



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112626154 A

(43) 申请公布日 2021.04.09

(21) 申请号 202011020773.8

(22) 申请日 2014.05.28

(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

(62) 分案原申请数据

201480040130.6 2014.05.28

(71) 申请人 谱赛科有限责任公司

地址 马来西亚内格里森美兰

(72) 发明人 因德拉·普拉卡什

辛西娅·邦德斯 潘卡杰·索尼

阿韦季克·马科西安

加林·西里尔 奥雷利安·巴迪

罗贝尔·泰·阿莱

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 牟静芳 郑霞

(51) Int.Cl.

C12P 19/56 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

C12R 1/66 (2006.01)

C12R 1/84 (2006.01)

C12R 1/07 (2006.01)

权利要求书1页 说明书95页

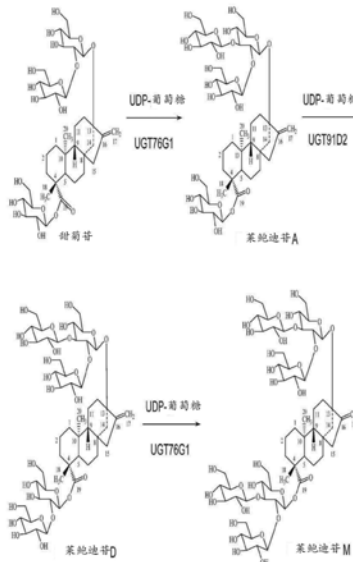
序列表23页 附图24页

(54) 发明名称

高纯度的甜菊醇糖苷

(57) 摘要

本申请涉及高纯度的甜菊醇糖苷。本申请描述了制备高度纯化的甜菊醇糖苷、特别是莱鲍迪苷A、D和M的方法。这些方法包括利用将不同的起始组合物转化为靶甜菊醇糖苷的重组微生物。另外，披露了新颖的甜菊醇糖苷reb D2和reb M2，也披露了制备它们的方法。高度纯化的莱鲍迪苷在可食用和可咀嚼组合物例如任何饮料、糕饼、烘烤产品、饼干和口香糖中可用作无热量甜味剂。



1. 一种用于产生靶甜菊醇糖苷的方法,该方法包括以下步骤:
 - a. 提供包含具有至少一个碳原子的有机化合物的起始组合物;
 - b. 提供含有选自甜菊醇生物合成酶、UDP-糖基转移酶的至少一种酶的并且任选地提供UDP-葡萄糖循环酶的微生物;
 - c. 使该微生物与含有该起始组合物的介质接触以产生包含至少一种靶甜菊醇糖苷的介质。
2. 一种用于产生靶甜菊醇糖苷的方法,该方法包括以下步骤:
 - a. 提供包含具有至少一个碳原子的有机化合物的起始组合物;
 - b. 提供包含选自甜菊醇生物合成酶、UDP-糖基转移酶、和任选地UDP-葡萄糖循环酶的至少一种酶的生物催化剂;
 - c. 使该生物催化剂与含有该起始组合物的介质接触以产生包含至少一种靶甜菊醇糖苷的介质。
3. 如权利要求1或2所述的方法,该方法进一步包括以下步骤:
 - d. 从该介质纯化该靶甜菊醇糖苷以提供高度纯化的靶甜菊醇糖苷组合物。
4. 如权利要求1或2所述的方法,其中该有机化合物选自下组,该组由以下各项组成:多元醇、碳水化合物、甜菊醇糖苷及其组合。
5. 如权利要求1或2所述的方法,其中该是葡萄糖并且该方法是发酵法。
6. 如权利要求1或2所述的方法,其中该起始组合物包含甜菊醇糖苷。
7. 如权利要求1所述的方法,其中该微生物选自下组,该组由以下各项组成:大肠杆菌、酵母菌属物种、曲霉菌属物种、毕赤酵母属物种、芽孢杆菌属物种、和耶氏酵母属物种。
8. 如权利要求2所述的方法,其中该生物催化剂是一种酶、或包含一种或多种酶的细胞,所述酶能够将该有机化合物转化为靶甜菊醇糖苷。
9. 如权利要求1或2所述的方法,其中该靶甜菊醇糖苷选自下组,该组由以下各项组成:甜菊苷、reb A、reb D、reb D2、reb E、reb M、reb M2及其混合物。
10. 如权利要求1或2所述的方法,其中该酶选自下组,该组由以下各项组成:香叶基香叶基二磷酸合酶、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-2-C-甲基-D-赤藓糖醇合酶(CMS)、4-二磷酸胞苷-2-C-甲基-D-赤藓糖醇激酶(CMK)、4-二磷酸胞苷-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、UGT91D2、UGTSL2、UGT76G1、或含有选自S42A、F46I、I190L、S274G、I295M、K303G、F314S、K316R、K393R、V394I、I407V、N409K、N409R、Q425E、Q432E、S447A和S456L的一个或多个点突变的UGT76G1。

高纯度的甜菊醇糖苷

[0001] 本申请是申请日为2014年5月28日,申请号为201480040130.6,发明名称为“高纯度的甜菊醇糖苷”的申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2013年5月28日提交的美国临时专利申请号61/827,922;2013年7月8日提交的美国临时专利申请号61/843,544;2013年8月2日提交的美国临时专利申请号61/861,528;2013年9月23日提交的美国临时专利申请号61/881,166;2013年10月1日提交的美国临时专利申请号61/885,084;2013年11月15日提交的美国临时专利申请号61/904,751;2013年12月9日提交的美国临时专利申请号61/913,482;2013年12月30日提交的美国临时专利申请号61/921,635;2014年1月9日提交的美国临时专利申请号61/925,329、以及2014年2月14日提交的美国临时专利申请号61/939,855的优先权。以上引用的优先权文件以其整体充分地结合在此。

技术领域

[0004] 本发明涉及用于制备包含甜菊醇糖苷的组合物的生物催化法,所述组合物包括高度纯化的甜菊醇糖苷组合物。本发明还涉及新颖的甜菊醇糖苷、用于分离所述甜菊醇糖苷的方法以及这些新颖的甜菊醇糖苷的用途。

[0005] 发明背景

[0006] 高强度甜味剂具有比蔗糖甜味水平高许多倍的甜味水平。它们基本上无热量,并且普遍用于饮食和低热量产品中,包括食品和饮料。高强度甜味剂不引发升糖反应,从而使它们适合用于针对糖尿病患者和有兴趣控制其碳水化合物摄入的其他人群的产品中。

[0007] 甜菊醇糖苷是一类在甜叶菊 (*Stevia rebaudiana* Bertoni) (原产于南美某些地区的菊科 (Asteraceae (Compositae)) 的多年生灌木) 叶中发现的化合物。它们的结构特征在于单个碱,甜菊醇,差异在于位置C13和C19上碳水化合物残基的存在。它们在甜叶菊的叶子中积累,构成大约10%-20%的总干重。基于干重,在甜菊属叶中发现的4种主要糖苷通常包括甜菊苷 (stevioside) (9.1%)、莱鲍迪苷A (3.8%)、莱鲍迪苷C (0.6%-1.0%) 和杜尔可苷A (dulcoside A) (0.3%)。其他已知的甜菊醇糖苷包括莱鲍迪苷B、C、D、E、F和M,甜菊双苷和甜叶悬钩子苷。

[0008] 虽然已知用于从甜叶菊制备甜菊醇糖苷的方法,但这些方法大多不适合于商业使用。

[0009] 因此,仍然存在对用于制备包含甜菊醇糖苷的组合物 (包括高度纯化的甜菊醇糖苷组合物) 的简单、高效且经济的方法的需要。

[0010] 另外,仍然存在对新颖的甜菊醇糖苷及其制备和分离方法的需要。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明提供了用于制备包含甜菊醇糖苷的组合物的生物催化法,该生物催化法包括使含有起始组合物的介质与生物催化剂接触,该起始组合物包括含有至少一个碳原子的有机化合物,由此产生包含甜菊醇糖苷的组合物。

[0013] 在另一个实施例中,本发明提供了用于产生靶甜菊醇糖苷的方法,该方法包括使一种有机化合物和选自甜菊醇生物合成酶和UDP-糖基转移酶的至少一种酶接触,由此产生包含靶甜菊醇糖苷的组合物。

[0014] 该包含至少一个碳原子的有机化合物是用于生物转化的底物。在一个实施例中,该有机化合物选自下组,该组由以下各项组成:多元醇或糖醇、或各种碳水化合物。在另一个实施例中,该有机化合物为至少一种甜菊醇糖苷。

[0015] 靶甜菊醇糖苷可以是与底物甜菊醇糖苷不相同的任何甜菊醇糖苷。在一个实施例中,靶甜菊醇糖苷是甜菊单苷、甜菊双苷、甜叶悬钩子苷、杜尔可苷B、杜尔可苷A、莱鲍迪苷B、莱鲍迪苷G、甜菊苷、莱鲍迪苷C、莱鲍迪苷F、莱鲍迪苷A、莱鲍迪苷I、莱鲍迪苷E、莱鲍迪苷H、莱鲍迪苷L、莱鲍迪苷K、莱鲍迪苷J、莱鲍迪苷M、莱鲍迪苷M2、莱鲍迪苷D、莱鲍迪苷D2、莱鲍迪苷N、莱鲍迪苷O或合成的甜菊醇糖苷。

[0016] 在一个实施例中,靶甜菊醇糖苷是甜菊苷。

[0017] 在另一个实施例中,靶甜菊醇糖苷是莱鲍迪苷A。

[0018] 在再另一个实施例中,靶甜菊醇糖苷是莱鲍迪苷D。

[0019] 在又另一个实施例中,靶甜菊醇糖苷是莱鲍迪苷M(也称为莱鲍迪苷X)。

[0020] 在优选的实施例中,生物催化剂是一种酶、或包含一种或多种酶的细胞,所述酶能够将有机化合物转化为靶甜菊醇糖苷。生物催化剂可以位于细胞的表面上和/或内部。生物催化剂可以被提供为全细胞悬液、粗裂解物或一种或多种纯化酶的形式。生物催化剂可以处于游离形式或被固定至由无机或有机材料制造的固体支持物。

[0021] 在一些实施例中,微生物包含用于将有机化合物转化为靶甜菊醇糖苷的一种或多种必需生物催化剂。因此,本发明还提供了用于通过以下方式制备包含靶甜菊醇糖苷的组合物的生物催化法:使包含有机化合物的起始组合物与包含能够将有机化合物转化为靶甜菊醇糖苷的至少一种酶的微生物接触,由此产生包含至少一种靶甜菊醇糖苷的介质。

[0022] 用于将该有机化合物转化为靶甜菊醇糖苷必需的酶包括甜菊醇生物合成酶、UDP-糖基转移酶(UGT)和/或UDP-循环酶。

[0023] 在一个实施例中,甜菊醇生物合成酶选自下组,该组由以下各项组成:香叶基香叶基二磷酸合酶、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-2-C-甲基-D-赤藓糖醇合酶(CMS)、4-二磷酸胞苷-2-C-甲基-D-赤藓糖醇激酶(CMK)、4-二磷酸胞苷-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和细胞色素P450还原酶。

[0024] UDP-葡萄糖基转移酶可以是能够将至少一个葡萄糖单位添加至甜菊醇和/或甜菊醇糖苷底物以提供靶甜菊醇糖苷的任何UDP-葡萄糖基转移酶。

[0025] 在一个实施例中,甜菊醇生物合成酶和UDP-葡萄糖基转移酶是在微生物中产生的。微生物可以是例如,大肠杆菌、酵母菌属物种、曲霉菌属物种、毕赤酵母属物种、芽孢杆菌属物种、耶氏酵母属物种等。在另一个实施例中,合成了UDP-葡萄糖基转移酶。

[0026] 在一个实施例中,UDP-葡萄糖基转移酶选自下组,该组由以下各项组成:UGT74G1、

UGT85C2、UGT76G1、UGT91D2、UGTSL、UGTSL_Sc、UGTSL2 (GI号460410132版本XP_004250485.1)、UGTLB、GI号460409128 (UGTSL) 版本XP_004249992.1、GI号115454819版本NP_001051010.1、GI号187373030、版本ACD03249.1、GI号222619587版本EEE55719.1、GI号297795735版本XP_002865752.1或EUGT11以及与所述多肽具有实质性(>85%)一致性的UGT、连同具有编码这些UGT的分离的核酸分子的UGT。

[0027] 在一个实施例中,甜菊醇生物合成酶、UGT和UDP-葡萄糖循环系统存在于一种微生物中。该微生物可以是例如,大肠杆菌、酵母菌属物种、曲霉菌属物种、毕赤酵母属物种、芽孢杆菌属物种、耶氏酵母属物种。

[0028] 在一个实施例中,UDP-葡萄糖基转移酶是能够将至少一个葡萄糖单位添加至甜叶悬钩子苷以形成甜菊苷的任何UDP-葡萄糖基转移酶。在一个具体的实施例中,该UDP-葡萄糖基转移酶是UGT91D2。

[0029] 在一个实施例中,该UDP-葡萄糖基转移酶是能够将至少一个葡萄糖单位添加至甜菊苷以形成莱鲍迪苷A的任何UDP-葡萄糖基转移酶。在一个具体的实施例中,该UDP-葡萄糖基转移酶是UGT76G1。

[0030] 在另一个实施例中,该UDP-葡萄糖基转移酶是能够将至少一个葡萄糖单位添加至莱鲍迪苷A以形成莱鲍迪苷D的任何UDP-葡萄糖基转移酶。在一个具体的实施例中,该UDP-葡萄糖基转移酶是UGT91D2。在另一个实施例中,UGT是通过定向演化产生的具有更高活性和/或选择性的UGT91D2的改良变体。

[0031] 在又一个实施例中,UDP-葡萄糖基转移酶是能够将至少一个葡萄糖单位添加至莱鲍迪苷D以形成莱鲍迪苷M的任何UDP-葡萄糖基转移酶。在一个具体的实施例中,UDP-葡萄糖基转移酶是UGT76G1。在另一个实施例中,UGT是通过定向演化产生的具有更高活性和/或选择性的UGT76G1的改良变体。

[0032] 任选地,本发明的方法还包括,再循环UDP以提供UDP-葡萄糖。在一个实施例中,该方法包括,通过提供再循环催化剂和再循环底物来再循环UDP,从而可使用催化量的UDP-葡萄糖基转移酶和UDP-葡萄糖进行甜菊醇糖苷底物至靶甜菊醇糖苷的生物转化。

[0033] 在一个实施例中,该再循环催化剂是蔗糖合酶。

[0034] 在一个实施例中,该再循环底物是蔗糖。

[0035] 任选地,本发明的方法还包括,将靶甜菊醇糖苷从介质分离,以提供高度纯化的靶甜菊醇糖苷组合物。靶甜菊醇糖苷可通过至少一种适当的方法例如像结晶、通过膜的分离、离心、提取、色谱分离或此类方法的组合来分离。

[0036] 在一个实施例中,可在微生物中产生靶甜菊醇糖苷。在另一个实施例中,靶甜菊醇糖苷可被分泌到介质中。在另一个实施例中,可从介质中连续移除释放的甜菊醇糖苷。在又一个实施例中,在完成反应之后分离靶甜菊醇糖苷。

[0037] 在一个实施例中,分离产生包含按干重计超过约80%的靶甜菊醇糖苷的组合物,即高度纯化的甜菊醇糖苷组合物。在另一个实施例中,分离产生包含按重量计超过约90%的靶甜菊醇糖苷的组合物。在具体的实施例中,组合物包含按重量计超过约95%的靶甜菊醇糖苷。在其他的实施例中,组合物包含按重量计超过约99%的靶甜菊醇糖苷。

[0038] 靶甜菊醇糖苷可以是任何多态形式或无定形形式,包括水合物、溶剂化物、无水形式或其组合。

[0039] 纯化的靶甜菊醇糖苷可作为甜味剂用于可消费产品。适合的消费产品包括但不限于,食品、饮料、药物组合物、烟草产品、营养制品组合物、口腔卫生组合物和化妆品组合物。

[0040] 本发明还提供了甜菊醇糖苷莱鲍迪昔D2 (reb D2, 莱鲍迪昔D的异构体) 和莱鲍迪昔M2 (reb M2, 莱鲍迪昔M的异构体)。在一个实施例中,提供了分离且纯化的reb D2。在另一个实施例中,提供了分离且纯化的reb M2。reb D2和reb M2也可以被呈现为本文披露的任何可消费产品的形式。在一个具体的实施例中,提供了包含reb D2和/或reb M2的饮料。

[0041] 本文还提供了制备reb D2和reb M2的方法。两者都在从reb A到reb D的生物转化过程中形成。Reb M2被认为是从reb D2在原位生物转化形成的。

[0042] 在一个实施例中,本发明为用于制备包含reb D2的组合物的方法,该方法包括:(a) 使包含reb A的起始组合物与能够将reb A转化为reb D2的酶、UDP-葡萄糖、以及任选的UDP-葡萄糖循环酶接触,以产生包含reb D2的组合物,并且(b) 分离包含reb D2的组合物。

[0043] 在另一个实施例中,本发明为用于制备包含reb M2的组合物的方法,该方法包括(a) 使包含reb D2的起始组合物与能够将reb D2转化为reb M2的酶、UDP-葡萄糖、以及任选的UDP-葡萄糖循环酶接触,以产生包含reb M2的组合物,并且(b) 分离包含reb M2的组合物。

[0044] 用于制备包含reb M2的组合物的另一种方法包括(a) 使包含reb A的起始组合物与能够将reb A转化为reb D2的酶、UDP-葡萄糖、以及任选的UDP-葡萄糖循环酶接触,以产生包含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的组合物与能够将reb D2转化为reb M2的酶、UDP-葡萄糖、以及任选的UDP-葡萄糖循环酶接触,以产生包含reb M2的组合物,并且(d) 分离包含reb M2的组合物。

[0045] 可将该组合物进一步纯化以提供具有基于干重计大于约95%的纯度的reb D2或reb M2。

[0046] 本申请提供了如下内容:

[0047] 1). 一种用于产生靶甜菊醇糖苷的方法,该方法包括以下步骤:

[0048] a. 提供包含具有至少一个碳原子的有机化合物的起始组合物;

[0049] b. 提供含有选自甜菊醇生物合成酶、UDP-糖基转移酶的至少一种酶的并且任选地提供UDP-葡萄糖循环酶的微生物;

[0050] c. 使该微生物与含有该起始组合物的介质接触以产生包含至少一种靶甜菊醇糖苷的介质。

[0051] 2). 一种用于产生靶甜菊醇糖苷的方法,该方法包括以下步骤:

[0052] a. 提供包含具有至少一个碳原子的有机化合物的起始组合物;

[0053] b. 提供包含选自甜菊醇生物合成酶、UDP-糖基转移酶、和任选地UDP-葡萄糖循环酶的至少一种酶的生物催化剂;

[0054] c. 使该生物催化剂与含有该起始组合物的介质接触以产生包含至少一种靶甜菊醇糖苷的介质。

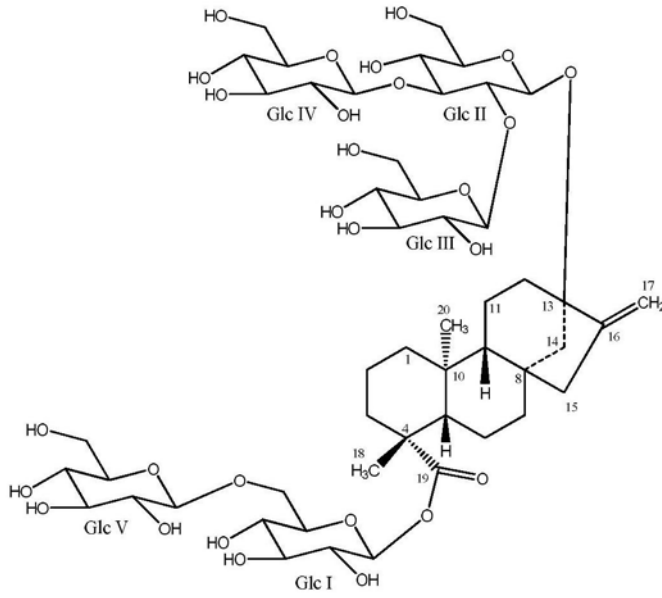
[0055] 3). 如1) 或2) 所述的方法,该方法进一步包括以下步骤:

[0056] d. 从该介质纯化该靶甜菊醇糖苷以提供高度纯化的靶甜菊醇糖苷组合物。

[0057] 4). 如1) 或2) 所述的方法,其中该有机化合物选自下组,该组由以下各项组成:多元醇、碳水化合物、甜菊醇糖苷及其组合。

- [0058] 5). 如1) 或2) 所述的方法, 其中该是葡萄糖并且该方法是发酵法。
- [0059] 6). 如1) 或2) 所述的方法, 其中该起始组合物包含甜菊醇糖苷。
- [0060] 7). 如1) 所述的方法, 其中该微生物选自下组, 该组由以下各项组成: 大肠杆菌、酵母菌属物种、曲霉菌属物种、毕赤酵母属物种、芽孢杆菌属物种、和耶氏酵母属物种。
- [0061] 8). 如2) 所述的方法, 其中该生物催化剂是一种酶、或包含一种或多种酶的细胞, 所述酶能够将该有机化合物转化为靶甜菊醇糖苷。
- [0062] 9). 如1) 或2) 所述的方法, 其中该靶甜菊醇糖苷选自下组, 该组由以下各项组成: 甜菊苷、reb A、reb D、reb D2、reb E、reb M、reb M2及其混合物。
- [0063] 10). 如1) 或2) 所述的方法, 其中该酶选自下组, 该组由以下各项组成: 香叶基香叶基二磷酸合酶、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-2-C-甲基-D-赤藓糖醇合酶(CMS)、4-二磷酸胞苷-2-C-甲基-D-赤藓糖醇激酶(CMK)、4-二磷酸胞苷-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、UGT91D2、UGTSL2、UGT76G1、或含有选自S42A、F46I、I190L、S274G、I295M、K303G、F314S、K316R、K393R、V394I、I407V、N409K、N409R、Q425E、Q432E、S447A和S456L的一个或多个点突变的UGT76G1。
- [0064] 11). 如3) 所述的方法, 其中该高度纯化的靶甜菊醇糖苷组合物具有按干重计超过约95%的靶甜菊醇糖苷纯度。
- [0065] 12). 如3) 所述的方法, 其中该高度纯化的靶甜菊醇糖苷组合物具有按干重计超过约99%的靶甜菊醇糖苷纯度。
- [0066] 13). 如11) 所述的方法, 其中该靶甜菊醇糖苷选自甜菊苷、reb A、reb E、reb D、reb D2、reb M、和reb M2。
- [0067] 14). 如11) 所述的方法, 其中该靶甜菊醇糖苷是reb M。
- [0068] 15). 根据如3) 所述的方法制备的高度纯化的靶甜菊醇糖苷组合物, 其中该靶甜菊醇糖苷是多态的。
- [0069] 16). 如15) 所述的高度纯化的靶甜菊醇糖苷组合物, 其中该靶甜菊醇糖苷是reb D 或reb M。
- [0070] 17). 一种包含通过如3) 所述的方法产生的高度纯化的靶糖苷组合物的可消费产品, 其中该产品选自下组, 该组由以下各项组成: 食品、饮料、药物组合物、烟草产品、营养制品组合物、口腔卫生组合物、和化妆品组合物。
- [0071] 18). 一种包含通过如3) 所述的方法产生的高度纯化的靶甜菊醇糖苷组合物的可消费产品, 其中该产品选自下组, 该组由以下各项组成: 食品、饮料、药物组合物、烟草产品、营养制品组合物、口腔卫生组合物、和化妆品组合物, 并且其中该靶甜菊醇糖苷是reb D。
- [0072] 19). 一种包含通过如3) 所述的方法产生的高度纯化的靶甜菊醇糖苷组合物的可消费产品, 其中该产品选自下组, 该组由以下各项组成: 食品、饮料、药物组合物、烟草产品、营养制品组合物、口腔卫生组合物、和化妆品组合物, 并且其中该靶甜菊醇糖苷是reb M。
- [0073] 20). 具有下列结构的分离的且高度纯化的reb D2:

[0074]



[0075] 21). 一种包含分离的且高度纯化的reb D2的可消费产品。

[0076] 22). 如21)所述的可消费产品,其中该可消费品选自下组,该组由以下各项组成:饮料;天然汁;提神饮料;碳酸软饮料;减肥饮料;零卡路里饮料;降卡路里饮料和食品;酸奶饮料;速溶汁液;速溶咖啡;粉末型速溶饮料;罐头产品;糖浆;发酵豆酱;酱油;醋;调味品;蛋黄酱;蕃茄酱;咖喱食品;汤;即时肉汤;酱油粉;醋粉;各种类型的饼干;米饼;薄脆饼干;面包;巧克力;焦糖;糖果;口香糖;果冻;布丁;果脯及腌菜;鲜奶油;果酱;桔子酱;糖花膏;奶粉;冰淇淋;冰糕;包装在瓶中的蔬菜和水果;水煮豆罐头;甜酱中煮的肉类和食品;农业蔬菜食品;海产食品;火腿;香肠;鱼火腿;鱼香肠;鱼酱;炸鱼制品;干海产品;冷冻食品;腌制海藻;腌肉;烟草和药品。

[0077] 23). 一种包含分离的且高度纯化的reb D2的饮料。

[0078] 24). 一种制备reb D2的方法,该方法包括:

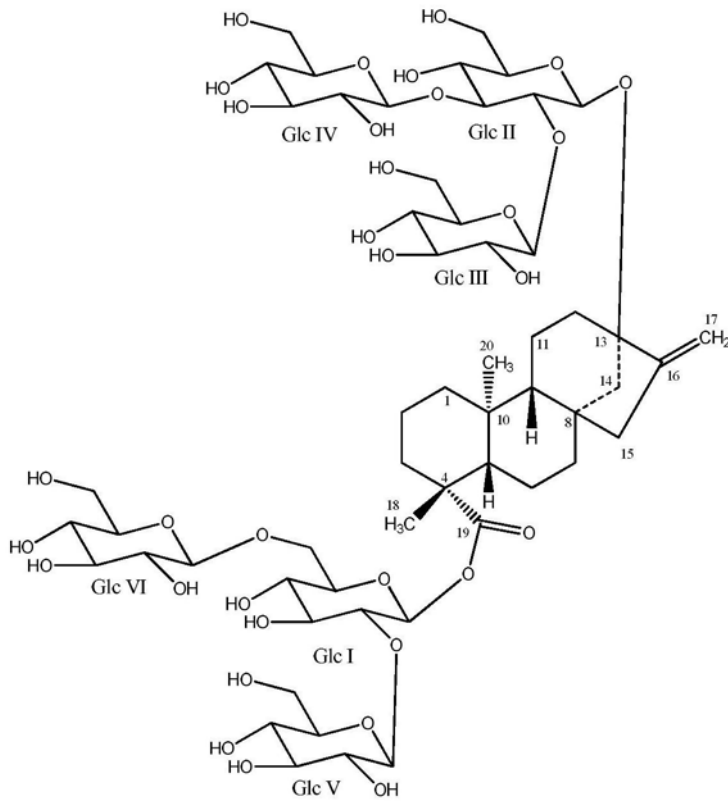
[0079] a. 使包含reb A的起始组合物与选自能够将reb A转化为reb D2的酶的组中的一种酶、UDP-葡萄糖、以及任选的UDP-葡萄糖循环酶接触,以产生包含reb D2的组合物;并且

[0080] b. 分离、并且任选地纯化该包含reb D2的组合物。

[0081] 25). 如24)所述的方法,其中reb D2具有按干重计超过约95%的纯度。

[0082] 26). 具有下列结构的分离的且高度纯化的reb M2:

[0083]



[0084] 27). 一种包含分离的且高度纯化的reb M2的可消费产品。

[0085] 28). 如27)所述的可消费产品,其中该可消费品选自下组,该组由以下各项组成:饮料;天然汁;提神饮料;碳酸软饮料;减肥饮料;零卡路里饮料;降卡路里饮料和食品;酸奶饮料;速溶汁液;速溶咖啡;粉末型速溶饮料;罐头产品;糖浆;发酵豆酱;酱油;醋;调味品;蛋黄酱;蕃茄酱;咖喱食品;汤;即时肉汤;酱油粉;醋粉;各种类型的饼干;米饼;薄脆饼干;面包;巧克力;焦糖;糖果;口香糖;果冻;布丁;果脯及腌菜;鲜奶油;果酱;桔子酱;糖花膏;奶粉;冰淇淋;冰糕;包装在瓶中的蔬菜和水果;水煮豆罐头;甜酱中煮的肉类和食品;农业蔬菜食品;海产食品;火腿;香肠;鱼火腿;鱼香肠;鱼酱;炸鱼制品;干海产品;冷冻食品;腌制海藻;腌肉;烟草和药品。

[0086] 29). 一种包含分离的且高度纯化的reb M2的饮料。

[0087] 30). 一种制备reb M2的方法,该方法包括:

[0088] a. 使包含reb D2的起始组合物与选自由能够将reb D2转化为reb M2的酶组成的组中的一种酶、UDP-葡萄糖、以及任选的UDP-葡萄糖循环酶接触,以产生包含reb M2的组合物;并且

[0089] b. 分离、并且任选地纯化该包含reb M2的组合物。

[0090] 31). 如30)所述的方法,其中reb M2具有按干重计超过约95%的纯度。

[0091] 32). 如21)所述的可消费产品,进一步包括选自下组的至少一种添加剂,该组由以下各项组成:碳水化合物、多元醇、氨基酸及其相应的盐、聚氨基酸及其相应的盐、糖酸及其相应的盐、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、苦味化合物、调味剂和调味成分、涩味化合物、蛋白质或蛋白质水解物、表面活性剂、乳化剂、类黄酮、醇类、聚合物及其组合。

[0092] 33). 如21)所述的可消费产品,进一步包括至少一种选自下组的功能成分,该组由

以下各项组成:皂苷、抗氧化剂、膳食纤维源、脂肪酸、维生素、葡糖胺、矿物质、防腐剂、水化剂、益生菌、益生元、体重管理剂、骨质疏松管理剂、植物雌激素、长链饱和脂肪伯醇、植物甾醇及其组合。

[0093] 34). 如21) 所述的可消费产品, 进一步包括选自下组的化合物, 该组由以下各项组成: 甜叶菊、甜叶菊提取物、甜菊单苷、甜菊双苷、甜叶悬钩子苷、杜尔可苷A、杜尔可苷B、莱鲍迪苷B、莱鲍迪苷G、甜菊苷、莱鲍迪苷C、莱鲍迪苷F、莱鲍迪苷A、莱鲍迪苷I、莱鲍迪苷E、莱鲍迪苷H、莱鲍迪苷L、莱鲍迪苷K、莱鲍迪苷J、莱鲍迪苷M、莱鲍迪苷M2、莱鲍迪苷D、莱鲍迪苷D2、莱鲍迪苷N或莱鲍迪苷O、或发现于甜叶菊中的其他甜菊醇糖苷、罗汉果苷、布拉齐因、新橙皮苷二氢查耳酮、甘草酸及其盐、索马甜、紫苏萜、pernandulcin、无患子倍半萜苷、白云参苷、糙苏苷-I、二甲基-六氢茱-二羧酸、相思子苷、巴西甘草甜素、肉花雪胆苷、青钱柳苷、蝶卡苷、聚波朵苷A、巴西木素、贺兰甜精、叶甜素、菝葜苷、根皮苷、三叶苷、二氢黄酮醇、二氢槲皮素-3-乙酸酯、新落新妇苷、反式肉桂醛、莫那汀及其盐、修蕨素A、苏木精、应乐果甜蛋白、欧亚水龙骨甜素、蝶卡苷A、蝶卡苷B、马槟榔甜蛋白、潘塔亭、神秘果蛋白、仙茅甜蛋白、宽叶仙茅甜蛋白、绿原酸、洋蓟酸、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、NSF-02、NSF-03、NSF-04、阿洛酮糖、阿洛糖、D-塔格糖、赤藓糖醇及其组合。

[0094] 35). 一种包含分离的且纯化的reb D2的桌面甜味剂组合物。

[0095] 36). 如27) 所述的可消费产品, 进一步包括选自下组的至少一种添加剂, 该组由以下各项组成: 碳水化合物、多元醇、氨基酸及其相应的盐、聚氨基酸及其相应的盐、糖酸及其相应的盐、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、苦味化合物、调味剂和调味成分、涩味化合物、蛋白质或蛋白质水解物、表面活性剂、乳化剂、类黄酮、醇类、聚合物及其组合。

[0096] 37). 如27) 所述的可消费产品, 进一步包括至少一种选自下组的功能成分, 该组由以下各项组成: 皂苷、抗氧化剂、膳食纤维源、脂肪酸、维生素、葡糖胺、矿物质、防腐剂、水化剂、益生菌、益生元、体重管理剂、骨质疏松管理剂、植物雌激素、长链饱和脂肪伯醇、植物甾醇及其组合。

[0097] 38). 如27) 所述的可消费产品, 进一步包括选自下组的化合物, 该组由以下各项组成: 甜叶菊、甜叶菊提取物、甜菊单苷、甜菊双苷、甜叶悬钩子苷、杜尔可苷A、杜尔可苷B、莱鲍迪苷B、莱鲍迪苷G、甜菊苷、莱鲍迪苷C、莱鲍迪苷F、莱鲍迪苷A、莱鲍迪苷I、莱鲍迪苷E、莱鲍迪苷H、莱鲍迪苷L、莱鲍迪苷K、莱鲍迪苷J、莱鲍迪苷M、莱鲍迪苷M2、莱鲍迪苷D、莱鲍迪苷D2、莱鲍迪苷N或莱鲍迪苷O、或发现于甜叶菊中的其他甜菊醇糖苷、罗汉果苷、布拉齐因、新橙皮苷二氢查耳酮、甘草酸及其盐、索马甜、紫苏萜、pernandulcin、无患子倍半萜苷、白云参苷、糙苏苷-I、二甲基-六氢茱-二羧酸、相思子苷、巴西甘草甜素、肉花雪胆苷、青钱柳苷、蝶卡苷、聚波朵苷A、巴西木素、贺兰甜精、叶甜素、菝葜苷、根皮苷、三叶苷、二氢黄酮醇、二氢槲皮素-3-乙酸酯、新落新妇苷、反式肉桂醛、莫那汀及其盐、修蕨素A、苏木精、应乐果甜蛋白、欧亚水龙骨甜素、蝶卡苷A、蝶卡苷B、马槟榔甜蛋白、潘塔亭、神秘果蛋白、仙茅甜蛋白、宽叶仙茅甜蛋白、绿原酸、洋蓟酸、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、NSF-02、NSF-03、NSF-04、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、赤藓糖醇及其组合。

[0098] 39). 一种包含分离的且纯化的reb M2的桌面甜味剂组合物。

- [0099] 40).一种用于增强包含甜味剂的饮料的甜味的方法,该方法包括:
- [0100] a.)提供一种包含甜味剂的饮料;并且
- [0101] b.)添加选自reb D2、reb M2或其组合的甜味增强剂,
- [0102] 其中reb D2和/或reb M2以处于或低于甜味识别阈值的浓度存在。
- [0103] 附图简要说明
- [0104] 附图被包括在内以提供对本发明的进一步理解。这些附图展示了本发明的实施例,并且与说明书一起用来解释本发明的实施例的原理。
- [0105] 图1显示从甜菊苷生物催化产生reb M。
- [0106] 图2显示使用酶UGT76G1从甜菊苷生物催化产生reb A,以及伴随的通过蔗糖合酶进行UDP至UDP-葡萄糖的再循环。
- [0107] 图3显示从reb D生物催化产生reb M的产物的HPLC色谱图,如实施例14中详述。具有24.165分钟的保留时间的峰相对应于未反应的reb D。具有31.325分钟的保留时间的峰相对应于reb M。
- [0108] 图4显示UGT76G1催化的甜菊苷到reb A的转化。
- [0109] 图5显示UGT76G1催化的reb D到reb M的转化。
- [0110] 图6显示半合成甜菊醇糖苷混合物的LC-MS分析,批号CB-2977-106,显示了TIC (A)、在1.8分钟处的峰的MS (B)、在4.1分钟处的reb M2峰的MS (C)、在6.0分钟处的reb D峰的MS (D)、在7.7分钟处的reb D2峰的MS (E)、在9.4分钟处的峰的MS (F)、在15.2分钟处的莱鲍迪昔A峰的MS (G)、在16.5分钟处的峰的MS (H)、和在18.3分钟处的峰的MS (I)。
- [0111] 图7显示半合成甜菊醇糖苷混合物的HPLC分析,批号CB-2977-106 (A),分离的reb M2 (B)、分离的reb D (C)和分离的reb D2 (D)。
- [0112] 图8显示reb D2的 ^1H NMR谱 (500MHz,吡啶- d_5)。
- [0113] 图9显示reb D2的 ^{13}C NMR谱 (125MHz,吡啶- d_5)。
- [0114] 图10显示reb D2的 ^{13}C NMR谱的扩展 (125MHz,吡啶- d_5)。
- [0115] 图11显示reb D2的 ^1H - ^1H COSY谱 (500MHz,吡啶- d_5)。
- [0116] 图12显示reb D2的HSQC-DEPT谱 (500MHz,吡啶- d_5)。
- [0117] 图13显示reb D2的HMBC谱。
- [0118] 图14显示reb D2的HMBC谱的扩展 (500MHz,吡啶- d_5)。
- [0119] 图15显示reb D2的NOESY谱。
- [0120] 图16显示在约46小时之后获得的reb D2的 ^1H NMR谱 (500MHz,吡啶- d_5)。
- [0121] 图17显示在约46小时之后获得的reb D2的 ^1H NMR谱的扩展 (500MHz,吡啶- d_5)。
- [0122] 图18显示reb M2的 ^1H NMR谱 (500MHz, D_2O)。
- [0123] 图19显示reb M2的 ^{13}C NMR谱 (125MHz, D_2O /TSP)。
- [0124] 图20显示reb M2的 ^{13}C NMR谱的扩展 (125MHz, D_2O /TSP)。
- [0125] 图21显示reb M2的 ^1H - ^1H COSY谱 (500MHz, D_2O)。
- [0126] 图22显示reb M2的HSQC-DEPT谱 (500MHz, D_2O)。
- [0127] 图23显示reb M2的HMBC谱 (500MHz, D_2O)。
- [0128] 图24显示reb M2的HMBC谱的扩展 (500MHz, D_2O)。
- [0129] 详细说明

[0130] 本发明提供了用于制备包含靶甜菊醇糖苷的组合物的生物催化法,该生物催化法包括通过使含有起始组合物的介质与生物催化剂接触,该起始组合物包括含有至少一个碳原子的有机化合物,由此产生包含靶甜菊醇糖苷的介质。

[0131] 在另一个实施例中,本发明提供了用于产生靶甜菊醇糖苷的方法,该方法包括使一种有机化合物和选自甜菊醇生物合成酶和UDP-糖基转移酶的至少一种酶接触,由此产生包含靶甜菊醇糖苷的组合物。

[0132] 本发明的目的是提供一种从起始组合物中的不同有机化合物制备甜菊醇糖苷,尤其是甜菊苷、reb E、reb A、reb D、reb D2、reb M、和reb M2的高效生物催化方法。

[0133] 如本文使用的,“生物催化”或“生物催化的”是指天然或遗传工程化的生物催化剂,例如酶、或包含能够对有机化合物进行单步或多步化学转化的一种或多种酶的细胞的使用。生物催化过程包括发酵、生物合成和生物转化过程。分离的酶生物催化法和全细胞生物催化法都是本领域已知的。生物催化剂蛋白酶可以是天然存在的或重组的蛋白质。

[0134] 如本文中使用的,术语“一种或多种甜菊醇糖苷”是指甜菊醇的糖苷,包括但不限于,天然存在的甜菊醇糖苷,例如甜菊单苷、甜菊双苷、甜叶悬钩子苷、杜尔可苷B、杜尔可苷A、莱鲍迪苷B、莱鲍迪苷G、甜菊苷、莱鲍迪苷C、莱鲍迪苷F、莱鲍迪苷A、莱鲍迪苷I、莱鲍迪苷E、莱鲍迪苷H、莱鲍迪苷L、莱鲍迪苷K、莱鲍迪苷J、莱鲍迪苷M、莱鲍迪苷M2、莱鲍迪苷D、莱鲍迪苷D2、莱鲍迪苷N、莱鲍迪苷O、合成甜菊醇糖苷例如酶促葡萄糖基化的甜菊醇糖苷及其组合。

[0135] 起始组合物

[0136] 如本文中使用的,“起始化合物”是指含有包含至少一个碳原子的一种或多种有机化合物的任何组合物(通常为水溶液)。

[0137] 在一个实施例中,该有机化合物选自下组,该组由以下各项组成:多元醇和各种碳水化合物。在目前方法为发酵法时,这样的有机化合物、以及包含所述有机化合物的起始组合物是特别有用的。

[0138] 术语“多元醇”是指含有多于一个羟基的分子。多元醇可以是分别含有2、3、和4个羟基的二醇、三醇或四醇。多元醇还可含有多于四个的羟基,例如分别含有5、6、或7个羟基的戊醇、己醇、庚醇等等。另外,多元醇还可以是糖醇、多元醇、或聚合醇,它们是碳水化合物的还原形式,其中羰基(醛或酮、还原糖)已被还原为伯醇羟基或仲醇羟基。多元醇的实例包括但不限于,赤藓醇、麦芽糖醇、甘露醇、山梨醇、拉克替醇、木糖醇、肌醇、异麦芽酮糖醇、丙二醇、甘油、苏糖醇、半乳糖醇、氢化异麦芽酮糖、还原的异麦芽糖寡糖、还原的低聚木糖、还原的龙胆低聚糖、还原的麦芽糖浆、还原的葡萄糖浆、氢化的淀粉水解物、聚糖醇和糖醇或能够被还原的任何其他碳水化合物。

[0139] 术语“碳水化合物”是指被多个羟基取代的醛或酮化合物,具有通式 $(CH_2O)_n$,其中n为3-30,以及它们的低聚物和聚合物。另外,本发明的碳水化合物可在一个或多个位置被取代或去氧。如本文使用的碳水化合物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、和修饰的碳水化合物。如本文使用的,短语“碳水化合物衍生物”、“取代的碳水化合物”、“修饰的碳水化合物”是同义的。修饰的碳水化合物意指,其中至少一个原子已被添加、去除、或取代或其组合的任何碳水化合物。因此,碳水化合物衍生物或取代的碳水化合物包括取代和未取代的单糖、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的C-位置上被脱氧,和/或可被一个或多个部分取代,所述部分例如氢、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、二烷氨基、芳氨基、烷氧基、芳氧基、硝基、氰基、磺基、巯基、亚胺基、磺酰基、亚氧硫基、亚磺酰基、氨磺酰基、烷氧羰基、甲酰胺基、膦酰基(phosphonyl)、氧膦基(phosphinyl)、磷酰基、膦基、硫酸酯、硫酸醚、胍基、胍基、氨甲酰基、二氧磷基(phospho)、膦酸基(phosphonato)或任何其他活性官能团,只要该碳水化合物衍生物或取代的碳水化合物能够改善甜味剂组合物的甜味。

[0140] 可按照本发明使用的碳水化合物的实例包括但不限于,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、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、塔洛糖、赤藓酮糖、木酮糖、阿洛酮糖、松二糖、纤维二糖、支链淀粉、葡糖胺、甘露糖胺、岩藻糖、葡糖醛酸、葡糖酸、葡糖酸内酯、阿比可糖、半乳糖胺、甜菜寡糖、异麦芽糖寡糖(异麦芽糖、异麦芽三糖、潘糖等)、低聚木糖(木三糖、木二糖等)、木糖末端寡糖(xylo-terminatedoligosaccharides)、龙胆低聚糖(龙胆二糖、龙胆三糖、龙胆四糖等)、山梨糖、黑曲霉寡糖、帕拉金糖寡糖、果糖寡聚体(蔗果三糖、霉菌赤藓醛糖等)、麦芽四醇(maltotetraol)、麦芽三醇(maltotriol)、麦芽低聚糖(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、异构化液体糖例如高果糖玉米糖浆、偶联糖和大豆寡糖。此外,本文中使用的碳水化合物可以为D或L构型。

[0141] 起始化合物可以是合成的或纯化的(部分或完全)、可商购的或制备的。

[0142] 在一个实施例中,有机化合物是甘油。在另一个实施例中,起始组合物包含甘油。

[0143] 在一个实施例中,有机化合物是葡萄糖。在另一个实施例中,起始组合物包含葡萄糖。

[0144] 在一个实施例中,有机化合物是蔗糖。在另一个实施例中,起始组合物包含蔗糖。

[0145] 在一个实施例中,有机化合物是淀粉。在另一个实施例中,起始组合物包含淀粉。

[0146] 在一个实施例中,有机化合物是麦芽糊精。在另一个实施例中,起始组合物包含麦芽糊精。

[0147] 一种或多种有机化合物用作用于产生一种或多种靶甜菊醇糖苷的一种或多种底物,如本文中所述。

[0148] 本发明方法还提供了将一种甜菊醇糖苷生物催化转化为另一种甜菊醇糖苷的方法。相应地,在一些实施例中,该有机化合物是甜菊醇糖苷,包括但不限于,甜菊单苷、甜菊双苷、甜叶悬钩子苷、杜尔可苷B、杜尔可苷A、莱鲍迪苷B、莱鲍迪苷G、甜菊苷、莱鲍迪苷C、莱鲍迪苷F、莱鲍迪苷A、莱鲍迪苷I、莱鲍迪苷E、莱鲍迪苷H、莱鲍迪苷L、莱鲍迪苷K、莱鲍迪苷J、莱鲍迪苷M、莱鲍迪苷M2、莱鲍迪苷D、莱鲍迪苷D2、莱鲍迪苷N或莱鲍迪苷O、或其他甜菊醇糖苷。

[0149] 值得注意的是,用于生物催化转化的底物甜菊醇糖苷与靶甜菊醇糖苷是不相同的,如下文论述。然而,起始组合物可以含有除了底物甜菊醇糖苷以外的甜菊醇糖苷,并且在一些情况下,可以含有一定量的靶甜菊醇糖苷。

[0150] 靶甜菊醇糖苷

[0151] 本发明的靶甜菊醇糖苷可以是可通过本文中披露的方法制备的任何甜菊醇糖苷。

在一个实施例中,靶甜菊醇糖苷选自下组,该组由以下各项组成:甜菊单苷、甜菊双苷、甜叶悬钩子苷、杜尔可苷B、杜尔可苷A、莱鲍迪苷B、莱鲍迪苷G、甜菊苷、莱鲍迪苷C、莱鲍迪苷F、莱鲍迪苷A、莱鲍迪苷I、莱鲍迪苷E、莱鲍迪苷H、莱鲍迪苷L、莱鲍迪苷K、莱鲍迪苷J、莱鲍迪苷M、莱鲍迪苷M2、莱鲍迪苷D、莱鲍迪苷D2、莱鲍迪苷N或莱鲍迪苷O、或其他甜菊醇糖苷。

[0152] 在一个实施例中,靶甜菊醇糖苷是甜菊苷。在另一个实施例中,靶甜菊醇糖苷是reb A。在再另一个实施例中,靶甜菊醇糖苷是reb E。在又另一个实施例中,靶甜菊醇糖苷是reb D。在又另一个实施例中,靶甜菊醇糖苷是reb D2。在一个另外的实施例中,靶甜菊醇糖苷是reb M。在再另外的另一个实施例中,靶甜菊醇糖苷是reb M2。

[0153] 靶甜菊醇糖苷可以是任何多态形式或无定形形式,包括水合物、溶剂化物、无水形式或其组合。

[0154] 在一个实施例中,本发明为用于产生reb A的生物催化法。在一个更具体的实施例中,本发明为用于从包含例如葡萄糖的起始组合物产生reb A的发酵方法。

[0155] 在另一个实施例中,本发明为用于产生reb E的生物催化法。在一个更具体的实施例中,本发明为用于从包含例如葡萄糖的起始组合物产生reb E的发酵方法。

[0156] 在再另一个实施例中,本发明为用于产生reb D的生物催化法。在一个更具体的实施例中,本发明为用于从包含例如葡萄糖的起始组合物产生reb D的发酵方法。

[0157] 在又另一个实施例中,本发明为用于产生reb D2的生物催化法。在一个更具体的实施例中,本发明为用于从包含例如葡萄糖的起始组合物产生reb D2的发酵方法。

[0158] 在一个另外的实施例中,本发明为用于产生reb M的生物催化法。在一个更具体的实施例中,本发明为用于从包含例如葡萄糖的起始组合物产生reb M的发酵方法。

[0159] 在再另外的实施例中,本发明为用于产生reb M2的生物催化法。在一个更具体的实施例中,本发明为用于从包含例如葡萄糖的起始组合物产生reb M2的发酵方法。

[0160] 在另一个另外的实施例中,本发明为用于产生甜菊苷的生物催化法。在一个更具体的实施例中,本发明为用于从包含例如葡萄糖的起始组合物产生甜菊苷的发酵方法。

[0161] 任选地,本发明的方法还包括,将靶甜菊醇糖苷从介质分离,以提供高度纯化的靶甜菊醇糖苷组合物。靶甜菊醇糖苷可通过任何适当的方法例如结晶、通过膜的分离、离心、提取、色谱分离或这类方法的组合来分离。

[0162] 在具体的实施例中,本文中描述的方法产生高度纯化的靶甜菊醇糖苷组合物。如本文中使用的,术语“高度纯化的”是指具有按干重计超过约80%的靶甜菊醇糖苷的组合物。在一个实施例中,高度纯化的靶甜菊醇糖苷组合物包含按干重计超过约90%的靶甜菊醇糖苷,例如,像按干重计超过约91%、超过约92%、超过约93%、超过约94%、超过约95%、超过约96%、超过约97%、超过约98%或超过约99%的靶甜菊醇糖苷含量。

[0163] 在一个实施例中,当靶甜菊醇糖苷是reb M时,本文中描述的方法提供了具有按干重计超过约90%的reb M含量的组合物。在另一个具体的实施例中,当靶甜菊醇糖苷是reb M时,本文中描述的方法提供了包含按干重计超过约95%的reb M含量的组合物。

[0164] 在另一个实施例中,当靶甜菊醇糖苷是reb M2时,本文中描述的方法提供了具有按干重计超过约90%的reb M2含量的组合物。在另一个具体的实施例中,当靶甜菊醇糖苷是reb M2时,本文中描述的方法提供了包含按干重计超过约95%的reb M2含量的组合物。

[0165] 在又另一个实施例中,当靶甜菊醇糖苷是reb D时,本文中描述的方法提供了按干

重计超过约90%的reb D含量的组合物。在另一个具体的实施例中,当靶甜菊醇糖苷是reb D时,本文中描述的方法提供了包含按干重计超过约95%的reb D含量的组合物。

[0166] 在再另一个实施例中,当靶甜菊醇糖苷是reb D2时,本文中描述的方法提供了按干重计超过约90%的reb D2含量的组合物。在另一个具体的实施例中,当靶甜菊醇糖苷是reb D2时,本文中描述的方法提供了包含按干重计超过约95%的reb D2含量的组合物。

[0167] 在一个另外的实施例中,当靶甜菊醇糖苷是reb A时,本文中描述的方法提供了包含按干重计超过约90%的reb A含量的组合物。在另一个具体的实施例中,当靶甜菊醇糖苷是reb A时,本文中描述的方法提供了包含按干重计超过约95%的reb A含量的组合物。

[0168] 在再另外的实施例中,当靶甜菊醇糖苷是reb E时,本文中描述的方法提供了包含按干重计超过约90%的reb E含量的组合物。在另一个具体的实施例中,当靶甜菊醇糖苷是reb E时,本文中描述的方法提供了包含按干重计超过约95%的reb E含量的组合物。

[0169] 在又一个另外的实施例中,当靶甜菊醇糖苷是甜菊苷时,本文中描述的方法提供了包含按干重计超过约90%的甜菊苷含量的组合物。在另一个具体的实施例中,当靶甜菊醇糖苷是甜菊苷时,本文中描述的方法提供了包含按干重计超过约95%的甜菊苷含量的组合物。

[0170] 微生物和生物催化剂

[0171] 在本发明的一个实施例中,生物催化剂与含有起始组合物的介质接触以产生靶甜菊醇糖苷。在某些实施例中,生物催化剂是一种酶、或包含一种或多种酶的细胞,所述酶能够将有机化合物转化为靶甜菊醇糖苷。

[0172] 在一个实施例中,生物催化剂是能够将有机化合物转化为靶甜菊醇糖苷的酶。酶可以被提供为全细胞悬液、粗裂解物、纯化酶或其组合的形式。在一个实施例中,生物催化剂是能够将有机化合物转化为靶甜菊醇糖苷的纯化的酶。在另一个实施例中,生物催化剂是包含能够将有机化合物转化为靶甜菊醇糖苷的至少一种酶的粗裂解物。在再另一个实施例中,生物催化剂是包含能够将有机化合物转化为靶甜菊醇糖苷的至少一种酶的全细胞悬液。

[0173] 在另一个实施例中,生物催化剂是包含能够将有机化合物转化为靶甜菊醇糖苷的酶的一种或多种细胞。酶可位于细胞表面上、细胞内部或既位于细胞表面上又位于细胞内部。

[0174] 在一个实施例中,在有机化合物到靶甜菊醇糖苷的每一转化中使用一种生物催化剂酶。在另一个实施例中,在每一转化中使用两种或更多种生物催化剂酶。

[0175] 用于将有机化合物转化为靶甜菊醇糖苷的适合的酶包括但不限于,甜菊醇生物合成酶和UDP-糖基转移酶(UGT)。

[0176] 在一个实施例中,甜菊醇生物合成酶包括甲羟戊酸(MVA)途径酶。

[0177] 在另一个实施例中,甜菊醇生物合成酶包括非甲羟戊酸2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸途径(MEP/DOXP)酶。

[0178] 在一个实施例中,甜菊醇生物合成酶选自下组,该组由以下各项组成:香叶基香叶基二磷酸合酶、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-2-C-甲基-D-赤藓糖醇合酶(CMS)、4-二磷酸胞苷-2-C-甲基-D-赤藓

糖醇激酶 (CMK)、4-二磷酸胞苷-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和细胞色素P450还原酶。

[0179] UDP-葡萄糖基转移酶可以是能够将至少一个葡萄糖单位添加至甜菊醇和/或甜菊醇糖苷底物以提供靶甜菊醇糖苷的任何UDP-葡萄糖基转移酶。

[0180] 在一个实施例中,UDP-葡萄糖基转移酶是能够将至少一个葡萄糖单位添加至甜叶悬钩子苷由此产生甜菊苷的任何UDP-葡萄糖基转移酶。UDP-葡萄糖基转移酶可以是例如UGT91D2。

[0181] 在另一个实施例中,UDP-葡萄糖基转移酶是能够将至少一个葡萄糖单位添加至甜叶悬钩子苷从而产生莱鲍迪苷E的任何UDP-葡萄糖基转移酶。UDP-葡萄糖基转移酶可以是例如UGTSL、UGTSL2或UGTLB。

[0182] 在再另一个实施例中,UDP-葡萄糖基转移酶是能够将至少一个葡萄糖单位添加至莱鲍迪苷E,从而产生莱鲍迪苷D的任何UDP-葡萄糖基转移酶。UDP-葡萄糖基转移酶可以是例如UGT76G1。

[0183] 在又一个实施例中,UDP-葡萄糖基转移酶是能够将至少一个葡萄糖单位添加至甜菊苷,从而产生莱鲍迪苷A的任何UDP-葡萄糖基转移酶。UDP-葡萄糖基转移酶可以是例如UGT76G1。

[0184] 在一个另外的实施例中,UDP-葡萄糖基转移酶是能够将至少一个葡萄糖单位添加至莱鲍迪苷A,从而产生莱鲍迪苷D和/或莱鲍迪苷D2和/或莱鲍迪苷M2的任何UDP-葡萄糖基转移酶。UDP-葡萄糖基转移酶可以是例如UGT91D2、UGTSL2、UGTLB或EUGT11。

[0185] 在另一个实施例中,能够将至少一个葡萄糖单位添加至莱鲍迪苷A的UDP-葡萄糖基转移酶选自以下基因信息 (GenInfo) 识别号的清单,优选来自呈现在表1中的组,并且更优选呈现在表2中的组。

	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
[0186]	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
	15239937	75285934	125589492	183013901	224103633	242032615
	15240305	75288884	125599469	183013903	224103637	242032621
	15240534	77550661	125601477	186478321	224109218	242038423
	15982889	77556148	126635837	187373030	224114583	242043290
[0187]	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
[0188]	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
	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
[0189]	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
	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
[0190]	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	

[0191] 表1

GI 号	登录号	起源
190692175	ACE87855.1	甜叶菊
41469452	AAS07253.1	水稻
[0192] 62857204	BAD95881.1	牵牛花
62857206	BAD95882.1	圆叶牵牛
56550539	BAD77944.1	雏菊
115454819	NP_001051010.1	粳稻亚种 (<i>Oryza sativa Japonica Group</i>)

[0193]

115459312	NP_001053256.1	粳稻亚种
115471069	NP_001059133.1	粳稻亚种
115471071	NP_001059134.1	粳稻亚种
116310985	CAH67920.1	籼稻亚种 (Oryza sativa Indica Group)
116788066	ABK24743.1	北美云杉
122209731	Q2V6J9.1	草莓
125534461	EAY81009.1	籼稻亚种
125559566	EAZ05102.1	籼稻亚种
125588307	EAZ28971.1	粳稻亚种
148907340	ABR16806.1	北美云杉
148910082	ABR18123.1	北美云杉
148910612	ABR18376.1	北美云杉
15234195	NP_194486.1	拟南芥
15239523	NP_200210.1	拟南芥
15239937	NP_196793.1	拟南芥
1685005	AAB36653.1	烟草
183013903	ACC38471.1	蒺藜状苜蓿
186478321	NP_172511.3	拟南芥
187373030	ACD03249.1	糙伏毛燕麦
194701936	ACF85052.1	玉蜀黍
19743740	AAL92461.1	番茄
212275846	NP_001131009.1	玉蜀黍
222619587	EEE55719.1	粳稻亚种
224055535	XP_002298527.1	毛果杨
224101569	XP_002334266.1	毛果杨
224120552	XP_002318358.1	毛果杨

[0194]

224121288	XP_002330790.1	毛果杨
225444853	XP_002281094	葡萄
225454342	XP_002275850.1	葡萄
225454475	XP_002280923.1	葡萄
225461556	XP_002285222	葡萄
225469540	XP_002270294.1	葡萄
226495389	NP_001148083.1	玉蜀黍
226502400	NP_001147674.1	玉蜀黍
238477377	ACR43489.1	小麦
240254512	NP_565540.4	拟南芥
2501497	Q43716.1	矮牵牛
255555369	XP_002518721.1	蓖麻
26452040	BAC43110.1	拟南芥
296088529	CBI37520.3	葡萄
297611791	NP_001067852.2	粳稻亚种
297795735	XP_002865752.1	琴叶拟南芥琴叶亚种
297798502	XP_002867135.1	琴叶拟南芥琴叶亚种
297820040	XP_002877903.1	琴叶拟南芥琴叶亚种
297832276	XP_002884020.1	琴叶拟南芥琴叶亚种
302821107	XP_002992218.1	江南卷柏
30680413	NP_179446.2	拟南芥
319759266	ADV71369.1	葛麻姆洛巴塔变种 (<i>Pueraria montana</i> var. <i>lobata</i>)
326507826	BAJ86656.1	多棱大麦亚种 (<i>Hordeum vulgare</i> subsp. <i>Vulgare</i>)
343457675	AEM37036.1	油菜 (<i>Brassica rapa</i> subsp. <i>oleifera</i>)

[0195]

350534960	NP_001234680.1	番茄
356501328	XP_003519477.1	大豆
356522586	XP_003529927.1	大豆
356535480	XP_003536273.1	大豆
357445733	XP_003593144.1	蒺藜状苜蓿
357452783	XP_003596668.1	蒺藜状苜蓿
357474493	XP_003607531.1	蒺藜状苜蓿
357500579	XP_003620578.1	蒺藜状苜蓿
357504691	XP_003622634.1	蒺藜状苜蓿
359477998	XP_003632051.1	葡萄
359487055	XP_002271587	葡萄
359495869	XP_003635104.1	葡萄
387135134	AFJ52948.1	亚麻
387135176	AFJ52969.1	亚麻
387135192	AFJ52977.1	亚麻
387135282	AFJ53022.1	亚麻
387135302	AFJ53032.1	亚麻
387135312	AFJ53037.1	亚麻
388519407	AFK47765.1	蒺藜状苜蓿
393887646	AFN26668.1	欧洲山芥假如意亚种 (<i>Barbarea vulgaris</i> subsp. <i>arcuata</i>)
414888074	DAA64088.1	玉蜀黍
42572855	NP_974524.1	拟南芥
449440433	XP_004137989.1	黄瓜
449446454	XP_004140986.1	黄瓜
449449004	XP_004142255.1	黄瓜

	449451593	XP_004143546.1	黄瓜
	449515857	XP_004164964.1	黄瓜
	460382095	XP_004236775.1	番茄
	460409128	XP_004249992.1	番茄
	460409461	XP_004250157.1	番茄
	460409465	XP_004250159.1	番茄
	462396388	EMJ02187.1	桃
[0196]	462402118	EMJ07675.1	桃
	462409359	EMJ14693.1	桃
	462416923	EMJ21660.1	桃
	46806235	BAD17459.1	粳稻亚种
	470104266	XP_004288529.1	野草莓韦斯卡亚种 (<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>)
	470142008	XP_004306714.1	野草莓韦斯卡亚种
	475432777	EMT01232.1	节节麦
	51090402	BAD35324.1	粳稻亚种

[0197] 表2

	GI 号	登录号	起源	内标
	460409128	XP.004249992.1	番茄	UGTSL
	460386018	XP.004238697.1	番茄	-
	460409134	XP.004249995.1	番茄	-
[0198]	460410132	XP.004250485.1	番茄	UGTSL2
	460410130	XP.004250484.1	番茄	-
	460410128	XP.004250483.1	番茄	-
	460378310	XP.004234916.1	番茄	-
	209954733	BAG80557.1	宁夏枸杞	UGTLB
[0199]	209954725	BAG80553.1	宁夏枸杞	-

[0200] 在又一个实施例中,UDP-葡萄糖基转移酶是能够将至少一个葡萄糖单位添加至莱鲍迪苷D以形成莱鲍迪苷M和/或莱鲍迪苷M2的任何UDP-葡萄糖基转移酶。UDP-葡萄糖基转移酶可以是例如UGT76G1。在优选的实施例中,转化率至少超过50%,例如超过60%,超过70%,超过80%或超过90%。

[0201] UGT76G1酶还可以含有有益于将莱鲍迪苷D转化为莱鲍迪苷M的一个或多个点突变。适合的突变包括例如,S42A、F46I、I190L、S274G、I295M、K303G、F314S、K316R、K393R、V394I、I407V、N409K、N409R、Q425E、Q432E、S447A和S456L。在优选的实施例中,与在相同条件下使用未突变的UGT76G1相比较,利用含有这样的—个或多个点突变的UGT76G1导致莱鲍迪苷M转化增加至少约5%(其中结果经归—化)。在优选的实施例中,生成莱鲍迪苷M的转化是从约5%增加到约50%,例如像从约10%到约50%,从约20%到约50%,从约30%到约50%或约40%到约50%。

[0202] 在一些实施例中,微生物包含本发明的酶,即能够将有机化合物转化为靶甜菊醇糖苷的酶。相应地,本发明方法的一些实施例包括使微生物与含有起始组合物的介质接触以提供包含至少一种靶甜菊醇糖苷的介质。

[0203] 该微生物可以是具备用于将有机化合物转化为一种或多种靶甜菊醇糖苷的一种或多种必需酶的任何微生物。这些酶在微生物的基因组内被编码。

[0204] 适合的微生物包括但不限于,大肠杆菌、酵母菌属物种、曲霉菌属物种、毕赤酵母属物种、芽孢杆菌属物种、耶氏酵母属物种等。

[0205] 在一个实施例中,当与起始组合物接触时,微生物是游离的。

[0206] 在另一个实施例中,当与起始组合物接触时,微生物是固定的。例如,可将微生物固定至由无机或有机材料制造的固体支持物。适合用于固定微生物的固体支持物的非限制性实例包括,衍生的纤维素或玻璃、陶瓷、金属氧化物或膜。可以例如通过共价附着、吸附、交联、捕获或封装将微生物固定至固体支持物。

[0207] 在再另一个实施例中,能够将有机化合物转化为靶甜菊醇糖苷的酶从微生物中分泌出来并且进入反应介质中。

[0208] 起始组合物/有机化合物与生物催化剂或微生物在包含水和例如各种组分的水性介质中接触,所述组分选自碳源、能源、氮源、微量元素、维生素、核苷、核苷磷酸、核苷二磷酸、核苷三磷酸、有机盐和无机盐、有机酸和矿物酸、碱等等。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、蛋白胨、或蛋白质。

[0209] 在一个具体的实施例中,介质包括缓冲液。适合的缓冲液包括但不限于,PIPES缓冲液、醋酸盐缓冲液和磷酸盐缓冲液。在一个具体的实施例中,介质包括磷酸盐缓冲液。

[0210] 在一个实施例中,介质还可包括有机溶剂。

[0211] 任选地,本发明的方法还包括,再循环UDP以提供UDP-葡萄糖。相应地,这些方法包括,通过提供再循环催化剂(即,能够使UDP-葡萄糖过量产生的生物催化剂)和再循环底物来伴随地再循环UDP,从而可使用催化量的UDP-葡萄糖基转移酶和UDP-葡萄糖进行底物甜菊醇糖苷至靶甜菊醇糖苷的转化(图2)。

[0212] 在一个实施例中,UDP-葡萄糖再循环催化剂是蔗糖合酶。

[0213] 在一个实施例中,该再循环底物是蔗糖。

[0214] 任选地,从所得的组合物纯化靶甜菊醇糖苷。可通过用以提供高度纯化的靶甜菊

醇糖苷组合物的至少一种适合的方法实现从反应介质纯化靶甜菊醇糖苷。适合的方法包括结晶、通过膜的分离、离心、提取(液相或固相)、色谱分离、HPLC(制备型或分析型)或此类方法的组合。

[0215] 在一个实施例中,本发明提供了通过(a)使含有包含甜叶悬钩子苷的起始组合物的介质与UGT91D2和UDP-葡萄糖接触而产生甜菊苷的方法。

[0216] 在一个更具体的实施例中,本发明提供了通过(a)使含有包含甜叶悬钩子苷的起始组合物的介质与催化量的UGT91D2和UDP-葡萄糖接触,和(b)通过提供蔗糖合酶和蔗糖再循环UDP-葡萄糖而产生甜菊苷的催化法。

[0217] 在另一个具体的实施例中,本发明提供了通过(a)使含有包含葡萄糖的起始组合物的介质与包含能够将葡萄糖转化为甜菊苷的至少一种酶的微生物接触而产生甜菊苷的发酵法。

[0218] 在再另一个具体的实施例中,本发明提供了通过(a)使含有包含葡萄糖的起始组合物的介质与包含能够将葡萄糖转化为甜菊苷的至少一种酶的微生物接触和(b)通过提供UDP-葡萄糖、蔗糖合酶和蔗糖再循环UDP-葡萄糖而产生甜菊苷的发酵法。

[0219] 上述方法可进一步包括从该介质中纯化甜菊苷以提供包含高度纯化的甜菊苷的组合物。

[0220] 在另一个实施例中,本发明提供了通过(a)使含有包含甜叶悬钩子苷的起始组合物的介质与UGTSL2和UDP-葡萄糖接触而产生莱鲍迪苷E的方法。

[0221] 在一个更具体的实施例中,本发明提供了通过(a)使含有包含甜叶悬钩子苷的起始组合物的介质与催化量的UGTSL2和UDP-葡萄糖接触,和(b)通过提供蔗糖合酶和蔗糖再循环UDP-葡萄糖而产生莱鲍迪苷E的催化法。

[0222] 在另一个具体的实施例中,本发明提供了通过(a)使含有包含葡萄糖的起始组合物的介质与包含能够将葡萄糖转化为莱鲍迪苷E的至少一种酶的微生物接触而产生莱鲍迪苷E的发酵法。

[0223] 在再另一个具体的实施例中,本发明提供了通过(a)使含有包含葡萄糖的起始组合物的介质与包含能够将葡萄糖转化为莱鲍迪苷E的至少一种酶的微生物接触和(b)通过提供UDP-葡萄糖、蔗糖合酶和蔗糖再循环UDP-葡萄糖而产生莱鲍迪苷E的发酵法。

[0224] 上述方法可进一步包括从该介质中纯化莱鲍迪苷E以提供包含高度纯化的莱鲍迪苷E的组合物。

[0225] 在再另一个实施例中,本发明提供了通过(a)使含有包含莱鲍迪苷E的起始组合物的介质与UGT76G1和UDP-葡萄糖接触而产生莱鲍迪苷D的方法。

[0226] 在一个更具体的实施例中,本发明提供了通过(a)使含有包含莱鲍迪苷E的起始组合物的介质与催化量的UGT76G1和UDP-葡萄糖接触,和(b)通过提供蔗糖合酶和蔗糖再循环UDP-葡萄糖而产生莱鲍迪苷D的催化法。

[0227] 在另一个具体的实施例中,本发明提供了通过(a)使含有包含葡萄糖的起始组合物的介质与包含能够将葡萄糖转化为莱鲍迪苷D的至少一种酶的微生物接触而产生莱鲍迪苷D的发酵法。

[0228] 在再另一个具体的实施例中,本发明提供了通过(a)使含有包含葡萄糖的起始组合物的介质与包含能够将葡萄糖转化为莱鲍迪苷D的至少一种酶的微生物接触和(b)通过

提供UDP-葡萄糖、蔗糖合酶和蔗糖再循环UDP-葡萄糖而产生莱鲍迪昔D的发酵法。

[0229] 上述方法可进一步包括从该介质中纯化莱鲍迪昔D以提供包含高度纯化的莱鲍迪昔D的组合物。

[0230] 在又一个实施例中,本发明提供了通过(a)使含有包含甜菊苷的起始组合物的介质与UGT76G1和UDP-葡萄糖接触而产生莱鲍迪昔A的方法。

[0231] 在一个更具体的实施例中,本发明提供了通过(a)使含有包含甜菊苷的起始组合物的介质与催化量的UGT76G1和UDP-葡萄糖接触,和(b)通过提供蔗糖合酶和蔗糖再循环UDP-葡萄糖而产生莱鲍迪昔A的催化法。

[0232] 在另一个具体的实施例中,本发明提供了通过(a)使含有包含葡萄糖的起始组合物的介质与包含能够将葡萄糖转化为莱鲍迪昔A的至少一种酶的微生物接触而产生莱鲍迪昔A的发酵法。

[0233] 在再另一个具体的实施例中,本发明提供了通过(a)使含有包含葡萄糖的起始组合物的介质与包含能够将葡萄糖转化为莱鲍迪昔A的至少一种酶的微生物接触和(b)通过提供UDP-葡萄糖、蔗糖合酶和蔗糖再循环UDP-葡萄糖而产生莱鲍迪昔A的发酵法。

[0234] 上述方法可进一步包括从该介质中纯化莱鲍迪昔A以提供包含高度纯化的莱鲍迪昔A的组合物。

[0235] 在再另外的实施例中,本发明提供了通过(a)使含有包含莱鲍迪昔A的起始组合物的介质与UGT91D2、UGTSL2或EUGT11和UDP-葡萄糖接触而产生莱鲍迪昔D、莱鲍迪昔D2和/或莱鲍迪昔M2的方法。

[0236] 在一个更具体的实施例中,本发明提供了通过(a)使含有包含莱鲍迪昔A的起始组合物的介质与催化量的UGT91D2、UGTSL2或EUGT11、和UDP-葡萄糖接触,和(b)通过提供蔗糖合酶和蔗糖再循环UDP-葡萄糖而产生莱鲍迪昔D、莱鲍迪昔D2和/或莱鲍迪昔M2的催化法。

[0237] 在另一个具体的实施例中,本发明提供了通过(a)使含有包含葡萄糖的起始组合物的介质与包含能够将葡萄糖转化为莱鲍迪昔D、莱鲍迪昔D2和/或莱鲍迪昔M2的至少一种酶的微生物接触而产生莱鲍迪昔D、莱鲍迪昔D2和/或莱鲍迪昔M2的发酵法。

[0238] 在再另一个具体的实施例中,本发明提供了通过(a)使含有包含葡萄糖的起始组合物的介质与包含能够将葡萄糖转化为莱鲍迪昔D、莱鲍迪昔D2和/或莱鲍迪昔M2的至少一种酶的微生物接触和(b)通过提供UDP-葡萄糖、蔗糖合酶和蔗糖再循环UDP-葡萄糖而产生莱鲍迪昔D、莱鲍迪昔D2和/或莱鲍迪昔M2的发酵法。

[0239] 上述方法可进一步包括从该介质中分离莱鲍迪昔D、莱鲍迪昔D2和/或莱鲍迪昔M2以提供包含高度纯化的莱鲍迪昔D、莱鲍迪昔D2和/或莱鲍迪昔M2的组合物。

[0240] 在又一个实施例中,本发明提供了通过(a)使含有包含莱鲍迪昔D的起始组合物的介质与UGT76G1和UDP-葡萄糖接触而产生莱鲍迪昔M的方法。

[0241] 在一个更具体的实施例中,本发明提供了通过(a)使含有包含莱鲍迪昔D的起始组合物的介质与催化量的UGT76G1和UDP-葡萄糖接触,和(b)通过提供蔗糖合酶和蔗糖再循环UDP-葡萄糖而产生莱鲍迪昔M的催化法。

[0242] 在另一个具体的实施例中,本发明提供了通过(a)使含有包含葡萄糖的起始组合物的介质与包含能够将葡萄糖转化为莱鲍迪昔M的至少一种酶的微生物接触而产生莱鲍迪昔M的发酵法。

[0243] 在再另一个具体的实施例中,本发明提供了通过(a)使含有包含葡萄糖的起始组合物的介质与包含能够将葡萄糖转化为莱鲍迪苷M的至少一种酶的微生物接触和(b)通过提供UDP-葡萄糖、蔗糖合酶和蔗糖再循环UDP-葡萄糖而产生莱鲍迪苷M的发酵法。

[0244] 上述方法可进一步包括从该介质中分离莱鲍迪苷M以提供包含高度纯化的莱鲍迪苷M的组合物。

[0245] 在一些实施例中,依次进行了多个生物催化步骤,以便将例如(i)莱鲍迪苷A转化为莱鲍迪苷D,然后(ii)将莱鲍迪苷D转化为莱鲍迪苷M,或者(i)将甜菊苷转化为莱鲍迪苷A,然后(ii)将莱鲍迪苷A转化为莱鲍迪苷D,然后(iii)将莱鲍迪苷D转化为莱鲍迪苷M,或者(i)将甜叶悬钩子苷转化为甜菊苷,然后(ii)将甜菊苷转化为莱鲍迪苷A,然后(iii)将莱鲍迪苷A转化为莱鲍迪苷D,然后(iv)将莱鲍迪苷D转化为莱鲍迪苷M。

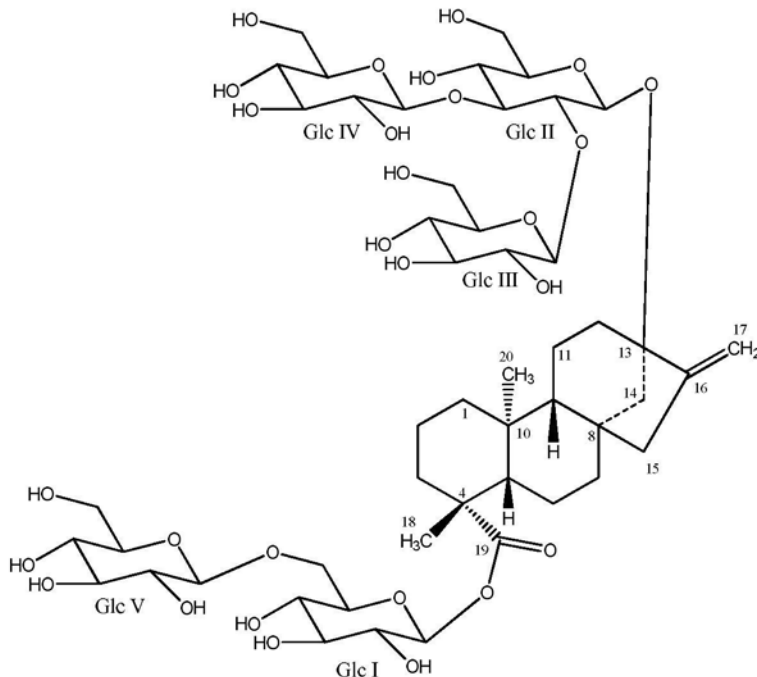
[0246] 可替代地,可以依次使用发酵和生物催化步骤。例如,可以首先用含有能够将葡萄糖转化为靶甜菊醇糖苷的至少一种酶的微生物对包含葡萄糖的起始组合物进行发酵。然后可以使靶甜菊醇糖苷(现在变为用于下一次生物转化目的的起始材料)与能够将其转化为下一种靶甜菊醇糖苷的生物催化剂接触。

[0247] 在各转化之间,在使甜菊醇糖苷(现在变为用于下一次生物转化目的的起始甜菊醇糖苷)与下一种生物催化剂接触之前,可任选地将靶甜菊醇糖苷从该介质中分离。

[0248] 化合物和方法

[0249] 本发明还提供了分离的且高度纯化的reb D2。Reb D2为reb D的异构体并具有以下结构:

[0250]



[0251] 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]

[0252] 在另一个实施例中,本发明提供了具有按干重计纯度超过约95%,例如像按重量计纯度超过约96%、按重量计纯度超过约97%、按重量计纯度超过约98%、或按重量计纯度超过约99%的reb D2。

[0253] 在再另一个实施例中,本发明提供了在甜菊醇糖苷混合物中具有按重量计纯度超过约95%,例如像按重量计纯度超过约96%、按重量计纯度超过约97%、按重量计纯度超过约98%、或按重量计纯度超过约99%的reb D2。

[0254] 本发明还提供了包含reb D2的组合物。

[0255] 本发明还提供了用于制备reb D2的方法,该方法包括:

[0256] a.使包含reb A的起始组合物与能够将reb A转化为reb D2的酶、UDP-葡萄糖、以及任选的UDP-葡萄糖循环酶接触,以产生包含reb D2的组合物;并且

[0257] b.分离包含reb D2的组合物。

[0258] 在一些实施例中,能够将reb A转化为reb D2的酶是UDP-葡萄糖基转移酶,例如像,UGT91D2、UGTSL、UGTSL_Sc、UGTSL2 (GI号460410132版本XP_004250485.1)、GI号460409128 (UGTSL) 版本XP_004249992.1、GI号115454819版本NP_001051010.1、GI号187373030、版本ACD03249.1、GI号222619587版本EEE55719.1、GI号297795735版本XP_002865752.1或EUGT11。

[0259] 在一个实施例中,该酶可被提供为含有所述酶的一种或多种细胞的形式。

[0260] 在其他实施例中,该酶可以被提供为全细胞悬液、粗裂解物、纯化酶或其组合的形式。在一个实施例中,该酶是纯化的酶。在另一个实施例中,该酶被提供为粗裂解物的形式。在再另一个实施例中,该酶被提供为全细胞悬液的形式。

[0261] 能够将reb A转化为reb D2的酶可被固定。

[0262] 在另一个实施例中,该酶被提供在微生物中。

[0263] 在一个实施例中,当与起始组合物接触时,微生物是游离的。

[0264] 在另一个实施例中,当与起始组合物接触时,微生物是固定的。例如,可将微生物固定至由无机或有机材料制造的固体支持物。适合用于固定微生物的固体支持物的非限制性实例包括,衍生的纤维素或玻璃、陶瓷、金属氧化物或膜。可以例如通过共价附着、吸附、交联、捕获或封装将微生物固定至固体支持物。

[0265] 适合的微生物包括但不限于,大肠杆菌、酵母菌属物种、曲霉菌属物种、毕赤酵母属物种、芽孢杆菌属物种、耶氏酵母属物种等。

[0266] 在再另一个实施例中,该酶从微生物中分泌出来并且进入反应介质中。

[0267] 该起始组合物与该酶或微生物在包含水和各种组分的水性介质中接触,所述组分选自下组,该组包括:碳源、能源、氮源、微量元素、维生素、核苷、核苷磷酸、核苷二磷酸、核苷三磷酸、有机盐和无机盐、有机酸和矿物酸、碱等等。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、蛋白胨、或蛋白质。

[0268] 在一个具体的实施例中,介质包括缓冲液。适合的缓冲液包括但不限于,PIPES缓冲液、醋酸盐缓冲液和磷酸盐缓冲液。在一个具体的实施例中,介质包括磷酸盐缓冲液。

[0269] 在一个实施例中,该介质还可包括有机溶剂。

[0270] 在一个具体的实施例中,该酶是能够将reb A转化为reb D2的UDP-葡萄糖基转移酶。

[0271] 在一个更具体的实施例中,该酶选自UGT91D2、UGTSL、UGTSL_Sc、UGTSL2 (GI号460410132版本XP_004250485.1)、GI号460409128 (UGTSL) 版本XP_004249992.1、GI号115454819版本NP_001051010.1、GI号187373030、版本ACD03249.1、GI号222619587版本

EEE55719.1、GI号297795735版本XP_002865752.1或EUGT11以及这些酶具有实质性(>85%)序列一致性的UGT。

[0272] 在再更具体的实施例中,该酶是UGTSL2或通过定向演化产生并且具有更高活性的其改良变体。

[0273] 在一个实施例中,在转化进展的同时连续地将reb D2从该介质中移除。在又一个实施例中,在完成反应之后从该反应介质中分离reb D2并且任选地进行纯化。

[0274] 可以通过任何适合的方法从反应介质中分离reb D2以提供包含reb D2的组合物。适合的方法包括但不限于,裂解、结晶、通过膜的分离、离心、提取(液相或固相)、色谱分离、HPLC(制备型或分析型)或此类方法的组合。在一个具体的实施例中,可以通过裂解和离心实现分离。

[0275] 在一些实施例中,分离可导致按干重计低于约95%的reb D2纯度,并且该组合物可含有例如甜菊醇糖苷和/或残余反应产物。可将该包含reb D2的组合物进一步纯化以提供高度纯化的reb D2,即,具有按干重计大于约95%的纯度的reb D2。在一些实施例中,可将这些包含reb D2的组合物进一步纯化以提供具有按干重计大于约96%,大于约97%,大于约98%或大于约99%的纯度的reb D2。

[0276] 纯化可以受到本领域技术人员已知的任何手段的影响,这些手段包括但不限于,结晶、通过膜的分离、离心、提取(液相或固相)、色谱分离、HPLC(制备型或分析型)或此类方法的组合。在一个具体的实施例中,使用HPLC来纯化reb D2。在一个更具体的实施例中,使用半制备型HPLC来纯化reb D2。

[0277] 例如,可以使用两步半制备型HPLC纯化。第一步利用C18柱,其中流动相含有A(水中的25%MeCN)和B(水中的30%MeCN),具有以下梯度:

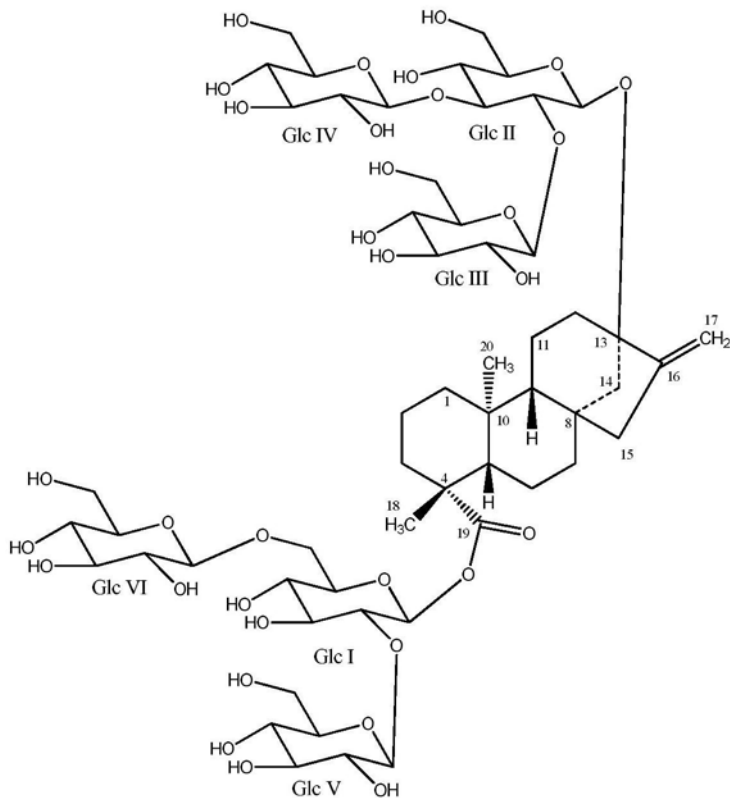
时间(min)	%A	%B
0.0-5.0	100	0
20	20	80
25	20	80
30	100	0

[0279] 第二步利用相同的柱子和条件,不过仅仅具有一个等度流动相:水中的20%MeCN。

[0280] 本领域中技术人员将认识到,特定的柱子、流动相、注射体积和其他HPLC参数可以变化。

[0281] 本发明提供了分离的且高度纯化的reb M2。Reb M2为reb M的异构体并具有以下结构:

[0282]



[0283] (13-[(2-0-β-D-吡喃葡萄糖基-3-0-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-[(2-0-β-D-吡喃葡萄糖基-6-0-β-D-吡喃葡萄糖基-β-D-吡喃葡萄糖基)酯])

[0284] 在另一个实施例中,本发明提供了具有按干重计纯度超过约95%,例如像按重量计纯度超过约96%、按重量计纯度超过约97%、按重量计纯度超过约98%、或按重量计纯度超过约99%的reb M2。

[0285] 在再另一个实施例中,本发明提供了在甜菊醇糖苷混合物中具有按重量计纯度超过约95%,例如像按重量计纯度超过约96%、按重量计纯度超过约97%、按重量计纯度超过约98%、或按重量计纯度超过约99%的reb M2。

[0286] 在又一个实施例中,本发明提供了在甜叶菊提取物中具有按重量计纯度超过约95%,例如像按重量计纯度超过约96%、按重量计纯度超过约97%、按重量计纯度超过约98%、或按重量计纯度超过约99%的reb M2。

[0287] 本发明还提供了包含reb M2的组合物。

[0288] 已经发现在reb A到reb D的生物转化过程中产生了reb M2。如上所述,reb A到reb D的生物转化还产生了reb D2。相应地,本发明还提供了用于制备reb M2的方法,该方法包括:

[0289] a.使包含reb A和/或reb D2的起始组合物与能够将reb A和/或reb D2转化为reb M2的酶、UDP-葡萄糖、以及任选的UDP-葡萄糖循环酶接触,以产生包含reb M2的组合物;并且

[0290] b.分离包含reb M2的组合物。

[0291] 不希望受理论的束缚,当前认为该途径以reb A到reb D2的转化开始,随后为reb D2到reb M2的转化。相应地,本发明提供了用于制备reb M2的方法,该方法包括:

[0292] a.使包含reb D2的起始组合物与能够将reb D2转化为reb M2的酶、UDP-葡萄糖、以及任选的UDP-葡萄糖循环酶接触,以产生包含reb M2的组合物;并且

[0293] b.分离包含reb M2的组合物。

[0294] 在又一个实施例中,用于制备reb M2的方法包括:

[0295] a.使包含reb A的起始组合物与能够将reb A转化为reb D2的酶、UDP-葡萄糖、以及任选的UDP-葡萄糖循环酶接触,以产生包含reb D2的组合物;

[0296] b.任选地,分离包含reb D2的组合物;

[0297] c.使包含reb D2的组合物与能够将reb D2转化为reb M2的酶、UDP-葡萄糖、以及任选的UDP-葡萄糖循环酶接触,以产生包含reb M2的组合物;并且

[0298] d.分离包含reb M2的组合物。

[0299] 该酶可以是UDP-葡萄糖基转移酶,例如像,UGT91D2、UGTSL、UGTSL_Sc、UGTSL2 (GI号460410132版本XP_004250485.1)、GI号460409128 (UGTSL) 版本XP_004249992.1、GI号115454819版本NP_001051010.1、GI号187373030、版本ACD03249.1、GI号222619587版本EEE55719.1、GI号297795735版本XP_002865752.1或EUGT11。

[0300] 在一个实施例中,该酶可被提供为含有所述酶的一种或多种细胞的形式。

[0301] 在其他实施例中,该酶可以被提供为全细胞悬液、粗裂解物、纯化酶或其组合的形式。在一个实施例中,该酶是纯化的酶。在另一个实施例中,该酶被提供为粗裂解物的形式。在再另一个实施例中,该酶被提供为全细胞悬液的形式。

[0302] 在一些实施例中,该酶可以被固定。

[0303] 在另一个实施例中,该酶被提供在微生物中。

[0304] 在一个实施例中,当与起始组合物接触时,微生物是游离的。

[0305] 在另一个实施例中,当与起始组合物接触时,微生物是固定的。例如,可将微生物固定至由无机或有机材料制造的固体支持物。适合用于固定微生物的固体支持物的非限制性实例包括,衍生的纤维素或玻璃、陶瓷、金属氧化物或膜。可以例如通过共价附着、吸附、交联、捕获或封装将微生物固定至固体支持物。

[0306] 适合的微生物包括但不限于,大肠杆菌、酵母菌属物种、曲霉菌属物种、毕赤酵母属物种、芽孢杆菌属物种、耶氏酵母属物种等。

[0307] 在再另一个实施例中,该酶从微生物中分泌出来并且进入反应介质中。

[0308] 该起始组合物与该酶或微生物在包含水和各种组分的水性介质中接触,所述组分选自下组,该组包括:碳源、能源、氮源、微量元素、维生素、核苷、核苷磷酸、核苷二磷酸、核苷三磷酸、有机盐和无机盐、有机酸和矿物酸、碱等等。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、蛋白胨、或蛋白质。

[0309] 在一个具体的实施例中,介质包括缓冲液。适合的缓冲液包括但不限于,PIPES缓冲液、醋酸盐缓冲液和磷酸盐缓冲液。在一个具体的实施例中,介质包括磷酸盐缓冲液。

[0310] 在一个实施例中,该介质还可包括有机溶剂。

[0311] 在一个具体的实施例中,该酶是能够将reb A和/或reb D2转化为reb M2的UDP-葡萄糖基转移酶并且被包含在大肠杆菌中。

[0312] 在一个更具体的实施例中,该酶选自UGT91D2、UGTSL、UGTSL_Sc、UGTSL2 (GI号460410132版本XP_004250485.1)、GI号460409128 (UGTSL) 版本XP_004249992.1、GI号

115454819版本NP_001051010.1、GI号187373030、版本ACD03249.1、GI号222619587版本EEE55719.1、GI号297795735版本XP_002865752.1或EUGT11。

[0313] 在再更具体的实施例中,该酶是UGTSL2或通过定向演化产生并且具有更高活性的其改良变体。

[0314] 在一个实施例中,在转化进展的同时可以连续地将reb M2从该介质中移除。在又一个实施例中,在完成反应之后从该反应介质中分离reb M2并且任选地进行纯化。

[0315] 可以通过任何适合的方法从反应介质中分离reb M2以提供包含reb M2的组合物。适合的方法包括但不限于,裂解、结晶、通过膜的分离、离心、提取(液相或固相)、色谱分离、HPLC(制备型或分析型)或此类方法的组合。在一个具体的实施例中,可以通过裂解和离心实现分离。

[0316] 在一些实施例中,分离可导致按干重计低于约95%的reb M2纯度,并且该组合物可含有例如甜菊醇糖苷和/或残余反应产物。

[0317] 可将该包含reb M2的组合物进一步纯化以提供高度纯化的reb M2,即,具有按干重计大于约95%的纯度的reb M2。在一些实施例中,可将这些包含reb M2的组合物进一步纯化以提供具有按干重计大于约96%、大于约97%、大于约98%或大于约99%的纯度的reb M2。

[0318] 纯化可以受到本领域技术人员已知的任何手段的影响,这些手段包括但不限于,结晶、通过膜的分离、离心、提取(液相或固相)、色谱分离、HPLC(制备型或分析型)或此类方法的组合。在一个具体的实施例中,使用HPLC来纯化reb M2。在一个更具体的实施例中,使用半制备型HPLC来纯化reb M2。

[0319] 例如,可以使用两步半制备型HPLC纯化。第一步利用C18柱,其中流动相含有A(水中的25%MeCN)和B(水中的30%MeCN),具有以下梯度:

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

[0321] 第二步利用相同的柱子和条件,不过仅仅具有一个等度流动相:水中的20%MeCN。

[0322] 本领域中技术人员将认识到,特定的柱子、流动相、注射体积和其他HPLC参数可以变化。

[0323] 按照本发明制备的纯化的甜菊醇糖苷可用于多种可消费产品中,包括但不限于食品、饮料、药物组合物、烟草产品、营养制品组合物、口腔卫生组合物和化妆品组合物。

[0324] 在本发明中获得的高纯度reb M具有1291.29的分子量,分子式为 $C_{56}H_{90}O_{33}$,CAS登记号为1220616-44-3,其结构呈现在图1中,其处于白色无味粉末的形式。当与10%蔗糖溶液相比较时,该化合物比糖甜约200倍。

[0325] 纯reb M化合物的其他性质包括,249°C-250°C的熔点和在50%乙醇中 $[\alpha]_D^{25}$ -19.0°的比旋光度(C=1.0)。reb M在水中的溶解度为大约0.3%,并且随着温度的增加而增加。

[0326] Reb M可溶于甲醇、乙醇、正丙醇、和异丙醇的稀释溶液中。然而,它不溶于丙酮、

苯、氯仿、和醚中。

[0327] 根据本发明获得的Reb M是热稳定的和pH稳定的。

[0328] 根据本发明获得的一种或多种高度纯化的靶糖苷,尤其是reb D、reb D2、reb M和/或reb M2可“按原样”使用,或与其他甜味剂、香料和食品成分及其组合进行组合使用。

[0329] 香料的非限制性实例包括但不限于,石灰、柠檬、柑橘、水果、香蕉、葡萄、梨、菠萝、芒果、浆果、苦杏仁、可乐、肉桂、糖、棉花糖、香草及其组合。

[0330] 其他食物成分的非限制性实例包括但不限于酸化剂、有机酸和氨基酸、着色剂、填充剂(bulking agent)、改性淀粉、树胶、组织改良剂、防腐剂、抗氧化剂、乳化剂、稳定剂、增稠剂、胶凝剂及其组合。

[0331] 根据本发明获得的一种或多种高度纯化的靶糖苷,特别是reb D、reb D2、reb M和/或reb M2,可以制备为各种多态形式,包括但不限于水合物、溶剂化物、无水形式、无定形形式和其组合。

[0332] 可将根据本发明获得的一种或多种高度纯化的靶甜菊醇糖苷,特别是reb D、reb D2、reb M和/或reb M2,作为高强度天然甜味剂掺入食品、饮料、药物组合物、化妆品、口香糖、桌面产品(table top product)、谷物、乳制品、牙膏和其他口腔组合物等中。

[0333] 一种或多种高度纯化的靶甜菊醇糖苷,特别是作为甜味化合物的reb D、reb D2、reb M和/或reb M2,可以作为唯一的甜味剂采用,或者可以彼此一起使用,或者与至少一种其他天然存在的高强度甜味剂一起使用,这些高强度甜味剂例如甜叶菊、甜叶菊提取物、甜菊单苷、甜菊双苷、甜菊苷、reb A、reb B、reb C、reb E、reb F、reb G、reb I、reb E、reb H、reb L、reb K、reb J、reb N、reb O、甜菊双苷、杜尔可苷A、杜尔可苷B、甜叶悬钩子苷、或发现于甜叶菊中的其他甜菊醇糖苷、罗汉果苷、布拉齐因(brazzein)、新橙皮苷二氢查耳酮、甘草酸及其盐、索马甜、紫苏萜、pernandulcin、无患子倍半萜苷、白云参苷、糙苏苷-I、二甲基-六氢苈-二羧酸、相思子苷(abrusoside)、巴西甘草甜素、肉花雪胆苷(carnosifloside)、青钱柳苷、蝶卡苷(pterocaryoside)、聚波朵苷(polypodoside)A、巴西木素、贺兰甜精(hernandulcin)、叶甜素(phyllodulcin)、菝葜苷、根皮苷、三叶苷、二氢黄酮醇、二氢槲皮素-3-乙酸酯、新落新妇苷(neoastilubin)、反式肉桂醛、莫那汀(monatin)及其盐、修蕨素A(selligueain A)、苏木精、应乐果甜蛋白(monellin)、欧亚水龙骨甜素、蝶卡苷A、蝶卡苷B、马槟榔甜蛋白、潘塔亭(pentadin)、神秘果蛋白、仙茅甜蛋白、宽叶仙茅甜蛋白(neoculin)、绿原酸、洋蓟酸、罗汉果甜味剂、罗汉果苷V、罗汉果苷VI、光果木鳖皂苷(grosmomomside)、赛门苷、或发现于罗汉果(Siraitia grosvenorii)中的其他罗汉果醇糖苷及其组合。

[0334] 在一个具体的实施例中,reb D2和/或reb M2可以与包含选自下组的化合物的甜味剂组合物一起使用,该组由以下各项组成:reb A、reb B、reb D、NSF-02、罗汉果苷V、罗汉果(Luo Han Guo)、阿洛酮糖、阿洛糖、D-塔格糖、赤藓糖醇及其组合。

[0335] 一种或多种高度纯化的靶甜菊醇糖苷,特别是reb D、reb D2、reb M和/或reb M2,还可以与合成的高强度甜味剂组合使用,这些合成的高强度甜味剂例如三氯蔗糖、乙酰磺胺酸钾、阿斯巴甜、阿力甜、糖精、新橙皮苷二氢查耳酮、甜蜜素、纽甜、甘素、对硝基苯基脲基丙酸钠(suosan)爱德万甜(advantame)、它们的盐,及其组合。

[0336] 而且,一种或多种高度纯化的靶甜菊醇糖苷,特别是reb D、reb D2、reb M和/或

reb M2,可与天然甜味剂抑制剂,例如匙羹藤酸、勿甜素、枣素(ziziphin)、拉克替醇(lactisole)等组合使用。reb D、reb D2、reb M和/或reb M2还可与各种鲜味增强剂组合。reb D、reb D2、reb M和/或reb M2可与鲜味和甜味氨基酸,例如谷氨酸盐、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、色氨酸及其组合相混合。

[0337] 一种或多种高度纯化的靶甜菊醇糖苷,特别是reb D、reb D2、reb M,可与选自下组的一种或多种添加剂组合使用,该组由以下各项组成:碳水化合物、多元醇、氨基酸及其相应的盐、聚氨基酸及其相应的盐、糖酸及其相应的盐、核苷酸、有机酸、无机酸、有机盐(包括有机酸盐和有机碱盐)、无机盐、苦味化合物、调味剂和调味成分、涩味化合物、蛋白质或蛋白质水解物、表面活性剂、乳化剂、类黄酮、醇类、聚合物及其组合。

[0338] 一种或多种高度纯化的靶甜菊醇糖苷特别是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”是指含有多于一个羟基的分子。多元醇可以是分别含有2、3、和4个羟基的二醇、三醇或四醇。多元醇还可含有多于四个的羟基,例如分别含有5、6、或7个羟基的戊醇、己醇、庚醇等等。另外,多元醇还可以是糖醇、多元醇、或聚合醇,它们是碳水化合物的还原形式,其中羰基(醛或酮、还原糖)已被还原为伯醇羟基或仲醇羟基。多元醇的实例包括但不限于,赤藓醇、麦芽糖醇、甘露醇、山梨醇、拉克替醇、木糖醇、肌醇、异麦芽酮糖醇、丙二醇、甘油、苏糖醇、半乳糖醇、氢化异麦芽酮糖、还原的异麦芽糖寡糖、还原的低聚木糖、还原的龙胆低聚糖、还原的麦芽糖浆、还原的葡萄糖浆、氢化的淀粉水解物、聚糖醇和糖醇或能够被还原的不会不利地影响甜味剂组合物的味道的任何其他碳水化合物。

[0339] 一种或多种高度纯化的靶甜菊醇糖苷,特别是reb D、reb D2、reb M和/或reb M2,可与降卡路里甜味剂组合,这些降卡路里甜味剂例如像D-塔格糖、L-糖、L-山梨糖、L-阿拉伯糖及其组合。

[0340] 一种或多种高度纯化的靶甜菊醇糖苷,特别是reb D、reb D2、reb M和/或reb M2,还可以与各种碳水化合物组合。术语“碳水化合物”通常是指经多个羟基取代的醛或酮化合物,具有通式 $(CH_2O)_n$,其中n为3-30,以及它们的低聚物和聚合物。另外,本发明的碳水化合物可在一个或多个位置被取代或去氧。如本文使用的碳水化合物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、和修饰的碳水化合物。如本文使用的,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。修饰的碳水化合物意指,其中至少一个原子已被添加、去除、或取代或其组合的任何碳水化合物。因此,碳水化合物衍生物或取代的碳水化合物包括取代和未取代的单糖、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的C-位置上被脱氧,和/或可被一个或多个部分取代,所述部分例如氢、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、二烷氨基、芳氨基、烷氧基、芳氧基、硝基、氰基、磺基、巯基、亚胺基、磺酰基、亚氧磺基、亚磺酰基、氨磺酰基、烷氧羰基、甲酰胺基、膦酰基(phosphonyl)、氧膦基(phosphinyl)、磷酰基、膦基、硫酯、硫醚、胍基、胍基、氨甲酰基、二氧磷基(phospho)、膦酸基(phosphonato)或任何其他活性官能团,只要该碳水化合物衍生物或取代的碳水化合物能够改善甜味剂组合物的甜味。

[0341] 可按照本发明使用的碳水化合物的实例包括但不限于,阿洛酮糖、松二糖、阿洛糖、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、塔洛糖、赤藓酮糖、木酮糖、阿洛酮糖、松二糖、纤维二糖、支链淀粉、葡糖胺、甘露糖胺、岩藻糖、葡糖醛酸、葡糖酸、葡糖酸内酯、阿比可糖、半乳糖胺、甜菜寡糖、异麦芽糖寡糖(异麦芽糖、异麦芽三糖、潘糖等)、低聚木糖(木三糖、木二糖等)、木糖末端寡糖(xylo-terminatedoligosaccharides)、龙胆低聚糖(龙胆二糖、龙胆三糖、龙胆四糖等)、山梨糖、黑曲霉寡糖、帕拉金糖寡糖、果糖寡聚体(蔗果三糖、霉菌赤藓醛糖等)、麦芽四醇(maltotetraol)、麦芽三醇(maltotriol)、麦芽低聚糖(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、异构化液体糖例如高果糖玉米糖浆、偶联糖和大豆寡糖。此外,本文中使用的碳水化合物可以为D或L构型。

[0342] 根据本发明获得的一种或多种高度纯化的靶甜菊醇糖苷,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。功能成分通常被分成多个种类,例如类胡萝卜素、膳食纤维、脂肪酸、皂苷、抗氧化剂、营养制品、类黄酮、异硫氰酸盐类、酚类、植物甾醇和甾烷醇(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/硫醇;氨基酸;蛋白质;维生素;和矿物质。功能成分还可基于它们的健康益处而分类,例如在心血管、降胆固醇、和抗炎方面的益处。示例性功能成分提供在WO 2013/096420中,将其内容通过引用特此结合。

[0343] 可将根据本发明获得的一种或多种高度纯化的靶甜菊醇糖苷,特别是reb D、reb D2、reb M和/或reb M2,作为高强度甜味剂用于生产零卡路里、降卡路里或糖尿病饮料和食品(具有改善的味道特征)。其还可用于饮料、食品、药物以及其中不能使用糖的其他产品。另外,一种或多种高度纯化的靶甜菊醇糖苷,特别是reb D、reb D2、reb M和/或reb M2,还可作为甜味剂,不仅可用于饮料、食品和专门用于人消费的其他产品,而且还可用于具有改善的特征的动物饲料和草料。

[0344] 其中可将一种或多种高度纯化的靶甜菊醇糖苷特别是reb D、reb D2、reb M和/或reb M2用作增甜化合物的可消费产品的实例包括但不限于,酒精性饮料例如伏特加酒、葡萄酒、啤酒、酒(liquor)和清酒(sake)等;天然汁;提神饮料;碳酸软饮料;减肥饮料;零卡路里饮料;降卡路里饮料和食品;酸奶饮料;速溶汁液(instant juices);速溶咖啡;粉末型速溶饮料;罐头产品;糖浆;发酵豆酱;酱油;醋;调味品;蛋黄酱;蕃茄酱;咖喱食品;汤;即时肉汤(instant bouillon);酱油粉;醋粉;各种类型的饼干;米饼;薄脆饼干(cracker);面包;巧克力;焦糖;糖果;口香糖;果冻;布丁;果脯及腌菜;鲜奶油;果酱;桔子酱;糖花膏(flower paste);奶粉;冰淇淋;冰糕;包装在瓶中的蔬菜和水果;水煮豆罐头(canned and boiled beans);甜酱中煮的肉类和食品;农业蔬菜食品;海产食品;火腿;香肠;鱼火腿;鱼香肠;鱼酱;炸鱼制品;干海产品;冷冻食品;腌制海藻(preserved seaweed);腌肉;烟草;药品;等等。原则上它可具有不受限制的应用。

[0345] 在产品例如食品、饮料、药物、化妆品、桌面产品(tabletopproduct)和口香糖的制造过程中,可使用常规方法例如混合、捏和、溶出、浸酸、渗透、渗滤、喷洒、雾化、灌注等方法。

[0346] 而且,在本发明中获得的一种或多种高度纯化的靶甜菊醇糖苷,特别是reb D、reb D2、reb M和/或reb M2,可以以干燥形式或液体形式使用。在一个实施例中,提供了包含reb

D2的桌面甜味剂(tabletop sweetener)。在另一个实施例中,提供了包含reb M2的桌面甜味剂。

[0347] 可在食品加热处理之前或之后添加高度纯化的靶甜菊醇糖苷。一种或多种高度纯化的靶甜菊醇糖苷特别是reb D、reb D2、reb M和/或reb M2的量取决于使用目的。如上所述,其可单独地添加,或与其他化合物组合地添加。

[0348] 本发明还针对使用reb D2和/或reb M2在饮料中进行甜味增强。相应地,本发明提供了包含甜味剂和作为甜味增强剂的reb D2和/或reb M2的饮料,其中reb D2和/或reb M2以处于它们的对应甜味识别阈值或该阈值之下的浓度存在。

[0349] 如本文中使用的,术语“甜味增强剂”是指能够增强或强化组合物例如饮料中的甜味的感知的化合物。术语“甜味增强剂”与术语“甜味道增效剂”、“甜味增效剂”、“甜味放大剂”和“甜味强化剂”是同义的。

[0350] 如本文中通常使用的术语“甜味识别阈值浓度”是可被人类味觉感知到的甜味化合物的最低已知浓度,典型地约1.0%蔗糖当量(1.0%SE)。通常,当在给定甜味增强剂的甜味识别阈值浓度或该甜味识别阈值浓度之下存在时,甜味增强剂可以增强或加强甜味剂的甜味而通过它们自身并不提供任何显著的甜味;然而,当甜味增强剂处于它们的甜味识别阈值浓度之上时,它们自身可提供甜味。甜味识别阈值浓度对于特定的增强剂是特异性的并且可基于饮料基质而变化。通过给定增强剂在给定饮料基质中直到大于1.0%蔗糖当量的渐增浓度的味道测试,可以容易地确定甜味识别阈值浓度。提供约1.0%的蔗糖当量的浓度被视为甜味识别阈值。

[0351] 在一些实施例中,甜味剂在饮料中以按重量计从约0.5%到到约12%,例如像,按重量计约1.0%、按重量计约1.5%、按重量计约2.0%、按重量计约2.5%、按重量计约3.0%、按重量计约3.5%、按重量计约4.0%、按重量计约4.5%、按重量计约5.0%、按重量计约5.5%、按重量计约6.0%、按重量计约6.5%、按重量计约7.0%、按重量计约7.5%、按重量计约8.0%、按重量计约8.5%、按重量计约9.0%、按重量计约9.5%、按重量计约10.0%、按重量计约10.5%、按重量计约11.0%、按重量计约11.5%或按重量计约12.0%的量存在。

[0352] 在一个具体的实施例中,甜味剂在饮料中以按重量计从0.5%到约10%,例如像,从约2%到约8%、从约3%到约7%或从约4%到约6%的量存在。在一个具体的实施例中,甜味剂在饮料中以按重量计约0.5%到约8%的量存在。在另一个具体的实施例中,甜味剂在饮料中以按重量计从约2%到约8%的量存在。

[0353] 在一个实施例中,甜味剂是传统的卡路里甜味剂。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。

[0354] 在另一个实施例中,甜味剂是赤藓糖醇。

[0355] 在再另一个实施例中,甜味剂是稀有糖。适合的稀有糖包括但不限于,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(arbinose)、D-松二糖、D-明串珠菌二糖(D-leucrose)及其组合。

[0356] 预期甜味剂可以单独使用,或者可以与其他甜味剂组合使用。

[0357] 在一个实施例中,稀有糖是D-阿洛糖。在一个更具体的实施例中,D-阿洛糖在饮料中以按重量计约0.5%到约10%,例如像从约2%到8%的量存在。

[0358] 在另一个实施例中,稀有糖是D-阿洛酮糖。在一个更具体的实施例中,D-阿洛酮糖在饮料中以按重量计约0.5%到约10%,例如像从约2%到8%的量存在。

[0359] 在再另一个实施例中,稀有糖是D-核糖。在一个更具体的实施例中,D-核糖在饮料中以按重量计约0.5%到约10%,例如像从约2%到8%的量存在。

[0360] 在又另一个实施例中,稀有糖是D-塔格糖。在一个更具体的实施例中,D-塔格糖在饮料中以按重量计约0.5%到约10%,例如像从约2%到8%的量存在。

[0361] 在一个另外的实施例中,稀有糖是L-葡萄糖。在一个更具体的实施例中,L-葡萄糖在饮料中以按重量计约0.5%到约10%,例如像从约2%到8%的量存在。

[0362] 在一个实施例中,稀有糖是L-岩藻糖。在一个更具体的实施例中,L-岩藻糖在饮料中以按重量计约0.5%到约10%,例如像从约2%到8%的量存在。

[0363] 在另一个实施例中,稀有糖是L-阿拉伯糖。在一个更具体的实施例中,L-阿拉伯糖在饮料中以按重量计约0.5%到约10%,例如像从约2%到8%的量存在。

[0364] 在又另一个实施例中,稀有糖是D-松二糖。在一个更具体的实施例中,D-松二糖在饮料中以按重量计约0.5%到约10%,例如像从约2%到8%的量存在。

[0365] 在又另一个实施例中,稀有糖是D-明串珠菌二糖。在一个更具体的实施例中,D-明串珠菌二糖在饮料中以按重量计约0.5%到约10%,例如像从约2%到8%的量存在。

[0366] 与不存在甜味增强剂时的相应饮料相比较,以其甜味识别阈值或低于它的浓度添加甜味增强剂增加了包含该甜味剂和该甜味增强剂的饮料的检测的蔗糖当量。而且,在不存在任何甜味剂的情况下,甜味可以按大于含有相同浓度的至少一种甜味增强剂的溶液的可检测甜味的量增加。

[0367] 相应地,本发明还提供了用于增强包含甜味剂的饮料的甜味的方法,该方法包括提供包含甜味剂的饮料并且添加选自reb D2、reb M2或其组合的甜味增强剂,其中reb D2和reb M2以其甜味识别阈值或低于其甜味识别阈值的浓度存在。

[0368] 以其甜味识别阈值或低于其甜味识别阈值的浓度向含有甜味剂的饮料中添加reb D2和/或reb M2可以按从约1.0%到约5.0%,例如像,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%增加检测的蔗糖当量。

[0369] 以下实例展示了用于制备一种或多种高度纯化的靶甜菊醇糖苷,特别是reb D、reb D2、reb M和/或reb M2的本发明的优选实施例。应当理解,本发明并不限于在这些实例中的材料、比例、条件和程序,它们仅仅是说明性的。

[0370] 实例1

[0371] UGT76G1的体内产生

[0372] 将NcoI和NdeI限制性位点添加至描述于Genbank登录号AAR06912.1中的原始核酸序列。在密码子优化之后,获得了下列核酸序列:

[0373] CCATGGCCCATATGGAACAAAACCGAAACCACCGTTCGTCGTCGTCGCCGTATTATTCTGTTTCCG
GTTCCGTTTCAGGGTCATATTAATCCGATTCTGCAGCTGGCAAATGTGCTGTATAGCAAAGTTTTAGCATTACCA
TTTTTCATACCAATTTTAACAAACCGAAAACCGCAATTATCCGCATTTTACCTTTCGCTTTATTCTGGATAATGA
TCCGCAGGATGAACGCATTAGCAATCTGCCGACACATGGTCCGCTGGCAGGTATGCGTATTCCGATTATTAACGAA
CATGGTGCAGATGAACTGCGTCGTGAACCTGGAACCTGCTGATGCTGGCAAGCGAAGAAGATGAAGAAGTTAGCTGTC
TGATTACCGATGCACTGTGGTATTTGCACAGAGCGTTGCAGATAGCCTGAATCTGCGTCGTCGTTCTGATGAC

CAGCAGCCTGTTTAACTTTCATGCACATGTTAGCCTGCCGCAGTTTGTGAACTGGGTTATCTGGATCCGGATGAT
AAAACCCGTCTGGAAGAACAGGCAAGCGTTTTCCGATGCTGAAAGTGAAAGATATCAAAGCGCCTATAGCAATT
GGCAGATTCTGAAAGAAATTCTGGGCAAATGATTAACAGACCAAAGCAAGCAGCGGTGTTATTTGGAATAGCTT
TAAAGAACTGGAAGAAAAGCGAACTGGAACCGTGATTTCGTGAAATTCGGCACCAGCTTTCTGATTCCGCTGCCG
AAACATCTGACCGCAAGCAGCAGCAGCCTGCTGGATCATGATCGTACCGTTTTTCAGTGGCTGGATCAGCAGCCTC
CGAGCAGCGTTCTGTATGTTAGCTTTGGTAGCACCAGCGAAGTTGATGAAAAAGATTTTCTGGAATGCCCCGTGG
TCTGGTTGATAGCAAACAGAGCTTTCTGTGGGTTGTTTCGTCCGGTTTTGTTAAAGGTAGCACCTGGGTTGAACCG
CTGCCGGATGGTTTTCTGGGTGAACGTGGTCGTATTGTTAAATGGGTTCCGCAGCAAGAAGTTCTGGCACACGGCG
CAATTGGTGCATTTTGGACCCATAGCGGTTGGAATAGCACCTGGAAAGCGTTTGTGAAGGTGTTCCGATGATTTT
TAGCGATTTTGGTCTGGATCAGCCGCTGAATGCACGTTATATGAGTGATGTTCTGAAAGTGGGTGTGTATCTGGAA
AATGGTTGGGAACGTGGTGAAATTGCAAATGCAATTCGTTCGTGTTATGGTGGATGAAGAAGGTGAATATATTCGTC
AGAATGCCCGTGTCTGAAACAGAAAGCAGATGTTAGCCTGATGAAAGGTGGTAGCAGCTATGAAAGCCTGGAAG
TCTGGTTAGCTATATTAGCAGCCTGTAATAACTCGAG (SEQ ID NO:1)。

[0374] 在合成基因并将该基因利用NdeI和XhoI克隆位点亚克隆到pET30a+载体之后,通过电穿孔将UGT76G1_pET30a+质粒引入到大肠杆菌B121 (DE3) 和大肠杆菌EC100中。将获得的细胞在卡那霉素存在的情况下培养在培养皿中,并选择适当的菌落,并让其在液体LB培养基(埃伦迈尔烧瓶)中生长。将甘油作为冷冻保护剂添加到悬浮液中并且将400μL的等分试样在-20℃和在-80℃下储存。

[0375] 将含有pET30a+_UGT76G1质粒的大肠杆菌BL21 (DE3) 的贮存等分试样解冻,并添加至30mL的LBGKP培养基(20g/L Luria Broth Lennox;50mM PIPES缓冲液pH 7.00;50mM磷酸盐缓冲液pH 7.00;2.5g/L葡萄糖和50mg/L卡那霉素)。在135rpm振摇下在30℃进行此培养持续8h。

[0376] 该生产培养基含有60g/L的过夜快速表达TB培养基(Novagen公司)、10g/L的甘油和50mg/L的卡那霉素。将该培养基在20℃搅拌,同时取样品测量OD和pH。培养物产生显著的生长并获得了良好的OD。40小时后,通过离心收获细胞,并将其冷冻,以产生12.7g的细胞湿重。

[0377] 通过添加Bugbuster母混合物(Novagen公司)进行裂解,并通过离心回收裂解物,且保持冷冻。对解冻的裂解物进行活性测试。

[0378] 实例2

[0379] UGT76G1的体外产生

[0380] 使用来自普洛麦格(Promega)的S30 T7高产率蛋白质表达系统试剂盒。将4μg的来自大肠杆菌EC100的UGT76G1_pET30a+质粒与80μL的S30预混物plus混合,并且添加72μL的S30 T7提取物。添加不含核酸酶的水以获得200μL的总体积,并将所得的溶液在30℃孵育2h。将180μL用于催化测试反应。

[0381] 实例3

[0382] UGT91D2的体外产生

[0383] 将NcoI和NdeI限制性位点添加至描述于Genbank登录号ACE87855.1中的原始核酸序列。在密码子优化之后,获得了下列核酸序列:

[0384] CCATGGCACATATGGCAACCAGCGATAGCATTGTTGATGATCGTAAACAGCTGCATGTTGCAACCTTT

CCGTGGCTGGCATTGTTGGTCATATTCTGCCGTATCTGCAGCTGAGCAAAGTATTGCAGAAAAAGGTCATAAAGTGA
GCTTTCTGAGCACCACCCGTAATATTCAGCGTCTGAGCAGCCATATTAGTCCGCTGATTAATGTTGTTTCAGCTGAC
CCTGCCTCGTGTTC AAGAACTGCCGGAAGATGCCGAAGCAACCACCGATGTTTCATCCGGAAGATATTCGGTATCTG
AAAAAAGCAAGTGATGGTCTGCAGCCGGAAGTTACCCGTTTTCTGGAACAGCATAGTCCGGATTGGATCATCTATG
ATTATAACCATTATTGGCTGCCGAGCATTGCAGCAAGCCTGGGTATTAGCCGTGCACATTTTAGCGTTACCACCCC
GTGGGCAATTGCATATATGGGTCCGAGCGCAGATGCAATGATTAATGGTAGTGATGGTTCGTACCACCGTTGAAGAT
CTGACCACCCCTCCGAAATGGTTTTCCGTTTTCCGACCAAAGTTTTGTTGGCGTAAACATGATCTGGCAGCTCTGGTTC
CGTATAAAGCACCGGTATTAGTGATGGTTATCGTATGGGTCTGGTTCTGAAAGGTAGCGATTGTCTGCTGAGCAA
ATGCTATCATGAATTTGGCACCCAGTGGCTGCCGCTGCTGGAAACCCTGCATCAGGTTCCGGTTGTTCCGGTGGGT
CTGCTGCCTCCGGAAGTTCCGGGTGATGAAAAAGATGAAACCTGGGTAGCATCAAAAAATGGCTGGATGGTAAAC
AGAAAGGTAGCGTGGTTTTATGTTGCACTGGGTAGCGAAGTTCTGGTTAGCCAGACCGAAGTTGTTGAACTGGCACT
GGGTCTGGAAGTGGTCTGCCGTTTTGTTGGGCATATCGTAAACCGAAAGTCCGGCAAAAAGCGATAGCGTT
GAACTGCCGGATGGTTTTGTTGAACGTACCCGTGATCGTGGTCTGGTTTTGGACCAGCTGGGCACCTCAGCTGCGTA
TTCTGAGCCATGAAAGCGTTTTGTTGTTTTCTGACCCATTGTGGTAGCGGTAGCATTGTGGAAGGTCTGATGTTTGG
TCATCCGCTGATTATGCTGCCGATTTTTGGTGATCAGCCGCTGAATGCACGTCTGCTGGAAGATAAACAGGTTGGT
ATTGAAATTCGCGTAATGAAGAAGATGGTTGCCTGACCAAAGAAAGCGTTGCACGTAGCCTGCGTAGCGTTGTTG
TTGAAAAAGAAGGCGAAATCTATAAAGCCAATGCACGTGAACTGAGCAAAAATCTATAATGATACCAAAGTGGAAAA
AGAATATGTGAGCCAGTTCGTGGATTATCTGGAAAAAACACCCGTGCAGTTGCCATTGATCACGAAAGCTAATGA
CTCGAG (SEQ ID NO:2)

[0385] 在合成基因并将该基因利用NcoI和XhoI克隆位点亚克隆到pET30A+载体之后,通过电穿孔将UGT91D2_pET30a+质粒引入到大肠杆菌EC100中。将获得的细胞在卡那霉素存在的情况下培养,选择适当的菌落,让其在液体LB培养基(埃伦迈尔烧瓶)中生长。将甘油作为冷冻保护剂添加到悬浮液中并且将400 μ L的等分试样在-20 $^{\circ}$ C和在-80 $^{\circ}$ C下储存。

[0386] 将来自普洛麦格的S30 T7高产率蛋白质表达系统试剂盒用于蛋白质的体外合成。

[0387] 将4 μ g的UGT91D2_pET30a+质粒与80 μ L的S30预混物plus混合,并且添加72 μ L的S30 T7提取物。添加不含核酸酶的水以获得200 μ L的总体积,并将所得的溶液在30 $^{\circ}$ C孵育2h。5 μ L用于SDS-PAGE分析,而剩余45 μ L用于催化测试反应中。

[0388] 实例4

[0389] 具有体内产生的UGT76G1的催化反应

[0390] 反应总体积为5.0mL,具有下列组成:50mM磷酸钠缓冲液pH 7.2、3mM MgCl₂、2.5mM UDP-葡萄糖、0.5mM甜菊苷和500 μ L的UGT76G1解冻裂解物。在30 $^{\circ}$ C在轨道摇床上在135rpm下运行反应。对于每个样品,用40 μ L的2N H₂SO₄和420 μ L的甲醇/水(6/4)将460 μ L的反应混合物淬灭。立即将样品离心并在10 $^{\circ}$ C下维持,之后通过HPLC(CAD)进行分析。HPLC指示甜菊苷几乎完全转化为莱鲍迪昔A(图4)。

[0391] 实例5

[0392] 具有体外产生的UGT91D2的催化反应

[0393] 反应总体积为0.5mL,具有下列组成:50mM磷酸钠缓冲液pH 7.2、3mM MgCl₂、3.8mM UDP-葡萄糖、0.1mM莱鲍迪昔A和180 μ L的体外产生的UGT91D2。在30 $^{\circ}$ C在轨道摇床上在135rpm下运行反应。对于每个样品,用45 μ L的2N H₂SO₄和405 μ L的60%MeOH将450 μ L的反应混

合物淬灭。离心后,通过HPLC (CAD) 分析上清液。HPLC指示在120h之后4.7%的莱鲍迪昔A转化为莱鲍迪昔D。

[0394] 实例6

[0395] 具有体外产生的UGT76G1的催化反应

[0396] 反应总体积为2mL,具有下列组成:50mM磷酸钠缓冲液pH 7.2、3mM $MgCl_2$ 、3.8mM UDP-葡萄糖、0.5mM莱鲍迪昔D和180 μ L的体外产生的UGT76G1。在30 $^{\circ}C$ 在轨道摇床上在135rpm下运行反应。对于每个样品,用40 μ L的2N H_2SO_4 和360 μ L的60%MeOH将400 μ L的反应混合物淬灭。离心后,通过HPLC (CAD) 分析上清液。HPLC指示在120h之后80%的莱鲍迪昔D转化为莱鲍迪昔M(图5)。

[0397] 对于实施例7到12,使用了以下缩写:

[0398] LBGKP培养基:20g/L Luria Broth Lennox;50mM PIPES缓冲液pH 7.00;50mM磷酸盐缓冲液pH 7.00;2.5g/L葡萄糖和50mg/L的卡那霉素或氨苄青霉素LB培养基:(20g/L Luria Broth Lennox)

[0399] 实例7

[0400] 通过pET30a+质粒和BL21 (DE3) 表达菌株制备的UGT76G1的制备和活性

[0401] 将pET30a+_UGT76G1质粒转化到BL21 (DE3) 表达菌株中(Lucigen E. Cloni[®] EXPRESS电感受态细胞)。使获得的细胞在卡那霉素的存在下在培养皿中的LB琼脂培养基上生长。选择适合的菌落,并使其在含有卡那霉素的液体LBGKP培养基中生长。添加甘油并且将400 μ L的等分试样在-20 $^{\circ}C$ 和在-80 $^{\circ}C$ 下储存。

[0402] 将储存等分试样解冻并添加到30mL的LBGKP培养基中。在30 $^{\circ}C$ 振摇下将该培养进行8h,随后将其用于接种400mL的含60g/L的“过夜快速表达TB培养基”(Novagen公司,参考71491-5)、10g/L的甘油和50mg/L的卡那霉素的生产培养基。将该培养基在20 $^{\circ}C$ 搅拌,同时取样品测量OD (600nm) 和pH。40小时后,通过离心收获细胞,并将其冷冻。获得的细胞湿重为10.58g。

[0403] 通过添加8.1mL的“Bugbuster母混合物”(Novagen公司,参考71456)和3.5mL的水将3.24g获得的沉淀裂解。通过离心回收裂解物并保持冷冻。

[0404] 实例8

[0405] 通过pET30a+质粒和Tuner (DE3) 表达菌株制备的UGT76G1的制备和活性

[0406] 通过热激处理将pET30a+_UGT76G1质粒转化到Tuner (DE3) 表达菌株(Novagen Tuner[™] (DE3) 感受态细胞)中。使获得的细胞在卡那霉素的存在下在培养皿中的LB琼脂培养基上生长。选择适合的菌落,并使其在含有卡那霉素的液体LBGKP培养基中生长。添加甘油并且将400 μ L的等分试样在-20 $^{\circ}C$ 和在-80 $^{\circ}C$ 下储存。

[0407] 将储存等分试样解冻并添加到100mL的含有50mg/L卡那霉素的LB培养基中。在30 $^{\circ}C$ 振摇下进行此培养持续15h。4.4mL的该培养物用来接种200mL含有LB的生产培养基。在37 $^{\circ}C$ 搅拌该培养基直至获得0.9的OD (600nm),随后添加400 μ L的100mM IPTG溶液,并在30 $^{\circ}C$ 搅拌该培养基4小时。通过离心收获细胞,并将其冷冻。获得的细胞湿重为1.38g。

[0408] 通过添加4.9mL的“Bugbuster母混合物”(Novagen公司,参考71456)和2.1mL的水将获得的沉淀裂解。通过离心回收裂解物并保持冷冻。

[0409] 实例9

[0410] 通过pMAL质粒和BL21表达菌株制备的UGT76G1的制备和活性

[0411] 使用Nde1和Sal1克隆位点将合成的UGT76G1基因亚克隆到pMAL质粒后,通过热激处理将pMAL_UGT76G1质粒转化到BL21表达菌株(New England Biolabs BL21感受态大肠杆菌)中。使获得的细胞在氨苄青霉素的存在下在培养皿中的LB琼脂培养基上生长。选择适合的菌落,并使其在含有氨苄青霉素的液体LBGKP培养基中生长。添加甘油并且将400 μ L的等分试样在-20 $^{\circ}$ C和在-80 $^{\circ}$ C下储存。

[0412] 将储存等分试样解冻并添加到30mL的LBGKP培养基中。在30 $^{\circ}$ C振摇下将该培养进行8h,随后将其用于接种400mL的含60g/L的“过夜快速表达TB培养基”(Novagen公司,参考71491-5)、10g/L的甘油和50mg/L的氨苄青霉素的生产培养基。将该培养基在20 $^{\circ}$ C搅拌,同时取样品测量OD和pH。40小时后,通过离心收获细胞,并将其冷冻。获得的细胞湿重为5.86g。

[0413] 通过添加9.6mL的“Bugbuster母混合物”(Novagen公司,参考71456)和4.1mL的水将2.74g获得的沉淀裂解。通过离心回收裂解物并保持冷冻。

[0414] 实例10

[0415] 通过pMAL质粒和ArcticExpress表达菌株制备的UGT76G1的制备和活性

[0416] 通过热激处理将pMAL_UGT76G1质粒转化到ArcticExpress表达菌株(安捷伦(Agilent)ArcticExpress感受态细胞)中。使获得的细胞在氨苄青霉素和遗传霉素的存在下在培养皿中的LB琼脂培养基上生长。选择适合的菌落,并使其在含有氨苄青霉素和遗传霉素的液体LBGKP培养基中生长。添加甘油并且将400 μ L的等分试样在-20 $^{\circ}$ C和在-80 $^{\circ}$ C下储存。

[0417] 将储存等分试样解冻并添加到30mL的LBGKP培养基(含有氨苄青霉素和遗传霉素)中。在30 $^{\circ}$ C振摇下将该培养进行8h,随后将其用于接种400mL的含60g/L的“过夜快速表达TB培养基”(Novagen公司,参考71491-5)、10g/L的甘油和50mg/L的氨苄青霉素的生产培养基。将该培养基在12 $^{\circ}$ C搅拌,同时取样品测量OD(600nm)和pH。68小时后,通过离心收获细胞,并将其冷冻。获得的细胞湿重为8.96g。

[0418] 通过添加8.73mL的“Bugbuster母混合物”(Novagen公司,参考71456)和3.79mL的水将2.47g获得的沉淀裂解。通过离心回收裂解物并保持冷冻。

[0419] 实例11

[0420] 通过pCOLDIII质粒和ArcticExpress表达菌株制备的UGT76G1的制备和活性

[0421] 使用Nde1和Xho1克隆位点将合成的UGT76G1基因亚克隆入pCOLDIII质粒后,通过热激处理将pCOLDIII_UGT76G1质粒转化到ArcticExpress表达菌株(安捷伦ArcticExpress感受态细胞)中。使获得的细胞在氨苄青霉素和遗传霉素的存在下在培养皿中的LB琼脂培养基上生长。选择适合的菌落,并使其在含有氨苄青霉素和遗传霉素的液体LBGKP培养基中生长。添加甘油并且将400 μ L的等分试样在-20 $^{\circ}$ C和在-80 $^{\circ}$ C下储存。

[0422] 将储存等分试样解冻并添加到30mL的LBGKP培养基(含有氨苄青霉素和遗传霉素)中。在30 $^{\circ}$ C振摇下将该培养进行8h,随后将其用于接种400mL的含60g/L的“过夜快速表达TB培养基”(Novagen公司,参考71491-5)、10g/L的甘油和50mg/L的卡那霉素的生产培养基。将该培养基在12 $^{\circ}$ C搅拌,同时取样品测量OD(600nm)和pH。63小时后,通过离心收获细胞,并将其冷冻。获得的细胞湿重为6.54g。

[0423] 通过添加9.8mL的“Bugbuster母混合物”(Novagen公司,参考71456)和4.2mL的水将2.81g获得的沉淀裂解。通过离心回收裂解物并保持冷冻。

[0424] 实例12

[0425] 通过pCOLDIII质粒和Origami2 (DE3) 表达菌株制备的UGT76G1的制备和活性

[0426] 通过热激处理将pCOLDIII_UGT76G1质粒转化到Origami2 (DE3) 表达菌株 (Novagen OrigamiTM2 (DE3) 感受态细胞) 中。使获得的细胞在氨苄青霉素的存在下在培养皿中的LB琼脂培养基上生长。选择适合的菌落,并使其在含有氨苄青霉素的液体LBGKP培养基中生长。添加甘油并且将400 μ L的等分试样在-20 $^{\circ}$ C和在-80 $^{\circ}$ C下储存。

[0427] 将储存等分试样解冻并添加到30mL的LBGKP培养基(含有氨苄青霉素)中。在30 $^{\circ}$ C振摇下将该培养进行8h,随后将其用于接种400mL的含60g/L的“过夜快速表达TB培养基”(Novagen公司,参考71491-5)、10g/L的甘油和50mg/L的卡那霉素的生产培养基。将该培养基在12 $^{\circ}$ C搅拌,同时取样品测量OD(600nm)和pH。68小时后,通过离心收获细胞,并将其冷冻。获得的细胞湿重为2.53g。

[0428] 通过添加6.0mL的“Bugbuster母混合物”(Novagen公司,参考71456)和1.9mL的水将1.71g获得的沉淀裂解。通过离心回收裂解物并保持冷冻。

[0429] 实例13

[0430] 活性测定

[0431] 使用在pH 7.2的50mM磷酸钠缓冲液中的0.5mM的底物、2.5mM的UDP-葡萄糖和3mM MgCl₂,利用500 μ L解冻裂解物,以5mL规模进行关于甜菊苷至莱鲍迪苷A以及莱鲍迪苷D至莱鲍迪苷M的转化的活性测试。取得样品并通过HPLC进行分析。UGT76G1的不同制备结果概括在下表中。

	实例	质粒	表达菌株	转化活性*	
				甜菊苷至莱鲍迪苷 A	莱鲍迪苷 D 至莱鲍迪苷 M
[0432]	7	pET30a+	BL21 (DE3)	29 U mL ⁻¹	0.31 U mL ⁻¹
	8	pET30a+	Tuner (DE3)	33 U mL ⁻¹	0.40 U mL ⁻¹
	9	pMAL	BL21	20 U mL ⁻¹	0.15 U mL ⁻¹
	10	pMAL	ArticExpress	15 U mL ⁻¹	0.25 U mL ⁻¹
[0433]	11	pCOLDIII	ArticExpress	15 U mL ⁻¹	0.11 U mL ⁻¹
	12	pCOLDIII	Origami2 (DE3)	37 U mL ⁻¹	0.20 U mL ⁻¹

[0434] *注释

[0435] 甜菊苷和莱鲍迪苷M的转化活性是对于每mL的裂解物提及的。1U即为在30 $^{\circ}$ C和pH 7.2下在1小时内转化1 μ mol的底物。

[0436] 实例14

[0437] 对于莱鲍迪苷D到莱鲍迪苷M的转化的50mL规模的反应

[0438] 使用5mL的实例12的裂解物进行在50mL规模上的莱鲍迪昔D到鲍迪昔M的转化。反应介质由50mM磷酸钠缓冲液pH 7.2、3mM的MgCl₂、2.5mM的UDP-葡萄糖和0.5mM的莱鲍迪昔D组成。在30℃振摇下进行此反应90小时之后,添加50mL的乙醇,并且将所得混合物在-20℃下搅拌1小时。在以5000g离心10分钟之后,经由超滤(Vivaflow MWC0 30000)将上清液纯化。获得78mL的渗透物,将9mL的渗余物用9mL的乙醇稀释并再进行超滤(Vivaflow MWC0 30000)。获得另一份14mL的滤液,将其与第一次的渗透物合并。将合并的渗透物在30℃在减压下浓缩,直到获得32mL的澄清溶液。

[0439] 产物混合物的HPLC轨迹显示在图3中。在配备有二元泵、自动进样器、和恒温柱箱的安捷伦1200系列上进行HPLC。该方法是等度的,其中流动相由70%水(0.1%甲酸):30%乙腈组成。流速是0.1μL/min。使用的柱子为菲罗门(Phenomenex)Prodigy 5μODS(3)100A;250x 2mm。柱温维持在40℃。注射体积为20-40μL。

[0440] 分离在31.325分钟处洗脱的物质。通过HPLC、¹H NMR和HRMS与已知的reb M标准品比较,证实该物质为reb M。

[0441] 实例15

[0442] 使用pMAL质粒和BL21表达菌株制备UGT91D2

[0443] 使用Nde1和Sal1克隆位点将合成的UGT91D2基因亚克隆到pMAL质粒中后,通过热激处理将pMAL_UGT91D2质粒转化到BL21表达菌株(New England Biolabs BL21感受态大肠杆菌)中。使获得的细胞在氨苄青霉素的存在下在培养皿中的LB琼脂培养基上生长。选择适合的菌落,并使其在含有氨苄青霉素的液体LBGKP培养基中生长。添加甘油并且将400μL的等分试样在-20℃和在-80℃下储存。

[0444] 将储存等分试样解冻并添加到30mL的LBGKP培养基中。在30℃振摇下将该培养进行8h,随后将其用于接种400mL的含60g/L的“过夜快速表达TB培养基”(Novagen公司,参考71491-5)、10g/L的甘油和50mg/L的氨苄青霉素的生产培养基。将该培养基在20℃搅拌,同时取样品测量OD和pH。40小时后,通过离心收获细胞,并将其冷冻。获得的细胞湿重为12.32g。

[0445] 通过添加7.7mL的“Bugbuster母混合物”(Novagen公司,参考71456)和3.2mL的水将2.18g获得的沉淀裂解。通过离心回收裂解物并且直接将其用于活性测试。

[0446] 实例16

[0447] 使用pMAL质粒和ArcticExpress表达菌株制备UGT91D2

[0448] 通过热激处理将pMAL_UGT91D2质粒转化到ArcticExpress表达菌株(安捷伦ArcticExpress感受态细胞)中。使获得的细胞在氨苄青霉素和遗传霉素的存在下在培养皿中的LB琼脂培养基上生长。选择适合的菌落,并使其在含有氨苄青霉素和遗传霉素的液体LBGKP培养基中生长。添加甘油并且将400μL的等分试样在-20℃和在-80℃下储存。

[0449] 将储存等分试样解冻并添加到30mL的LBGKP培养基(含有氨苄青霉素和遗传霉素)中。在30℃振摇下将该培养进行8h,随后将其用于接种400mL的含60g/L的“过夜快速表达TB培养基”(Novagen公司,参考71491-5)、10g/L的甘油和50mg/L的氨苄青霉素的生产培养基。将该培养基在20℃搅拌16小时,然后在12℃另外搅拌50小时,同时取样品测量OD(600nm)和pH。通过离心收获细胞,并将其冷冻。获得的细胞湿重为15.77g。

[0450] 通过添加9.0mL的“Bugbuster母混合物”(Novagen公司,参考71456)和3.8mL的水

将2.57g获得的沉淀裂解。通过离心回收裂解物并且直接将其用于活性测试。

[0451] 实例17

[0452] 使用pET30a+质粒和Tuner (DE3) 表达菌株制备UGT91D2

[0453] 通过热激处理将pET30a+_UGT91D2质粒转化到Tuner (DE3) 表达菌株 (Novagen Tuner™ (DE3) 感受态细胞) 中。使获得的细胞在卡那霉素的存在下在培养皿中的LB琼脂培养基上生长。选择适合的菌落,并使其在液体LBGKP培养基(含有卡那霉素)中生长。添加甘油并且将400μL的等分试样在-20℃和在-80℃下储存。

[0454] 将储存等分试样解冻并添加到100mL的含有50mg/L卡那霉素的LB培养基中。在30℃振摇下进行此培养持续15h。6.2mL的该培养物用来接种500mL含有LB的生产培养基。在37℃搅拌该培养基直至获得0.9的OD (600nm),随后添加500μL的100mM IPTG溶液(培养基中的IPTG浓度为100μM),并在30℃搅拌培养基4小时,通过离心收获细胞,并将其冷冻。获得的细胞湿重为4.02g。

[0455] 通过添加6.8mL的“Bugbuster母混合物”(Novagen公司,参考71456)和2.8mL的水将1.92g获得的沉淀裂解。通过离心回收裂解物并且直接将其进行活性测试。

[0456] 实例18

[0457] 使用pET30a+质粒和ArcticExpress表达菌株制备UGT91D2

[0458] 通过热激处理将pET30a+_UGT91D2质粒转化到ArcticExpress (DE3) 表达菌株 (安捷伦ArcticExpress感受态细胞) 中。使获得的细胞在卡那霉素和遗传霉素的存在下在培养皿中的LB琼脂培养基上生长。选择适合的菌落,并使其在含有卡那霉素和遗传霉素的液体LBGKP培养基中生长。添加甘油并且将400μL的等分试样在-20℃和在-80℃下储存。

[0459] 将储存等分试样解冻并添加到30mL的LBGKP培养基(含有卡那霉素和遗传霉素)中。在30℃振摇下将该培养进行8h,随后将其用于接种400mL的含60g/L的“过夜快速表达TB培养基”(Novagen公司,参考71491-5)、10g/L的甘油和50mg/L的氨苄青霉素的生产培养基。将该培养基在20℃搅拌16小时,然后在12℃另外搅拌50小时,同时取样品测量OD (600nm) 和pH。60小时后,通过离心收获细胞,并将其冷冻。获得的细胞湿重为16.07g。

[0460] 通过添加11.4mL的“Bugbuster母混合物”(Novagen公司,参考71456)和4.8mL的水将3.24g获得的沉淀裂解。通过离心回收裂解物并且直接将其用于活性测试。

[0461] 实例19

[0462] UGT91D2的体内制剂的活性测定

[0463] 使用在pH 7.2的50mM磷酸钠缓冲液中的0.5mM底物、2.5mM的UDP-葡萄糖和3mM的MgCl₂,利用1000μL的裂解物,以5mL规模进行关于甜叶悬钩子苷至甜菊苷的转化的活性测试。取得样品并通过HPLC进行分析。UGT91D2的不同制备结果概括在下表中。

实例	质粒	表达菌株	转化活性*
			甜叶悬钩子苷至甜菊苷
[0464] 15	pMAL	BL21	9 mU mL ⁻¹
16	pMAL	ArcticExpress	60 mU mL ⁻¹
17	pET30a+	Tuner (DE3)	28 mU mL ⁻¹
18	pET30a+	ArcticExpress (DE3)	21 mU mL ⁻¹

[0465] *注释:以每mL的裂解物提及活性。1U即为在30°C和pH 7.2下在1小时内转化1 μ mol的底物。

[0466] 实例20

[0467] 用于将莱鲍迪昔A转化为莱鲍迪昔D的其他酶

[0468] 从公用数据库中鉴定了下列UDP-葡萄糖基转移酶的基因,通过DNA2.0合成,并且随后亚克隆到pET30a+载体中。

微量培 养板	位置	基因名称	内标	转化 RebA 到 RebD
[0469] C908201	A1	gi115454819_NP_001051010.1	S115N01 A1	活性的
C908201	G2	gi187373030_ACD03249.1	S115N01 G2	活性的
C908201	A7	gi460409128_XP_004249992.1	S115N05 A7	活性的
C912666	E1	gi222619587_EEE55719.1	S115N06 E1	活性的
C912666	C2	gi297795735_XP_002865752.1	S115N06 C2	活性的

[0470] 氨基酸序列如下:

[0471] >gi|115454819|ref|NP_001051010.1|0s03g0702500[粳稻亚种]

[0472] MDDAHSSQSPLHVVIFPWLAFGHLLPCLDLAERLAARGHRVSFVSTPRNLARLPPVRPELAELVDLVALPLPRVDGLPDGAEATSDVPPDFKELHRKAFDGLAAPFSAFLDTACAGGKRPDWVLADLMHHWVALASQERGVPCAMILPCSAAVVASSAPPTTESSADQREAI VRSMGTAAPSFEAKRATEEFATEGASGVSIMTRYSLTLQRSKLVAMRSCPELEPGAFTILTRFYGKPVVPPFGLLPPRPDGARGVSKNGKHDAIMQWLDAQPAKSVVYVALGSEAPMSADLLRELAHGLDLAGTRFLWAMRKPAGVDADSVLPAGFLGRTGERGLVTRWAPQVSI LAHAAVCAFLTHCGWGSVVEGLQFGHPLIMLPILGDQGPNARILEGRKLGAVPRNDEDGSFDRGGVAGAVRAVVVEEGKTFANARKLQEI VADREREERCIDFVQHLT SWNELKNNSDGQYP (SEQ ID NO:3)。

[0473] >gi|187373030|gb|ACD03249.1|UDP-糖基转移酶[糙伏毛燕麦]

[0474] MAVKDEQQSPLHILLFPFLAPGHLIPIADMAALFASRGVRCITLTPVNAAIIRSAVDRANDAFRGSDCPAIDISVVPFPDVLPPGVENGAL TSPADRLKFFQAVAELREPFDRFLADNHPDAVSDSFFHWSTDAAAEHGV PRLGFLGSSMFAGSCNESTLHNNPLETAADDPDALVSLPGLPHRVELRRSQMMDPKKRPDHWALLESVNAADQKSF

GEVFNFSHELEPDYVEHYQTTLGRRTWL VGPVALASKDMAGRGSTSARSPDADSCLRWLDTKQPGSVVYVSFGTLI
RFSPAELHELARGLDL SGKNFVWVLGRAGPDSSEWMPQGFADLITPRGDRGFI IRGWAPQMLILNHRALGGFVTHC
GWNSTLESVSAGVPMVTWPRFADQFQNEKLIVEVLKVGVSIGAKDYGSGIENHDVIRGEVIAESIGKLMGSSEESD
AIQRKAKDLGAEARS AVENGGSSYNDVGRLMDELMARRSSVKVGEDI IPTNDGL (SEQ ID NO:4)。

[0475] >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]

[0476] MSPKLHKELFFHSLYKTRSNHTMATLKVLMFPFLAYGHI SPYLNVAKKLADRGLIYFCSTPINLKS
TIEKIPEKYADSIHLIELHLPQLPHYHTTNGLPNLNQVLQKALKMSKPNFSKILQNLKPDVLIYDILQRWA
KHVANEQNIPAVKLLTSGAAVFSYFFNVLKPKGVEFPFPGIYLRKIEQVRLSEMMSKSDKEKELEDDDDDDLLVD
GNMQIMLMSTSRITIEAKYIDFCTALTNWKVVPVGPVQDLITNDVDDMELIDWLGTKDENSTVFSFGSEYFLSKE
DMEEVAFALELSNVNFIWVARFPKGEERNLEDALPKGFLEIRIGRGRVLDKFAQPRIILNHPSTGGFISHCGWNSA
MESIDFGVPIIAMPMLDQPMNARLIVELGVAIVEVRDDDGKIHRGEIAETLKGVITGKTGEKLRKVRDISKNLK
TIRDEEMDAAAEEELIQLCRNGN (SEQ ID NO:5)。

[0477] >gi|222619587|gb|EEE55719.1|假设蛋白OsJ_04191[粳稻亚种]

[0478] MHVVMLPWLAFGHILPFAEFAKRVARQHRVTLFSTPRNTRRLIDVPPSLAGRIRVVDIPLPRVEHLP
EHAEATIDLPSNDRPYLRRAYDEAFSRELSRLLQETGPSRPDWVLADYAAWAPAAAASRHGVPCAFSLFGAAAL
CFFGPAETLQGRGPYAKTEPAHLTAVPEYVPFPTTVAFRGNEARELFKPSLIPDESGVSES YRFSQSIEGCQLVAV
RSNQEFEPWELELLGELYQKPVIPIGMFP PPPQDVAGHEETLRWLD RQEPNSVVYAAF GSEVKLTAEQLQRIALG
LEASELPFIWAFRAPPDAGDGDGLPGGFKERVNGRGVVCRGWVPQVKFLAHASVGGFLTHAGWNSIAEGLANGVRL
VLLPLMFEQGLNARQLAEKKVAVEVARDEDDGSFAANDIVDALRRVMVGEEDGDFGVKVKELAKVFGDDEVNDRYV
RDFLKCLSEYKMQRQG (SEQ ID NO:6)。

[0479] >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]

[0480] MDDKKEEVMHIAMFPWLAMGHLLPFLRLSKLLAQKGHKISFISTPRNLRPLKPSNLSSSITFVSFP
LPSISGLPPSESSMDVPYKQQLKAAFDLLQPPLTEFLRLSSPDWIIYDYASHWLPSIAKELGISKAFFSLFNA
ATLCFMGPSSSLIEESRSTPEDFTVPPVWVFPKSTIVFRYHEVSRYVEKTDEDVTGVSDSVRFGYTIDGSDAVFVR
SCPEFEPEWFSLLQDLYRKPVPFPIGFLPPVIEDDDDDTTWVRIKEWLDKQRVNSVVYVSLGTEASLRREELTELAL
GLEKSETPFFWVLRNEPQIPDGFEERVKGRGMVHVGVVQVKILSHESVGGFLTHCGWNSVVEGIGFGKVPIFLPV
LNEQGLNTRLLQGKGLGVEVLRDERDGSFGSDSVADSVRLVMIDDAGEEIREKVKLMKGLFGNMDENIRYVDELVG
FMRNDESSQLKEEEEDDCSDDQSSEVSSETDEKELNLDLKEEKRRISVYKSLSSSEFDDYVANEKMG (SEQ ID
NO:7)。

[0481] 测试的质粒被接收在微量滴定板中,该微量滴定板在每个单独的孔中含有作为冻
干固体的质粒。

[0482] 质粒悬液。向每个孔中添加24μL的超纯无菌水,并且在室温下将该微量滴定板振
摇30分钟。随后,将该板在4℃下孵育1小时。通过上下吹打进一步混合每个孔的内容物。使
用1μL的悬液通过Qubit2.0分析进行质粒定量。测定的质粒的量为:

[0483]

微量滴定板	位置	内标	[质粒]ng/μL
C908201	A1	S115N01 A1	32.8
C908201	G2	S115N01 G2	41.0

C908201	A7	S115N05 A7	56.6
C912666	E1	S115N06 E1	64.0
C912666	C2	S115N06 C2	31.4

[0484] 用质粒转化感受态细胞。从处于-80℃的冰箱中取得化学感受态EC100细胞的等分试样,并将其储存在冰上。使细胞在冰上解冻10分钟。将10μL的上述质粒溶液的稀释物添加到1.5mL的无菌微型管(为了用50pg的DNA转化每个细胞)中并在冰上储存。向每个微型管中加入100μL的化学感受态细胞。在冰上孵育化学感受态细胞质粒混合物持续20min之后,在42℃进行热击30秒。

[0485] 在冰上进行进一步孵育持续2分钟。向每个微型管加入300μL的SOC培养基,并将所得混合物转移到15mL的无菌管中。在37℃在135rpm振摇下孵育1小时之后,将混合物涂布在含有卡那霉素50μg/mL的固体Luria肉汤培养基上。将培养皿在37℃孵育16小时。

[0486] 在甘油中的储备溶液的制备和质粒的纯化。向50mL的无菌离心管(Falcon Tube)中加入10mL的含有50μg/mL卡那霉素的Luria肉汤培养基。将该培养基接种从上述培养皿中分离的菌落,并允许培养物在37℃在135rpm振摇下孵育16小时。

[0487] 向含有300μL的60%无菌甘油溶液的1.5mL的无菌微型管中加入600μL的培养物。将储备溶液在-80℃下储存。

[0488] 将培养物的剩余部分在5,525g下在10℃离心10分钟,并且在移除上清液之后,将沉淀储存在冰上。根据凯杰(Qiagen)Qiaprep Spin Miniprep试剂盒(参考:27106)纯化产生的质粒,并在260nm测量质粒产率。将质粒溶液在4℃下储存。质粒的量确定如下:

微量滴定板	位置	测试的内标	[质粒]ng/μL
C908201	A1	S115N01 A1	115.7
C908201	G2	S115N01 G2	120.4
C908201	A7	S115N05 A7	293.8
C912666	E1	S115N06 E1	126.1
C912666	C2	S115N06 C2	98.8

[0490] 酶的体外表达。18μL的质粒溶液(含有大约1.5μg的质粒)用于根据普洛麦格S30 T7高产率蛋白质表达系统(High-Yield Protein Expression System(参考:L1110))试剂盒的体外表达。表达培养基产生如下:

	S30预混物Plus	T7 S30提取物	总计
试验	30μL	27μL	57μL
参考	20μL	18μL	38μL

[0492] 将制备的表达培养基混合物添加到质粒溶液中,并将该溶液在30℃孵育3小时,同时每45分钟将该混合物混合一次。将5μL的混合物冷冻,而剩余物用于将莱鲍迪昔A转化为莱鲍迪昔D的催化测试。

[0493] 莱鲍迪昔A转化为莱鲍迪昔D的催化测试。将含有0.5mM莱鲍迪昔A、3mM MgCl₂、50mM磷酸盐缓冲液(pH 7.2)和2.5mM UDP-葡萄糖的430μL的反应混合物添加到1.5mL的无菌微型管中。添加52μL的酶表达培养基,并允许所得混合物在30℃反应24小时。在2小时、16小时和24小时之后取125μL的样品,并将其添加到115μL的60%甲醇和10μL的2N H₂SO₄中。将淬灭的样品在18,000g在室温下离心2分钟。将200μL转移到HPLC瓶并进行分析。

[0494] HPLC分析如下进行HPLC测定：

[0495] 设备

装备	供应商	参考	批号
依利特 (Elite)	日立 (Hitachi)	L-2130	NA
光电二极管阵列 (Photodiode Array)	日立 (Hitachi)	L-2455	NA
科罗纳 (Corona) CAD 检测器	ESA	70-6186A	CO-2044
注射器 (Injector) 100 μ L	日立 (Hitachi)		NA
Column Synergy 4u Hydro-RP 80A (250 x 4.60 mm)	菲罗门	00G-4375- E0	588582-1 2

[0496] 仪器条件

柱温	55°C
检测	UV 205nm; bw 400 nm CAD 检测
分析持续时间	15 min
注射体积	10 μ L
流速	1 mL/min

[0497] 流动相梯度程序

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

[0500] 酶S115N05 A7对于Reb A到Reb D的转化具有最高的活性(大约22.4%)。至少三种酶产生了显著量的未知糖苷(标记为Reb UNK;随后鉴定为reb D2)连同reb D。在约4.5分钟处的未知峰随后被鉴定为reb M2。

[0501] HPLC测定结果提供如下：

酶内标	在反应混合物中的甜菊醇糖苷转化 (面积%)		
	Reb D (保留时间约 5.8 分钟)	Reb UNK (保留时间约 6.7 分钟)	Reb A (保留时间约 9.1 分钟)
[0503] S115N01 A1	2.1	ND	96.7
S115N01 G2	0.6	ND	99.4
S115N05 A7	22.4	23.3	46.7
S115N06 E1	0.14	7.0	92.8
S115N06 C2	0.28	3.9	95.8

[0504] 实例21

[0505] 体外产生的EUGT11的活性

[0506] 通过DNA2.0合成了描述于W0/2013/022989A2中的EUGT11基因,并且随后亚克隆到pET30a+载体中。

微量培养板	位置	GI 号	版本	内标	转化 RebA 到 RebD
[0507] C912666	G4	41469452	AAS07253.1	S115N08 G4	活性的

[0508] 氨基酸序列如下:

[0509] >gi|41469452|gb|AAS07253.1|假定UDP-葡糖醛酸基和UDP-葡萄糖基转移酶[粳稻亚种]EUGT11酶,来自专利申请W0/2013/022989 A2

[0510] MHVVICPLLAFGHLLPCLDLAQLACGHRVSFVSTPRNISRLPPVRPSLAPLVSFVALPLPRVEGLPN
GAESTHNVP HDRPDMVELHLRAFDGLAAPFSEFLGTACADWVMTSSAPRQTLSSNIHRNSSRPGTPAPSGRLLCP
ITPHSNTLERA AEKLVRRSRQNARARSLAFTSPPLPYRDVFRSLLGLQMGRKQLNIAHETNGRRGTGLPLNLCRW
MWKQRRCGKLRPSDVEFNTRSNEAISPIGASLVNLQSIQSPNPRAVLPIASSGVRAVFIGRARTSTPTPPHAKPA
RSAAPRAHRPPSSVMDSGYSSSYAAAAGMHVVICPWLAFGHLLPCLDLAQLASRGHRVSFVSTPRNISRLPPVRP
ALAPLVAFVALPLPRVEGLPDGAESTNDVPHDRPDMVELHRRAFDGLAAPFSEFLGTACADWVIVDVFHHWAAAAA
LEHKVPCAMMLLGS AHMIAS IADRRLEAETESPAAGQGRPAAAPT FEVARMKL IRTKGSSGMSLAERFSLTL SR
SSLVVG RSCVEFEPETVPLLSTLRGKPI TFLGLMPPLHEGRREDGEDATVRWLD AQPASV VYVALGSEVPLGVEK
VHELALGLELAGTRFLWALRKPTGVSDADLLPAGFEERTRGRGVVATRWPQMSILAHAAVGAF LTHCGWNSTIEG
LMFGHPLIMLP IFGDQGP NARL IEAKNAGLQVARNDGDG SFDREGVAAAIRAVAVEEESKVFQAKAKKLQEIVAD
MACHERYIDGFIQQLRSYKD (SEQ ID NO:8)。

[0511] 测试的质粒被接收在微量滴定板中,该微量滴定板在单独的孔中含有作为冻干固体的质粒。

[0512] 质粒悬液向孔中添加24μL的超纯无菌水,并且在室温下将该微量滴定板振摇30分钟。随后,将该板在4℃下孵育1小时。通过上下吹打进一步混合孔的内容物。使用1μL的悬液通过Qubit2.0分析进行质粒定量。质粒的量确定如下:

[0513]	微量滴定板	位置	测试的内标	[质粒] ng/ μ L
	C912666	G4	S115N08 G4	19.2

[0514] 用质粒转化感受态细胞。从处于 -80°C 的冰箱中取得化学感受态EC100细胞的等分试样,并将其储存在冰上。使细胞在冰上解冻10分钟。将 $10\mu\text{L}$ 的上述质粒溶液的稀释物添加到 1.5mL 的无菌微型管(为了用 50pg 的DNA转化每个细胞)中并在冰上储存。向微型管中加入 $100\mu\text{L}$ 的化学感受态细胞。在冰上孵育化学感受态细胞/质粒混合物持续20min之后,在 42°C 进行热击30秒。

[0515] 在冰上进行进一步孵育持续2分钟。向微型管加入 $300\mu\text{L}$ 的SOC培养基,并将所得混合物转移到 15mL 的无菌管中。在 37°C 在 135rpm 振摇下孵育1小时之后,将混合物涂布在含有卡那霉素 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 的固体Luria肉汤培养基上。将培养皿在 37°C 孵育16小时。

[0516] 在甘油中的储备溶液的制备和质粒的纯化。向 50mL 的无菌离心管(Falcon Tube)中加入 10mL 的含有 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的Luria肉汤培养基。将该培养基接种从上述培养皿中分离的菌落,并允许培养物在 37°C 在 135rpm 振摇下孵育16小时。

[0517] 向含有 $300\mu\text{L}$ 的60%无菌甘油溶液的 1.5mL 的无菌微型管中加入 $600\mu\text{L}$ 的培养物。将储备溶液在 -80°C 下储存。

[0518] 将培养物的剩余部分在 $5,525\text{g}$ 下在 10°C 离心10分钟,并且在移除上清液之后,将沉淀储存在冰上。根据凯杰(Qiagen)Qiaprep Spin Miniprep试剂盒(参考:27106)纯化产生的质粒,并在 260nm 测量质粒产率。将质粒溶液在 4°C 下储存。质粒的量确定如下:

[0519]	微量滴定板	位置	测试的内标	[质粒] ng/ μ L
	C912666	G4	S115N08 G4	38.4

[0520] EUGT11的体外表达 $18\mu\text{L}$ 的稀释的质粒溶液(含有大约 $1.5\mu\text{g}$ 的质粒)用于根据普洛麦格S30 T7高产率蛋白质表达系统(High-Yield Protein Expression System(参考:L1110))试剂盒的体外表达。表达培养基产生如下:

[0521]		S30预混物Plus	T7 S30提取物	DNA模板	总计
	试验	$30\mu\text{L}$	$27\mu\text{L}$	$18\mu\text{L}$ (约 $1.5\mu\text{g}$)	$75\mu\text{L}$
	参考	$20\mu\text{L}$	$18\mu\text{L}$	$12\mu\text{L}$ (约 $1.0\mu\text{g}$)	$50\mu\text{L}$

[0522] 将制备的表达培养基混合物添加到质粒溶液中,并将该溶液在 30°C 孵育3小时,同时每45分钟将该混合物混合一次。将 $5\mu\text{L}$ 的混合物冷冻,而剩余物用于将莱鲍迪昔A转化为莱鲍迪昔D的催化测试。

[0523] 莱鲍迪昔A转化为莱鲍迪昔D的催化测试。将含有 0.5mM 莱鲍迪昔A、 3mM MgCl_2 、 50mM 磷酸盐缓冲液(pH 7.2)和 2.5mM UDP-葡萄糖的 $430\mu\text{L}$ 的反应混合物添加到 1.5mL 的无菌微型管中。添加 $52\mu\text{L}$ 的酶表达培养基,并允许所得混合物在 30°C 反应24小时。在2小时、16小时和24小时之后取 $125\mu\text{L}$ 的样品,并将其添加到 $115\mu\text{L}$ 的60%甲醇和 $10\mu\text{L}$ 的 2N H_2SO_4 中。将淬灭的样品在 $18,000\text{g}$ 在室温下离心2分钟。将 $200\mu\text{L}$ 转移到HPLC瓶并进行分析。

[0524] HPLC分析。如在实例20中所述,进行HPLC测定。

[0525] HPLC测定结果提供如下:

[0526]	化合物	保留时间	积分(面积)
	莱鲍迪昔D	5.797	54,654,810

莱鲍迪昔A	9.157	633,926,835
总计		688,581,645

[0527] 实例22

[0528] 酶的体内产生

[0529] 在体内产生实例20中描述的酶。

[0530] 通过热激将含有相应于该酶的基因的pET30A+载体引入到大肠杆菌BL21 (DE3) 中。将获得的细胞在卡那霉素存在的情况下培养在培养皿中, 并且选择适当的菌落, 并让其在液体LB培养基 (埃伦迈尔烧瓶) 中生长。将甘油作为冷冻保护剂添加到悬液中并且将400 μ L的等分试样在-20 $^{\circ}$ C和在-80 $^{\circ}$ C下储存。

[0531] 将含有pET30A+_UGT质粒的大肠杆菌BL21 (DE3) 的贮存等分试样解冻, 并添加至30mL的LBGKP培养基 (20g/L Luria Broth Lennox; 50mM PIPES缓冲液pH 7.00; 50mM磷酸盐缓冲液pH 7.00; 2.5g/L葡萄糖和50mg/L卡那霉素)。在135rpm振动下在30 $^{\circ}$ C进行此培养8小时。

[0532] 该生产培养基含有60g/L的过夜快速表达TB培养基 (Novagen公司)、10g/L的甘油和50mg/L的卡那霉素。将预培养物添加到400mL的该培养基中并且将该溶液在20 $^{\circ}$ C搅拌, 同时取样品测量OD和pH。培养物产生显著的生长并获得了良好的OD。40小时后, 通过离心收获细胞, 并将其冷冻。在下文提及下列细胞湿重 (CWW) 的产率。

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

[0534] 通过添加Bugbuster母混合物 (Novagen公司) 进行裂解, 并通过离心回收裂解物, 且趁新鲜使用。

[0535] 活性测定。使用在pH 7.2的50mM磷酸钠缓冲液中的0.5mM底物、2.5mM的UDP-葡萄糖和3mM的MgCl₂, 利用1,000 μ L解冻的裂解物, 以5mL规模进行关于莱鲍迪昔A的转化的活性测试。取得样品并通过HPLC进行分析。

[0536] HPLC分析。如在实例20中所述, 进行HPLC测定。

[0537] 对于不同酶的结果提供如下。

GI号	版本	在45小时后的转化	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%	未检测到Reb D
297795735	XP_002865752.1	0.0%	未检测到Reb D

[0539] HPLC分析还显示了两个未知峰。在约4.5分钟处的峰随后被鉴定为reb M2。在约7.6分钟处的峰随后被鉴定为reb D2。

[0540] 实例23

[0541] 糖苷的鉴定

[0542] 另外,通过LC-MS测定了代表实例20(下文的S115N05A7)和实例22(下文的S129N04)的GI号460409128的反应混合物,以便鉴定未知的糖苷。使用与安捷伦(Agilent) 6110A MSD连接并且接合“LC/MSD Chemstation”软件的装备有二元泵(G1312B)、自动进样器(G1367D)、恒温柱箱(G1316B)、DAD检测器(G1315C)的安捷伦1200系列HPLC系统。

[0543] 仪器条件

[0544]	柱	菲罗门 Kinetex 2.6u C18 100A, 4.6 mm x 150 mm, 2.6 μm
	柱温	55°C
	检测	在 210 nm 带宽 360nm 的 DAD

[0545]		MSD (扫描和 SIM 模式) 模式: ES-API, 负极性 干燥气体流速: 13.0 L/min 喷雾器压力: 30 psig 干燥气体温度: 270°C
	分析持续时间	25 min
	注射体积	2 μL
	流速	1 mL/min

[0546] 流动相梯度程序

[0547]	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

[0548] 在LCMS系统上在3.5分钟处观察到的化合物相对于实例20和22中在约4.5分钟处的未知峰。LCMS数据表明,这种化合物在其结构中具有六个糖苷残基(C₅₆H₉₀O₃₃),并且发现其为reb M的异构体形式,即reb M2(参见实例40中的论述)。

[0549] 在LCMS系统上在7.6分钟处观察到的化合物相对于实例20和22中在约7.6分钟处的未知峰。LCMS数据表明,这种化合物在其结构中具有五个糖苷残基(C₅₀H₈₀O₂₈),并且发现其为reb D的异构体形式,即reb D2(参见实例39中的论述)。这些化合物的比率提供如下。

样品	在反应混合物中的甜菊醇糖苷转化 (面积%)			
	未知@RT3.5	Reb D	未知@RT7.6	Reb A
[0550] S115N05A7	6.47	20.35	19.93	53.24
S129N04	6.05	23.73	21.22	49.00

[0551] 实例24

[0552] 糖苷的鉴定

[0553] 另外,通过LC-MS测定代表实例22(下文的S129N04)的GI号460409128的反应混合物连同由谱赛科(PureCircle) Sdn Bhd(马来西亚)生产的甜叶菊叶提取物“MLD1”,以确定S129N04糖苷在自然界中的存在。

[0554] 测定显示,在实例23中在LCMS系统上在3.5分钟处观察到的化合物($C_{56}H_{90}O_{33}$;随后证实为reb M2)、以及在实例23中在LCMS系统上在7.6分钟处观察到的化合物($C_{50}H_{80}O_{28}$;reb UNK;随后证实为reb D2)在甜叶菊植物提取物中存在。

[0555] 实例25

[0556] 莱鲍迪昔E到莱鲍迪昔D的转化

[0557] 反应总体积为5.0mL,具有下列组成:100mM磷酸钾缓冲液pH 7.5、3mM $MgCl_2$ 、2.5mM UDP-葡萄糖、0.5mM莱鲍迪昔E和500 μ L的解冻的UGT76G1裂解物,UGT76G1基因克隆到pET30a+载体中并且在大肠杆菌BL21(DE3)中表达。在30 $^{\circ}$ C在轨道摇床上在135rpm下进行反应。对于取样,用30 μ L的2N H_2SO_4 和270 μ L的甲醇/水(6/4)将300 μ L的反应混合物淬灭。立即将样品离心并在10 $^{\circ}$ C下维持,之后通过HPLC(CAD检测)进行分析。获得了相应于莱鲍迪昔E到莱鲍迪昔D的完全转化的下列反应曲线。

[0558] 实例26

[0559] 用于莱鲍迪昔D到莱鲍迪昔M的转化的UGT76G1的定向演化

[0560] 从如描述于Genbank(AAR06912.1)中的UGT76G1的氨基酸序列开始,鉴定了在各个氨基酸位置处的不同突变,这些突变可改变用于莱鲍迪昔D(Reb D)到莱鲍迪昔M(Reb M)的转化的酶的活性。通过DNA2.0 ProteinGPSTM策略设计的突变的这个清单随后用于合成96个变体基因,这些变体基因含有针对在大肠杆菌中表达经密码子优化的这些突变中的3个、4个或5个。这些基因被亚克隆到pET30a+质粒中并且用于转化大肠杆菌BL21(DE3)化学感受态细胞。使获得的细胞在卡那霉素的存在下在培养皿中在固体LB琼脂培养基上生长。选择适合的菌落,并使其在试管中的液体LB培养基中生长。将甘油作为冷冻保护剂添加到悬液中并且将400 μ L的等分试样在-20 $^{\circ}$ C和在-80 $^{\circ}$ C下储存。

[0561] 将含有pET30a+_UGT76G1var质粒的大肠杆菌BL21(DE3)的这些贮存等分试样解冻,并将其添加至LBGKP培养基(20g/L Luria Broth Lennox;50mM PIPES缓冲液pH 7.00;50mM磷酸盐缓冲液pH 7.00;2.5g/L葡萄糖和50mg/L卡那霉素)。在135rpm在30 $^{\circ}$ C下,在振摇下在96微量滴定板中进行此培养持续8h。

[0562] 用50 μ L的上述培养物接种含有60g/L的过夜快速表达TB培养基(Overnight ExpressTM Instant TB medium)(Novagen[®])、10g/L的甘油和50mg/L的卡那霉素的3.95mL的生产培养基。在20 $^{\circ}$ C在48深孔板中搅拌所得培养物。培养物产生显著的生长并获得了良

好的OD (600nm; 1cm)。44小时后,通过离心收获细胞,并将其冷冻。

[0563] 通过向解冻的细胞添加 Bugbuster® 母混合物 (Novagen®) 进行裂解,并通过离心回收裂解物。用100µL的新鲜裂解物进行活性测试,该裂解物被添加到在50mM磷酸盐缓冲液 (pH 7.2) 中的莱鲍迪昔D (终浓度0.5mM)、MgCl₂ (终浓度3mM) 和UDP-葡萄糖 (终浓度2.5mM) 的溶液中。

[0564] 使反应在30℃下进行,并且在2、4、7和24小时之后取样。为了通过HPLC (CAD检测) 确定转化和初始速率,使用上述的用于莱鲍迪昔D到莱鲍迪昔M的转化的分析方法。结果描绘于下表中。

克隆	突变*	在 24 小时 之后 Reb D 到 Reb M 的转化 (%)	初始速率 (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

[0566]

克隆	突变*	在 24 小时 之后 Reb D 到 Reb M 的转化 (%)	初始速率 (Reb M 面积 /min)
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
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

[0567]

克隆	突变*	在 24 小时 之后 Reb D 到 Reb M 的转化 (%)	初始速率 (Reb M 面积 /min)
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

[0568]

克隆	突变*	在 24 小时 之后 Reb D 到 Reb M 的转化 (%)	初始速率 (Reb M 面积 /min)
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
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

克隆	突变*	在 24 小时 之后 Reb D 到 Reb M 的转化 (%)	初始速率 (Reb M 面积 /min)
[0569] 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

[0570] *突变标注如下:原始氨基酸-位置-新的氨基酸:例如在位置33处的丙氨酸突变为甘氨酸被标注为A33G。

[0571] 实例27

[0572] UGTSL2的体内产生

[0573] UGTSL2 (GI_460410132/XP_004250485.1) 氨基酸序列:

[0574] MATNLRVLMFPWLAYGHISPFNLIAKQLADRGFLIYLCSTRINLESIIKKIPEKYADSIHLIELQLPELPELPPHYHTTNGLPPLNPTLHKALKMSKPNFSRILQNLKPDLLIYDVLQPWAEHVANEQNIPAGKLLTSCAAVFSYFFSFRKNPGVEFPFPAIHLPEVEKVKIREILAKEPEEGRLDEGNKQMLMCTSRTIEAKYIDYCTELCNWKVV PVGPPFQDLITNDADNKELIDWLGTKHENSTVFVSGSEYFLSKEDMEEVAFLELSNVNFIWVARFPKGEERNLE DALPKGFLERIGERGRVLDKFAQPRLNHPSTGGFISHCGWNSAMESIDFGVPIIAMP IHNDQPINAKLMVELGV AVEIVRDDDGIHRGEIAETLKS SVTGETGEILRAKVREISKNLKSIRDEEMDAVAEELIQLCRNSNKS (SEQ ID NO:9)。

[0575] 通过热激将含有UGTSL2基因的pET30A+载体引入到大肠杆菌B121 (DE3) 中。将获得的细胞在卡那霉素存在的情况下培养在培养皿中,并选择适当的菌落,并让其在液体LB培养基(埃伦迈尔烧瓶)中生长。将甘油作为冷冻保护剂添加到悬液中并且将400 μ L的等分试样在-20 $^{\circ}$ C和在-80 $^{\circ}$ C下储存。

[0576] 将含有pET30A+_UGTSL2质粒的大肠杆菌BL21 (DE3) 的贮存等分试样解冻,并将其添加至30mL的LBGKP培养基(20g/L Luria Broth Lennox;50mM PIPES缓冲液pH 7.00;50mM 磷酸盐缓冲液pH 7.00;2.5g/L葡萄糖和50mg/L卡那霉素)。在135rpm振摇下在30 $^{\circ}$ C进行此培养持续8h。

[0577] 该生产培养基含有60g/L的过夜快速表达TB培养基(Novagen公司)、10g/L的甘油和50mg/L的卡那霉素。将预培养物添加到200mL的该培养基中并且将该溶液在20 $^{\circ}$ C搅拌,同时取样品测量OD和pH。培养物产生显著的生长并获得了良好的OD。40小时后,通过离心收获细胞,将其冷冻,获得6.22g的细胞湿重。

[0578] 通过在1.4g的细胞上添加Bugbuster母混合物 (Novagen公司) 进行裂解,并通过离心回收裂解物,且趁新鲜使用。

[0579] 实例28

[0580] 关于用UGTSL和UGTSL2将甜菊苷转化为莱鲍迪苷E的活性的测定

[0581] 根据实例22制备UGTSL,并根据实例27制备UGTSL2。

[0582] 使用在pH 7.2的50mM磷酸钠缓冲液中的0.5mM底物、2.5mM的UDP-葡萄糖和3mM的MgCl₂,利用600μL的裂解物,以3mL规模进行关于甜菊苷的转化的活性测试。取得样品并通过HPLC进行分析。HPLC分析。如在实例20中所述,进行HPLC测定。

[0583] 对于不同酶的结果和相应的色谱图提供如下。

酶内标	GI 号	版本	甜菊苷转化 ¹ (反应时间)	莱鲍迪苷 E 形成 ¹
[0584] UGTSL	460409128	XP_004249992.1	74% (22 h.)	46%
UGTSL2	460410132	XP_004250485.1	77% (2 h.)	50%

[0585] 注释:¹基于甜菊苷的初始浓度

[0586] 实例29

[0587] 关于用UGTSL和UGTSL2将甜叶悬钩子苷转化为莱鲍迪苷E的活性的测定

[0588] 根据实例22制备UGTSL,并根据实例27制备UGTSL2。

[0589] 使用在pH 7.2的50mM磷酸钠缓冲液中的0.5mM底物、2.5mM的UDP-葡萄糖和3mM的MgCl₂,利用600μL的裂解物,以3mL规模进行关于甜叶悬钩子苷的转化的活性测试。取得样品并通过HPLC进行分析。如在实例20中所述,进行HPLC测定。

[0590] 对于不同酶的结果和相应的色谱图提供如下。

酶内标	GI 号	版本	甜叶悬钩子苷转 化 ¹ (反应时间)	莱鲍迪苷 E 形成 ¹
[0591] UGTSL	460409128	XP_004249992.1	70% (45 h.)	27%
UGTSL2	460410132	XP_004250485.1	80% (2 h.)	55%

[0592] 注释:¹基于甜叶悬钩子苷的初始浓度

[0593] 实例30

[0594] 关于用UGTSL2将莱鲍迪苷A转化为莱鲍迪苷D的活性的测定

[0595] 根据实例27制备UGTSL2。

[0596] 使用在pH 7.2的50mM磷酸钠缓冲液中的0.5mM底物、2.5mM的UDP-葡萄糖和3mM的MgCl₂,利用60μL的裂解物,以3mL规模进行关于莱鲍迪苷A的转化的活性测试。取得样品并通过HPLC进行分析。如在实例20中所述,进行HPLC测定。

[0597] 在反应23小时之后的结果提供如下。

[0598]	酶内标	GI 号	版本	莱鲍迪苷 A 转化 ¹ (反应时间)	莱鲍迪苷 D 形成 ¹
	UGTSL2	460410132	XP_004250485.1	78% (23 h.)	75%

[0599] 注释:¹基于莱鲍迪苷A的初始浓度

[0600] 实例31

[0601] 糖苷的鉴定

[0602] 通过LC-MS分析根据实例30制备并且孵育45小时的反应混合物、连同由谱赛科 (PureCircle) Sdn Bhd (马来西亚) 生产的甜叶菊叶提取物“MLD1”, 以便确定形成的未知糖苷 (约4.5分钟、约6.7分钟、约7.0分钟、约7.3分钟和约7.7分钟) 在自然界中的存在。

[0603] 使用与安捷伦 (Agilent) 6110A MSD连接并且接合“LC/MSD Chemstation”软件的装备有二元泵 (G1312B)、自动进样器 (G1367D)、恒温柱箱 (G1316B)、DAD检测器 (G1315C) 的安捷伦1200系列HPLC系统。

[0604] 仪器条件

[0605]	柱	菲罗门 Prodigy 3u C18 100A, 4.6 mm x 250 mm, 3 μm
	柱温	55°C
	检测	在 210 nm 带宽 360nm 的 DAD MSD (扫描和 SIM 模式) 模式: ES-API, 负极性 干燥气体流速: 13.0 L/min 喷雾器压力: 30 psig 干燥气体温度: 270°C
	分析持续时间	75 min
	注射体积	10 μL
	流速	0.5 mL/min

[0606] 流动相梯度程序

[0607]	时间 (min)	A (%) : 甲酸0.1%	B (%) : 乙腈
	0	75	25
	30	75	25
	33	68	32
	75	68	32

[0608] 测定显示, 在LC-MS系统上在11.77分钟处观察到的化合物与在实例23中在3.5分

钟处的化合物 (C₅₆H₉₀O₃₃; 随后证实为reb M2) 是一样的, 并且在26.64分钟处观察到的化合物与在实例23中在7.6分钟处观察到的化合物 (C₅₀H₈₀O₂₈; reb UNK; 随后证实为reb D2) 是一样的。在13.96分钟处观察到reb M的其他异构体, 并且在25.06分钟处观察到reb D的另一种异构体形式。所有观察到的化合物都在甜叶菊植物提取物中存在。

[0609] 实例32

[0610] UGTLB的体内制备和活性测定

[0611] UGTLB (GI_209954733/BAG80557.1) 氨基酸序列

[0612] MGTEVTVHKNTLRVLMFPWLAYGHISPFNLVAKKLVDRGFLIYLCSTAINLKSTIKKIPEKYSDSIQL IELHLPPELPPHYHTNGLPPLNHTLQKALKMSKPNFSKILQNLKPDLVYDILLQQWAEGVANEQNIPAVKLL TSGAAVLSYFFNLVKKPGVEFPFPAIYLRKNELEKMSSELLAQSAKDKEPDGVDPFADGNMQVLMSTSRITIEAKYI DYFSGLSNWKVVPVGPVQDPIADDAEMELIDWLGKKDENSTVFSVSGSEYFLSKEDREEIAFGLELSNVNFIWV ARFPKGEEQNLEDALPKGFLERIGDRGRVLDKFAPQPRILNHPSTGGFISHCGWNSVMESVDFGVPIIAMPILHDQ PMNARLIVELGVAVEIVRDDYGKIHREEIAEILKDVIAKSGENLKAKMRDISKNLKSIRDEEMDTAAEELIQLCK NSPKLK (SEQ ID NO:10)。

[0613] 通过热激将含有UGTLB基因的pET30A+载体引入到大肠杆菌B121 (DE3) 中。将获得的细胞在卡那霉素存在的情况下培养在培养皿中, 并选择适当的菌落, 并让其在液体LB培养基 (埃伦迈尔烧瓶) 中生长。将甘油作为冷冻保护剂添加到悬液中并且将400μL的等分试样在-20°C和在-80°C下储存。

[0614] 将含有pET30A+_UGTLB质粒的大肠杆菌BL21 (DE3) 的贮存等分试样解冻, 并将其添加至30mL的LBGKP培养基 (20g/L Luria Broth Lennox; 50mM PIPES缓冲液pH 7.00; 50mM磷酸盐缓冲液pH 7.00; 2.5g/L葡萄糖和50mg/L卡那霉素)。在135rpm振摇下在30°C进行此培养持续8h。

[0615] 该生产培养基含有60g/L的过夜快速表达TB培养基 (Novagen公司)、10g/L的甘油和50mg/L的卡那霉素。将预培养物添加到200mL的该培养基中并且将该溶液在20°C搅拌, 同时取样测量OD和pH。培养物产生显著的生长并获得了良好的OD。40小时后, 通过离心收获细胞, 将其冷冻, 获得5.7g的细胞湿重。

[0616] 通过在1.2g的细胞上添加6mL的Bugbuster母混合物 (Novagen公司) 进行裂解, 并通过离心回收裂解物, 且趁新鲜使用。

[0617] 关于用UGTLB将甜菊苷转化为莱鲍迪苷E的活性的测定

[0618] 使用在pH 7.2的50mM磷酸钠缓冲液中的0.5mM底物、2.5mM的UDP-葡萄糖和3mM的MgCl₂, 利用600μL的裂解物, 以3mL规模进行关于甜菊苷的转化的活性测试。取样并根据实例20的方法通过HPLC进行分析。结果提供如下。

酶内标	GI 号	版本	甜菊苷转化 ¹ (反应时间) (保留时间约 9.2 分钟)	莱鲍迪苷 E 形成 ¹ (保留时间 约 5.4 分钟)
[0619]				
UGTLB	209954733	BAG80557.1	89% (22 h.)	3%

[0620] 注释:¹基于甜菊苷的初始浓度

[0621] 关于用UGTLB将甜叶悬钩子苷转化为莱鲍迪苷E的活性的测定

[0622] 使用在pH 7.2的50mM磷酸钠缓冲液中的0.5mM底物、2.5mM的UDP-葡萄糖和3mM的MgCl₂ (利用600μL的裂解物,以3mL规模进行关于甜叶悬钩子苷的转化的活性测试。取样并根据实例20的方法通过HPLC进行分析。结果提供如下。

酶内标	GI 号	版本	甜叶悬钩子苷转化 ¹ (反应时间) (保留时间约 11.2 分钟)	莱鲍迪苷 E 形成 ¹ (保留时间 约 5.4 分钟)
[0623] UGTLB	209954733	BAG80557.1	65% (5 h.)	4%

[0624] 注释:¹基于甜叶悬钩子苷的初始浓度

[0625] 关于用UGTLB将莱鲍迪苷A转化为莱鲍迪苷D的活性的测定

[0626] 使用在pH 7.2的50mM磷酸钠缓冲液中的0.5mM底物、2.5mM的UDP-葡萄糖和3mM的MgCl₂,利用600μL的裂解物,以3mL规模进行关于莱鲍迪苷A的转化的活性测试。取样并根据实例20的方法通过HPLC进行分析。在反应23小时之后的结果提供如下。

酶内标	GI 号	版本	莱鲍迪苷 A 转化 ¹ (反应时间)	莱鲍迪苷 D 形成 ¹
[0627] UGTLB	209954733	BAG80557.1	72% (22 h.)	10%

[0628] 注释:¹基于莱鲍迪苷A的初始浓度

[0629] 实例33

[0630] 关于用UGTSL、UGTSL2、和UGTLB转化甜叶悬钩子苷和甜菊苷的反应产物的测定

[0631] 以类似于实例28的方式进行用UGTSL和UGTSL2转化甜菊苷,并且类似于实例29进行用UGTSL和UGTSL2转化甜叶悬钩子苷。类似于实例32进行用UGTLB转化甜叶悬钩子苷和甜菊苷。

[0632] 通过LCMS分析反应混合物以确定所有反应产物。

[0633] 甜叶悬钩子苷转化产物

样品 ID	UGT (反应时间)	LC-MS, 峰面积比 (%)			
		Rub	Stev	Reb E	Reb D
[0634] S151N15	UGTSL2 (2 小时)	3.54	2.12	52.88	6.73
S151N17	UGTLB (5 小时)	13.49	ND	9.21	1.29
S151N22	UGTSL (45 小时)	7.82	2.37	35.88	3.45

[0635] 甜菊苷转化产物

样品 ID	UGT (反应时间)	LC-MS, 峰面积比 (%)		
		Stev	Reb E	Reb D
[0636] S151N26	UGTSL2 (2 小时)	20.01	42.56	1.70
S151N28	UGTLB (2 小时)	43.11	3.12	ND
S151N33	UGTSL (22 小时)	25.24	49.68	0.54

[0637] 可以看出,在甜叶悬钩子苷转化产物中,除了甜菊苷、reb E和reb D之外,还存在至少3种另外的分子量为804的化合物。这些化合物的保留时间与reb B(也已知具有与甜菊苷相同的分子量)不匹配。

[0638] 在甜菊苷转化产物中,除了reb E和reb D之外,还存在至少3种另外的分子量为966的化合物。这些化合物的保留时间与reb A(也已知具有与reb E相同的分子量)不匹配。

[0639] 实例34

[0640] 在酿酒酵母中的UGT76G1的体内生产

[0641] UGT76G1 [甜叶菊] (gi_37993653/gb_AAR06912.1)

[0642] MENKTETTIVRRRRRIILFPVPFQGHINPILQLANVLYSKGFSITIFHTNFKPKTSNYPHFTFRFILDNDPQDERISNLPHTHGLAGMRIPIINEHGADELRRLELLMLASEEDEEVSCLI TDALWYFAQSVADSLNLRRLVLMTSSLFNFHAHVSLPQFDELGYLDPDDKTRLEEQASGFPMKVKDIKSAYSNWQILKEILGKMIKQTKASSGVIWNSFKELEESELETVIREIPAPSFLIPLPKHLTASSSSLLDHDRTVFQWLDQQPPSSVLVYVSGSTSEVDEKDFLEIARGLVDSKQSFLWVVRPGFVKGSTWVEPLPDGFLGERGRIVKWVPPQEVLAHGAIGAFWTHSGWNSTLESVCEGVPMIFSDFGLDQPLNARYMSDVLKGVVYLENGWERGEIANAIRVMVDEEGEYIRQNARVLKQKADVSLMKGSSYESLESLVSYISSL (SEQ ID NO:11)。

[0643] 上述氨基酸序列针对在酿酒酵母中表达进行了密码子优化。此外,在ATG起始密码子之前添加了酵母共有序列AACACA。使用Hind III和Xba I限制性位点将合成基因亚克隆到pYES2载体中。使用pYES2_UGT76G1_Sc载体来转化化学感受态酿酒酵母INVSc1细胞(英杰公司)。

[0644] 使细胞在缺乏尿嘧啶的含有2%葡萄糖的固体合成基本培养基上生长,并挑选单个菌落,且使其在缺乏尿嘧啶的液体合成基本培养基(含有2%葡萄糖的SC-U)上生长。在离心之后,将细胞用SC-U(含有2%葡萄糖)和60%甘油/水悬浮。将等分试样在-80℃下储存,并且使用一个等分试样来开始在SC-U(含有2%葡萄糖)中培养,在30℃持续43小时。将此培养物的一部分离心,并将其悬浮在诱导培养基(含有2%半乳糖的SC-U)中,在30℃持续19小时。

[0645] 通过离心获得细胞并且用五倍体积的CelLyticTMY细胞裂解试剂(西格玛公司)进行裂解。将裂解物直接用于活性测试(UGT76G1_Sc)。

[0646] 实例35

[0647] 用于莱鲍迪苷D转化为莱鲍迪苷M的UGT76G1_Sc的活性的测定

[0648] 根据实例34制备UGT76G1_Sc。使用在pH 7.2的50mM磷酸钠缓冲液中的0.5mM底物、2.5mM的UDP-葡萄糖和3mM的MgCl₂,利用200μL的裂解物,以3mL规模进行关于莱鲍迪苷D的

转化的活性测试。取样并根据实例20的方法通过HPLC进行分析。结果如下所示。

[0649]	酶内标	莱鲍迪昔 D 转化 ¹ (反应时间)	莱鲍迪昔 M 选择性 ¹ (保留时间约 6.7 分钟)
--------	-----	----------------------------------	---

[0650]	UGT76G1_Sc	85% (21 h.)	100%
--------	------------	-------------	------

[0651] 注释:¹基于莱鲍迪昔D的初始浓度

[0652] 实例36

[0653] 在酿酒酵母中的UGTSL的体内生产

[0654] UGTSL[番茄] (gi_460409128/XP_004249992.1

[0655] MSPKLHKELFFHSLYKKTRSNHTMATLKVLMFPFLAYGHI SPYLVNAKKLADRGLIYFCSTPINLKS
TIEKIPEKYADSIHLIELHLPQLPPHYHTTNGLPNQLNQLKALKMSKPNFSKILQNLKPDLVIIYDILQRWA
KHVANEQNIPAVKLLTSGAAVFSYFFNVLKPGVEFPFPGIYLRKIEQVRLSEMMSKSDKEKELEDDDDDDLLVD
GNMQIMLMSTSRTEAKYIDFCTALTNWKVVPVGGPPVQDLITNDVDDMELIDWLGTKDENSTVFSVFGSEYFLSKE
DMEEVAFALELSNVNFIWVARFPKGEERNLEDALPKGFLERIGERGRVLDKFAQPRIILNHPSTGGFISHCGWNSA
MESIDFGVPIIAMPMLDQPMNARLIVELGVAVEIVRDDDGIHRGEIAETLKGVITGKTGEKLRKVRDISKNLK
TIRDEEMDAAAEEELIQLCRNGN (SEQ ID NO:12)。

[0656] 上述氨基酸序列针对在酿酒酵母中表达进行了密码子优化。此外,在ATG起始密码子之前添加了酵母共有序列AACACA。使用Hind III和Xba I限制性位点将合成基因亚克隆到pYES2载体中。使用pYES2_UGTSL_Sc载体来转化化学感受态酿酒酵母INVSc1细胞(英杰公司)。

[0657] 使细胞在缺乏尿嘧啶的、含有2%葡萄糖的固体合成基本培养基上生长,并挑选单个菌落,且使其在缺乏尿嘧啶的液体合成基本培养基(含有2%葡萄糖的SC-U)上生长。在离心之后,将细胞用SC-U(含有2%葡萄糖)和60%甘油/水悬浮。将等分试样在-80℃下储存,并且使用一个等分试样来开始在SC-U(含有2%葡萄糖)中培养,在30℃持续43小时。将此培养物的一部分离心,并将其悬浮在诱导培养基(含有2%半乳糖的SC-U)中,在30℃持续19小时。

[0658] 通过离心获得细胞并且用五倍体积的CellLyticTMY细胞裂解试剂(西格玛公司)进行裂解。将裂解物直接用于活性测试(UGTSL_Sc)。

[0659] 实例37

[0660] 用于莱鲍迪昔A转化为莱鲍迪昔D的UGTSL_Sc的活性的测定

[0661] 根据实例36制备UGTSL_Sc。使用在pH 7.2的50mM磷酸钠缓冲液中的0.5mM底物、2.5mM的UDP-葡萄糖和3mM的MgCl₂,利用200μL的裂解物,以2mL规模进行关于莱鲍迪昔A的转化的活性测试。取样并根据实例20的方法通过HPLC进行分析。结果提供如下。

[0662]	酶内标	莱鲍迪昔A转化 ¹ (反应时间)	莱鲍迪昔D选择性 ¹
	UGTSL_Sc	46% (4h)	42%

[0663] 注释:¹基于莱鲍迪昔A的初始浓度

[0664] 实例38

[0665] 莱鲍迪昔M的分离

[0666] 实例14的产物混合物的量不够大,以至不足以通过制备型HPLC方法进行分离。相应地,使用具有一系列注射的分析型HPLC来分离该混合物的组分。根据以上实例14中描述的方法进行分离,以提供相应于图3的HPLC轨迹中的两个主峰的两个部分:部分A(保留时间24.165分钟)和部分B(保留时间31.325分钟)。

[0667] 部分A的保留时间与reb D一致,指示来自该生物转化反应的未反应的起始物质。

[0668] 纯化的部分B的保留时间与reb M一致,指示从reb D的成功生物转化。通过纯化的部分B和reb M标准品(可获自谱赛科)的共同注射,证实在部分B中收集的物质身份为reb M。发现部分B和reb M标准品两者都在相同的保留时间处被洗脱(图7),表明部分B为reb M。

[0669] 还通过NMR和HRMS独立地证实部分B的身份为reb M。为了取样,在旋转蒸发器下将部分B浓缩,冷冻干燥,并且在40°C下干燥40小时。

[0670] 将NMR样品溶解在氘代吡啶(C_5D_5N)中,并且使用标准脉冲序列在Varian Unity Plus 600MHz仪器上获得光谱。将部分B的NMR光谱与reb M的NMR光谱进行比较。两种光谱的重叠表明了部分B与reb M的一致性。关于reb M的NMR指定的表格显示如下:

[0671] 对于在 C_5D_5N 中的莱鲍迪昔M的 1H 和 ^{13}C NMR光谱数据^{a-c}

位置	^{13}C NMR	1H NMR
1	40.3	0.75 t (13.2)
		1.76 m
2	19.6	1.35 m
		2.24 m

[0673]

3	38.4	1.01 m 2.30 d (13.3)
4	44.3	---
5	57.4	1.06 d (12.8)
6	23.5	2.23 m 2.41 q (13.2)
7	42.6	1.41 m 1.80 m
8	41.2	---
9	54.3	0.91 d (7.7)
10	39.7	---
11	20.2	1.65 m 1.75 m
12	38.5	1.86 m 2.73 m
13	87.6	---
14	43.3	2.02 m 2.74 m
15	46.5	1.88 d (16.4) 2.03 m
16	153.3	---
17	104.9	4.90 s 5.69 s
18	28.2	1.32 s
19	176.9	---
20	16.8	1.38 s
1'	94.9	6.39 d (8.2)
2'	76.9	4.51 t (8.5)
3'	88.6	5.09 t (8.5)

[0674]

4'	70.1	4.18 m
5'	78.4	4.13 m
6'	61.8	4.20 m 4.31 m
1''	96.2	5.46 d (7.1)
2''	81.4	4.13 m
3''	87.9	4.98 t (8.5)
4''	70.4	4.07 t (9.6)
5''	77.7	3.94 m
6''	62.6	4.19 m 4.32 m
1'''	104.8	5.48 d (7.7)
2'''	75.8	4.15 m
3'''	78.6	4.13 m
4'''	73.2	3.98 m
5'''	77.6	3.74 ddd (2.8, 6.4, 9.9)
6'''	64.0	4.27 m 4.51m
1''''	103.9	5.45 d (7.5)
2''''	75.6	3.98 m
3''''	77.8	4.50 t (7.8)
4''''	71.3	4.14 m
5''''	78.0	3.99 m
6''''	62.1	4.20 m 4.32 m
1'''''	104.2	5.81 d (7.2)
2'''''	75.5	4.20 m
3'''''	78.4	4.20 m
4'''''	73.6	4.10 m

[0675]	5''''''	77.8	3.90 ddd (2.8, 6.4, 9.9)
	6''''''	64.0	4.32 m 4.64 d (10.3)
	1''''''	104.1	5.31 d (8.0)
	2''''''	75.5	3.95 m
	3''''''	78.0	4.37 t (9.1)
	4''''''	71.1	4.10 m
	5''''''	78.1	3.85 ddd (1.7, 6.1, 9.9)
	6''''''	62.1	4.10 m 4.32 m

[0676] ^a在COSY、HMQC和HMBC关联基础上进行的指定；^b化学位移值表示为 δ (ppm)；^c耦合常数表示为Hz。

[0677] 用装备有在正离子模式下运行的电喷雾电离源的沃特斯 (Waters) Premier四极杆飞行时间 (Q-TOF) 质谱仪产生HRMS。将样品溶解在甲醇中,并且在2:2:1的甲醇:乙腈:水中洗脱,并使用机载的 (onboard) 注射泵经由灌注引入。通过处于 m/z 1313.5265的 $[M+Na]^+$ 加合物证实了reb M的存在,其相对应于分子式 $C_{56}H_{90}O_{33}$ 。

[0678] 实例39

[0679] Reb D2的分离和表征

[0680] 粗反应样品。根据实例22用UGTSL (GI#460409128) 制备了用于分离的批号为CB-2977-106的样品。

[0681] HPLC分析。使用沃特斯 (Waters) 2695 Alliance系统按照下列方法进行了样品的初步HPLC分析:菲罗门Synergi Hydro-RP, 4.6×250 mm, $4\mu\text{m}$ (p/n 00G-4375-E0);柱温:55℃;流动相A:在水中的0.0284%乙酸铵 (NH_4OAc) 和0.0116%乙酸 (HOAc);流动相B:乙腈 (MeCN);流速:1.0mL/min;注射体积:10 μL 。通过UV (210nm) 和CAD进行检测。梯度:

[0682]	时间 (min)	%A	%B
	0.0-8.5	75	25
[0683]	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

[0684] 按照下列方法进行半制备型纯化部分的分析:沃特斯(Waters)Atlantis dC18, 4.6×100mm, 5 μ m (p/n 186001340);流动相A:在水中的25%MeCN;流动相B:在水中的30%MeCN;流速:1.0mL/min;注射体积:10 μ L。通过CAD进行检测。

[0685] 梯度:

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

[0687] LC-MS。在具有以负离子模式运行的沃特斯(Waters) 3100质量检测器的沃特斯(Waters)自动纯化HPLC/MS系统上进行半合成甜菊醇糖苷混合物的初步分析。使用下列方法进行样品的分析:菲罗门Synergi Hydro-RP, 4.6×250mm, 4 μ m (p/n 00G-4375-E0);柱温:55 $^{\circ}$ C;流动相A:在水中的0.0284%NH₄OAc和0.0116%HOAc;流动相B:乙腈;流速:1.0mL/min;注射体积:10 μ L。通过UV (210nm)、和MSD (-ESI m/z 500-2000) 进行检测。梯度条件如上文列出。

[0688] 通过HPLC分离。纯化分两步进行。用于半制备纯化的第一种方法概括如下。柱子:沃特斯(Waters)Atlantis dC18, 30×100mm, 5 μ m (p/n 186001375);流动相A:在水中的25%MeCN;流动相B:在水中的30%MeCN;流速:45mL/min;注射负荷:溶解在20mL水中的160mg。通过UV (205nm) 进行检测。

[0689] 梯度:

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

[0692] 第二次纯化使用相同的柱子和条件,但是为等度流动相:水中的20%MeCN。

[0693] 从天然提取物进行纯化。纯化分三步进行。用于制备纯化的第一种方法概括如下。主要工艺:沃特斯(Waters)Symmetry C18, 50×250mm, 7 μ m (p/n WAT248000);等度流动相:具有0.05%HOAc的在水中的50%甲醇(MeOH);流速:85mL/min;注射负荷:溶解在50mL流动相中的6g粗提取物。通过UV (210nm) 进行检测。在洗脱靶分析物之后,在水中的85%MeOH冲洗柱子。

[0694] 次级工艺:沃特斯(Waters)Symmetry Shield RP18, 50×250mm, 7 μ m (p/n WAT248000);等度流动相:在水中的20%MeCN;流速:100mL/min;注射负荷:溶解在30mL水中的0.5g主要部分。通过UV (210nm) 进行检测。

[0695] 三级工艺:沃特斯(Waters)Symmetry Shield RP18, 50×250mm, 7 μ m (p/n WAT248000);等度流动相:在水中的20%MeCN;流速:100mL/min;注射负荷:溶解在30mL水中

的0.5g次级部分。通过UV (210nm) 进行检测。

[0696] MS和MS/MS。用装备有电喷雾电离源的Premier质谱仪的沃特斯(Waters) QT产生MS和MS/MS数据。通过负ESI分析样品。用H₂O:乙腈(1:1)以50倍稀释样品,并且使用机载的注射泵经由灌注将其引入。将样品稀释以产生良好的s/n,其在大约0.01mg/mL浓度时出现。

[0697] NMR。通过将1-2mg溶解在150 μ L的吡啶-d₅中来准备样品,并且在具有2.5mm反式检测探头的Bruker Avance 500MHz仪器上获得NMR数据。¹H NMR光谱以残余溶剂信号(对于吡啶-d₅的 δ_{H} 8.74和 δ_{C} 150.35)为参考。

[0698] 结果和讨论

[0699] 分离和纯化。对根据实例22用UGTSL (GI#460409128) 制备的批号为CB-2977-106的甜菊醇糖苷混合物进行分离。使用上述方法通过LC-MS对物质进行分析,并且将结果提供在图6中。感兴趣的目标峰是在TIC色谱图中的7.7分钟处的峰。这个峰的质谱提供了处于m/z 1127.6的[M-H]⁻离子。使用以上提供的第一方法条件,以单次注射(160mg)初步处理提供的样品。这种方法将该物质分级为‘极性’和‘非极性’糖苷混合物。然后使用以上第二步条件再处理该‘极性’混合物。从该半制备收集物中分离到具有>99% (CAD, AUC)纯度的化合物。纯化之后,通过在35 $^{\circ}$ C旋转蒸发将合并的部分浓缩,并冻干。获得大约1-2mg,用于表征。

[0700] 质谱分析法。通过灌注样品获得的ESI-TOF质谱显示出处于m/z 1127.4709的[M-H]⁻离子。[M-H]⁻离子的质量与分子式C₅₀H₈₀O₂₈很好地一致(对C₅₀H₇₉O₂₈计算为:1127.4758,误差:-4.3ppm)。MS数据证实1128道尔顿的标称质量,具有分子式C₅₀H₈₀O₂₈。

[0701] MS/MS谱(选择处于m/z 1127.5的[M-H]⁻离子进行碎片化(fragmentation))指示两个葡萄糖单元的丢失和处于m/z 641.3187、479.2655和317.2065的三个葡萄糖部分的后续丢失。

[0702] NMR光谱学。进行一系列NMR实验,包括¹H NMR(图8)、¹³C NMR(图9和10)、¹H-¹H COSY(图11)、HSQC-DEPT(图12)、HMBC(图13和14)、NOESY(图15)和1D-TOCSY,以允许对该化合物的指定。在样品制备约46小时之后获得的¹H NMR中,解析了在 δ_{H} 5.04处的端基共振,其在原始谱(图8)中被溶剂(HOD)掩盖。

[0703] ¹H、¹H-¹H COSY、¹H-¹³C HSQC-DEPT和¹H-¹³C HMBC NMR数据表明,该糖苷的中心核是二萜。在¹H和¹H-¹³C HSQC-DEPT谱中观察到五个端基质子的存在证实了结构中的五糖单元。在¹H-¹³C HSQC-DEPT谱中的 δ_{C} 69.9处的亚甲基¹³C共振表明结构中的1 \rightarrow 6糖键的存在。使用¹H-¹³C HMBC和1D-TOCSY关联对糖单元的连接进行指定。

[0704] 从在 δ_{H} 1.29处的甲基质子到在 δ_{C} 177.7处的羰基的HMBC关联允许指定叔甲基基团(C-18)以及C-19之一,并且提供了用于指定其余糖苷配基的起点。从甲基质子(H-18)到在 δ_{C} 38.9、45.0、和57.8处的碳的另外的HMBC关联允许指定C-3、C-4、和C-5。¹H-¹³C HSQC-DEPT数据的分析表明,在 δ_{C} 38.9处的碳为亚甲基并且在 δ_{C} 57.8处的碳为次甲基,其分别指定为C-3和C-5。这留下在 δ_{C} 45.0处的碳,其未显示在HSQC-DEPT谱中的关联,被指定为季碳,C-4。使用HSQC-DEPT数据指定对于C-3(δ_{H} 0.98和2j.36)和C-5(δ_{H} 1.04)的¹H化学位移。在H-3质子之一(δ_{H} 0.98)与在 δ_{H} 1.43处的质子之间的COSY关联允许指定H-2质子之一,所述H-2质子之一进而显示出与被指定为C-1的在 δ_{H} 0.75处的质子的关联。然后,基于另外的COSY和HSQC-DEPT关联,对C-1和C-2的剩余¹H和¹³C化学位移进行指定,并概括在下表中。

[0705] ¹H和¹³C NMR(500和125MHz,吡啶-d₅), Reb D2的指定。

[0706]

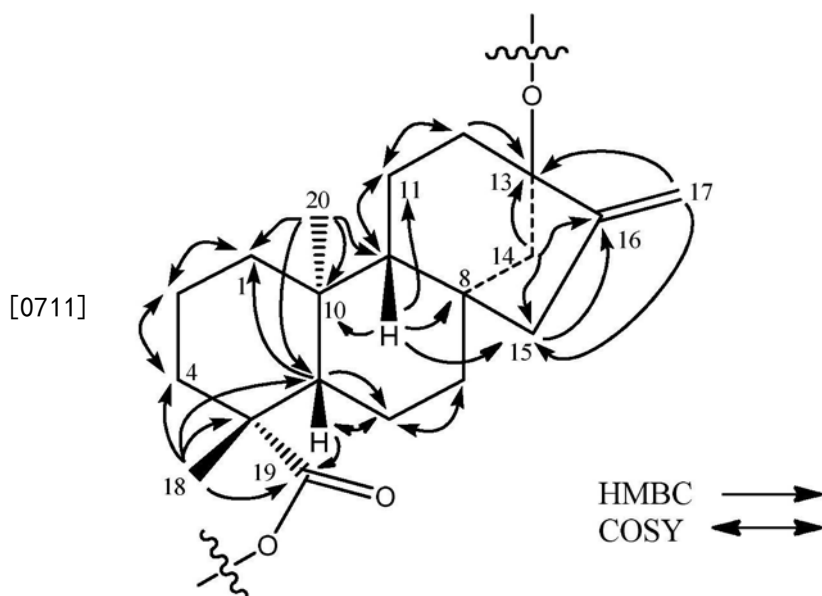
	Reb D2	
位置	¹³ C	¹ H
1	41.3	0.75 t (11.0) 1.76 m
2	19.9	1.43 m 2.20 m
3	38.9	0.98 m 2.36 d (12.1)
4	45.0	---
5	57.8	1.04 d (12.5)
6	22.7	1.92 m 2.43 m
7	42.2	1.22 m 1.30 m
8	43.1	---
9	54.5	0.88 brs
10	40.3	---
11	21.1	1.65 m 1.69 m
12	37.5	1.99 m 2.25 m
13	87.1	---
14	44.5	1.80 d (11.7) 2.65 d (11.7)
15	48.3	1.31 m

		2.04 brs
[0707]	16	154.7 ---
	17	105.2 5.01 s 5.64 s
	18	28.8 1.29 s
	19	177.7 ---
	20	16.0 1.30s

[0708] 在 δ_{H} 1.30处观察到的其他叔甲基单峰显示出与C-1和C-5的HMBC关联并且被指定为C-20。甲基质子显示出与分别被指定为C-10和C-9的季碳(δ_{C} 40.3)和次甲基碳(δ_{C} 54.5)的另外的HMBC关联。然后,在H-5(δ_{H} 1.04)与在 δ_{H} 1.92和2.43处的质子之间的COSY关联允许H-6质子的指定,该H-6质子进而显示出与被指定为C-7的在 δ_{H} 1.22和1.30处的质子的关联。然后根据HSQC-DEPT数据确定关于C-6(δ_{C} 22.7)和C-7(δ_{C} 42.2)的 ^{13}C 化学位移。在H-9(δ_{H} 0.88)与在 δ_{H} 1.65和1.69处的质子之间的COSY关联允许H-11质子的指定,该H-11质子进而显示出与被指定为H-12质子的在 δ_{H} 1.99和2.25处的质子的COSY关联。然后使用HSQC-DEPT数据来指定C-11(δ_{C} 21.1)和C-12(δ_{C} 37.5)。从H-12质子(δ_{H} 2.25)到在 δ_{C} 87.1和154.7处的碳的HMBC关联允许分别指定C-13和C-16。在 δ_{H} 5.01和5.64处观察到的烯属质子显示出与C-13的HMBC关联并且被指定为C-17(经由HSQC-DEPT为 δ_{C} 105.2)。烯属质子H-17和次甲基质子H-9显示出与被指定为C-15的在 δ_{C} 48.3处的碳的HMBC关联。然后,从H-9到在 δ_{C} 44.5处的亚甲基碳的另外的HMBC关联允许指定C-14。使用HSQC-DEPT数据指定在C-14(δ_{H} 1.80和2.65)和C-15(δ_{H} 1.31和2.04)处的 ^1H 化学位移。

[0709] 使用在NOESY谱中观察到的关联来指定中心二萜核的相对立体化学。在该NOESY谱中,在H-14与H-20之间观察到的NOE关联表明H-14和H-20在环的同一面上。类似地,在H-9与H-5;H-9与H-18以及H-5与H-18之间观察到NOE关联,但是在H-9与H-14之间未观察到NOE关联,表明与H-14和H-20相比,H-5、H-9和H-18位于环的相对面上。这些数据表明,在中央核中的相对立体化学在糖基化步骤过程中被保留。

[0710] 用来指定糖苷配基区域的关键HMBC和COSY关联提供如下:



[0712] ^1H - ^{13}C HSQC-DEPT数据的分析证实了五个端基质子的存在。这些端基质子中的三个在 ^1H NMR谱中的 δ_{H} 6.02 (δ_{C} 96.1)、5.57 (δ_{C} 105.3)、和5.34 (δ_{C} 105.3)处良好解析。在 δ_{H} 5.04 (δ_{C} 105.6)和5.07 (δ_{C} 98.7)处观察到的在 ^1H 谱中被溶剂(HOD)共振掩盖的剩余两个端基质子通过 ^1H - ^{13}C HSQC-DEPT数据进行鉴定。在 δ_{H} 6.02处观察到的端基质子显示出与C-19的HMBC关联,表明它相对应于Glc_I的端基质子。类似地,在 δ_{H} 5.07处观察到的端基质子显示出与C-13的HMBC关联,从而允许它被指定为Glc_{II}的端基质子。

[0713] Glc_I端基质子(δ_{H} 6.02)显示出与在 δ_{H} 4.07处的质子(被指定为Glc_I H-2)的COSY关联,该在 δ_{H} 4.07处的质子进而显示出与在 δ_{H} 4.22处的质子(Glc_I H-3)的COSY关联,该在 δ_{H} 4.22处的质子显示出与在 δ_{H} 4.12处的质子(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,使用Glc_I端基质子的选择性照射以若干不同的混合时间进行一系列的1D-TOCSY实验。除了证实对Glc_I H-2到H-4的指定之外,1D-TOCSY数据还显示出在 δ_{H} 4.04处被指定为Glc_I H-5的质子和在 δ_{H} 4.68处被指定为Glc_I H-6质子之一的质子。后面的质子还用于1D-TOCSY实验。在若干不同的混合时间的情况下H-6的选择性照射还证实了Glc_I H-1到H-5以及H-6(δ_{H} 4.30)的剩余亚甲基质子的指定。使用 ^1H - ^{13}C HSQC-DEPT数据,确定关于Glc_I C-2(δ_{C} 74.2)、C-3(δ_{C} 79.1)、C-4(δ_{C} 72.1)、C-5(δ_{C} 78.5)、和C-6(δ_{C} 69.9)的 ^{13}C 化学位移的指定,从而完成Glc_I的指定。此外,在 ^1H - ^{13}C HSQC-DEPT谱中的 δ_{C} 69.9处的亚甲基 ^{13}C 共振的存在表明结构中Glc_I的1 \rightarrow 6糖键。

[0714] 在四个剩余的未指定葡萄糖部分中,基于 ^1H - ^{13}C HSQC-DEPT、HMBC、和1D-TOCSY关联,一个被指定为在Glc_I的C-6处的取代基。在HSQC-DEPT谱中的 δ_{C} 69.9处的Glc_I的亚甲基 ^{13}C 共振的相对低场位移指示了Glc_I的1 \rightarrow 6糖键。在 δ_{H} 5.04处观察到的端基质子显示出与Glc_I C-6的HMBC关联并且被指定为Glc_V的端基质子。类似地,Glc_I的亚甲基质子显示出与Glc_V的端基碳的HMBC关联,证实了在Glc_I与Glc_V之间的1 \rightarrow 6糖键的存在。Glc_V端基质子显示出与在 δ_{H} 4.00处的质子(被指定为Glc_V H-2)的COSY关联,该在 δ_{H} 4.00处的质子进而显示出与在 δ_{H} 4.22处的质子(Glc_V H-3)的COSY关联。由于数据重叠,该COSY谱不允许基于Glc_V H-3的COSY关联的Glc_V H-4的指定。然而,在HMBC谱中,Glc_V H-3显示出与Glc_V C-5(δ_{C} 78.9)的关联。在HSQC-DEPT谱中,Glc_V C-5显示出与 δ_{H} 3.89(Glc_V H-5)的关联。Glc_V H-5显

示出与 δ_{H} 4.21、4.37、和4.48的COSY关联。在HSQC-DEPT谱中, δ_{H} 4.21显示出与 δ_{C} 71.4 (Glc_V H-4)的关联,而 δ_{H} 4.37和4.48显示出与 δ_{C} 63.1的关联并且分别被指定为Glc_V H-6a和H-6b。使用¹H-¹³C HSQC-DEPT数据,确定关于Glc_V C-2 (δ_{C} 75.7)和C-3 (δ_{C} 79.1)的¹³C化学位移的指定,从而完成Glc_V的指定。

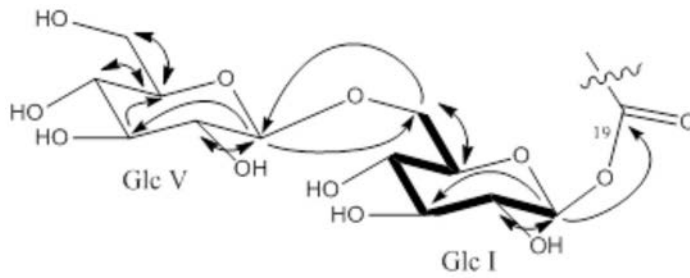
[0715] 关于在C-19处的糖苷的¹H和¹³C化学位移的总结显示在下列表中:

[0716] ¹H和¹³C NMR (500和125MHz,吡啶-d₅), reb D2 C-19糖苷的指定。

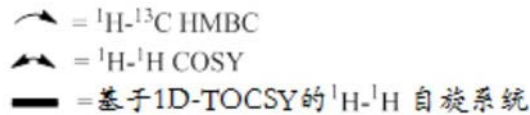
Reb D2		
位置	¹³ C	¹ H
Glc _I -1	96.1	6.02 d (8.1)
Glc _I -2	74.2	4.07 m
Glc _I -3	79.1 [#]	4.22 m [#]
Glc _I -4	72.1	4.12 m
Glc _I -5	78.5	4.04 m
Glc _I -6	69.9	4.30 m 4.68 d (10.7)
Glc _V -1	105.6	5.04 (8.1)
Glc _V -2	75.7	4.00 m
Glc _V -3	79.1 [#]	4.22 m [#]
Glc _V -4	71.4	4.21 m
Glc _V -5	78.9	3.89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

[0719] ¹H和¹³C值可在位置Glc_I-3、Glc_V-3和Glc_{IV}-3之间互换。

[0720] 用来指定C-19糖苷区域的关键HMBC、COSY、和1D-TOCSY关联的总结提供如下。



[0721]



[0722] 以类似的方式进行Glc_{II}的指定。Glc_{II}端基质子(δ_{H} 5.07)显示出与在 δ_{H} 4.37处的质子(被指定为Glc_{II} H-2)的COSY关联,该在 δ_{H} 4.37处的质子进而显示出与在 δ_{H} 4.18处的质子(Glc_{II} H-3)的COSY关联。此后者质子显示出与在 δ_{H} 3.88处的质子(Glc_{II} H-4)的额外关联,该在 δ_{H} 3.88处的质子还显示出与在 δ_{H} 3.79处的质子(Glc_{II} H-5)的COSY关联。Glc_{II} H-5还显示出与Glc_{II} H-6质子(δ_{H} 4.08和4.46)的COSY关联。使用HSQC-DEPT数据,确定关于Glc_{II} C-2(δ_{C} 81.3)、C-3(δ_{C} 88.4)、C-4(δ_{C} 71.1)、C-5(δ_{C} 77.9)、和C-6(δ_{C} 63.2)的 ^{13}C 化学位移的指定。从Glc_{II} H-3到C-2和C-4以及还有从Glc_{II} H-4到C-2和C-5的HMBC关联证实了以上做出的指定。Glc_{II} H-4与Glc_{II} C-6的额外HMBC关联进一步支持完成Glc_{II}的指定。

[0723] 基于HMBC关联,剩余未指定的葡萄糖部分中的两个被指定为在Glc_{II}的C-2和C-3处的取代基。在 δ_{H} 5.57处观察到的端基质子显示出与Glc_{II} C-2的HMBC关联并且被指定为Glc_{III}的端基质子。在 δ_{H} 5.34处观察到的端基质子显示出与Glc_{II} C-3的HMBC关联并且被指定为Glc_{IV}的端基质子。还观察到从Glc_{II} H-2到Glc_{III}的端基碳以及从Glc_{II} H-3到Glc_{IV}的端基碳的相互HMBC关联。

[0724] Glc_{III}(δ_{H} 5.57)的端基质子显示出与在 δ_{H} 4.19处的被指定为Glc_{III} H-2的质子的COSY关联。由于数据重叠,COSY谱不允许H-3到H-6质子的指定。因此,使用Glc_{III}端基质子的选择性照射以若干不同的混合时间进行一系列的1D-TOCSY实验。除了证实关于Glc_{III} H-2的指定之外,该1D-TOCSY数据还显示出在 δ_{H} 4.24(Glc_{III} H-3)、 δ_{H} 4.27(Glc_{III} H-4)、和 δ_{H} 3.94(Glc_{III} H-5)处的质子。一旦使用1D-TOCSY数据将H-4指定,就使用从H-4到H-5以及进而到H-6的COSY关联来指定H-6。在COSY谱中,Glc_{III} H-4显示出与Glc_{III} H-5的关联,该Glc_{III} H-5进而显示出对应地与Glc_{III} H-6a和H-6b的 δ_{H} 4.41和4.50的COSY关联。然后使用 $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC-DEPT关联,确定关于Glc_{III} C-2(δ_{C} 76.8)、C-3(δ_{C} 78.9)、C-4(δ_{C} 72.4)、C-5(δ_{C} 78.8)、和C-6(δ_{C} 63.5)的 ^{13}C 化学位移,从而完成Glc_{III}的指定。

[0725] Glc_{IV}(δ_{H} 5.34)的端基质子显示出与在 δ_{H} 4.06处的被指定为Glc_{IV} H-2的质子的COSY关联。由于数据重叠,COSY谱不允许H-3到H-6质子的指定。因此,使用Glc_{IV}端基质子的选择性照射以若干不同的混合时间进行一系列的1D-TOCSY实验。除了证实关于Glc_{IV} H-2的指定之外,该1D-TOCSY数据显示出在 δ_{H} 4.22(Glc_{IV} H-3)、 δ_{H} 4.18(Glc_{IV} H-4)、和 δ_{H} 4.10(Glc_{IV} H-5)处的质子。一旦使用1D-TOCSY数据将H-4指定,就使用从H-4到H-5以及进而到H-6的COSY关联来指定H-6。在COSY谱中,Glc_{IV} H-4显示出与Glc_{IV} H-5的关联,该Glc_{IV} H-5进而显示出对应地与 δ_{H} 4.32和4.58(Glc_{IV} H-6a和H-6b)的COSY关联。然后使用 $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ HSQC-

DEPT关联,确定关于Glc_{IV} C-2 (δ_c 75.8)、C-3 (δ_c 78.9)、C-4 (δ_c 72.0)、C-5 (δ_c 79.3)、和C-6 (δ_c 62.9)的¹³C化学位移,从而完成Glc_{IV}的指定。

[0726] 对于在 δ_H 6.02 (d, J=8.1Hz)、5.57 (d, J=7.6Hz)、5.34 (d, J=7.9Hz) 和 δ_H 5.04 (d, J=8.1Hz) 处的葡萄糖部分的端基质子观察到大的耦合常数,提示了它们的 β -定向。虽然在 δ_H 5.07处的剩余端基质子被溶剂共振 (HDO) 掩盖,从1D TOCSY数据明显可见的其耦合常数 (J=约8Hz) 也指示了 β -定向。

[0727] 关于在C-13处的糖苷的¹H和¹³C化学位移的总结显示在下列表中:

[0728] ¹H和¹³C NMR (500和125MHz,吡啶-d₅), Reb D2 C-13糖苷的指定。

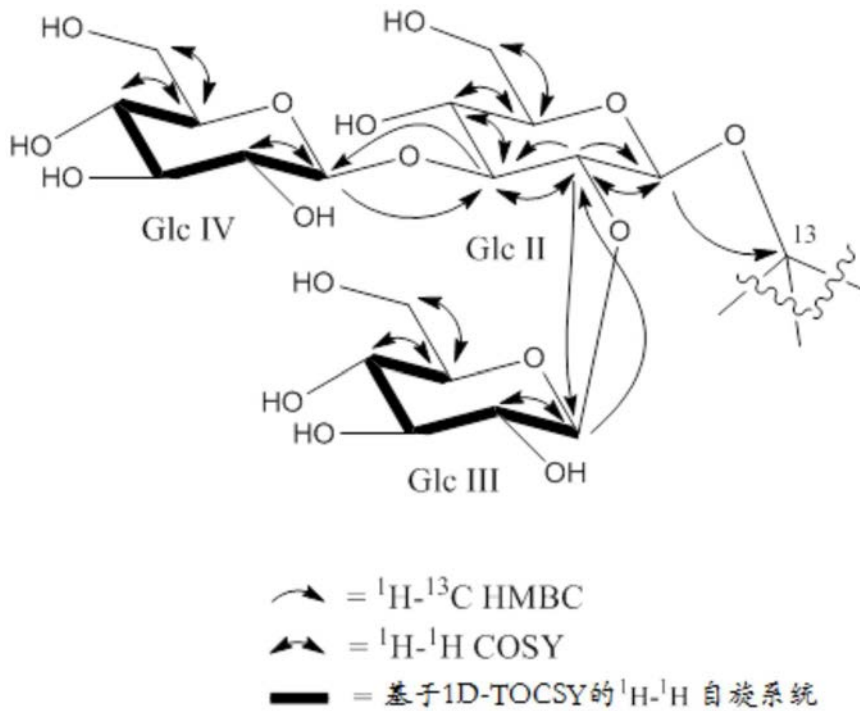
Reb D2		
位置	¹³ C	¹ H
Glc _{II} -1	98.7	5.07 (~8) *
Glc _{II} -2	81.3	4.37 m
Glc _{II} -3	88.4	4.18 m
Glc _{II} -4	71.1	3.88 m
Glc _{II} -5	77.9	3.79 m
Glc _{II} -6	63.2	4.08 m 4.47 m
Glc _{III} -1	105.3	5.57 d (7.6)
Glc _{III} -2	76.8	4.19 m
[0729] Glc _{III} -3	78.9	4.24 m
Glc _{III} -4	72.4	4.27 m
Glc _{III} -5	78.8	3.94 m
Glc _{III} -6	63.5	4.41 m 4.50m
Glc _{IV} -1	105.3	5.34 d (7.9)
Glc _{IV} -2	75.8	4.06 m
Glc _{IV} -3	78.9 [#]	4.22 m [#]
Glc _{IV} -4	72.0	4.18 m
Glc _{IV} -5	79.3	4.10 m
Glc _{IV} -6	62.9	4.32 m 4.58 m

[0730] *端基质子被溶剂 (HDO) 共振掩盖,从1D-TOCSY数据获得耦合常数。

[0731] ^1H 和 ^{13}C 值可在 Glc_I-3 、 Glc_V-3 和 $\text{Glc}_{IV}-3$ 之间互换。

[0732] 用来指定C-13糖苷区域的关键HMBC、COSY、和1D-TOCSY关联的总结提供如下：

[0733]



[0734] 该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](莱鲍迪昔D2或reb D2)。该化合物是莱鲍迪昔D的异构体。

[0735] 实例40

[0736] Reb M2的分离和表征

[0737] 粗反应样品。根据实例22用UGTSL (GI#460409128) 制备了用于分离的批号为CB-2977-106的样品。

[0738] HPLC分析。使用沃特斯 (Waters) 2695Alliance系统按照下列方法进行了初步HPLC分析：菲罗门Synergi Hydro-RP, $4.6 \times 250\text{mm}$, $4\mu\text{m}$ (p/n 00G-4375-E0)；柱温： 55°C ；流动相A：在水中的 $0.0284\%\text{NH}_4\text{OAc}$ 和 $0.0116\%\text{HOAc}$ ；流动相B：乙腈 (MeCN)；流速： $1.0\text{mL}/\text{min}$ ；注射体积： $10\mu\text{L}$ 。通过UV (210nm) 和CAD进行检测。

[0739] 梯度：

[0740]

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

[0741]

30	100	0
----	-----	---

[0742] 按照下列方法进行半制备型纯化部分的分析：沃特斯 (Waters) Atlantis dC18, $4.6 \times 100\text{mm}$, $5\mu\text{m}$ (p/n 186001340)；流动相A：在水中的 $25\%\text{MeCN}$ ；流动相B：在水中的 30%

MeCN;流速:1.0mL/min;注射体积:10 μ L。通过CAD进行检测。

[0743] 梯度:

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

[0745] LC-MS。在具有以负离子模式运行的沃特斯 (Waters) 3100质量检测器的沃特斯 (Waters) 自动纯化HPLC/MS系统上进行半合成甜菊醇糖苷混合物的初步分析。使用下列方法进行样品的分析:菲罗门Synergi Hydro-RP, 4.6 \times 250mm, 4 μ m (p/n 00G-4375-E0);柱温:55 $^{\circ}$ C;流动相A:在水中的0.0284%NH₄OAc和0.0116%HOAc;流动相B:MeCN;流速:1.0mL/min;注射体积:10 μ L。通过UV (210nm)、和MSD (-ESI m/z 500-2000) 进行检测。梯度条件如上文列出。

[0746] 通过HPLC分离。纯化分两步进行。用于半制备纯化的第一种方法概括如下。柱子:沃特斯 (Waters) Atlantis dC18, 30 \times 100mm, 5 μ m (p/n 186001375);流动相A:在水中的25% MeCN;流动相B:在水中的30%MeCN;流速:45mL/min;注射负荷:溶解在20mL水中的160mg。通过UV (205nm) 进行检测。

[0747] 梯度:

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

[0750] 第二次纯化使用相同的柱子和条件,但是为等度流动相:水中的20%MeCN。

[0751] MS和MS/MS。用装备有电喷雾电离源的Premier质谱仪的沃特斯 (Waters) QT产生MS和MS/MS数据。通过负ESI分析样品。用H₂O:MeCN (1:1) 以50倍稀释样品,并且使用机载的注射泵经由灌注将其引入。将样品稀释以产生良好的s/n,其在大约0.01mg/mL浓度时出现。

[0752] NMR。通过将约1.0mg溶解在150 μ L的D₂O中来准备样品,并在具有2.5mm反式检测探头的Bruker Avance 500MHz仪器上获得NMR数据。¹H NMR和¹³C NMR谱分别参考残余溶剂信号H₂O (δ_{H} 4.79ppm) 和TSP (δ_{C} 0.00ppm)。

[0753] 结果和讨论

[0754] 分离和纯化。对根据实例22用UGTSL (GI#460409128) 制备的批号为CB-2977-106的甜菊醇糖苷混合物进行分离。使用上述方法通过LC-MS对物质进行分析 (图6)。感兴趣的目

标峰是在TIC色谱图中的4.1分钟处的峰。这个峰的质谱提供了处于 m/z 1289.7的 $[M-H]^-$ 离子。使用以上提供的第一方法条件,以单次注射(160mg)初步处理提供的样品。这种方法将该物质分级为‘极性’和‘非极性’糖苷混合物。然后使用以上提供的第二步条件再处理该‘极性’混合物。从该半制备收集物中分离到具有>99% (CAD, AUC)纯度的峰。纯化之后,通过在35°C旋转蒸发将这些部分浓缩,并冻干。获得大约1mg。

[0755] 质谱分析法。通过灌注CC-00300的样品获得的ESI-TOF质谱显示出处于 m/z 1289.5266的 $[M-H]^-$ 离子。 $[M-H]^-$ 离子的质量与针对reb M2所预期的分子式 $C_{56}H_{90}O_{33}$ 很好的一致(对 $C_{56}H_{89}O_{33}$ 计算为:1289.5286,误差:-1.6ppm)。MS数据证实CC-00300具有1290道尔顿的标称质量,具有分子式 $C_{56}H_{90}O_{33}$ 。

[0756] MS/MS谱(选择处于 m/z 1289.5的 $[M-H]^-$ 离子进行碎片化)指示处于 m/z 803.3688的三个葡萄糖单元的丢失和处于 m/z 641.3165、479.2633和317.2082的三个葡萄糖部分的后续丢失。

[0757] NMR光谱学。进行一系列NMR实验,包括 1H NMR(图18)、 ^{13}C NMR(图19和20)、 1H - 1H COSY(图21)、HSQC-DEPT(图22)、HMBC(图23和24)、和1D-TOCSY,以允许对reb M2的指定。

[0758] 1H 、 1H - 1H COSY、 1H - ^{13}C HSQC-DEPT和 1H - ^{13}C HMBC NMR数据表明,该糖苷的中心核是二萜。在 1H 和 1H - ^{13}C HSQC-DEPT谱中观察到六个端基质子的存在证实了结构中的六糖单元。在 1H - ^{13}C HSQC-DEPT谱中的 δ_c 70.9处的亚甲基 ^{13}C 共振表明结构中的1 \rightarrow 6糖键的存在。使用 1H - ^{13}C HMBC和1D-TOCSY关联对糖单元的连接进行指定。

[0759] 从在 δ_H 1.29处的甲基质子到在 δ_c 181.5处的羰基的HMBC关联允许指定叔甲基基团(C-18)以及C-19之一,并且提供了用于指定其余糖苷配基的起点。从甲基质子(H-18)到在 δ_c 39.8、43.7、和59.2处的碳的另外的HMBC关联允许指定C3、C4、和C5。 1H - ^{13}C HSQC-DEPT数据的分析表明,在 δ_c 39.8处的碳为亚甲基并且在 δ_c 59.2处的碳为次甲基,其分别指定为C-3和C-5。这留下在 δ_c 43.7处的碳,其未显示在HSQC-DEPT谱中的关联,被指定为季碳,C-4。使用HSQC-DEPT数据指定对于C-3(δ_H 1.16和2.28)和C-5(δ_H 1.24)的 1H 化学位移。在H-3质子之一(δ_H 1.16)与在 δ_H 1.49处的质子之间的COSY关联允许指定H-2质子之一,所述H-2质子之一进而显示出与被指定为C-1的在 δ_H 0.92处的质子的关联。然后,基于另外的COSY和HSQC-DEPT关联,对C-1和C-2的剩余 1H 和 ^{13}C 化学位移进行指定,并概括在下表中。

[0760] Reb M2糖苷配基的 1H NMR(500MHz, D_2O)和 ^{13}C NMR(125MHz, D_2O /TSP)指定。

[0761]

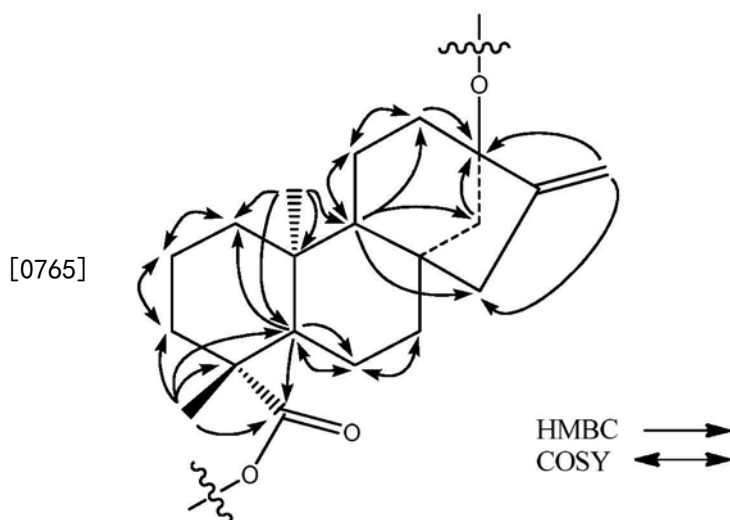
位置	^{13}C	^1H
1	41.9	0.92 m 1.93 m
2	21.8	1.49 m 1.86 m
3	39.8	1.16 m 2.28 d (13.4)
4	43.7	---
5	59.2	1.24 d (12.1)
6	24.4	1.73 m

		1.94 m
7	44.2	1.49 m 1.56 m
8	46.9	---
9	55.5	1.09 d (7.7)
10	42.4	---
11	22.6	1.66 m 1.70 m
12	39.9	1.60 m 2.00 m
[0762] 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	4.98 s 5.16 s
18	31.0	1.29 s
19	181.5	---
20	19.1	0.92 s

[0763] 在 δ_{H} 0.92处观察到的其他叔甲基单峰显示出与C-1和C-5的HMBC关联并且被指定为C-20。甲基质子显示出与分别被指定为C-10和C-9的季碳(δ_{C} 42.4)和次甲基(δ_{C} 55.5)的另外的HMBC关联。然后,在H-5(δ_{H} 1.24)与在 δ_{H} 1.73和1.94处的质子之间的COSY关联允许H-6质子的指定,该H-6质子进而显示出与被指定为C-7的在 δ_{H} 1.49和1.56处的质子的关联。然后根据HSQC-DEPT数据确定关于C-6(δ_{C} 24.4)和C-7(δ_{C} 44.2)的 ^{13}C 化学位移。在H-9(δ_{H} 1.09)与在 δ_{H} 1.66和1.70处的质子之间的COSY关联允许H-11质子的指定,该H-11质子进而显示出与被指定为H-12质子的在 δ_{H} 1.60和2.00处的质子的COSY关联。然后使用HSQC-DEPT数据来指定C-11(δ_{C} 22.6)和C-12(δ_{C} 39.9)。在 δ_{H} 4.98和5.16处观察到的烯属质子显示出与C-13(δ_{C} 90.9)的HMBC关联并且被指定为C-17(经由HSQC-DEPT为 δ_{C} 107.0)。烯属质子H-17显示出与被指定为C-15的在 δ_{C} 49.4处的碳的HMBC关联。然后,从H-9到在 δ_{C} 46.9处的亚甲基碳的另外的HMBC关联允许指定C-14。使用HSQC-DEPT数据指定在C-14(δ_{H} 1.53和

2.21) 和C-15 (δ_{H} 2.15和2.18) 处的 ^1H 化学位移。

[0764] 用来指定糖苷配基区域的关键HMBC和COSY关联的总结提供如下：



[0766] ^1H - ^{13}C HSQC-DEPT数据的分析证实了六个端基质子的存在。这些端基质子中的三个在 ^1H NMR谱中的 δ_{H} 5.65 (δ_{C} 95.5)、4.92 (δ_{C} 104.9)、和4.50 (δ_{C} 105.7) 处良好解析。在 δ_{H} 4.85 (δ_{C} 98.4)、4.84 (δ_{C} 105.0)、和4.83 (δ_{C} 105.3) 处观察到的剩余三个端基质子在 ^1H 谱中与残余溶剂共振重叠。在 δ_{H} 5.65处观察到的端基质子显示出与C-19的HMBC关联,表明它相对应于Glc_I的端基质子。类似地,在 δ_{H} 4.85处观察到的端基质子显示出与C-13的HMBC关联,从而允许它被指定为Glc_{II}的端基质子。

[0767] Glc_I端基质子 (δ_{H} 5.65) 显示出与在 δ_{H} 3.96处的质子(被指定为Glc_I H-2)的COSY关联,该在 δ_{H} 3.96处的质子进而显示出与在 δ_{H} 3.89处的质子(Glc_I H-3)的COSY关联,该在 δ_{H} 3.89处的质子显示出与在 δ_{H} 3.71处的质子(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,使用Glc_I端基质子的选择性照射以若干不同的混合时间进行一系列的1D-TOCSY实验。除了证实对Glc_I H-2到H-4的指定之外,1D-TOCSY数据还显示出在 δ_{H} 3.73处被指定为Glc_I H-5的质子和在 δ_{H} 4.15处被指定为Glc_I H-6质子之一的质子。后面的质子还用于1D-TOCSY实验。在若干不同的混合时间的情况下H-6的选择性照射还证实了Glc_I H-1到H-5以及H-6 (δ_{H} 4.00) 的剩余亚甲基质子的指定。使用 ^1H - ^{13}C HSQC-DEPT数据,确定关于Glc_I C-2 (δ_{C} 80.5)、C-3 (δ_{C} 79.0)、C-4 (δ_{C} 71.5)、C-5 (δ_{C} 79.0)、和C-6 (δ_{C} 70.9) 的 ^{13}C 化学位移的指定,从而完成Glc_I的指定。此外,在 ^1H - ^{13}C HSQC-DEPT谱中的 δ_{C} 70.9处的亚甲基 ^{13}C 共振的存在表明结构中Glc_I的1 \rightarrow 6糖键。

[0768] 基于HMBC关联,未指定的葡萄糖部分中的两个被指定为在Glc_I的C-2和C-6处的取代基。在 δ_{H} 4.83处观察到的端基质子显示出与Glc_I C-2的HMBC关联并且被指定为Glc_V的端基质子。在 δ_{H} 4.50处观察到的端基质子显示出与Glc_I C-6的HMBC关联并且被指定为Glc_{VI}的端基质子。还观察到从Glc_I H-2到Glc_V的端基碳以及从Glc_I H-6到Glc_{VI}的端基碳的相互HMBC关联。

[0769] Glc_V (δ_{H} 4.83) 的端基质子显示出与在 δ_{H} 3.32处的被指定为Glc_V H-2的质子的COSY关联。Glc_V H-2进而显示出与在 δ_{H} 3.51处的质子(Glc_V H-3)的COSY关联。此后者质子显示出与在 δ_{H} 3.38处的质子(Glc_V H-4)的另外的关联。H-4还显示出与在 δ_{H} 3.55处的质子(Glc_V H-5)的COSY关联,并且Glc_V H-5进而显示出与Glc_V H-6质子 (δ_{H} 3.76和3.97) 的COSY

关联。使用HSQC-DEPT数据,确定关于Glc_V C-2 (δ_c 78.5)、C-3 (δ_c 78.7)、C-4 (δ_c 72.9)、C-5 (δ_c 78.8)、和C-6 (δ_c 63.6)的¹³C化学位移的指定。从Glc_V H-3到C-2和C-4以及还有从Glc_V H-4到C-3和C-6的HMBC关联证实了以上做出的指定,从而完成Glc_V的指定。

[0770] 基于¹H-¹³C HSQC-DEPT和HMBC关联,另一个葡萄糖部分被指定为在Glc_I的C-6处的取代基。在HSQC-DEPT谱中的 δ_c 70.9处的Glc_I的亚甲基¹³C共振的相对低场位移指示了Glc_I的1→6糖键。在 δ_H 4.50处观察到的端基质子显示出与Glc_I C-6的HMBC关联并且被指定为Glc_{VI}的端基质子。类似地,Glc_I的亚甲基质子显示出与Glc_{VI}的端基碳的HMBC关联,并且这证实了在Glc_I与Glc_{VI}之间的1→6糖键的存在。Glc_{VI}端基质子显示出与在 δ_H 3.33处的质子(被指定为Glc_{VI} H-2)的COSY关联,该在 δ_H 3.33处的质子进而显示出与在 δ_H 3.49处的质子(Glc_{VI} H-3)的COSY关联。由于数据重叠,COSY谱不允许基于COSY关联对Glc_VH-4到H-6质子的指定。因此,使用Glc_{VI}端基质子的选择性照射以不同的混合时间进行一系列的1D-TOCSY实验。除了证实关于Glc_{VI} H-2到H-3的指定之外,该1D-TOCSY数据还显示出在 δ_H 3.45 (Glc_{VI} H-4)和 δ_H 3.48 (Glc_{VI} H-5)处的质子以及被指定针对Glc_{VI} H-6质子的在 δ_H 3.92和3.94处的质子。使用¹H-¹³C HSQC-DEPT数据,确定关于Glc_{VI} C-2 (δ_c 78.1)、C-3 (δ_c 78.6)、C-4 (δ_c 72.3)、C-5 (δ_c 78.8)、和C-6 (δ_c 64.1)的¹³C化学位移的指定,从而完成Glc_{VI}的指定。

[0771] 关于在C-19处的糖苷的¹H和¹³C化学位移的总结发现在下列表中:

[0772] Reb M2糖苷的¹H NMR (500MHz, D₂O) 和¹³C NMR (125MHz, D₂O/TSP) 指定。

[0773]

位置	^{13}C	^1H
Glc _I -1	95.5	5.65 d (7.6)
Glc _I -2	80.5	3.96 m
Glc _I -3	79.0	3.89 m
Glc _I -4	71.5	3.71 m
Glc _I -5	79.0	3.73 m
Glc _I -6	70.9	4.00 m 4.15 d (11.7)
Glc _V -1	105.3*	4.83* d (8.0)
Glc _V -2	78.5	3.32 m
Glc _V -3	78.7	3.51 m
Glc _V -4	72.9	3.38 m
Glc _V -5	78.8	3.55 m
Glc _V -6	63.6	3.76 m 3.97 m
Glc _{VI} -1	105.7	4.50 d (7.9)
Glc _{VI} -2	78.1	3.33 m
Glc _{VI} -3	78.6	3.49 m
Glc _{VI} -4	72.3	3.45 m
Glc _{VI} -5	78.8	3.48 m
Glc _{VI} -6	64.1	3.92 m 3.94 m

[0774] * ^1H 和 ^{13}C 值可与下表的Glc_{IV}-1互换。

[0775] 用来指定C-19糖苷区域的关键HMBC、COSY、和1D-TOCSY关联的总结提供如下：

[0776] Reb M2糖苷的 ^1H NMR (500MHz, D₂O) 和 ^{13}C NMR (125MHz, D₂O/TSP) 指定。

[0777]

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

[0778] 以类似的方式进行Glc_{II}的指定。Glc_{II}端基质子(δ_{H} 4.85)显示出与在 δ_{H} 3.75处的质子(被指定为Glc_{II} H-2)的COSY关联,该在 δ_{H} 3.75处的质子进而显示出与在 δ_{H} 3.98处的质子(Glc_{II} H-3)的COSY关联。此后者质子显示出与在 δ_{H} 3.54处的质子(Glc_{II} H-4)的另外的关联。H-4也显示出与在 δ_{H} 3.96处的质子(Glc_{II} H-5)的COSY关联。Glc_{II} H-5还显示出与Glc_{II} H-6质子(δ_{H} 3.77和3.45)的COSY关联。使用HSQC-DEPT数据,确定关于Glc_{II} C-2(δ_{C} 81.7)、C-3(δ_{C} 88.0)、C-4(δ_{C} 71.3)、C-5(δ_{C} 80.5)、和C-6(δ_{C} 63.6)的 ^{13}C 化学位移的指定。从Glc_{II} H-3到C-2和C-4以及还有从Glc_{II} H-4到C-3和C-6的HMBC关联证实了以上做出的指定,从而完成Glc_{II}的指定。

[0779] 基于HMBC关联,剩余未指定的葡萄糖部分中的两个被指定为在Glc_{II}的C-2和C-3处的取代基。在 δ_{H} 4.92处观察到的端基质子显示出与Glc_{II} C-2的HMBC关联并且被指定为

Glc_{III}的端基质子。在 δ_{H} 4.84处观察到的端基质子显示出与Glc_{II} C-3的HMBC关联并且被指定为Glc_{IV}的端基质子。还观察到在Glc_{II} H-2与Glc_{III}的端基碳之间以及在Glc_{II} H-3与Glc_{IV}的端基碳之间的相互HMBC关联。

[0780] Glc_{III} (δ_{H} 4.92) 的端基质子显示出与在 δ_{H} 3.32处的被指定为Glc_{III} H-2的质子的COSY关联。由于数据重叠, COSY谱不允许H-3到H-6质子的指定。因此, 使用Glc_{III}端基质子的选择性照射以不同的混合时间进行一系列的1D-TOCSY实验。除了证实关于Glc_{III} H-2的指定之外, 该1D-TOCSY数据还显示出在 δ_{H} 3.51 (Glc_{III} H-3)、 δ_{H} 3.26 (Glc_{III} H-4)、和 δ_{H} 3.44 (Glc_{III} H-5) 处的质子。一旦使用1D-TOCSY数据将H-4指定, 就使用从H-4到H-5以及进而到H-6的COSY关联来指定H-6。在COSY谱中, Glc_{III} H-4显示出与Glc_{III} H-5的关联, 该Glc_{III} H-5进而显示出对应地与Glc_{III} H-6a和H-6b的 δ_{H} 3.94和3.75的COSY关联。然后使用 ^1H - ^{13}C HSQC-DEPT关联, 确定关于Glc_{III} C-2 (δ_{C} 76.3)、C-3 (δ_{C} 78.8)、C-4 (δ_{C} 73.3)、C-5 (δ_{C} 78.8)、和C-6 (δ_{C} 64.4) 的 ^{13}C 化学位移, 从而完成Glc_{III}的指定。

[0781] 显示出与在 δ_{H} 3.41的质子的COSY关联的Glc_{IV}的端基质子 (δ_{H} 4.84) 被指定为Glc_{IV} H-2, 该Glc_{IV} H-2进而显示出与在 δ_{H} 3.46处的质子 (Glc_{IV} H-3) 的COSY关联。此后者质子显示出与在 δ_{H} 3.45处的质子 (Glc_{IV} H-4) 的额外关联, 该在 δ_{H} 3.45处的质子还显示出与在 δ_{H} 3.75处的质子 (Glc_{IV} H-5) 的COSY关联。Glc_{IV} H-5还显示出与Glc_{IV} H-6质子 (δ_{H} 3.55和3.78) 的COSY关联。使用HSQC-DEPT数据, 确定关于Glc_{IV} C-2 (δ_{C} 76.1)、C-3 (δ_{C} 78.8)、C-4 (δ_{C} 72.5)、C-5 (δ_{C} 81.7)、和C-6 (δ_{C} 65.8) 的 ^{13}C 化学位移的指定。从Glc_{IV} H-3到C-4和C-5以及还有从Glc_{IV} H-4到C-3和C-6的HMBC关联证实了以上做出的指定, 从而完成Glc_{IV}的指定。

[0782] 关于在C-13处的糖苷的 ^1H 和 ^{13}C 化学位移的总结发现在下列表中:

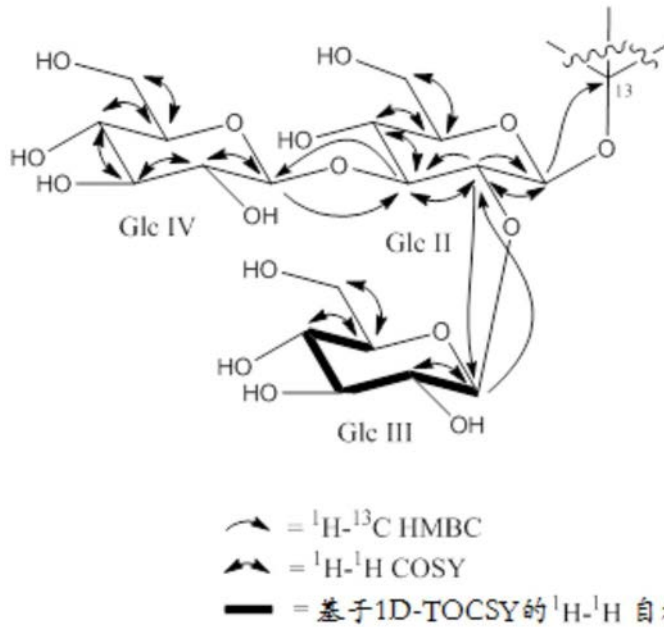
[0783] Reb M2糖苷的 ^1H NMR (500MHz, D_2O) 和 ^{13}C NMR (125MHz, $\text{D}_2\text{O}/\text{TSP}$) 指定。

[0784]

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

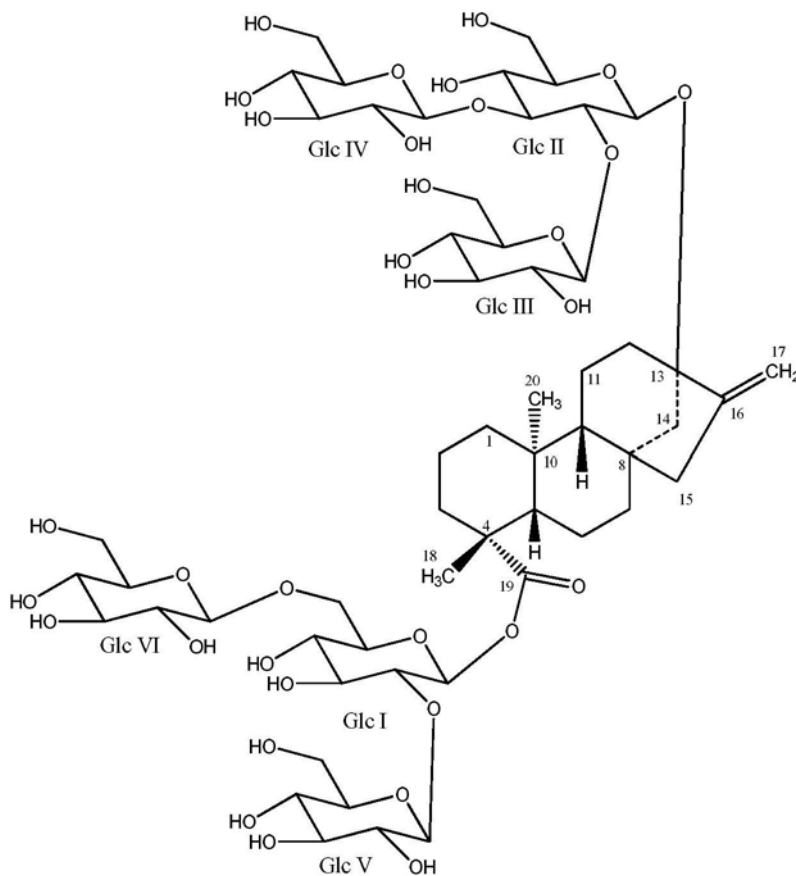
[0785] 用来指定C-13糖苷区域的关键HMBC、COSY、和1D-TOCSY关联的总结提供如下：

[0786]



[0787] NMR和MS分析允许以下显示的其结构中的完全指定。该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] (莱鲍迪昔M2或reb M2)。该化合物是莱鲍迪昔M的异构体。

[0788]



[0789] 实例41

[0790] 用于莱鲍迪昔D到莱鲍迪昔M的转化的UGT76G1的定向演化(第2轮)

[0791] 选择来自UGT76G1的第一轮定向演化的最有活性的克隆(参见实例26,含有突变

Q266E_P272A_R334K_G348P_L379G的UGT76G1var94) 作为第2轮的基线克隆。建立了53种突变的清单,该清单含有来自第一轮的鉴定的不同正突变和通过DNA2.0 ProteinGPStm策略获得的新突变。这个突变清单随后用于设计92个变体基因,这些变体基因各自含有3个不同的突变。针对在大肠杆菌中表达进行密码子优化之后,合成了这些基因,将其亚克隆到pET30a+质粒中并且用于转化大肠杆菌BL21 (DE3) 化学感受态细胞。使获得的细胞在卡那霉素的存在下在培养皿中在固体LB琼脂培养基上生长。选择适合的菌落,并使其在试管中的液体LB培养基中生长。将甘油作为冷冻保护剂添加到悬液中并且将400 μ L的等分试样在-20 $^{\circ}$ C和在-80 $^{\circ}$ C下储存。

[0792] 将含有pET30a+_UGT76G1var质粒的大肠杆菌BL21 (DE3) 的这些贮存等分试样解冻,并将其添加至LBGKP培养基 (20g/L Luria Broth Lennox;50mM PIPES缓冲液pH 7.00;50mM磷酸盐缓冲液pH 7.00;2.5g/L葡萄糖和50mg/L卡那霉素)。在30 $^{\circ}$ C下,在振摇下在96微量滴定板中进行此培养持续8h。

[0793] 用50 μ L的上述培养物接种含有60g/L的过夜快速表达TB培养基 (Overnight ExpressTM Instant TB medium) (Novagen[®]),10g/L的甘油和50mg/L的卡那霉素的3.95mL的生产培养基。在20 $^{\circ}$ C在48深孔板中搅拌所得培养物。培养物产生显著的生长并获得了良好的OD (600nm)。44小时后,通过离心收获细胞,并将其冷冻。

[0794] 通过向解冻的细胞添加 Bugbuster[®]母混合物(Novagen[®])进行裂解,并通过离心回收裂解物。用100 μ L的新鲜裂解物进行活性测试,该裂解物被添加到在50mM磷酸盐缓冲液 (pH 7.2) 中的莱鲍迪昔D (终浓度0.5mM)、MgCl₂ (终浓度3mM) 和UDP-葡萄糖 (终浓度2.5mM) 的溶液中。

[0795] 使反应在30 $^{\circ}$ C下进行,并且在2、4、7和24小时之后取样。为了通过HPLC (CAD检测) 确定转化和初始速率,使用上述的用于莱鲍迪昔D到莱鲍迪昔M的转化的分析方法。用基线克隆第1轮-Var94并行地进行实验。在22h之后转化。并且,针对这个基线克隆的初始速率被定义为100%,且对于第2轮克隆的归一化转化率和初始速率描绘在下表中:

[0796]

克隆	突变*	在 22 小时之后 Reb D 到 Reb M 的归一化转化率。	归一化初始速率 (0-4 h)
第 1 轮-Var94	UGT76G1 (Q266E_P272A_R334K_G348P_L379G) 基线克隆	100%	100%
第 2 轮-Var1	第 1 轮-Var94 (A213N_P348G_I411V)	70%	86%
第 2 轮-Var2	第 1 轮-Var94 (K303G_I423M_Q425E)	120%	134%
第 2 轮-Var3	第 1 轮-Var94 (V20L_N138K_S147G)	14%	15%
第 2 轮-Var4	第 1 轮-Var94 (I16V_V133A_L299I)	37%	43%
第 2 轮-Var5	第 1 轮-Var94 (S241V_S274G_Q432E)	75%	72%
第 2 轮-Var6	第 1 轮-Var94 (I16V_L139V_I218V)	62%	68%
第 2 轮-Var7	第 1 轮-Var94 (K334R_N409K_Q432E)	104%	92%
第 2 轮-Var8	第 1 轮-Var94 (I15L_R141T_I407V)	17%	26%
第 2 轮-Var9	第 1 轮-Var94 (R141T_K303G_G379L)	31%	42%
第 2 轮-Var10	第 1 轮-Var94 (I190L_K303G_P348G)	131%	149%
第 2 轮-Var11	第 1 轮-Var94 (E266Q_F314S_N409R)	106%	132%
第 2 轮-Var12	第 1 轮-Var94 (V133A_I295V_K303G)	43%	49%
第 2 轮-Var13	第 1 轮-Var94 (I16V_S241V_N409R)	80%	79%
第 2 轮-Var14	第 1 轮-Var94 (A239V_K334R_G379L)	58%	55%
第 2 轮-Var15	第 1 轮-Var94 (I190L_K393R_V396L)	118%	126%
第 2 轮-Var16	第 1 轮-Var94 (L101F_I295M_K393R)	84%	89%
第 2 轮-Var17	第 1 轮-Var94 (A239V_E266Q_Q425E)	96%	101%
第 2 轮-Var18	第 1 轮-Var94 (V20L_I190L_I423M)	98%	98%

[0797]

克隆	突变*	在 22 小时之后 Reb D 到 Reb M 的归一化转化率。	归一化初始速率 (0-4 h)
第 2 轮-Var19	第 1 轮-Var94 (V20L_G379L_S456L)	84%	81%
第 2 轮-Var20	第 1 轮-Var94 (K334R_P348G_N409R)	73%	73%
第 2 轮-Var21	第 1 轮-Var94 (E231A_S241V_E449D)	53%	50%
第 2 轮-Var22	第 1 轮-Var94 (K188R_L299I_V394I)	56%	59%
第 2 轮-Var23	第 1 轮-Var94 (E231A_S274G_V394I)	110%	124%
第 2 轮-Var24	第 1 轮-Var94 (S42A_I295V_Q432E)	71%	78%
第 2 轮-Var25	第 1 轮-Var94 (A213N_A272P_K334R)	95%	80%
第 2 轮-Var26	第 1 轮-Var94 (L158Y_S274K_N409K)	80%	50%
第 2 轮-Var27	第 1 轮-Var94 (K188R_I295M_Q425E)	132%	116%
第 2 轮-Var28	第 1 轮-Var94 (I15L_I295M_V394I)	53%	36%
第 2 轮-Var29	第 1 轮-Var94 (V133A_A239V_V394I)	47%	30%
第 2 轮-Var30	第 1 轮-Var94 (L158Y_F314S_K316R)	107%	72%
第 2 轮-Var31	第 1 轮-Var94 (L158Y_A239V_A272P)	54%	30%
第 2 轮-Var32	第 1 轮-Var94 (F46I_D301N_V396L)	109%	101%
第 2 轮-Var33	第 1 轮-Var94 (L101F_I218V_Q432E)	78%	54%
第 2 轮-Var34	第 1 轮-Var94 (I16V_F46I_I295M)	110%	95%
第 2 轮-Var35	第 1 轮-Var94 (A213N_E266S_I407V)	98%	79%
第 2 轮-Var36	第 1 轮-Var94 (A239V_S274K_I295M)	102%	89%
第 2 轮-Var37	第 1 轮-Var94 (A239V_F314S_S450K)	105%	99%
第 2 轮-Var38	第 1 轮-Var94 (L139V_K188R_D301N)	66%	51%
第 2 轮-Var39	第 1 轮-Var94 (I45V_I218V_S274K)	87%	58%
第 2 轮-Var40	第 1 轮-Var94 (S241V_K303G_V394I)	78%	57%

[0798]

克隆	突变*	在 22 小时之后 Reb D 到 Reb M 的归一化转化率。	归一化初始速率 (0-4 h)
第 2 轮-Var41	第 1 轮-Var94 (R141T_S274G_K334R)	41%	28%
第 2 轮-Var42	第 1 轮-Var94 (V217L_S274G_L299I)	47%	34%
第 2 轮-Var43	第 1 轮-Var94 (S274G_D301N_P348G)	98%	91%
第 2 轮-Var44	第 1 轮-Var94 (E231A_N409R_S450K)	87%	65%
第 2 轮-Var45	第 1 轮-Var94 (R64H_E231A_K316R)	88%	64%
第 2 轮-Var46	第 1 轮-Var94 (V394I_N409K_I411V)	110%	100%
第 2 轮-Var47	第 1 轮-Var94 (I45V_I295M_K303G)	113%	88%
第 2 轮-Var48	第 1 轮-Var94 (L101F_V396L_L398V)	46%	43%
第 2 轮-Var49	第 1 轮-Var94 (N27S_L101F_S447A)	54%	37%
第 2 轮-Var50	第 1 轮-Var94 (S274G_F314S_L398V)	129%	156%
第 2 轮-Var51	第 1 轮-Var94 (E266Q_L299I_K393R)	70%	51%
第 2 轮-Var52	第 1 轮-Var94 (V217L_E266S_V394I)	62%	48%
第 2 轮-Var53	第 1 轮-Var94 (N138K_A272P_N409R)	118%	102%
第 2 轮-Var54	第 1 轮-Var94 (E266S_F314S_Q432E)	124%	146%
第 2 轮-Var55	第 1 轮-Var94 (D301N_G379L_L398V)	56%	45%
第 2 轮-Var56	第 1 轮-Var94 (F46I_E266S_K334R)	123%	142%
第 2 轮-Var57	第 1 轮-Var94 (A272P_V394I_Q432E)	133%	142%
第 2 轮-Var58	第 1 轮-Var94 (V394I_I407V_S456L)	118%	114%
第 2 轮-Var59	第 1 轮-Var94 (I218V_E266Q_I423M)	106%	98%
第 2 轮-Var60	第 1 轮-Var94 (A272P_G379L_I407V)	80%	63%
第 2 轮-Var61	第 1 轮-Var94 (E231A_K303G_S456L)	113%	110%
第 2 轮-Var62	第 1 轮-Var94 (I190L_E266Q_I407V)	150%	167%

[0799]

克隆	突变*	在 22 小时之后 Reb D 到 Reb M 的归一化转化率。	归一化初始速率 (0-4 h)
第 2 轮-Var63	第 1 轮-Var94 (N27S_L139V_I295V)	43%	25%
第 2 轮-Var64	第 1 轮-Var94 (V217L_I423M_S447A)	67%	51%
第 2 轮-Var65	第 1 轮-Var94 (L158Y_E266S_E449D)	68%	43%
第 2 轮-Var66	第 1 轮-Var94 (S42A_F46I_I407V)	160%	203%
第 2 轮-Var67	第 1 轮-Var94 (N138K_E231A_D301N)	118%	93%
第 2 轮-Var68	第 1 轮-Var94 (K188R_G379L_N409R)	52%	35%
第 2 轮-Var69	第 1 轮-Var94 (I15L_E231A_V396L)	38%	22%
第 2 轮-Var70	第 1 轮-Var94 (E231A_Q425E_Q432E)	115%	119%
第 2 轮-Var71	第 1 轮-Var94 (D301N_K316R_Q425E)	126%	121%
第 2 轮-Var72	第 1 轮-Var94 (L139V_I295M_F314S)	76%	91%
第 2 轮-Var73	第 1 轮-Var94 (S147G_E266S_D301N)	30%	18%
第 2 轮-Var74	第 1 轮-Var94 (R64H_S147G_S447A)	23%	12%
第 2 轮-Var75	第 1 轮-Var94 (S42A_K303G_L398V)	95%	110%
第 2 轮-Var76	第 1 轮-Var94 (I45V_D301N_E449D)	62%	60%
第 2 轮-Var77	第 1 轮-Var94 (V133A_E266S_I411V)	37%	28%
第 2 轮-Var78	第 1 轮-Var94 (I45V_N409R_Q425E)	63%	59%
第 2 轮-Var79	第 1 轮-Var94 (R141T_A272P_F314S)	23%	10%
第 2 轮-Var80	第 1 轮-Var94 (E266S_S274G_N409R)	81%	91%
第 2 轮-Var81	第 1 轮-Var94 (N409K_Q425E_S450K)	81%	84%
第 2 轮-Var82	第 1 轮-Var94 (N27S_R64H_K393R)	47%	37%
第 2 轮-Var83	第 1 轮-Var94 (S42A_A213N_V217L)	62%	46%
第 2 轮-Var84	第 1 轮-Var94 (N27S_S274K_I407V)	49%	44%

克隆	突变*	在 22 小时之后 Reb D 到 Reb M 的归一化转化率。	归一化初始速率 (0-4 h)
[0800] 第 2 轮-Var85	第 1 轮-Var94 (I411V_Q425E_S456L)	75%	81%
第 2 轮-Var86	第 1 轮-Var94 (A239V_K316R_E449D)	83%	72%
第 2 轮-Var87	第 1 轮-Var94 (S147G_A239V_P348G)	18%	7%
第 2 轮-Var88	第 1 轮-Var94 (V20L_S274G_S450K)	71%	68%
第 2 轮-Var89	第 1 轮-Var94 (F314S_V394I_S447A)	88%	123%
第 2 轮-Var90	第 1 轮-Var94 (R64H_E266Q_I295M)	45%	47%
第 2 轮-Var91	第 1 轮-Var94 (N138K_I295V_I407V)	50%	51%
第 2 轮-Var92	第 1 轮-Var94 (I15L_P348G_Q432E)	18%	13%

[0801] *突变标注如下：参考基因-原始氨基酸-位置-新的氨基酸：例如，对于来自 UGT76G1 的第一轮定向演化的变体 94，在位置 33 处的丙氨酸突变为甘氨酸被标注为第 1 轮-Var94 (A33G)

[0802] 这些结果的建模允许获得每个突变的效应的分级。以下突变被确定为对于活性是有益的：S42A、F46I、I190L、S274G、I295M、K303G、F314S、K316R、K393R、V394I、I407V、N409K、N409R、Q425E、Q432E、S447A、S456L。

[0803] 实例 42

[0804] AtSUS 的体内产生

[0805] AtSUS

[0806] >gi|79328294|ref|NP_001031915.1|蔗糖合酶 1 [拟南芥]

[0807] MANAERMITRVHSQRERLNETLVSERNEVLALLSRVEAKGKGIQQNQI IAEFEALPEQTRKKLEGGP
FFDLLKSTQEAIVLPPWVALAVRPRPGVWEYLRVNLHALVVEELQPAEFLHFKEELVDGVKNGNFTLELDFEPFNA
SIPRPTLHKYIIGNGVDFLNRHLSAKLFHDKESLLPLLKFLRLHSHQGKNLMLSEKIQLNLTQLHTLRKAEYYLAEL
KSETLYEEFEAKFEEIGLERGWGDAERVLDMIRLLLDLLEAPDPCTLETFLGRVPMVFNVVILSPHGYFAQDNVL
GYPDTGGQVVYILDQVRALEIEMLQRIKQQGLNIKPRILILTRLLPDAVGTTCGERLERVYDSEYCDILRVPFRTE
KGIVRKWISRFEVWPYLETYTEDAAVELSKELNGKPDLIIGNYSDGNLVAALLAHKLGVTQCTIAHALEKTKYPDS
DIYWKLLDDKYHFSCQFTADIFAMNHTDFIITSTFQEIAGSKETVGGYESHTAFTLPLGLYRVVHGIDVDFPKFNIV
SPGADMSIYFPYTEEKRRRLTKFHSEIEELLYSDVENKEHLCVLKDKKKPILFTMARLDRVKNLSGLVEWYGKNTL
RELANLVVVGDRRRESKDNEEKAEMKKMYDLIEEYKLNQQRWISSQMDRVRNGELYRYICDTKGAFVQPALYEA
FGLTVVEAMTCGLPTFATCKGGPAEIIVHGKSGFHIDPYHGDQAADTLADFFTKCKEDPSHWDEISKGGLQRIEEK
YTWQIYSQRLTLTGVIYGFVKHVSNDRLREARRYLEMFYALKYRPLAQVPLAQDD (SEQ ID NO:13)。

[0808] 将合成的 AtSUS 基因针对在大肠杆菌中表达进行密码子优化并使用 NdeI 和 XhoI 限制性位点将其亚克隆到 pET30a+ 质粒中。使用含有 AtSUS 基因的 pET30A+ 载体来转化电感受

态的大肠杆菌B121 (DE3) 细胞。将获得的细胞在卡那霉素存在的情况下培养在培养皿中,并选择适当的菌落,并让其在液体LB培养基(埃伦迈尔烧瓶)中生长。将甘油作为冷冻保护剂添加到悬液中并且将400 μ L的等分试样在-20 $^{\circ}$ C和在-80 $^{\circ}$ C下储存。

[0809] 将含有pET30A+_AtSUS质粒的大肠杆菌BL21 (DE3) 的贮存等分试样解冻,并将其添加至30mL的LBGKP培养基(20g/L Luria Broth Lennox;50mM PIPES缓冲液pH 7.00;50mM磷酸盐缓冲液pH 7.00;2.5g/L葡萄糖和50mg/L卡那霉素)。在135rpm振摇下在30 $^{\circ}$ C进行此培养持续8h。

[0810] 该生产培养基含有60g/L的过夜快速表达TB培养基(Novagen公司)、10g/L的甘油和50mg/L的卡那霉素。将预培养物添加到800mL的该培养基中并且将该溶液在20 $^{\circ}$ C搅拌,同时取样品测量OD和pH。培养物产生显著的生长并获得了良好的OD。40小时后,通过离心收获细胞,将其冷冻,获得30.1g的细胞湿重。

[0811] 通过Fastprep(MP Biomedicals,裂解基质B,速度6.0,3x 40秒)用细胞悬液进行裂解,该细胞悬液具有在1.0mL的50mM Tris缓冲液(pH 7.5)中的200mg细胞。通过离心回收裂解物并趁新鲜使用。

[0812] 实例43

[0813] 使用UGTSL2、UGT76G1-R1-F12和AtSUS以原位制备的UDP-葡萄糖进行莱鲍迪昔A到莱鲍迪昔M的转化

[0814] 使用在磷酸钾缓冲液(50mM终浓度,pH 7.5)中的100mM的蔗糖、3mM的MgCl₂、0.25mM的UDP和0.5mM的莱鲍迪昔A,以1mL规模进行反应。通过添加15 μ L的UGTSL2(参见实例27)裂解物(2U/mL)、150 μ L的UGT76G1var94(参见实例26)(2.5U/mL)和15 μ L的AtSUS(参见实例42)(400U/mL)开始反应。反应后,用10 μ L的2N H₂SO₄和115 μ L的60%甲醇淬灭125 μ L样品,之后进行HPLC。在反应时间21小时之后,获得68%的莱鲍迪昔M和26%的莱鲍迪昔M2。

序列表

- <110> 可口可乐公司
- 皮尔瑟克私人有限公司(PureCircle Sdn Bhd)
- 因德拉·普拉卡什(Prakash, Indra)
- 辛西娅·邦德斯(Bunders, Cynthia)
- 潘卡杰·索尼(Soni, Pankaj)
- 阿韦季克·马科西安(Markosyan, Avetik)
- 加林·西里尔(Cyrille, Jarrin)
- 奥雷利安·巴迪(Badie, Aurelien)
- 罗贝尔·泰·阿莱(ter Halle, Robert)
- <120> 高纯度的甜菊醇糖苷
- <130> 12600.105134
- <150> US 61/827,922
- <151> 2013-05-28
- <150> US 61/843,544
- <151> 2013-07-28
- <150> US 61/861,528
- <151> 2013-08-02
- <150> US 61/881,166
- <151> 2013-09-23
- <150> US 61/885,084
- <151> 2013-10-01
- <150> US 61/904,751
- <151> 2013-11-15
- <150> US 61/913,482
- <151> 2013-12-09
- <150> US 61/921,635
- <151> 2013-12-30
- <150> US 61/925,329
- <151> 2014-01-09
- <150> US 61/939,855
- <151> 2014-02-14
- <160> 13
- <170> PatentIn 3.5版
- <210> 1
- <211> 1397
- <212> DNA
- <213> 甜叶菊

<400> 1

ccatggccca tatgaaaac aaaaccgaaa ccaccgttcg tcgtcgtcgc cgtattattc 60
 tgtttccggg tccgtttcag ggtcatatta atccgattct gcagctggca aatgtgctgt 120
 atagcaaagg ttttagcatt accatthttc ataccaatth taacaaaccg aaaaccagca 180
 attatccgca ttttaccttt cgctttattc tggataatga tccgcaggat gaacgcatta 240
 gcaatctgcc gacacatggt ccgctggcag gtatgcgtat tccgattatt aacgaacatg 300
 gtgcagatga actgcgtcgt gaactggaac tgctgatgct ggcaagcga gaagatgaag 360
 aagttagctg tctgattacc gatgcactgt ggtatthttgc acagagcgtt gcagatagcc 420
 tgaatctgcg tcgtctggtt ctgatgacca gcagcctggt taactthtcat gcacatgtta 480
 gcctgccgca gtttgatgaa ctgggttatac tggatccgga tgataaaacc cgtctggaag 540
 aacaggcaag cggthttccg atgctgaaag tgaagatat caaaagcgc tatagcaatt 600
 ggcagattct gaaagaaatt ctgggcaaaa tgattaaaca gaccaaagca agcagcgggtg 660
 ttatthtgaa tagctthtaa gaactggaag aaagcgaact ggaaaccgtg attcgtgaa 720
 ttccggcacc gagctthctg attccgctgc cgaaacatct gaccgcaagc agcagcagcc 780
 tgctggatca tgatcgtacc gthtttcagt ggctggatca gcagcctccg agcagcgttc 840
 tgtatgttag cthttgtagc accagcgaag ttgatgaaaa agatthttctg gaaattgccc 900
 gtggtctggt tgatagcaaa cagagctthc tgtgggttgt tcgtccgggt thttgthaaag 960
 gtagcacctg ggttgaaccg ctgccggatg gthttctggg tgaacgtggt cgtattgtta 1020
 aatgggttcc gcagcaagaa gttctggcac acggcgaat tgggtcattt tggaccata 1080
 gcggttgaa tagcacctg gaaagcgtt gtgaaggtgt tccgatgatt thtagcgatt 1140
 ttggtctgga tcagccgctg aatgcacgtt atatgagtga tgttctgaaa gtgggtgtgt 1200
 atctggaaaa tggttggaa cgtggtgaaa ttgcaaatgc aatcgtcgt gttatggtgg 1260
 atgaagaagg tgaatatatt cgtcagaatg cccgtgttct gaaacagaaa gcagatgtta 1320
 gcctgatgaa aggtggtagc agctatgaaa gcctggaaag tctggttagc tatattagca 1380
 gcctgtaata actcgag 1397

<210> 2

<211> 1442

<212> DNA

<213> 甜叶菊

<400> 2

ccatggcaca tatggcaacc agcgatagca ttgttgatga tcgtaaacag ctgcatgttg 60
 caacctttcc gtggctggca tttggtcata ttctgcegta tctgcagctg agcaaactga 120
 ttgcagaaaa aggtcataaa gtgagctthc tgagcaccac ccgtaatat cagcgtctga 180
 gcagccatat tagtccgctg attaatgttg ttcagctgac cctgcctcgt gttcaagaac 240
 tgccggaaga tgccgaagca accaccgatg ttcacccgga agatattccg tatctgaaaa 300
 aagcaagtga tggctctgcag ccggaagtta cccgtthttct ggaacagcat agtccggtt 360
 ggatcatcta tgattatacc cattattggc tgccgagcat tgcagcaagc ctgggtatta 420
 gccgtgcaca ttttagcgtt accaccccgt gggcaattgc atatatgggt ccgagcgcag 480
 atgcaatgat taatggtagt gatggtcgtta ccaccgttga agatctgacc acccctccga 540

aatggtttcc gtttccgacc aaagtttggt ggcgtaaaca tgatctggca cgtctggttc 600
cgtataaagc accgggtatt agtgatgggt atcgtatggg tctggttctg aaaggtagcg 660
attgtctgct gagcaaatgc tatcatgaat ttggcaccca gtggctgccg ctgctggaaa 720
ccctgcatca ggttccggtt gttccggtgg gtctgctgcc tccggaagtt ccgggtgatg 780
aaaaagatga aacctggggt agcatcaaaa aatggctgga tggtaaacag aaaggtagcg 840
tggtttatgt tgcactgggt agcgaagttc tggtagcca gaccgaagtt gttgaactgg 900
cactgggtct ggaactgagc ggtctgccgt ttgtttgggc atatcgtaaa ccgaaaggtc 960
cggcaaaaag cgatagcgtt gaactgccgg atggttttgt tgaacgtacc cgtgatcgtg 1020
gtctggtttg gaccagctgg gcacctcagc tgcgtattct gagccatgaa agcgtttgtg 1080
gttttctgac ccattgtggt agcggtagca ttgtggaagg tctgatgttt ggtcatccgc 1140
tgattatgct gccgattttt ggtgatcagc cgctgaatgc acgtctgctg gaagataaac 1200
aggttggtat taaaattccg cgtaatgaag aagatggttg cctgaccaa gaaagcgttg 1260
cacgtagcct gcgtagcgtt gttgttgaag aagaaggcga aatctataaa gccaatgcac 1320
gtgaactgag caaaatctat aatgatacca aagtggaaaa agaatatgtg agccagttcg 1380
tggattatct ggaaaaaac acccgtgcag ttgccattga tcacgaaagc taatgactcg 1440
ag 1442

<210> 3

<211> 472

<212> PRT

<213> 水稻

<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
							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
 145 150 155 160
 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
 225 230 235 240
 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
 305 310 315 320
 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
 385 390 395 400
 Arg Asn Asp Glu Asp Gly Ser Phe Asp Arg Gly Gly Val Ala Gly Ala
 405 410 415
 Val Arg Ala Val Val Val Glu Glu Glu Gly Lys Thr Phe Phe Ala Asn
 420 425 430
 Ala Arg Lys Leu Gln Glu Ile Val Ala Asp Arg Glu Arg Glu Glu Arg
 435 440 445
 Cys Ile Asp Glu Phe Val Gln His Leu Thr Ser Trp Asn Glu Leu Lys

450	455	460
Asn Asn Ser Asp Gly Gln Tyr Pro		
465	470	
<210> 4		
<211> 502		
<212> PRT		
<213> 糙伏毛燕麦		
<400> 4		
Met Ala Val Lys Asp Glu Gln Gln Ser Pro Leu His Ile Leu Leu Phe		
1	5	10
Pro Phe Leu Ala Pro Gly His Leu Ile Pro Ile Ala Asp Met Ala Ala		
	20	25
Leu Phe Ala Ser Arg Gly Val Arg Cys Thr Ile Leu Thr Thr Pro Val		
	35	40
Asn Ala Ala Ile Ile Arg Ser Ala Val Asp Arg Ala Asn Asp Ala Phe		
	50	55
Arg Gly Ser Asp Cys Pro Ala Ile Asp Ile Ser Val Val Pro Phe Pro		
65	70	75
Asp Val Gly Leu Pro Pro Gly Val Glu Asn Gly Asn Ala Leu Thr Ser		
	85	90
Pro Ala Asp Arg Leu Lys Phe Phe Gln Ala Val Ala Glu Leu Arg Glu		
	100	105
Pro Phe Asp Arg Phe Leu Ala Asp Asn His Pro Asp Ala Val Val Ser		
	115	120
Asp Ser Phe Phe His Trp Ser Thr Asp Ala Ala Ala Glu His Gly Val		
	130	135
Pro Arg Leu Gly Phe Leu Gly Ser Ser Met Phe Ala Gly Ser Cys Asn		
145	150	155
Glu Ser Thr Leu His Asn Asn Pro Leu Glu Thr Ala Ala Asp Asp Pro		
	165	170
Asp Ala Leu Val Ser Leu Pro Gly Leu Pro His Arg Val Glu Leu Arg		
	180	185
Arg Ser Gln Met Met Asp Pro Lys Lys Arg Pro Asp His Trp Ala Leu		
	195	200
Leu Glu Ser Val Asn Ala Ala Asp Gln Lys Ser Phe Gly Glu Val Phe		
	210	215
Asn Ser Phe His Glu Leu Glu Pro Asp Tyr Val Glu His Tyr Gln Thr		
225	230	235
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
Pro Thr Asn Asp Gly Leu			
	500		
<210> 5			
<211> 470			
<212> PRT			
<213> 番茄			
<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
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
 <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
 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
 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														
<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
								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	240
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	320
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	400
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			
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
 <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
 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 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
 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> 番茄		
<400> 9		
Met Ala Thr Asn Leu Arg Val Leu Met Phe Pro Trp Leu Ala Tyr Gly		
1	5	10
15		
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
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> 宁夏枸杞
 <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
 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
 Asn Ser Pro Lys Leu Lys
 450
 <210> 11
 <211> 458
 <212> PRT
 <213> 甜叶菊
 <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
 225 230 235 240
 Ser Phe Leu Ile Pro Leu Pro Lys His Leu Thr Ala Ser Ser Ser Ser
 245 250 255
 Leu Leu Asp His Asp Arg Thr Val Phe Gln Trp Leu Asp Gln Gln Pro
 260 265 270
 Pro Ser Ser Val Leu Tyr Val Ser Phe Gly Ser Thr Ser Glu Val Asp
 275 280 285
 Glu Lys Asp Phe Leu Glu Ile Ala Arg Gly Leu Val Asp Ser Lys Gln
 290 295 300
 Ser Phe Leu Trp Val Val Arg Pro Gly Phe Val Lys Gly Ser Thr Trp
 305 310 315 320
 Val Glu Pro Leu Pro Asp Gly Phe Leu Gly Glu Arg Gly Arg Ile Val
 325 330 335
 Lys Trp Val Pro Gln Gln Glu Val Leu Ala His Gly Ala Ile Gly Ala

340	345	350
Phe Trp Thr His Ser Gly Trp Asn Ser Thr Leu Glu Ser Val Cys Glu		
355	360	365
Gly Val Pro Met Ile Phe Ser Asp Phe Gly Leu Asp Gln Pro Leu Asn		
370	375	380
Ala Arg Tyr Met Ser Asp Val Leu Lys Val Gly Val Tyr Leu Glu Asn		
385	390	395
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		
<400> 12		
Met Ser Pro Lys Leu His Lys Glu Leu Phe Phe His Ser Leu Tyr Lys		
1	5	10
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
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
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> 13
 <211> 808
 <212> PRT
 <213> 拟南芥
 <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
 Leu Leu Pro Leu Leu Lys Phe Leu Arg Leu His Ser His Gln Gly Lys
 180 185 190
 Asn Leu Met Leu Ser Glu Lys Ile Gln Asn Leu Asn Thr Leu Gln His
 195 200 205
 Thr Leu Arg Lys Ala Glu Glu Tyr Leu Ala Glu Leu Lys Ser Glu Thr
 210 215 220
 Leu Tyr Glu Glu Phe Glu Ala Lys Phe Glu Glu Ile Gly Leu Glu Arg
 225 230 235 240
 Gly Trp Gly Asp Asn Ala Glu Arg Val Leu Asp Met Ile Arg Leu Leu
 245 250 255

Leu Asp Leu Leu Glu Ala Pro Asp Pro Cys Thr Leu Glu Thr Phe Leu
 260 265 270
 Gly Arg Val Pro Met Val Phe Asn Val Val Ile Leu Ser Pro His Gly
 275 280 285
 Tyr Phe Ala Gln Asp Asn Val Leu Gly Tyr Pro Asp Thr Gly Gly Gln
 290 295 300
 Val Val Tyr Ile Leu Asp Gln Val Arg Ala Leu Glu Ile Glu Met Leu
 305 310 315 320
 Gln Arg Ile Lys Gln Gln Gly Leu Asn Ile Lys Pro Arg Ile Leu Ile
 325 330 335
 Leu Thr Arg Leu Leu Pro Asp Ala Val Gly Thr Thr Cys Gly Glu Arg
 340 345 350
 Leu Glu Arg Val Tyr Asp Ser Glu Tyr Cys Asp Ile Leu Arg Val Pro
 355 360 365
 Phe Arg Thr Glu Lys Gly Ile Val Arg Lys Trp Ile Ser Arg Phe Glu
 370 375 380
 Val Trp Pro Tyr Leu Glu Thr Tyr Thr Glu Asp Ala Ala Val Glu Leu
 385 390 395 400
 Ser Lys Glu Leu Asn Gly Lys Pro Asp Leu Ile Ile Gly Asn Tyr Ser
 405 410 415
 Asp Gly Asn Leu Val Ala Ser Leu Leu Ala His Lys Leu Gly Val Thr
 420 425 430
 Gln Cys Thr Ile Ala His Ala Leu Glu Lys Thr Lys Tyr Pro Asp Ser
 435 440 445
 Asp Ile Tyr Trp Lys Lys Leu Asp Asp Lys Tyr His Phe Ser Cys Gln
 450 455 460
 Phe Thr Ala Asp Ile Phe Ala Met Asn His Thr Asp Phe Ile Ile Thr
 465 470 475 480
 Ser Thr Phe Gln Glu Ile Ala Gly Ser Lys Glu Thr Val Gly Gln Tyr
 485 490 495
 Glu Ser His Thr Ala Phe Thr Leu Pro Gly Leu Tyr Arg Val Val His
 500 505 510
 Gly Ile Asp Val Phe Asp Pro Lys Phe Asn Ile Val Ser Pro Gly Ala
 515 520 525
 Asp Met Ser Ile Tyr Phe Pro Tyr Thr Glu Glu Lys Arg Arg Leu Thr
 530 535 540
 Lys Phe His Ser Glu Ile Glu Glu Leu Leu Tyr Ser Asp Val Glu Asn
 545 550 555 560
 Lys Glu His Leu Cys Val Leu Lys Asp Lys Lys Lys Pro Ile Leu Phe

	565		570		575
Thr Met Ala Arg Leu Asp Arg Val Lys Asn Leu Ser Gly Leu Val Glu					
	580		585		590
Trp Tyr Gly Lys Asn Thr Arg Leu Arg Glu Leu Ala Asn Leu Val Val					
	595		600		605
Val Gly Gly Asp Arg Arg Lys Glu Ser Lys Asp Asn Glu Glu Lys Ala					
	610		615		620
Glu Met Lys Lys Met Tyr Asp Leu Ile Glu Glu Tyr Lys Leu Asn Gly					
625		630		635	640
Gln Phe Arg Trp Ile Ser Ser Gln Met Asp Arg Val Arg Asn Gly Glu					
	645		650		655
Leu Tyr Arg Tyr Ile Cys Asp Thr Lys Gly Ala Phe Val Gln Pro Ala					
	660		665		670
Leu Tyr Glu Ala Phe Gly Leu Thr Val Val Glu Ala Met Thr Cys Gly					
	675		680		685
Leu Pro Thr Phe Ala Thr Cys Lys Gly Gly Pro Ala Glu Ile Ile Val					
	690		695		700
His Gly Lys Ser Gly Phe His Ile Asp Pro Tyr His Gly Asp Gln Ala					
705		710		715	720
Ala Asp Thr Leu Ala Asp Phe Phe Thr Lys Cys Lys Glu Asp Pro Ser					
	725		730		735
His Trp Asp Glu Ile Ser Lys Gly Gly Leu Gln Arg Ile Glu Glu Lys					
	740		745		750
Tyr Thr Trp Gln Ile Tyr Ser Gln Arg Leu Leu Thr Leu Thr Gly Val					
	755		760		765
Tyr Gly Phe Trp Lys His Val Ser Asn Leu Asp Arg Leu Glu Ala Arg					
	770		775		780
Arg Tyr Leu Glu Met Phe Tyr Ala Leu Lys Tyr Arg Pro Leu Ala Gln					
785		790		795	800
Ala Val Pro Leu Ala Gln Asp Asp					
	805				

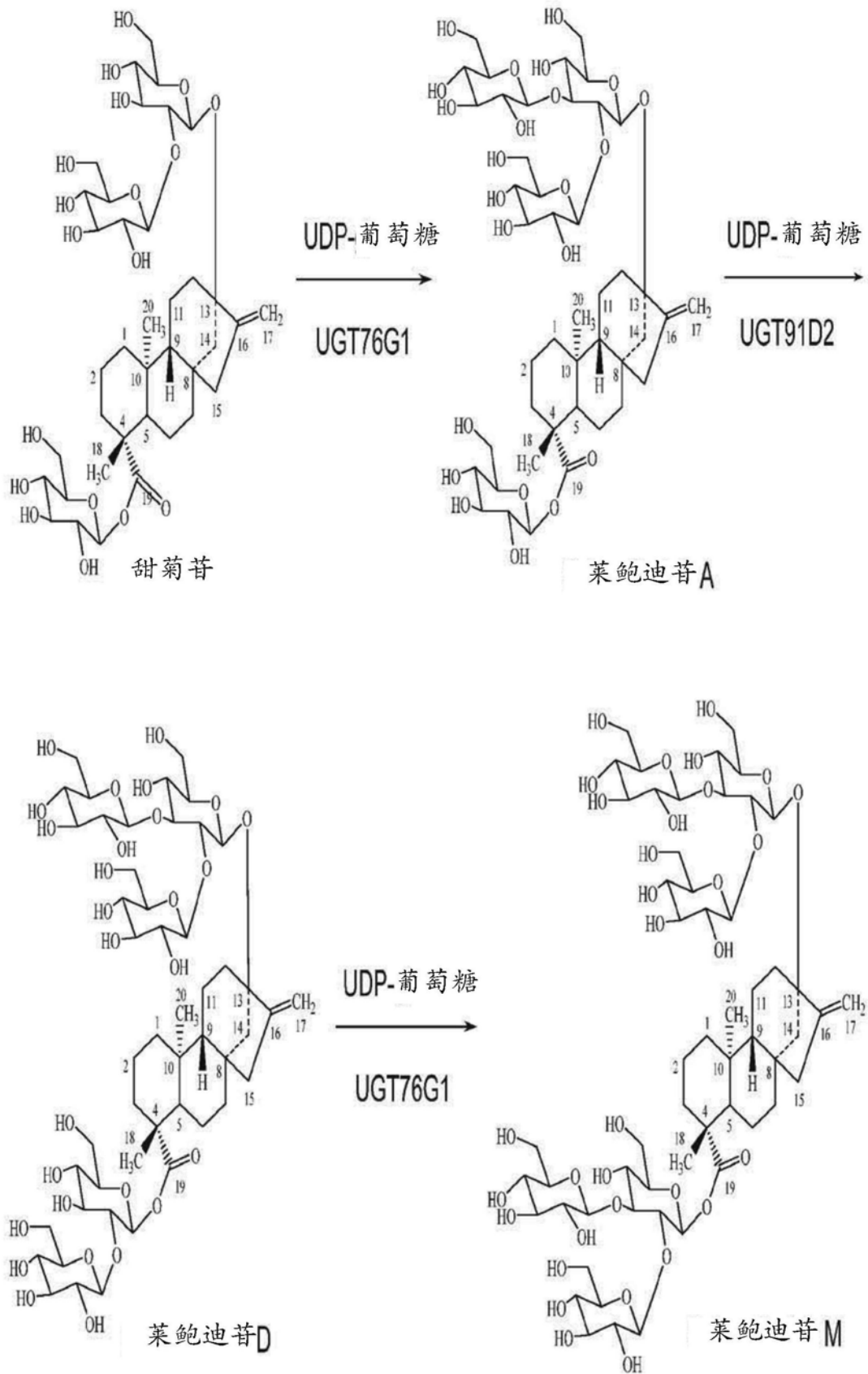


图1

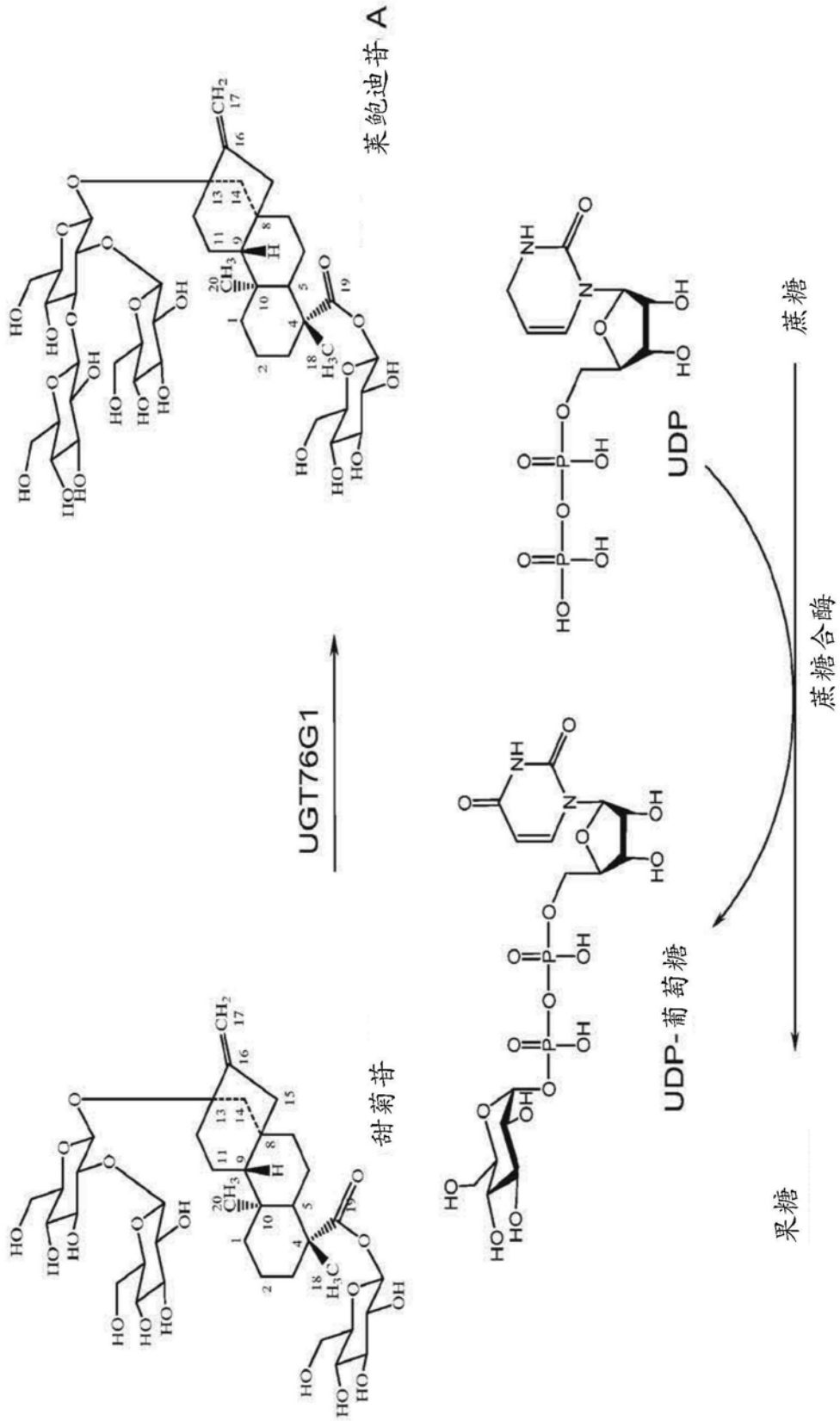


图2

一个或多个当前色谱图

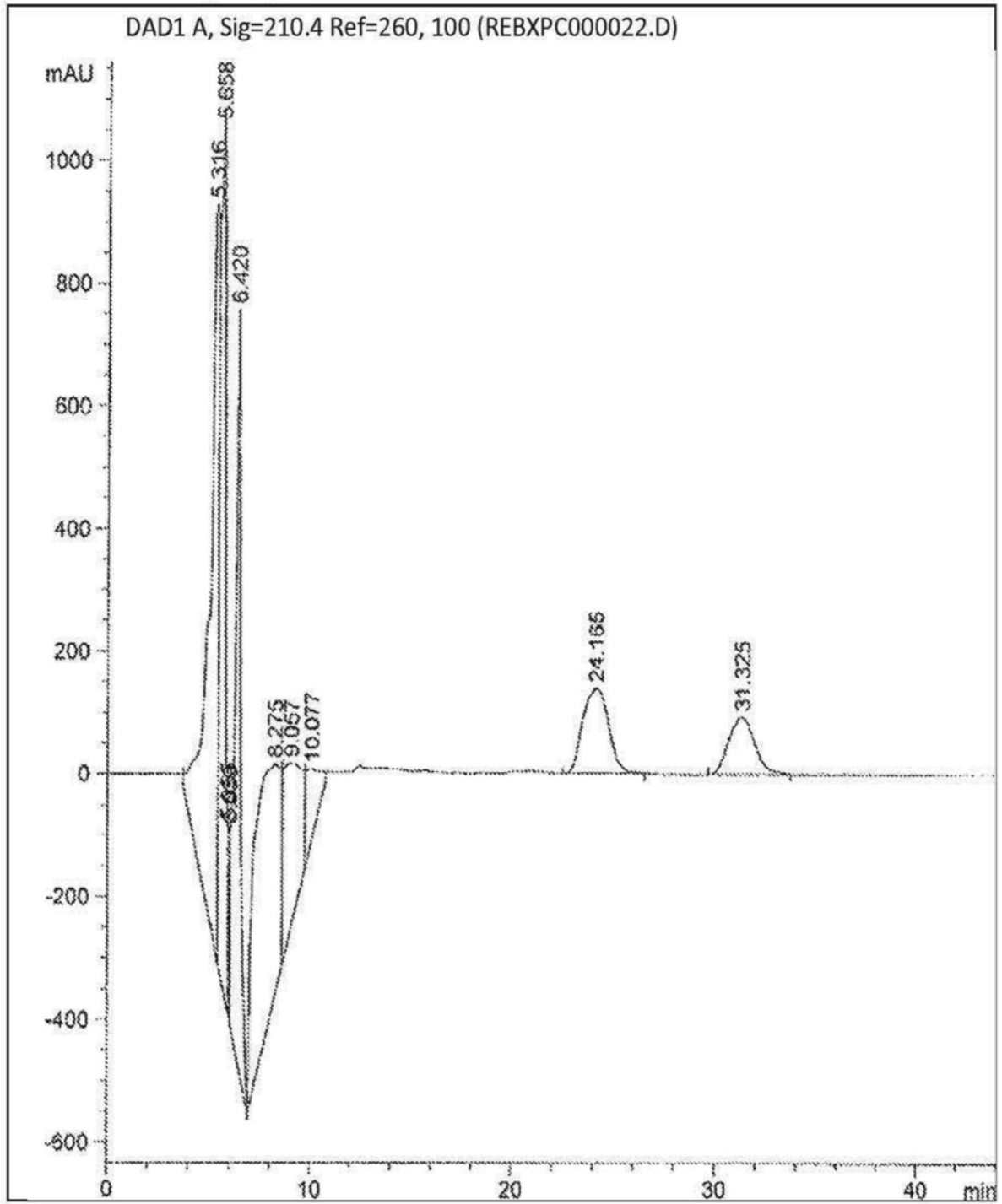


图3

通过CAD测量的UGT76G1催化的甜菊苷到Reb A的转化

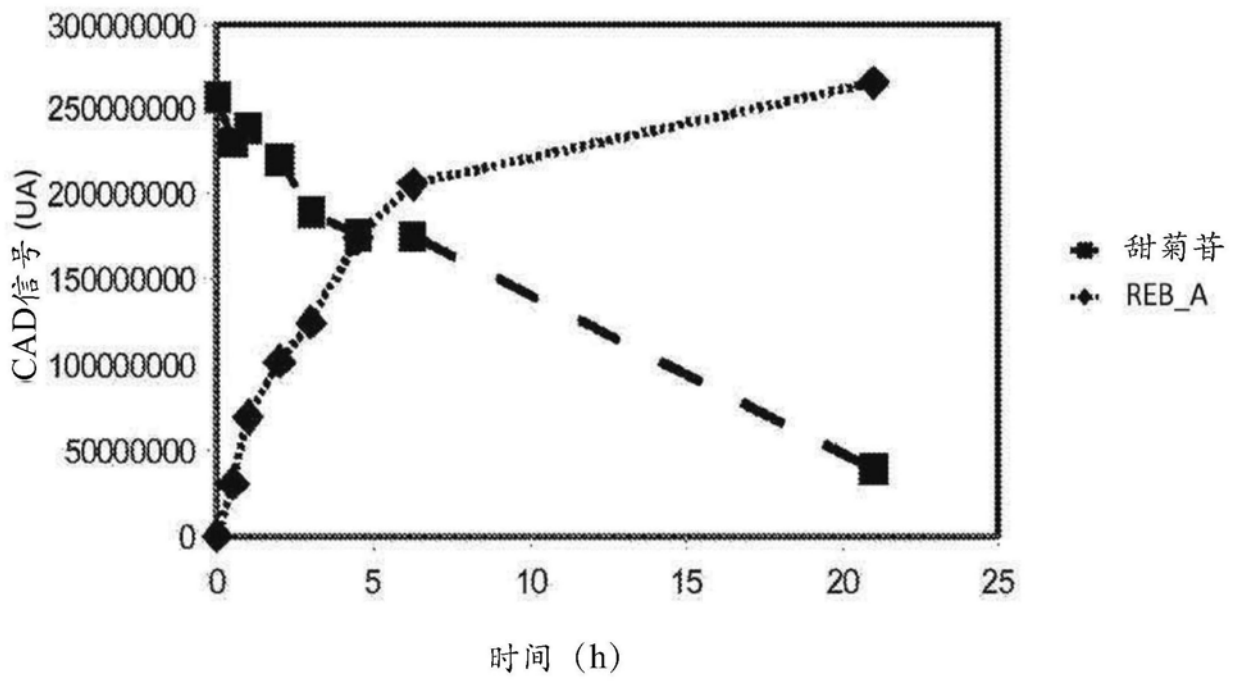


图4

从莱鲍迪昔D合成莱鲍迪昔M/CAD检测
通过体外产生的UGT76G1进行催化

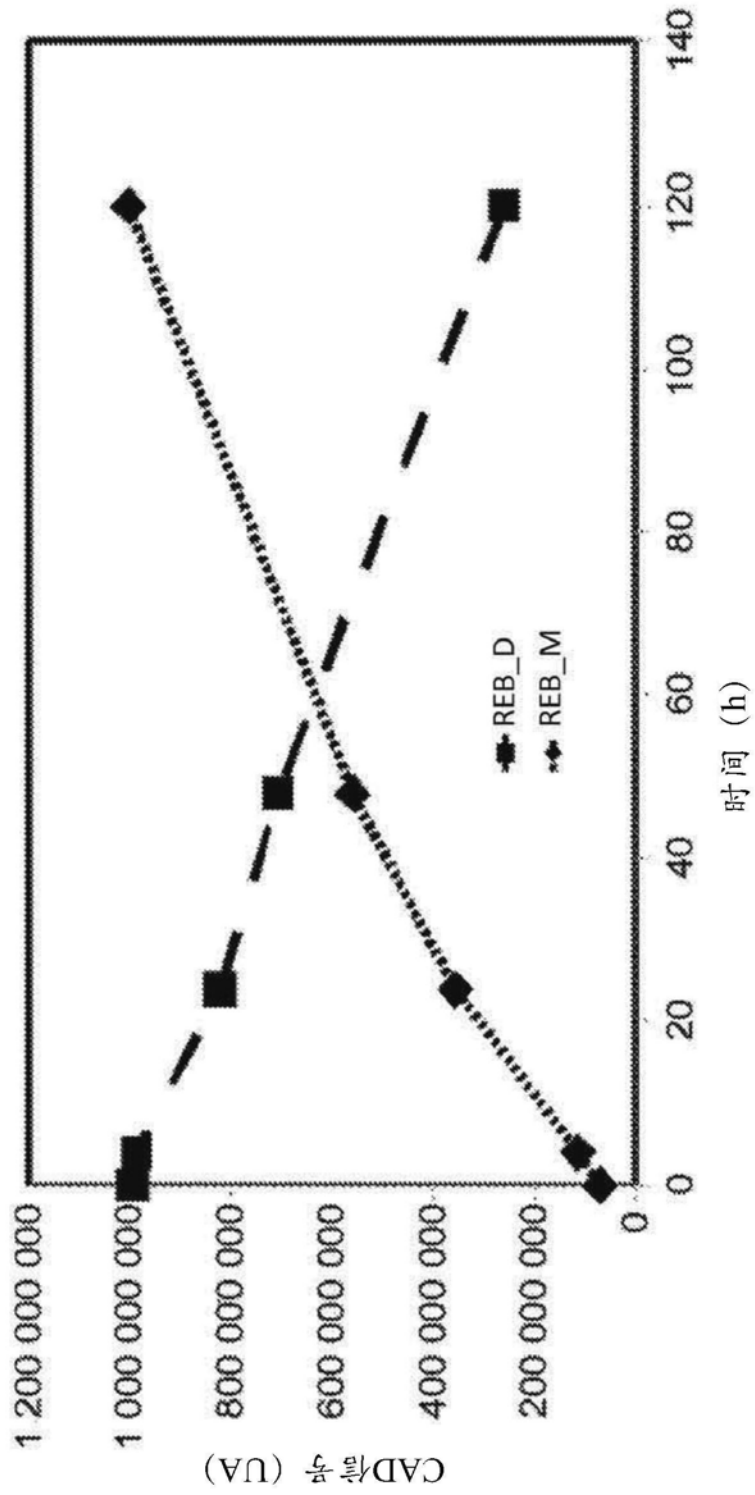


图5

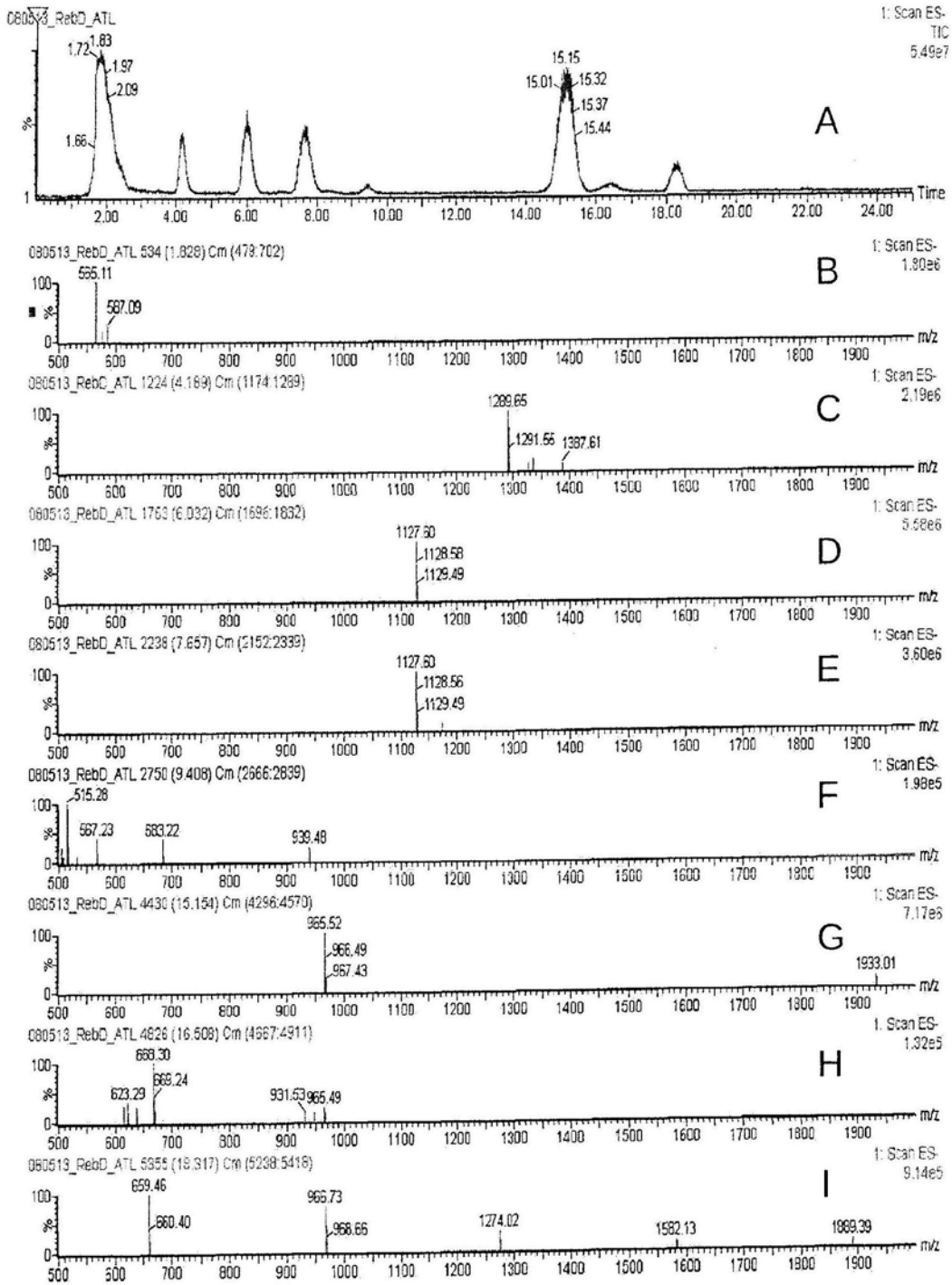


图6

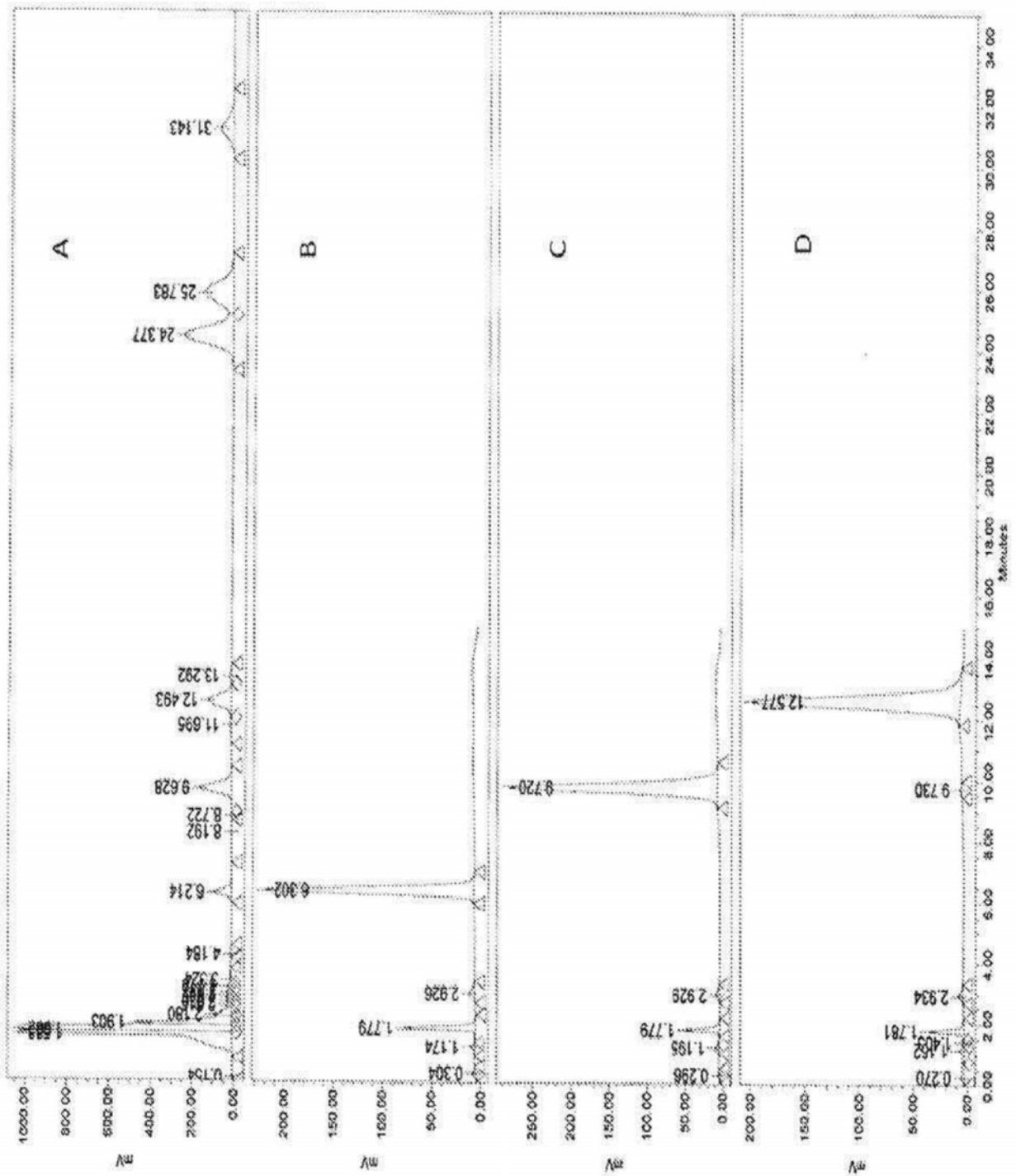


图7

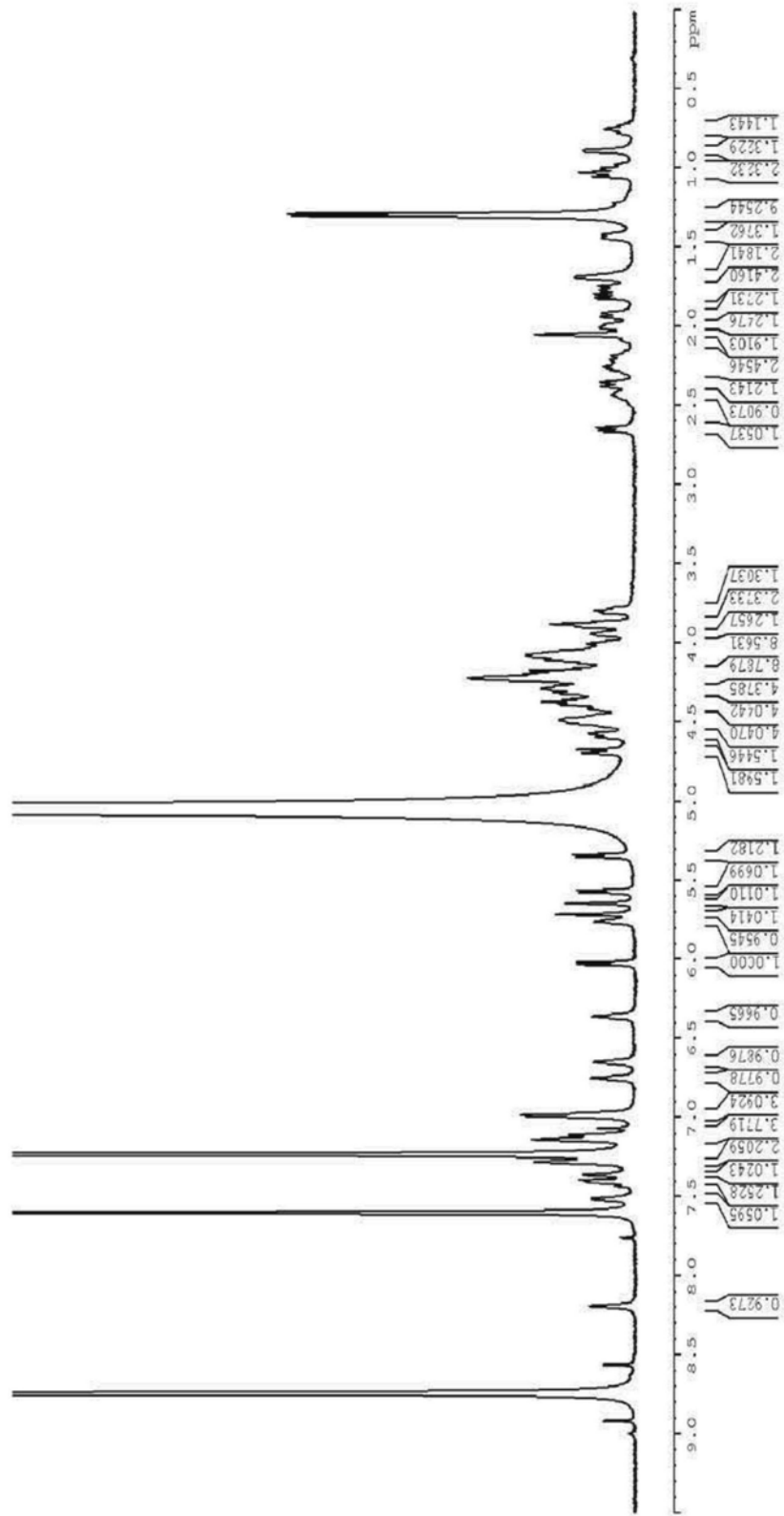


图8

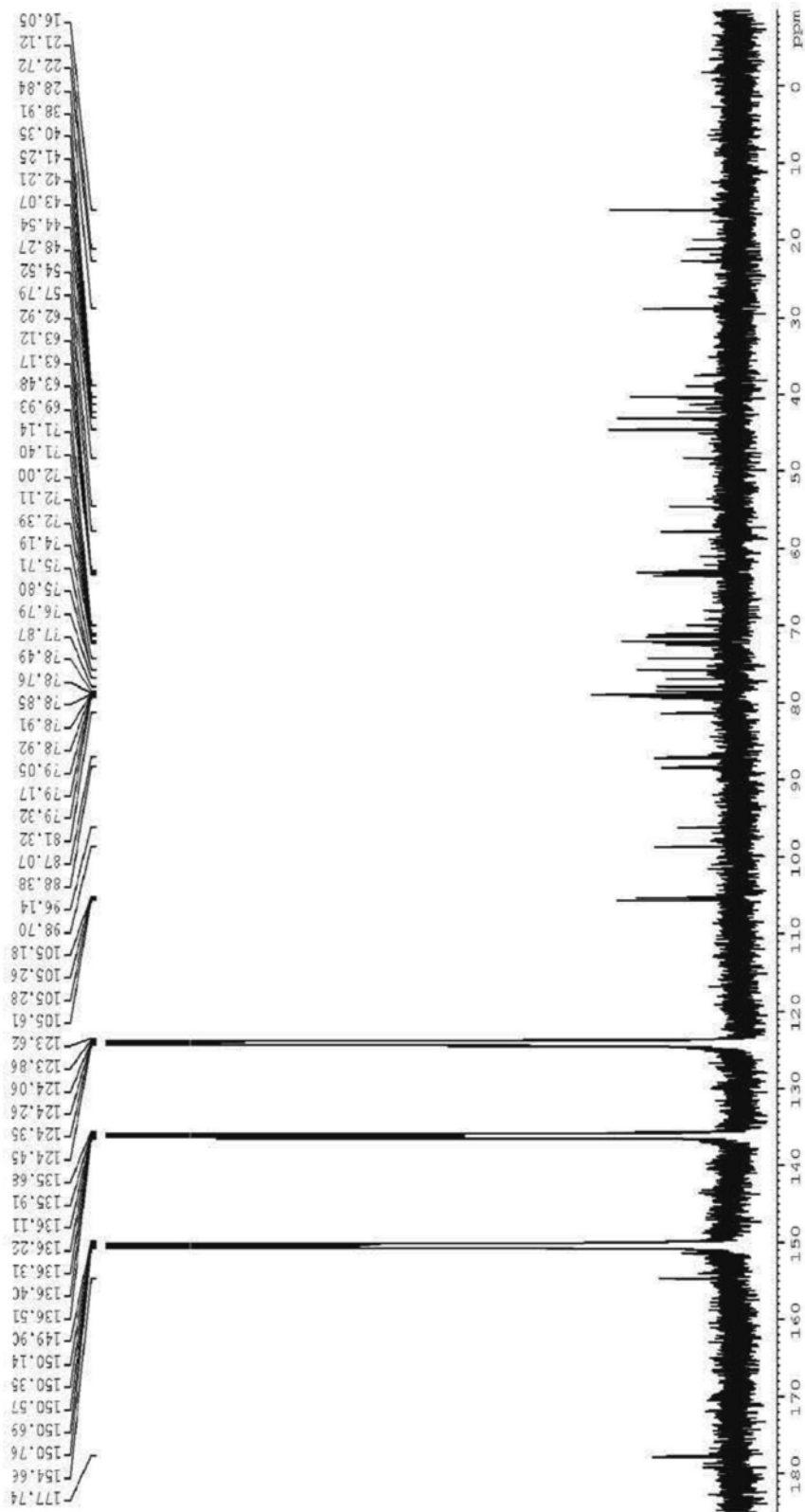


图9

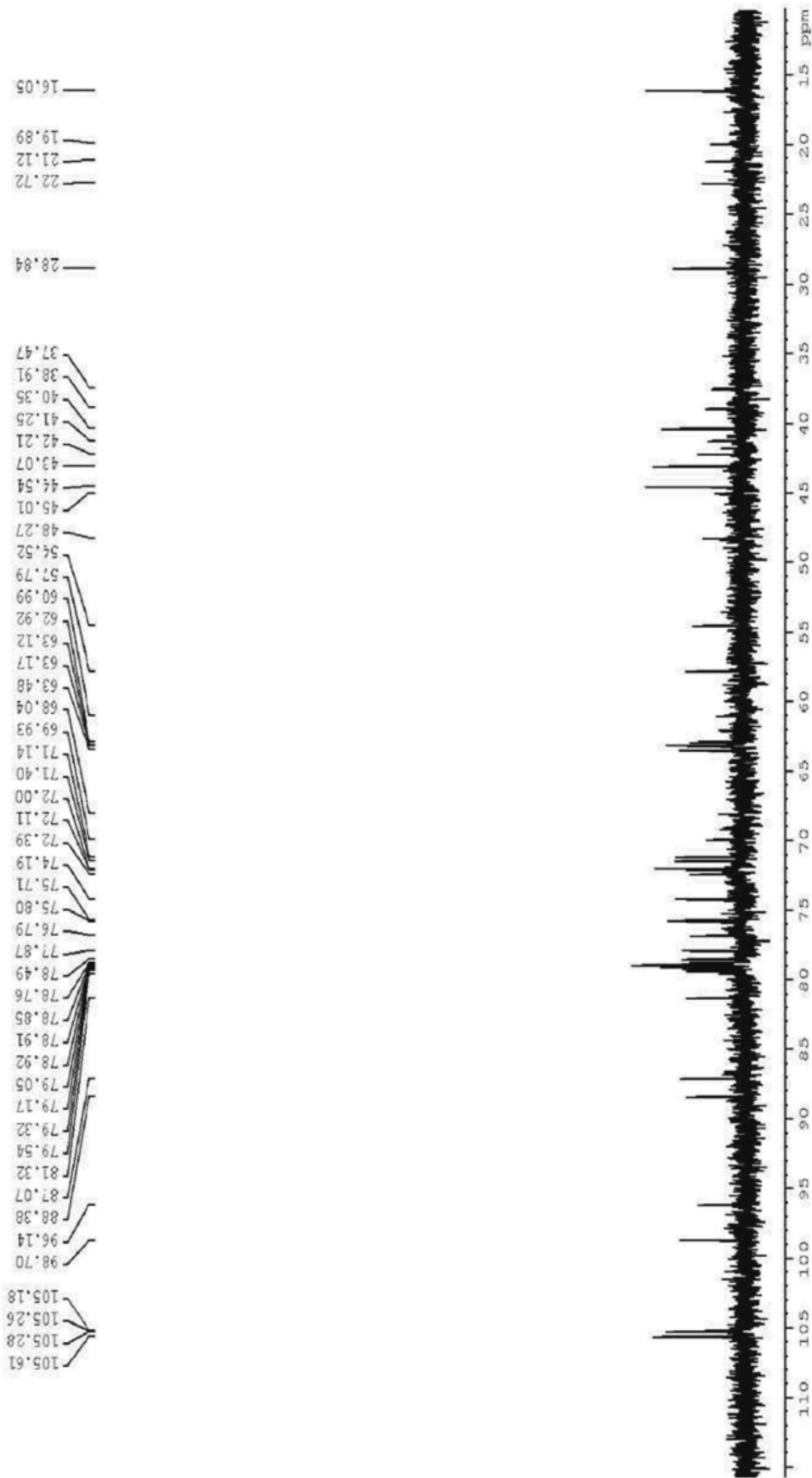


图10

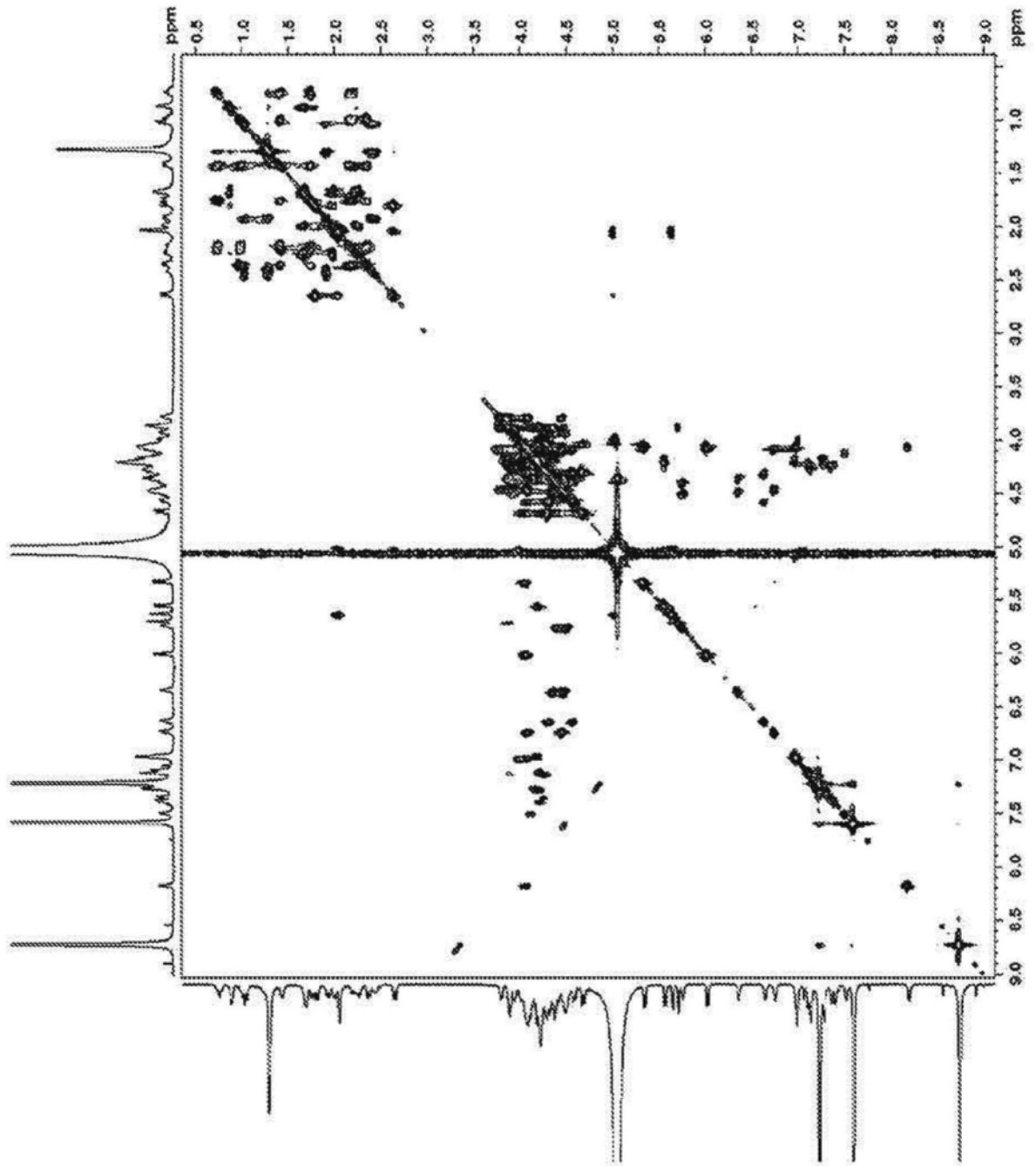


图11

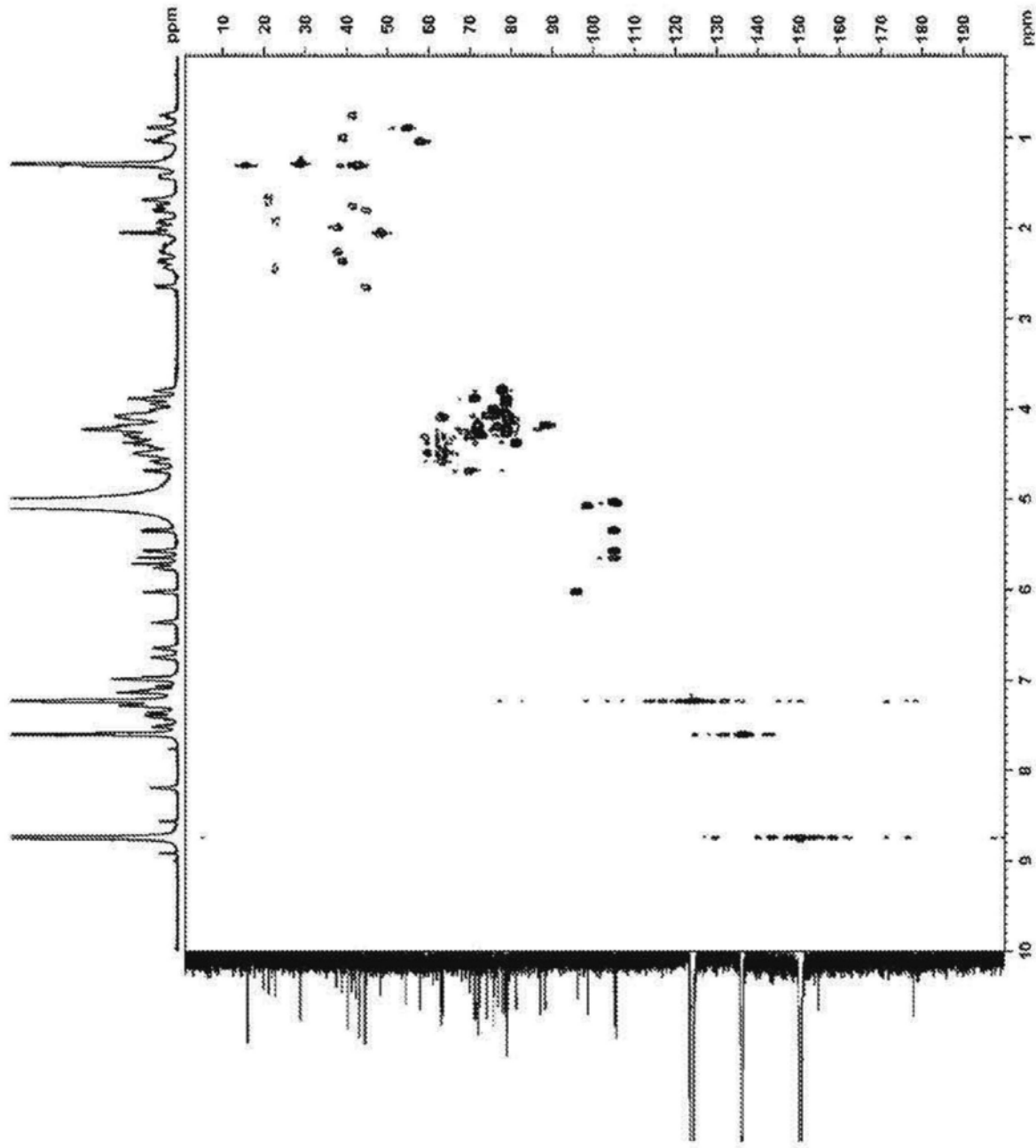


图12

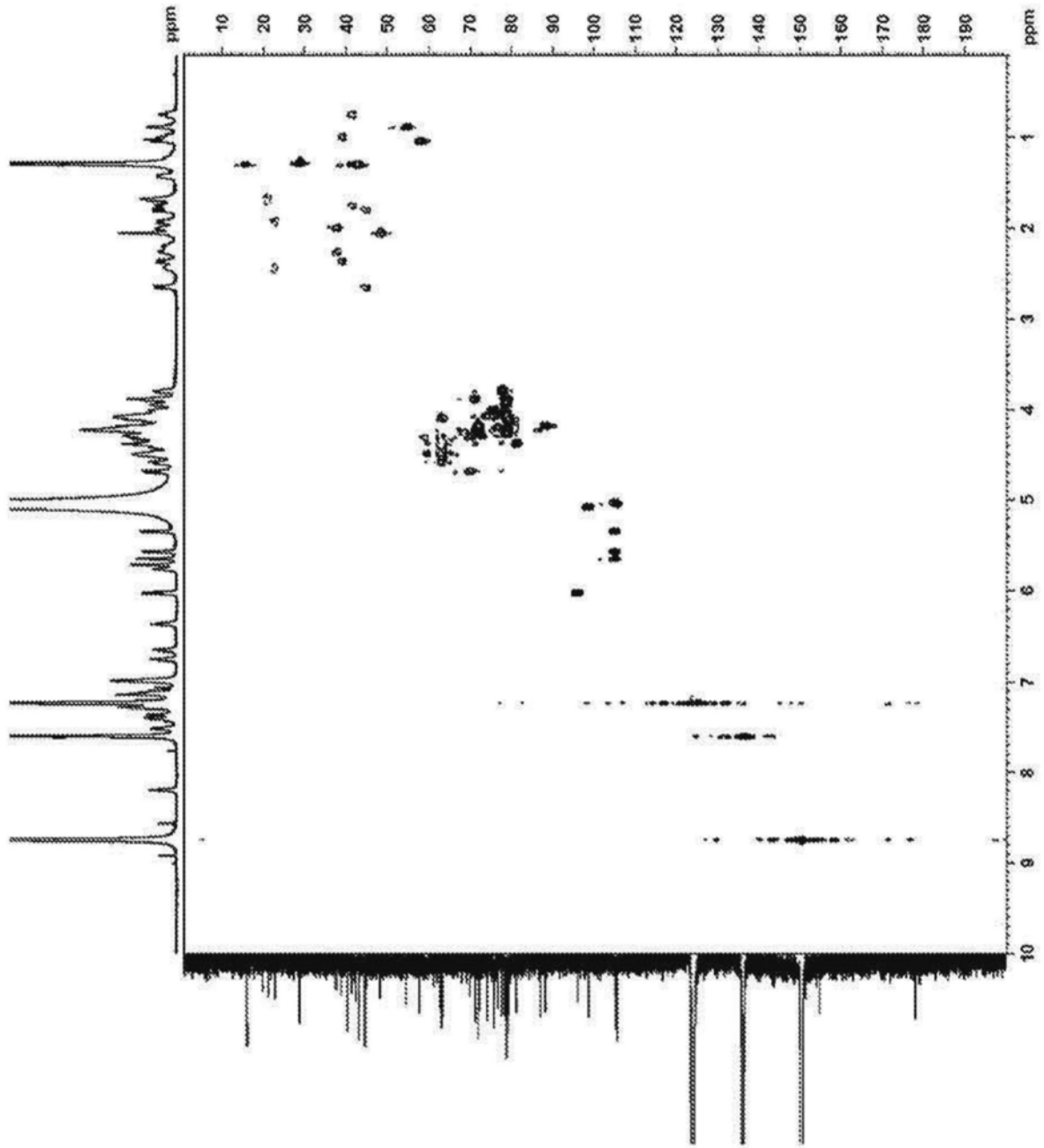


图13

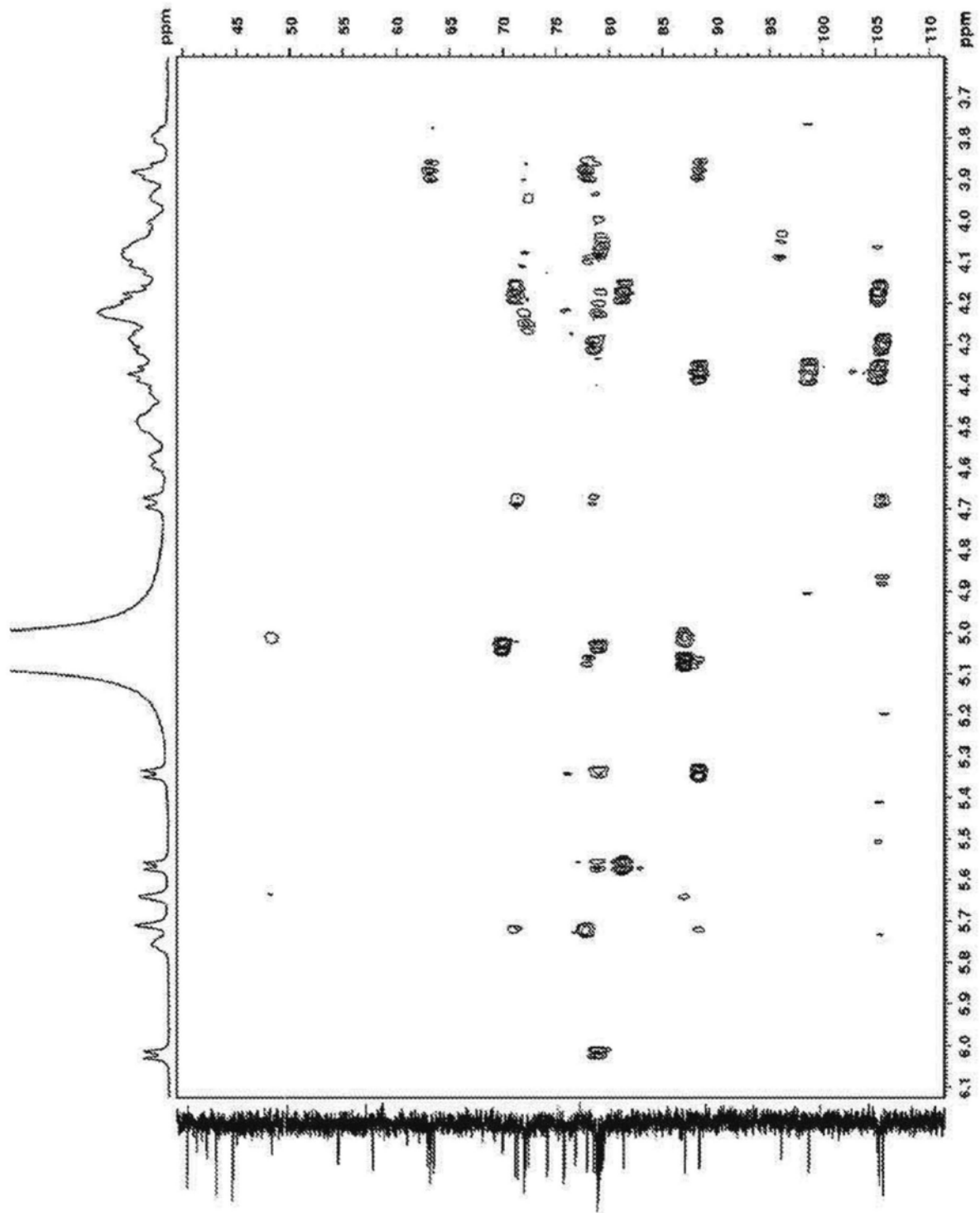


图14

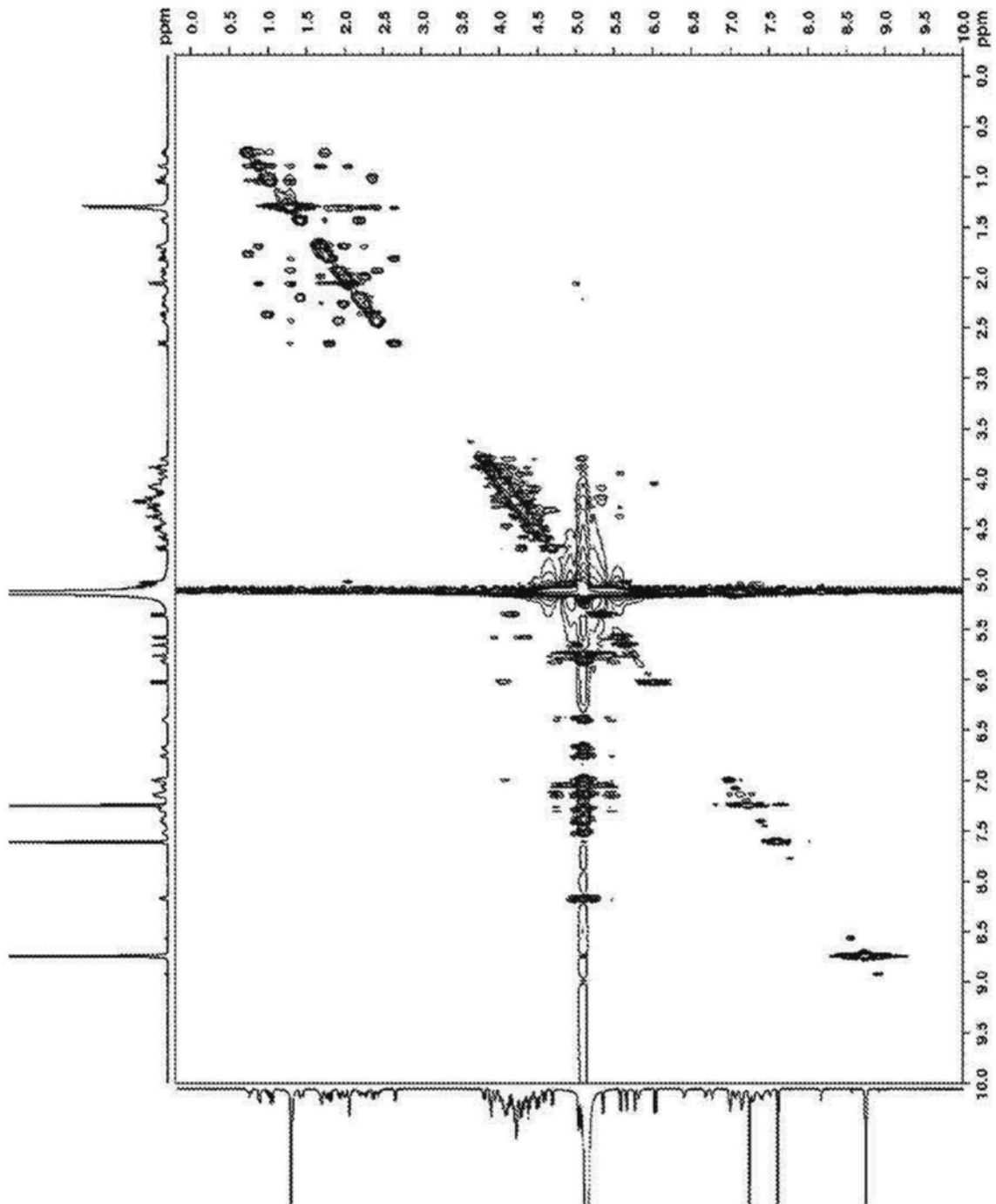


图15

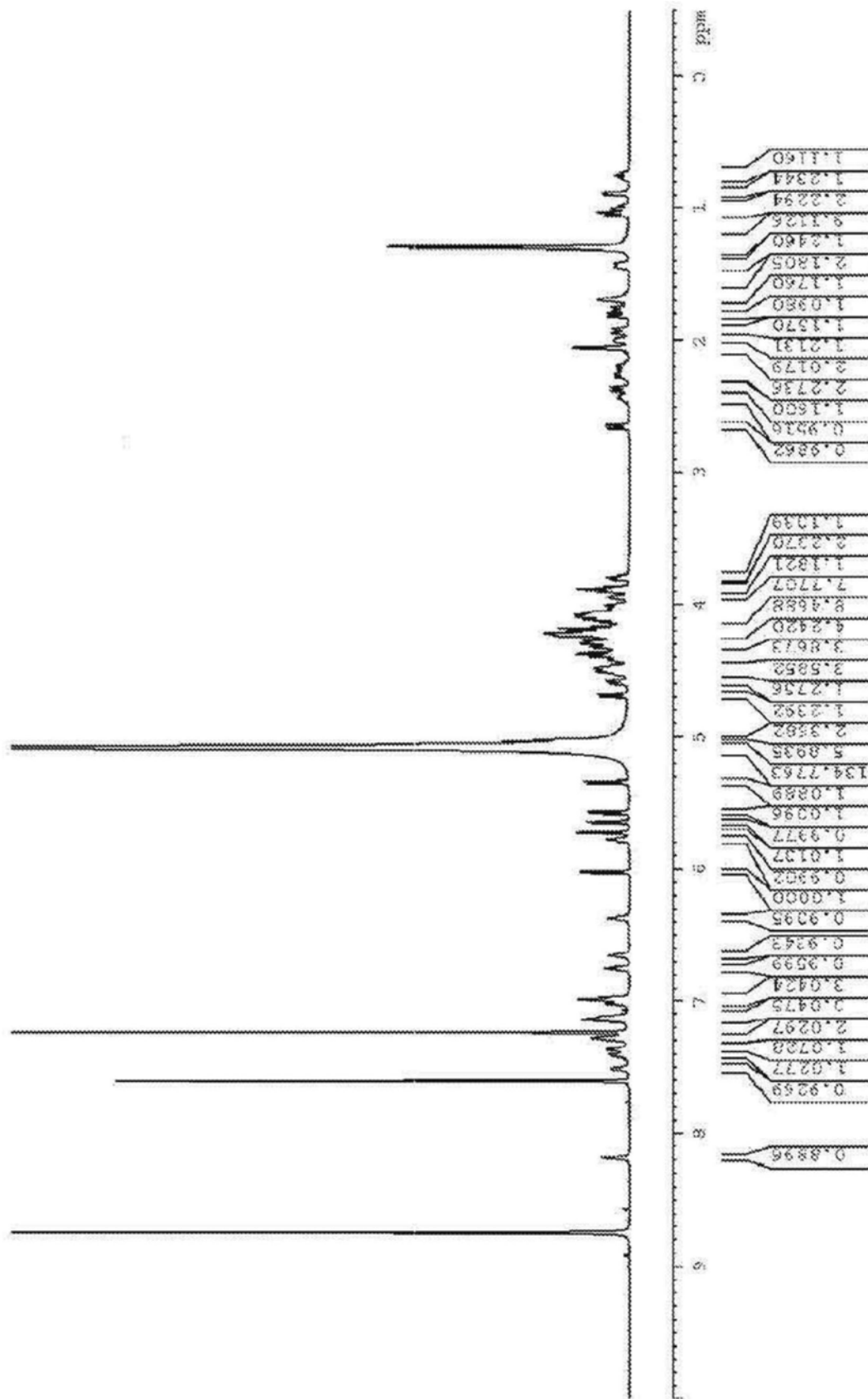


图16

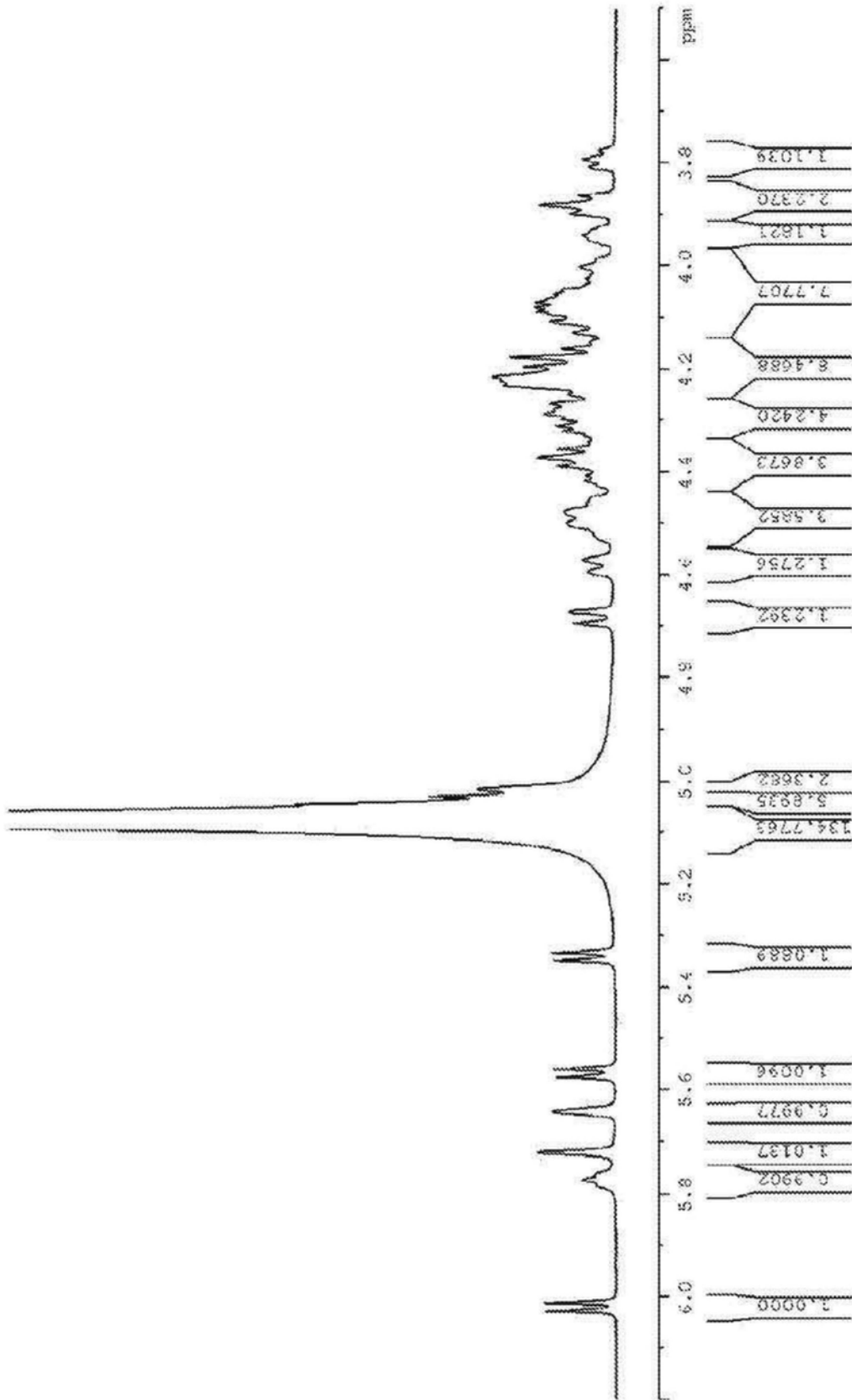


图17

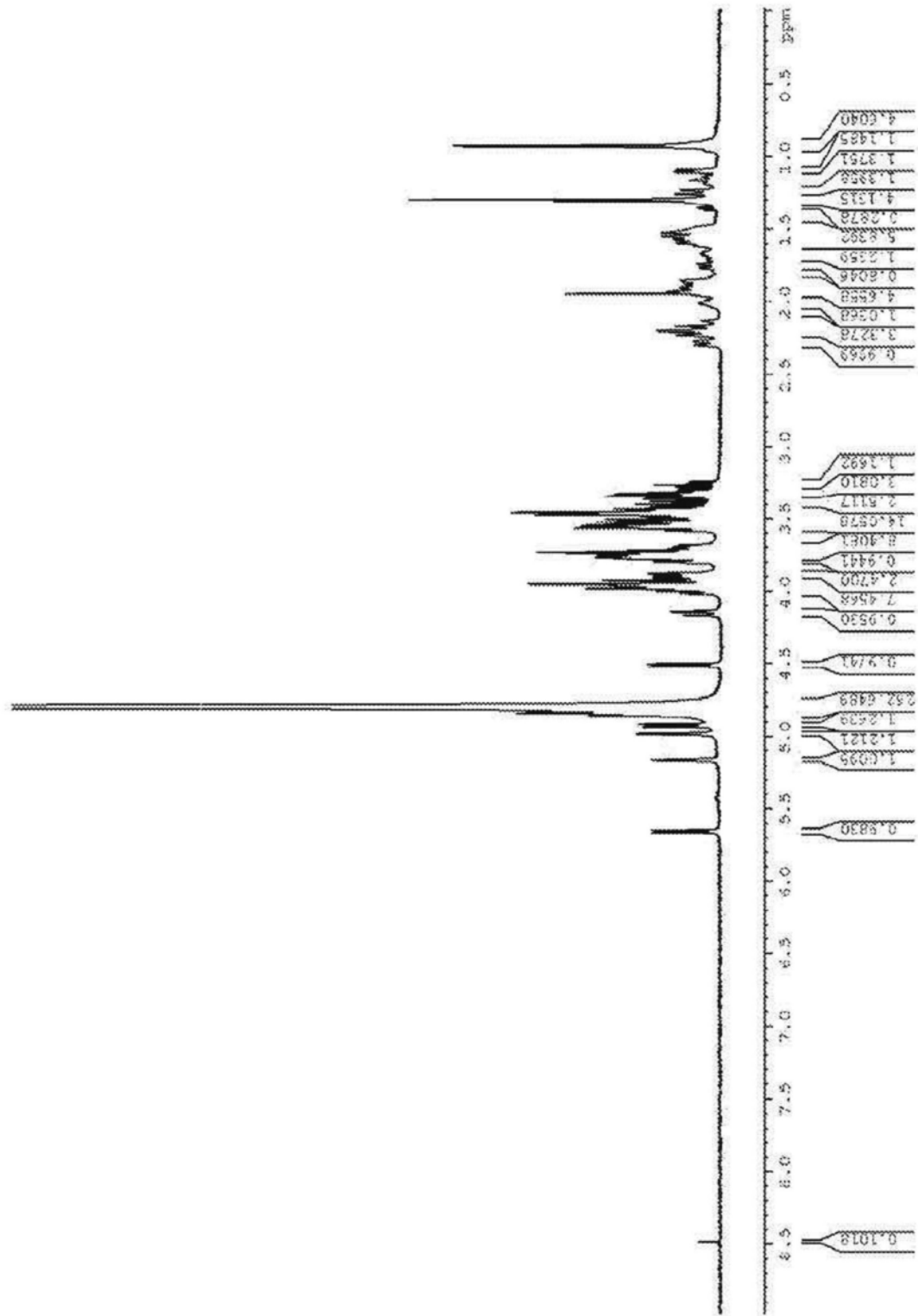


图18

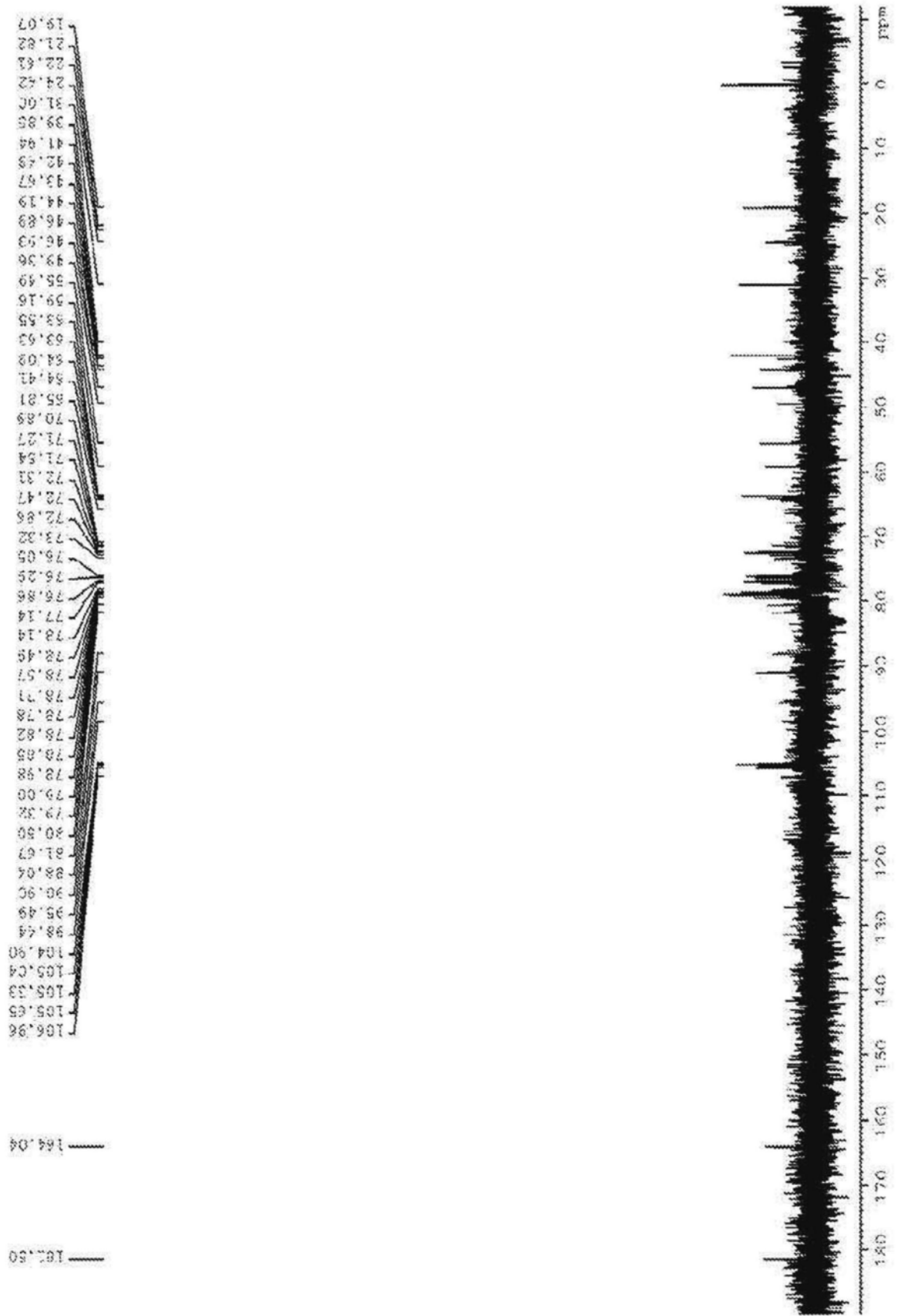


图19

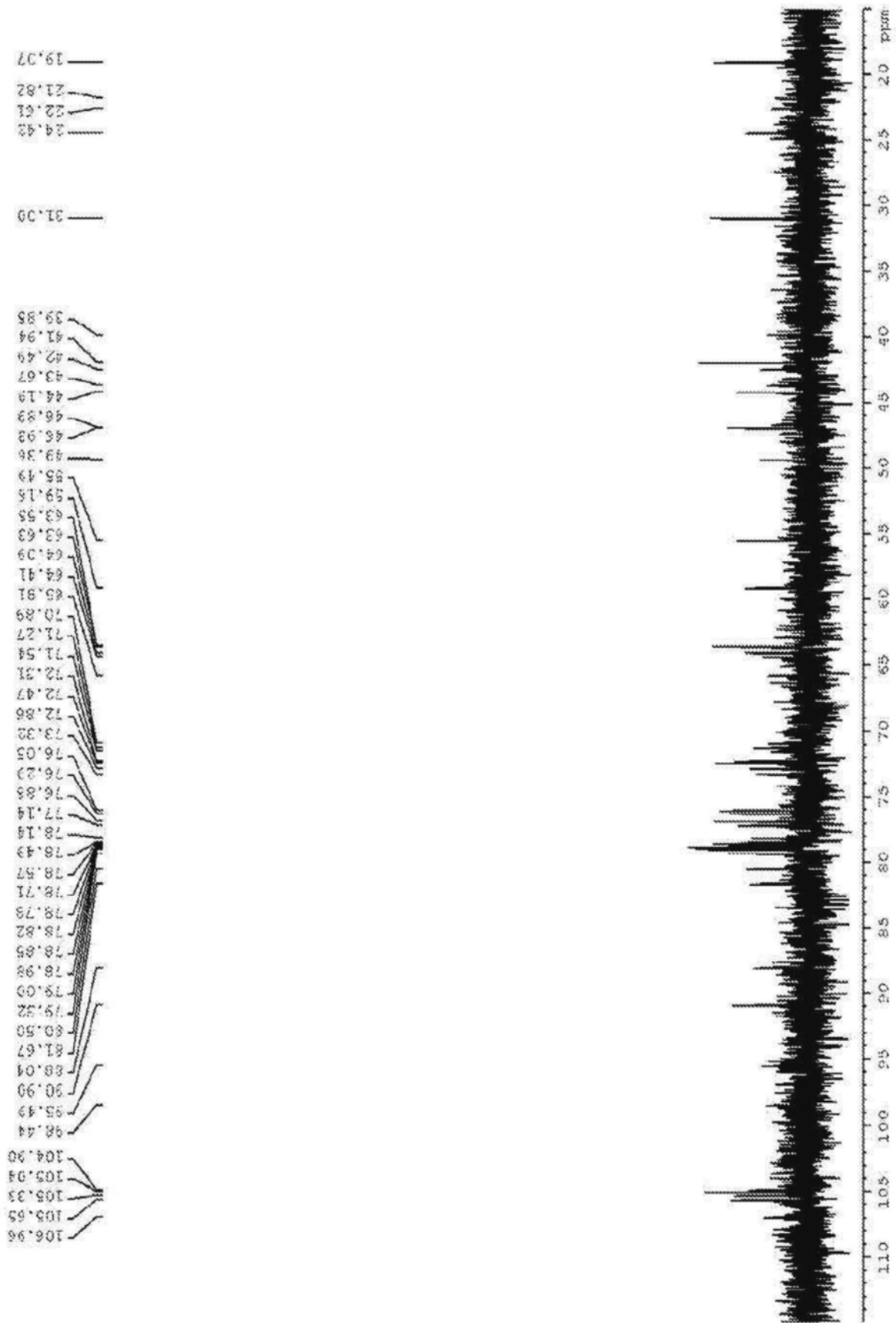


图20

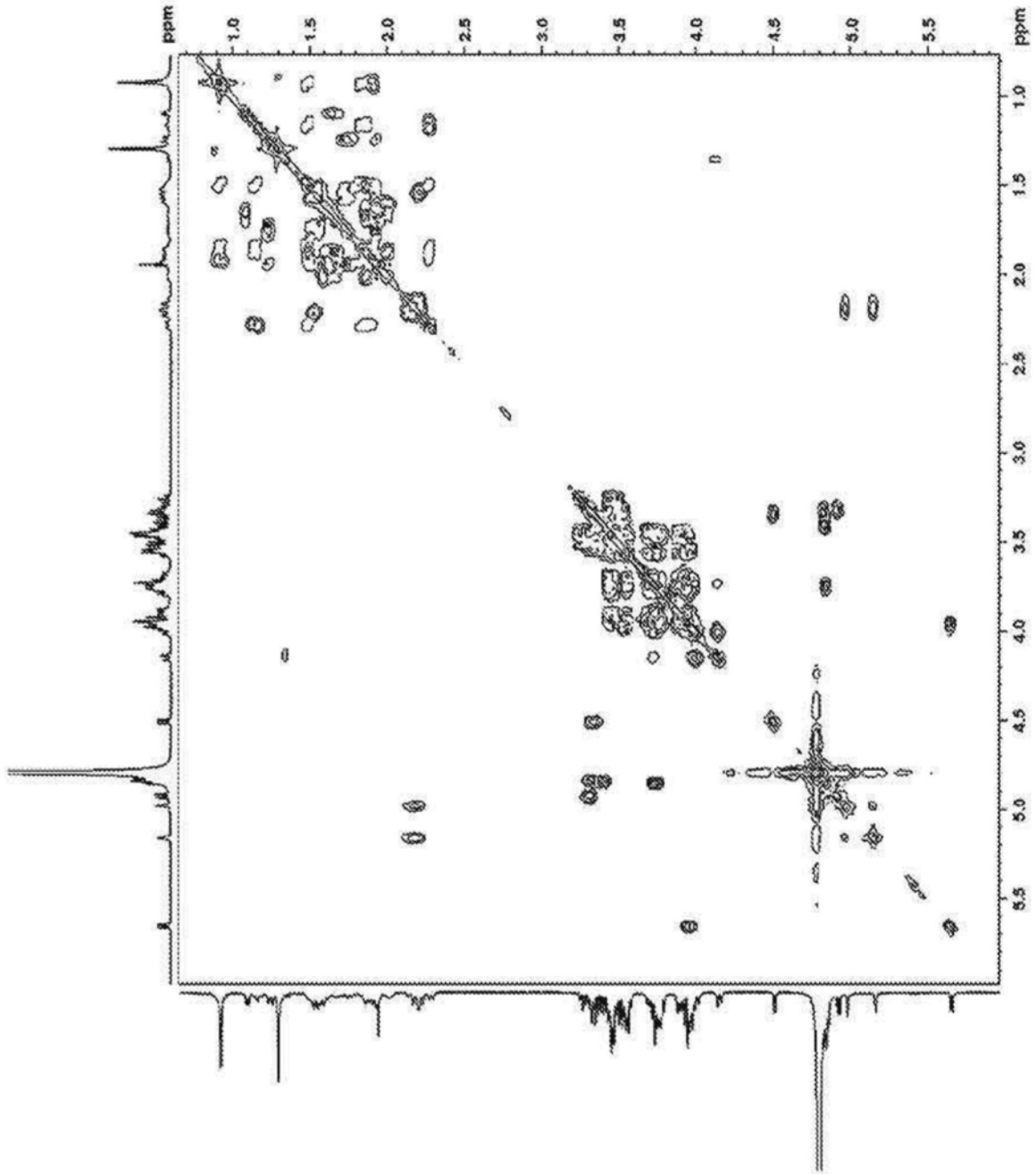


图21

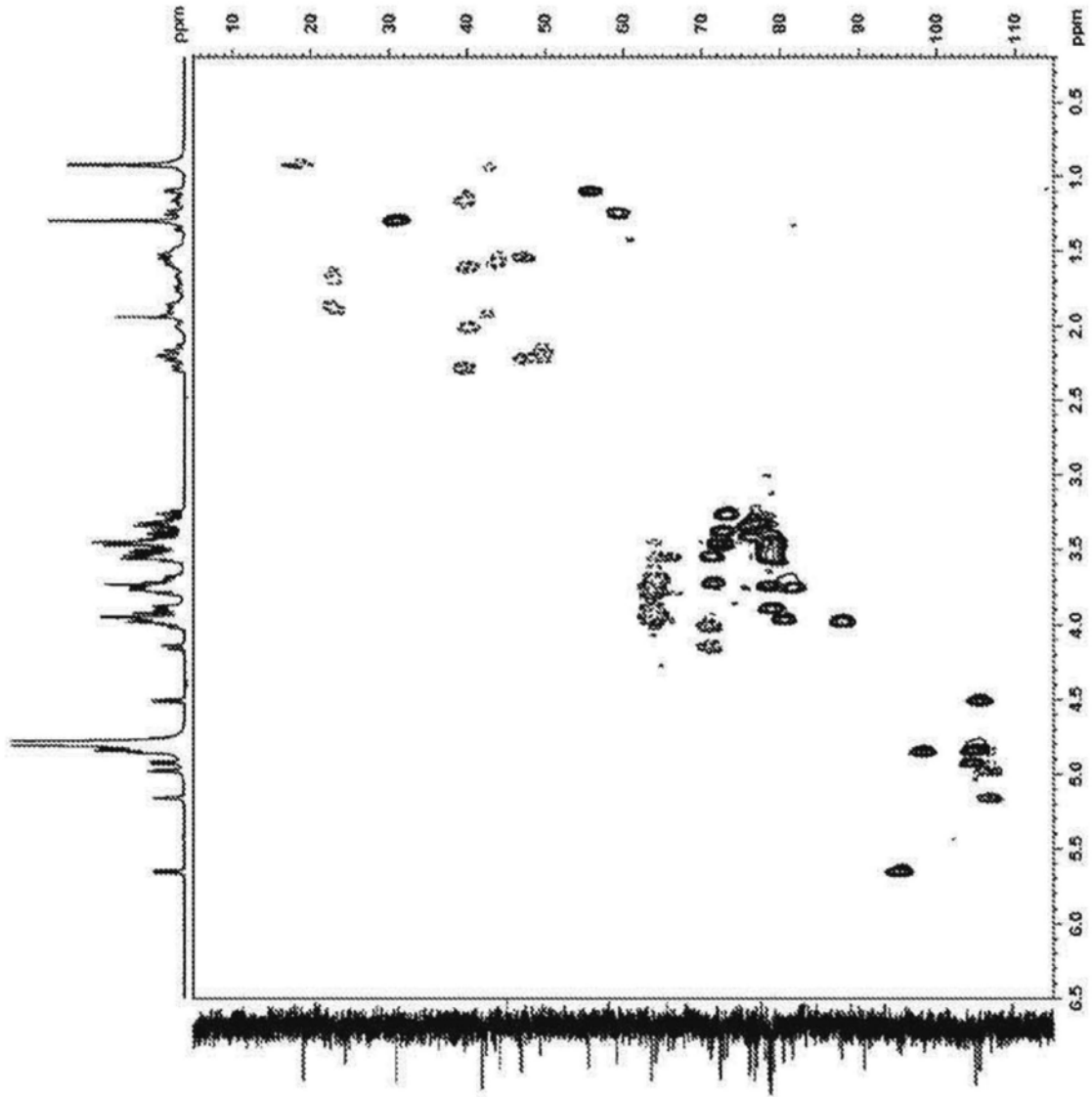


图22

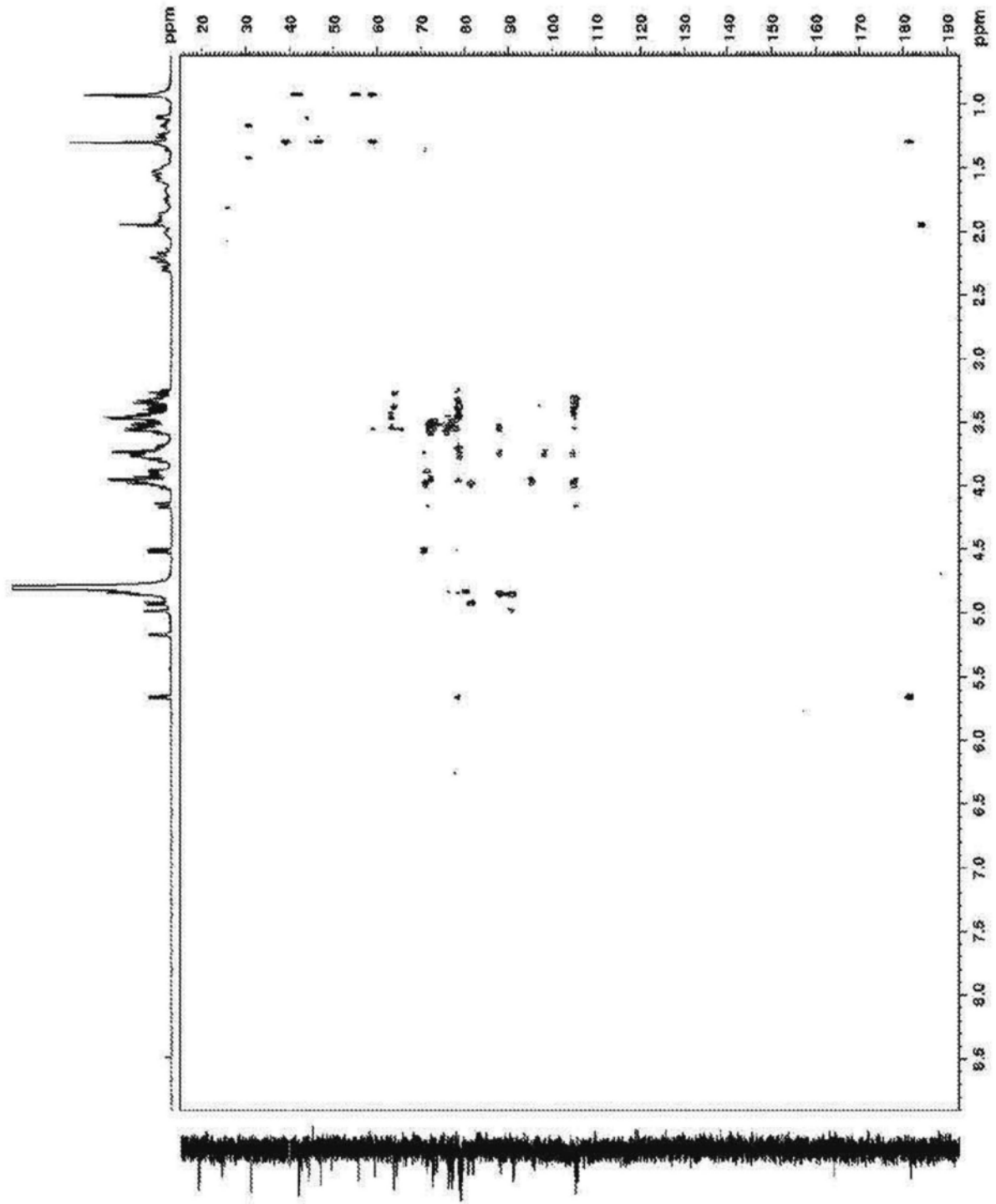


图23

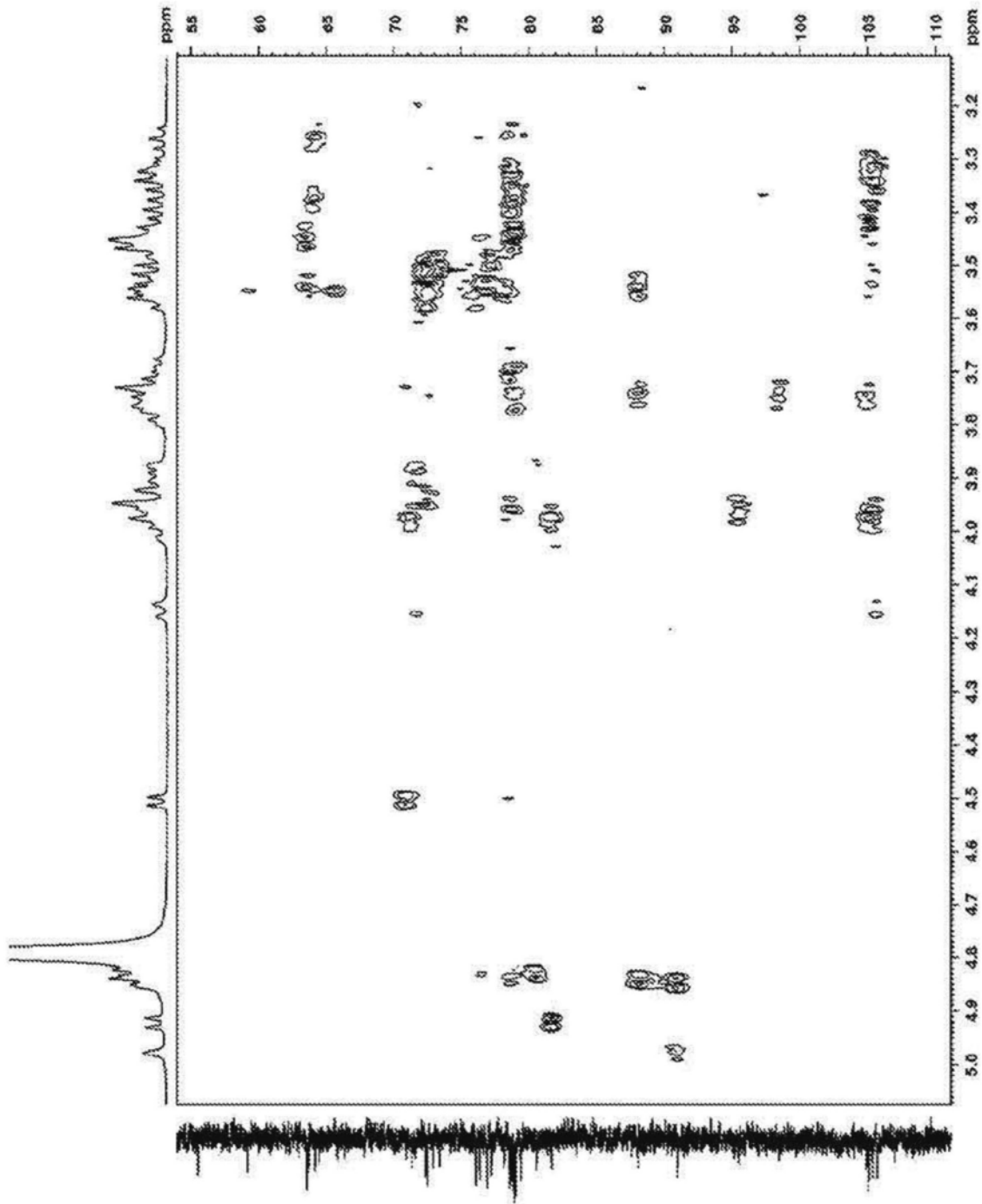


图24