 175  
 Leu Ala Lys Glu Pro Glu Glu Gly Gly Arg Leu Asp Glu Gly Asn Lys  
 180 185 190  
 Gln Met Met Leu Met Cys Thr Ser Arg Thr Ile Glu Ala Lys Tyr Ile  
 195 200 205  
 Asp Tyr Cys Thr Glu Leu Cys Asn Trp Lys Val Val Pro Val Gly Pro  
 210 215 220  
 Pro Phe Gln Asp Leu Ile Thr Asn Asp Ala Asp Asn Lys Glu Leu Ile  
 225 230 235 240  
 Asp Trp Leu Gly Thr Lys His Glu Asn Ser Thr Val Phe Val Ser Phe  
 245 250 255  
 Gly Ser Glu Tyr Phe Leu Ser Lys Glu Asp Met Glu Glu Val Ala Phe  
 260 265 270  
 Ala Leu Glu Leu Ser Asn Val Asn Phe Ile Trp Val Ala Arg Phe Pro  
 275 280 285  
 Lys Gly Glu Glu Arg Asn Leu Glu Asp Ala Leu Pro Lys Gly Phe Leu  
 290 295 300  
 Glu Arg Ile Gly Glu Arg Gly Arg Val Leu Asp Lys Phe Ala Pro Gln  
 305 310 315 320

[0015]

Pro Arg Ile Leu Asn His Pro Ser Thr Gly Gly Phe Ile Ser His Cys  
 325 330 335

Gly Trp Asn Ser Ala Met Glu Ser Ile Asp Phe Gly Val Pro Ile Ile  
 340 345 350

Ala Met Pro Ile His Asn Asp Gln Pro Ile Asn Ala Lys Leu Met Val  
 355 360 365

Glu Leu Gly Val Ala Val Glu Ile Val Arg Asp Asp Asp Gly Lys Ile  
 370 375 380

His Arg Gly Glu Ile Ala Glu Thr Leu Lys Ser Val Val Thr Gly Glu  
 385 390 395 400

Thr Gly Glu Ile Leu Arg Ala Lys Val Arg Glu Ile Ser Lys Asn Leu  
 405 410 415

Lys Ser Ile Arg Asp Glu Glu Met Asp Ala Val Ala Glu Glu Leu Ile  
 420 425 430

Gln Leu Cys Arg Asn Ser Asn Lys Ser Lys  
 435 440

<210> 10  
 <211> 454  
 <212> PRT  
 <213> 大肠埃希氏菌 (Escherichia coli)

<400> 10

Met Gly Thr Glu Val Thr Val His Lys Asn Thr Leu Arg Val Leu Met  
 1 5 10 15

Phe Pro Trp Leu Ala Tyr Gly His Ile Ser Pro Phe Leu Asn Val Ala  
 20 25 30

Lys Lys Leu Val Asp Arg Gly Phe Leu Ile Tyr Leu Cys Ser Thr Ala  
 35 40 45

Ile Asn Leu Lys Ser Thr Ile Lys Lys Ile Pro Glu Lys Tyr Ser Asp  
 50 55 60

Ser Ile Gln Leu Ile Glu Leu His Leu Pro Glu Leu Pro Glu Leu Pro  
 65 70 75 80

Pro His Tyr His Thr Thr Asn Gly Leu Pro Pro His Leu Asn His Thr  
 85 90 95

Leu Gln Lys Ala Leu Lys Met Ser Lys Pro Asn Phe Ser Lys Ile Leu  
 100 105 110

Gln Asn Leu Lys Pro Asp Leu Val Ile Tyr Asp Leu Leu Gln Gln Trp  
 115 120 125

Ala Glu Gly Val Ala Asn Glu Gln Asn Ile Pro Ala Val Lys Leu Leu  
 130 135 140

[0016]

Thr Ser Gly Ala Ala Val Leu Ser Tyr Phe Phe Asn Leu Val Lys Lys  
 145 150 155 160

Pro Gly Val Glu Phe Pro Phe Pro Ala Ile Tyr Leu Arg Lys Asn Glu  
 165 170 175

Leu Glu Lys Met Ser Glu Leu Leu Ala Gln Ser Ala Lys Asp Lys Glu  
 180 185 190

Pro Asp Gly Val Asp Pro Phe Ala Asp Gly Asn Met Gln Val Met Leu  
 195 200 205

Met Ser Thr Ser Arg Ile Ile Glu Ala Lys Tyr Ile Asp Tyr Phe Ser  
 210 215 220

Gly Leu Ser Asn Trp Lys Val Val Pro Val Gly Pro Pro Val Gln Asp  
 225 230 235 240

Pro Ile Ala Asp Asp Ala Asp Glu Met Glu Leu Ile Asp Trp Leu Gly  
 245 250 255

Lys Lys Asp Glu Asn Ser Thr Val Phe Val Ser Phe Gly Ser Glu Tyr  
 260 265 270

Phe Leu Ser Lys Glu Asp Arg Glu Glu Ile Ala Phe Gly Leu Glu Leu  
 275 280 285

Ser Asn Val Asn Phe Ile Trp Val Ala Arg Phe Pro Lys Gly Glu Glu  
 290 295 300

Gln Asn Leu Glu Asp Ala Leu Pro Lys Gly Phe Leu Glu Arg Ile Gly  
 305 310 315 320

Asp Arg Gly Arg Val Leu Asp Lys Phe Ala Pro Gln Pro Arg Ile Leu  
 325 330 335

Asn His Pro Ser Thr Gly Gly Phe Ile Ser His Cys Gly Trp Asn Ser  
 340 345 350

Val Met Glu Ser Val Asp Phe Gly Val Pro Ile Ile Ala Met Pro Ile  
 355 360 365

His Leu Asp Gln Pro Met Asn Ala Arg Leu Ile Val Glu Leu Gly Val  
 370 375 380

Ala Val Glu Ile Val Arg Asp Asp Tyr Gly Lys Ile His Arg Glu Glu  
 385 390 395 400

Ile Ala Glu Ile Leu Lys Asp Val Ile Ala Gly Lys Ser Gly Glu Asn  
 405 410 415

Leu Lys Ala Lys Met Arg Asp Ile Ser Lys Asn Leu Lys Ser Ile Arg  
 420 425 430

Asp Glu Glu Met Asp Thr Ala Ala Glu Glu Leu Ile Gln Leu Cys Lys  
 435 440 445

[0017]

Asn Ser Pro Lys Leu Lys  
450

<210> 11  
<211> 458  
<212> PRT  
<213> 甜叶菊 (Stevia rebaudiana)

<400> 11

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  
235 240 245

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

[0018]

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> 12  
 <211> 470  
 <212> PRT  
 <213> 番茄 (Solanum lycopersicum)  
 <400> 12  
 Met Ser Pro Lys Leu His Lys Glu Leu Phe Phe His Ser Leu Tyr Lys  
 1 5 10 15  
 Lys Thr Arg Ser Asn His Thr Met Ala Thr Leu Lys Val Leu Met Phe  
 20 25 30  
 Pro Phe Leu Ala Tyr Gly His Ile Ser Pro Tyr Leu Asn Val Ala Lys  
 35 40 45  
 Lys Leu Ala Asp Arg Gly Phe Leu Ile Tyr Phe Cys Ser Thr Pro Ile  
 50 55 60  
 Asn Leu Lys Ser Thr Ile Glu Lys Ile Pro Glu Lys Tyr Ala Asp Ser  
 65 70 75 80

[0019]

Ile His Leu Ile Glu Leu His Leu Pro Glu Leu Pro Gln Leu Pro Pro  
 85 90 95  
 His Tyr His Thr Thr Asn Gly Leu Pro Pro Asn Leu Asn Gln Val Leu  
 100 105 110  
 Gln Lys Ala Leu Lys Met Ser Lys Pro Asn Phe Ser Lys Ile Leu Gln  
 115 120 125  
 Asn Leu Lys Pro Asp Leu Val Ile Tyr Asp Ile Leu Gln Arg Trp Ala  
 130 135 140  
 Lys His Val Ala Asn Glu Gln Asn Ile Pro Ala Val Lys Leu Leu Thr  
 145 150 155 160  
 Ser Gly Ala Ala Val Phe Ser Tyr Phe Phe Asn Val Leu Lys Lys Pro  
 165 170 175  
 Gly Val Glu Phe Pro Phe Pro Gly Ile Tyr Leu Arg Lys Ile Glu Gln  
 180 185 190  
 Val Arg Leu Ser Glu Met Met Ser Lys Ser Asp Lys Glu Lys Glu Leu  
 195 200 205  
 Glu Asp Asp Asp Asp Asp Asp Leu Leu Val Asp Gly Asn Met Gln  
 210 215 220  
 Ile Met Leu Met Ser Thr Ser Arg Thr Ile Glu Ala Lys Tyr Ile Asp  
 225 230 235 240  
 Phe Cys Thr Ala Leu Thr Asn Trp Lys Val Val Pro Val Gly Pro Pro  
 245 250 255  
 Val Gln Asp Leu Ile Thr Asn Asp Val Asp Asp Met Glu Leu Ile Asp  
 260 265 270  
 Trp Leu Gly Thr Lys Asp Glu Asn Ser Thr Val Phe Val Ser Phe Gly  
 275 280 285  
 Ser Glu Tyr Phe Leu Ser Lys Glu Asp Met Glu Glu Val Ala Phe Ala  
 290 295 300  
 Leu Glu Leu Ser Asn Val Asn Phe Ile Trp Val Ala Arg Phe Pro Lys  
 305 310 315 320  
 Gly Glu Glu Arg Asn Leu Glu Asp Ala Leu Pro Lys Gly Phe Leu Glu  
 325 330 335  
 Arg Ile Gly Glu Arg Gly Arg Val Leu Asp Lys Phe Ala Pro Gln Pro  
 340 345 350  
 Arg Ile Leu Asn His Pro Ser Thr Gly Gly Phe Ile Ser His Cys Gly  
 355 360 365  
 Trp Asn Ser Ala Met Glu Ser Ile Asp Phe Gly Val Pro Ile Ile Ala  
 370 375 380

[0020]

Met Pro Met His Leu Asp Gln Pro Met Asn Ala Arg Leu Ile Val Glu  
385 390 395 400

Leu Gly Val Ala Val Glu Ile Val Arg Asp Asp Asp Gly Lys Ile His  
405 410 415

Arg Gly Glu Ile Ala Glu Thr Leu Lys Gly Val Ile Thr Gly Lys Thr  
420 425 430

Gly Glu Lys Leu Arg Ala Lys Val Arg Asp Ile Ser Lys Asn Leu Lys  
435 440 445

Thr Ile Arg Asp Glu Glu Met Asp Ala Ala Ala Glu Glu Leu Ile Gln  
450 455 460

Leu Cys Arg Asn Gly Asn  
465 470

<210> 13  
<211> 808  
<212> PRT  
<213> 大肠埃希氏菌 (Escherichia coli)

<400> 13

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

[0021]

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

[0022]

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

[0023]

---

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

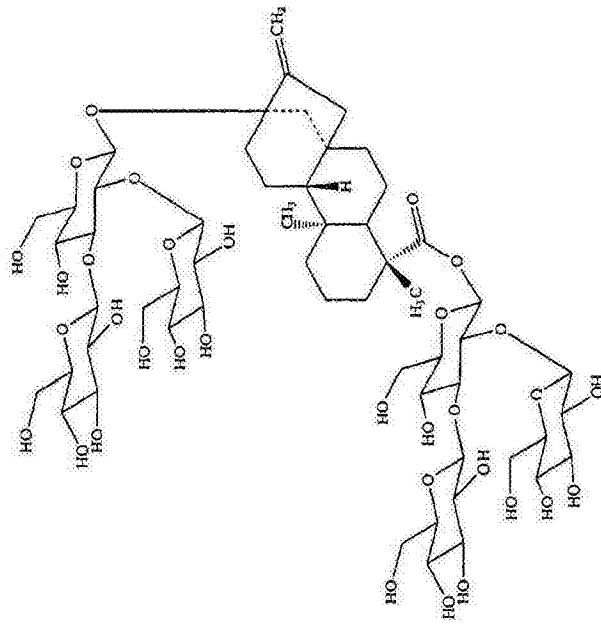


图 1

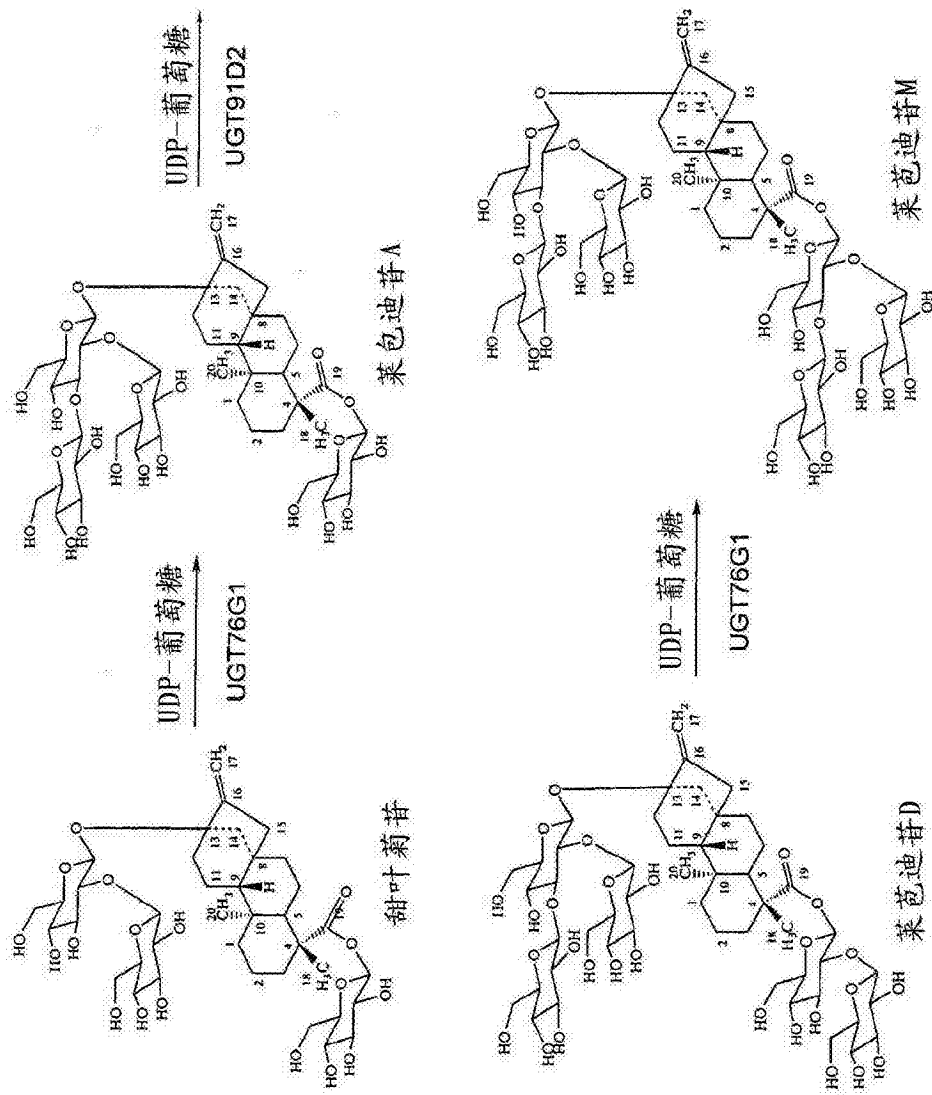


图 2

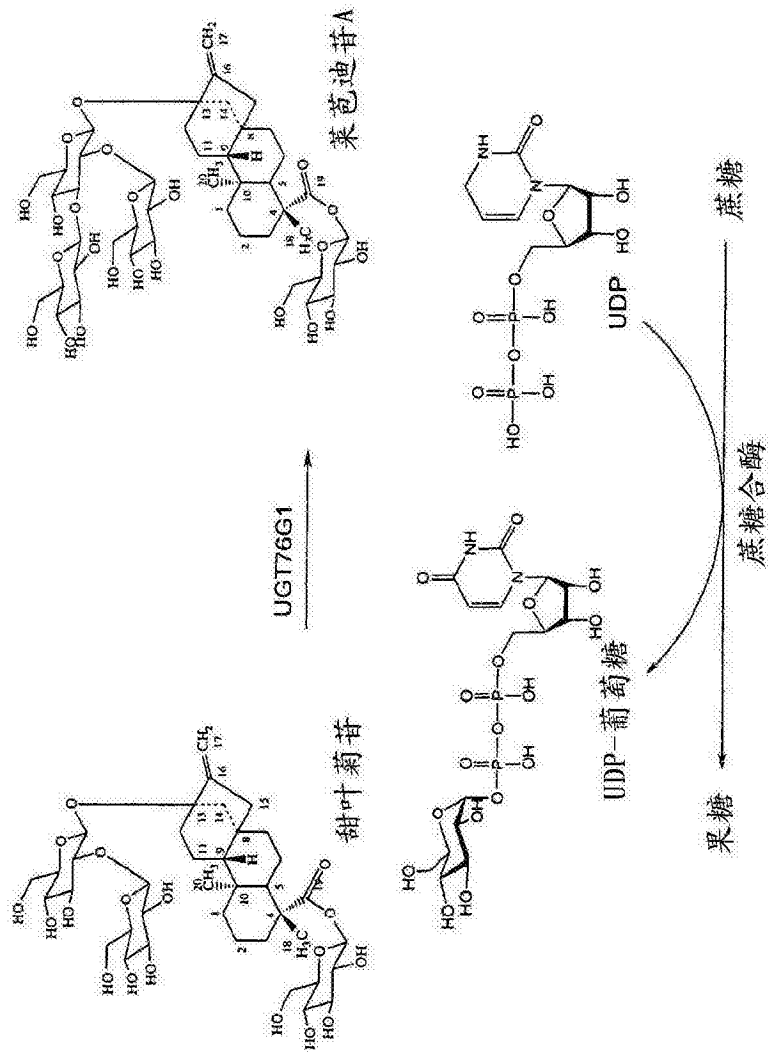


图 3

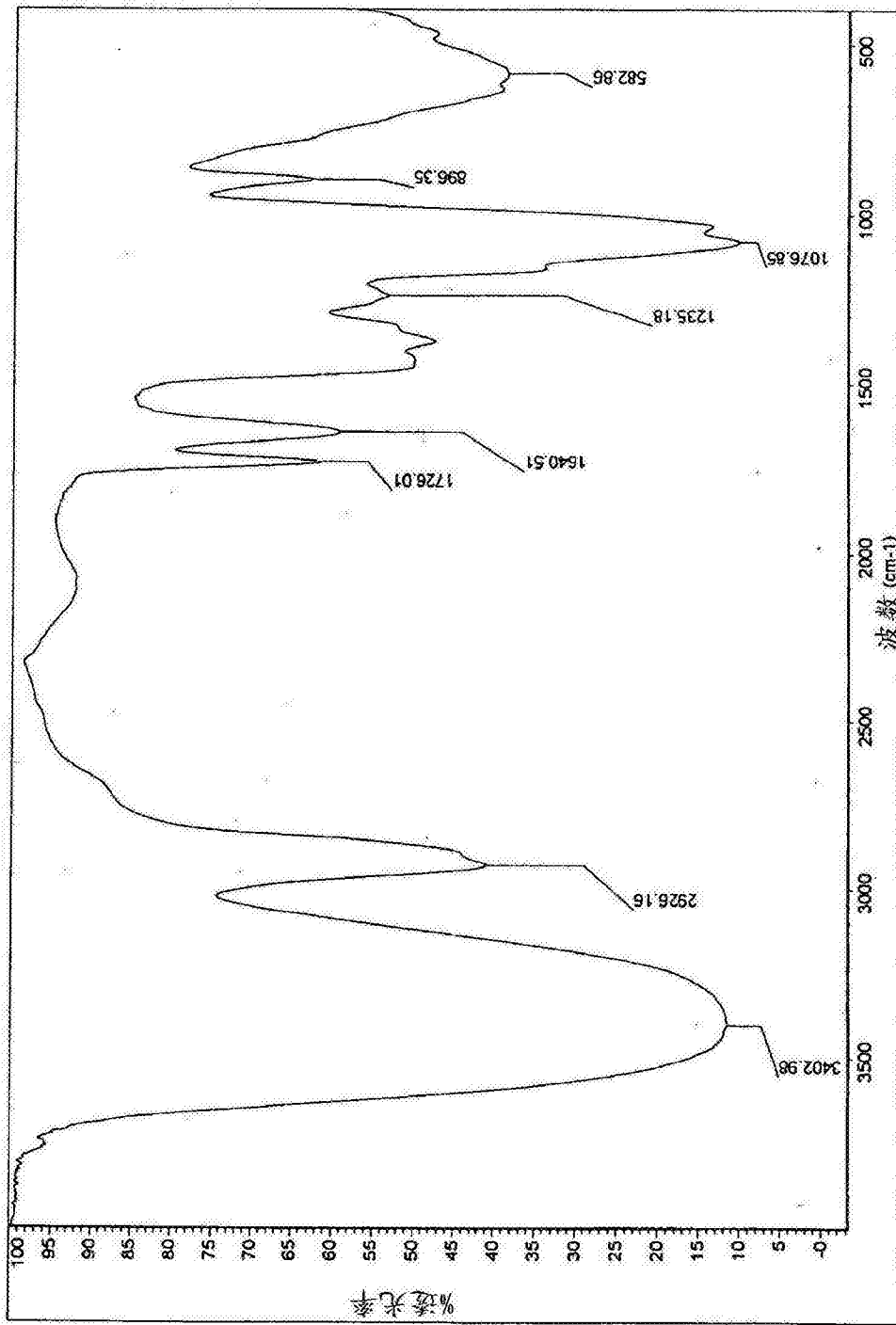


图 4

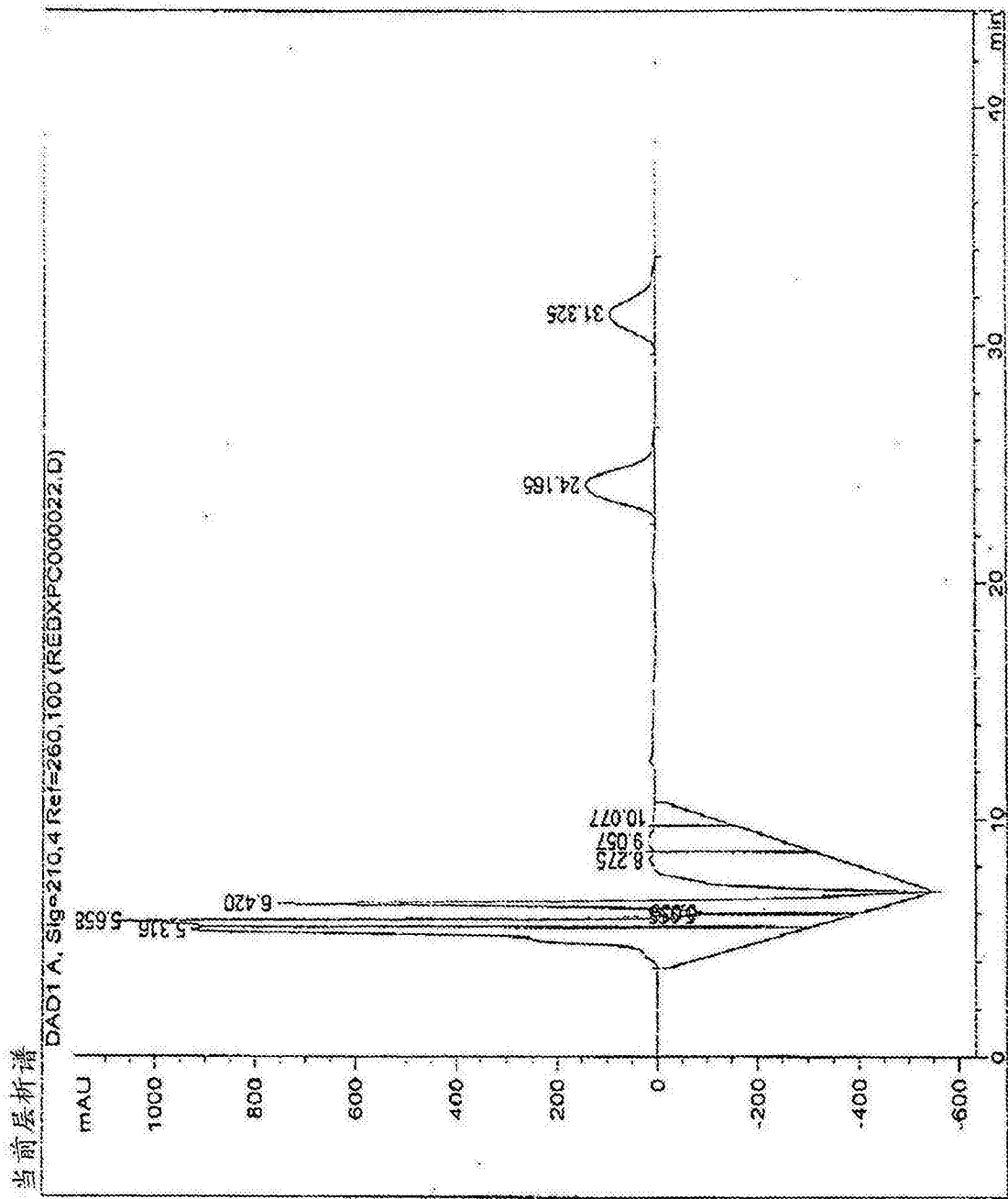


图 5

自菜芭迪苷D的生物转化纯化的菜芭迪苷M的HPLC层析谱

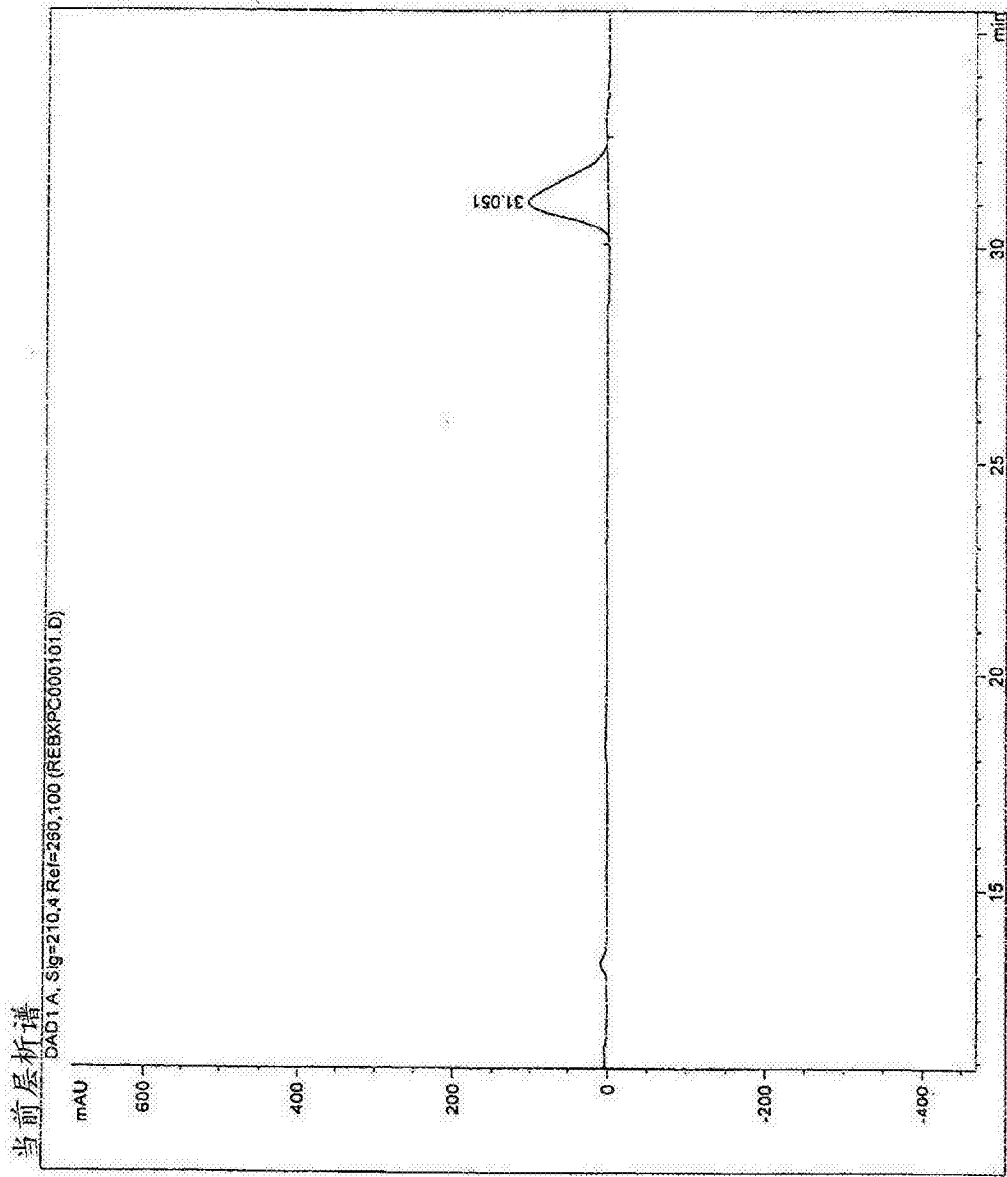


图 6

标准菜芭迪昔M的HPLC层析谱

当前层析谱

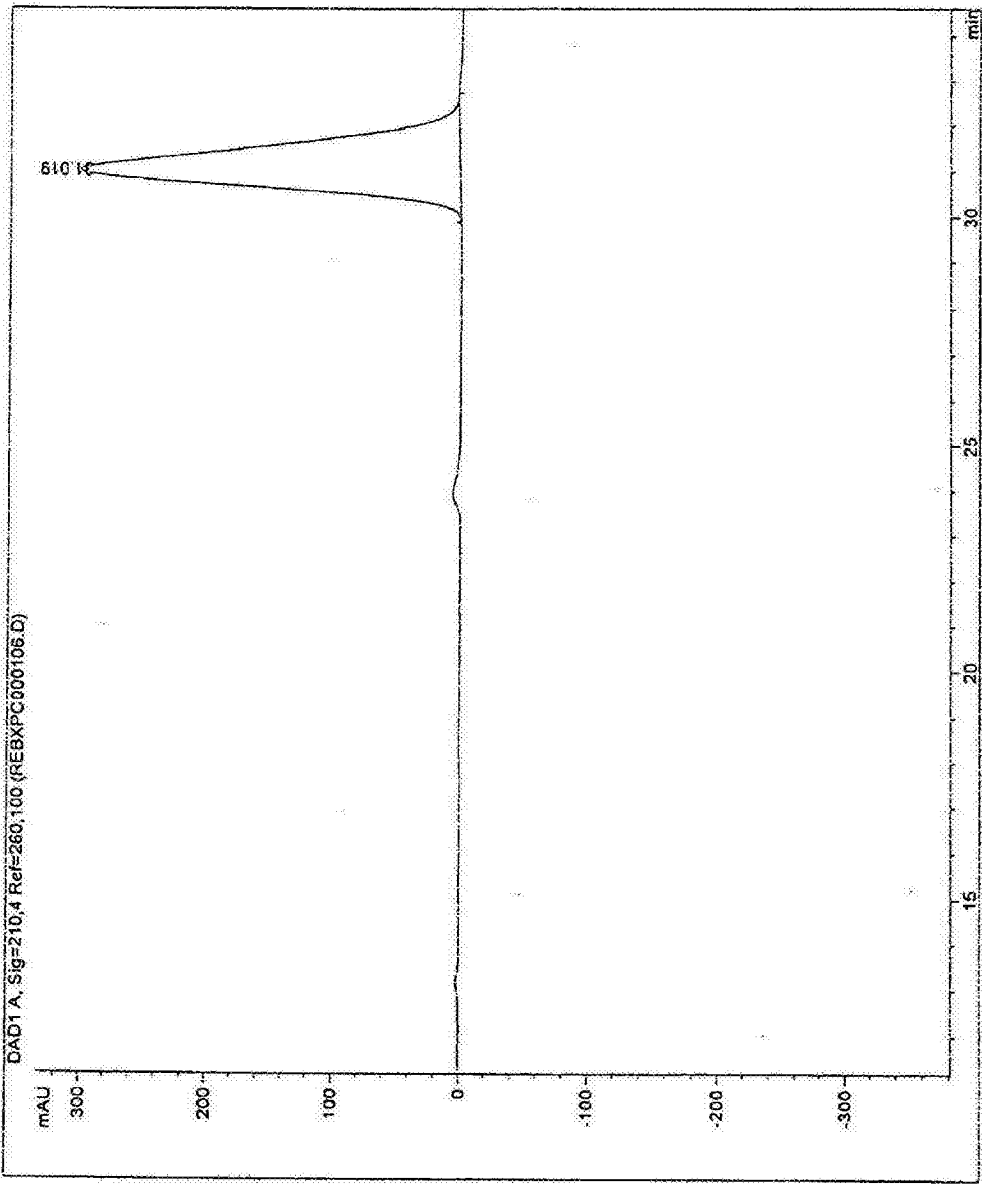


图 7

标准莱芭迪苷M和自莱芭迪苷D的生物转化纯化的莱芭迪苷M的共HPLC层析谱

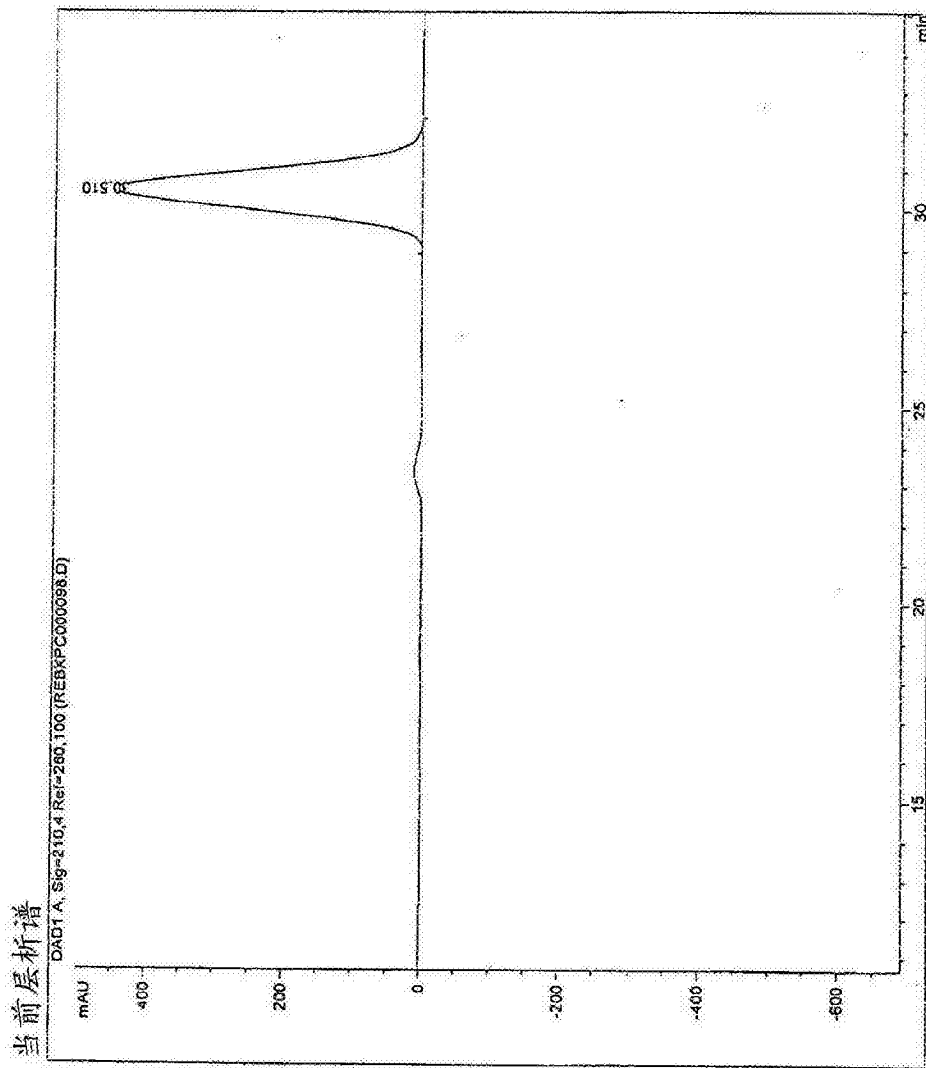


图 8

标准菜芭迪昔M和自莉芭迪昔D的生物转化纯化的菜芭迪昔M的<sup>1</sup>HNMR谱的叠加

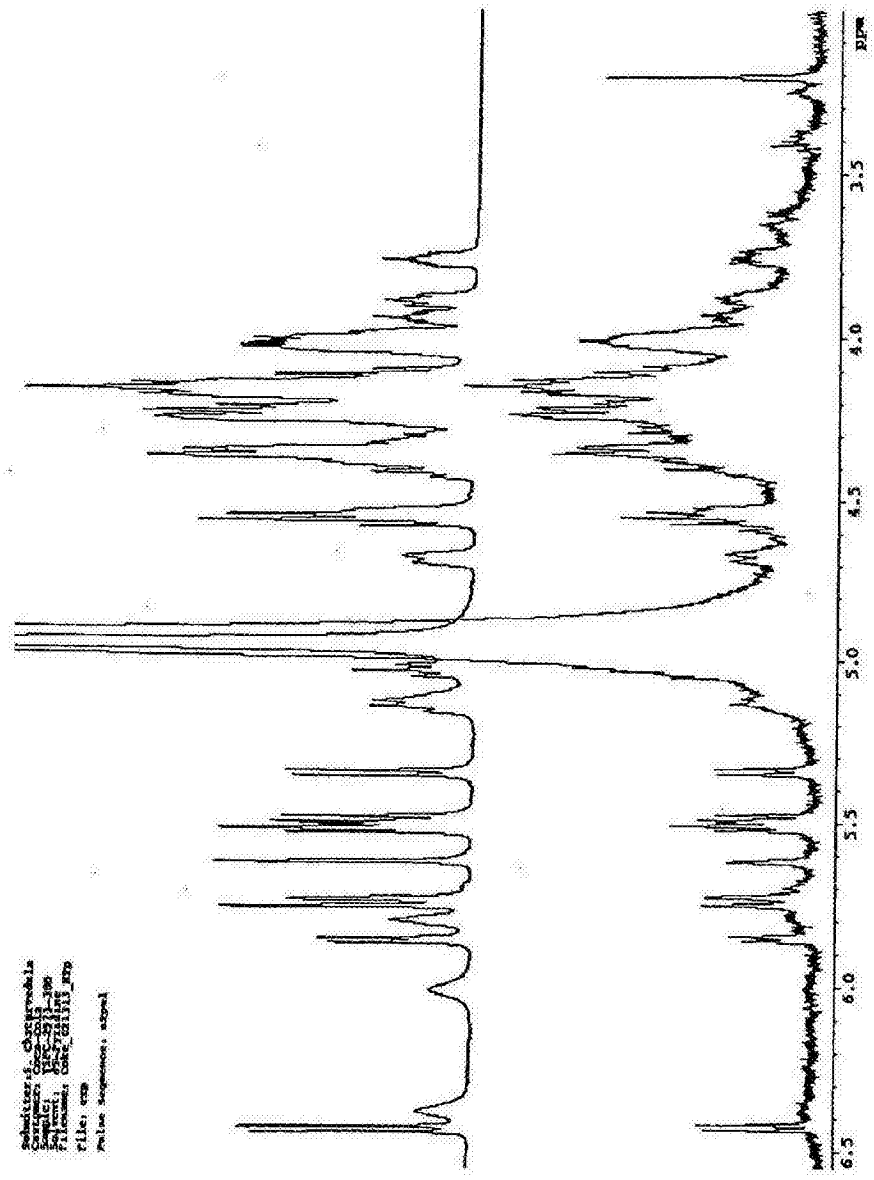
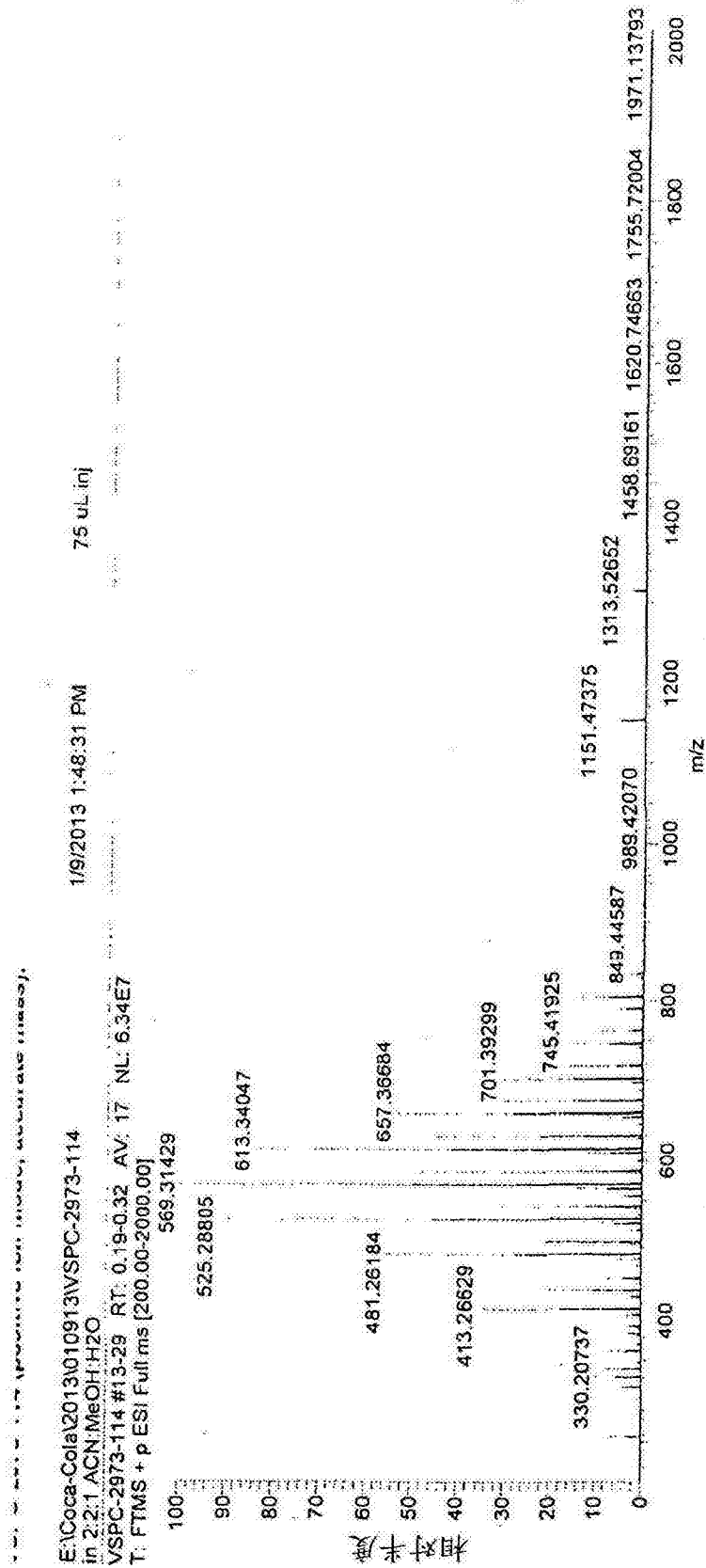


图 9



m/z 1313.52652的信号与分子式 $C_{26}H_{30}O_{13}$ (+0.658 ppm)的物质钠加合物一致。  
将样品溶解于甲醇，并以2:2:1的甲醇:乙腈:水洗脱。

图 10

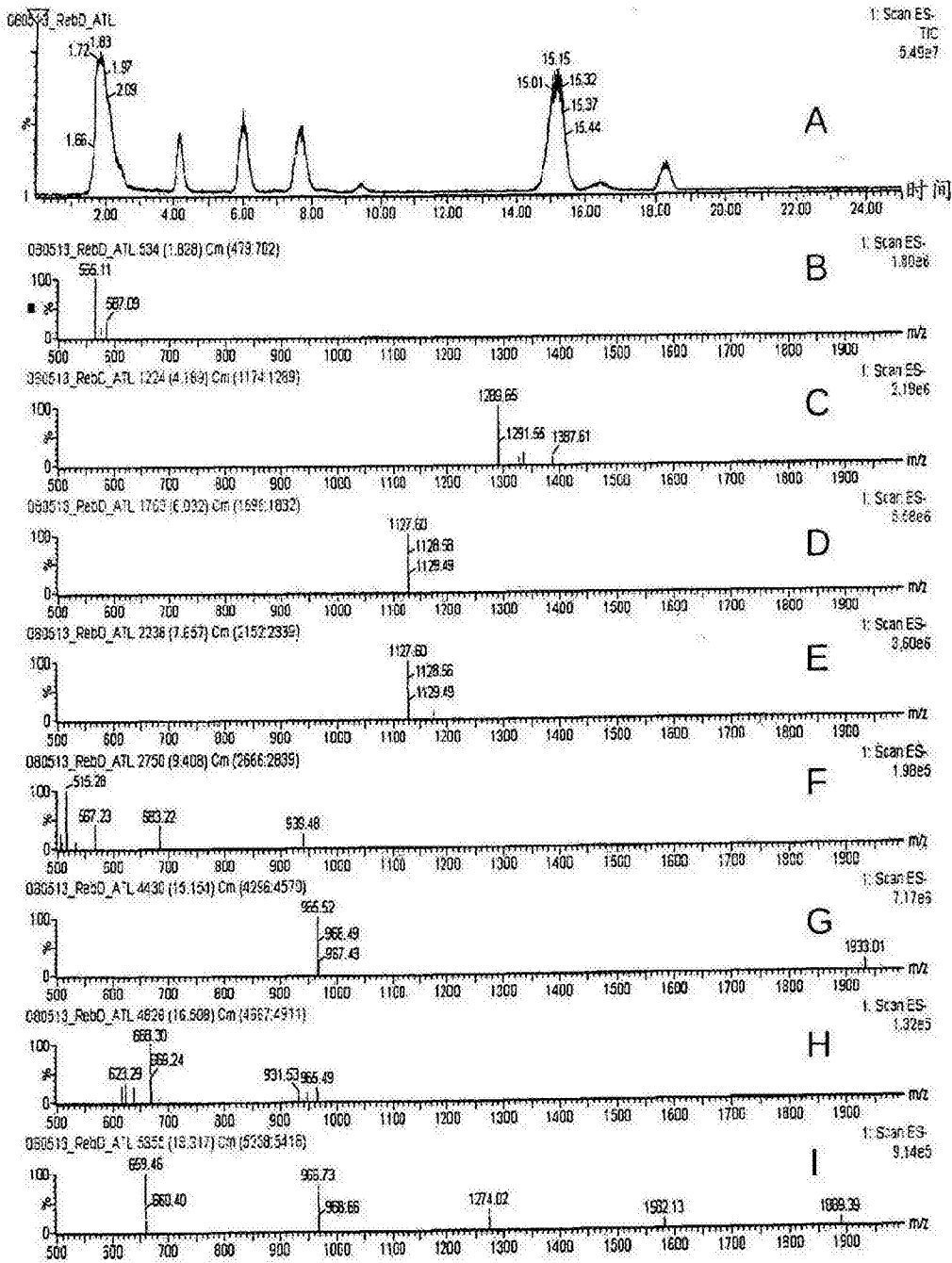


图 11

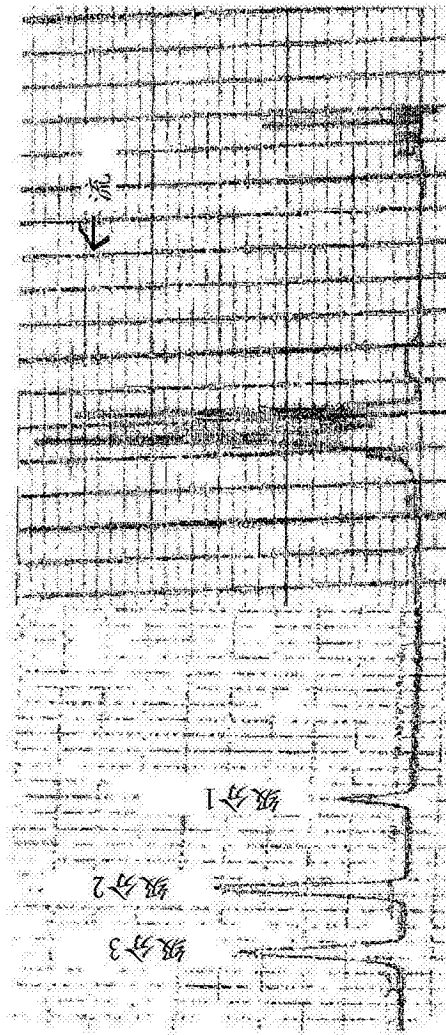


图 12

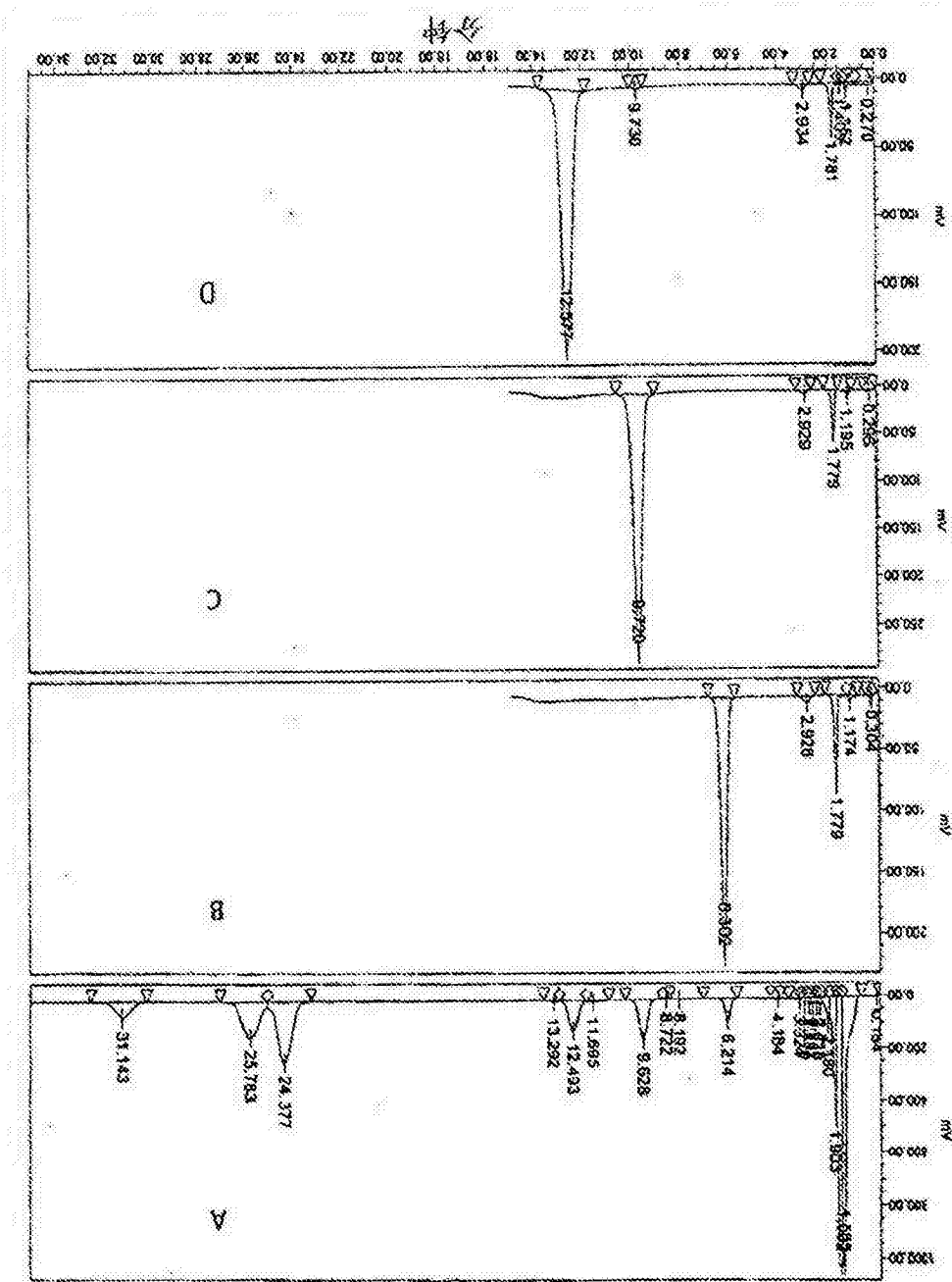
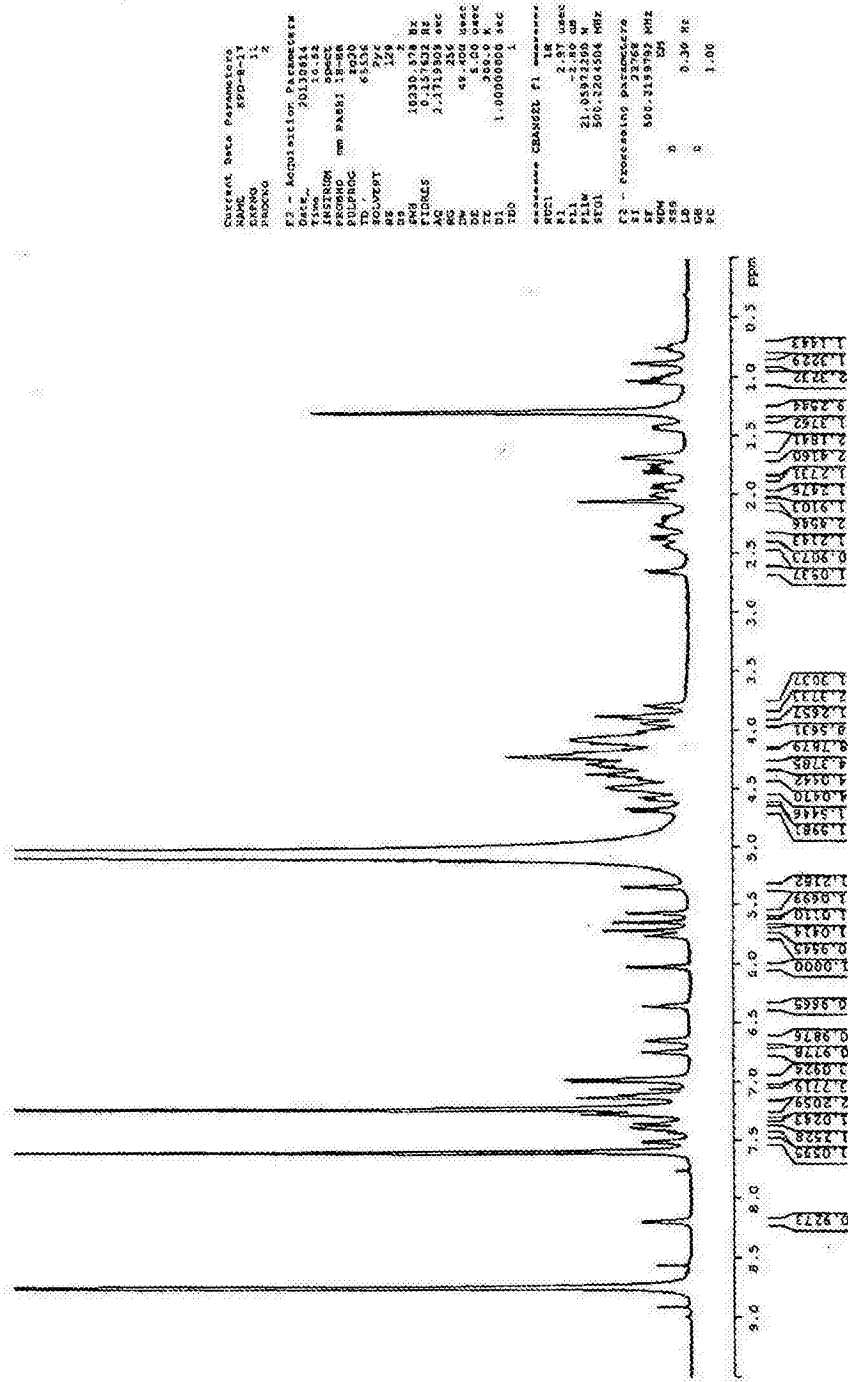


图 13

AMRI, 21 Corporate Circle  
 Location: 13  
 ARN: 20131237  
 Lot: MAU-D-111-8  
 Project: B417  
 User: kdevkota



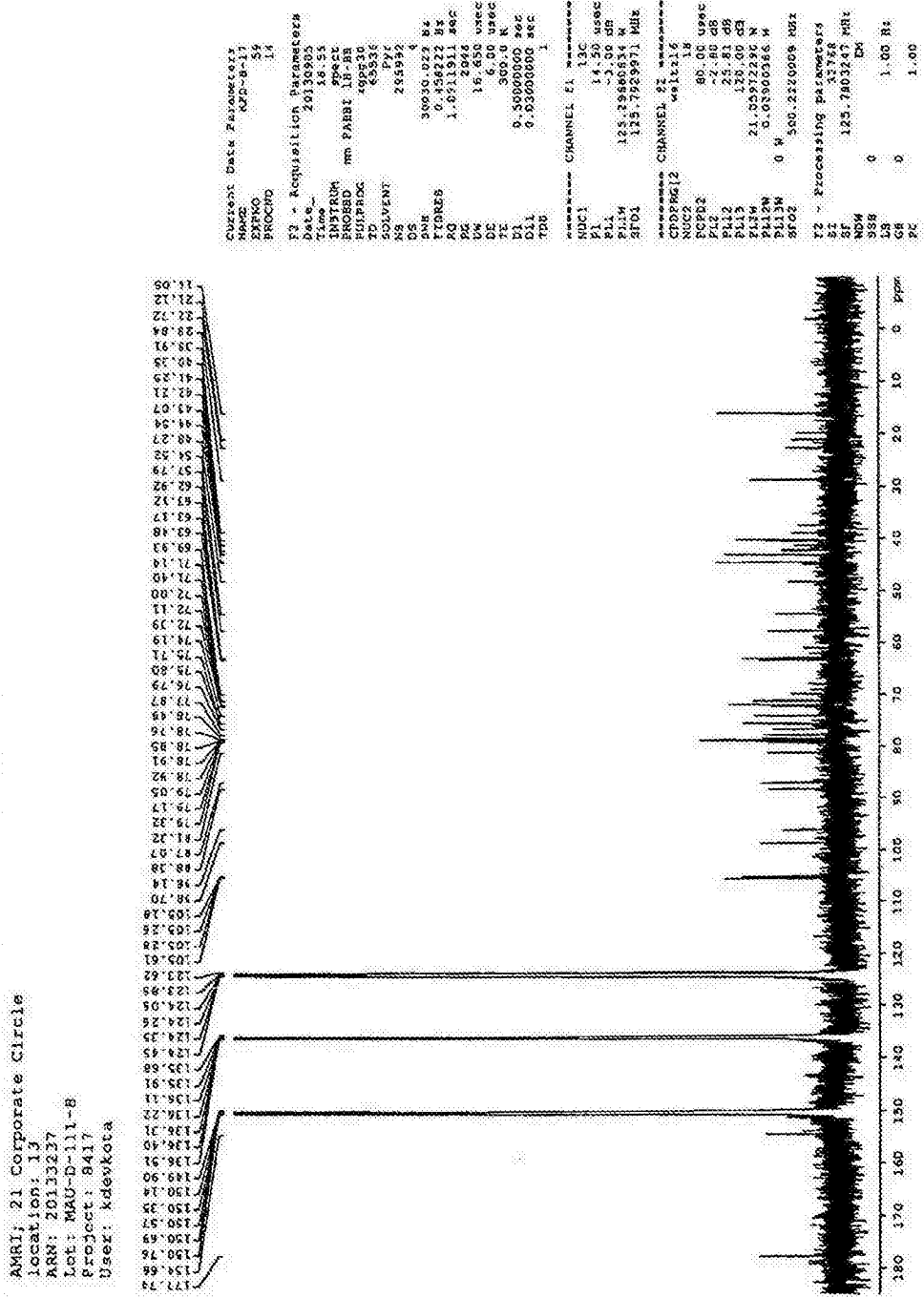


图 15

AMRI: 21 Corporate Circle  
 location: 13  
 ARN: 2013237  
 Lot: MAU-D-111-8  
 Project: 6417  
 User: kdevkoba

105.63  
105.28  
105.28  
105.28  
105.18  
99.70  
98.14  
98.38  
97.07  
81.32  
79.34  
79.32  
79.17  
79.05  
79.32  
78.91  
79.85  
79.76  
79.49  
77.87  
76.79  
75.80  
75.71  
74.59  
72.39  
72.21  
72.00  
71.40  
71.14  
69.53  
68.04  
63.48  
63.17  
63.12  
62.92  
60.89  
57.79  
54.94  
48.27  
45.01  
44.84  
43.07  
42.21  
41.25  
40.35  
36.91  
37.47

```

Current Data Parameters
Name: KPO-8-17
Date: 17
PRDCNC: 17

Z2 - Acquisition Parameters
Date_: 20130623
Time: 18.35
INSTRUM: spect
PROB: mm 44251 130
PULPROG: zgpg30
TC: 455336
SOLVENT: PVF
NS: 295992
DS: 4
SWH: 30032.000 Hz
FIDRES: 0.452221 Hz
AQ: 1.8511048 sec
RG: 327.500
CW: 16.500 usec
DE: 6.000 usec
TE: 300.2 K
D1: 0.5000000 sec
D11: 0.0300000 sec
TDC: 1

===== CHANNEL F1 =====
NUC1: 13C
P1: 14.50 usec
PL1: -3.00 dB
PLLK: 125.7980634 M
SFO1: 125.762971 MHz

===== CHANNEL F2 =====
CPDPRG2: waltz16
NUC2: 13C
P2: 80.00 usec
PL2: -2.00 dB
PL12: 25.81 dB
PL13: 120.00 dB
PL14: 21.05872250 M
PL15: 0.00000000 M
PL16: 0.00000000 M
SFO2: 500.222005 MHz

F2 - Processing parameters
SI: 32768
SF: 125.7603217 MHz
WDW: 0
SSB: 0
GB: 0
PC: 1.00
  
```

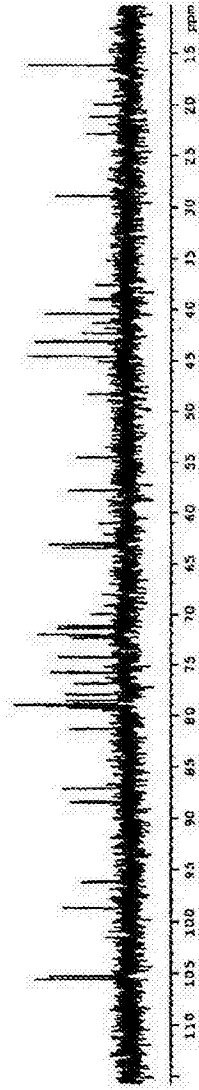


图 16

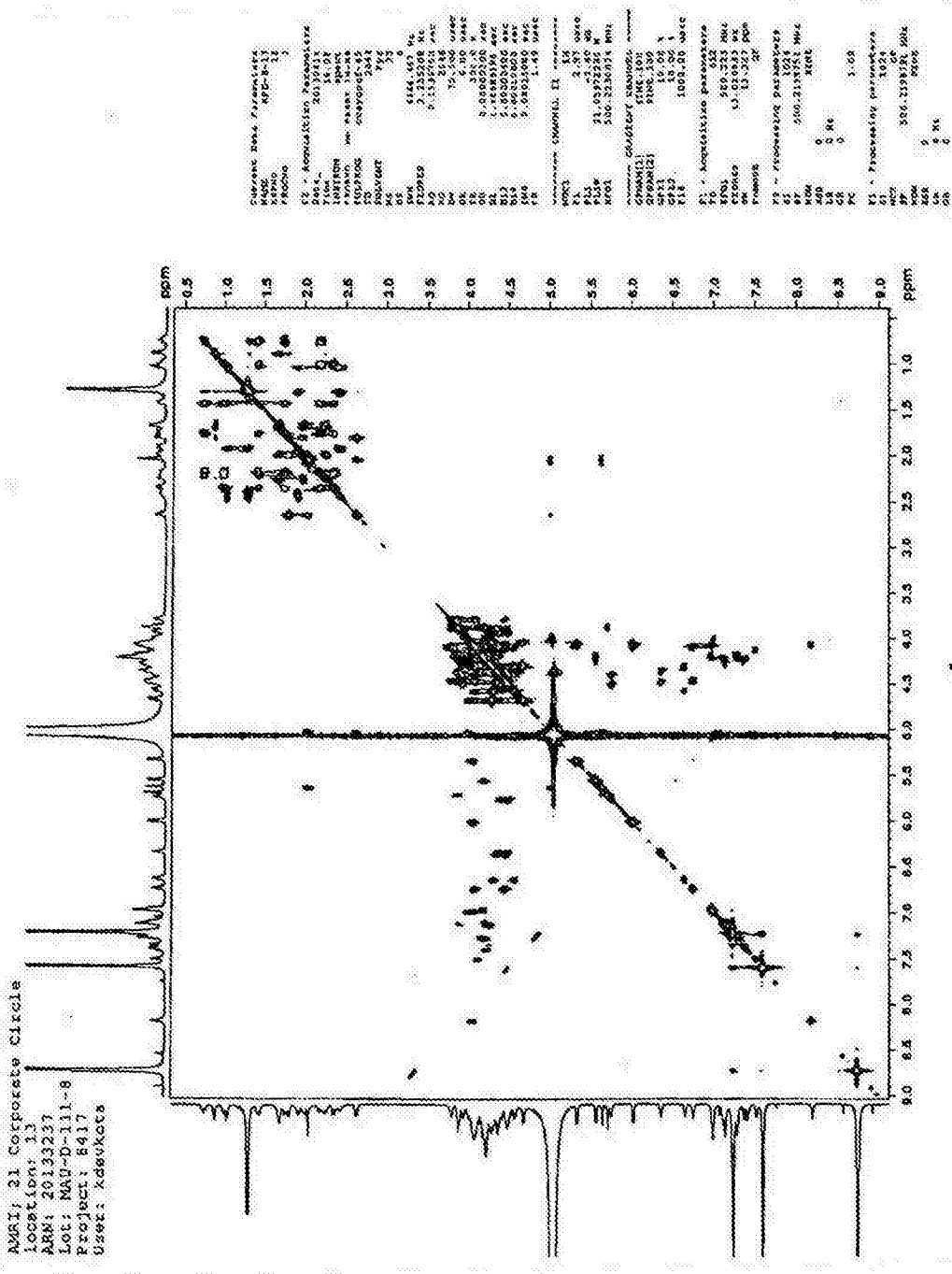


图 17

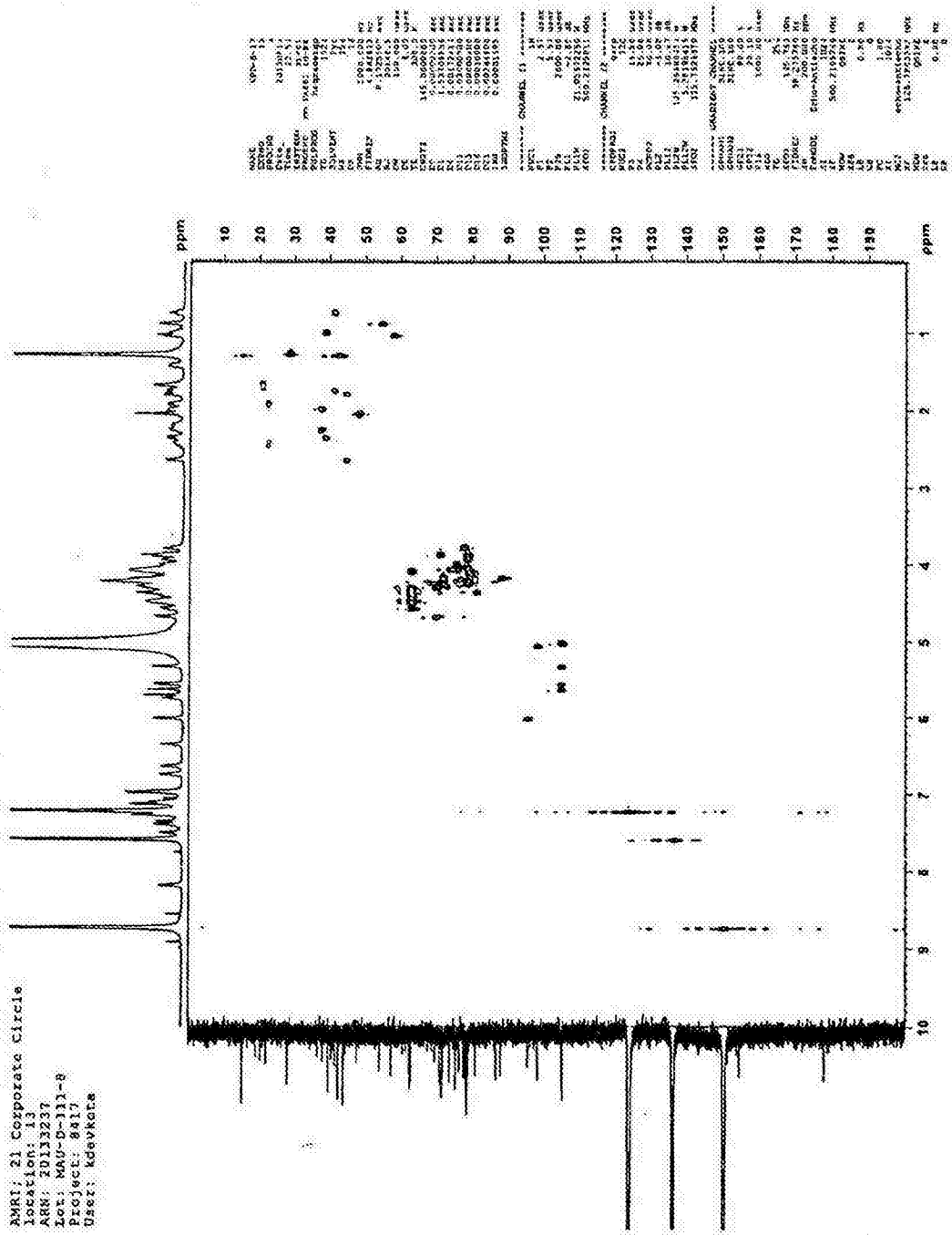


图 18

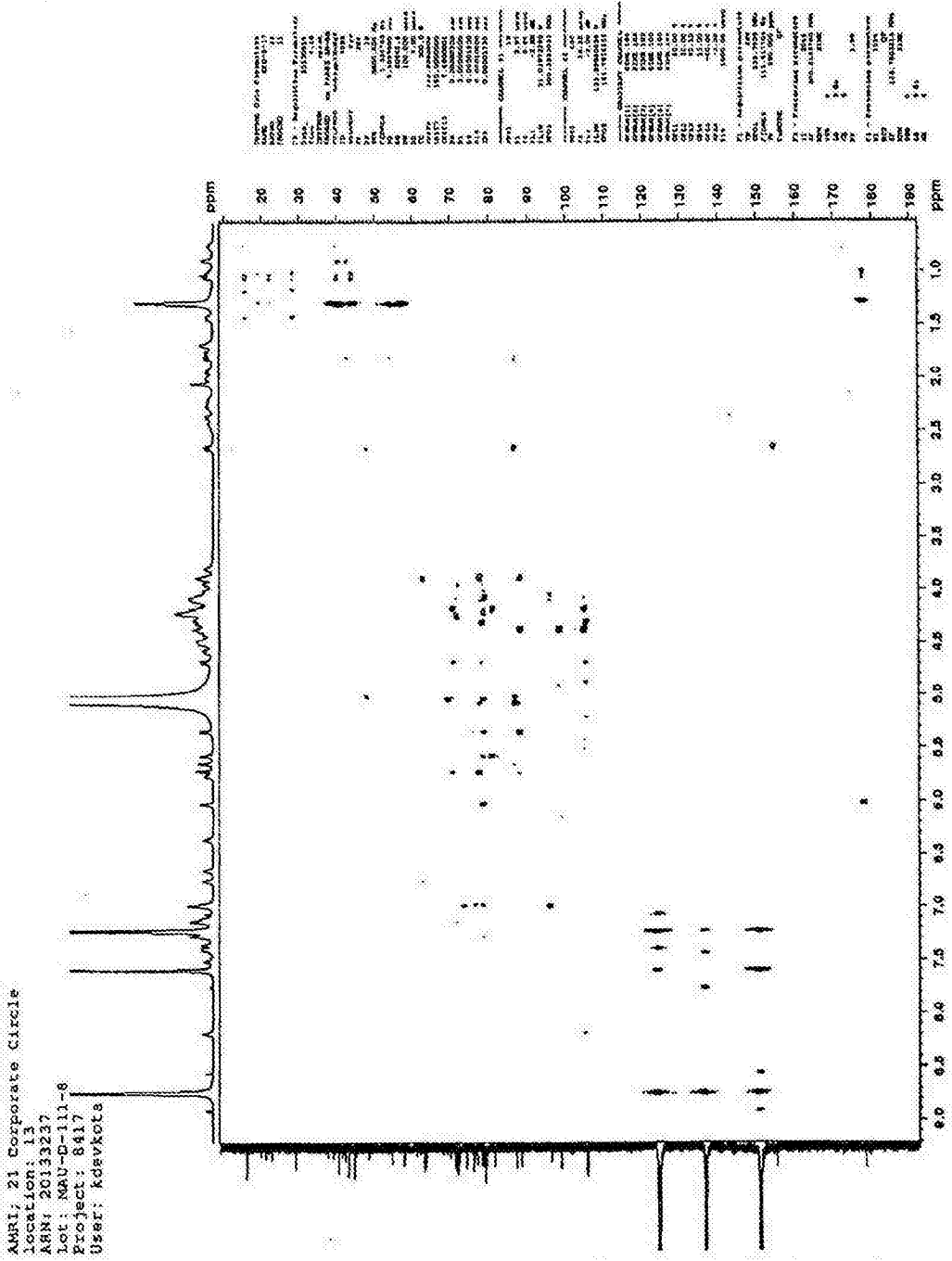


图 19

AMPL: 21 Corporate Circle  
 Location: 13  
 ARN: 2013237  
 Lot: MAU-0-111-8  
 Project: 8417  
 User: kdevkota

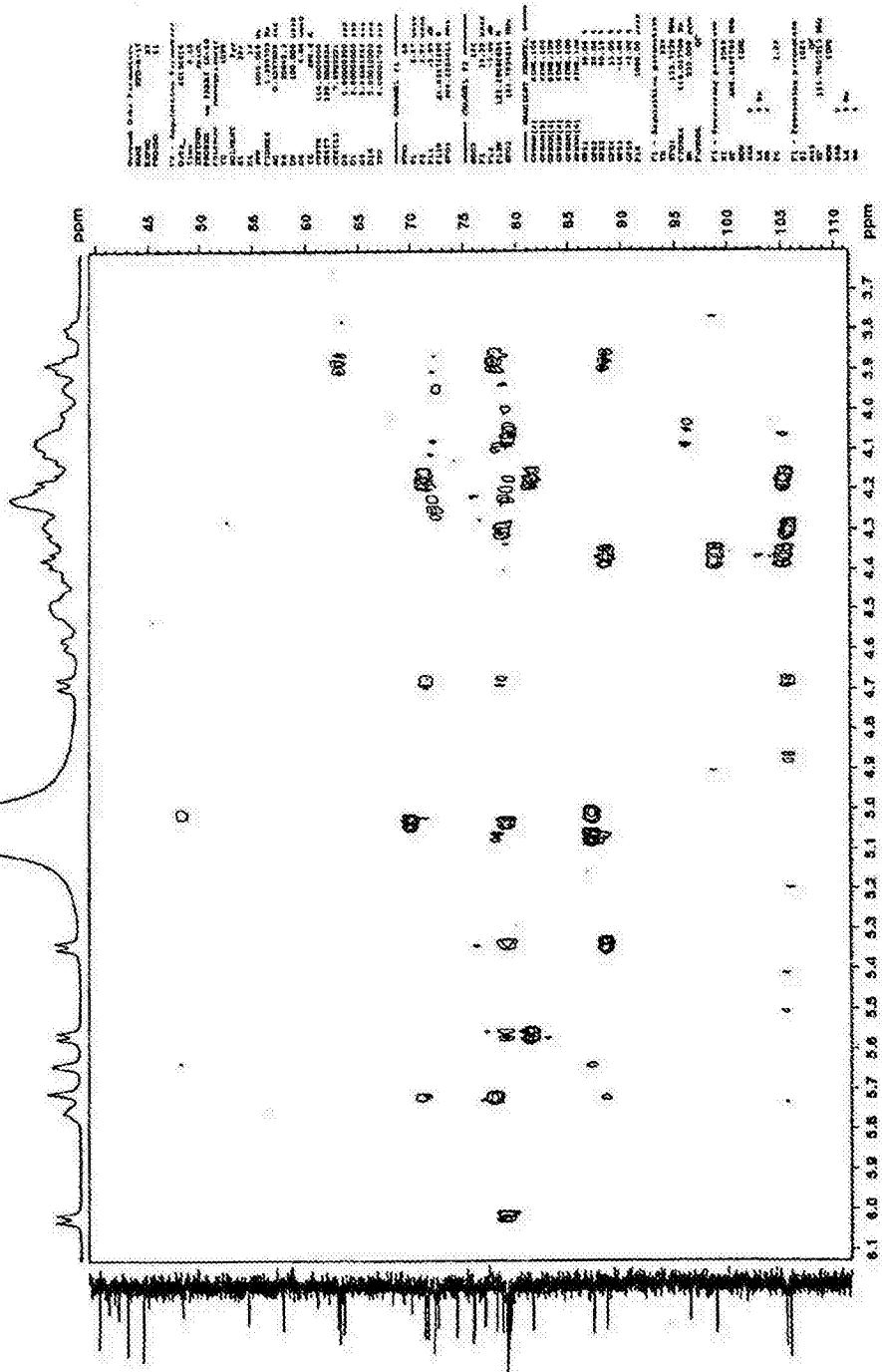


图 20



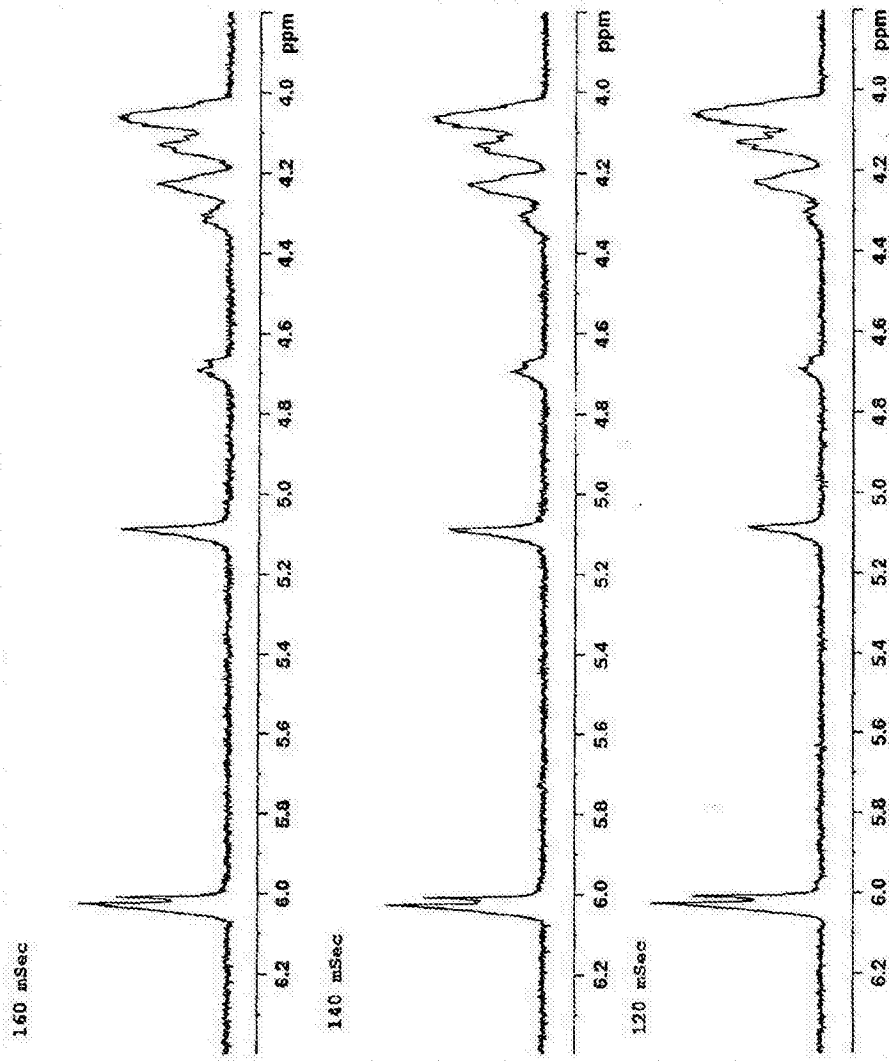


图 22

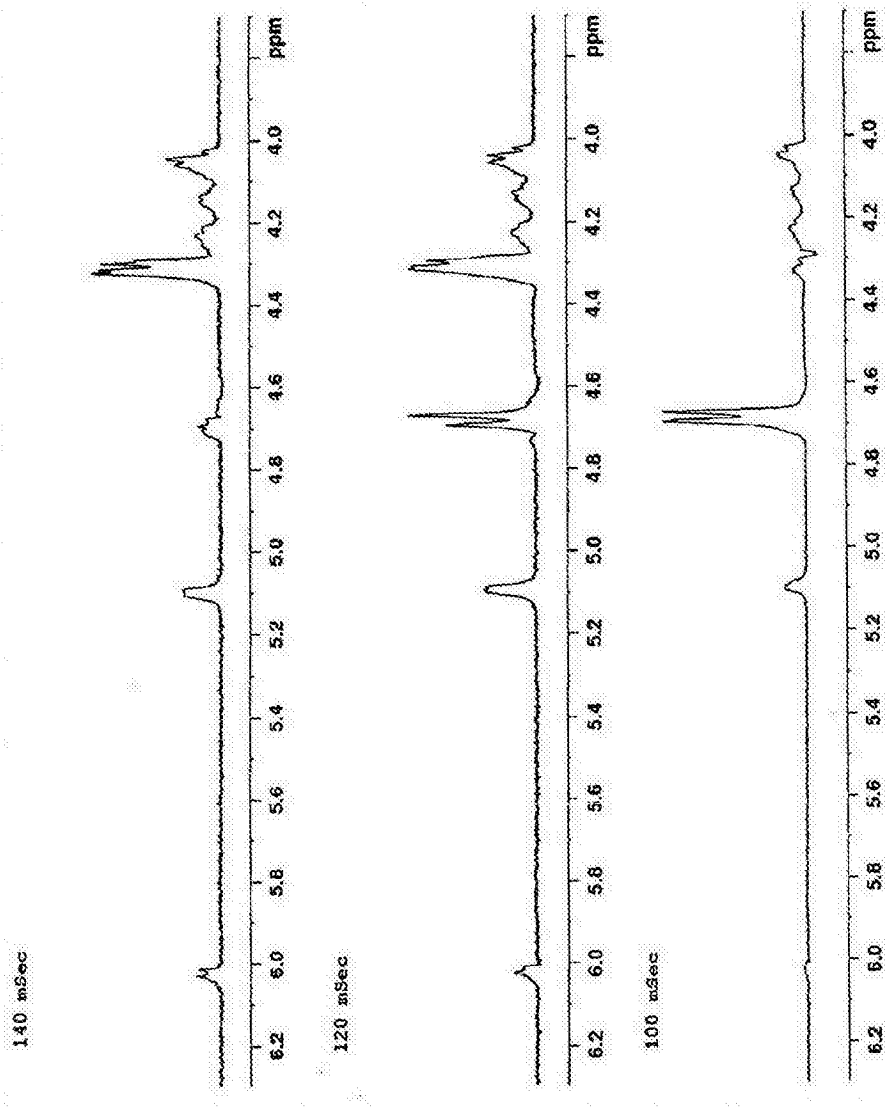


图 23

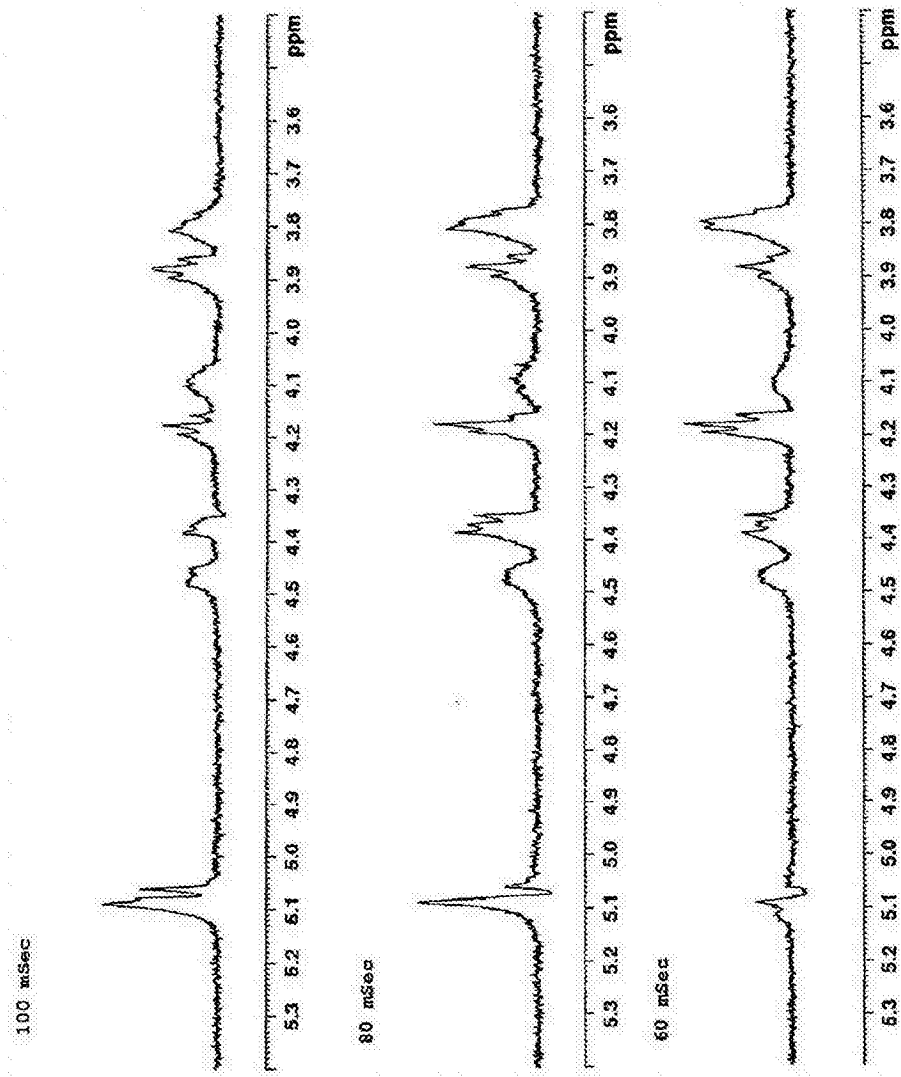


图 24

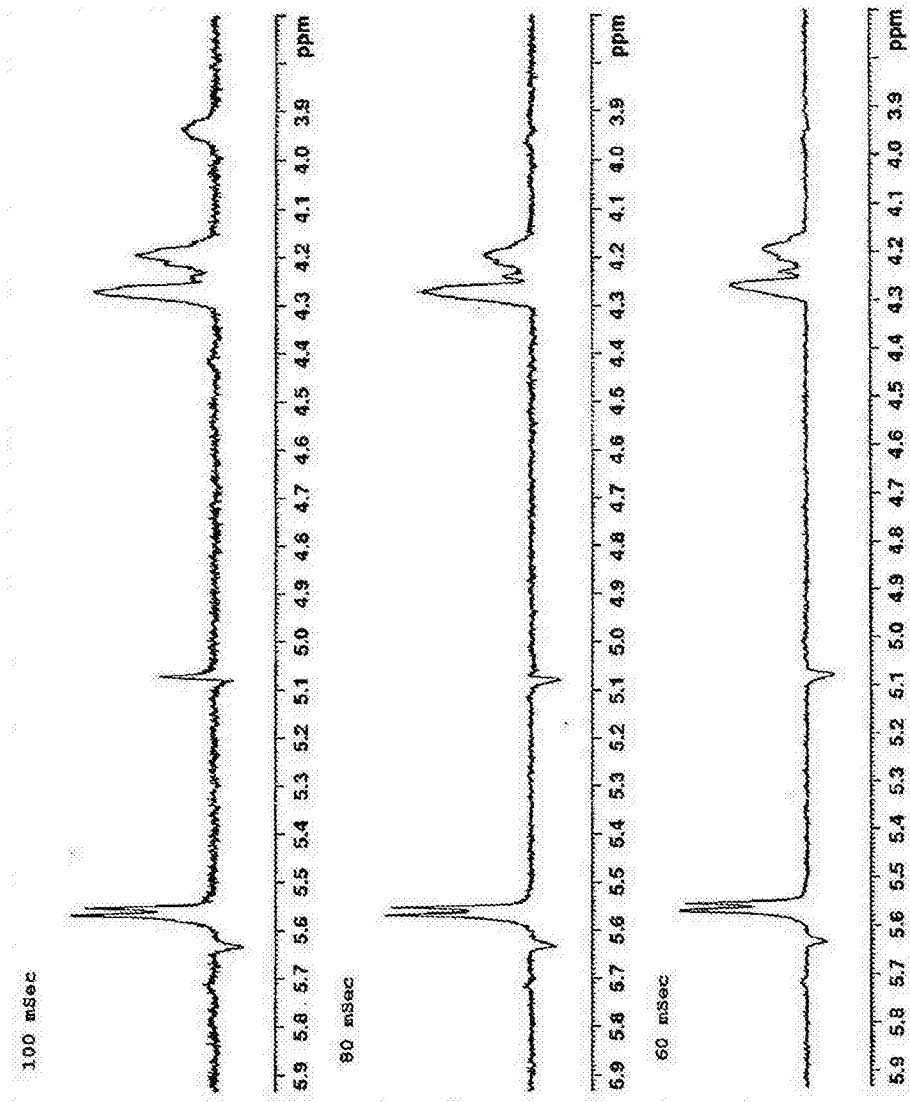


图 25

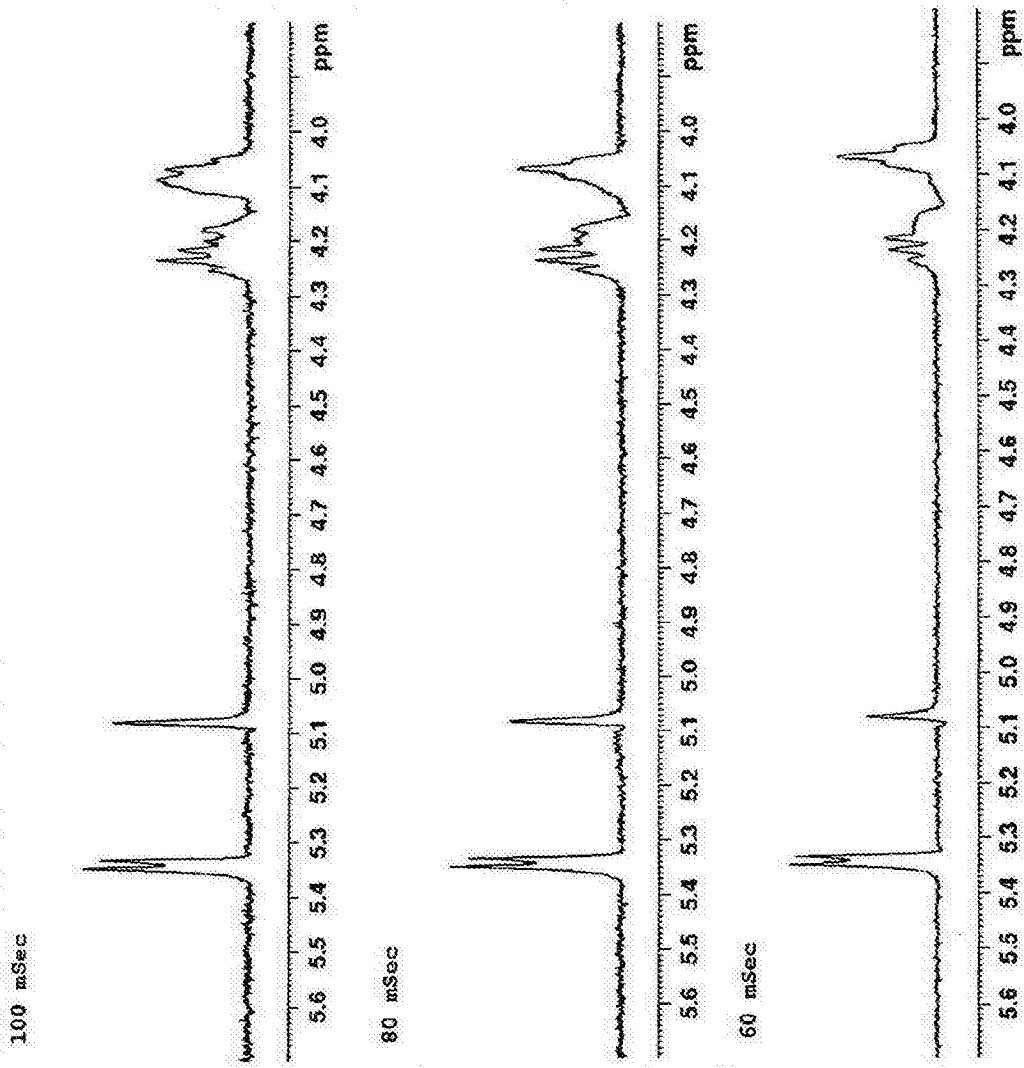


图 26

```

Current Data Parameters
NAME      KPY-B-17
EXNO     21
PROCNO   2

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20130816
Time     7:39
INSTRUM  SP6C
PROBHD   MK PAB81 1H-5C
SOLFRAC  2550
ID       65336
SOLVENT  PZ
MS       188
DS       2
SAG      10330.578 Hz
FIDRES   0.157632 Hz
AQ       3.1719939 sec
RG       256
DK       48.420 usec
DE       6.70 usec
TE       300.0 K
D1       1.00000000 sec
TIC      1

===== CHANNEL CL =====
MDC1    1H
P1      2.37 usec
PL1     -2.30 dB
PL1M    21.0372330 Hz
SFO1    500.1204504 MHz

F2 - Processing Parameters
SI      32768
SF      500.2199738 MHz
MCM     0
SSB     0
LB      0.30 Hz
GB      0
PC      1.00

```

AMRI, 21 Corporate Circle  
 location; 13  
 ARN: 20133237  
 Lot: MAU-D-111-8  
 Project: 8417  
 User: kdevkora

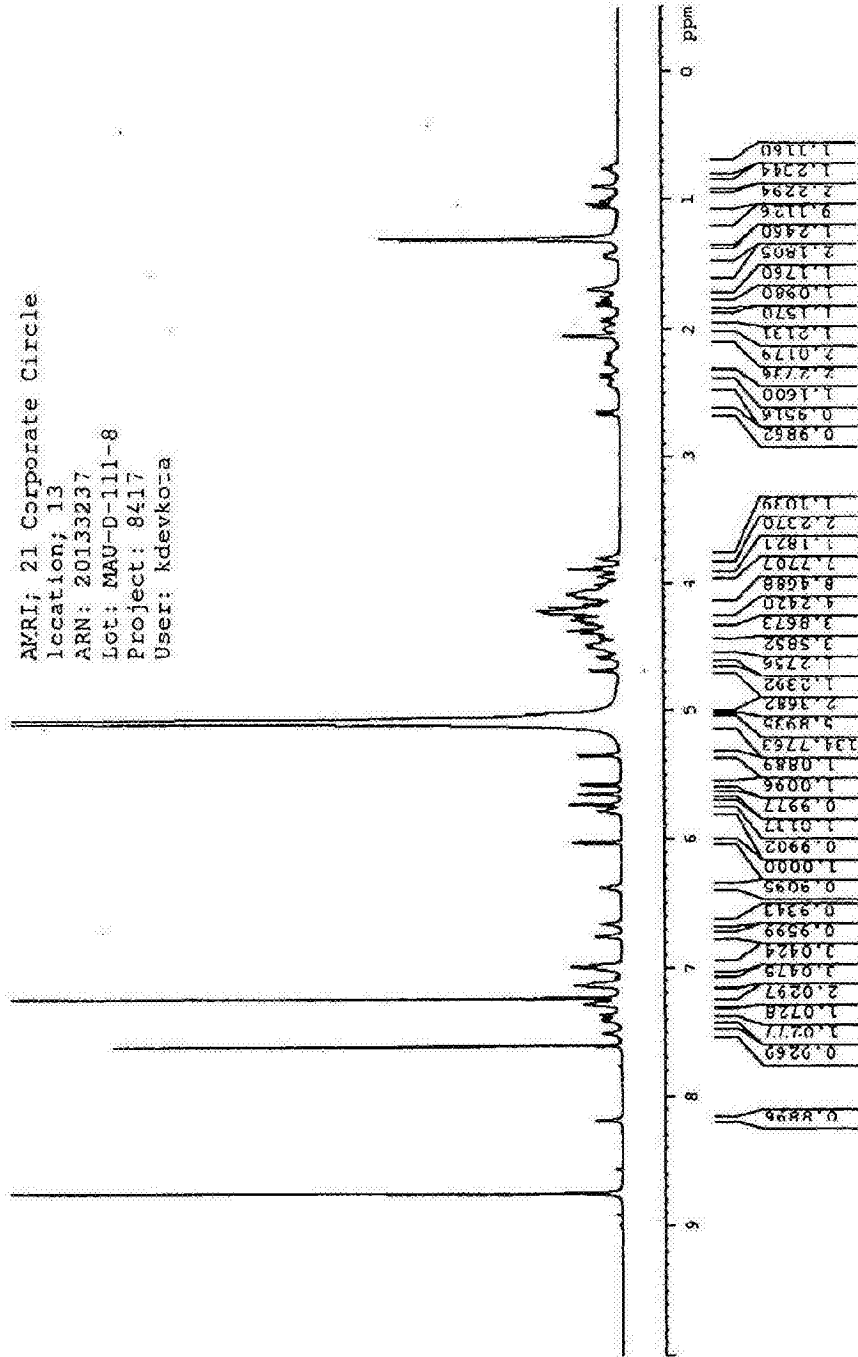


图 27

```

Current Data Parameters:
NAME      KP3-B-17
EXPNO    21
PROCNO   3
F2 - Acquisition Parameters
Date_    20130816
Time     7.29
INSTRUM spect
PROBHD   mm PABBI 1H-BB
PULPROG zgpg30
TD       65536
SOLVENT  H2O
NS       128
DS       2
SWH      10330.578 KHz
FIDRES   0.157632 Hz
AQ       3.171986 sec
RG       384
DR       288
DE       48.400 Usec
TE       300.2 K
D1       1.33300000 sec
TD0      1
----- CHANNEL f1 -----
NUC1     1H
P1       2.97 Usec
PL1      -2.80 dB
PL12     21.05972240 W
SFO1     500.2204506 MHz
F2 - Processing Parameters:
SI       32768
SF       509.2199794 MHz
RG       0
SSB      0
CB       0
PC       1.00

```

AMRI, 21 Corporate Circle  
 location; 23  
 ARN: 2013237  
 lot: MAU-D-1-1-8  
 Project: 8417  
 User: kdevketa

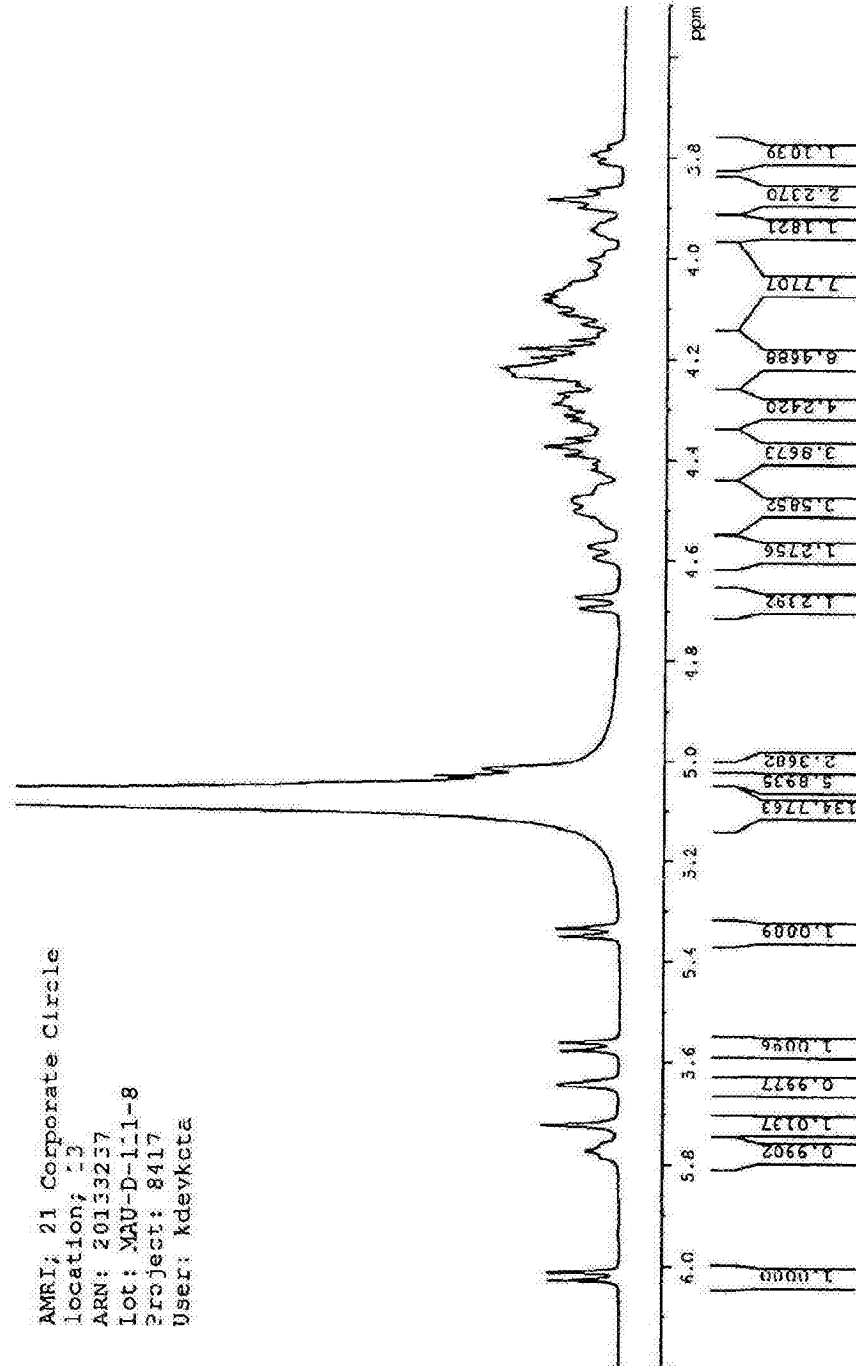


图 28

AMY: 21 Corporate Circle  
 location: 13  
 ARN: 201325  
 Lot: RFD-B-21 (MAU-D-111-4)  
 Project: 8417  
 User: Kdevkota

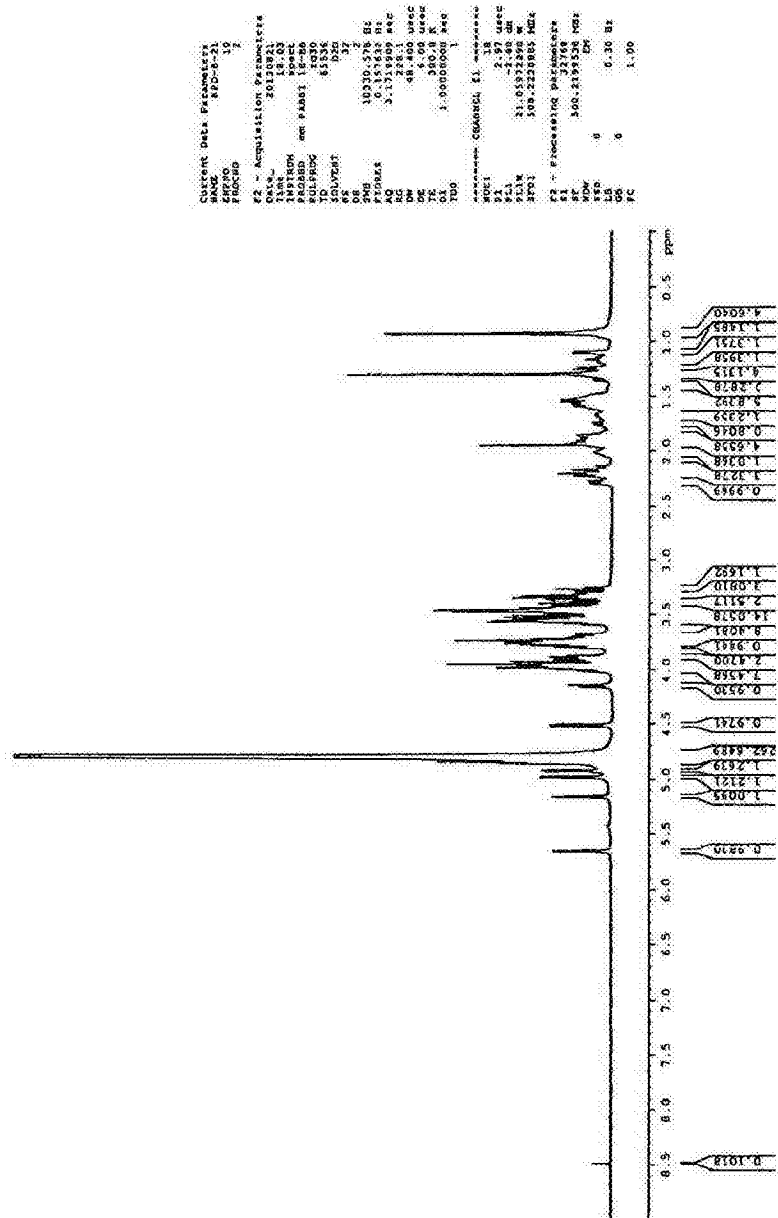
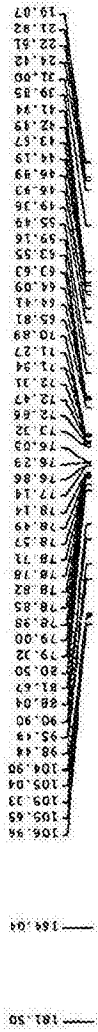


图 29

AMR1; 21 Corporate Circle  
 Location; 9  
 ARN: 2013235  
 Lot: RPD-B-21 (MAU-D-111-4)  
 Project: 8417  
 User: KdevKORa



```

Current Data Parameters
NAME      RPD-B-21
EXPNO    13
PROCNO   12

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20120914
Time     17:14
INSTRUM spect
PROBHD   5 mm BBO BB-1H
PULPROG zgpg30
TD        65536
SFO2      125.760000
AQ        0.220
RG        652
NS        128024
DS        4
SWH       50036.019 Hz
FIDRES   0.859222 Hz
AQ        1.058111 sec
RG        652
DM        15.650 usec
DE        15.650 usec
TE        300.2 K
D1        0.50000000 sec
D11       0.00000000 sec
D12       0.00000000 sec
===== CHANNEL f1 =====
NUC1      13C
P1        7.75 usec
PL1       0.00 dB
PL12      2.30 dB
SFO1      125.760000 MHz
===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG1N Mzg116
NUC2      1H
P2        90.00 usec
PL2       0.00 dB
PL12      1.00 dB
PL13      1.00 dB
PL14      1.00 dB
PL15      13.43233727 MHz
PL16M     0.00000000 MHz
PL17M     0.33196479 MHz
PL18M     0.00000000 MHz
SFO2      400.1320005 MHz

F2 - Processing Parameters
SI        32768
SF        400.1320005 MHz
WDW       EM
SSB       0
GB        0
CB        0
PC        0.40
  
```

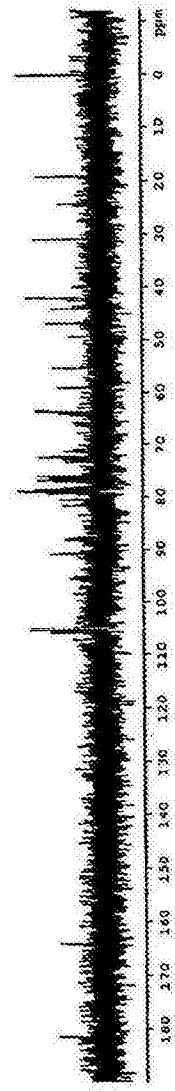
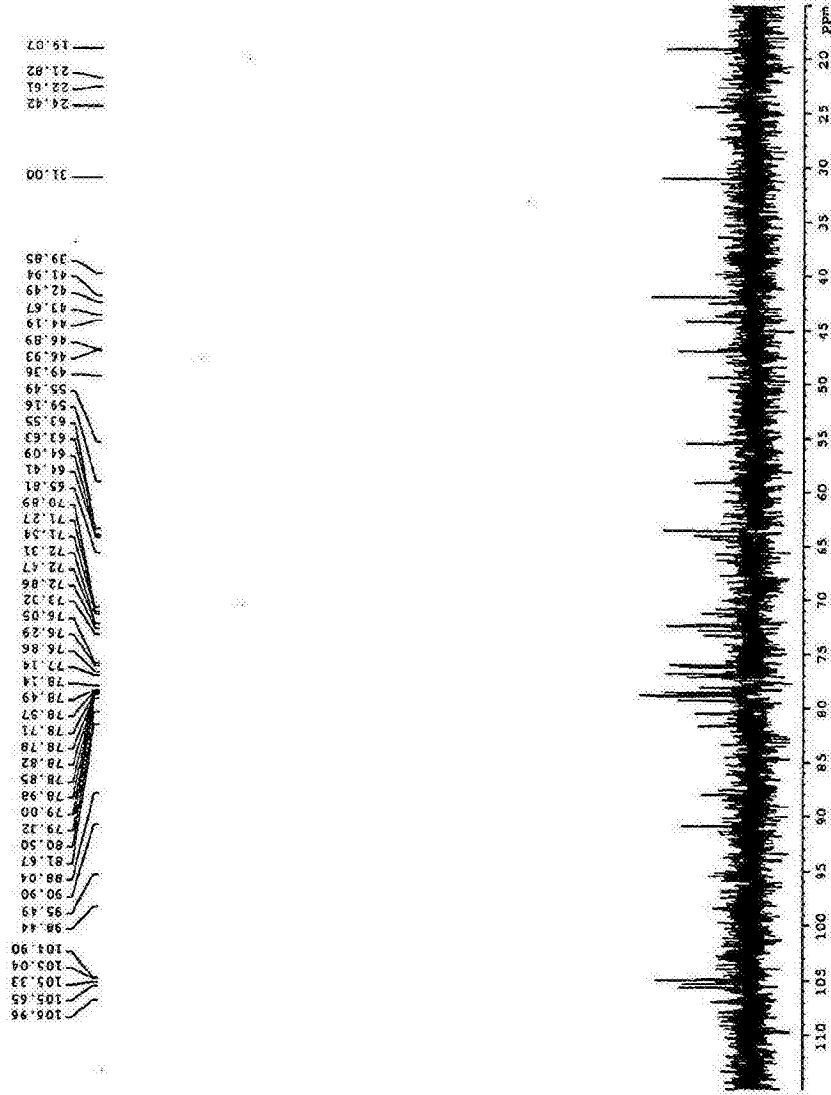


图 30

AMM: 21 Corporate Circle  
 location: 5  
 ARN: 20133235  
 Lot: KED-B-21 (MAU-D-111-4)  
 Project: 8417  
 User: Kdevkota



```

Current Data Parameters
NAME      KED-B-21
EXPNO    12
PROCNO   2

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20130914
Time     17.14
INSTRUM spect
PROBHD   5 mm BBO BB-1E
PULPROG zgpg30
SOLVENT  DMSO
NS       129024
DS       4
SWH      30030.034 Hz
FIDRES   0.458222 Hz
AQ       1.021911 sec
RG       456.1
DE       164.80 usec
TE       300.2 K
D1       0.50000000 sec
D11      0.03000000 sec
TD0      1

===== CHANNEL F1 =====
NUC1     13C
P1       1.00 usec
PL1      0.00 dB
PL1N     64.01805878 W
SFO1     125.7703643 MHz

===== CHANNEL F2 =====
CPDPRG2  waltz16
NUC2     1H
P2       80.00 usec
PL2      0.00 dB
PL2N     16.00 dB
PL12     16.00 dB
PL13     16.00 dB
PL1ZM    13.43233727 W
PL1ZM    0.37857440 W
PL13M    0.33740479 W
SFO2     400.1320003 MHz

F2 - Processing Parameters
SI       32768
SF       125.7674213 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       1.00 Hz
GB       0
FC       0
  
```

图 31

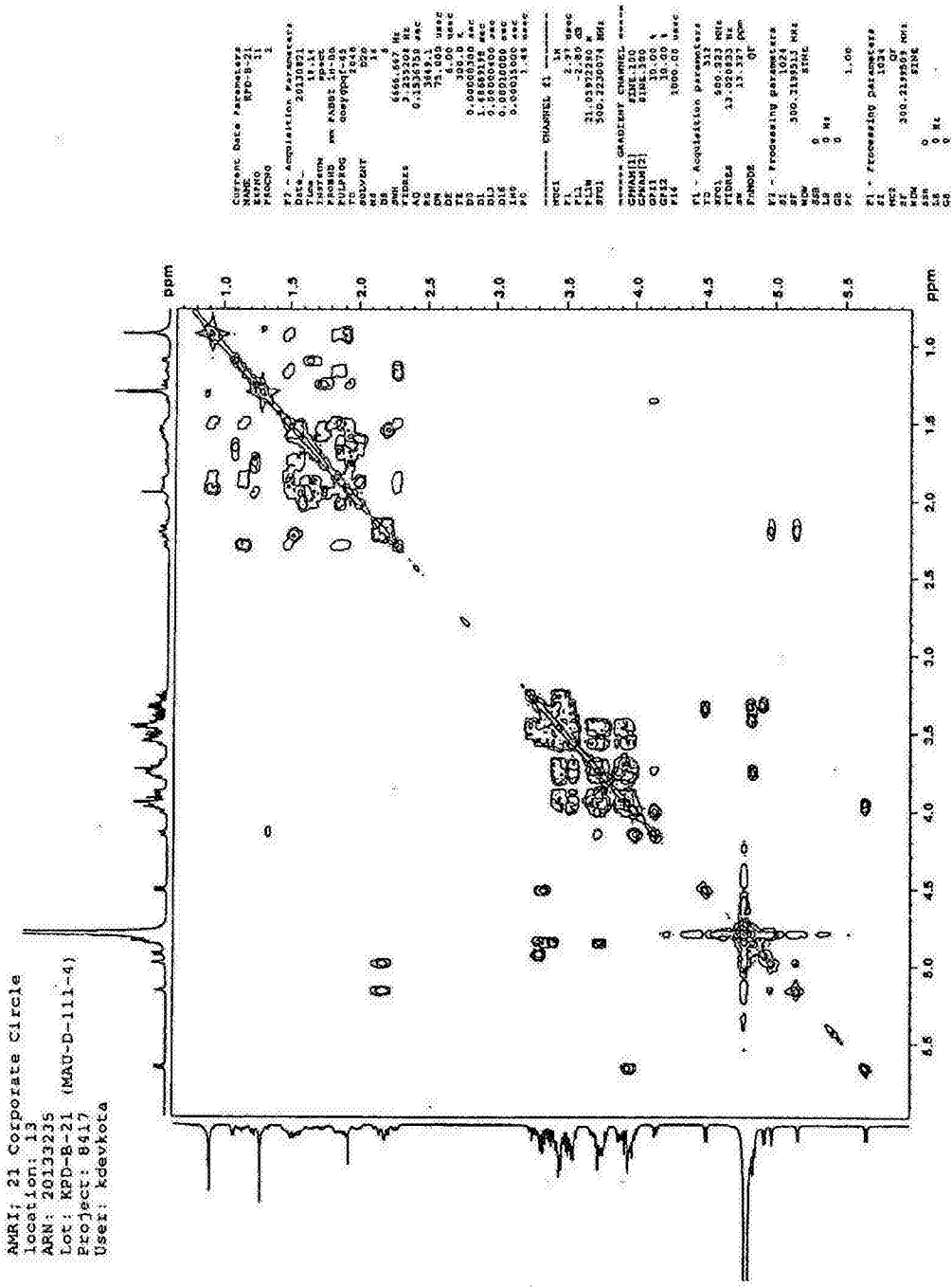


图 32



AMRI; 21 Corporate Circle  
location: 13  
ARN: 2013235  
Lot: KPD-B-21 (NAU-D-111-4)  
Project: 8417  
User: kdevkota

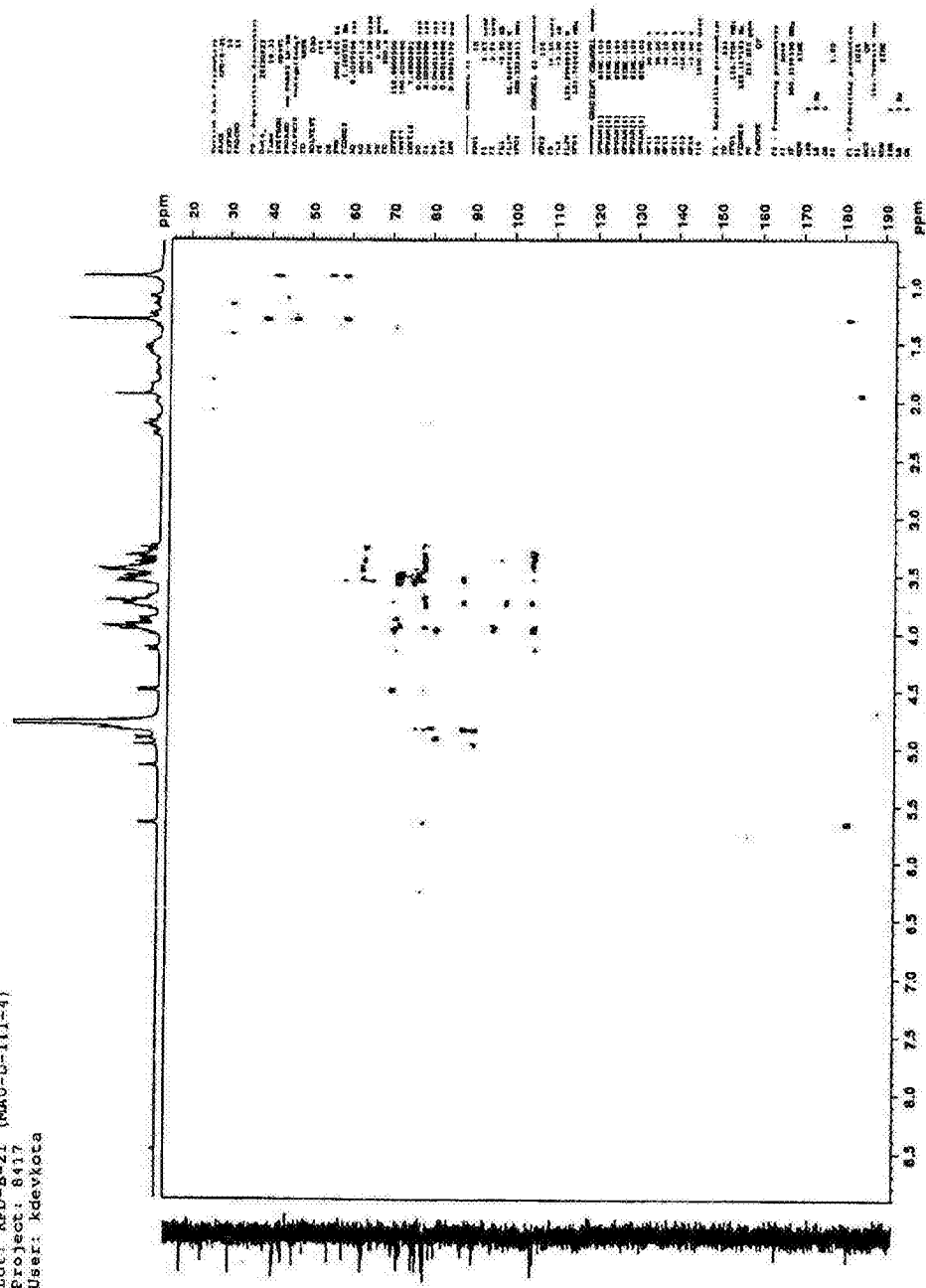


图 34



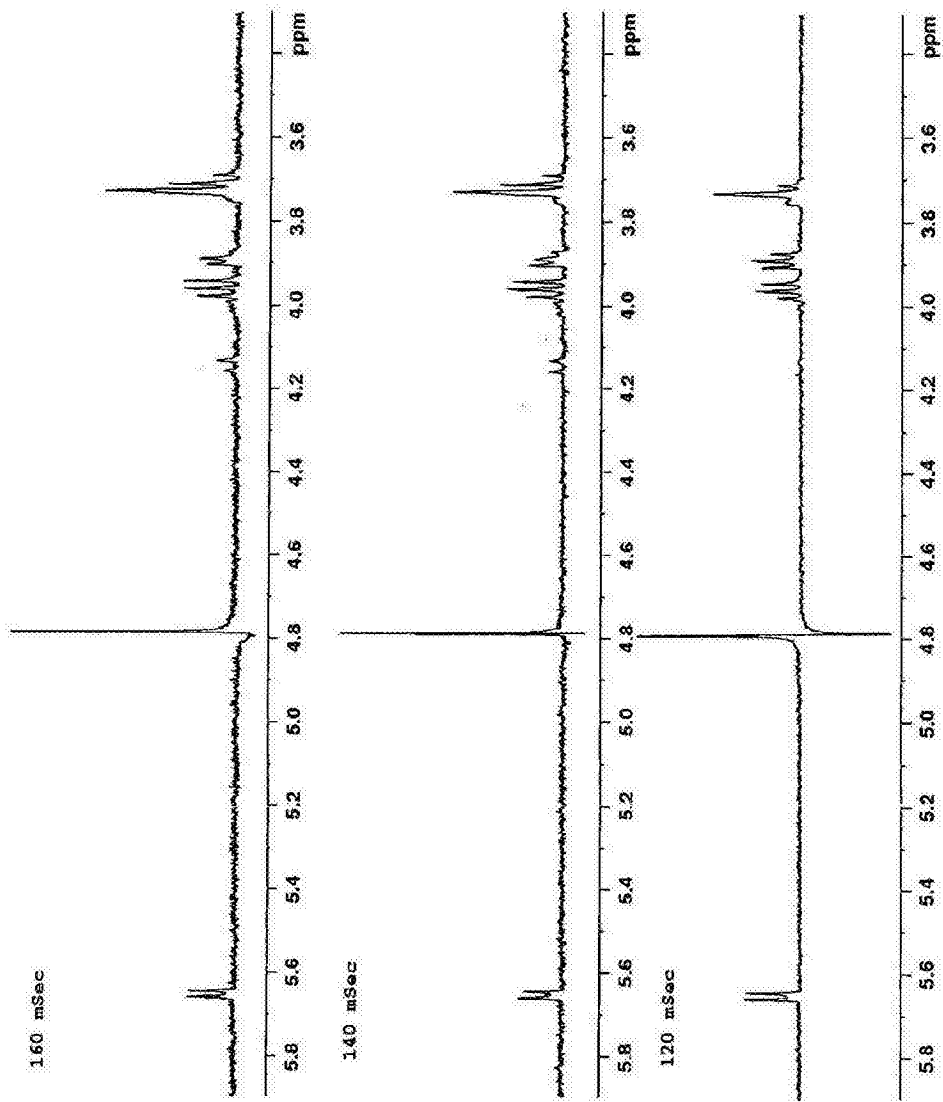


图 36

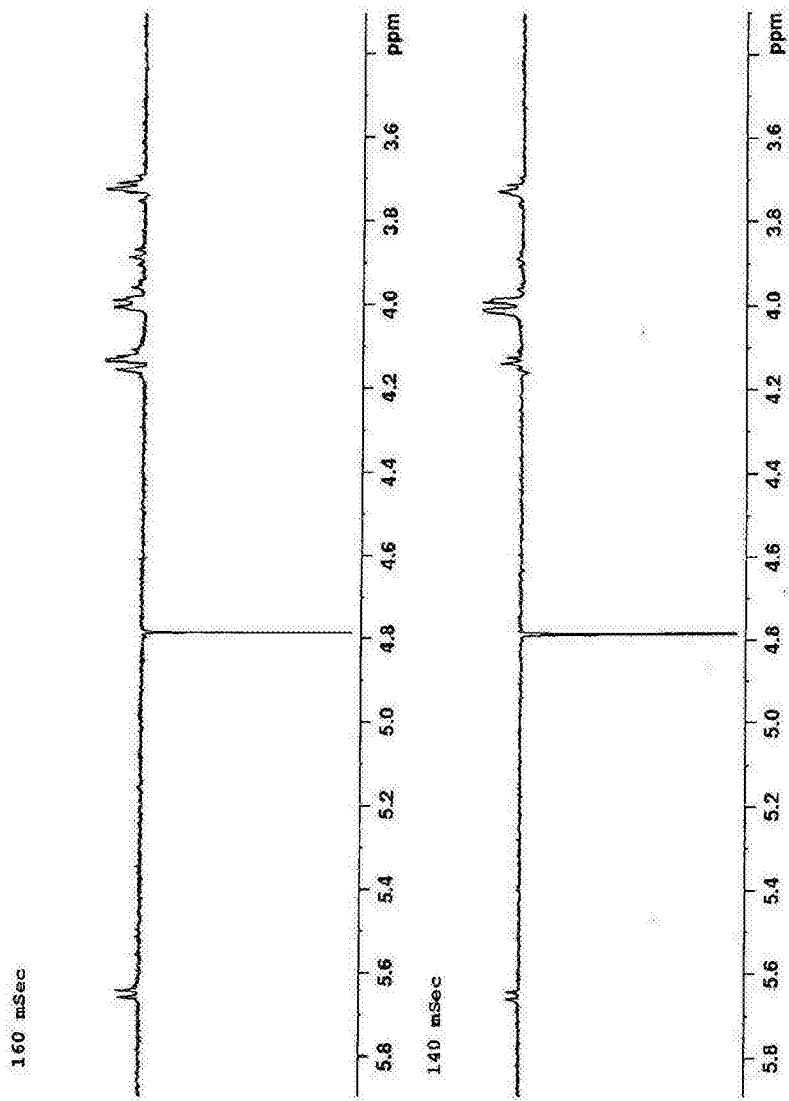


图 37

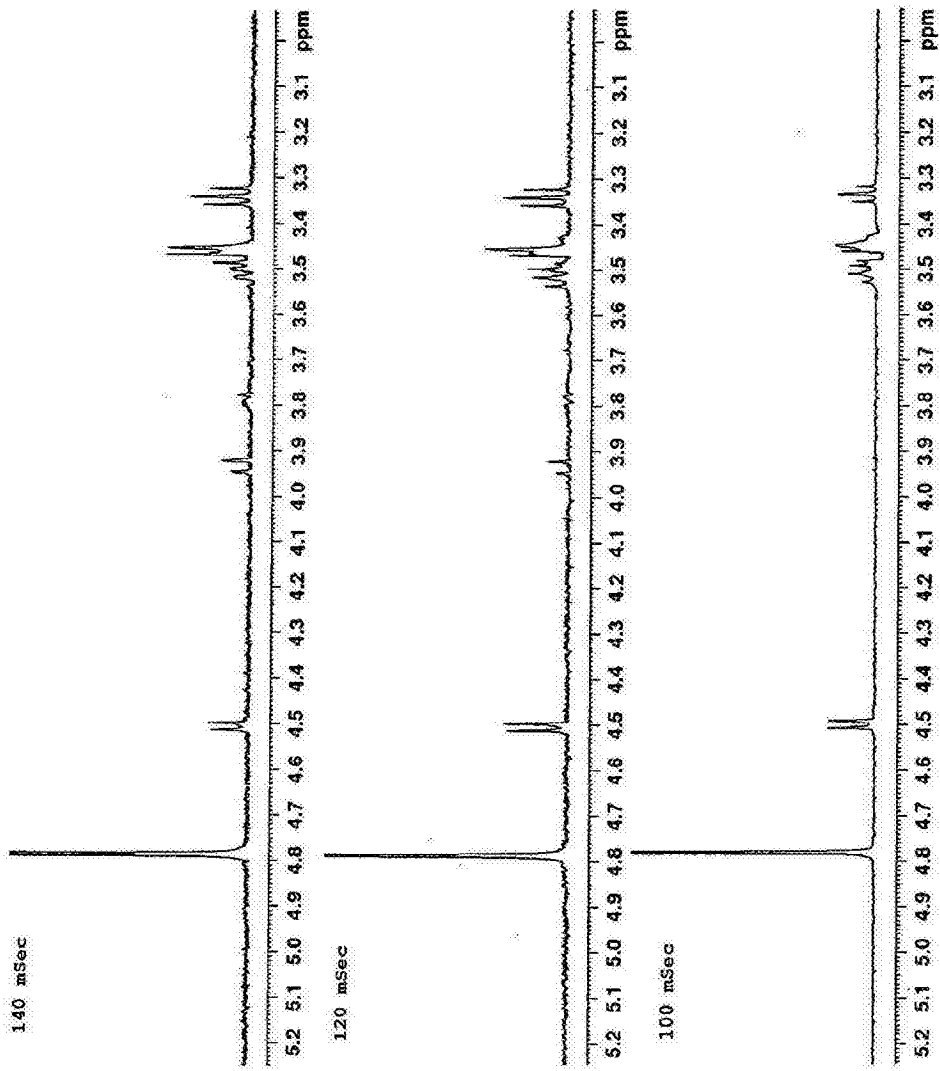


图 38

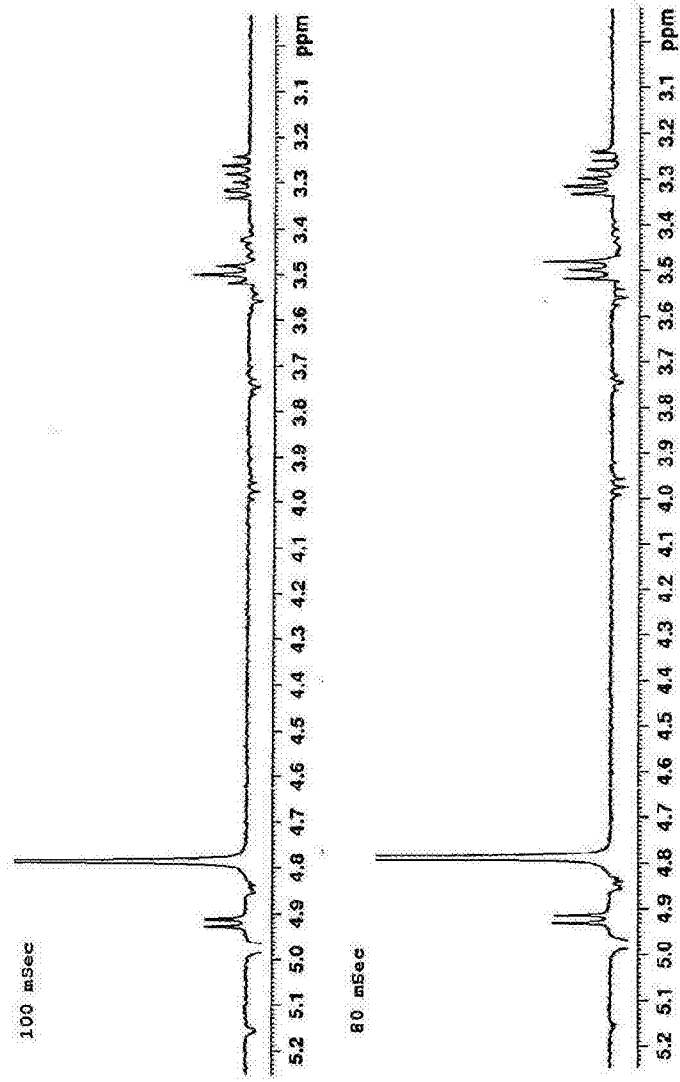


图 39

实施例4

甜叶菊苷向RebA的UGT76G1催化的转化  
由CAD测量

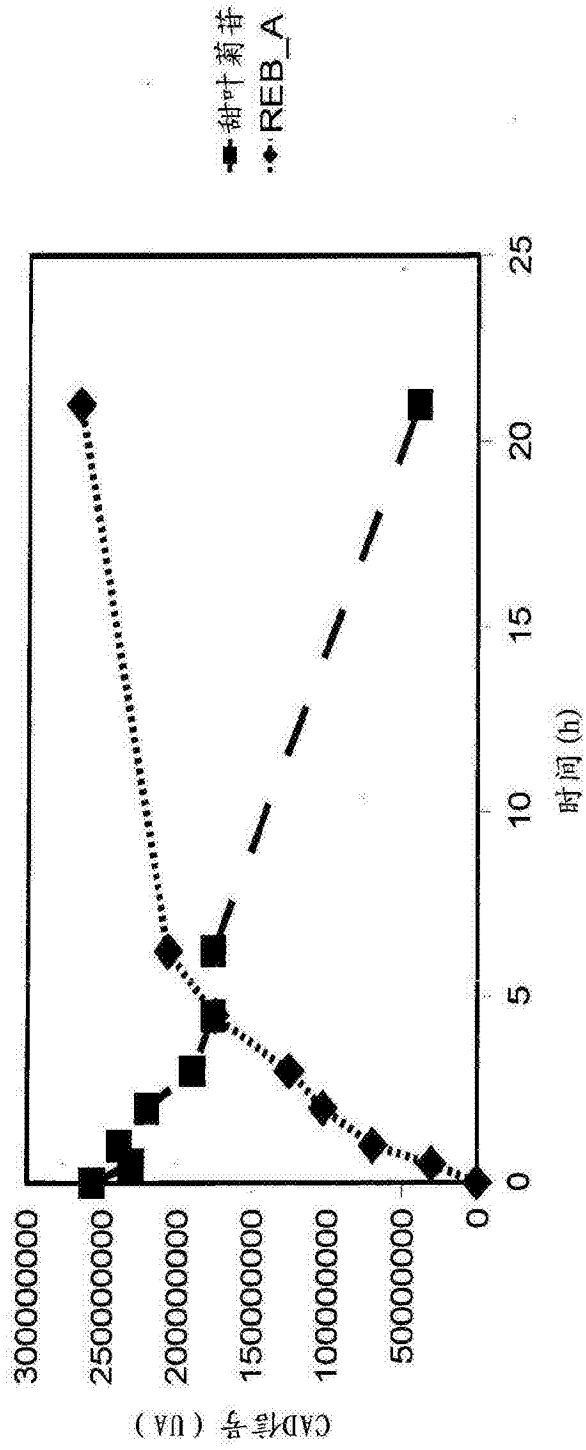


图 40

实施例6

自莱芭迪昔D合成莱芭迪昔M/CAD检测  
由体外产生的UGT76G1催化

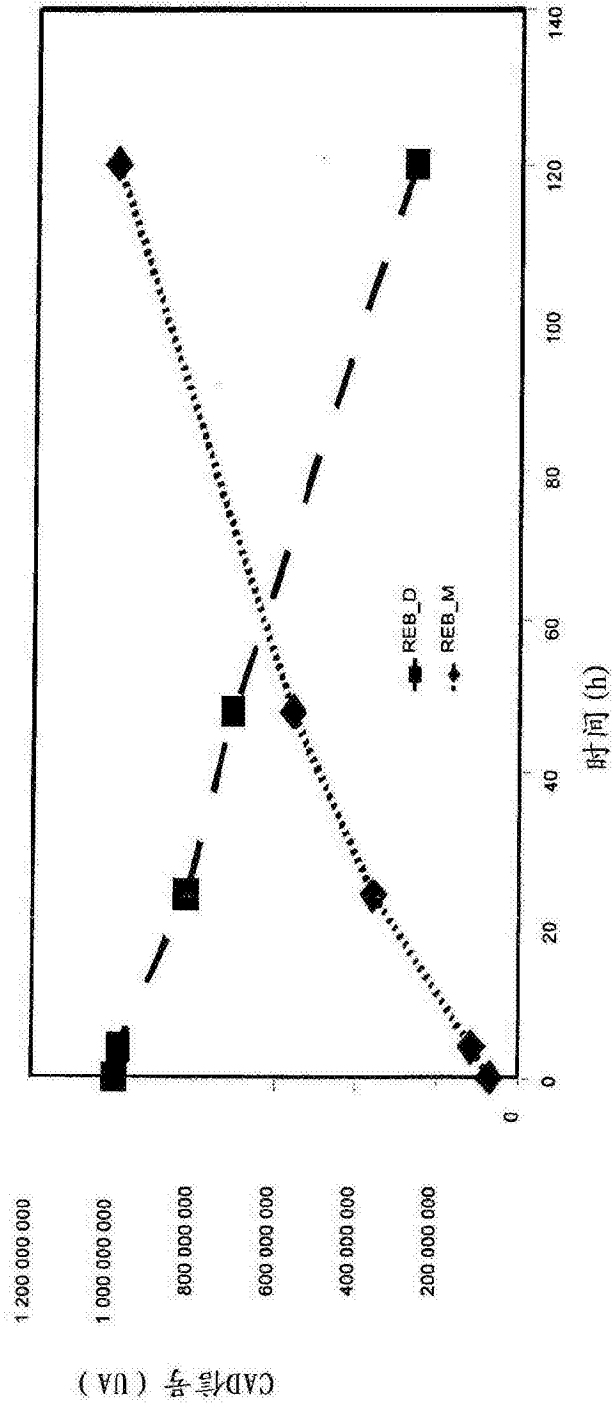


图 41

实施例20

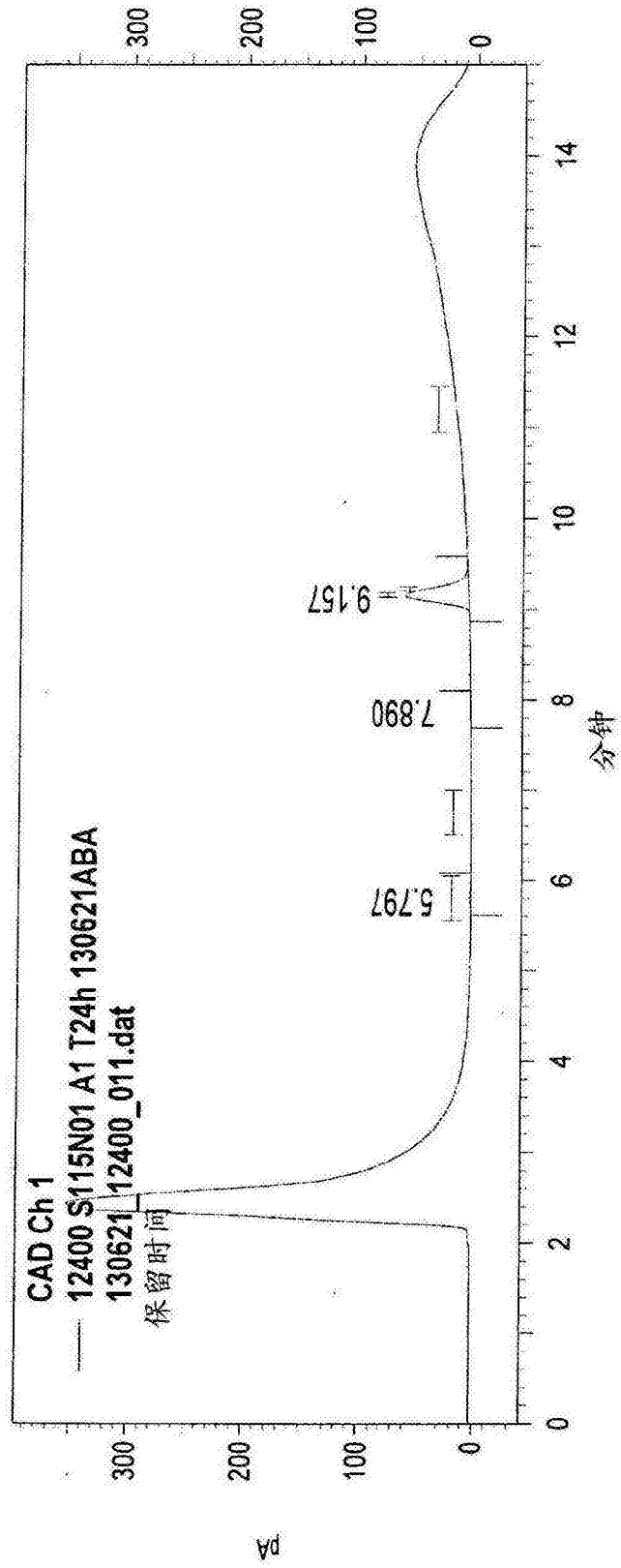


图 42

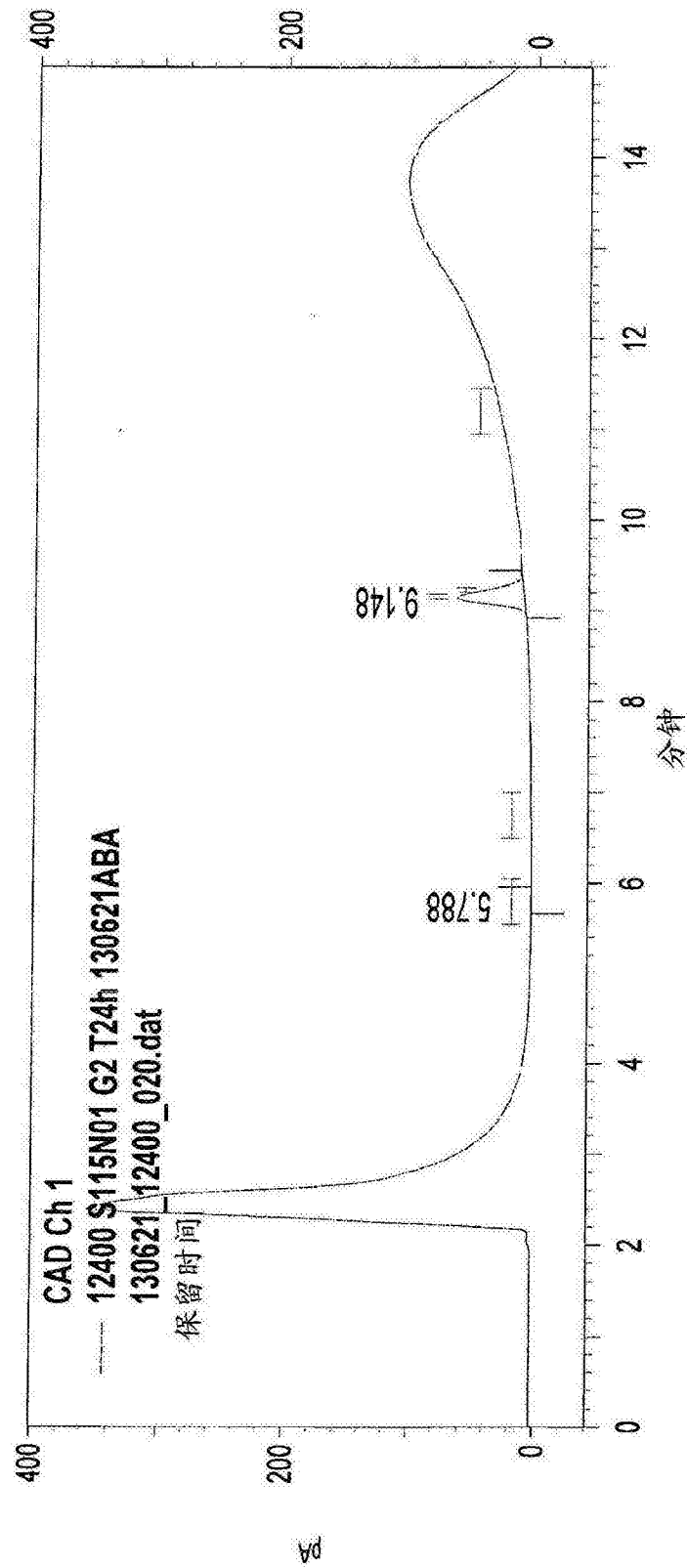


图 43

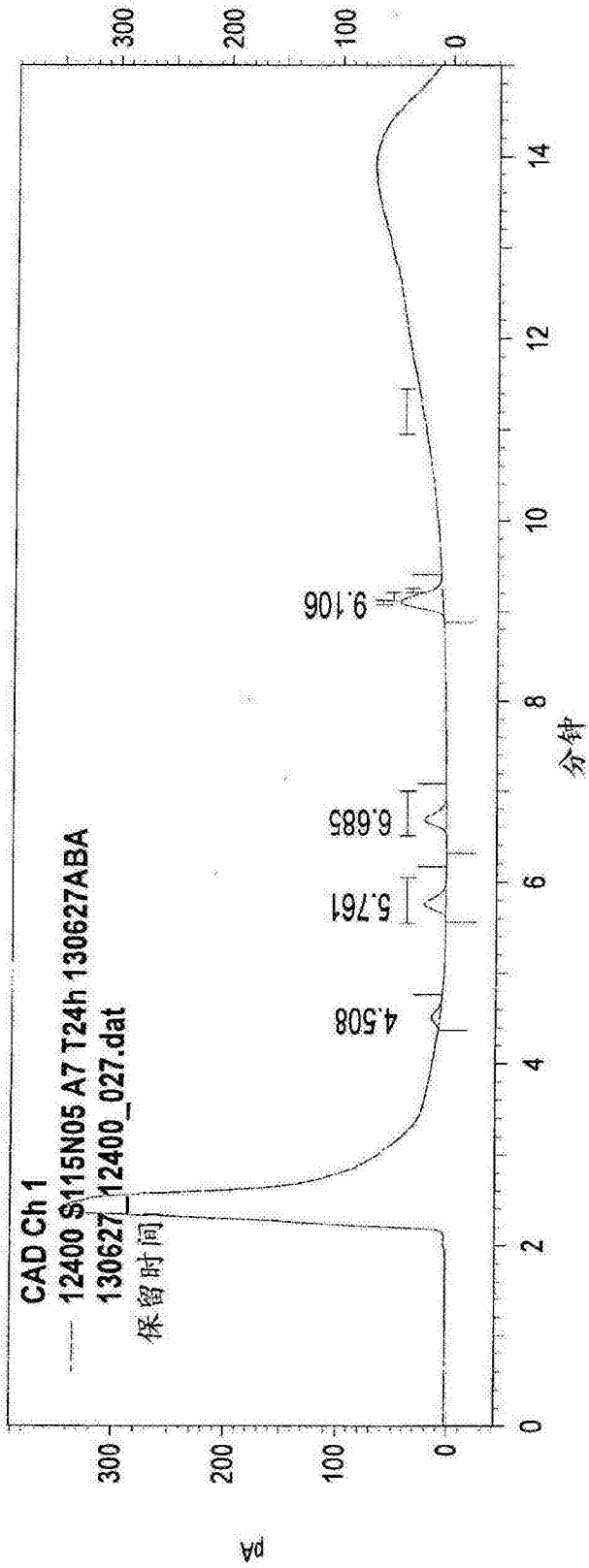


图 44

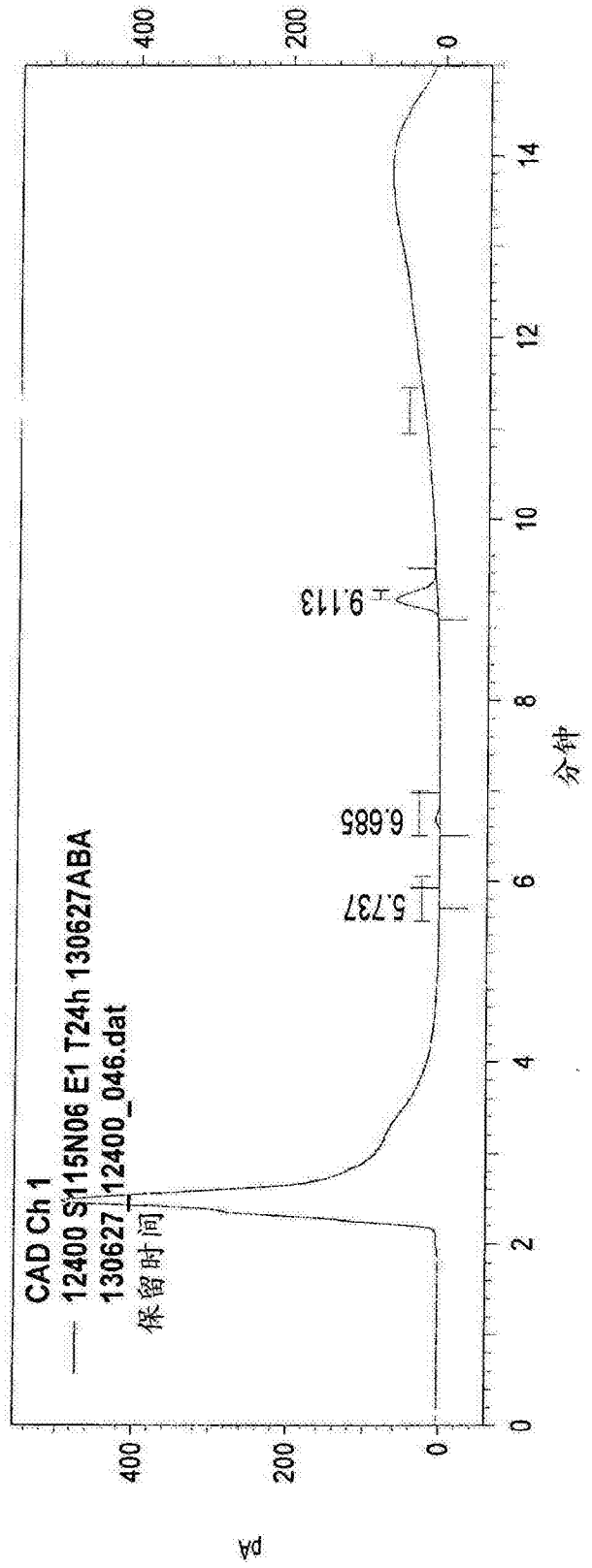


图 45

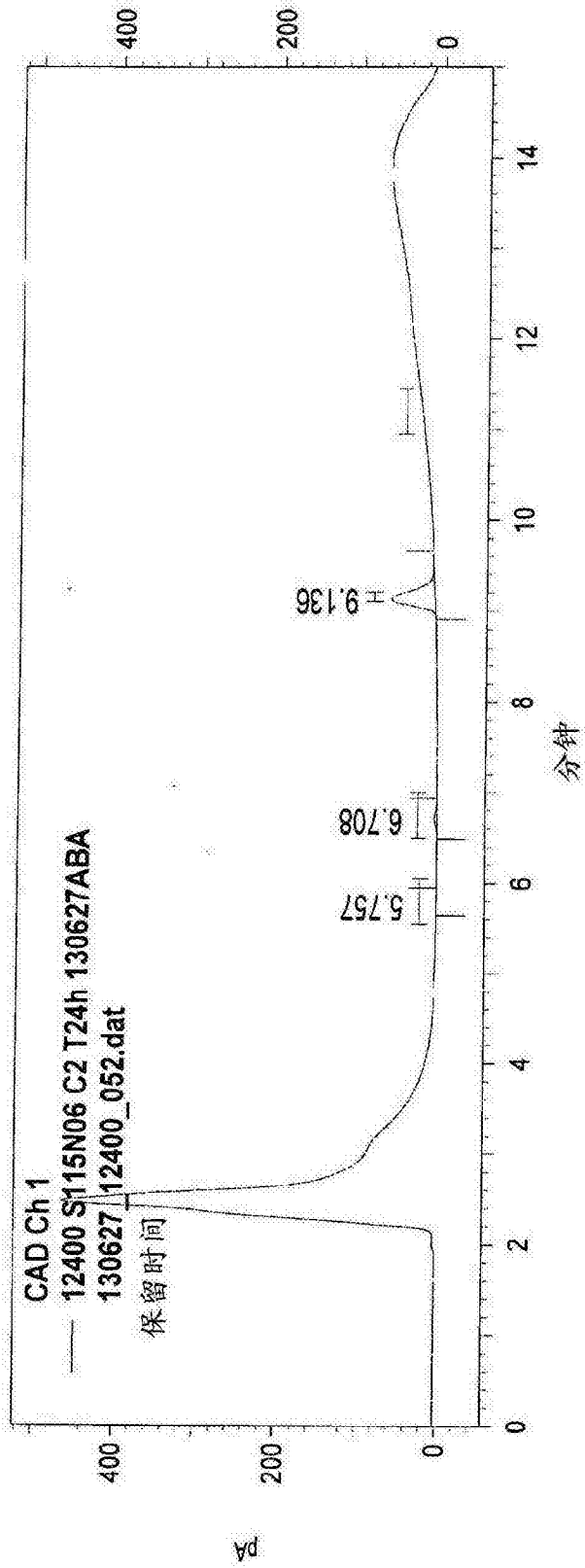


图 46

实施例21

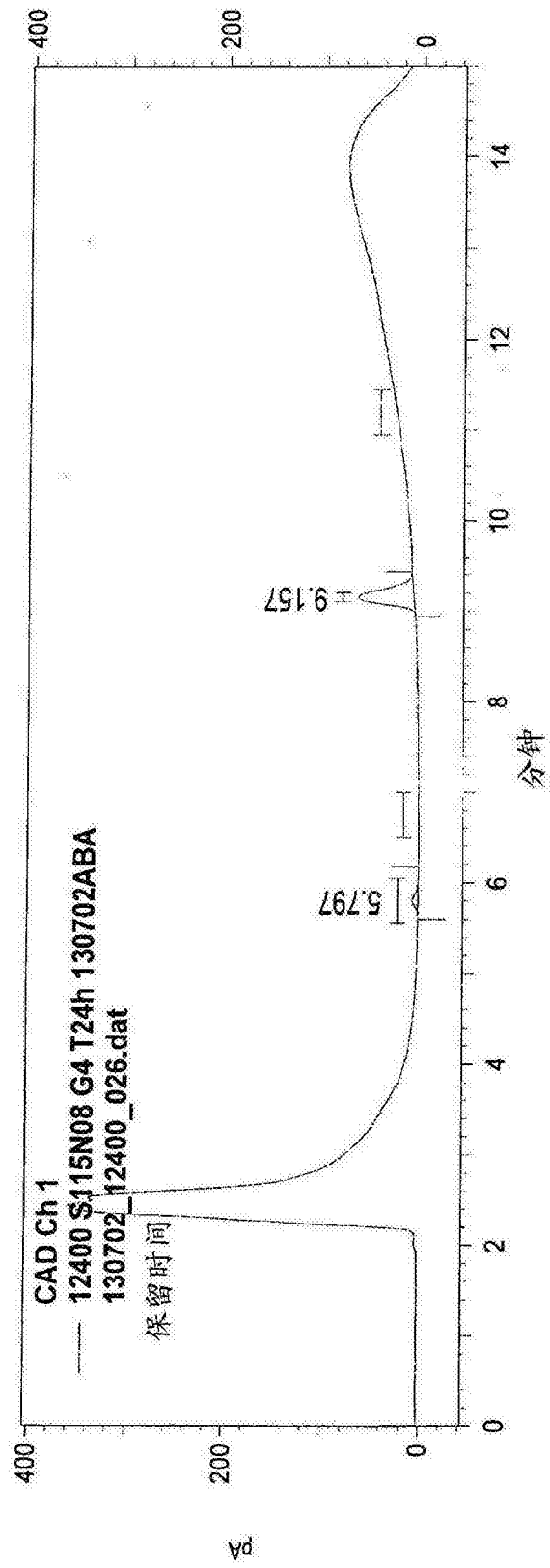


图 47

实施例22

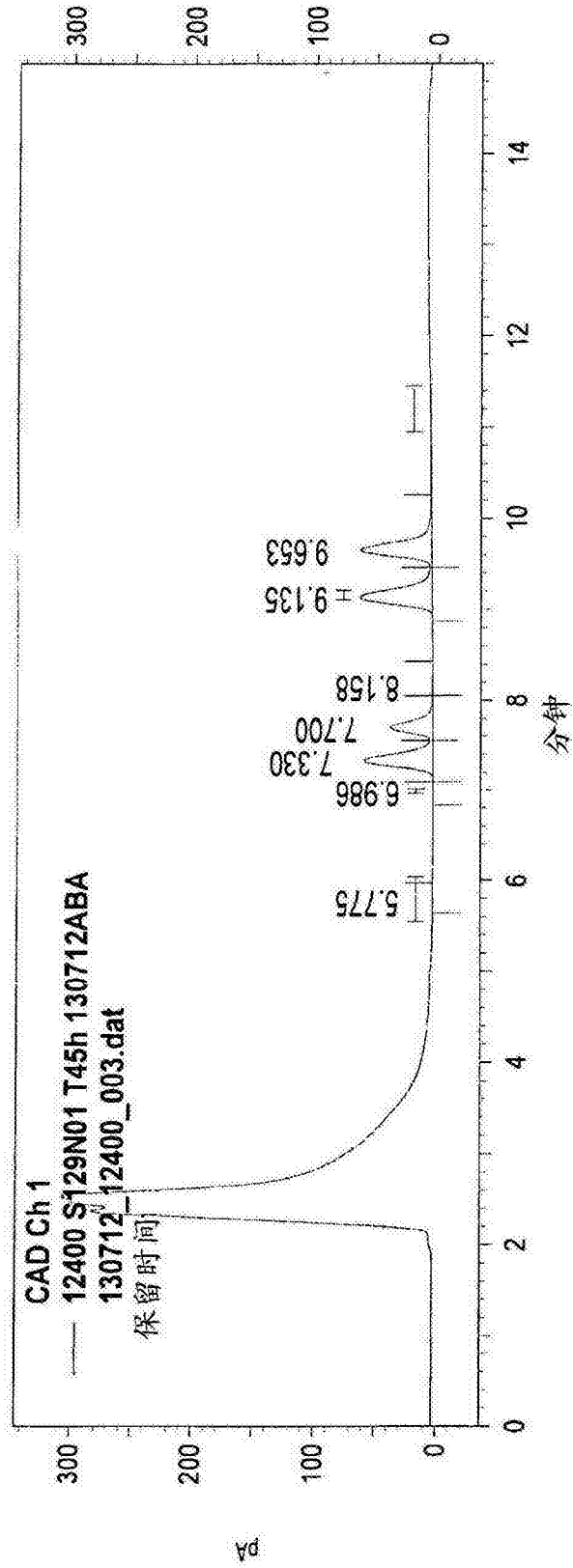


图 48

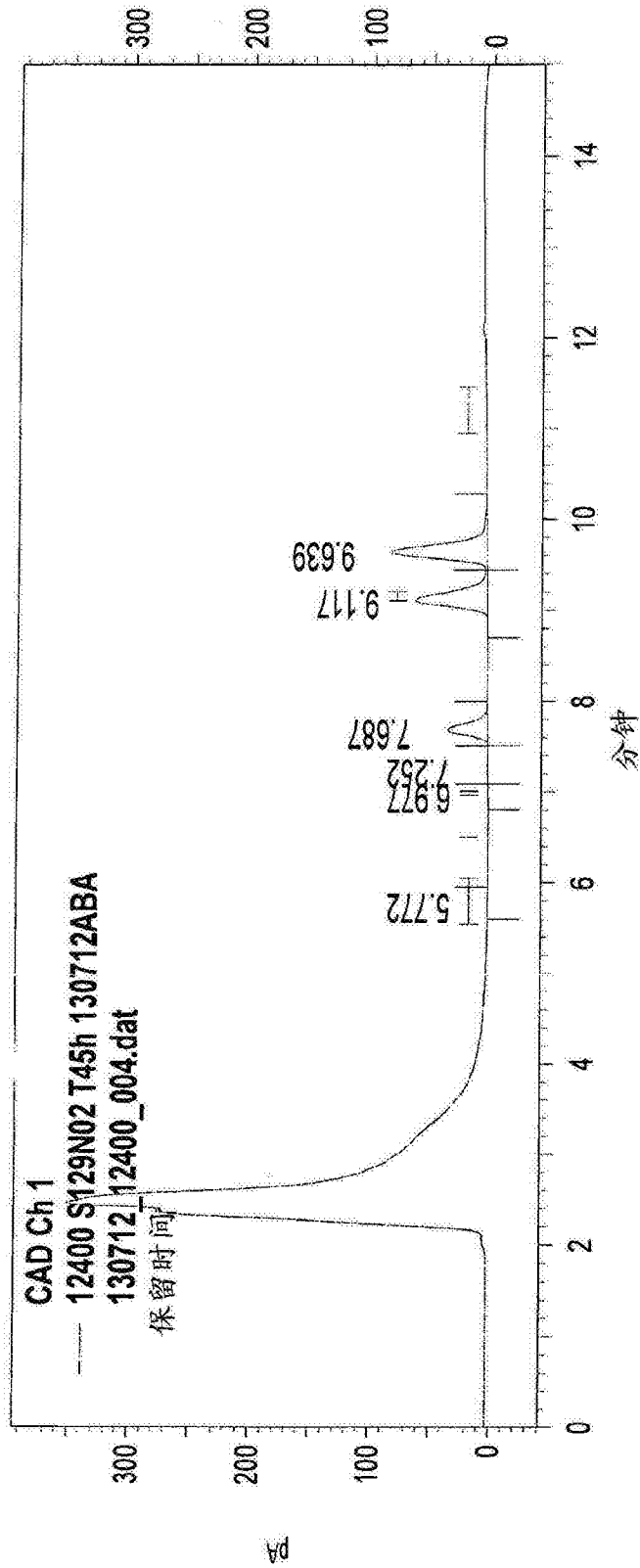


图 49

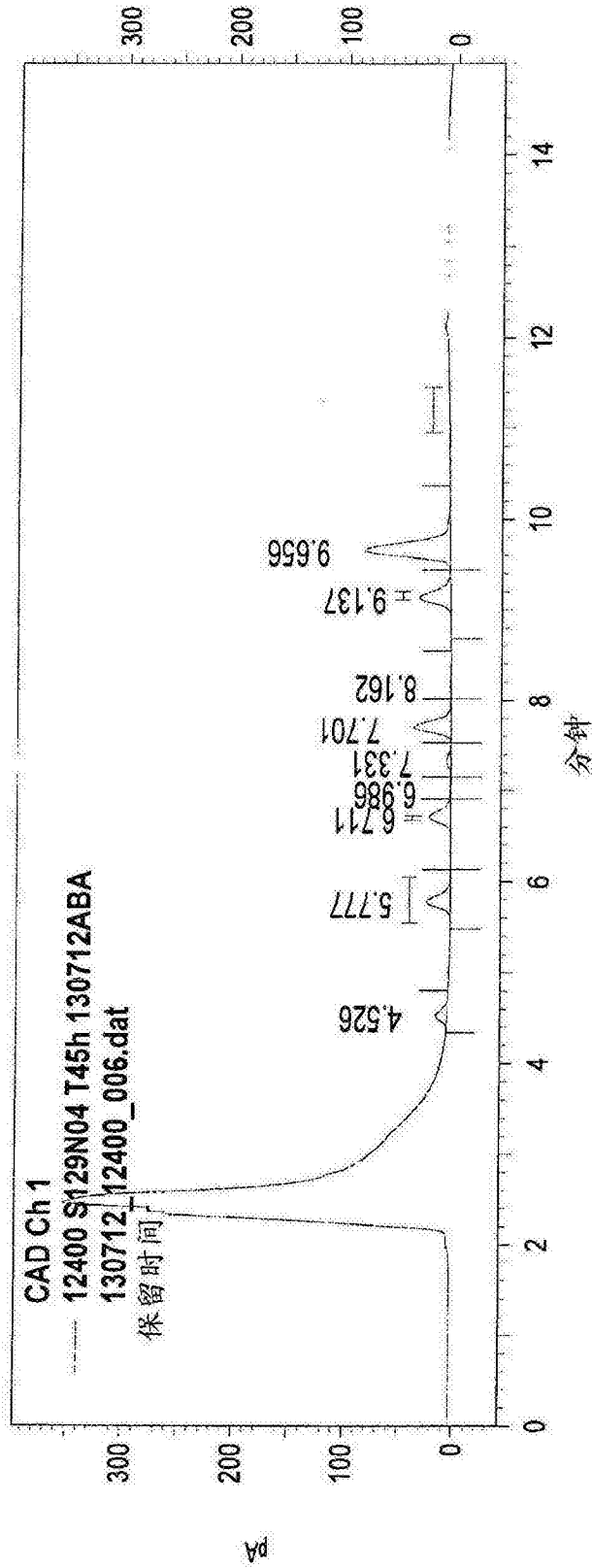


图 50

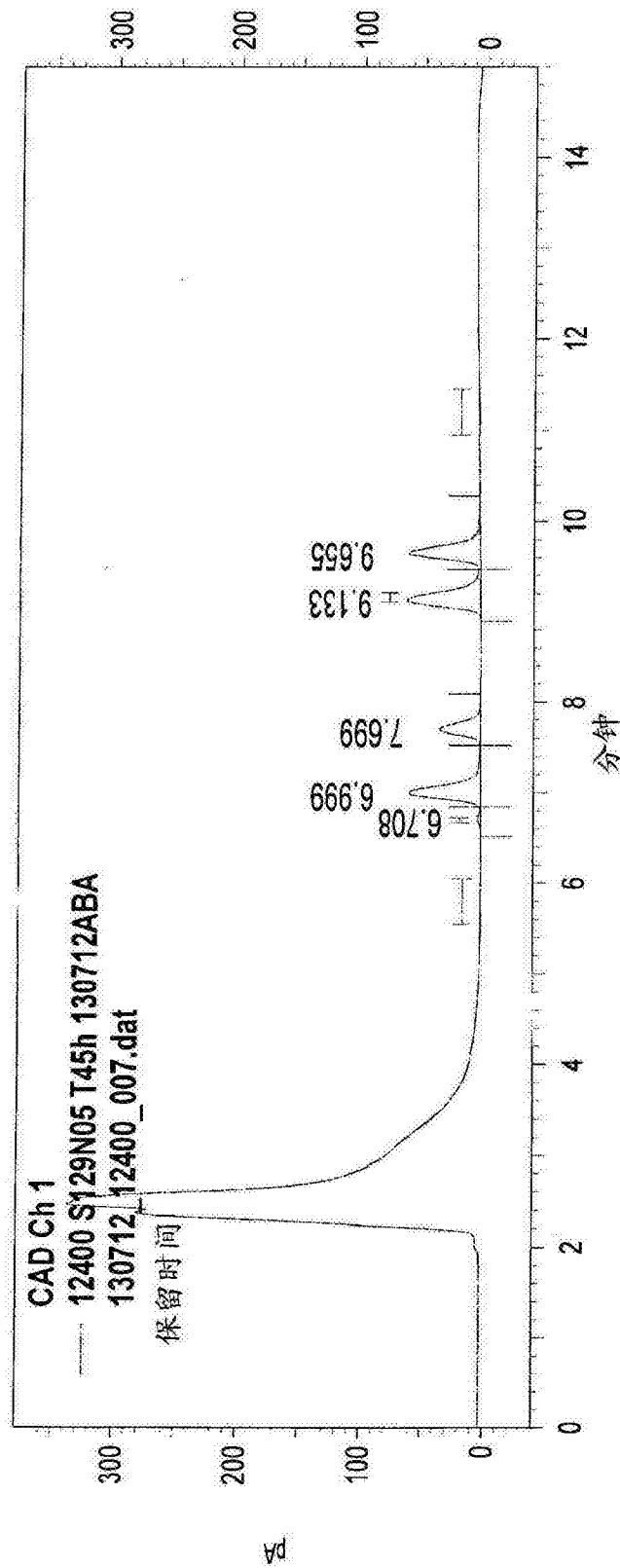


图 51

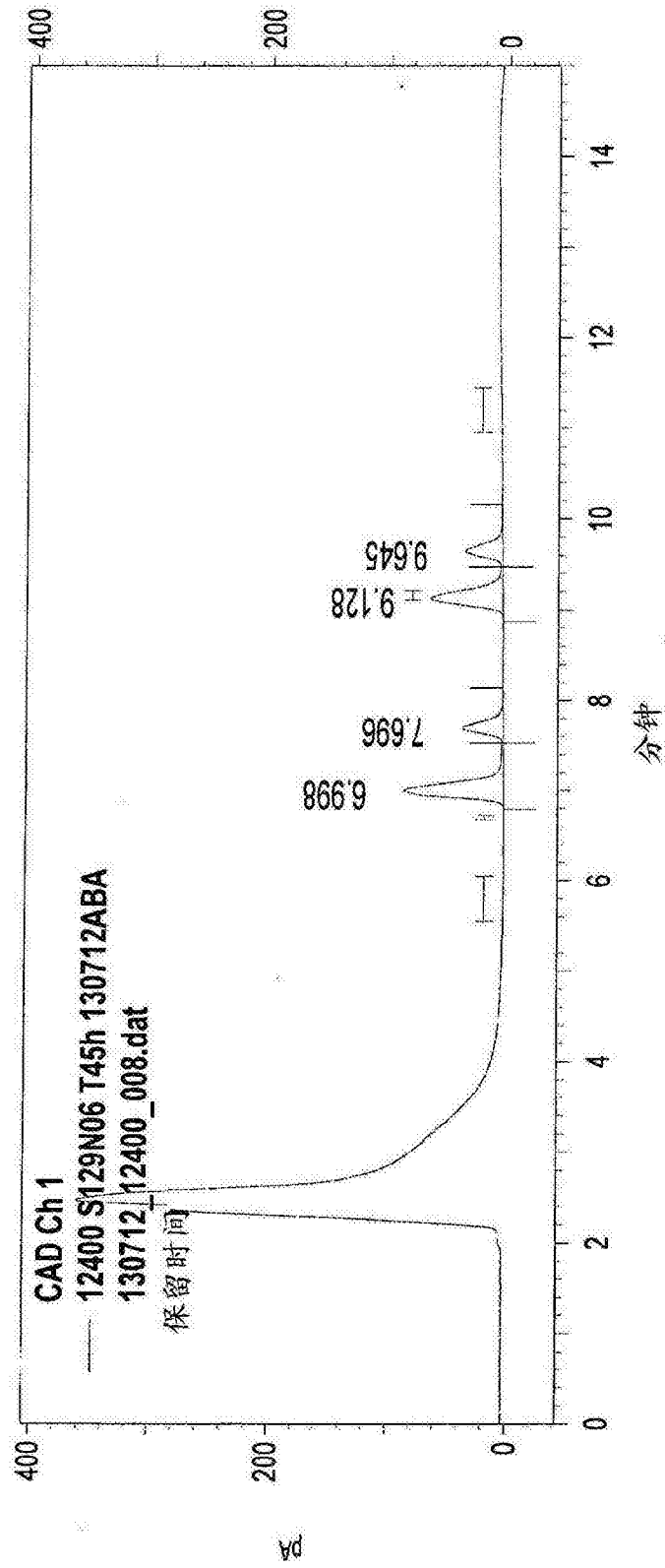


图 52

实施例2.3

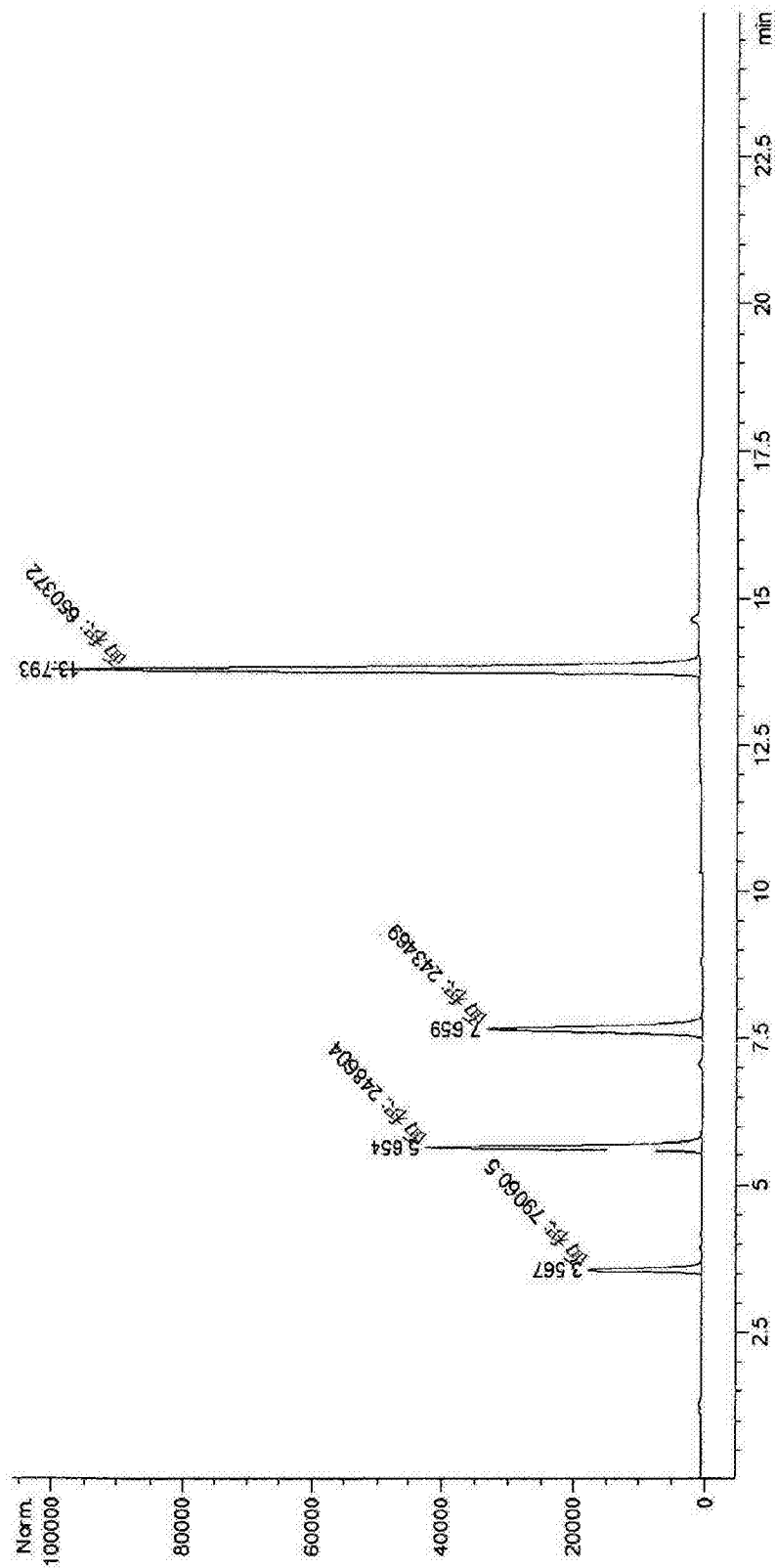


图 53

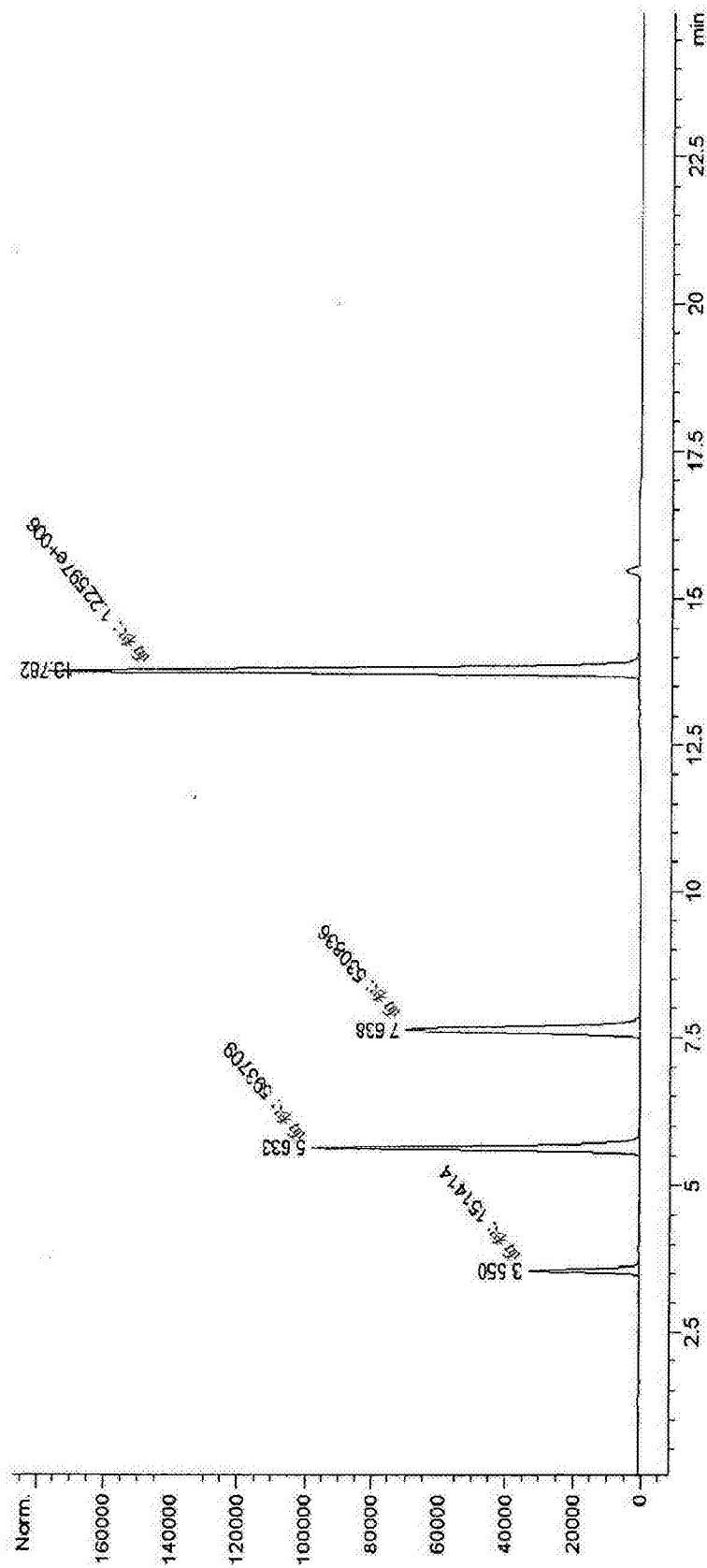


图 54

实施例24

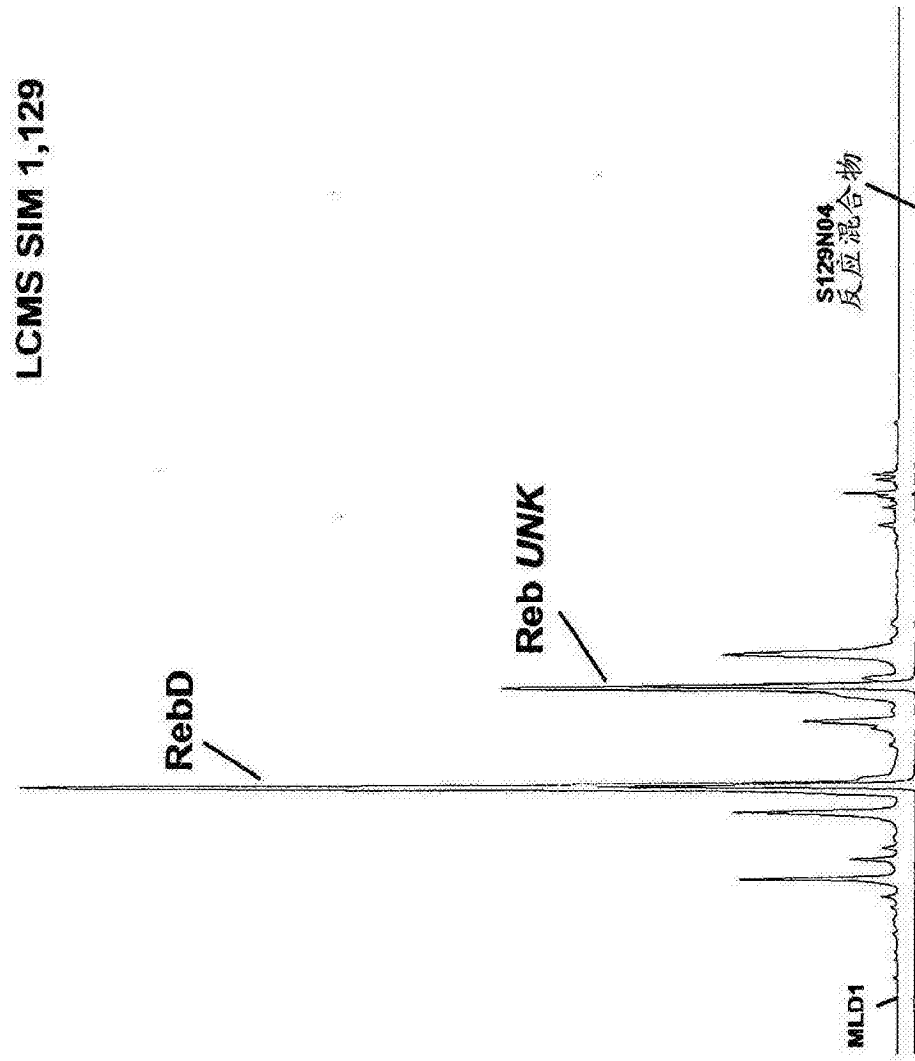


图 55

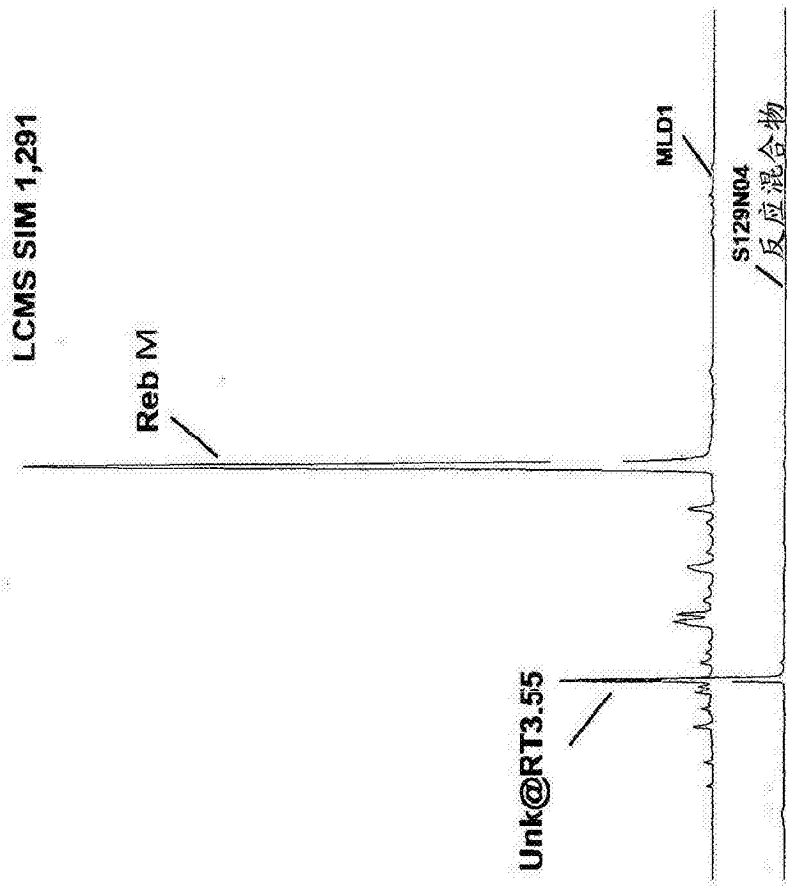


图 56

实施例25

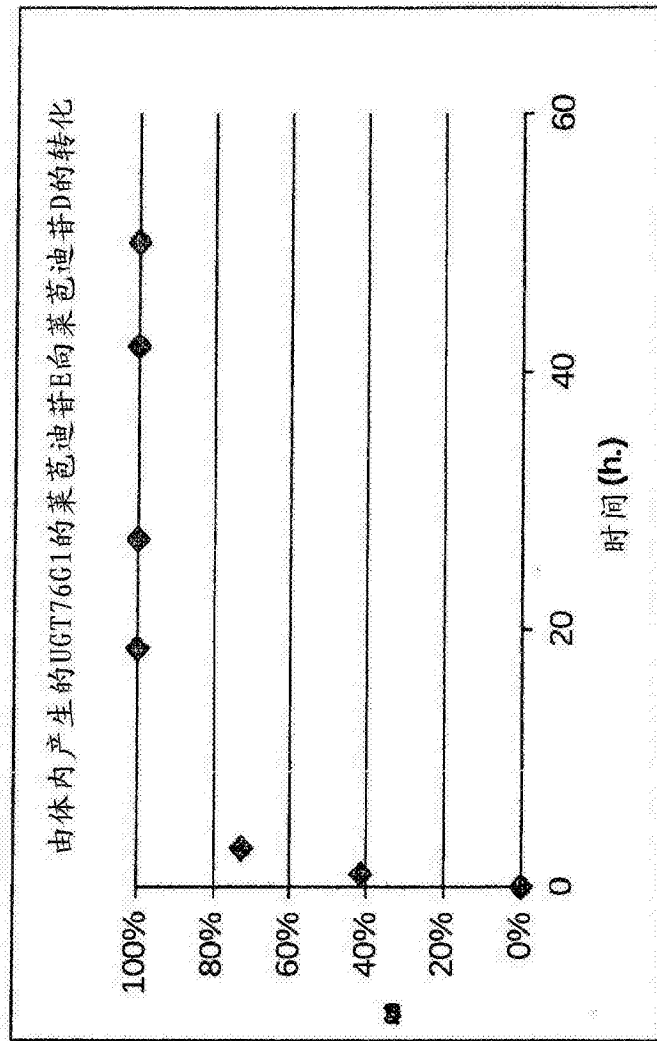


图 57

实施例 28

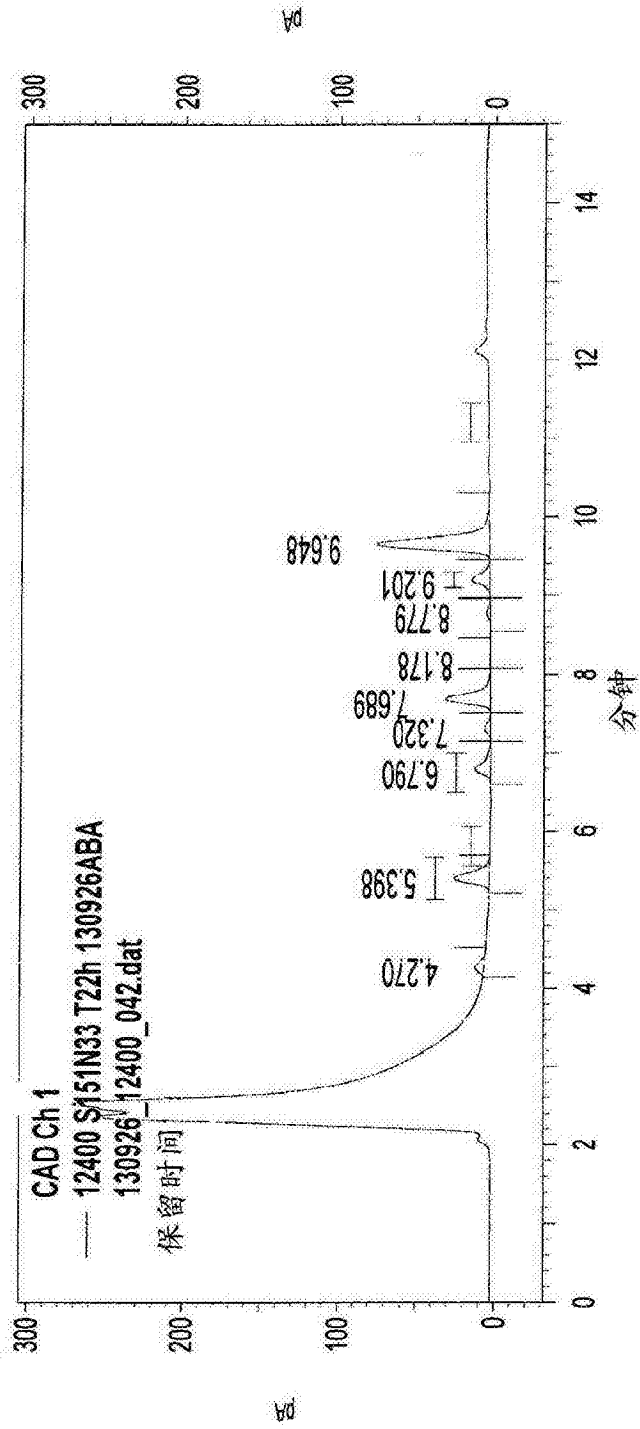


图 58

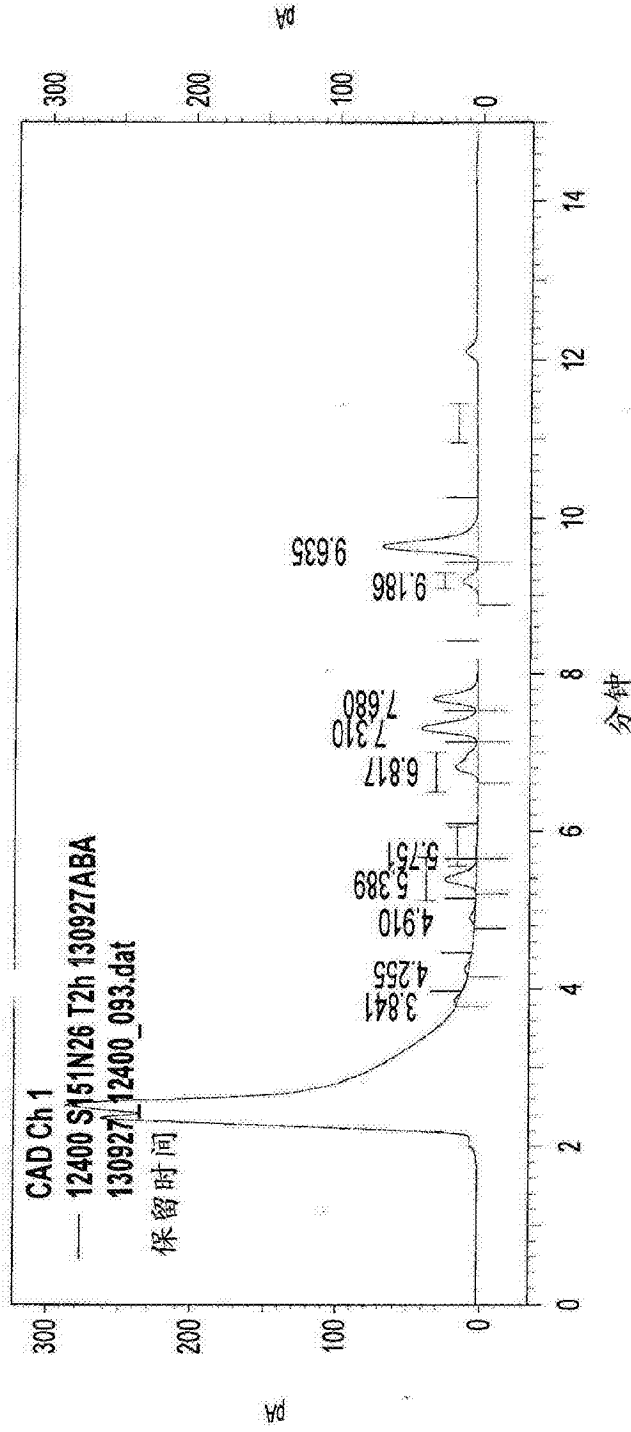


图 59

实施例29

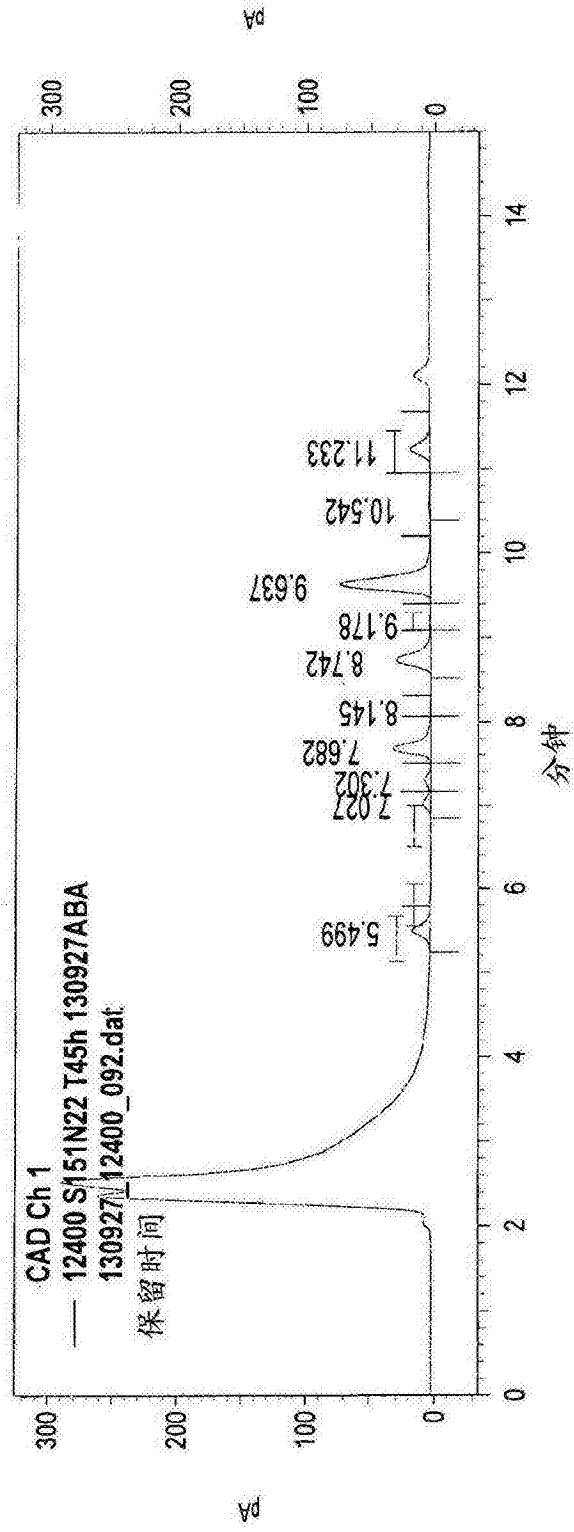


图 60

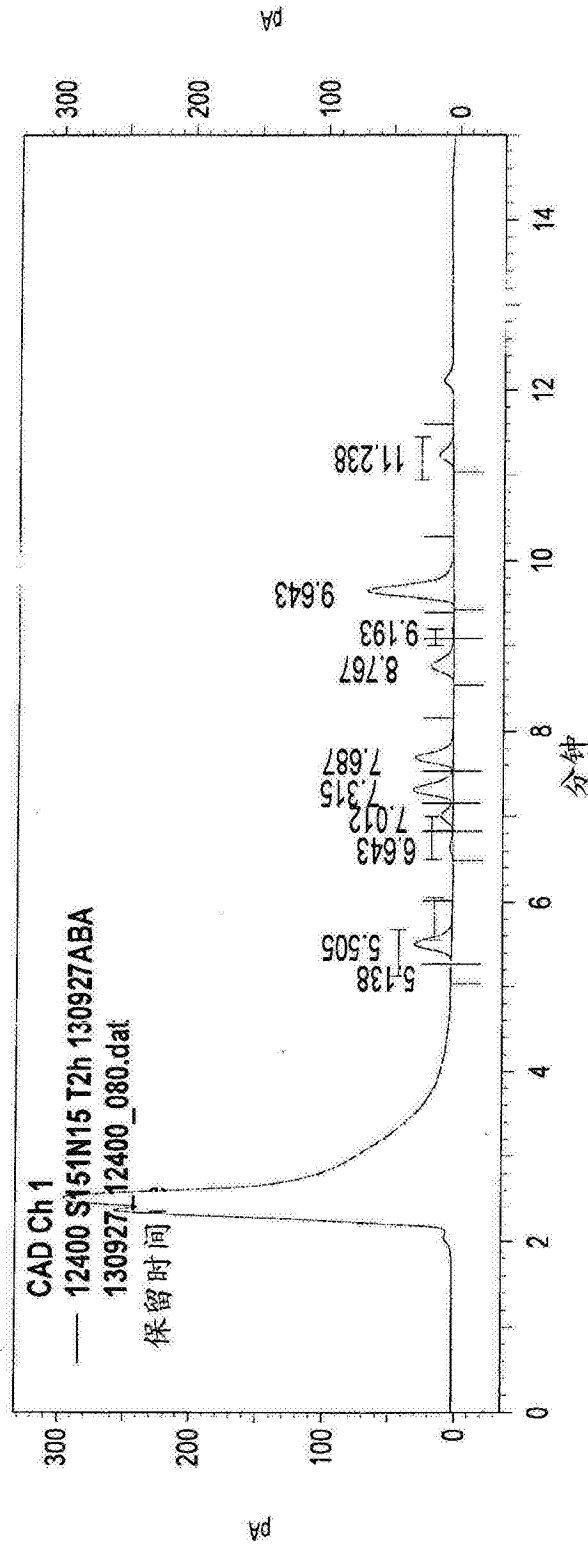


图 19

实施例30

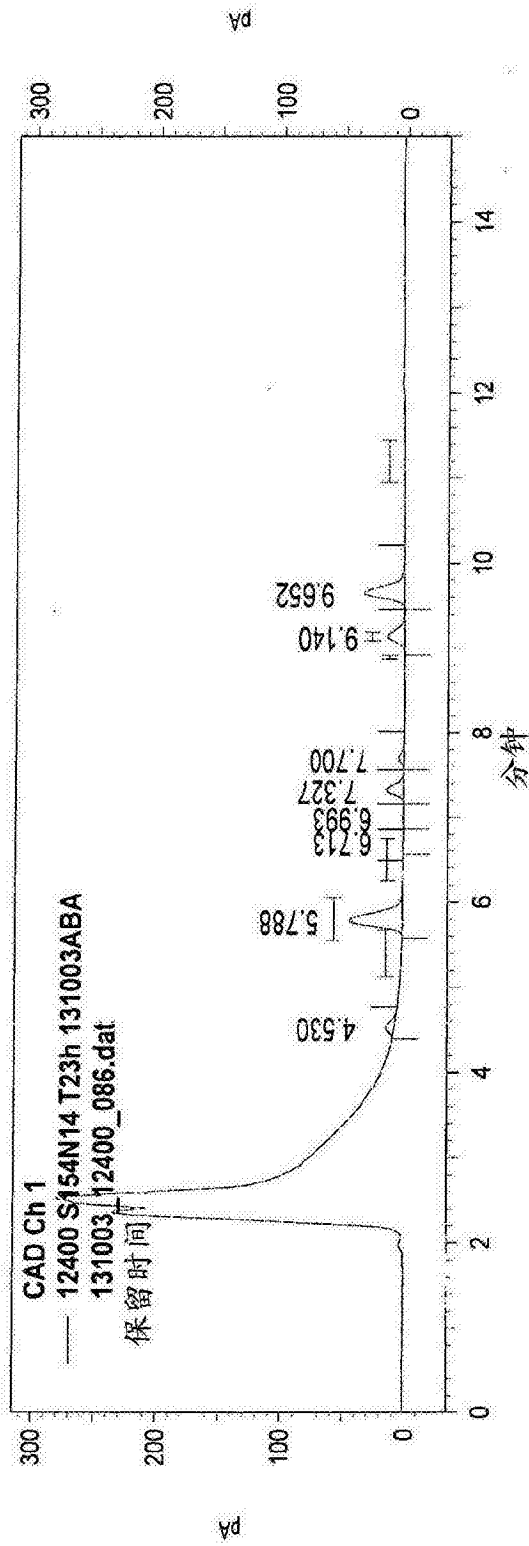
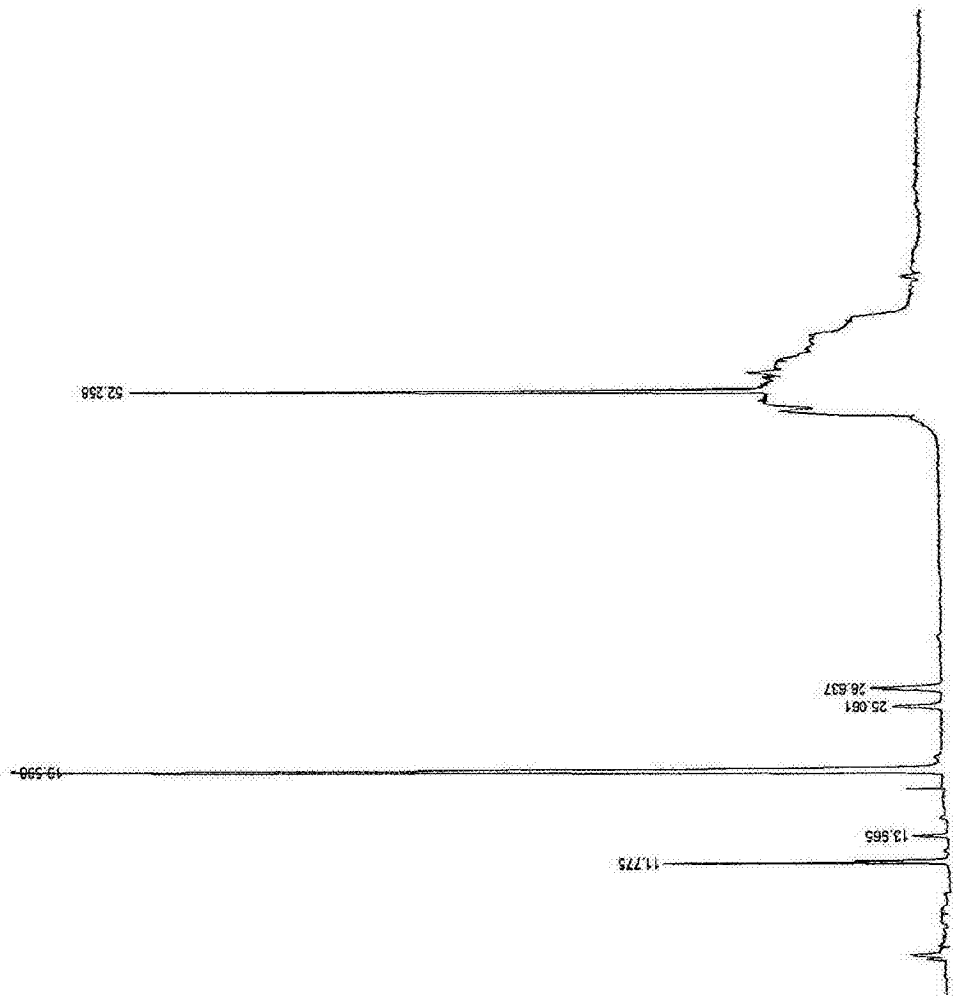


图 62



实施例31

图 63

实施例 32

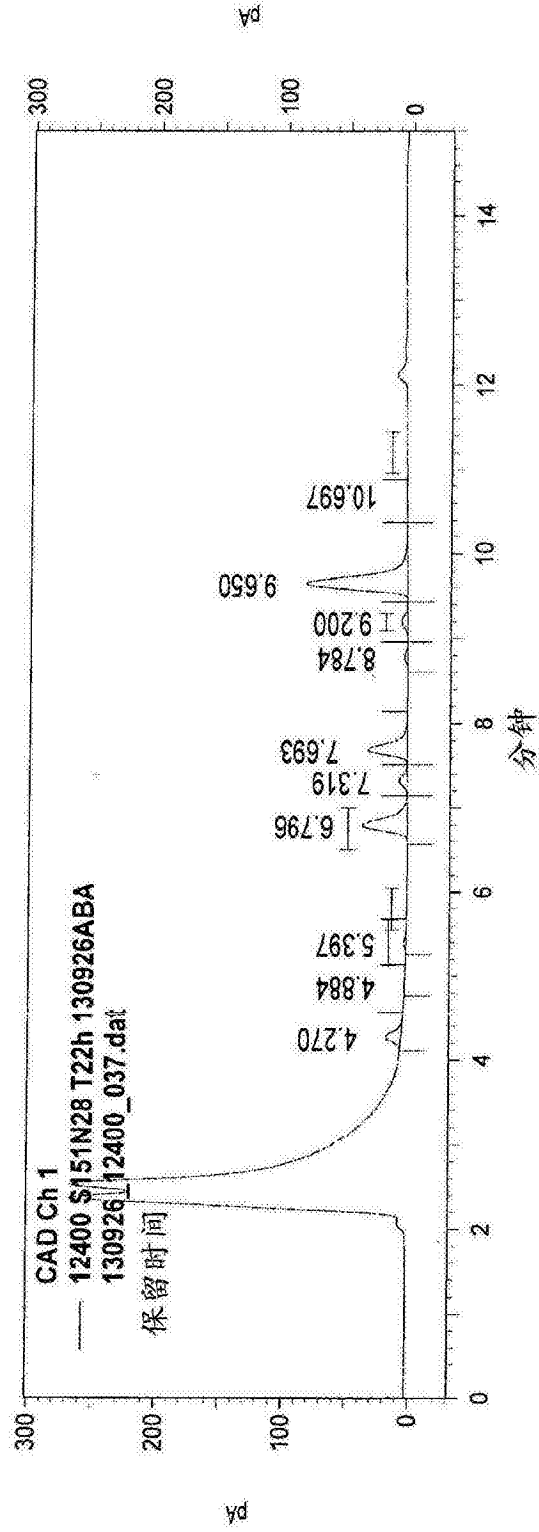


图 64

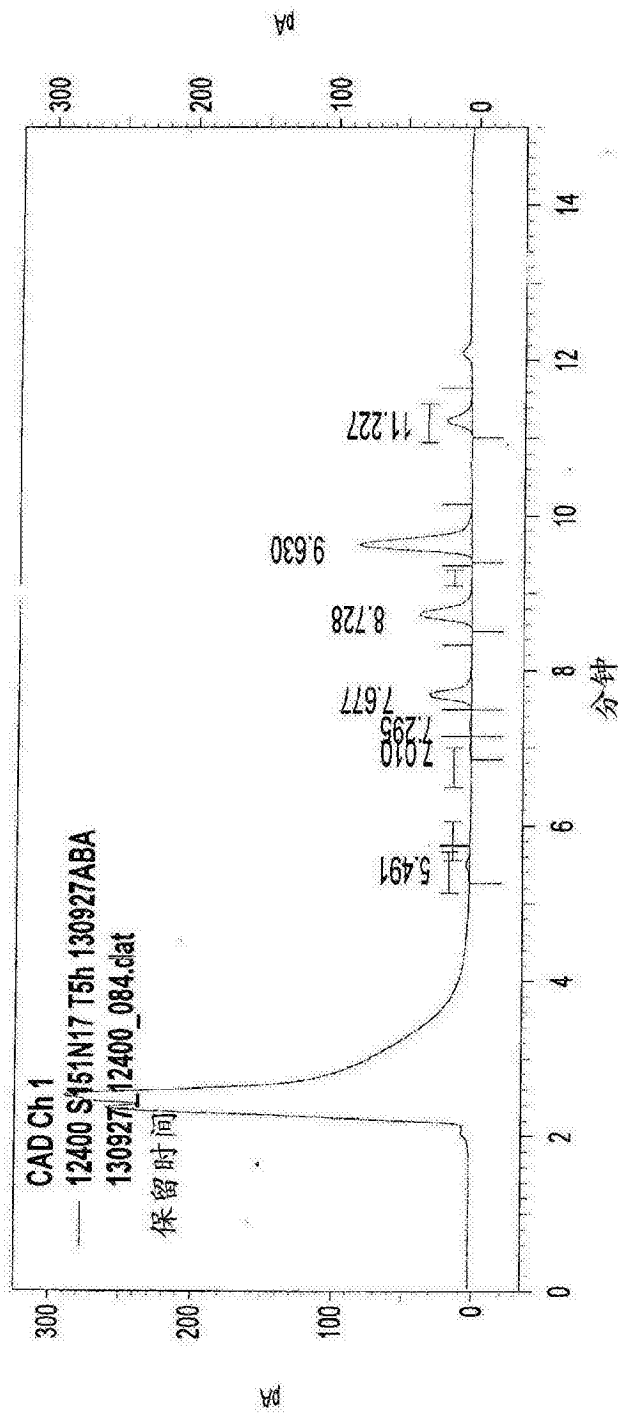


图 65

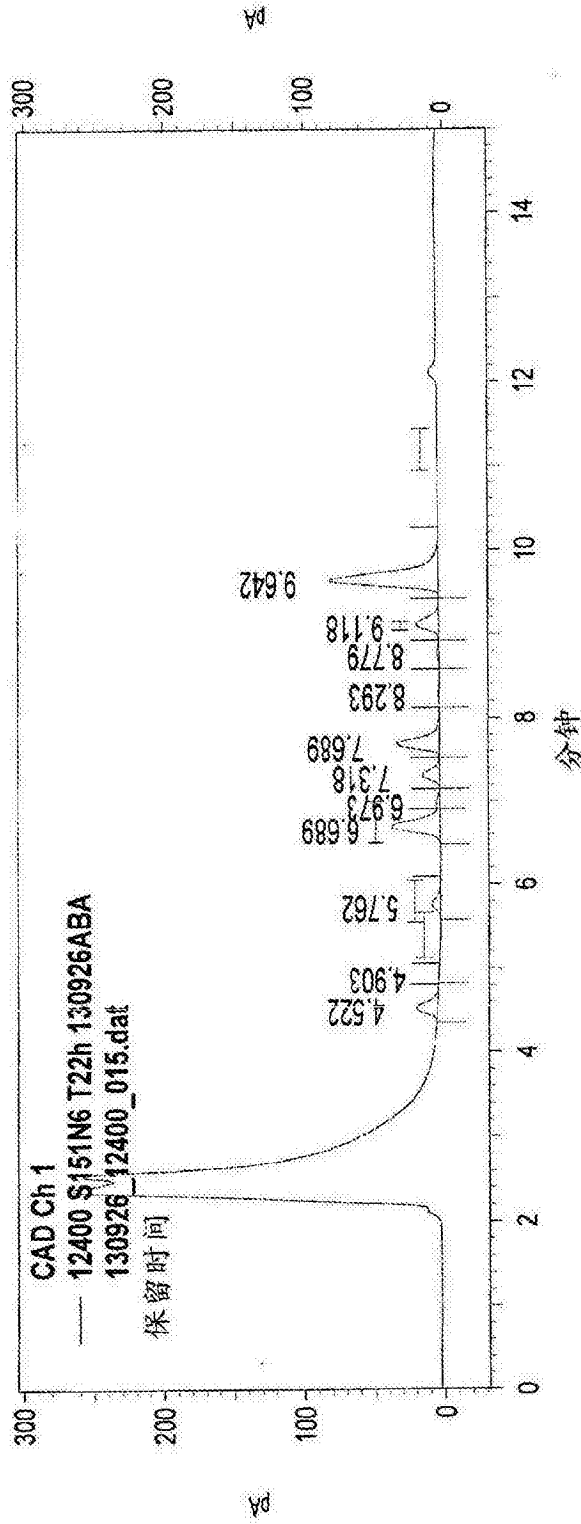


图 99

实施例 35

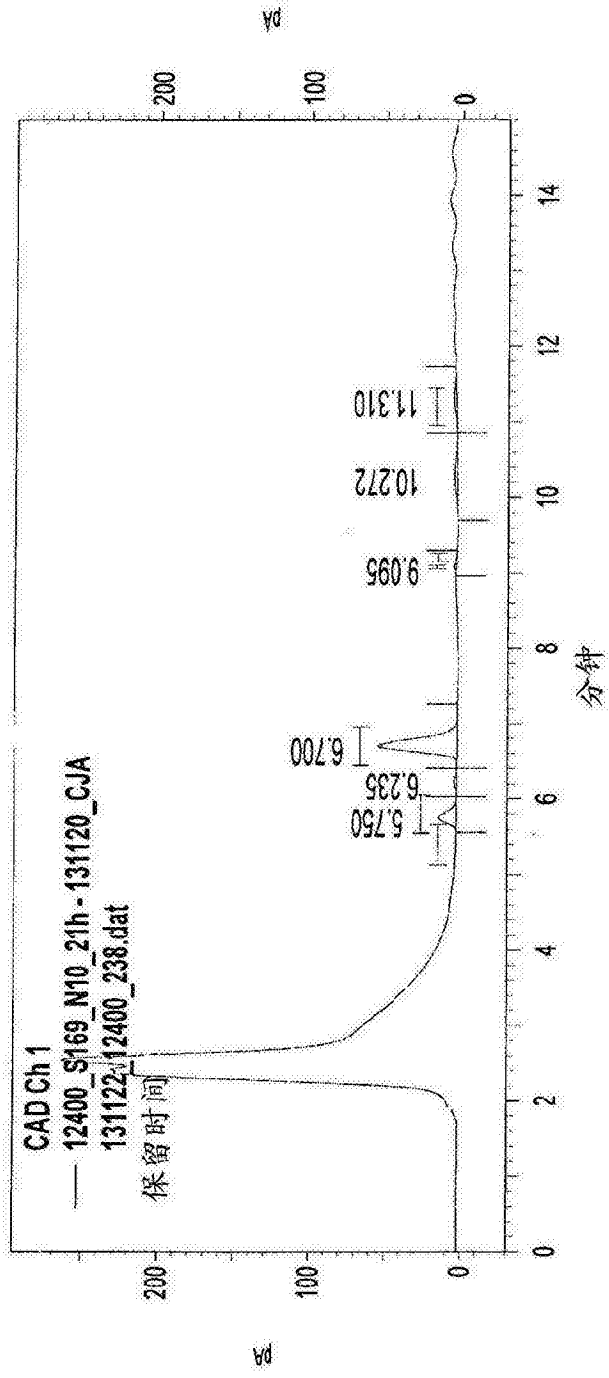


图 67

实施例37

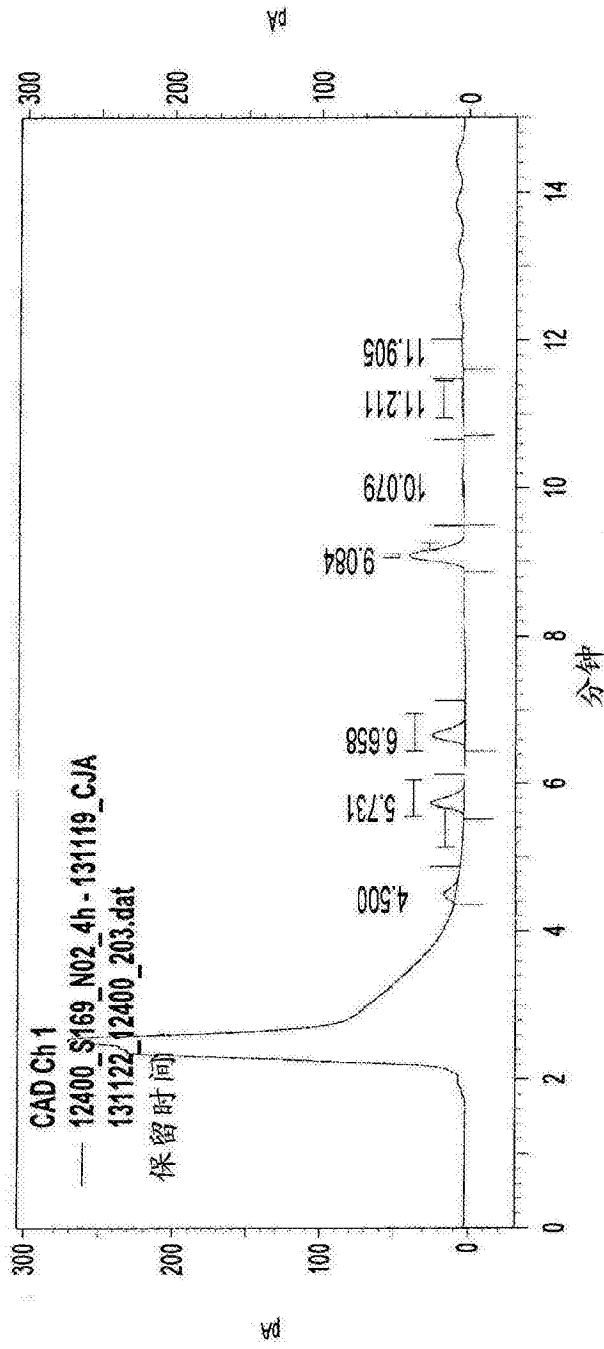


图 68

实施例43

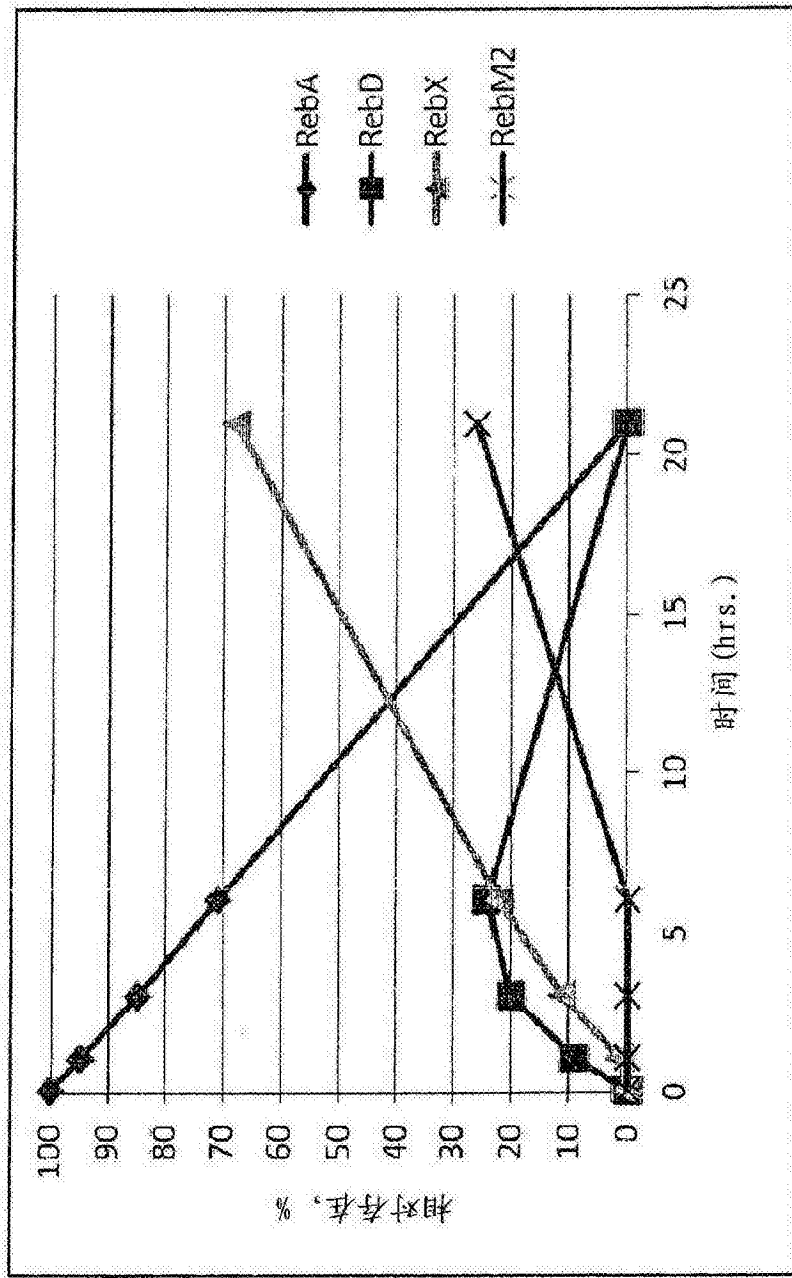


图 69