



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)  
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0047313

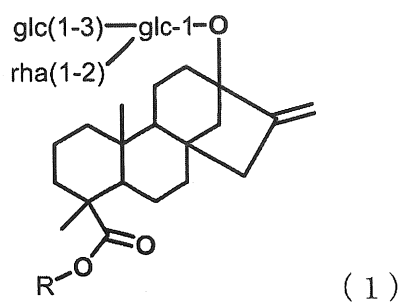
(51)<sup>7</sup> C07H 15/256; A23L 2/60; A23L 27/00; (13) B  
C12P 19/44; C12N 1/19; C12N 15/29;  
A01H 5/00; A23L 27/20

- 
- |                                                                                                                                                                                                     |                                   |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| (21) 1-2019-06037                                                                                                                                                                                   | (22) 28/03/2018                   |
| (86) PCT/JP2018/012845 28/03/2018                                                                                                                                                                   | (87) WO 2018/181515 A1 04/10/2018 |
| (30) 2017-071457 31/03/2017 JP                                                                                                                                                                      |                                   |
| (45) 25/06/2025 447                                                                                                                                                                                 | (43) 30/01/2020 382A              |
| (73) SUNTORY HOLDINGS LIMITED (JP)<br>1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku, Osaka-shi, Osaka 530-8203, Japan                                                                                           |                                   |
| (72) IWAKI Kazunari (JP); MIYAGAWA Katsuro (JP); ONO Eiichiro (JP); HIRAI<br>Tadayoshi (JP); OCHIAI Misa (JP); NAGAO Koji (JP); URAI Soichiro (JP);<br>WATANABE Takehiro (JP); FUJIKAWA Kohki (JP). |                                   |
| (74) Công ty TNHH một thành viên Sở hữu trí tuệ VCCI (VCCI-IP CO.,LTD)                                                                                                                              |                                   |
- 

(54) HỢP CHẤT STEVIOL GLYCOSIT, PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT HỢP CHẤT  
NÀY VÀ CHẾ PHẨM TẠO NGỌT CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(21) 1-2019-06037

(57) Sáng chế đề cập đến việc xác định cấu trúc của steviol glycosit mới mà được phát hiện từ loài chứa một lượng lớn Reb. C (dùng để chỉ dulcoside B), và một lượng rất nhỏ mà có thể làm ảnh hưởng đến chất lượng vị; và hiểu các đặc tính vị của steviol glycosit này. Cụ thể, sáng chế đề cập đến hợp chất được thể hiện bởi công thức (1) hoặc muối, hoặc hydrat của nó. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất hợp chất này và chế phẩm tạo ngọt chứa hợp chất này.



### Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến steviol glycosit mới, phương pháp sản xuất hợp chất này, và chế phẩm tạo ngọt chứa hợp chất này. Hơn nữa, sáng chế cũng đề cập đến thực phẩm hoặc đồ uống, thực vật, dịch chiết của nó và chất kiểm soát vị chứa steviol glycosit mới.

### Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Lá của loài *Stevia rebaudiana* (cỏ ngọt hay cúc ngọt) chứa chất chuyển hóa thứ hai gọi là Steviol mà là một loại diterpenoid, trong đó steviol glycosit tạo ra độ ngọt mà gấp gần 300 lần độ ngọt của đường và vì vậy được sử dụng làm chất tạo ngọt không sinh năng lượng (không chứa calo) trong ngành thực phẩm. Nhu cầu về các chất tạo ngọt không chứa calo ngày một tăng lên do béo phì đang trở thành một vấn đề xã hội nghiêm trọng trên toàn thế giới và cũng nhằm mục đích cải thiện sức khỏe và giảm các chi phí y tế. Hiện tại, aspartam và axesulfam kali, mà là các dẫn xuất axit amin được tổng hợp nhân tạo, được sử dụng làm các chất tạo ngọt nhân tạo, tuy nhiên các chất tạo ngọt tự nhiên không chứa calo như các steviol glycosit được kỳ vọng là an toàn hơn và dễ được cộng đồng chấp nhận.

Steviol glycosit chính từ stevia cuối cùng được glycosyl hóa thành glycosit được gọi là rebaudioside A (Reb.A) mà có bốn gốc đường (Fig. 1). Steviosit, tức là steviol glycosit được tri-glycosyl hóa và là tiền chất của Reb.A, là nhiều glycosit nhất. Hai glycosit này là các chất chính liên quan đến độ ngọt của stevia. Steviosit chiếm hàm lượng lớn nhất trong lá stevia và được biết là tạo ra độ ngọt mà gấp khoảng 250-300 lần độ ngọt của đường. Reb.A là steviol glycosit được tetra-glycosyl hóa mà có độ ngọt đậm (gấp 350-450 lần so với đường) với chất lượng mùi vị tốt. Chúng đã và đang thu hút sự chú ý là các chất tạo ngọt không chứa calo. Bên cạnh đó, đã biết đến sự tồn tại của glycosit mà được xem là các chất trung gian phản ứng và các chất tương tự có các loại gốc đường khác nhau. Ví dụ, trong khi tất cả bốn gốc đường glycosit của Reb.A là glucoza, rebaudioside C (Reb.C) đã được biết là có ramnoza thay vì glucoza được gắn ở vị trí C-2 của glucoza ở vị trí C-13, và rebaudioside F (Reb.F) đã được biết là có xyloza được gắn ở cùng vị trí.

Đến nay, các nỗ lực được dành ra để thu được thực vật stevia có hàm lượng

Reb.A cao hơn so với các thực vật stevia kiểu đại bằng cách gây giống hoặc tương tự do chất lượng mùi vị của Reb.A, mà trong đó tất cả bốn gốc đường glycosit là glucoza, là tốt (ví dụ, tài liệu Patent 1).

Tài liệu kỹ thuật đã biết

Tài liệu Patent

Tài liệu Patent 1: Patent Nhật Bản số 3436317

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Vấn đề được sáng chế giải quyết

Trong khi đó thì một số các loại giống cây stevia có nguồn gốc từ việc gây giống có thể chứa lượng nhỏ steviol glycosit mà cấu trúc của nó vẫn chưa được phát hiện, trong đó sự có mặt của steviol glycosit như vậy có mặt với lượng nhỏ có thể đóng góp một cách tiềm năng đến các đặc tính hương vị của dịch chiết stevia. Hơn nữa, mặc dù các nghiên cứu đã và đang được tiến hành sâu rộng trên các steviol glycosit thu được bằng cách gắn thêm glucoza vào Reb.A và các loại giống cây trồng chứa nó thì không có nhiều nghiên cứu được tiến hành vào thời điểm mà loại giống cây trồng chứa một lượng dồi dào steviol glycosit có ramnoza như Reb.C và trên steviol glycosit như vậy.

Theo đó, mục đích của sáng chế là xác định cấu trúc của steviol glycosit mới có mặt với một lượng nhỏ mà ảnh hưởng đến chất lượng mùi vị, và nhận dạng các đặc điểm của chất lượng mùi vị. Ngoài ra, các mục đích khác của sáng chế là đề xuất steviol glycosit mới, phương pháp sản xuất hợp chất này, và chế phẩm tạo ngọt chứa hợp chất này.

Cách thức giải quyết vấn đề

Các tác giả sáng chế đã tiến hành các nghiên cứu chuyên sâu để giải quyết vấn đề được mô tả trên đây, và kết quả là thành công trong việc xác định cấu trúc của steviol glycosit mới có mặt với một lượng nhỏ mà ảnh hưởng đến chất lượng mùi vị. Sáng chế được thực hiện trên cơ sở những phát hiện nêu trên.

Hiệu quả của sáng chế

Sáng chế đề xuất steviol glycosit mới có mặt với một lượng nhỏ mà ảnh hưởng đến chất lượng mùi vị. Hơn nữa, sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất steviol glycosit mới, và chế phẩm tạo ngọt, thực phẩm hoặc đồ uống, thực vật, dịch chiết từ thực

vật và chất kiểm soát vị chứa steviol glycosit mới.

### Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 là sơ đồ thể hiện cấu trúc và tên của các steviol glycosit.

Fig. 2 là biểu đồ thể hiện sắc phổ ion được chọn của mẫu 1 ở  $m/z$  là 1095,4.

Fig. 3 là biểu đồ thể hiện sắc phổ ion được chọn của mẫu 1 ở  $m/z$  là 1257,5.

Fig. 4 là biểu đồ thể hiện khối phổ được phân đoạn MS/MS và MS<sup>3</sup> của steviol glycosit 1 mới.

Fig. 5 là biểu đồ thể hiện khối phổ được phân đoạn MS/MS và MS<sup>3</sup> của steviol glycosit 2 mới.

Fig. 6 là (a) biểu đồ thể hiện phổ <sup>1</sup>H-NMR của hợp chất 15 (800 MHz, Pyr-d<sub>5</sub>); và (b) biểu đồ thể hiện phổ <sup>13</sup>C-NMR của hợp chất 15 (200 MHz, Pyr-d<sub>5</sub>).

Fig. 7 là (a) biểu đồ thể hiện phổ cosy <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H của hợp chất 15 (800 MHz, Pyr-d<sub>5</sub>); và (b) biểu đồ thể hiện phổ HSQC của hợp chất 15 (800 MHz, Pyr-d<sub>5</sub>).

Fig. 8 là (a) biểu đồ thể hiện phổ HMBC của hợp chất 15 (800 MHz, Pyr-d<sub>5</sub>); và (b) biểu đồ thể hiện phổ TOCSY của hợp chất 15 (800 MHz, Pyr-d<sub>5</sub>).

Fig. 9 là biểu đồ thể hiện phổ NOESY của hợp chất 15 (800 MHz, Pyr-d<sub>5</sub>).

Fig. 10 là (a) biểu đồ thể hiện phổ <sup>1</sup>H-NMR của hợp chất 17 (800 MHz, Pyr-d<sub>5</sub>); và (b) biểu đồ thể hiện phổ <sup>13</sup>C-NMR của hợp chất 17 (200 MHz, Pyr-d<sub>5</sub>).

Fig. 11 là (a) biểu đồ thể hiện phổ cosy <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H của hợp chất 17 (800 MHz, Pyr-d<sub>5</sub>); và (b) phổ HSQC của hợp chất 17 (800 MHz, Pyr-d<sub>5</sub>).

Fig. 12 là (a) biểu đồ thể hiện phổ HMBC của hợp chất 17 (800 MHz, Pyr-d<sub>5</sub>); và (b) biểu đồ thể hiện phổ TOCSY của hợp chất 17 (800 MHz, Pyr-d<sub>5</sub>).

Fig. 13 là biểu đồ thể hiện phổ NOESY của hợp chất 17 (800 MHz, Pyr-d<sub>5</sub>).

Fig. 14 là biểu đồ thể hiện sắc phổ ion được chiết của steviol glycosit 1 mới (dịch chiết lá stevia) và sản phẩm được tổng hợp hóa học (dạng β của hợp chất 15).

Fig. 15 là biểu đồ thể hiện khối phổ được phân đoạn MS/MS và MS<sup>3</sup> của steviol glycosit 1 mới (dịch chiết lá stevia) và sản phẩm được tổng hợp hóa học (dạng β của hợp chất 15).

Fig. 16 là biểu đồ thể hiện sắc phổ ion được chiết của steviol glycosit 2 mới (dịch chiết lá stevia) và sản phẩm được tổng hợp hóa học (dạng β của hợp chất 17).

Fig. 17 là biểu đồ thể hiện khối phổ MS/MS và MS<sup>3</sup> được phân đoạn của steviol glycosit 2 mới (dịch chiết lá stevia) và sản phẩm được tổng hợp hóa học (dạng β của hợp

chất 17).

Fig. 18 là biểu đồ thể hiện sắc phổ ion được chọn của mẫu thu được bằng cách sinh tổng hợp ở  $m/z$  là 1095,4.

Fig. 19 là biểu đồ thể hiện sắc phổ ion được chọn của mẫu thu được bằng cách sinh tổng hợp ở  $m/z$  là 1257,5.

Fig. 20 là biểu đồ thể hiện kết quả đánh giá cảm quan để so sánh giữa steviol glycosit mới với rebaudioside A và rebaudioside D.

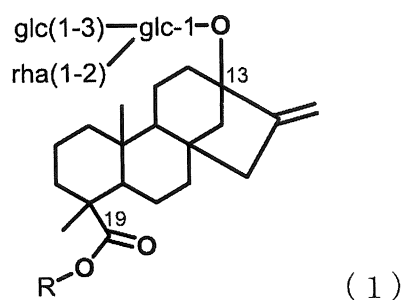
### Mô tả chi tiết sáng chế

Sau đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết. Phương án sau đây được đề cập nhằm minh họa sáng chế và không nhằm mục đích giới hạn sáng chế chỉ ở phương án này. Sáng chế có thể được thực hiện theo nhiều phương thức mà không nằm ngoài phạm vi của sáng chế. Tất cả các tài liệu, công bố, các công bố sáng chế và các tài liệu patent khác được trích dẫn trong bản mô tả này được kết hợp trong bản mô tả này để tham khảo.

Các thuật ngữ "rebaudioside" và "Reb." được sử dụng trong bản mô tả này có cùng nghĩa và cả hai đều đề cập tới "rebaudioside".

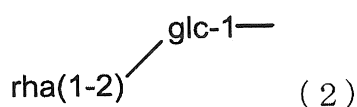
#### 1. Steviol glycosit mới

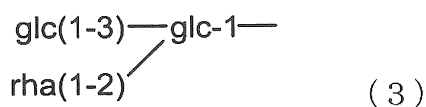
Đầu tiên, các tác giả sáng chế đã tìm ra cấu trúc của một lượng nhỏ steviol glycosit mới mà ảnh hưởng đến chất lượng mùi vị. Steviol glycosit mới theo sáng chế (sau đây còn được đề cập là "glycosit theo sáng chế") là hợp chất được thể hiện bằng công thức (1):



hoặc dẫn xuất, muối hoặc hydrat của nó,

trong đó R là chuỗi đường có công thức (2) hoặc (3); và





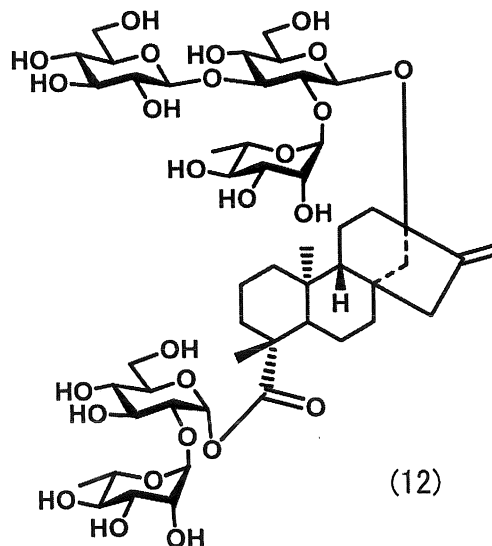
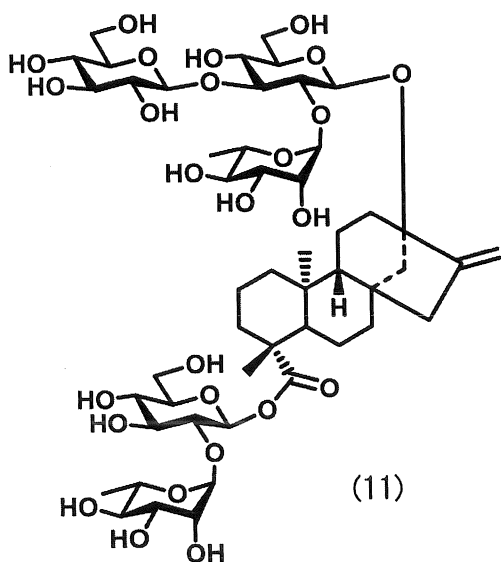
glc là glucoza, và rha là ramnoza.

Như được thể hiện trên đây, glycosit theo sáng chế có chuỗi đường chứa hai gốc glucoza và một gốc ramnoza ở vị trí C-13 của steviol, và chuỗi đường chứa một gốc glucoza và một gốc ramnoza, hoặc hai gốc glucoza và một gốc ramnoza ở vị trí C-19.

Hơn nữa, như được thể hiện trên đây, glc là glucoza và rha là ramnoza. "Glc" như được sử dụng trong bản mô tả này có thể là  $\alpha$ - hoặc  $\beta$ -glucoza trong khi rha có thể là  $\alpha$ - hoặc  $\beta$ -ramnoza. Theo cách khác, "glc" như được sử dụng trong bản mô tả này có thể là  $\alpha$ - và  $\beta$ -glucoza trong khi rha có thể là  $\alpha$ - và  $\beta$ -ramnoza. Hơn nữa, "glc-1-" nghĩa là nguyên tử cacbon ở C-1 của glucoza được nối với steviol bằng liên kết glycosit, và "glc(1-3)-glc-1-" nghĩa là nguyên tử cacbon ở C-3 của glucoza được thể hiện bởi "glc-1-" được nối với nguyên tử cacbon ở C-1 của một glucoza khác bằng liên kết glycosit. Hơn nữa, "rha(1-2)-glc-1-" nghĩa là nguyên tử cacbon ở C-2 của glucoza được thể hiện bởi "glc-1-" được nối với nguyên tử cacbon ở C-1 của ramnoza bằng liên kết glycosit.

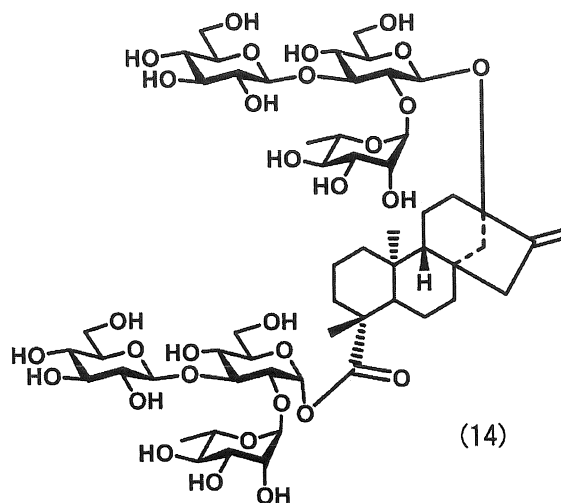
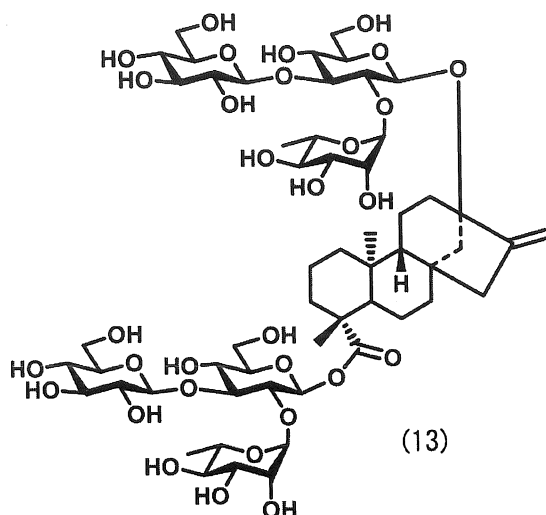
Trong bản mô tả này, trong số các hợp chất được thể hiện bởi công thức (1), các hợp chất trong đó R có chuỗi đường có công thức (2) dùng để chỉ "Glycosit A" trong khi những hợp chất trong đó R có chuỗi đường có công thức (3) dùng để chỉ "Glycosit B".

Ví dụ về Glycosit A bao gồm glycosit có cấu trúc được thể hiện bởi công thức (11) và (12).



Trong Glycosit A được thể hiện bởi công thức (11), glucoza được nối với nhóm carboxylic ở vị trí C-19 của steviol bằng liên kết  $\beta$ -glycosit, trong khi đó trong Glycosit A được thể hiện bởi công thức (12), glucoza được nối với nhóm carboxylic ở vị trí C-19 của steviol bằng liên kết  $\alpha$ -glycosit.

Ví dụ về Glycosit B bao gồm glycosit có cấu trúc được thể hiện bởi công thức (13) và (14).



Trong Glycosit B được thể hiện bởi công thức (13), glucoza được nối với nhóm carboxylic ở vị trí C-19 của steviol bằng liên kết  $\beta$ -glycosit, trong khi đó trong Glycosit B được thể hiện bởi công thức (14), glucoza được nối với nhóm carboxylic ở vị trí C-19 của steviol bằng liên kết  $\alpha$ -glycosit.

Glycosit theo sáng chế cũng bao gồm chất đồng phân như dạng  $\alpha$  và  $\beta$  như được mô tả ở trên. Do đó, glycosit theo sáng chế chỉ có thể bao gồm chất đồng phân có dạng  $\alpha$ , chất đồng phân có dạng  $\beta$  hoặc hỗn hợp của dạng  $\alpha$  và  $\beta$ . Glycosit theo sáng chế có dạng  $\beta$  với tỉ lệ tốt hơn là 80% hoặc nhiều hơn, còn tốt hơn là 90% hoặc nhiều hơn, vẫn còn tốt hơn là 95% hoặc nhiều hơn, và đặc biệt tốt hơn là 99% hoặc nhiều hơn. Dạng  $\alpha$  và  $\beta$  có thể được phân tách/tinh chế theo phương pháp đã biết như sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), sắc ký lỏng hiệu năng siêu cao (UPLC), hoặc phương pháp tương tự.

Glycosit theo sáng chế không chỉ là hợp chất được thể hiện bởi công thức (1) mà còn có thể là dẫn xuất, muối hoặc hydrat của nó. Thuật ngữ "dẫn xuất" được sử dụng trong bản mô tả này là hợp chất tạo thành từ sự thay đổi cấu trúc của một gốc nhỏ của hợp chất đó, ví dụ, hợp chất mà trong đó một số nhóm hydroxyl được thế bằng các phần tử thế khác. Vì vậy, các dẫn xuất của hợp chất được thể hiện bởi công thức (1) bao gồm

các hợp chất mà trong đó một số nhóm hydroxyl có trong hợp chất này được thế bằng phân tử thế được chọn từ hydro, halogen, nhóm alkyl, nhóm alkenyl, nhóm alkynyl, nhóm aryl, nhóm amino, nhóm xyano hoặc tương tự. Như được sử dụng trong bản mô tả này, "muối của hợp chất được thể hiện bởi công thức (1)" là muối sinh lý, ví dụ, muối natri, của hợp chất được thể hiện bởi công thức (1). Hơn nữa, "hydrat của hợp chất được thể hiện bởi công thức (1)" được sử dụng trong bản mô tả này là hợp chất tạo thành từ sự bổ sung phân tử nước vào hợp chất được thể hiện bởi công thức (1).

Khi mà glycosit theo sáng chế là không bị giới hạn cụ thể, nó có thể là sản phẩm có nguồn gốc từ thực vật, sản phẩm được tổng hợp hóa học hoặc sản phẩm sinh học tổng hợp. Ví dụ, nó có thể được phân tách và tinh chế từ thực vật nhiều Reb.C, hoặc có thể thu được nó bằng cách tổng hợp hóa học hoặc tổng hợp sinh học. Các chi tiết về phương pháp sản xuất glycosit theo sáng chế sẽ được mô tả sau đây trong bản mô tả này.

Glycosit theo sáng chế ngọt hơn đường (sucroza), có chất lượng mùi vị như khởi phát vị ngọt sớm và dư vị ngọt kéo dài tuyệt vời như đường, và có thể ảnh hưởng đến chất lượng mùi vị của các thực phẩm/đồ uống chỉ bằng một lượng nhỏ. Như vậy, glycosit theo sáng chế có thể được sử dụng làm chất tạo ngọt mới.

Glycosit theo khía cạnh ưu tiên của sáng chế được chọn từ Glycosit A hoặc Glycosit B. Glycosit B ngọt hơn đường (sucroza), khởi phát vị ngọt sớm, có dư vị ngọt kéo dài tuyệt vời như đường, và có thể hòa tan trong nước nhanh. Theo đó, nó có thể thích hợp làm chất tạo ngọt trong nhiều ứng dụng như được mô tả dưới đây. Glycosit A, mặc dù không ngọt như Glycosit B, nhưng ngọt hơn đường (sucroza), khởi phát vị ngọt sớm, và có dư vị ngọt kéo dài tuyệt vời như đường. Tương tự như Glycosit B, Glycosit A cũng có thể thích hợp làm chất tạo ngọt trong nhiều ứng dụng. Do khả năng hòa tan trong nước kém hơn Glycosit B, nó có thể đặc biệt thích hợp sử dụng cho đồ uống lên men đường sữa, nước ép trái cây được tạo huyền phù, và nhũ tương của đồ uống. Nó cũng có thể thích hợp được sử dụng để điều chỉnh độ ngọt của sản phẩm được phẩm hoặc tương tự. Mặc dù không muốn bị ràng buộc bởi bất kỳ lý thuyết nào, nhưng khả năng hòa tan trong nước kém có thể ngăn cảm nhận vị đắng bằng lưỡi trong khi tăng cường kích thích cảm giác đi xuống cổ họng, và do đó tạo thuận lợi để tăng lượng đồ uống.

## 2. Chế phẩm tạo ngọt chứa steviol glycosit mới

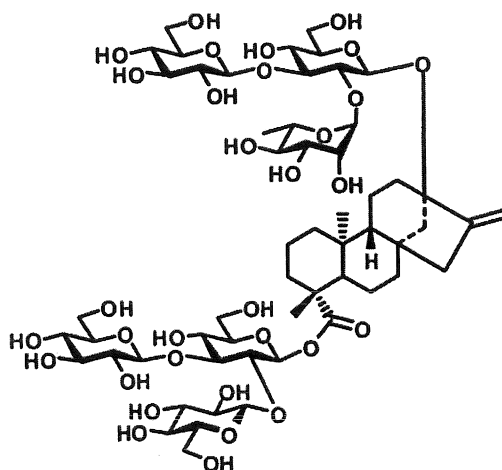
Theo một khía cạnh của sáng chế, sáng chế đề cập đến chế phẩm tạo ngọt chứa hợp chất được thể hiện bởi công thức (1), hoặc dẫn xuất, muối hoặc hydrat của nó (sau

đây còn được gọi là "chế phẩm tạo ngọt theo sáng chế"). Chế phẩm tạo ngọt theo sáng chế là không bị giới hạn cụ thể miễn là nó chứa hợp chất được thể hiện bởi công thức (1), hoặc dẫn xuất, muối hoặc hydrat của nó, và nó có thể là chế phẩm chứa dịch chiết chứa hợp chất được thể hiện bởi công thức (1), hoặc dẫn xuất, muối hoặc hydrat của nó.

Lượng glycosit theo sáng chế được chứa trong chế phẩm tạo ngọt theo sáng chế là không bị giới hạn cụ thể.

Ngoài ra, chế phẩm tạo ngọt theo sáng chế tốt hơn là chế phẩm chứa glycosit theo sáng chế với một lượng lớn hơn lượng trong stevia kiểu đại hoặc dịch chiết stevia ít nhất là 0,01%. Như được đề cập trên đây, glycosit theo sáng chế được phát hiện lần đầu tiên trong giống cây trồng chứa nhiều Reb.C, và nó không được chứa chút nào trong stevia kiểu đại hoặc dịch chiết của nó hoặc nếu có thì được chứa với lượng giới hạn phát hiện hoặc ít hơn.

Chế phẩm tạo ngọt theo sáng chế có thể còn chứa steviol glycosit khác. Ví dụ, chế phẩm tạo ngọt theo sáng chế có thể chứa, ngoài glycosit theo sáng chế, một hoặc nhiều loại steviol glycosit được chọn từ nhóm bao gồm rebaudioside A, rebaudioside B, rebaudioside C, rebaudioside D, rebaudioside E, rebaudioside F, rebaudioside I, rebaudioside J, rebaudioside K, rebaudioside N, rebaudioside M, rebaudioside O, rebaudioside Q, rebaudioside R, dulcoside A, dulcoside C, rubusoside, steviol, steviol monosit, steviol biosit và steviosit. Trong bản mô tả này, "dulcoside C" dùng để chỉ hợp chất có cấu trúc như sau.



Trong trường hợp bao gồm steviol glycosit khác, thì tỷ lệ thành phần của glycosit theo sáng chế và steviol glycosit khác tốt hơn là 0,01:9,99-6:4 theo tỉ lệ khối lượng.

Chế phẩm tạo ngọt theo sáng chế có thể còn chứa chất tạo ngọt thông thường.

Các ví dụ về chất tạo ngọt thông thường bao gồm các chất tạo ngọt tự nhiên như fructoza, đường, xi rô fructoza-glucoza, glucoza, mantoza, sucroza, xi rô fructoza cao, rượu đường, oligosaccarit, mật ong, nước ép mía (xi rô đường nâu), xi rô tinh bột, bột Lo Han Kuo (*Siraitia grosvenorii*), dịch chiết Lo Han Kuo, bột cam thảo, dịch chiết cam thảo, bột hạt giống *Thaumatococcus daniellii* và dịch chiết hạt giống *Thaumatococcus daniellii*, và các chất tạo ngọt nhân tạo như axesulfam kali, sucraloza, neotam, aspartam và sacarin. Trong số chúng, các chất tạo ngọt tự nhiên tốt hơn là được sử dụng từ khía cạnh là truyền mùi vị sạch, khả năng dễ uống, hương vị tự nhiên và sự tương đối giàu mùi vị, trong đó fructoza, glucoza, mantoza, sucroza và đường đặc biệt tốt hơn là được sử dụng. Một loại hoặc nhiều loại thành phần tạo ngọt này được sử dụng.

### 3. Thực phẩm/đồ uống chứa steviol glycosit mới

Theo một khía cạnh của sáng chế, sáng chế đề cập đến thực phẩm hoặc đồ uống chứa hợp chất được thể hiện bởi công thức (1), hoặc dẫn xuất, muối hoặc hydrat của nó (sau đây còn được gọi là "thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế"). Thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế là không bị giới hạn cụ thể miễn là nó chứa hợp chất được thể hiện bởi công thức (1), hoặc dẫn xuất, muối hoặc hydrat của nó, và có thể là thực phẩm hoặc đồ uống chứa dịch chiết hoặc chế phẩm tạo ngọt chứa hợp chất được thể hiện bởi công thức (1), hoặc dẫn xuất, muối hoặc hydrat của nó. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thực phẩm hoặc đồ uống là các thực phẩm và đồ uống. Vì vậy, trong một số phương án, sáng chế đề cập đến thực phẩm hoặc đồ uống mới, và phương pháp sản xuất thực phẩm hoặc đồ uống đó.

Khi lượng glycosit theo sáng chế được chứa trong thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế khác nhau phụ thuộc vào thực phẩm hoặc đồ uống cụ thể, tốt hơn là khoảng 0,0004%-0,8% và còn tốt hơn là từ 0,04%-0,4%. Miễn là hàm lượng nằm trong khoảng nêu trên thì dư vị đọng lại có thể được ngăn một cách thuận lợi.

Thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế có thể còn chứa các steviol glycosit khác. Ví dụ, chế phẩm tạo ngọt theo sáng chế có thể chứa, ngoài glycosit theo sáng chế, một hoặc nhiều loại steviol glycosit được chọn từ nhóm bao gồm rebaudioside A, rebaudioside B, rebaudioside C, rebaudioside D, rebaudioside E, rebaudioside F, rebaudioside I, rebaudioside J, rebaudioside K, rebaudioside N, rebaudioside M, rebaudioside O, rebaudioside Q, rebaudioside R, dulcoside A, dulcoside C, rubusoside, steviol, steviol monosit, steviol biosit và steviosit.

Trong trường hợp bao gồm steviol glycosit khác, thì tỉ lệ thành phần của glycosit theo sáng chế và steviol glycosit khác tốt hơn là 0,01:9,99-6:4 theo tỉ lệ khối lượng.

Thực phẩm hoặc đồ uống theo sáng chế có thể còn chứa chất tạo ngọt thông thường. Các ví dụ về chất tạo ngọt thông thường như vậy bao gồm các chất tạo ngọt tự nhiên như fructoza, đường, xi rô fructoza-glucoza, glucoza, mantoza, sucroza, xi rô fructoza cao, rượu đường, oligosaccarit, mật ong, nước mía ép (xi rô đường nâu), xi rô tinh bột, bột Lo Han Kuo (*Siraitia grosvenorii*), dịch chiết Lo Han Kuo, bột cam thảo, dịch chiết cam thảo, bột hạt giống *Thaumatococcus daniellii* và dịch chiết hạt giống *Thaumatococcus daniellii*, và các chất tạo ngọt nhân tạo như axesulfam kali, sucraloza, neotam, aspartam và sacarin. Trong số chúng, các chất tạo ngọt tự nhiên tốt hơn là được sử dụng từ khía cạnh về truyền mùi vị sạch, khả năng dễ uống, hương vị tự nhiên và sự tương đối giàu mùi vị, trong đó fructoza, glucoza, mantoza, sucroza và đường đặc biệt tốt hơn là được sử dụng. Hoặc là một hoặc nhiều loại các thành phần tạo ngọt này được sử dụng.

Các ví dụ về thực phẩm theo sáng chế bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở bánh kẹo, bánh mỳ, bột ngũ cốc, mỳ, gạo, thực phẩm nông nghiệp/lâm nghiệp chế biến sẵn, sản phẩm gia súc chế biến sẵn, sản phẩm cá chế biến sẵn, sản phẩm sữa/bơ sữa, sản phẩm dầu và chất béo/dầu và chất béo chế biến sẵn, gia vị hoặc nguyên liệu thực phẩm khác.

Các ví dụ về đồ uống theo sáng chế bao gồm, nhưng là không bị giới hạn cụ thể ở đồ uống có ga, đồ uống không có ga, đồ uống có cồn, đồ uống không cồn, đồ uống có vị bia hoặc bia không cồn, cà phê, trà, đồ uống cacao, đồ uống dinh dưỡng và đồ uống dạng thực phẩm chức năng.

Đồ uống theo sáng chế có thể được khử trùng bằng nhiệt và được đóng gói để được chế biến làm đồ uống bao gói. Các ví dụ về đồ uống như vậy bao gồm, nhưng là không bị giới hạn cụ thể ở chai PET, đồ hộp nhôm, hộp thép, hộp giấy, cốc được làm lạnh, và chai. Trong trường hợp mà việc khử trùng bằng nhiệt cần được thực hiện thì cách khử trùng bằng nhiệt là không bị giới hạn cụ thể. Ví dụ, việc khử trùng bằng nhiệt có thể được thực hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật chung như khử trùng UHT, hấp thanh trùng hoặc tương tự. Nếu nhiệt độ trong quá trình khử trùng bằng nhiệt là không bị giới hạn cụ thể thì ví dụ nó là 65-130°C, và tốt hơn là 85-120°C, trong 10-40 phút. Việc khử trùng, tuy nhiên, có thể được thực hiện ở nhiệt độ thích hợp trong vài giây, ví dụ 5-30 giây, mà không xảy ra vấn đề miễn là đạt được cùng trị số khử trùng với các điều kiện được mô tả

trên đây.

#### 4. Thực vật chứa steviol glycosit mới và dịch chiết của nó

Theo một khía cạnh của sáng chế, sáng chế đề cập đến thực vật chứa steviol glycosit mới và dịch chiết của nó. Hơn nữa, theo một khía cạnh khác của sáng chế, sáng chế đề cập đến thực phẩm hoặc đồ uống, tốt hơn là đồ uống, chứa thực vật theo sáng chế hoặc dịch chiết thực vật. Nếu lượng glycosit theo sáng chế được chứa trong thực vật theo sáng chế là không bị giới hạn cụ thể, tốt hơn là từ 0,001%-1,000% và tốt hơn nữa là 0,01%-0,80%.

Tốt hơn là, thực vật theo sáng chế là thực vật mà chứa glycosit theo sáng chế với lượng nhiều hơn các loại stevia kiểu dại khoảng 0,01% hoặc nhiều hơn. Như được mô tả trên đây, steviol glycosit theo sáng chế không được chứa một chút nào trong stevia kiểu dại hoặc nếu cần, được chứa với lượng giới hạn phát hiện hoặc ít hơn.

Cụm từ "chứa glycosit theo sáng chế với lượng nhiều hơn các loại stevia kiểu dại khoảng 0,01% hoặc nhiều hơn" nghĩa là, liên quan đến hàm lượng (nồng độ) của glycosit theo sáng chế được chứa trên mỗi đơn vị số lượng (ví dụ 10ml) dịch chiết dạng lỏng từ lá tươi (lá không phơi khô) của thực vật stevia kiểu dại, hàm lượng (nồng độ) của glycosit theo sáng chế được chứa trong đơn vị số lượng tương đương của dịch chiết dạng lỏng từ lá tươi (lá không phơi khô) của thực vật theo sáng chế (lượng giống như lượng của dịch chiết dạng lỏng từ lá của thực vật stevia kiểu dại plant) là cao hơn khoảng 0,01% hoặc nhiều hơn. Trong bản mô tả này, thực vật theo sáng chế có thể chứa glycosit theo sáng chế với lượng lớn hơn các loại stevia kiểu dại là 0,02% hoặc nhiều hơn, 0,03% hoặc nhiều hơn, 0,04% hoặc nhiều hơn, 0,05% hoặc nhiều hơn, 0,07% hoặc nhiều hơn, 0,09% hoặc nhiều hơn, 0,10% hoặc nhiều hơn, 0,15% hoặc nhiều hơn, 0,20% hoặc nhiều hơn, 0,40% hoặc nhiều hơn, 0,60% hoặc nhiều hơn, 0,80% hoặc nhiều hơn, 1,0% hoặc nhiều hơn, 1,50% hoặc nhiều hơn, 2,00% hoặc nhiều hơn, 4,00% hoặc nhiều hơn, 6,00% hoặc nhiều hơn, 8,00% hoặc nhiều hơn, hoặc 10,00% hoặc nhiều hơn.

Hơn nữa, cụm từ "tỷ lệ của glycosit theo sáng chế trong số tổng steviol glycosit là 0,01% hoặc nhiều hơn" nghĩa là glycosit theo sáng chế tồn tại ở tỷ lệ là 0,01% hoặc nhiều hơn tính theo hàm lượng của tổng steviol glycosit tồn tại trong dịch chiết dạng lỏng từ lá tươi (lá không phơi khô) của thực vật stevia theo sáng chế. Trong bản mô tả này, tổng steviol glycosit không chứa steviol glycosit chưa được biết đến hoặc không chứa bất kỳ steviol glycosit nào tồn tại ở lượng ít hơn giới hạn phát hiện. Tốt hơn là tổng các

steviol glycosit gồm có rebaudioside A, rebaudioside B, rebaudioside C, rebaudioside D, rebaudioside E, rebaudioside F, rebaudioside I, rebaudioside J, rebaudioside K, rebaudioside N, rebaudioside M, rebaudioside O, rebaudioside Q, rebaudioside R, dulcoside A, dulcoside C, rubusoside, steviol, steviol monosit, steviol biosit và steviosit.

Nếu hàm lượng glycosit theo sáng chế trong thực vật theo sáng chế là như được mô tả trên đây thì trong trường hợp mà lá khô thu được từ thực vật theo sáng chế, glycosit theo sáng chế có thể tồn tại với lượng là 0,01% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 0,02% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 0,03% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 0,04% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 0,05% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 0,07% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 0,10% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 0,15% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 0,20% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 0,30% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 0,50% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 0,60% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 0,80% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 1,00% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 2,00% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 4,00% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 6,00% trọng lượng hoặc nhiều hơn, 8,00% trọng lượng hoặc nhiều hơn, hoặc 10,00% trọng lượng hoặc nhiều hơn tính theo trọng lượng của lá khô nêu trên.

Trong bản mô tả này, lá khô của thực vật theo sáng chế là các loại thu được bằng cách làm khô lá ướt của thực vật theo sáng chế để làm giảm hàm lượng nước của chúng xuống 10% trọng lượng hoặc ít hơn, 7% trọng lượng hoặc ít hơn, 5% trọng lượng hoặc ít hơn, 4% trọng lượng hoặc ít hơn, 3% trọng lượng hoặc ít hơn, 2% trọng lượng hoặc ít hơn, hoặc 1% trọng lượng hoặc ít hơn. Tốt hơn là hàm lượng nước của lá khô của thực vật theo sáng chế là 3-4% trọng lượng.

Ví dụ về thực vật theo sáng chế bao gồm thực vật có nhiều Reb.C. Như được mô tả trên đây, steviol glycosit theo sáng chế không được chứa một chút nào trong stevia kiểu đại, nếu có, được chứa với lượng giới hạn phát hiện hoặc ít hơn. Trong khi đó thì các tác giả sáng chế đã phát hiện ra steviol glycosit theo sáng chế được chứa với lượng lớn hơn ở thực vật có nhiều Reb.C. Vì vậy, steviol glycosit mới và dịch chiết của nó cũng chứa thực vật với nhiều Reb.C như vậy và dịch chiết của nó.

Ví dụ về thực vật nhiều Reb.C như vậy bao gồm, nhưng là không bị giới hạn cụ thể ở, thực vật stevia không tái tổ hợp chứa rebaudioside C cao mà chứa rebaudioside C với lượng lớn hơn các loại stevia kiểu đại khoảng 20% hoặc nhiều hơn, và tỷ lệ rebaudioside C của nó trong số tổng các steviol glycosit là 40% hoặc nhiều hơn (sau đây còn được gọi là "thực vật Reb.C cao").

Ví dụ về thực vật Reb.C cao bao gồm thực vật stevia không tái tổ hợp chứa rebaudioside C cao mà chứa rebaudioside C với lượng lớn hơn các loại stevia kiểu đại là 20% hoặc nhiều hơn, và tỷ lệ rebaudioside C của nó trong số tổng các steviol glycosit là 40% hoặc nhiều hơn.

Thực vật Reb.C cao là loại giống cây trồng có nguồn gốc từ thực vật stevia kiểu đại, mà trong đó đột biến gen xảy ra làm tăng rebaudioside C. Các ví dụ về đột biến gen như vậy bao gồm nhưng là không bị giới hạn cụ thể ở đột biến gen gây ra do các điều kiện xảy ra tự nhiên, đột biến gen gây ra do kỹ thuật phi tái tổ hợp và đột biến gen gây ra do sự tái tổ hợp gen.

Thực vật Reb.C cao có thể được sàng lọc, ví dụ bằng cách phát hiện hiện tượng đa hình gen trong mô của thực vật. Trong bản mô tả này, "sự sàng lọc" nghĩa là nhận dạng và chọn thực vật Reb.C cao trong số các cơ thể thực vật khác.

Thực vật Reb.C cao cũng có thể được sàng lọc theo phương pháp sàng lọc mà bao gồm bước nhận dạng hiện tượng đa hình của A trong kiểu đại được biến đổi thành T ở nucleotit thứ 60 của trình tự nucleotit được thể hiện bằng SEQ ID NO:11 trong bộ gen của thực vật thử nghiệm.

Thực vật theo sáng chế không chỉ bao gồm toàn bộ thực vật mà còn bao gồm các cơ quan của thực vật (ví dụ, lá, cánh hoa, thân, rễ, hạt giống, v.v.), các mô thực vật (ví dụ, biểu bì, libe, nhu mô, chất gỗ, bó mạch, mô palisade, mô xốp, v.v.), các dạng khác của tế bào thực vật (ví dụ, các tế bào được nuôi cấy trong hỗn dịch), thể nguyên sinh, mẫu lá, thể sần và tương tự.

Ngoài ra, thực vật theo sáng chế cũng có thể bao gồm việc cấy mô hoặc cấy tế bào thực vật. Đó là bởi vì việc cấy mô hoặc việc cấy tế bào thực vật có thể được cấy để tái tạo thực vật. Các ví dụ về việc cấy mô hoặc cấy tế bào thực vật của thực vật theo sáng chế bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở phôi, các tế bào mô phân sinh, phần hoa, lá, rễ, ngọn rễ, cánh hoa, tế bào nguyên sinh, mẫu lá và thể sần.

Dịch chiết của thực vật theo sáng chế có thể thu được bằng cách cho lá tươi hoặc lá khô của thực vật theo sáng chế phản ứng với dung môi thích hợp (dung môi chứa nước như nước hoặc dung môi hữu cơ như rượu, ete hoặc axeton). Đối với điều kiện chiết, xem phương pháp được mô tả trong công bố đơn số WO2016/090460 hoặc phương pháp được mô tả trong ví dụ dưới đây.

Tốt hơn là dịch chiết của thực vật theo sáng chế chứa glycosit theo sáng chế với

lượng lớn hơn stevia kiểu đại 0,01% hoặc nhiều hơn, trong đó tỷ lệ của glycosit theo sáng chế trong số tổng các steviol glycosit là 0,01% hoặc nhiều hơn. Trong bản mô tả này, cụm từ "chứa glycosit theo sáng chế với lượng lớn hơn stevia kiểu đại là 0,01% hoặc nhiều hơn" nghĩa là tương tự như được đề cập trên đây. Theo cách tương tự, cụm từ "tỷ lệ của glycosit theo sáng chế trong số tổng các steviol glycosit là 0,01% hoặc nhiều hơn" cũng nghĩa là tương tự như được đề cập trên đây.

#### 5. Chế phẩm điều vị chứa steviol glycosit mới

Mặc dù steviol glycosit mới theo sáng chế được chứa trong dịch chiết stevia với một lượng nhỏ, nó được xem là có ảnh hưởng đến hương vị dịch chiết stevia. Trong khi không mong muốn bị ràng buộc bởi bất kỳ lý thuyết nào, việc bổ sung lượng nhỏ steviol glycosit theo sáng chế có lẽ có thể kiểm soát hương vị của thực phẩm hoặc đồ uống. Vì vậy, theo một khía cạnh của sáng chế, sáng chế đề cập đến chế phẩm điều vị chứa hợp chất được thể hiện bởi công thức (1) hoặc dẫn xuất, muối hoặc hydrat của nó được đề cập trên đây.

Được sử dụng trong bản mô tả này, "chế phẩm điều vị" là chất mà có thể được thêm vào thực phẩm hoặc đồ uống để kiểm soát hương vị của thực phẩm hoặc đồ uống. Tốt hơn là chế phẩm điều vị theo sáng chế có thể được thêm vào thực phẩm hoặc đồ uống để kiểm soát hương vị của chính thực phẩm hoặc đồ uống mà không người tiêu dùng nào nhận ra hương vị của chính chế phẩm điều vị. Ví dụ, do steviol glycosit theo sáng chế có dư vị ngọt tuyệt vời khi so sánh với các steviol glycosit thông thường, nó có thể được sử dụng làm chế phẩm điều vị để kiểm soát dư vị ngọt của thực phẩm hoặc đồ uống.

Chất kiểm soát vị theo sáng chế tốt hơn là bao gồm, ngoài hợp chất được thể hiện bởi công thức (1) hoặc dẫn xuất, muối hoặc hydrat của nó nêu trên, một hoặc nhiều loại chất tạo ngọt khác. Các ví dụ về chất tạo ngọt như vậy bao gồm: một hoặc nhiều loại steviol glycosit được chọn từ nhóm bao gồm: rebaudioside A, rebaudioside B, rebaudioside C, rebaudioside D, rebaudioside E, rebaudioside F, rebaudioside I, rebaudioside J, rebaudioside K, rebaudioside N, rebaudioside M, rebaudioside O, rebaudioside Q, rebaudioside R, dulcoside A, dulcoside C, rubusoside, steviol, steviol monosit, steviol biosit và steviosit; chất tạo ngọt tự nhiên như fructoza, đường, xi rô fructoza-glucoza, glucoza, mantoza, sucroza, xi rô fructoza cao, rượu đường, oligosaccarit, mật ong, nước ép mía (xi rô đường nâu), xi rô tinh bột, bột Lo Han Kuo (*Siraitia grosvenorii*), dịch chiết Lo Han Kuo, bột cam thảo, dịch chiết cam thảo, bột hạt

giống *Thaumatococcus daniellii* và dịch chiết hạt giống *Thaumatococcus daniellii*; và chất tạo ngọt nhân tạo như axesulfam kali, sucraloza, neotam, aspartam và sacarin.

#### 6. Phương pháp sản xuất steviol glycosit mới

Như được mô tả trên đây, steviol glycosit theo sáng chế có thể được sản xuất bằng (A) việc phân tách/tinh chế từ thực vật, (B) tổng hợp hóa học, hoặc (C) sinh tổng hợp. Sau đây, mỗi loại sẽ được mô tả.

##### (A) Phân tách/tinh chế từ thực vật

Do thực vật theo sáng chế chứa steviol glycosit mới theo sáng chế, steviol glycosit mới có thể được phân tách/tinh chế từ thực vật nêu trên. Lá tươi hoặc khô của thực vật theo sáng chế được cho phản ứng với dung môi thích hợp (dung môi chứa nước như nước hoặc dung môi hữu cơ như rượu, ete hoặc axeton) để chiết steviol glycosit mới ở trạng thái dịch chiết lỏng. Đối với các điều kiện chiết và điều kiện khác, xem phương pháp được mô tả trong công bố đơn WO2016/090460 hoặc phương pháp được mô tả trong ví dụ dưới đây.

Hơn nữa, dịch chiết lỏng tạo thành có thể được cho tham gia phương pháp đã biết như gradien etyl axetat hoặc dung môi hữu cơ khác: nước, sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), hoặc sắc ký lỏng hiệu năng siêu cao (UPLC) để phân tách/tinh chế steviol glycosit mới.

Hàm lượng của steviol glycosit mới trong thực vật có thể được xác định bằng phương pháp được mô tả trong công bố đơn số WO2016/090460 hoặc phương pháp được mô tả trong ví dụ dưới đây. Cụ thể là, hàm lượng có thể được đo bằng cách lấy mẫu lá tươi từ thực vật theo sáng chế và cho lá tham gia quá trình LC-MS/MS.

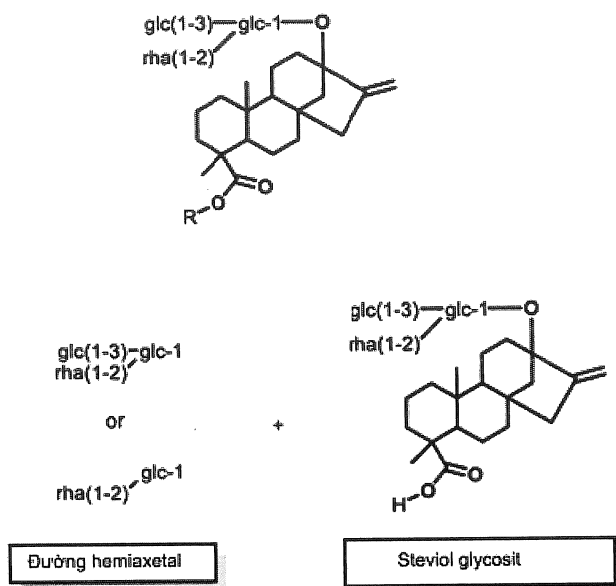
##### (B) Tổng hợp hóa học

Phương pháp sản xuất steviol glycosit theo sáng chế bằng cách tổng hợp hóa học được mô tả chi tiết dưới đây.

Các steviol glycosit có các cấu trúc mà trong đó các gốc đường khác nhau (glucoza, ramnoza, xiloza, v.v.) được gắn ở vị trí aglycon, tức là steviol, qua các dạng liên kết khác nhau (các vị trí và hình dạng liên kết). Vì vậy, steviol glycosit mong muốn có thể thu được qua các đường tổng hợp khác nhau phụ thuộc vào vật liệu ban đầu được chọn. Tuy nhiên, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực mà sáng chế liên quan đến hiểu rằng thời gian và hiệu suất để thu được hợp chất mong muốn thay đổi đáng kể phụ thuộc vào đường tổng hợp.

Thời gian này, các tác giả sáng chế phát hiện ra rằng phương pháp mới để sản xuất steviol glycosit theo sáng chế với tính chọn lọc cao hơn và hiệu suất cao hơn qua đường tổng hợp cụ thể. Theo phương pháp sản xuất steviol glycosit theo sáng chế, việc tổng hợp hóa học steviol glycosit diễn ra bằng cách tách steviol glycosit thành "steviol glycosit" và "dạng đường hemiaxetal" như được thể hiện trong Sơ đồ 1.

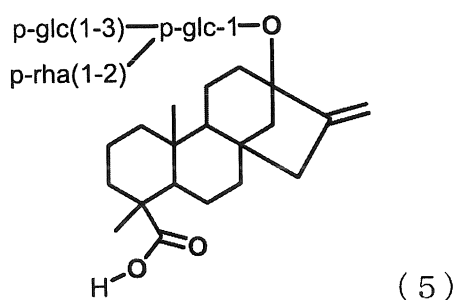
Sơ đồ 1: Phương pháp tổng hợp steviol glycosit mới



Steviol glycosit có thể được điều chế bằng cách dẫn xuất từ chất tồn tại trong tự nhiên (rebaudioside, dulcoside, steviosit, steviol biosit, rubusoside, v.v.). Trong khi đó đường hemiaxetal có thể được điều chế hoặc là từ chất tồn tại trong tự nhiên hoặc là bằng sự tổng hợp hóa học. Các tác giả sáng chế phát hiện ra rằng steviol glycosit mong muốn có thể thu được hiệu suất cao và tính chọn lọc  $\beta$  cực kỳ cao bằng cách ngưng tụ steviol glycosit và đường hemiaxetal qua phản ứng Mitsunobu.

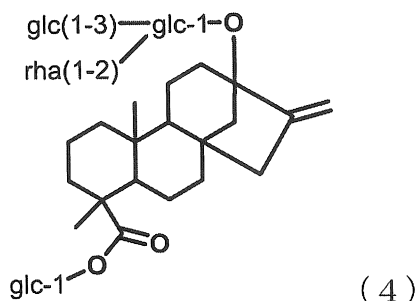
Theo một khía cạnh của sáng chế, sáng chế đề cập đến phương pháp sản xuất hợp chất được thể hiện bởi công thức (1) trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(A) điều chế chất trung gian 1 được thể hiện bởi công thức (5):



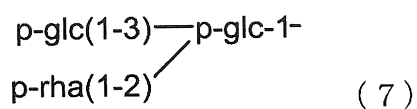
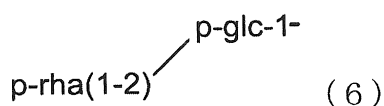
trong đó p-glc là glucoza trong đó ít nhất một nhóm hydroxyl được bảo vệ bởi nhóm bảo vệ, và p-rha là ramnoza trong đó ít nhất một nhóm hydroxyl được bảo vệ bởi nhóm bảo vệ,

từ rebaudioside C được thể hiện bởi công thức (4):



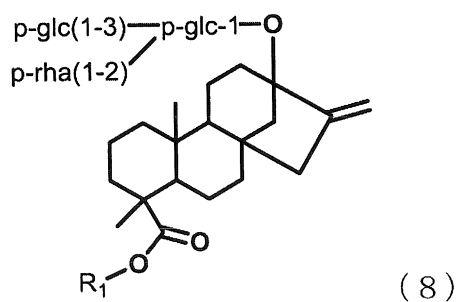
trong đó glc là glucoza và rha là ramnoza;

(B) điều chế chất trung gian 2 được thể hiện bởi công thức (6) hoặc chất trung gian 3 được thể hiện bởi công thức (7) từ dẫn xuất glucopyranoside:

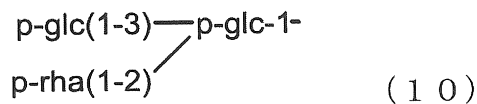
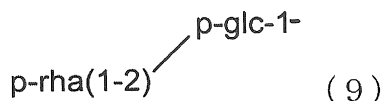


trong đó p-glc là glucoza trong đó ít nhất một nhóm hydroxyl được bảo vệ bởi nhóm bảo vệ, và p-rha là ramnoza trong đó ít nhất một nhóm hydroxyl được bảo vệ bởi nhóm bảo vệ; và

(C) cho Chất trung gian 1 phản ứng với chất trung gian 2 hoặc 3 với sự có mặt của chất phản ứng phosphin và hợp chất azo để thu được chất trung gian 4 được thể hiện bởi công thức (8):



trong đó,  $R_1$  là chuỗi đường có công thức (9) hoặc (10); và



p-glc là glucoza trong đó ít nhất một nhóm hydroxyl được bảo vệ bởi nhóm bảo vệ, và p-rha là ramnoza trong đó ít nhất một nhóm hydroxyl được bảo vệ bởi nhóm bảo vệ.

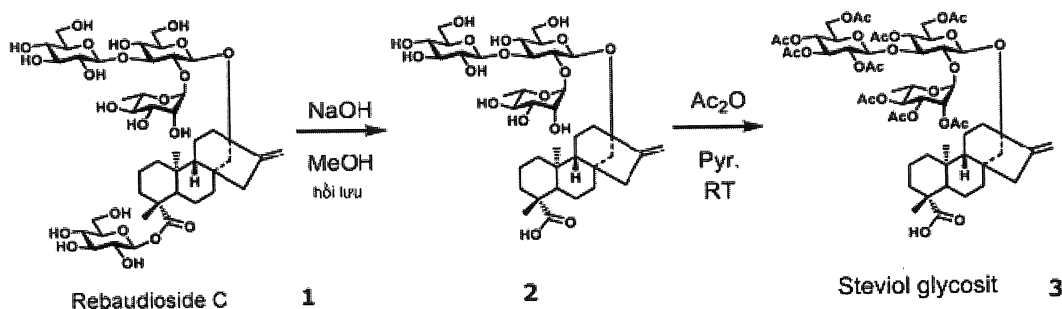
Trong bản mô tả này, các ví dụ về nhóm bảo vệ bao gồm nhóm bảo vệ axyl, nhóm silyl có ba nhóm thế, nhóm bảo vệ axetal và nhóm bảo vệ ete. Các ví dụ ưu tiên bao gồm nhóm silyl có ba nhóm thế (nhóm trimetylsilyl, nhóm trietylsilyl, nhóm t-butyldimetylsilyl, v.v.) và nhóm bảo vệ axyl (nhóm axetyl, nhóm benzoyl, v.v.).

Sau đây, một khía cạnh cụ thể của phương pháp sản xuất steviol glycosit theo sáng chế được mô tả, tuy nhiên phương pháp sản xuất glycosit theo sáng chế không bị giới hạn ở khía cạnh này.

#### (A) Bước đầu tiên (tổng hợp steviol glycosit)

Steviol glycosit có thể thu được, ví dụ, bằng Sơ đồ 2 dưới đây sử dụng rebaudioside C (dulcoside B) có trong tự nhiên làm nguyên liệu thô.

Sơ đồ 2: Tổng hợp steviol glycosit



Đầu tiên, rebaudioside C được hòa tan trong dung môi như metanol và nước, được thêm bazơ mạnh như natri hydroxit, và được hồi lưu ở nhiệt độ 60°C-120°C trong 2 giờ hoặc lâu hơn sao cho phân tử glucoza được loại bỏ từ vị trí C-19 của rebaudioside C để tạo ra Hợp chất 2 nêu trên. Để thực hiện quy trình này, dung môi có thể được làm bay hơi sau khi trung hòa dung dịch phản ứng bằng nhựa trao đổi cation hoặc tương tự.

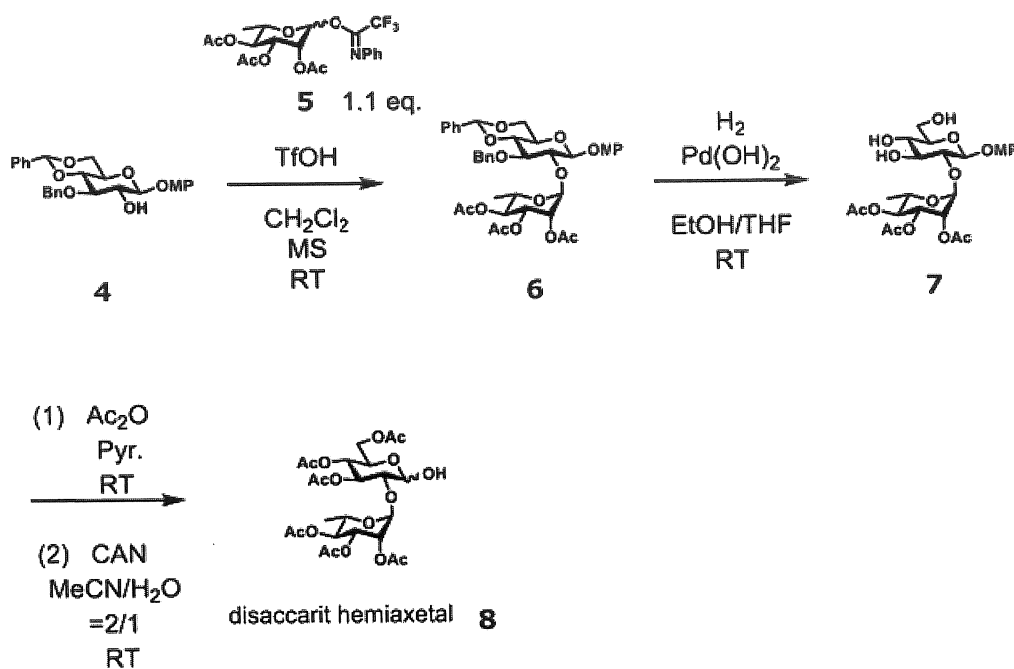
Hợp chất 2 được hòa tan thêm trong dung môi như pyridin, và được thêm anhydrit axetic hoặc tương tự để bảo vệ các nhóm hydroxyl được chứa trong hợp chất 2, nhờ đó thu được hợp chất 3 (Chất trung gian 1).

(B) Bước hai (tổng hợp disaccarit hoặc trisaccarit hemiaxetal)

Disaccarit hemiaxetal hoặc trisaccarit hemiaxetal có thể thu được, ví dụ, bằng cách sử dụng dẫn xuất glucopyranoside có bán sẵn làm chất ban đầu. Việc tổng hợp disaccarit hemiaxetal (Bước 2a) và trisaccarit hemiaxetal (Bước 2b) được thể hiện lần lượt trong Sơ đồ 3 và 4.

Sơ đồ 3 là quy trình tổng hợp disaccarit hemiaxetal (Bước 2a) như dưới đây.

Sơ đồ 3: Tổng hợp disaccarit hemiaxetal



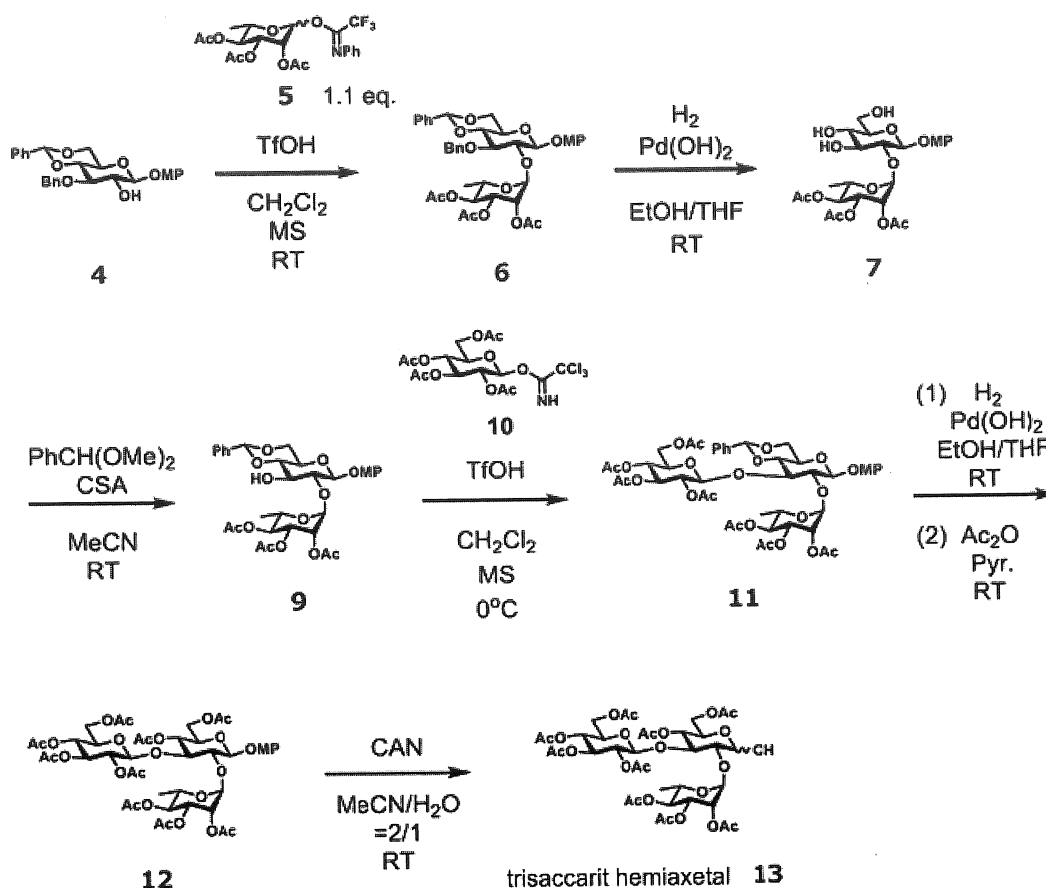
Đầu tiên, 4-metoxyphenyl 3-O-benzyl-4,6-O-benzylidin-β-D-glucopyranoside (Hợp chất 4), Hợp chất 5 và rây phân tử (MS) được hòa tan trong dung môi như diclometan, được thêm axit triflometansulfonic (chất xúc tác axit), và được khuấy ở 25°C-80°C trong 2 giờ hoặc lâu hơn để tạo ra hợp chất 6.

Tiếp theo, hợp chất 6 được hòa tan trong dung môi như etanol hoặc THF, được thêm chất xúc tác như paladi hydroxit ở nhiệt độ trong phòng, và được khuấy trong môi trường khí hydro ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ hoặc lâu hơn để hoàn thành phản ứng. Sau đó, chất xúc tác được loại bỏ bằng cách lọc để tạo ra hợp chất 7. Hợp chất 7 được hòa tan trong dung môi như pyridin, được thêm anhydrit axetic ở nhiệt độ trong phòng, và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 12-36 giờ. Sau đó, dung dịch được cô

dưới áp suất giảm, thêm axetonitril và nước, thêm chất oxy hóa như xeri amoni nitrat, và khuấy trong 5 phút đến 2 giờ để tạo ra hợp chất 8 (Chất trung gian 2).

Sơ đồ 4 là quy trình tổng hợp trisaccarit hemiaxetal (Bước 2b) như dưới đây.

Sơ đồ 4: Tổng hợp trisaccarit hemiaxetal



Đầu tiên, 4-metoxyphenyl 3-O-benzyl-4,6-O-benzylidin- $\beta$ -D-glucopyranoside (Hợp chất 4), Hợp chất 5 và rây phân tử (MS) được hòa tan trong dung môi như diclometan, thêm axit triflometansulfonic (chất xúc tác axit), và khuấy ở  $25^\circ\text{C}$ - $80^\circ\text{C}$  trong 2 giờ hoặc lâu hơn để tạo ra hợp chất 6.

Tiếp theo, hợp chất 6 được hòa tan trong dung môi như ethanol hoặc THF, thêm chất xúc tác như paladi hydroxit ở nhiệt độ trong phòng, và khuấy trong môi trường khí hydro ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ hoặc lâu hơn để hoàn thành phản ứng. Sau đó, chất xúc tác được loại bỏ bằng cách lọc để tạo ra hợp chất 7. Hợp chất 7 được hòa tan trong axetonitril, thêm benzaldehyde dimetyl axetal ở nhiệt độ trong phòng, và được khuấy trong 2 giờ hoặc lâu hơn để tạo ra hợp chất 9.

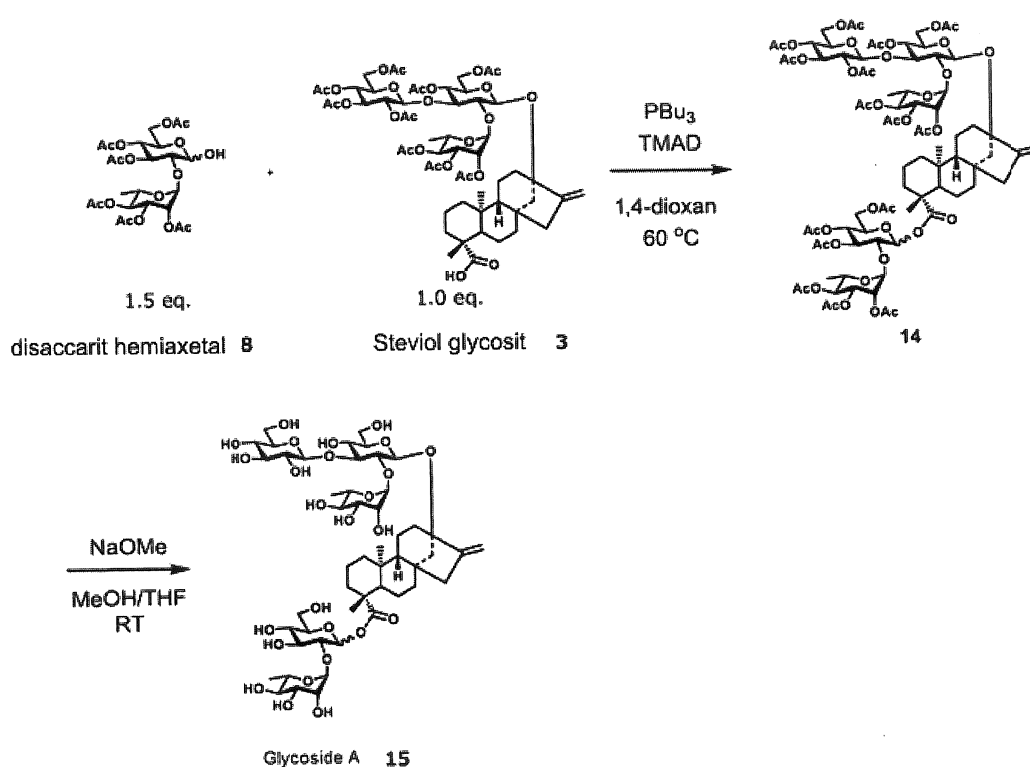
Hợp chất 9 và 10 và rây phân tử (MS) được hòa tan trong dung môi như

diclometan, được thêm axit triflometansulfonic ở nhiệt độ trong phòng, và được khuấy ở 0°C trong 3-9 giờ để tạo ra hợp chất 11. Hợp chất 11 tạo thành được hòa tan trong dung môi như etanol hoặc THF, thêm chất xúc tác như paladi hydroxit ở nhiệt độ trong phòng, và khuấy trong môi trường khí hydro ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ hoặc lâu hơn để hoàn thành phản ứng. Sau đó, chất tạo thành được hòa tan trong dung môi như pyridin, thêm anhydrit axetic ở nhiệt độ trong phòng, và khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 12-36 giờ để tạo ra hợp chất 12. Sau đó, dung dịch được cô dưới áp suất giảm, thêm axetonitril và nước, thêm chất oxy hóa như xeri amoni nitrat, và khuấy trong 5 phút đến 2 giờ, từ đó thu được hợp chất 13 (Chất trung gian 3).

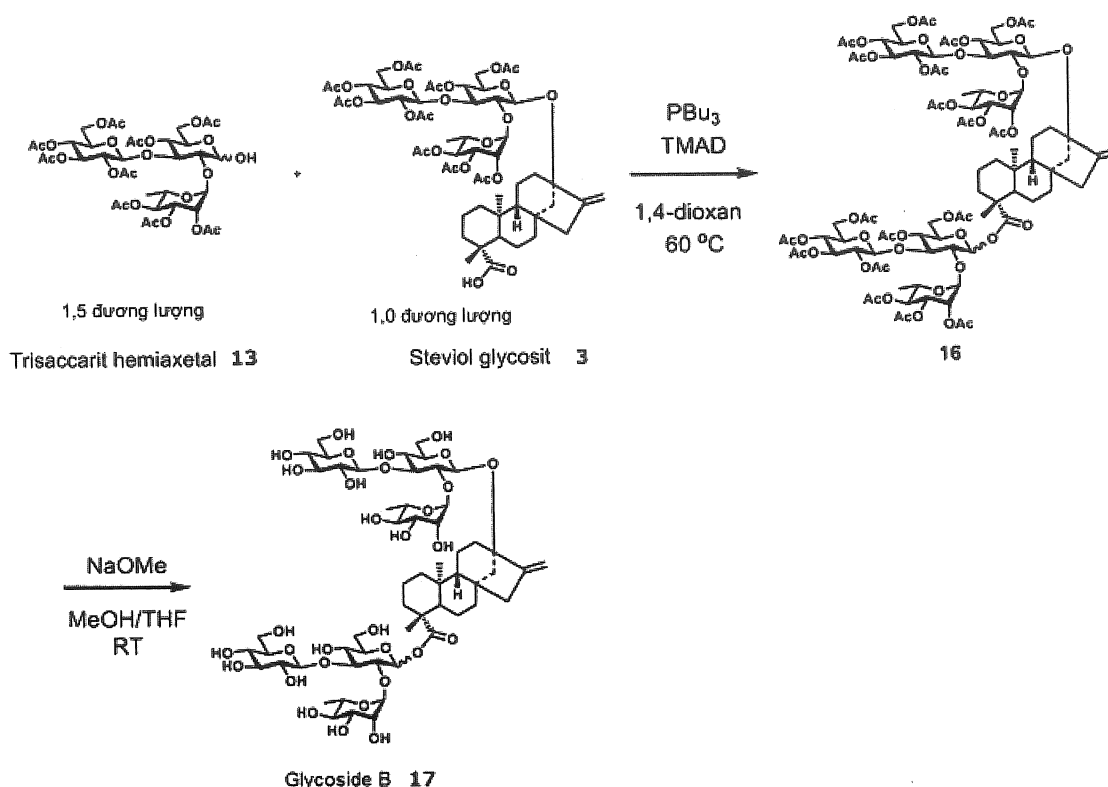
(C) Bước ba (Tổng hợp hợp chất được thể hiện bởi công thức (1))

Hợp chất được thể hiện bởi công thức (1) có thể được tổng hợp, ví dụ, theo sơ đồ 5 hoặc 6 dưới đây sử dụng hợp chất 3 (Chất trung gian 1) và hợp chất 8 hoặc 13 (Chất trung gian 2 hoặc 3) thu được trong Bước 1 và 2 (2a hoặc 2b) ở trên.

Sơ đồ 5: Tổng hợp hợp chất được thể hiện bởi công thức (1) (Glycosit A)



Sơ đồ 6: Tổng hợp hợp chất được thể hiện bởi công thức (1) (Glycosit B)



Đầu tiên, disaccarit hoặc trisaccarit hemiaxetal và steviol glycosit thu được trong Bước 1 và 2 (2a hoặc 2b) được cho tham gia vào phản ứng Mitsunobu để thu được glycosit trong đó disaccarit hoặc trisaccarit hemiaxetal được liên kết một cách chọn lọc với nhóm carboxylic ở vị trí C-19 của steviol. Cụ thể là, những hợp chất này được hòa tan trong 1,4-dioxan, được thêm chất phản ứng phosphin như tributylphosphin hoặc triphenylphosphin và hợp chất azo như 1,1'-azobis (N,N'-dimetylformamit) (TMAD) ở nhiệt độ trong phòng, và được khuấy ở  $50^\circ\text{C}$ - $80^\circ\text{C}$  trong 2 giờ hoặc lâu hơn để tạo ra hợp chất 14 hoặc 16. Cuối cùng, nhóm bảo vệ của hợp chất 14 hoặc 16 được khử bảo vệ để tạo ra hợp chất được thể hiện bởi công thức (1) (Glycosit A hoặc B).

### (C) Sinh tổng hợp

Steviol glycosit theo sáng chế cũng có thể được tạo ra bằng cách chuyển dịch sự mã hóa polynucleotit của protein định trước đến tế bào chủ có nguồn gốc từ vi khuẩn, thực vật, côn trùng, động vật có vú không phải người hoặc tương tự, và sử dụng steviol, steviol glycosit, UDP-glucoza và/hoặc UDP-ramnoza làm chất nền. Steviol, steviol glycosit, UDP-glucoza hoặc UDP-ramnoza làm chất nền có thể hoặc là được tạo ra hoặc là được sinh tổng hợp trong tế bào. Trong khi các ví dụ về protein định trước bao gồm

UGT85C2 (trình tự axit amin của nó được thể hiện bằng SEQ ID NO:2), UGT74G1 (trình tự axit amin của nó được thể hiện bằng SEQ ID NO:4), UGT91D2 (trình tự axit amin của nó được thể hiện bằng SEQ ID NO:6), UGT76G1 (trình tự axit amin của nó được thể hiện bằng SEQ ID NO:8) dẫn xuất từ stevia và UDP-ramnoza synthaza AtRHM2 (trình tự axit amin của nó được thể hiện bằng SEQ ID NO:10) dẫn xuất từ *Arabidopsis thaliana*, nó không bị giới hạn ở các ví dụ này miễn là nó có hoạt tính tương đương.

Protein nêu trên là enzym có nguồn gốc từ *Arabidopsis thaliana* hoặc stevia, mà được kỳ vọng là hoạt hóa cao trong môi trường bên ngoài tế bào thực vật như *Arabidopsis thaliana* và stevia (ví dụ, trong môi trường ngoại bào, hoặc bên trong tế bào chủ khác ngoài stevia). Trong trường hợp này, sự mã hóa polynucleotit của protein nêu trên (ví dụ, gen UGT85C2 được thể hiện bằng SEQ ID NO:1, gen UGT74G1 được thể hiện bằng SEQ ID NO:3, gen UGT91D2 được thể hiện bằng SEQ ID NO:5, gen UGT76G1 được thể hiện bằng SEQ ID NO:7 và gen AtRHM2 được thể hiện bằng SEQ ID NO:9) được chuyển vào tế bào chủ có nguồn gốc từ vi khuẩn, nấm, thực vật, côn trùng hoặc động vật có vú không phải người để cho phép sự biểu hiện của protein theo sáng chế, theo đó steviol, steviol glycosit, UDP-glucoza hoặc UDP-ramnoza ở dạng chất nền được đề xuất để tạo ra hợp chất theo sáng chế. Ngoài ra, tùy thuộc vào vật chủ, protein được đề cập trên đây được biểu hiện trong tế bào chủ mà theo đó chất nền thích hợp được đề xuất để tạo ra hợp chất theo sáng chế.

Theo một khía cạnh của sáng chế, phương pháp sản xuất steviol glycosit mới theo sáng chế được đề cập, trong đó phương pháp này đặc trưng ở chỗ sử dụng thể biến nạp không phải người mà đã được đưa vào ít nhất một trong các polynucleotit (a) đến (g).

(a) Polynucleotit mã hóa protein mà có sự tương đồng 90% hoặc cao hơn với trình tự axit amin của SEQ ID NO:2 và có hoạt tính bổ sung glucoza vào nhóm hydroxyl ở vị trí C-13 của steviol glycosit.

(b) Polynucleotit mã hóa protein mà có sự tương đồng 90% hoặc cao hơn với trình tự axit amin của SEQ ID NO:4 và có hoạt tính bổ sung glucoza vào axit cacboxylic ở vị trí C-19 của steviol glycosit.

(c) Polynucleotit mã hóa protein mà có sự tương đồng 90% hoặc cao hơn với trình tự axit amin của SEQ ID NO:6 và mà có hoạt tính bổ sung ramnoza vào glucoza được gắn ở vị trí C-13 của steviol glycosit qua liên kết 1→2.

(d) Polynucleotit mã hóa protein mà có sự tương đồng 90% hoặc cao hơn với trình tự axit amin của SEQ ID NO:8 và có hoạt tính bổ sung glucoza vào vị trí C-3 của glucoza ở vị trí C-13 của steviol glycosit qua liên kết 1→3.

(e) Polynucleotit mã hóa protein mà có sự tương đồng 90% hoặc cao hơn với trình tự axit amin của SEQ ID NO:6 và có hoạt tính bổ sung glucoza vào glucoza ở vị trí C-19 của steviol glycosit qua liên kết 1→2.

(f) Polynucleotit mã hóa protein mà có sự tương đồng 90% hoặc cao hơn với trình tự axit amin của SEQ ID NO:8 và có hoạt tính bổ sung glucoza vào glucoza ở vị trí C-19 của steviol glycosit qua liên kết 1→3.

(g) Polynucleotit mã hóa protein mà có sự tương đồng 90% hoặc cao hơn với trình tự axit amin của SEQ ID NO:10 và có hoạt tính tạo ra UDP-ramnoza từ UDP-glucoza.

Theo khía cạnh ưu tiên của sáng chế, có thể sử dụng polynucleotit độc lập có sự tương đồng trình tự so với các trình tự nucleotit của các số trình tự được đề cập trong các mục (a) đến (g) nêu trên là 91% hoặc cao hơn, 92% hoặc cao hơn, 93% hoặc cao hơn, 94% hoặc cao hơn, 95% hoặc cao hơn, 96% hoặc cao hơn, 97% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, 99% hoặc cao hơn, 99,1% hoặc cao hơn, 99,2% hoặc cao hơn, 99,3% hoặc cao hơn, 99,4% hoặc cao hơn, 99,5% hoặc cao hơn, 99,6% hoặc cao hơn, 99,7% hoặc cao hơn, 99,8% hoặc cao hơn, hoặc 99,9% hoặc cao hơn.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, có thể sử dụng protein mà độc lập có trình tự axit amin có sự tương đồng trình tự với các trình tự axit amin của số trình tự được đề cập trong mục (a) đến (g) nêu trên là 91% hoặc cao hơn, 92% hoặc cao hơn, 93% hoặc cao hơn, 94% hoặc cao hơn, 95% hoặc cao hơn, 96% hoặc cao hơn, 97% hoặc cao hơn, 98% hoặc cao hơn, 99% hoặc cao hơn, 99,1% hoặc cao hơn, 99,2% hoặc cao hơn, 99,3% hoặc cao hơn, 99,4% hoặc cao hơn, 99,5% hoặc cao hơn, 99,6% hoặc cao hơn, 99,7% hoặc cao hơn, 99,8% hoặc cao hơn, hoặc 99,9% hoặc cao hơn và có hoạt tính định trước được đề cập trong mục (a) đến (g) nêu trên.

Tốt hơn là, sự mã hóa polynucleotit của protein được đề cập trên đây được đưa vào vật chủ khi được đưa vào trong vectơ biểu hiện thích hợp. Các polynucleotit có thể được chèn một cách riêng rẽ vào các vectơ riêng biệt.

Vectơ biểu hiện thích hợp thường được tạo ra để bao gồm:

(i) gen khởi đầu mà cho phép sự phiên mã trong tế bào chủ;

(ii) polynucleotit theo sáng chế liên kết với gen khởi đầu đó; và

(iii) cassette biểu hiện mà có liên quan đến sự kết thúc phiên mã và polyadenyl hóa các phân tử ARN và chứa, ở dạng thành phần của nó, tín hiệu mà có chức năng trong tế bào chủ.

Các ví dụ về phương pháp điều chế vector biểu hiện bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, phương pháp mà sử dụng plasmit, thực khuẩn thể, cosmid hoặc tương tự, và các phân tử ADN có các thành phần cần thiết.

Loại vector cụ thể là không bị giới hạn cụ thể, và bất kỳ vector nào mà cho phép sự biểu hiện trong tế bào chủ có thể được chọn một cách thích hợp. Cụ thể là trình tự gen khởi đầu được chọn một cách thích hợp theo loại tế bào chủ để bảo đảm sự biểu hiện của polynucleotit theo sáng chế, và vector thu được bằng cách tích hợp trình tự gen khởi đầu này và polynucleotit theo sáng chế vào plasmit hoặc tương tự được sử dụng làm vector biểu hiện.

Vector biểu hiện theo sáng chế bao gồm các vùng kiểm soát biểu hiện (ví dụ, gen khởi đầu, vùng gen kết thúc và/hoặc nguồn gốc của sự sao chép và tương tự) phụ thuộc vào loại vật chủ mà nó được đưa vào. Gen khởi đầu được sử dụng trong vector biểu hiện của vi khuẩn có thể là gen khởi đầu chung (ví dụ, gen khởi đầu trc, gen khởi đầu tac, gen khởi đầu lac, v.v.), gen khởi đầu được dùng cho nấm men có thể là, ví dụ gen khởi đầu glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza, gen khởi đầu PH05, gen khởi đầu GAL1/10 hoặc tương tự, và gen khởi đầu của nấm sợi ví dụ có thể là amilaza, trpC hoặc tương tự. Ngoài ra, các ví dụ về gen khởi đầu để biểu hiện gen mong muốn ở tế bào thực vật bao gồm virus thể khảm gen khởi đầu cây súp lơ 35S ARN, gen khởi đầu gen rd29A, gen khởi đầu rbcS, và gen khởi đầu mac-1 mà trong đó trình tự đoạn tăng cường của virus thể khảm gen khởi đầu cây súp lơ 35S ARN được bố trí ở đầu 5' của trình tự gen khởi đầu của mannopin synthaza có nguồn gốc từ *khuẩn Agrob.* Gen khởi đầu của tế bào chủ động vật có thể là gen khởi đầu nhiễm virus (ví dụ, gen khởi đầu sớm SV40, gen khởi đầu muộn SV40, v.v.). Các ví dụ về gen khởi đầu mà hoạt hóa cảm ứng đáp ứng lại các kích thích bên ngoài bao gồm gen khởi đầu virus u vú ở chuột (MMTV- mouse mammary tumor virus), gen khởi đầu phản ứng với tetracyclin, gen khởi đầu metallothionein và gen khởi đầu protein do sốc nhiệt.

Tốt hơn là, vector biểu hiện chứa ít nhất một chất chỉ thị chọn lọc. Đối với chất chỉ thị như vậy, có thể sử dụng chất chỉ thị khuyết dưỡng (LEU2, URA3, HIS3, TRP1, ura5, niaD), chất chỉ thị kháng thuốc (hygromycin, zeocin), gen kháng geneticin (G418r), gen kháng đồng (CUP1) (Marin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, tập 81, trang 337, 1984), gen kháng cerulenin (fas2m, PDR4) (tương ứng các tài liệu Junji Inokoshi et al., Journal of Japanese Biochemical Society, tập 64, trang 660, 1992; Hussain et al., Gene, tập 101, trang 149, 1991,) hoặc tương tự.

Đối với phương pháp chuyển hóa tế bào chủ, có thể sử dụng phương pháp đã biết mà thường được sử dụng. Ví dụ, có thể thực hiện phương pháp mở lỗ bằng điện (Mackenzie, D. A. et al., Appl. Environ. Microbiol., tập 66, trang 4655-4661, 2000), phương pháp chuyển hạt (Công bố đơn sáng chế Nhật Bản chưa qua thẩm định số 2005-287403), phương pháp biến đổi tế bào (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, tập 75, trang 1929, 1978), phương pháp lithi axetat (J. Bacteriology, tập 153, trang 163, 1983), phương pháp được mô tả trong tài liệu Methods in yeast genetics, xuất bản năm 2000: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, hoặc tương tự, tuy nhiên sáng chế không bị giới hạn ở đó.

Ngoài ra, đối với các quy trình sinh học phân tử thông thường, xem tài liệu "Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001", "Methods in Yeast Genetics, A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)" và tương tự.

Thế biến nạp không phải người thu được như được mô tả trên đây có thể được nuôi cấy để cho thế biến nạp không phải người sản sinh ra steviol glycosit. Thế biến nạp không phải người như vậy tốt hơn là nấm men. Ngoài ra, thế biến nạp không phải người tốt hơn là được nuôi cấy trong môi trường chứa steviol. Steviol glycosit tích tụ có thể được chiết/tinh chế để thu được steviol glycosit theo sáng chế.

### **Ví dụ thực hiện sáng chế**

#### **Phân tách steviol glycosit mới**

Dịch chiết thu được từ lá của bốn loại thân thực vật stevia mới (Mẫu 1 (EM3-4), Mẫu 2 (EM2-27-8), Mẫu 3 (EM2-27-15) và Mẫu 4 (EM2-11)) do Suntory Global Innovation Center (SIC) phát triển được phân tách sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)-đo khối phổ (MS) để phân tích sàng lọc về steviol glycosit có chứa trong thân thực vật stevia dựa trên các trọng lượng phân tử của steviol glycosit mà có chuỗi đường tạo thành bởi D-

glucopyranosyl (Glc), L-rhamnopyranosyl (Rha) và xylopyranosyl (Xyl). Trong bản mô tả này, mẫu 1 là thực vật Reb.C cao có dạng đa hình gen A ở kiểu đại được biến đổi thành T ở nucleotit thứ 60 của trình tự nucleotit được thể hiện bởi SEQ ID NO:11 trong bộ gen. Phân tích thống kê sự tương quan giữa kiểu hình có nồng độ RebC cao và dạng đa hình của SEQ ID NO:11 cho thấy dạng đa hình này có sự tương quan theo thống kê với kiểu hình có nồng độ RebC cao.

Quy trình điều chế chất lỏng thử nghiệm là như sau: 10,0mg mỗi trong số các lá stevia đã được làm khô lạnh được cân vào lọ thủy tinh, thêm vào đó 1,0mL nước/metanol (1/1 thể tích/thể tích) làm dung môi chiết, và sau đó chất tạo thành được cho chiếu xạ bằng sóng siêu âm trong thiết bị làm sạch bằng sóng siêu âm (AS ONE, AS52GTU) ở nhiệt độ được thiết lập là 25°C trong 20 phút, nhờ đó thu được dịch chiết lỏng chứa steviol glycosit từ lá stevia. Chất tạo thành được pha loãng gấp 10 lần bằng nước/metanol và được lọc qua bộ lọc với cỡ lỗ là 0,45µm (Nacalai tesque, Cosmonice filter S (dung môi)) trước khi được cho tham gia HPLC-MS.

Đối với phần HPLC của HPLC-MS, Nexera LC-30AD (Shimadzu Corporation) được sử dụng làm bơm LC vận chuyển đơn vị chất lỏng, và SM-C18 (4,6 x 250mm) (từ Imtakt) làm cột tách. Vận chuyển chất lỏng ở pha động LC được thực hiện bằng cách sử dụng nước Milli-Q chứa axit axetic 0,2% làm pha động A và metanol làm pha động B, trong đó gradien nhị phân để nồng độ của pha động B được duy trì ổn định ở mức 10% trong 0-5 phút, được chuyển dịch từ 10% đến 70% trong 15 phút tiếp theo, và sau đó được dịch chuyển từ 70% đến 100% trong 5 phút tiếp theo, và gradien cuối cùng được kết thúc bằng cách duy trì nồng độ của pha động B ở 100% trong 5 phút. Vận tốc dòng chảy của pha động là 0,4mL/phút, và dịch chiết lỏng lá stevia mà đã được pha loãng và lọc bằng bộ lọc được phun với lượng 5µL.

Đối với phần MS, khối phổ kế lai ghép ba tứ cực LCMS-8030 (Shimadzu Corpotý lện) được trang bị nguồn ion ion hóa tia điện (ESI) được sử dụng. Việc đo khối phổ được thực hiện ở chế độ kiểm soát ion được chọn lọc (SIM) bằng cách chọn chế độ đo ion âm và các trị số m/z. Các trị số m/z được chọn bằng việc tính toán dựa trên trọng lượng phân tử của steviol glycosit mà có chuỗi đường được tạo thành bởi D-glucopyranosyl (glc), L-rhamnopyranosyl (rha) và xylopyranosyl (xyl). Theo đó, m/z = 641,2 (Glc (2)), 773,2 (Glc (2), Xyl (1)), 787,2 (Glc (2), Rha (1)), 803,2 (Glc (3)), 935,3 (Glc (3), Xyl (1)), 949,3 (Glc (3), Rha (1)), 965,3 (Glc (4)), 1095,4 (Glc (3), Rha (2)),

1097,4 (Glc (4), Xyl (1)), 1111,4 (Glc (4), Rha (1)), 1127,4 (Glc (5)), 1257,5 (Glc (4), Rha (2)), 1259,5 (Glc (5), Xyl (1)), 1273,5 (Glc (5), Rha (1)), 1289,5 (Glc (6)), 1435,6 (Glc (6), Rha (1)) được chọn. Ngoài ra, chất phản ứng độ tinh khiết cao, các rebaudioside A, B, D, F, M, N và O, steviosit, và dulcoside A và B sẵn có cũng được đo dưới các điều kiện tương tự để xác nhận các trị số m/z ion âm và thời gian lưu trong HPLC. Các diện tích đỉnh (đơn vị tùy ý) của các steviol glycosit được phát hiện chủ yếu được thể hiện trong Bảng 1.

Bảng 1: Diện tích đỉnh (đơn vị tùy ý) được quan sát bằng việc đo STM trong HPLC-MS

| Tên hợp chất           | Rebaudioside A       | Rebaudioside e C     | Rebaudiosid e D     | Rebaudiosi de M     | Dulcoside C      | Steviol glycosit 1 mới<br><i>m/z</i> 1095,4 | Steviol glycosit 2 mới<br><i>m/z</i> 1257,5 | Rebaudioside N     |
|------------------------|----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|--------------------|
| Thời gian lưu (phút)   | 29,60                | 29,96                | 28,00               | 28,66               | 27,70            | 28,73                                       | 28,50                                       | 28,18              |
| Diện tích đỉnh (Mẫu 1) | 29.669.582<br>46,92% | 30.122.062<br>47,63% | 1.428.384<br>2,26%  | 1.030.603<br>1,63%  | 140.947<br>0,22% | 76.369<br>0,12%                             | 242.070<br>0,38%                            | 772.570<br>1,22%   |
| Diện tích đỉnh (Mẫu 2) | 23.762.676<br>45,13% | 24.201.473<br>45,97% | 2.253.735<br>4,28%  | 1.029.837<br>1,96%  | 97.388<br>0,18%  | 94.330<br>0,18%                             | 292.157<br>0,55%                            | 1.211.504<br>2,30% |
| Diện tích đỉnh (Mẫu 3) | 15.386.726<br>52,82% | 5.872.656<br>20,16%  | 3.585.775<br>12,31% | 3.296.579<br>11,32% | 89.988<br>0,31%  | 0<br>0,00%                                  | 86.845<br>0,30%                             | 896.549<br>3,08%   |
| Diện tích đỉnh (Mẫu 4) | 16.070.017<br>56,96% | 10.339.094<br>36,64% | 1.404.429<br>4,98%  | 74.413<br>0,26%     | 0<br>0,00%       | 17.634<br>0,06%                             | 0<br>0,00%                                  | 308.709<br>1,09%   |

Fig. 2 thể hiện sắc phổ ion được chọn của mẫu 1 (EM3-4) ở  $m/z$  là 1095,4. Đỉnh có trọng lượng phân tử mà chưa từng được báo cáo được quan sát trong sắc phổ ion được chọn của steviol glycosit ( $m/z$  1095,4) trong đó chuỗi đường được cải biến chứa ba gốc glucoza (Glc) và hai gốc ramnoza (Rha). Cụ thể là, đỉnh ở  $R_t$  28,73 phút thể hiện trong Fig. 2 là chất chưa biết. Đối với mẫu 3 mà hàm lượng rebaudioside C của nó là thấp hơn hàm lượng của rebaudioside A và sự giãn chuỗi đường của nó là ngắn hơn các mẫu khác, giá trị đỉnh ở  $R_t$  28,73 phút là thấp hơn giới hạn phát hiện.

Fig. 3 thể hiện sắc phổ ion được chọn của mẫu 1 (EM3-4) ở  $m/z$  là 1257,5. Đỉnh có trọng lượng phân tử mà chưa từng được báo cáo được quan sát trong sắc phổ ion được chọn của steviol glycosit ( $m/z$  1257,5) trong đó chuỗi đường được cải biến chứa bốn gốc glucoza (Glc) và hai gốc ramnoza (Rha). Cụ thể là, đỉnh ở  $R_t$  28,50 phút thể hiện trong Fig. 3 là chất chưa biết. Đối với mẫu 4 mà hàm lượng rebaudioside C của nó là thấp hơn hàm lượng rebaudioside A và sự kéo dài chuỗi đường là thấp hơn các mẫu khác, giá trị đỉnh ở  $R_t$  28,50 phút là thấp hơn giới hạn phát hiện.

#### Phân tích cấu trúc của steviol glycosit mới

Theo sáng chế, việc phân tích cấu trúc của steviol glycosit 1 và 2 mới được phát hiện trong loại giống cây trồng có hàm lượng rebaudioside C cao được thực hiện theo quy trình như sau:

(i) Suy luận cấu trúc bằng phân tích phân đoạn thông qua sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) - khối phổ độ phân giải cao (MS), MS/MS, và phân đoạn ion ba giai đoạn (phân đoạn  $MS^3$ ).

(ii) Tổng hợp hóa học sản phẩm steviol glycosit tiêu chuẩn được suy ra thông qua phản ứng hóa học.

(iii) Xác nhận cấu trúc bằng cách khớp với sản phẩm tiêu chuẩn được tổng hợp hóa học theo thời gian lưu và mẫu phân đoạn từ HPLC- MS độ phân giải cao và sự phân đoạn  $MS^3$ .

Sau đây, mỗi bước (i)-(iii) nêu trên sẽ được mô tả chi tiết.

(i) Suy luận cấu trúc bằng phân tích phân đoạn qua sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)- khối phổ có độ phân giải cao (MS), MS/MS, và phân đoạn ion ba giai đoạn (phân đoạn  $MS^3$ )

Quy trình điều chế các chất lỏng thử nghiệm là như sau: 10,0mg mỗi trong số các lá stevia khô lạnh được cân vào lọ thủy tinh, 1,0mL nước/metanol (1/1 thể tích/thể tích)

được thêm vào đó làm dung môi chiết, và sau đó chất tạo thành được cho chiếu xạ bằng sóng siêu âm trong thiết bị làm sạch bằng sóng siêu âm (AS ONE, AS52GTU) ở nhiệt độ được thiết lập là 25°C trong 20 phút, nhờ đó thu được dịch chiết lỏng chứa steviol glycosit từ lá stevia. Chất tạo thành được pha loãng thêm 10 lần với nước/metanol và được lọc qua bộ lọc với cỡ lỗ là 0,45µm (Nacalai tesque, Cosmonice filter S (dung môi)) trước khi được cho tham gia HPLC-MS.

Trong cấu hình thiết bị dùng cho sắc ký lỏng hiệu năng cao-ion hoá tia điện - khối phổ phân giải cao (HPLC-ESI-HRMS), thiết bị dùng cho HPLC được thiết lập cấu hình bằng cách sử dụng Prominence LC-20AD (Shimadzu Corp) làm bơm LC vận chuyển đơn vị chất lỏng và SM-C18 (4,6 x 250mm) (từ Imtakt) làm cột tách. Pha động LC được vận chuyển sử dụng nước Milli-Q chứa axit axetic 0,2% làm pha động A và metanol làm pha động B, trong đó gradien nhệ phân để nồng độ của pha động B được duy trì ổn định ở mức 10% trong 0-5 phút, còn được chuyển dịch từ 10% đến 70% trong 15 phút tiếp theo, và sau đó được chuyển dịch từ 70% đến 100% trong 5 phút tiếp theo. Cuối cùng, nồng độ của pha động B được duy trì ở 100% trong 5 phút đến kết thúc. Vận tốc dòng chảy của pha động là 0,4mL/phút, và dịch chiết lỏng lá stevia mà đã được pha loãng và được lọc bằng bộ lọc được phun với lượng 20µL. Đối với phần khối phổ, Orbitrap Elite MS (từ Thermo Fisher Scientific) được trang bị nguồn ion ESI được sử dụng. Việc đo khối phổ được thực hiện ở chế độ đo ion âm ở m/z trong khoảng từ 150-2000 với độ phân giải được thiết lập đến 60000. Việc đo MS/MS được thực hiện bằng cách chọn m/z mục tiêu là 1095,4 hoặc 1257,5 và ở chế độ CID trong đó việc phân đoạn là do sự va chạm với khí trơ. Ion có cường độ cao nhất trong phổ MS/MS là mục tiêu cho MS<sup>3</sup>. Sự chiếu xạ năng lượng cần cho sự phân đoạn được thực hiện ở năng lượng va chạm tiêu chuẩn chỉ liên quan đến thiết bị, tức là 35.

Để nghiên cứu mẫu được phân đoạn của steviol glycosit 1 và 2 mới, các mẫu tiêu chuẩn rebaudioside A, D và M với cấu trúc đã biết được cho tham gia các phân tích mẫu phân đoạn MS/MS và MS<sup>3</sup>. Kết quả là MS/MS của steviol glycosit mới tạo ra dữ liệu thể hiện cường độ ion cao nhất xuất hiện ở đỉnh mà tất cả chuỗi đường được gắn ở vị trí C-19 qua liên kết este được giải phóng. Kết quả này thể hiện tổng trọng lượng phân tử của chuỗi đường được gắn ở vị trí cacbon của C-19 qua liên kết este.

Khối phổ được phân đoạn MS/MS và MS<sup>3</sup> của steviol glycosit 1 mới (tương ứng với m/z 1095,4, Rt:28,73) được thể hiện trong Fig. 4. Trong phổ MS/MS của steviol

glycosit mới, đỉnh chính được phát hiện ở  $m/z$  là 787,38 tương ứng với sự giải phóng một gốc Glc và một gốc Rha. Từ kết quả trên, số lượng của chuỗi đường được gắn với cacbon ở vị trí C-19 bằng liên kết este được phát hiện là một gốc Glc và một gốc Rha. Để thu được thông tin cấu trúc rõ hơn, thu được phổ  $MS^3$  bằng cách phân đoạn đỉnh chính ở  $m/z$  là 787,4 thu được bằng MS/MS. Kết quả là, thu được phổ có mẫu đỉnh tương tự như phổ  $MS^3$  của rebaudioside C ( $949,4 \rightarrow 787,4 \rightarrow$ ). Theo đó, chuỗi đường được gắn ở vị trí C-13 được cho là giống như rebaudioside C. Cấu trúc được suy luận ra được thể hiện trong Fig. 4.

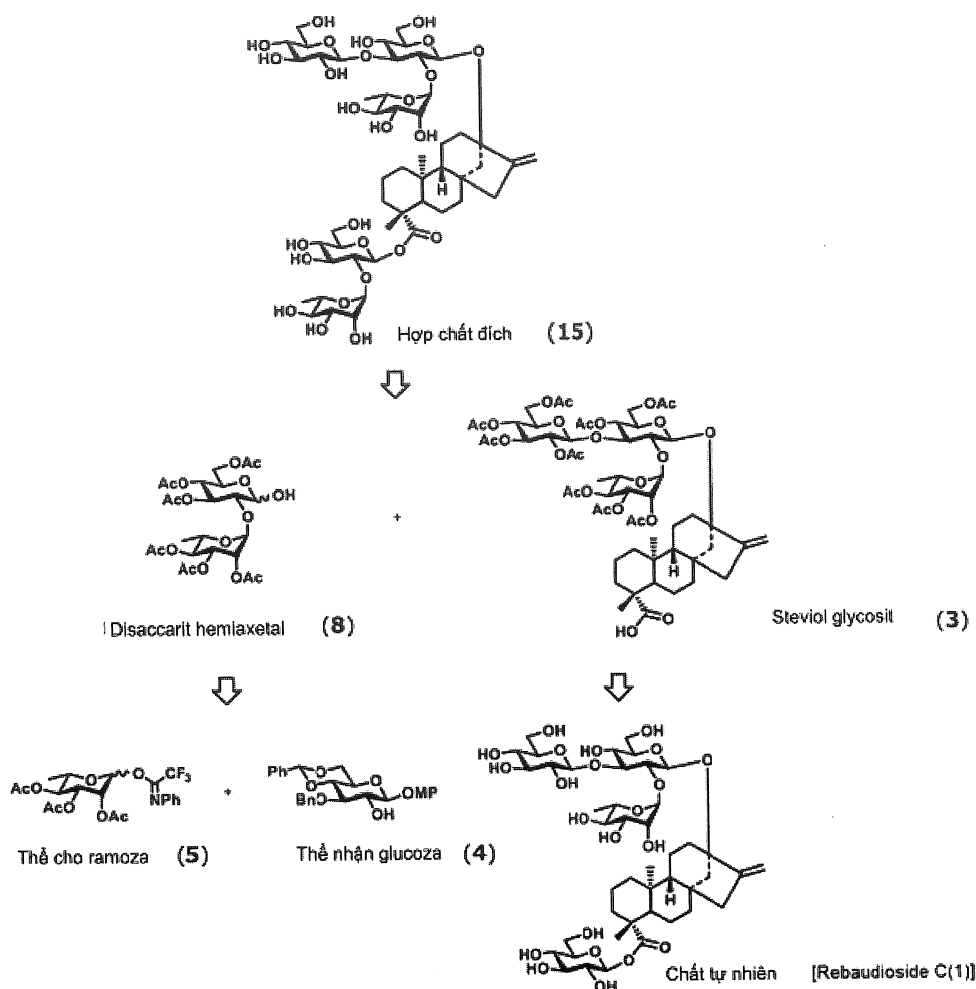
Khối phổ được phân đoạn MS/MS và  $MS^3$  của steviol glycosit 2 mới (tương ứng với  $m/z$  1257,5, Rt:28,50) được thể hiện trong Fig. 5. Trong phổ MS/MS của steviol glycosit mới, đỉnh chính được phát hiện ở  $m/z$  là 787,38 tương ứng với sự giải phóng hai gốc Glc và một gốc Rha. Từ kết quả trên, số lượng của chuỗi đường được gắn với cacbon ở vị trí C-19 bằng liên kết este được phát hiện là hai gốc Glc và một gốc Rha. Để thu được thông tin cấu trúc rõ hơn, thu được phổ  $MS^3$  bằng cách phân đoạn đỉnh chính ở  $m/z$  là 787,4 thu được bằng MS/MS. Kết quả là, thu được phổ có mẫu đỉnh tương tự như phổ  $MS^3$  của rebaudioside C ( $949,4 \rightarrow 787,4 \rightarrow$ ). Theo đó, chuỗi đường được gắn ở vị trí C-13 được cho là giống như rebaudioside C. Cấu trúc được suy luận ra được thể hiện trong Fig. 5.

(ii) Tổng hợp hóa học sản phẩm tiêu chuẩn steviol glycosit được suy luận bằng phản ứng hóa học

Tổng hợp Steviol glycosit 1 mới

(1) Sơ lược quá trình tổng hợp

## Sơ đồ 7: Cách thức tổng hợp Steviol glycosit 1 mới



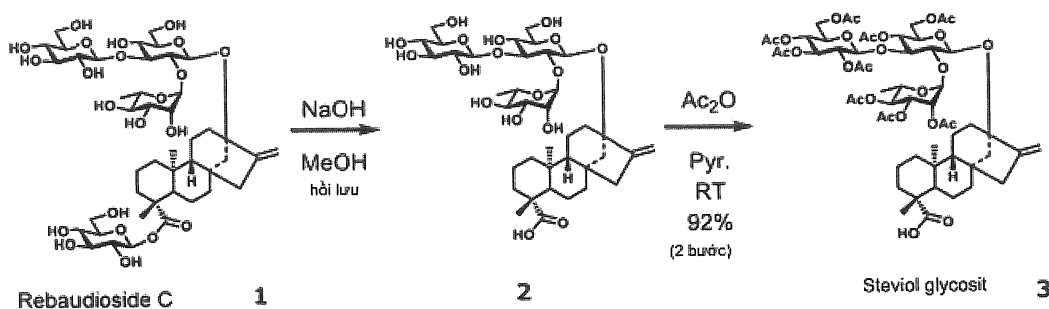
Như được nhận thấy từ Sơ đồ 7, đối với việc tổng hợp Steviol glycosit 1 mới (Hợp chất 15), steviol glycosit (Hợp chất 3) và disaccarit hemiacetal (Hợp chất 8) được ngưng tụ qua phản ứng Mitsunobu để thu được trực chính của Steviol glycosit 1 mới (Hợp chất 15). Đối với việc tổng hợp steviol glycosit, chất tự nhiên đã biết, rebaudioside C (Hợp chất 1), được mua từ Ark Pharm, liên kết este ở vị trí C-19 của steviol được cho tham gia thủy phân chất kiềm và sau đó nhóm hydroxyl của chuỗi đường được bảo vệ bằng nhóm (Ac) axetyl để thu được steviol glycosit. Đối với việc tổng hợp dạng disaccarit hemiacetal, trực chính disaccarit được tạo ra bằng phản ứng ngưng tụ giữa thẻ nhận glucoza được bảo vệ thích hợp (Hợp chất 4) và thẻ cho ramnoza (Hợp chất 5), và nhóm bảo vệ ở anomer cacbon của đầu khử được khử bảo vệ để tạo ra dạng disaccarit hemiacetal. Steviol glycosit và dạng disaccarit hemiacetal tạo thành được cho tham gia ngưng tụ qua phản ứng Mitsunobu, trong đó phản ứng được tiến hành với hiệu suất cao và tính chọn lọc  $\beta$  cao là 75% ( $\alpha/\beta = 1/20$ ). Nhóm bảo vệ của hợp chất tạo thành được khử

bảo vệ, nhờ đó thu được Steviol glycosit 1 mới (15).

Tiếp theo, mỗi bước tổng hợp được mô tả.

## (2) Tổng hợp steviol glycosit

Sơ đồ 8: Tổng hợp steviol glycosit



Như được nhận thấy từ Sơ đồ 8, đối với việc tổng hợp steviol glycosit (Hợp chất 3), rebaudioside C (Hợp chất 1) (1,0 g, 1,05 mmol) được mua từ Ark Pharm được hòa tan trong metanol (10 mL) và nước (10 mL), được thêm 4 mol/L natri hydroxit (2,6 mL, 10,4 mmol) ở nhiệt độ trong phòng, và được hồi lưu ở 100°C trong 20 giờ. Sau khi xác nhận hoàn thành phản ứng bằng TLC (cloform/metanol/nước = 5/4/0,1, trị số R<sub>f</sub> = 0,9), dung dịch phản ứng được trung hòa bằng dạng hydro Dowex MAC-3 nhựa trao đổi cation (SIGMA-ALDRICH) (pH 7). Sau khi nhựa được loại bỏ bằng cách lọc, chất tạo thành được cô dưới áp suất giảm. Xi rô tạo thành được làm khô trong 18 giờ bằng cách sử dụng bơm chân không để tạo ra hợp chất 2 (828 mg, định lượng).

Hợp chất 2 (828 mg, 1,05 mmol) được hòa tan trong pyridin (20 mL), được thêm anhydrit axetic (5 mL) ở nhiệt độ trong phòng và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 48 giờ. Sau khi xác nhận hoàn thành phản ứng bằng TLC (etyl axetat/hexan = 2/1, trị số R<sub>f</sub> = 0,5), dung dịch natri hydro cacbonat bão hòa (5 mL) được thêm vào, và dung dịch phản ứng được cô dưới áp suất giảm. Xi rô tạo thành được cho tham gia sắc ký cột silica gel và nước rửa giải (etyl axetat/hexan = 2/1) được sử dụng để tạo ra hợp chất 3 (1,1 g, 92 %).

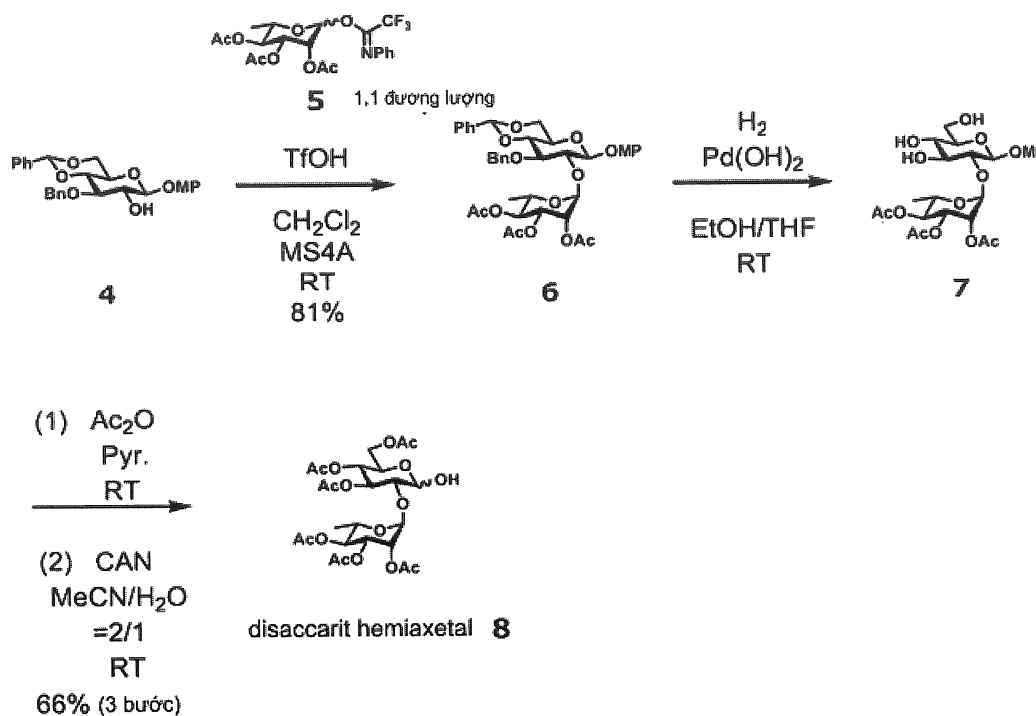
### Hợp chất 3

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 0,81 (m, 2H), 0,83-1,45 (phức hợp, 19H), 1,39-1,91 (phức hợp, 24H), 1,91-2,35 (s, 30H), 3,58 (m, 1H), 3,71-3,81 (phức hợp, 4H), 3,95-4,12 (phức hợp, 7H), 4,34-4,46 (phức hợp, 3H), 4,56-4,66 (phức hợp, 4H), 4,69-4,92 (phức hợp, 7H), 5,05-5,14 (phức hợp, 5H), 5,23-5,38 (phức hợp, 6H), 5,45 (s, 1H); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ 15,9, 17,3, 19,1, 20,5, 20,7, 20,8, 20,9, 21,1, 21,5, 21,7, 29,1,

37,8, 38,0, 39,5, 40,7, 41,4, 42,2, 43,8, 48,4, 53,8, 56,8, 61,6, 63,0, 65,5, 66,8, 68,0, 68,6, 69,3, 69,6, 69,8, 70,5, 70,9, 71,6, 71,9, 72,4, 72,8, 73,9, 74,9, 81,3, 87,3, 96,6, 96,8, 99,2, 99,4, 125,4, 128,3, 129,1, 137,9, 151,9, 168,9, 169,2, 169,5, 169,6, 169,8, 170,1, 170,2, 170,3, 170,6, 170,9, 176,8, 183,4.

### (3) Tổng hợp disaccarit hemiaxetal

#### Sơ đồ 9: Tổng hợp disaccarit hemiaxetal



Như được thấy từ Sơ đồ 9, đối với việc tổng hợp disaccarit hemiaxetal (Hợp chất **8**), 4-metoxiphenyl 3-O-benzyl-4,6-O-benzylidin- $\beta$ -D-glucopyranoside (Hợp chất **4**) (3,0 g, 6,46 mmol) được mua từ Tokyo Chemical Industry, Hợp chất **5** (3,3 g, 7,10 mmol) và rây phân tử 4Å (6,0 g) được hòa tan trong diclometan (136mL), được thêm axit triflometansulfonic (114  $\mu\text{L}$ , 1,29 mmol) ở nhiệt độ trong phòng, và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 18 giờ. Sau khi xác nhận hoàn thành phản ứng bằng TLC (etyl axetat/hexan = 1/2, trị số  $R_f$  = 0,5), chất tạo thành được trung hòa bằng trietylamin (100  $\mu\text{L}$ ) (pH 8), rây phân tử 4Å được loại bỏ bằng cách lọc, và chất tạo thành được cô dưới áp suất giảm. Xi rô tạo thành được cho tham gia sắc ký cột silica gel và nước rửa giải (etyl axetat/hexan = 1/1,5) được sử dụng để tạo ra hợp chất **6** (3,9 g, 81%).

#### Hợp chất **6**

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  1,18 (d,  $J$  = 6,4 Hz, 3H, H-6 của Rha), 1,96 (s, 3H, OAc), 1,98 (s, 3H, OAc), 2,07 (s, 3H, OAc), 3,51 (m, 1H, H-5), 3,73-3,81 (phức hợp, 5H, H-4, H-6, OMe), 3,83-3,96 (phức hợp, 2H, H-2, H-3), 4,28 (m, 1H, H-5 của Rha), 4,36

(m, 1H, H-6'), 4,70 (d, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4,95 (d, 1H, CH<sub>2</sub>Ph), 4,99 (d, J = 7,2 Hz, 1H, H-1), 5,03 (t, 1H, H-4 của Rha), 5,20 (dd, 1H, H-3 của Rha), 5,32 (s, 1H, H-1 của Rha), 5,34 (m, 1H, H-2 của Rha), 5,57 (s, 1H, CHPh), 6,90 (dd, 4H, OMePh), 7,21-7,49 (phức hợp, 10H, Ph); <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz) δ 14,2, 17,4, 20,8, 20,9, 21,0, 22,8, 31,7, 55,8, 66,2, 66,7, 68,8, 69,4, 69,5, 71,0, 75,2, 76,7, 77,5, 81,7, 81,8, 98,4, 100,8, 101,4, 114,8, 118,3, 126,1, 127,9, 128,4, 128,5×2, 129,2, 137,2, 137,9, 150,8, 155,7, 169,9, 170,1, 170,2.

Hợp chất 6 (3,9 g, 5,29 mmol) được hòa tan trong ethanol (27 mL) và THF (27 mL), được thêm paladi hydroxit (2,0 g) ở nhiệt độ trong phòng, và được khuấy trong môi trường khí hydro ở nhiệt độ trong phòng trong 18 giờ. Sau khi xác nhận hoàn thành phản ứng bằng TLC (cloform/metanol = 10/1, Trị số R<sub>f</sub> = 0,2), paladi hydroxit được loại bỏ bằng cách lọc và phần lọc được cô dưới áp suất giảm để tạo ra hợp chất 7 (2,9 g, định lượng).

Hợp chất 7 (1,1 g, 1,97 mmol) được hòa tan trong pyridin (20 mL), được thêm anhydrit axetic (740 μL, 7,88 mmol) ở nhiệt độ trong phòng, và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 24 giờ. Sau khi xác nhận hoàn thành phản ứng bằng TLC (etyl axetat/hexan = 1/1, trị số R<sub>f</sub> = 0,6), việc chưng cất đẳng phí bằng toluen (30 mL) được lặp lại ba lần. Tiếp theo, chất tạo thành được cô dưới áp suất giảm và xi rô tạo thành được hòa tan trong axetonitril (14 mL) và nước (7,0 mL), được thêm xeri amoni nitrat (3,2 g, 5,91 mmol) ở nhiệt độ trong phòng, và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Sau khi xác nhận hoàn thành phản ứng bằng TLC (etyl axetat/hexan = 1,5/1, trị số R<sub>f</sub> = 0,5), chất tạo thành được pha loãng bằng etyl axetat, lớp hữu cơ được rửa bằng nước và dung dịch nước natri hydro cacbonat bão hòa, và làm khô bằng magie sulfat. Magie sulfat được loại bỏ bằng cách lọc và chất tạo thành được cô dưới áp suất giảm. Xi rô tạo thành được cho tham gia sắc ký cột silica gel và nước rửa giải (etyl axetat/hexan = 1/1) và (toluen/etyl axetat = 3/1) được sử dụng để tạo ra hợp chất 8 (721 mg, 66%, 3 bước).

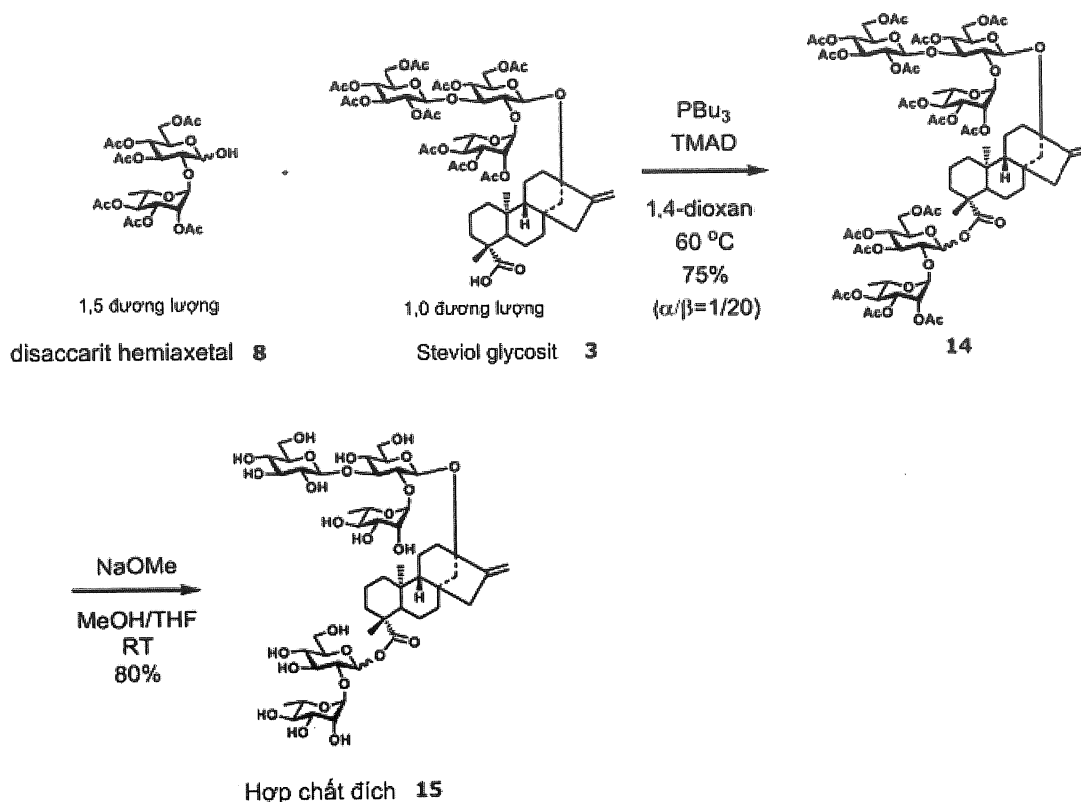
#### Hợp chất 8

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 1,16-1,19 (phức hợp, 4,5H, H-6α của Rha, H-6β của Rha), 1,97-2,34 (phức hợp, 27 H, OAc), 3,58 (t, 0,5H, H-2β), 3,72-3,75 (phức hợp, 1,5H, H-2α, H-5β), 4,00 (m, 1H, H-4α của Rha), 4,05-4,16 (phức hợp, 1,5H), 4,21-4,27 (phức hợp, 3H), 4,76 (d, J = 7,6 Hz, 0,5H, H-1β), 4,86 (s, 1H, H-1α của Rha), 4,91 (s, 0,5H, H-1β của Rha), 4,98-5,08 (phức hợp, 4,6H), 5,23-5,26 (phức hợp, 2H), 5,34 (d, J =

3,2 Hz, 1H, H-1 $\alpha$ ), 5,48 (t, 1H, H-3 $\alpha$ );  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  17,2, 17,5, 20,7 $\times$ 2, 20,8 $\times$ 3, 20,9 $\times$ 2, 21,0, 21,6, 62,1, 62,2, 67,2, 67,3, 67,5, 68,5, 68,6, 68,7, 70,0, 70,4, 71,0, 74,2, 77,4, 77,9, 79,3, 92,0, 95,7, 98,4, 99,2, 125,4, 128,3, 129,1, 137,9, 169,8, 169,9 $\times$ 2, 170,0, 170,1 $\times$ 2, 170,2, 170,4, 170,9 $\times$ 2.

#### (4) Tổng hợp Hợp chất 15

Sơ đồ 10: Tổng hợp Steviol glycosit 1 mới (hợp chất mong muốn 15)



Như được nhận thấy từ Sơ đồ 10, đối với việc tổng hợp Hợp chất 15, Hợp chất 8 (291 mg, 0,503 mmol) và Hợp chất 3 (391 mg, 0,335 mmol) được hòa tan trong 1,4-dioxan (17 mL), được thêm tributylphosphin (252  $\mu\text{L}$ , 1,01 mmol) và 1,1'-azobis (N,N'-dimethylformamit) (TMAD) (173 mg, 1,01 mmol) ở nhiệt độ trong phòng, và được khuấy ở 60°C trong 6 giờ. Sau khi xác nhận hoàn thành phản ứng bằng TLC (toluen/etyl axetat = 1/1, trị số  $R_f$  = 0,4), chất tạo thành được pha loãng bằng etyl axetat, lớp hữu cơ được rửa bằng nước, dung dịch nước natri hydro cacbonat bão hòa và nước muối bão hòa, và làm khô bằng magie sulfat. Magie sulfat được loại bỏ bằng cách lọc, và chất tạo thành được cô dưới áp suất giảm. Xi rô tạo thành được cho tham gia sắc ký cột silica gel và nước rửa giải (toluen/etyl axetat = 1,5/1) được sử dụng để tạo ra hợp chất 14 (435 mg, 75%,  $\alpha/\beta=1/20$ ).

Hợp chất 14

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  0,50-1,18 (phức hợp, 7H), 1,15 (d, 3H, H-6 của Rham), 1,24 (s, 3H), 1,40-2,32 (phức hợp, 70H), 3,60 (m, 1H), 3,73 (m, 2H), 3,82-4,28 (phức hợp, 10H), 4,40-4,48 (phức hợp, 2H), 4,63 (d,  $J = 7,6$  Hz, 1H), 4,72 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 4,75-4,88 (phức hợp, 3H), 4,98 (s, 1H), 5,01-5,18 (phức hợp, 8H), 5,24-5,31 (phức hợp, 4H), 5,32 (s, 1H), 5,71 (d,  $J = 7,6$  Hz, 1H, H-1 $\beta$ ), 6,31 (d,  $J = 3,0$  Hz, 0,05H, H-1 $\alpha$ );  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  16,6, 17,4, 17,6, 20,5, 20,7 $\times$ 2, 20,8 $\times$ 3, 20,9 $\times$ 3, 21,6, 29,0, 39,5, 42,5, 44,1, 53,8, 57,9, 61,7, 66,6, 67,4, 68,0, 68,3, 68,5, 68,7, 69,7, 69,8, 70,8, 71,1, 71,4, 71,9 $\times$ 2, 72,4, 72,9, 74,2, 75,1, 86,6, 92,2, 96,4, 96,9, 97,7, 99,3, 125,4, 128,3, 129,1, 152,9, 169,0, 169,5, 169,8 $\times$ 2, 169,9, 170,0, 170,1, 170,2 $\times$ 2, 170,3, 170,5, 170,6, 170,9 $\times$ 2, 174,6.

Hợp chất 14 (435 mg, 0,252 mmol) được hòa tan trong metanol (2,0 mL) và THF (2,0 mL), được thêm natri metoxit (0,5M trong MeOH) (0,5 mL, 0,252 mmol) ở nhiệt độ trong phòng, và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 18 giờ. Sau khi xác nhận hoàn thành phản ứng bằng TLC (cloform/metanol/nước = 5/4/1, trị số  $R_f = 0,4$ ), chất tạo thành được cô dưới áp suất giảm. Xi rô tạo thành được cho tham gia cột tinh lọc gel (GE Healthcare, Sephadex LH-20, etanol) để tạo ra hợp chất 15 (220 mg, 80%,  $\alpha/\beta = 1/20$ ). Tiếp theo, dạng  $\beta$  của Hợp chất 15 được tách bằng HPLC điều chế (cột C18 YMC HPLC, 20 mM dung dịch nước amoni axetat/90% axetonitril/10% nước = 70/30-10/90, 45 phút), và được làm đông khô. Dữ liệu phân tích cấu trúc của Hợp chất 15 bằng phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được thể hiện trong Fig. 6-9.

#### Hợp chất 15 (dạng $\beta$ )

$^1\text{H-NMR}$  (pyridin- $d_5$ , 800 MHz)  $\delta$  0,68 (m, 1H), 0,86 (m, 1H), 0,98 (m, 1H), 1,11-1,15 (phức hợp, 4H), 1,24 (m, 2H), 1,39 (m, 2H), 1,49 (s, 3H), 1,62 (m, 3H), 1,71 (d, 3H), 1,75 (d, 3H), 1,88 (m, 1H), 1,93 (m, 1H), 2,00 (m, 2H), 2,11 (m, 2H), 2,19 (m, 2H), 2,46 (m, 1H), 2,66 (m, 1H), 3,62 (m, 1H), 3,91 (m, 1H), 3,97-4,10 (phức hợp, 5H), 4,17-4,42 (phức hợp, 11H), 4,49 (m, 1H), 4,51-4,59 (phức hợp, 3H), 4,73 (m, 1H), 4,82 (m, 1H), 4,87 (m, 1H), 4,98 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 5,08 (s, 1H), 5,10 (d,  $J = 7,2$  Hz, 1H), 5,66 (s, 1H), 6,26 (d,  $J = 7,2$  Hz, 1H), 6,41 (s, 1H), 6,47 (s, 1H);  $^{13}\text{C-NMR}$  (pyridin- $d_5$ , 200 MHz)  $\delta$  17,1, 19,2 $\times$ 2, 20,1, 20,9, 22,3, 29,6, 37,9, 38,2, 39,9, 40,9, 41,9, 42,8, 43,7, 44,5, 48,4, 54,1, 58,3, 62,3, 62,4, 62,5, 69,8 $\times$ 2, 70,2, 71,2, 71,6, 72,4, 72,5, 72,6, 74,0, 74,1, 75,2, 76,4, 76,8, 77,4, 78,5, 78,8, 79,0, 79,5, 86,9, 89,8, 94,0, 98,4, 101,8, 101,9, 104,4, 105,3, 154,5, 176,2.

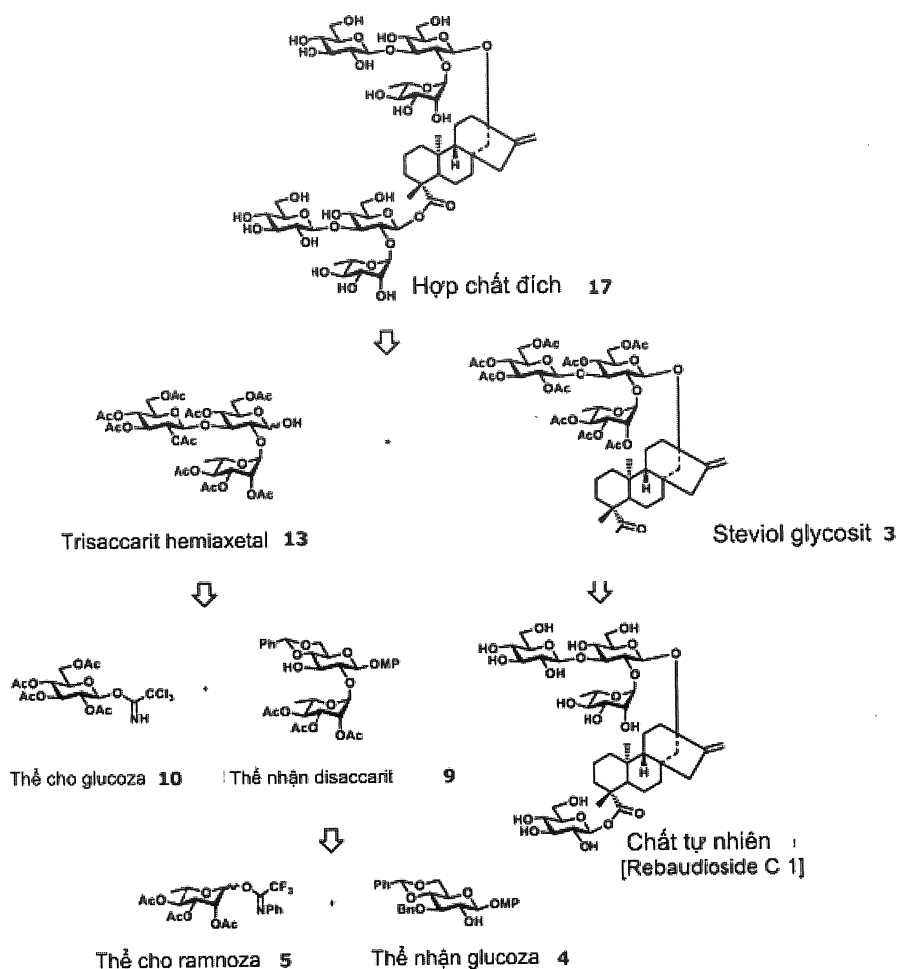
$[\alpha]_D = -46,3^\circ$  (c 0,05, MeOH)

MALDI-TOF-MS m/z phát hiện thấy  $[M + Na]^+$  1119,5,  $C_{50}H_{80}O_{26}$  được dự tính cho  $[M + Na]^+$  1119,5.

Tổng hợp Steviol glycosit 2 mới

(1) Sơ lược quá trình tổng hợp

Sơ đồ 11: Cách thức tổng hợp Steviol glycosit 2 mới



Như được nhận thấy từ Sơ đồ 11, đối với việc tổng hợp Steviol glycosit 2 mới (Hợp chất 17), steviol glycosit (Hợp chất 3) và dạng trisaccarit hemiacetal (Hợp chất 13) được ngưng tụ qua phản ứng Mitsunobu để thu được trực chính của Steviol glycosit 2 mới. Đối với việc tổng hợp steviol glycosit, chất tự nhiên đã biết, rebaudioside C (Hợp chất 1), được mua từ Ark Pharm, liên kết este ở vị trí C-19 của steviol được cho tham gia thủy phân chất kiềm và sau đó nhóm hydroxyl của chuỗi đường được bảo vệ bằng nhóm (Ac) axetyl để thu được steviol glycosit. Đối với việc tổng hợp dạng trisaccarit hemiacetal, thể nhận disaccarit (Hợp chất 9) được tổng hợp bằng phản ứng ngưng tụ giữa thể nhận glucoza được bảo vệ thích hợp (Hợp chất 4) và thể cho ramnoza (Hợp chất 5),

mà được cho tham gia phản ứng ngưng tụ với thể cho glucoza (Hợp chất 10) để tạo ra trực chính trisaccarit. Nhóm bảo vệ ở anomer cacbon của đầu khử của trisaccarit tạo thành được khử bảo vệ để tạo ra dạng trisaccarit hemiaxetal. Steviol glycosit và dạng trisaccarit hemiaxetal được cho tham gia ngưng tụ qua phản ứng Mitsunobu, trong đó phản ứng được tiến hành với hiệu suất cao và tính chọn lọc  $\beta$  cao ở 44% ( $\alpha/\beta = 1/10$ ). Nhóm bảo vệ của hợp chất tạo thành được khử bảo vệ, nhờ đó thu được Steviol glycosit 2 mới.

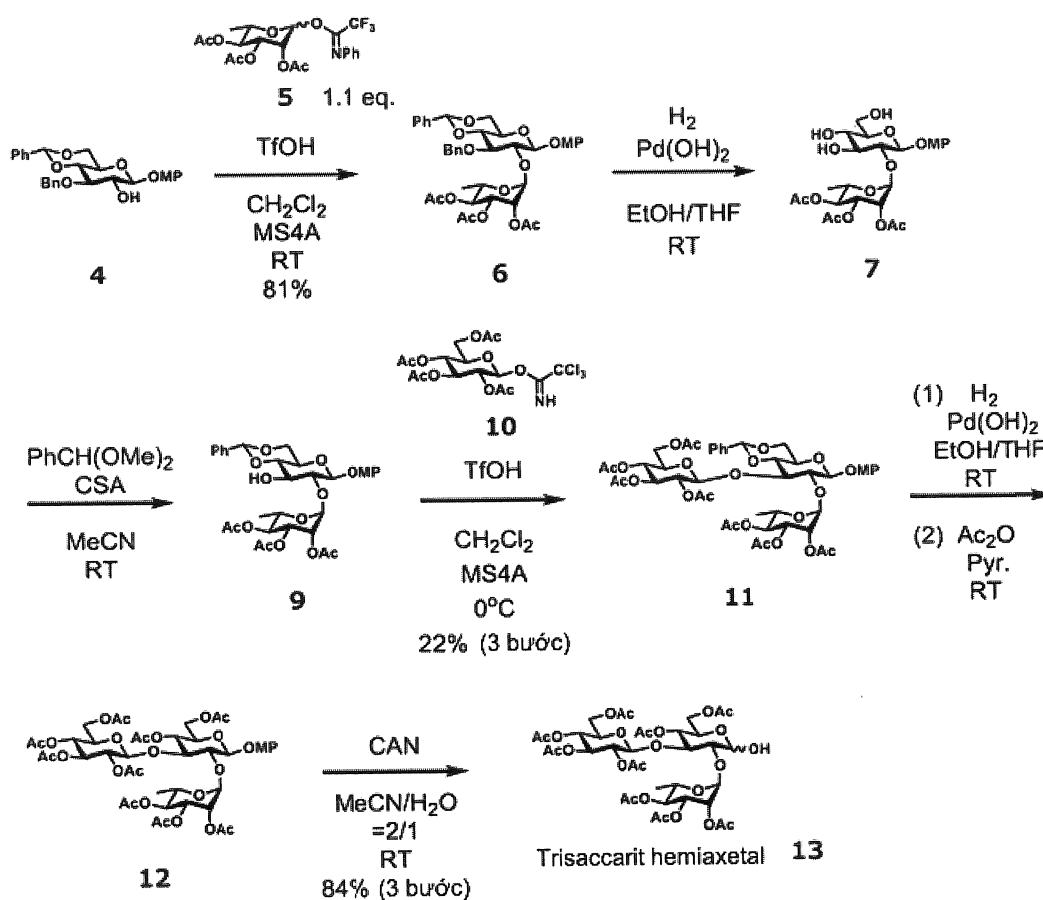
Tiếp theo, mỗi bước tổng hợp được mô tả.

### (2) Tổng hợp steviol glycosit

Steviol glycosit được tổng hợp theo cách tương tự như "Tổng hợp Steviol glycosit 1 mới".

### (3) Tổng hợp dạng trisaccarit hemiaxetal

Sơ đồ 12: Tổng hợp dạng trisaccarit hemiaxetal



Như được nhận thấy từ Sơ đồ 12, hợp chất 6 và 7 thu được theo cách tương tự như "Tổng hợp Steviol glycosit 1 mới".

Hợp chất 7 (1,7 g, 3,04 mmol) được hòa tan trong axetonitril (30 mL), được thêm

benzaldehyt dimetyl axetal (681  $\mu\text{L}$ , 4,57 mmol) ở nhiệt độ trong phòng, và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 2 giờ. Việc hoàn thành phản ứng được xác nhận bằng TLC (etyl axetat/hexan = 1/1, trị số  $R_f$  = 0,7). Chất tạo thành được trung hòa bằng trietylamin (2 mL) (pH 8), và sau đó được cô dưới áp suất giảm để tạo ra hợp chất 9 (2,0 g).

Hợp chất 9 (2,0 g, 3,04 mmol), Hợp chất 10 (1,6 g, 3,34 mmol) và rây phân tử 4Å (4,0 g) được hòa tan trong diclometan (64 mL), được thêm axit triflometansulfonic (114  $\mu\text{L}$ , 1,29 mmol) ở nhiệt độ trong phòng, và được khuấy ở 0°C trong 6 giờ. Sau khi xác nhận hoàn thành phản ứng bằng TLC (etyl axetat/hexan = 1/1, Trị số  $R_f$  = 0,4), chất tạo thành được trung hòa bằng trietylamin (100  $\mu\text{L}$ ) (pH 8), rây phân tử 4Å được loại bỏ bằng cách lọc, và chất tạo thành được cô dưới áp suất giảm. Xi rô tạo thành được cho tham gia sắc ký cột silica gel và nước rửa giải (etyl axetat/hexan = 1/2) được sử dụng để tạo ra hợp chất 11 (650 mg, 22%, 3 bước).

#### Hợp chất 11

$^1\text{H}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  1,16 (d,  $J$  = 6,0 Hz, 1H, H-6 của Rha), 1,94-2,19 (phức hợp, 21H, OAc), 3,43-3,52 (phức hợp, 2H), 3,62-3,81 (phức hợp, 5H, OMe), 3,96-4,04 (phức hợp, 2H), 4,07-4,18 (phức hợp, 3H), 4,28-4,35 (phức hợp, 2H), 4,86 (d,  $J$  = 8,0 Hz, 1H, H-1), 4,94-4,98 (phức hợp, 2H, H-1), 5,01-5,11 (phức hợp, 2H), 5,16-5,21 (phức hợp, 2H), 5,28 (s, 2H, H-1 của Rha), 5,52 (s, 1H, PhCH), 6,90 (dd, 4H, PhOMe), 7,31-7,49 (phức hợp, 5H, Ph);  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  14,3, 17,3, 20,4, 20,7, 20,9 $\times$ 3, 21,0, 21,1, 55,8, 60,5, 62,0, 66,3, 66,9, 68,3, 68,7, 69,3, 69,4, 70,7, 71,6, 71,9, 72,9, 78,9, 81,0, 97,7, 99,3, 100,7, 101,6, 114,8, 118,4, 126,2, 128,4, 129,4, 137,1, 150,7, 155,8, 169,4, 169,5, 170,0, 170,2, 170,4, 170,5, 170,8, 171,2.

Hợp chất 11 (627 mg, 0,642 mmol) được hòa tan trong etanol (3 mL) và THF (3 mL), được thêm paladi hydroxit (1,0 g) ở nhiệt độ trong phòng, và được khuấy trong môi trường khí hydro ở nhiệt độ trong phòng trong hai giờ. Sau khi xác nhận hoàn thành phản ứng bằng TLC (etyl axetat/hexan = 2/1, Trị số  $R_f$  = 0,2), paladi hydroxit được loại bỏ bằng cách lọc, và phân lọc được cô dưới áp suất giảm. Tiếp theo, chất tạo thành được hòa tan trong pyridin (6,4 mL), được thêm anhydrit axetic (182  $\mu\text{L}$ , 1,93 mmol) ở nhiệt độ trong phòng, và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 18 giờ. Sau khi xác nhận hoàn thành phản ứng bằng TLC (etyl axetat/hexan = 2/1, Trị số  $R_f$  = 0,7), việc chưng cất đẳng phí bằng toluen (20 mL) được lặp lại ba lần. Tiếp theo, chất tạo thành được cô dưới áp suất giảm. Xi rô tạo thành được hòa tan trong axetonitril (4 mL) và nước (2 mL), được

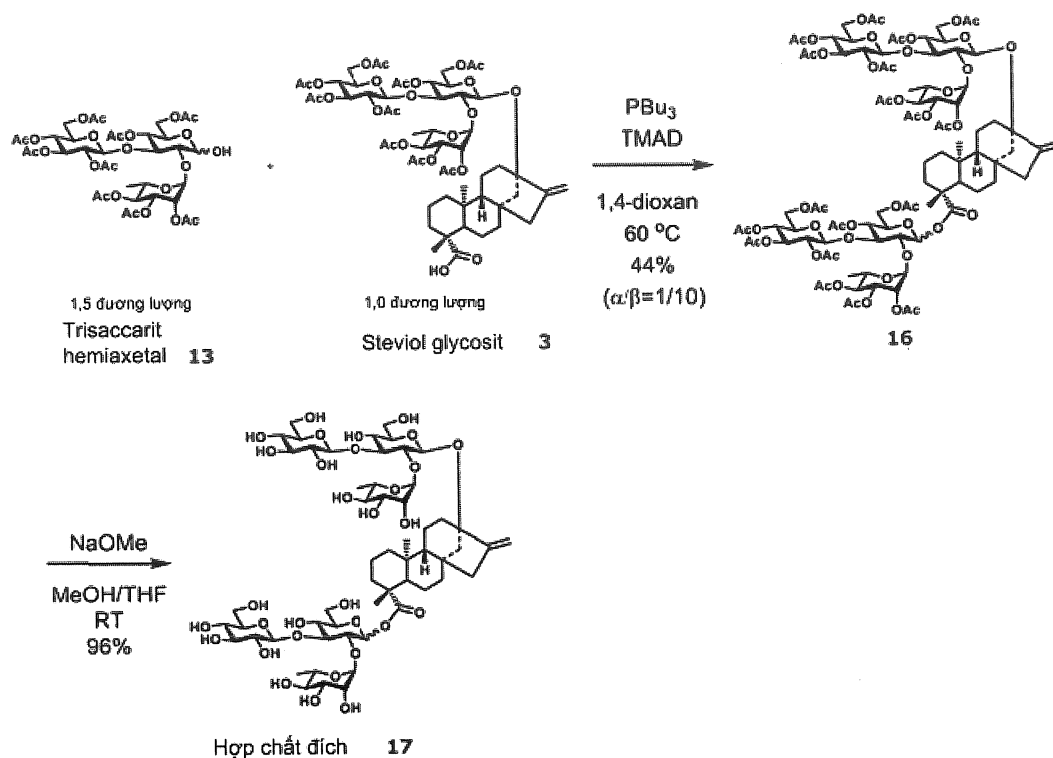
thêm xeri amoni nitrat (1,0 g, 1,87 mmol) ở nhiệt độ trong phòng, và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 30 phút. Sau khi xác nhận hoàn thành phản ứng bằng TLC (toluen/ethyl axetat = 1/1, trị số  $R_f$  = 0,3), chất tạo thành được pha loãng bằng ethyl axetat, lớp hữu cơ được rửa bằng nước và dung dịch nước natri hydro cacbonat bão hòa, và làm khô bằng magie sulfat. Magie sulfat được loại bỏ bằng cách lọc, và chất tạo thành được cô dưới áp suất giảm. Xi rô tạo thành được cho tham gia sắc ký cột silica gel và nước rửa giải (toluen/ethyl axetat = 1/1) được sử dụng để tạo ra hợp chất 13 (468 mg, 84%, 3 bước).

#### Hợp chất 13

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  1,18 (d,  $J$  = 6,4 Hz, 1H, H-6 của Rha), 1,93-2,19 (phức hợp, 27H, OAc), 3,60 (t, 1,6H, H-2 $\beta$ ), 3,68 (m, 1,2H, H-5 $\beta$ ), 3,78 (m, 1,4H, H-5' $\beta$ ), 3,97 (t, 1H, H-3 $\beta$ ), 4,03 (dd, 1H, H-6' $\beta$ ), 4,15 (m, 2,3H, H-6 $\beta$ , H-6 $\beta$ ), 4,22 (m, 1,2H, H-5 $\beta$  của Rha), 4,43 (dd, 1,2H, H-6' $\beta$ ), 4,67 (d,  $J$  = 7,6 Hz, 1H, H-1 $\beta$ ), 4,77 (d,  $J$  = 8,0 Hz, 1H, H-1' $\beta$ ), 4,82-4,91 (phức hợp, 2,4H, H-4 $\beta$ , H-2' $\beta$ ), 5,06-5,14 (phức hợp, 2,3H, H-4' $\beta$ , H-4 $\beta$  của Rha), 5,16 (s, 1H, H-1 của Rha), 5,26-5,33 (phức hợp, 2,4H, H-3' $\beta$ , H-3 $\beta$  của Rha), 5,39 (m, 1,1H, H-2 $\beta$  của Rha);  $^{13}\text{C-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  17,3, 17,5, 20,6, 20,7 $\times$ 2, 20,8 $\times$ 3, 20,9 $\times$ 2, 21,6, 29,8, 31,1, 61,7, 61,8, 62,4, 67,4, 67,6, 67,9, 68,0, 68,1 $\times$ 2, 68,3, 68,8 $\times$ 2, 69,5, 69,9, 70,6 $\times$ 2, 71,5, 71,8, 71,9, 72,1, 72,3, 72,8, 73,0, 75,5, 79,9, 80,1, 80,5, 91,9, 95,8, 98,1, 98,9, 99,6, 99,8, 125,4, 128,4, 129,2, 169,1, 169,4, 169,5, 169,6, 169,7, 170,0 $\times$ 3, 170,1, 170,4, 170,5 $\times$ 2, 170,7.

#### (4) Tổng hợp Hợp chất 17

## Sơ đồ 13: Tổng hợp Steviol glycosit 2 mới (Hợp chất 17)



Như được nhận thấy từ Sơ đồ 13, đối với việc tổng hợp Hợp chất 17, Hợp chất 13 (468 mg, 0,540 mmol) và Hợp chất 3 (420 mg, 0,360 mmol) được hòa tan trong 1,4-dioxan (18 mL), được thêm tributylphosphin (270  $\mu$ L, 1,08 mmol) và 1,1'-azobis (N,N'-dimethylformamit) (TMAD) (186 mg, 1,08 mmol) ở nhiệt độ trong phòng, và được khuấy ở 60°C trong 6 giờ. Sau khi xác nhận hoàn thành phản ứng bằng TLC (toluen/etyl axetat = 1/1, trị số R<sub>f</sub> = 0,4), chất tạo thành được pha loãng bằng etyl axetat, lớp hữu cơ được rửa bằng nước, dung dịch nước natri hydro cacbonat bão hòa và nước muối bão hòa, và làm khô bằng magie sulfat. Magie sulfat được loại bỏ bằng cách lọc, và chất tạo thành được cô dưới áp suất giảm. Xi rô tạo thành được cho tham gia sắc ký cột silica gel, và nước rửa giải (toluen/etyl axetat = 1,5/1) và (toluen/axeton = 3/1) được sử dụng để tạo ra hợp chất 16 (320 mg, 44%,  $\alpha/\beta=1/10$ ).

## Hợp chất 16

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  0,45-1,18 (phức hợp, 8H), 1,28 (d, 3H, H-6 của Rham), 1,40-1,81 (phức hợp, 20H), 1,81-2,35 (phức hợp, 54H, OAc), 3,60 (m, 1,2H), 3,71-3,78 (phức hợp, 3H), 3,81-3,91 (phức hợp, 2,4H), 3,98-4,20 (phức hợp, 10H), 4,40-4,50 (phức hợp, 3,4H), 4,62 (d, J = 8,0 Hz, 1,1H, H-1), 4,73 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H-1), 4,75-4,91 (phức hợp, 7H), 4,96-5,12 (phức hợp, 7H), 5,17 (s, 1H, H-1 của Rha), 5,21-

5,31 (phức hợp, 6H), 5,32 (s, 1H, H-1 của Rha), 5,38 (t, 1,1H), 5,60 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H, H-1 $\beta$ ), 6,22 (d,  $J = 3,0$  Hz, 0,1H, H-1 $\alpha$ );  $^{13}\text{C}$ -NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz)  $\delta$  16,7, 17,5, 20,5, 20,7 $\times 2$ , 20,8 $\times 2$ , 20,9 $\times 2$ , 21,0, 21,6, 29,0, 39,6, 42,5, 44,0, 53,9, 58,1, 61,7, 66,7, 67,6, 68,0, 68,1, 68,3, 68,5, 69,8, 70,2, 70,7, 71,2, 71,4, 71,8, 71,9, 72,2, 72,4, 72,8, 72,9, 75,2, 80,3, 81,4, 86,6, 92,2, 96,4, 96,9, 99,3, 99,8, 125,4, 128,4, 129,2, 138,0, 152,9, 169,0, 169,3, 169,5 $\times 2$ , 169,6 $\times 2$ , 169,8, 170,1 $\times 3$ , 170,2, 170,5, 170,6, 170,9 $\times 2$ , 174,7.

Hợp chất 16 (300 mg, 0,149 mmol) được hòa tan trong metanol (2,0 mL) và THF (2,0 mL), được thêm natri metoxit (0,5 M trong MeOH) (0,3 mL, 0,149 mmol) ở nhiệt độ trong phòng, và được khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ. Sau khi xác nhận hoàn thành phản ứng bằng TLC (cloform/metanol/nước = 5/4/1, trị số  $R_f = 0,5$ ), chất tạo thành được cô dưới áp suất giảm. Xi rô tạo thành được cho tham gia cột tinh lọc gel (GE Healthcare, Sephadex LH-20, etanol) để tạo ra hợp chất 17 (188 mg, 96%,  $\alpha/\beta = 1/10$ ). Tiếp theo, dạng  $\beta$  của Hợp chất 17 được tách bằng HPLC điều chế (cột C18 YMC HPLC, 20 mM dung dịch nước amoni axetat/90% axetonitril/10% nước = 70/30-10/90, 45 phút), và được làm đông khô. Dữ liệu phân tích cấu trúc của Hợp chất 17 bằng phương pháp cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được thể hiện trong Fig. 10-13.

#### Hợp chất 17 (dạng $\beta$ )

$^1\text{H}$ -NMR (pyridin- $d_5$ , 800 MHz)  $\delta$  0,67 (m, 1H), 0,86 (m, 1H), 0,96 (m, 1H), 1,07 (m, 1H), 1,14 (s, 3H), 1,26 (m, 1H), 1,36 (m, 1H), 1,41 (m, 1H), 1,48 (s, 3H), 1,61 (m, 3H), 1,70 (m, 6H), 1,87-2,21 (phức hợp, 11H), 2,46 (m, 1H), 2,57 (m, 1H), 3,63 (m, 1H), 3,85 (m, 1H), 3,95-4,09 (phức hợp, 8H), 4,14-4,31 (phức hợp, 14H), 4,33 (m, 1H), 4,45 (m, 2H), 4,55 (m, 3H), 4,78 (m, 1H), 4,82 (m, 1H), 4,86 (m, 1H), 4,98 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 5,05-5,11 (phức hợp, 3H), 5,66 (s, 1H), 6,17 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 6,24 (s, 1H), 6,46 (s, 1H);  $^{13}\text{C}$ -NMR (pyridin- $d_5$ , 200 MHz)  $\delta$  17,0, 19,2, 20,1, 20,9, 22,3, 29,6, 37,8, 38,3, 39,9, 40,8, 41,9, 42,7, 43,7, 44,5, 48,4, 54,2, 58,4, 61,9, 62,4, 62,5, 69,1, 69,8 $\times 2$ , 70,5, 71,6, 71,7, 72,3, 72,4, 72,5 $\times 2$ , 73,9, 74,1, 75,2, 76,4, 76,5, 77,5, 78,3, 78,4, 78,5, 78,8 $\times 2$ , 86,9, 88,8, 89,8, 93,8, 98,4, 101,8, 101,9, 104,4, 104,5, 105,3, 154,4, 176,0.

$[\alpha]_D = -44,5^\circ$  (c 0,1, MeOH)

MALDI-TOF-MS  $m/z$  phát hiện thấy  $[M + \text{Na}]^+$  1281,4,  $\text{C}_{56}\text{H}_{90}\text{O}_{31}$  được dự tính cho  $[M + \text{Na}]^+$  1281,5.

(iii) Xác định cấu trúc bằng cách khớp với sản phẩm tiêu chuẩn được tổng hợp hóa học theo thời gian lưu và mẫu được phân đoạn từ HPLC- MS/MS độ phân giải cao và

phân đoạn MS<sup>3</sup>

Sản phẩm được tổng hợp hóa học của steviol glycosit 1 mới (dạng  $\beta$  của hợp chất 15) và dịch chiết lỏng lá stevia được so sánh bằng HPLC- MS/MS độ phân giải cao và phân đoạn MS<sup>3</sup> trong cùng điều kiện như (i). Kết quả là, các đỉnh của sản phẩm được tổng hợp hóa học và dịch chiết lỏng lá stevia được phát hiện ở đỉnh với thời gian lưu là 29,1 phút (Fig. 14). Hơn nữa, chúng cũng phù hợp với khối phổ được phân đoạn MS/MS và MS<sup>3</sup> tương ứng (Fig. 15). Từ kết quả này, Steviol glycosit 1 mới thu được từ dịch chiết lỏng của thực vật được xác nhận là có cùng cấu tạo như dạng  $\beta$  của hợp chất 15.

Ngoài ra, sản phẩm được tổng hợp hóa học của steviol glycosit 2 mới (dạng  $\beta$  của hợp chất 17) và dịch chiết lỏng lá stevia được so sánh bằng HPLC- MS/MS phân giải cao và phân đoạn MS<sup>3</sup> trong cùng điều kiện như (i). Kết quả là, đỉnh của sản phẩm được tổng hợp hóa học và dịch chiết lỏng lá stevia được phát hiện ở đỉnh với thời gian lưu là 28,9 phút (Fig. 16). Hơn nữa, chúng cũng phù hợp với khối phổ được phân đoạn MS/MS và MS<sup>3</sup> tương ứng (Fig. 17). Từ kết quả này, Steviol glycosit 2 mới thu được từ dịch chiết lỏng của thực vật được xác nhận là có cùng cấu tạo như dạng  $\beta$  của hợp chất 17.

Sinh tổng hợp của steviol glycosit mới

Steviol glycosit mới được tạo ra từ steviol trong nấm men. Đầu tiên, nấm men có thể cùng biểu hiện bốn loại gen enzym được glycosyl hoá có nguồn gốc từ stevia UGT85C2, UGT91D2, UGT74G1 và UGT76G1 và gen synthaza UDP-ramnoza có nguồn gốc từ *Arabidopsis thaliana*- AtRHM2 được gây giống.

Trừ khi có quy định khác, các quy trình sinh học phân tử được sử dụng trong ví dụ này tuân theo các phương pháp được mô tả trong tài liệu Molecular Cloning (Sambrook et al., Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001).

Để nhân bản bốn loại gen enzym được glycosyl hoá, các bộ đoạn mồi được tổng hợp để đóng vai trò PCR sử dụng cDNA được điều chế từ lá stevia làm mẫu.

Bộ đoạn mồi dùng cho sự khuếch đại gen UGT85C2

CACC-NdeI-SrUGT85C2-Fw (Vị trí nhận biết NdeI được gạch chân):

5'-CACCCCATATGGATGCAATGGCTACAAGTGAAG-3' (SEQ ID NO:12)

BglIII-SrUGT85C2-Rv (Vị trí nhận biết BglIII được gạch chân):

5'-AGATCTCTAGTTTCTTGCTAGCACGGTGATTT-3' (SEQ ID NO:13)

Bộ đoạn mồi dùng cho sự khuếch đại gen UGT91D2

SrUGT91D2-pET15b-FW

5'-TGCCGCGCGGCAGCCCATATGTACAACGTTACTTATCATC-3' (SEQ ID NO:35)

SrUGT91D2-pET15b-RV

5'-GTTAGCAGCCGGATCCTTAACTCTCATGATCGATGGCAA-3' (SEQ ID NO:36)

Bộ đoạn mồi dùng cho sự khuếch đại gen UGT74G1

CACC-NdeI-SrUGT74G1-Fw (Vị trí nhận biết NdeI được gạch chân):

5'-CACCCCATATGGCGGAACAACAAAAGATCAAGAAAT-3' (SEQ ID NO:14)

BamHI-SrUGT74G1-Rv (Vị trí nhận biết BamHI được gạch chân):

5'-GGATCCTTAAGCCTTAATTAGCTCACTTACAAATT-3' (SEQ ID NO:15)

Bộ đoạn mồi dùng cho sự khuếch đại gen UGT76G1

CACC-NdeI-SrUGT76G1-Fw (Vị trí nhận biết NdeI được gạch chân):

5'-CACCCCATATGGAAAATAAAACGGAGACCA-3' (SEQ ID NO:16)

BamHI-SrUGT76G1-Rv (Vị trí nhận biết BamHI được gạch chân):

5'-GGATCCTTACAACGATGAAATGTAAGAAACTA-3' (SEQ ID NO:17)

Lá stevia cDNA thu được bằng cách chiết tổng số ARN từ lá stevia sử dụng RNeasy Plant Mini kit (QIAGEN), và cho 0,5µg lượng này tham gia phản ứng phiên mã ngược (RT) sử dụng đoạn mồi Random Oligo-dT.

Dung dịch phản ứng PCR (50µl) có thành phần như sau: 1µl cDNA có nguồn gốc từ lá stevia, 1 x chất đệm dương KOD (TOYOBO), 0,2mM dNTPs, 0,4pmol/µl mỗi đoạn mồi, 1mM MgSO<sub>4</sub> và 1U polymeraza KOD dương chịu nhiệt. Phản ứng PCR bao gồm phản ứng ở nhiệt độ 95°C trong 5 phút, sau đó là sự khuếch đại bằng tổng số 30 chu kỳ phản ứng ở nhiệt độ 94°C trong 0,5 phút, 50°C trong 0,5 phút và 68°C trong 2 phút. Mỗi sản phẩm PCR được cho tham gia điện di với 0,8% gel agarosa và sự biến màu ethidi bromua, nhờ đó thu được dải khuếch đại gần 1,4 kb về cỡ như giả định từ mỗi mẫu ADN.

Sản phẩm PCR này được phân dòng trong vector pENTR-TOPO Directional

(Invitrogen) theo phương pháp được khuyến nghị bởi nhà sản xuất. DNA Sequencer model 3100 (Applied Biosystems) được sử dụng cho trình tự bởi quy trình đoạn mồi trực tiếp với đoạn mồi oligonucleotit được tổng hợp, nhờ đó xác nhận tất cả các gen UGT ưa thích, tức là UGT85C2, UGT91D2, UGT74G1 và UGT76G1 được tách dòng.

#### Cấu trúc của vector biểu hiện nấm men

Các bộ đoạn mồi sau đây được thiết kế để tích hợp các gen UGT này và gen ramnoza synthaza UDP AtRHM2 có nguồn gốc từ *Arabidopsis thaliana* (J Biol Chem 2007, Oka et. al) vào vector biểu hiện nấm men.

#### Bộ SrUGT85C2

Bgl2-UGT85C2-F (Vị trí nhận biết BglII được gạch chân):

5'-ACAGATCTATGGATGCAATGGCTACAACCTGAGA-3' (SEQ ID NO:18)

Sal-UGT85C2-R (Vị trí nhận biết SalI được gạch chân):

5'-TAGTCGACTAGTTTCTTGCTAGCACGGTGATTTC-3' (SEQ ID NO:19)

#### Bộ SrUGT91D2

NotI-UGT91DIL3-F (Vị trí nhận biết NotI được gạch chân):

5'-AAGCGGCCGCATGTACAACGTTACTTATCATCAAAATTCAAA-3' (SEQ ID NO:20)

Pac-UGT91D1L3-R (Vị trí nhận biết PacI được gạch chân):

5'-CGTTAAATTAACTCTCATGATCGATGGCAACC-3' (SEQ ID NO:21)

#### Bộ SrUGT74G1

Not-UGT74G1-F (Vị trí nhận biết NotI được gạch chân):

5'-AAGCGGCCGCATGGCGGAACAACAAAAGATCAAG-3' (SEQ ID NO:22)

Pac-UGT74G1-R (Vị trí nhận biết PacI được gạch chân):

5'-CGTTAAATTAAGCCTTAATTAGCTCACTTACAAATTCG-3' (SEQ ID NO:23)

#### Bộ SrUGT76G1

Bam-UGT76G1-F (Vị trí nhận biết BamHI được gạch chân):

5'-AAGGATCCATGGAAAATAAAACGGAGACCACCG-3' (SEQ ID NO:24)

Sal-UGT76G1-R (Vị trí nhận biết SalI được gạch chân):

5'-GCGTCGACTTACAACGATGAAATGTAAGAACTAGAGACTCTAA-3'

(SEQ ID NO:25)

Bộ AtRHM2

Bam-AtRHM2-F (Vị trí nhận biết BamHI được gạch chân):

5'-GGATCCATGGATGATACTACGTATAAGCCAAAG-3' (SEQ ID NO:26)

Xho-AtRHM2-R (Vị trí nhận biết XhoI được gạch chân):

5'-CTCGAGTTAGGTTCTCTTGTGTTTGGTTCAAAGA-3' (SEQ ID NO:27)

Các cách kết hợp các mẫu và đoạn môi, tức là bộ UGT85C2 và SrUGT85C2 mẫu, bộ UGT91D2 và SrUGT91D2 mẫu, bộ UGT74G1 và SrUGT74G1 mẫu, bộ UGT76G1 và SrUGT76G1 mẫu, và bộ AtAHM2 và AtAHM2 mẫu, được sử dụng để khuếch đại PCR sử dụng KOD ADN polymeraza chịu nhiệt (TOYOBO) và chèn các vị trí enzyme giới hạn ở cả hai đầu của mỗi ORF. Phân đoạn ADN tạo thành được phân dòng sử dụng kit tách dòng Zero Blunt-TOPO PCR (Invitrogen), và được tạo trình tự sử dụng DNA Sequencer model 3100 (Applied Biosystems) bằng quy trình đoạn môi trực tiếp với đoạn môi oligonucleotit được tổng hợp để xác nhận rằng mỗi gen UGT ưa thích được nhân bản.

Để có sự biểu hiện của các gen nêu trên ở các nấm men bằng cách sử dụng hệ biểu hiện nấm men pESC (Stratagene), các vector biểu hiện sau đây được cấu tạo thành.

#### (1) Cấu trúc của plasmid pESC-URA-UGT56

UGT85C2 được phân cắt bằng các enzyme giới hạn BglII và SalI, và được liên kết với vector pESC-URA (Stratagene) mà đã được phân cắt bởi các enzyme giới hạn BamHI và SalI để tạo ra plasmid pESC-URA-UGT-5. Plasmid pESC-URA-UGT-5 này được phân cắt bằng các enzyme giới hạn NotI và PacI trong khi UGT91D2 cũng được phân cắt bằng các enzyme giới hạn NotI và PacI. Các chất tạo thành được liên kết để tạo ra pESC-URA-UGT56.

#### (2) Cấu trúc của plasmid pESC-HIS-UGT78

UGT76G1 được phân cắt bằng các enzyme giới hạn BamHI và SalI, và được liên kết với vector pESC-HIS (Stratagene) mà đã được phân cắt bằng các enzyme giới hạn tương tự để tạo ra plasmid pESC-HIS-UGT-8. Plasmid pESC-HIS-UGT-8 này được phân cắt bằng các enzyme giới hạn NotI và PacI trong khi UGT74G1 cũng được phân cắt bằng

NotI và PacI. Các chất tạo thành được liên kết để tạo ra pESC-HIS-UGT78.

### (3) Cấu trúc của plasmit pESC-TRP-AtRHM2

AtAHM2 được phân cắt bằng các enzym giới hạn BamHI và XhoI trong khi vector pESC-TRP (Stratagene) được phân cắt bằng các enzym giới hạn tương tự. Các chất tạo thành được liên kết để tạo ra plasmit pESC-TRP-AtAHM2.

### Sự biến nạp của nấm men

Các plasmit được thể hiện trong bảng 2 được đưa vào chủng *Saccharomyces cerevisiae* YPH499 (ura3-52 lys2-801<sup>amber</sup> ade2-101<sup>ochre</sup> trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1 a) làm vật chủ bằng kỹ thuật lithi axetat. Đối với các chủng được biến nạp, những loại mà sống sót trong môi trường thạch aga SC-Trp-Ura-His (6,7g nấm men nitơ bazơ không có axit amin, 20g glucoza, 1,3g bột axit amin mix-Trp-Ura-His và 20g thạch aga Bacto mỗi 1L) được chọn lọc.

Bảng 2

| Chủng được biến nạp | Các plasmit được đưa vào                              | Các gen được đưa vào                                   |
|---------------------|-------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| A-5678              | pESC-URA-UGT-56<br>pESC-HIS-UGT-78<br>pESC-TRP-AtAHM2 | SrUGT85C2, SrUGT91D2<br>SrUGT74G1, SrUGT76G1<br>AtAHM2 |

Trong bản mô tả này, hỗn hợp bột axit amin Trp-Ura-His được điều chế bằng cách trộn adenine sulfat (2,5g), L-acginin hydroclorua (1,2g), axit L-aspartic (6,0g), axit L-glutamic (6,0g), L-leuxin (3,6g), L-lizin (1,8g), L-methionin (1,2g), L-phenylalanin (3,0g), L-serin (22,5g), L-threonin (12g), L-tiroxin (1,8g) và L-valin (9,0g).

### Cảm ứng và phân tích biểu hiện của gen chuyên

Chủng được biến nạp thu được được nuôi cấy như sau.

Đầu tiên, đối với việc nuôi cấy sơ bộ, mỗi chủng được biến nạp được cấy vào 10ml môi trường lỏng SC-Trp-Ura-His (môi trường thạch aga SC-Trp-Ura-His không có thạch aga Bacto) và được nuôi cấy trong tủ lắc ở nhiệt độ 30°C trong một ngày. Tiếp theo, đối với việc nuôi cấy chính, 1ml dung dịch nuôi cấy sơ bộ được cấy vào 10ml môi trường lỏng SG-Trp-Ura-His (6,7g nấm men nitơ bazơ không có axit amin, 20g galactoza, và 1,3g hỗn hợp bột axit amin Trp-Ura-His mỗi 1L) và được nuôi cấy trong tủ lắc ở nhiệt độ 30°C trong hai ngày.

Để xác nhận liệu rằng gen được chuyển vào có được biểu hiện ở chủng được biến

nap hay không, các tế bào được thu hoạch từ dung dịch nuôi cấy để tinh chế ARN tổng bằng kit RNeasy Mini.

Với 1 $\mu$ g ARN tổng, cDNA được tổng hợp sử dụng kỹ thuật phiên mã ngược SuperScript II (Thermo Fischer Scientific) và hexamer ngẫu nhiên làm đoạn mồi.

Để xác nhận sự biểu hiện của gen chuyển, các đoạn mồi sau đây được điều chế.

Để xác nhận sự biểu hiện của UGT85C2

UGT85C2-r1:

5'-CAAGTCCCCAACC AAATTCCGT-3' (SEQ ID NO:28)

Để xác nhận sự biểu hiện của UGT91D2

UGT91D1L3-r1:

5'-CACGAACCCGTCTGGCAACTC-3' (SEQ ID NO:29)

Để xác nhận sự biểu hiện của UGT74G1

UGT74G1-r1:

5'-CCCGTGTGATTTCTTCCACTTGTTTC-3' (SEQ ID NO:30)

Để xác nhận sự biểu hiện của UGT76G1

UGT76G1-r1:

5'-CAAGAACCCATCTGGCAACGG-3' (SEQ ID NO:31)

Để xác nhận sự biểu hiện của AtAHM2

AtAHM2-r1

5'-GCTTTGTCACCAGAATCACCATT-3' (SEQ ID NO:32)

Vùng GAL10p (vùng gen khởi đầu)

PGAL10-f3:

5'-GATTATTAACTTCTTTGCGTCCATCCA-3' (SEQ ID NO:33)

Vùng GAL1p (vùng gen khởi đầu)

PGAL1-f3:

5'-CCTCTATACTTTAACGTCAAGGAGAAAAAACC-3' (SEQ ID NO:34)

Sự biểu hiện của mỗi gen chuyển được xác nhận bằng cách thực hiện PCR bằng

cách sử dụng ExTaq (Taraka Bio) với sự kết hợp các đoạn mồi sau đây và cDNA đã tổng hợp trước đó làm mẫu và cho sản phẩm tạo thành tham gia điện di gel agarosa.

UGT85C2: UGT85C2-r1 (SEQ ID NO:28) và PGAL1-f3 (SEQ ID NO:34)

UGT91D2 hoặc UGT91D2L3: UGT91D1L3-r1 (SEQ ID NO:29) và PGAL10-f3 (SEQ ID NO:33)

UGT74G1: UGT74G1-r1 (SEQ ID NO:30) và PGAL1-f3 (SEQ ID NO:34)

UGT76G1: UGT76G1-r1 (SEQ ID NO:31) và PGAL10-f3 (SEQ ID NO:33)

AtAHM2: AtAHM2-r1 (SEQ ID NO:32) và PGAL10-f3 (SEQ ID NO:33)

Theo đó, sự biểu hiện của gen chuyển trong chủng được biến nạp được xác nhận.

#### Sản xuất steviol glycosit mới

Việc nuôi cấy được thực hiện dưới cùng các điều kiện như được mô tả trên đây ngoại trừ việc 0,5 $\mu$ g hoặc 2 $\mu$ g steviol (ChromaDex Inc.) được thêm vào môi trường lỏng dùng cho việc nuôi cấy chính mỗi 1ml môi trường. Sau khi nuôi cấy, dung dịch nuôi cấy được tách thành dịch nổi nuôi cấy và các tế bào bằng cách ly tâm. Dịch nổi nuôi cấy được rửa bằng axetonitril, sau đó được cho tham gia cột Sep-Pak C18 được cân bằng bằng nước, được rửa bằng axetonitril 20%, được rửa giải bằng axetonitril 80%, được làm khô để hóa rắn, và sau đó được hòa tan trong một lượng nhỏ axetonitril 80% để điều chế mẫu glycosit. Mẫu glycosit này được cho tham gia phân tích sau đây.

#### Phân tích bằng LC-MS

Phân tích bằng LC-MS được thực hiện như được mô tả trong ví dụ "Phân tách steviol glycosit mới".

Kết quả được thể hiện trong Fig 18 và 19. Sự tạo ra steviol glycosit 1 và 2 mới ở chủng A-5678 được xác nhận. Kết quả này tương ứng với steviol glycosit tạo ra từ sự tổng hợp hóa học được mô tả ở trên.

#### Đánh giá độ ngọt của steviol glycosit mới

Để đánh giá độ ngọt của steviol glycosit mới, các mẫu được điều chế bằng cách thêm sucroza vào nước tinh khiết để tạo ra Brix là 0,5 đến 3 trong 0,5 lượng gia tăng. Mẫu được điều chế bằng cách thêm Hợp chất 17 có cấu trúc tương tự như Steviol glycosit 2 mới vào nước tinh khiết đến 1700 ppm. Ở đây, tỉ lệ dạng  $\alpha$  và dạng  $\beta$  chứa trong Hợp chất 17 là 1: 10 ( $\alpha$ :  $\beta$ , tỉ lệ mol).

Việc đánh giá được thực hiện bằng cách chọn mẫu được thêm sucroza có độ ngọt

tương đương với độ ngọt của mẫu được thêm steviol glycosit mới, trong đó đánh giá cảm quan được thực hiện bởi các thử nghiệm viên được đào tạo về các thuộc tính cảm quan của các chất tạo ngọt (5 thành phần). Kết quả là mẫu được điều chế bằng cách thêm glycosit 2 mới được phát hiện thấy là có độ ngọt tương đương với độ ngọt của mẫu được thêm sucroza với Brix là 1. Do đó, steviol glycosit mới theo sáng chế được phát hiện là có độ ngọt là 14,7 tính theo sucroza. Mặc dù không đòi hỏi độ ngọt chính xác của steviol glycosit 1 mới do nó không hòa tan hoàn toàn trong nước, steviol glycosit 1 mới cũng được xác nhận là có độ ngọt như được mô tả dưới đây.

#### Đánh giá cảm quan steviol glycosit mới (Hợp chất 17)

Để đánh giá chất lượng mùi vị của các steviol glycosit, Reb.A, Reb.D và hợp chất 17 có cấu trúc tương tự như Steviol glycosit 2 mới được thêm vào nước tinh khiết với lượng như thể hiện trong Fig. 20 để điều chế mẫu đồ uống. Tất cả các mẫu đồ uống được điều chỉnh để có Brix cuối cùng là 2 tính theo sucroza, với điều kiện là các mức độ ngọt là Reb.A: 300, Reb.D: 250 và glycosit 2 mới (Hợp chất 17): 14,7.

Các mẫu đồ uống tạo thành được cho tham gia đánh giá cảm quan để đánh giá các thuộc tính, như, độ ngọt ban đầu, dư vị ngọt kéo dài, độ ngọt tổng quan, vị tự nhiên, và dư vị tự nhiên kéo dài. Vị tự nhiên như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ vị không mong muốn không phải là vị ngọt, ví dụ vị đắng và vị gắt. Các thử nghiệm viên được đào tạo về các thuộc tính cảm quan của các chất tạo ngọt (7 thành phần: Suntory Beverage and Food Ltd.) đánh giá dựa trên các tiêu chuẩn đánh giá sau. Rất ít (-3), ít (-2), khá ít (-1), bình thường (0), khá nhiều (+1), nhiều (+2) và rất nhiều (+3). Kết quả được thể hiện trong Fig. 20. Điểm đánh giá thể hiện trong biểu đồ là điểm trung bình của các điểm của 7 thử nghiệm viên.

Kết quả đánh giá cảm quan, Hợp chất 17 có cấu trúc tương tự như Steviol glycosit 2 mới được phát hiện là có độ ngọt ban đầu nhanh hơn chất tạo ngọt Reb.A và Reb.D thông thường và dư vị ngọt kéo dài tốt như đường. Nó cũng được phát hiện là có độ ngọt tổng quan so với Reb.D.

#### Đánh giá vị của steviol glycosit mới (Hợp chất 15 và 17) ở dạng bột

Vị của steviol glycosit mới 1 và 2 ở dạng bột được đánh giá. Cụ thể là, hợp chất 15 (tương ứng với Steviol glycosit 1 mới) và 17 (tương ứng với Steviol glycosit 2 mới) thu được bằng cách tổng hợp hóa học được cho tham gia sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) để phân tách chỉ dạng  $\beta$ , mà được làm thành dạng bột và đưa đi đánh giá vị. Thử

nghiệm viên được đào tạo về các thuộc tính cảm quan của chất tạo ngọt (3 thành phần: Suntory Beverage and Food Ltd.) đánh giá. Kết quả được thể hiện trong bảng 3.

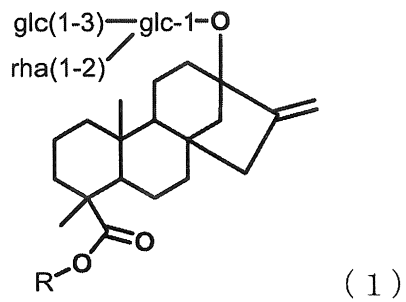
Bảng 3: Kết quả đánh giá vị của steviol glycosit mới (chỉ dạng  $\beta$ ) ở dạng bột

|                                         | Độ ngọt | Các đặc tính về vị                                                                                                                                                             |
|-----------------------------------------|---------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Steviol glycosit 1 mới<br>(Hợp chất 15) | Có      | <ul style="list-style-type: none"> <li>·Độ ngọt ít hơn steviol glycosit 2 mới</li> <li>·Dư vị ngọt kéo dài nhiều hơn steviol glycosit 2, nhưng với độ ngọt cuối tốt</li> </ul> |
| Steviol glycosit 2 mới<br>(Hợp chất 17) | Có      | <ul style="list-style-type: none"> <li>·Vị giống hỗn hợp</li> <li>·Không có vị đắng</li> </ul>                                                                                 |

Từ kết quả trên, cả hai steviol glycosit 1 và 2 mới có vị ngọt và được phát hiện là hữu ích làm chất tạo ngọt. Hơn nữa, cả hai steviol glycosit có ít vị không mong muốn như vị đắng. Hợp chất 17 có vị giống hỗn hợp có dạng  $\alpha$  và  $\beta$  được sử dụng để đánh giá độ ngọt.

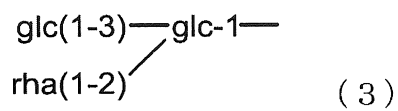
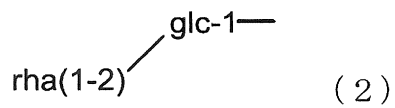
## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất được thể hiện bởi công thức (1):



hoặc muối hoặc hydrat của nó,

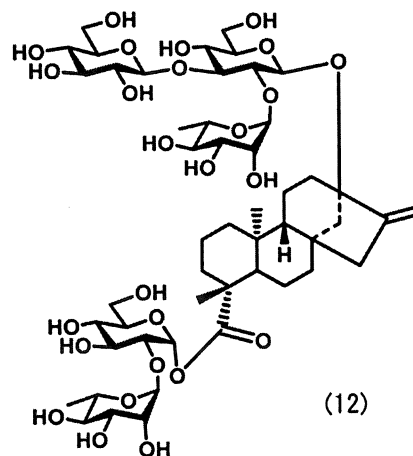
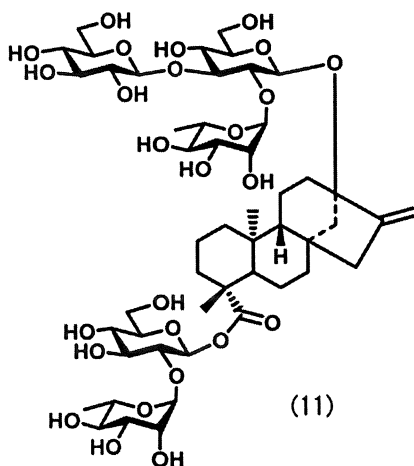
trong đó R là chuỗi đường có công thức (2) hoặc (3); và

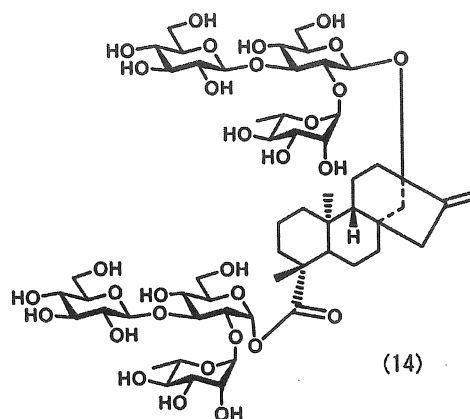
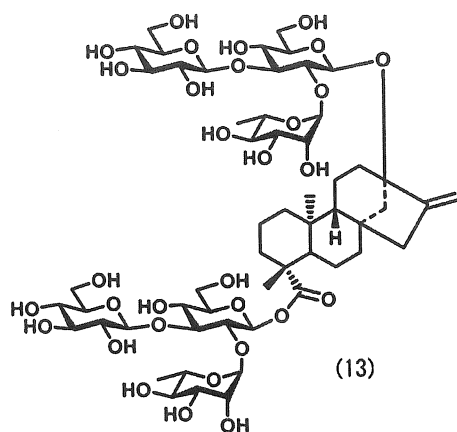


glc là glucoza, và rha là ramnoza.

2. Hợp chất theo điểm 1, trong đó hợp chất này là sản phẩm có nguồn gốc từ thực vật, sản phẩm được tổng hợp hóa học hoặc sản phẩm sinh học tổng hợp.

3. Hợp chất được thể hiện bởi công thức (11), (12), (13) hoặc (14):





hoặc muối hoặc hydrat của nó.

4. Thực phẩm chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 hoặc muối hoặc hydrat của nó.

5. Đồ uống chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 hoặc muối hoặc hydrat của nó.

6. Chế phẩm tạo ngọt chứa hợp chất theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3 hoặc muối hoặc hydrat của nó.

7. Chế phẩm tạo ngọt theo điểm 6, trong đó chế phẩm này còn chứa một hoặc nhiều loại steviol glycosit được chọn từ nhóm bao gồm rebaudioside A, rebaudioside B, rebaudioside C, rebaudioside D, rebaudioside E, rebaudioside F, rebaudioside I, rebaudioside J, rebaudioside K, rebaudioside N, rebaudioside M, rebaudioside O, rebaudioside Q, rebaudioside R, dulcoside A, dulcoside C, rubusoside, steviol, steviol monosit, steviol biosit và steviosit.

8. Thực phẩm chứa chế phẩm tạo ngọt theo điểm 6 hoặc 7.

9. Đồ uống chứa chế phẩm tạo ngọt theo điểm 6 hoặc 7.

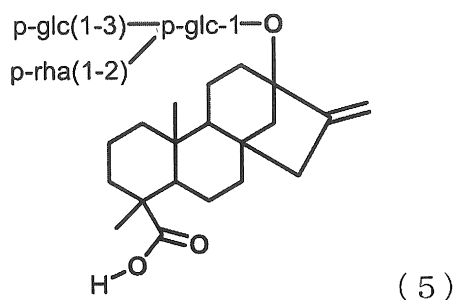
10. Dịch chiết của thực vật chứa hợp chất theo điểm 1 hoặc 3, hoặc muối hoặc hydrat của nó, trong đó dịch chiết này chứa hợp chất theo điểm 1 hoặc 3, hoặc muối hoặc hydrat của nó.

11. Thực phẩm chứa dịch chiết của thực vật theo điểm 10.

12. Đồ uống chứa dịch chiết của thực vật theo điểm 10.

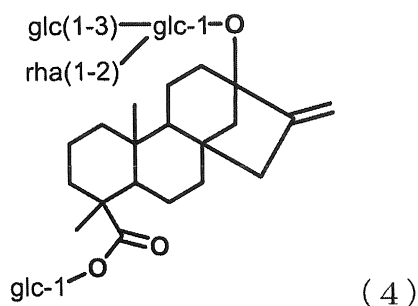
13. Phương pháp sản xuất hợp chất theo điểm 1, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

(A) điều chế chất trung gian 1 được thể hiện bởi công thức (5):



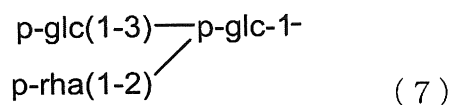
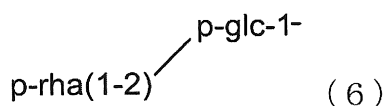
trong đó p-glc là glucoza, trong đó ít nhất một nhóm hydroxyl được bảo vệ bởi nhóm bảo vệ, và p-rha là ramnoza, trong đó ít nhất một nhóm hydroxyl được bảo vệ bởi nhóm bảo vệ,

từ rebaudioside C được thể hiện bởi công thức (4):



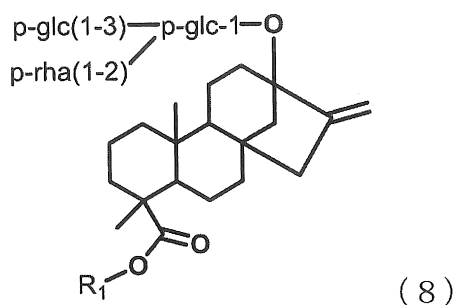
trong đó glc là glucoza và rha là ramnoza;

(B) điều chế chất trung gian 2 được thể hiện bởi công thức (6) hoặc chất trung gian 3 được thể hiện bởi công thức (7) từ dẫn xuất glucopyranosit:

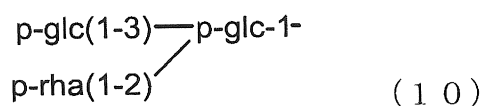
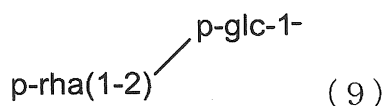


trong đó p-glc là glucoza, trong đó ít nhất một nhóm hydroxyl được bảo vệ bởi nhóm bảo vệ, và p-rha là ramnoza, trong đó ít nhất một nhóm hydroxyl được bảo vệ bởi nhóm bảo vệ; và

(C) cho chất trung gian 1 phản ứng với chất trung gian 2 hoặc 3 với sự có mặt của chất phản ứng phosphin và hợp chất azo để thu được chất trung gian 4 được thể hiện bởi công thức (8):



trong đó  $R_1$  là chuỗi đường có công thức (9) hoặc (10): và



p-glc là glucoza, trong đó ít nhất một nhóm hydroxyl được bảo vệ bởi nhóm bảo vệ, và p-rha là ramnoza, trong đó ít nhất một nhóm hydroxyl được bảo vệ bởi nhóm bảo vệ.

14. Phương pháp sản xuất hợp chất theo điểm 1, trong đó phương pháp này đặc trưng ở chỗ sử dụng thể biến nạp không phải người mà được đưa vào ít nhất một trong các polynucleotit (a) đến (g):

(a) polynucleotit mã hóa protein mà có sự tương đồng 90% hoặc cao hơn với trình tự axit amin của SEQ ID NO:2 và có hoạt tính bổ sung glucoza vào nhóm hydroxyl ở vị trí C-13 của steviol glycosit;

(b) polynucleotit mã hóa protein mà có sự tương đồng 90% hoặc cao hơn với trình tự axit amin của SEQ ID NO:4 và có hoạt tính bổ sung glucoza vào axit cacboxylic ở vị trí C-19 của steviol glycosit;

(c) polynucleotit mã hóa protein mà có sự tương đồng 90% hoặc cao hơn với trình tự axit amin của SEQ ID NO:6 và mà có hoạt tính bổ sung ramnoza vào glucoza được gắn ở vị trí C-13 của steviol glycosit qua liên kết 1→2;

(d) polynucleotit mã hóa protein mà có sự tương đồng 90% hoặc cao hơn với trình tự axit amin của SEQ ID NO:8 và có hoạt tính bổ sung glucoza vào C-3 của glucoza ở vị trí C-13 của steviol glycosit qua liên kết 1→3;

(e) polynucleotit mã hóa protein mà có sự tương đồng 90% hoặc cao hơn với

trình tự axit amin của SEQ ID NO:6 và có hoạt tính bổ sung glucoza vào glucoza ở vị trí C-19 của steviol glycosit qua liên kết 1→2;

(f) polynucleotit mã hóa protein mà có sự tương đồng 90% hoặc cao hơn với trình tự axit amin của SEQ ID NO:8 và có hoạt tính bổ sung glucoza vào glucoza ở vị trí C-19 của steviol glycosit qua liên kết 1→3; và

(g) polynucleotit mã hóa protein mà có sự tương đồng 90% hoặc cao hơn với trình tự axit amin của SEQ ID NO:10 và có hoạt tính tạo ra UDP-ramnoza từ UDP-glucoza.

15. Phương pháp theo điểm 14, trong đó thể biến nạp không phải người là nấm men.

16. Phương pháp theo điểm 14 hoặc 15, trong đó thể biến nạp không phải người được nuôi cấy trong môi trường chứa steviol.

## Danh mục trình tự

<110> SUNTORY HOLDINGS LIMITED

<120> Steviol glycosit, phương pháp sản xuất hợp chất này và chế phẩm tạo ngọt chứa hợp chất này

<130> G1766WO

<150> JP2017-071457

<151> 2017-03-31

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1446

<212> DNA

<213> Stevia rebaudiana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1446)

<400> 1

atg gat gca atg gct aca act gag aag aaa cca cac gtc atc ttc ata  
48

Met Asp Ala Met Ala Thr Thr Glu Lys Lys Pro His Val Ile Phe Ile  
1 5 10 15

cca ttt cca gca caa agc cac att aaa gcc atg ctc aaa cta gca caa  
96

Pro Phe Pro Ala Gln Ser His Ile Lys Ala Met Leu Lys Leu Ala Gln  
20 25 30

ctt ctc cac cac aaa gga ctc cag ata acc ttc gtc aac acc gac ttc  
144

Leu Leu His His Lys Gly Leu Gln Ile Thr Phe Val Asn Thr Asp Phe  
35 40 45

atc cac aac cag ttt ctt gaa tca tcg ggc cca cat tgt ttg gac ggt  
192

Ile His Asn Gln Phe Leu Glu Ser Ser Gly Pro His Cys Leu Asp Gly  
50 55 60

tca ccg ggt ttc cgg ttc gaa acc atc ccg gat ggt gtt tct cac agt  
240

Ser Pro Gly Phe Arg Phe Glu Thr Ile Pro Asp Gly Val Ser His Ser  
65 70 75 80

ccg gaa gcg agc atc cca atc aga gaa tca ctc ttg aga tcc att gaa  
288

Pro Glu Ala Ser Ile Pro Ile Arg Glu Ser Leu Leu Arg Ser Ile Glu  
85 90 95

acc aac ttc ttg gat cgt ttc att gat ctt gta acc aaa ctt ccg gat  
336

Thr Asn Phe Leu Asp Arg Phe Ile Asp Leu Val Thr Lys Leu Pro Asp  
100 105 110

cct ccg act tgt att atc tca gat ggg ttc ttg tcg gtt ttc aca att  
384

Pro Pro Thr Cys Ile Ile Ser Asp Gly Phe Leu Ser Val Phe Thr Ile  
115 120 125

gac gct gca aaa aag ctt gga att ccg gtc atg atg tat tgg aca ctt  
432

Asp Ala Ala Lys Lys Leu Gly Ile Pro Val Met Met Tyr Trp Thr Leu  
130 135 140

gct gcc tgt ggg ttc atg ggt ttt tac cat att cat tct ctc att gag  
480

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

aaa gga ttt gca cca ctt aaa gat gca agt tac ttg aca aat ggg tat  
528

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

ttg gac acc gtc att gat tgg gtt ccg gga atg gaa ggc atc cgt ctc  
576

Leu Asp Thr Val Ile Asp Trp Val Pro Gly Met Glu Gly Ile Arg Leu  
180 185 190

aag gat ttc ccg ctg gac tgg agc act gac ctc aat gac aaa gtt ttg  
624

Lys Asp Phe Pro Leu Asp Trp Ser Thr Asp Leu Asn Asp Lys Val Leu  
195 200 205

atg ttc act aca gaa gct cct caa agg tca cac aag gtt tca cat cat  
672

Met Phe Thr Thr Glu Ala Pro Gln Arg Ser His Lys Val Ser His His  
210 215 220

att ttc cac acg ttc gat gag ttg gag cct agt att ata aaa act ttg  
720

Ile Phe His Thr Phe Asp Glu Leu Glu Pro Ser Ile Ile Lys Thr Leu  
225 230 235 240

tca ttg agg tat aat cac att tac acc atc ggc cca ctg caa tta ctt  
768

Ser Leu Arg Tyr Asn His Ile Tyr Thr Ile Gly Pro Leu Gln Leu Leu  
 245 250 255  
 ctt gat caa ata ccc gaa gag aaa aag caa act gga att acg agt ctc  
 816  
 Leu Asp Gln Ile Pro Glu Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ile Thr Ser Leu  
 260 265 270  
 cat gga tac agt tta gta aaa gaa gaa cca gag tgt ttc cag tgg ctt  
 864  
 His Gly Tyr Ser Leu Val Lys Glu Glu Pro Glu Cys Phe Gln Trp Leu  
 275 280 285  
 cag tct aaa gaa cca aat tcc gtc gtt tat gta aat ttt gga agt act  
 912  
 Gln Ser Lys Glu Pro Asn Ser Val Val Tyr Val Asn Phe Gly Ser Thr  
 290 295 300  
 aca gta atg tct tta gaa gac atg acg gaa ttt ggt tgg gga ctt gct  
 960  
 Thr Val Met Ser Leu Glu Asp Met Thr Glu Phe Gly Trp Gly Leu Ala  
 305 310 315 320  
 aat agc aac cat tat ttc ctt tgg atc atc cga tca aac ttg gtg ata  
 1008  
 Asn Ser Asn His Tyr Phe Leu Trp Ile Ile Arg Ser Asn Leu Val Ile  
 325 330 335  
 ggg gaa aat gca gtt ttg ccc cct gaa ctt gag gaa cat ata aag aaa  
 1056  
 Gly Glu Asn Ala Val Leu Pro Pro Glu Leu Glu Glu His Ile Lys Lys  
 340 345 350  
 aga ggc ttt att gct agc tgg tgt tca caa gaa aag gtc ttg aag cac  
 1104  
 Arg Gly Phe Ile Ala Ser Trp Cys Ser Gln Glu Lys Val Leu Lys His  
 355 360 365  
 cct tcg gtt gga ggg ttc ttg act cat tgt ggg tgg gga tcg acc atc  
 1152  
 Pro Ser Val Gly Gly Phe Leu Thr His Cys Gly Trp Gly Ser Thr Ile  
 370 375 380  
 gag agc ttg tct gct ggg gtg cca atg ata tgc tgg cct tat tcg tgg  
 1200  
 Glu Ser Leu Ser Ala Gly Val Pro Met Ile Cys Trp Pro Tyr Ser Trp  
 385 390 395 400  
 gac cag ctg acc aac tgt agg tat ata tgc aaa gaa tgg gag gtt ggg  
 1248  
 Asp Gln Leu Thr Asn Cys Arg Tyr Ile Cys Lys Glu Trp Glu Val Gly  
 405 410 415

ctc gag atg gga acc aaa gtg aaa cga gat gaa gtc aag agg ctt gta  
1296

Leu Glu Met Gly Thr Lys Val Lys Arg Asp Glu Val Lys Arg Leu Val  
420 425 430

caa gag ttg atg gga gaa gga ggt cac aaa atg agg aac aag gct aaa  
1344

Gln Glu Leu Met Gly Glu Gly Gly His Lys Met Arg Asn Lys Ala Lys  
435 440 445

gat tgg aaa gaa aag gct cgc att gca ata gct cct aac ggt tca tct  
1392

Asp Trp Lys Glu Lys Ala Arg Ile Ala Ile Ala Pro Asn Gly Ser Ser  
450 455 460

tct ttg aac ata gac aaa atg gtc aag gaa atc acc gtg cta gca aga  
1440

Ser Leu Asn Ile Asp Lys Met Val Lys Glu Ile Thr Val Leu Ala Arg  
465 470 475 480

aac tag  
1446

Asn

<210> 2

<211> 481

<212> PRT

<213> Stevia rebaudiana

<400> 2

Met Asp Ala Met Ala Thr Thr Glu Lys Lys Pro His Val Ile Phe Ile  
1 5 10 15

Pro Phe Pro Ala Gln Ser His Ile Lys Ala Met Leu Lys Leu Ala Gln  
20 25 30

Leu Leu His His Lys Gly Leu Gln Ile Thr Phe Val Asn Thr Asp Phe  
35 40 45

Ile His Asn Gln Phe Leu Glu Ser Ser Gly Pro His Cys Leu Asp Gly  
50 55 60

Ser Pro Gly Phe Arg Phe Glu Thr Ile Pro Asp Gly Val Ser His Ser  
65 70 75 80

Pro Glu Ala Ser Ile Pro Ile Arg Glu Ser Leu Leu Arg Ser Ile Glu  
85 90 95

Thr Asn Phe Leu Asp Arg Phe Ile Asp Leu Val Thr Lys Leu Pro Asp  
100 105 110

Pro Pro Thr Cys Ile Ile Ser Asp Gly Phe Leu Ser Val Phe Thr Ile  
115 120 125

Asp Ala Ala Lys Lys Leu Gly Ile Pro Val Met Met Tyr Trp Thr Leu  
130 135 140

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

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

Leu Asp Thr Val Ile Asp Trp Val Pro Gly Met Glu Gly Ile Arg Leu  
180 185 190

Lys Asp Phe Pro Leu Asp Trp Ser Thr Asp Leu Asn Asp Lys Val Leu  
195 200 205

Met Phe Thr Thr Glu Ala Pro Gln Arg Ser His Lys Val Ser His His  
210 215 220

Ile Phe His Thr Phe Asp Glu Leu Glu Pro Ser Ile Ile Lys Thr Leu  
225 230 235 240

Ser Leu Arg Tyr Asn His Ile Tyr Thr Ile Gly Pro Leu Gln Leu Leu  
245 250 255

Leu Asp Gln Ile Pro Glu Glu Lys Lys Gln Thr Gly Ile Thr Ser Leu  
260 265 270

His Gly Tyr Ser Leu Val Lys Glu Glu Pro Glu Cys Phe Gln Trp Leu  
275 280 285

Gln Ser Lys Glu Pro Asn Ser Val Val Tyr Val Asn Phe Gly Ser Thr  
 290 295 300

Thr Val Met Ser Leu Glu Asp Met Thr Glu Phe Gly Trp Gly Leu Ala  
 305 310 315 320

Asn Ser Asn His Tyr Phe Leu Trp Ile Ile Arg Ser Asn Leu Val Ile  
 325 330 335

Gly Glu Asn Ala Val Leu Pro Pro Glu Leu Glu Glu His Ile Lys Lys  
 340 345 350

Arg Gly Phe Ile Ala Ser Trp Cys Ser Gln Glu Lys Val Leu Lys His  
 355 360 365

Pro Ser Val Gly Gly Phe Leu Thr His Cys Gly Trp Gly Ser Thr Ile  
 370 375 380

Glu Ser Leu Ser Ala Gly Val Pro Met Ile Cys Trp Pro Tyr Ser Trp  
 385 390 395 400

Asp Gln Leu Thr Asn Cys Arg Tyr Ile Cys Lys Glu Trp Glu Val Gly  
 405 410 415

Leu Glu Met Gly Thr Lys Val Lys Arg Asp Glu Val Lys Arg Leu Val  
 420 425 430

Gln Glu Leu Met Gly Glu Gly Gly His Lys Met Arg Asn Lys Ala Lys  
 435 440 445

Asp Trp Lys Glu Lys Ala Arg Ile Ala Ile Ala Pro Asn Gly Ser Ser  
 450 455 460

Ser Leu Asn Ile Asp Lys Met Val Lys Glu Ile Thr Val Leu Ala Arg  
 465 470 475 480

Asn

<210> 3  
 <211> 1383  
 <212> DNA  
 <213> Stevia rebaudiana

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1383)

<400> 3  
 atg gcg gaa caa caa aag atc aag aaa tca cca cac gtt cta ctc atc  
 48  
 Met Ala Glu Gln Gln Lys Ile Lys Lys Ser Pro His Val Leu Leu Ile  
 1 5 10 15  
 cca ttc cct tta caa ggc cat ata aac cct ttc atc cag ttt ggc aaa  
 96  
 Pro Phe Pro Leu Gln Gly His Ile Asn Pro Phe Ile Gln Phe Gly Lys  
 20 25 30  
 cga tta atc tcc aaa ggt gtc aaa aca aca ctt gtt acc acc atc cac  
 144  
 Arg Leu Ile Ser Lys Gly Val Lys Thr Thr Leu Val Thr Thr Ile His  
 35 40 45  
 acc tta aac tca acc cta aac cac agt aac acc acc acc acc tcc atc  
 192  
 Thr Leu Asn Ser Thr Leu Asn His Ser Asn Thr Thr Thr Thr Ser Ile  
 50 55 60  
 gaa atc caa gca att tcc gat ggt tgt gat gaa ggc ggt ttt atg agt  
 240  
 Glu Ile Gln Ala Ile Ser Asp Gly Cys Asp Glu Gly Gly Phe Met Ser  
 65 70 75 80  
 gca gga gaa tca tat ttg gaa aca ttc aaa caa gtt ggg tct aaa tca  
 288  
 Ala Gly Glu Ser Tyr Leu Glu Thr Phe Lys Gln Val Gly Ser Lys Ser  
 85 90 95  
 cta gct gac tta atc aag aag ctt caa agt gaa gga acc aca att gat  
 336  
 Leu Ala Asp Leu Ile Lys Lys Leu Gln Ser Glu Gly Thr Thr Ile Asp  
 100 105 110  
 gca atc att tat gat tct atg act gaa tgg gtt tta gat gtt gca att  
 384  
 Ala Ile Ile Tyr Asp Ser Met Thr Glu Trp Val Leu Asp Val Ala Ile  
 115 120 125

gag ttt gga atc gat ggt ggt tcg ttt ttc act caa gct tgt gtt gta  
432

Glu Phe Gly Ile Asp Gly Gly Ser Phe Phe Thr Gln Ala Cys Val Val  
130 135 140

aac agc tta tat tat cat gtt cat aag ggt ttg att tct ttg cca ttg  
480

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

ggt gaa act gtt tcg gtt cct gga ttt cca gag ctt caa cgg tgg gag  
528

Gly Glu Thr Val Ser Val Pro Gly Phe Pro Glu Leu Gln Arg Trp Glu  
165 170 175

aca ccg tta att ttg cag aat cat gag caa ata cag agc cct tgg tct  
576

Thr Pro Leu Ile Leu Gln Asn His Glu Gln Ile Gln Ser Pro Trp Ser  
180 185 190

cag atg ttg ttt ggt cag ttt gct aat att gat caa gca cgt tgg gtc  
624

Gln Met Leu Phe Gly Gln Phe Ala Asn Ile Asp Gln Ala Arg Trp Val  
195 200 205

ttc aca aat agt ttt tac aag ctc gag gaa gag gta ata gag tgg acg  
672

Phe Thr Asn Ser Phe Tyr Lys Leu Glu Glu Glu Val Ile Glu Trp Thr  
210 215 220

aga aag ata tgg aac ttg aag gta atc ggg cca aca ctt cca tcc atg  
720

Arg Lys Ile Trp Asn Leu Lys Val Ile Gly Pro Thr Leu Pro Ser Met  
225 230 235 240

tac ctt gac aaa cga ctt gat gat gat aaa gat aac gga ttt aat ctc  
768

Tyr Leu Asp Lys Arg Leu Asp Asp Asp Lys Asp Asn Gly Phe Asn Leu  
245 250 255

tac aaa gca aac cat cat gag tgc atg aac tgg tta gac gat aag cca  
816

Tyr Lys Ala Asn His His Glu Cys Met Asn Trp Leu Asp Asp Lys Pro  
260 265 270

aag gaa tca gtt gtt tac gta gca ttt ggt agc ctg gtg aaa cat gga  
864

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

ccc gaa caa gtg gaa gaa atc aca cgg gct tta ata gat agt gat gtc  
912

Pro Glu Gln Val Glu Glu Ile Thr Arg Ala Leu Ile Asp Ser Asp Val  
290 295 300

aac ttc ttg tgg gtt atc aaa cat aaa gaa gag gga aag ctc cca gaa  
960

Asn Phe Leu Trp Val Ile Lys His Lys Glu Glu Gly Lys Leu Pro Glu  
305 310 315 320

aat ctt tcg gaa gta ata aaa acc gga aag ggt ttg att gta gca tgg  
1008

Asn Leu Ser Glu Val Ile Lys Thr Gly Lys Gly Leu Ile Val Ala Trp  
325 330 335

tgc aaa caa ttg gat gtg tta gca cac gaa tca gta gga tgc ttt gtt  
1056

Cys Lys Gln Leu Asp Val Leu Ala His Glu Ser Val Gly Cys Phe Val  
340 345 350

aca cat tgt ggg ttc aac tca act ctt gaa gca ata agt ctt gga gtc  
1104

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

ccc gtt gtt gca atg cct caa ttt tcg gat caa act aca aat gcc aag  
1152

Pro Val Val Ala Met Pro Gln Phe Ser Asp Gln Thr Thr Asn Ala Lys  
370 375 380

ctt cta gat gaa att ttg ggt gtt gga gtt aga gtt aag gct gat gag  
1200

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

aat ggg ata gtg aga aga gga aat ctt gcg tca tgt att aag atg att  
1248

Asn Gly Ile Val Arg Arg Gly Asn Leu Ala Ser Cys Ile Lys Met Ile  
405 410 415

atg gag gag gaa aga gga gta ata atc cga aag aat gcg gta aaa tgg  
1296

Met Glu Glu Glu Arg Gly Val Ile Ile Arg Lys Asn Ala Val Lys Trp  
420 425 430

aag gat ttg gct aaa gta gcc gtt cat gaa ggt ggt agc tca gac aat  
1344

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

gat att gtc gaa ttt gta agt gag cta att aag gct taa  
1383

Asp Ile Val Glu Phe Val Ser Glu Leu Ile Lys Ala  
 450 455 460

<210> 4  
 <211> 460  
 <212> PRT  
 <213> Stevia rebaudiana

<400> 4

Met Ala Glu Gln Gln Lys Ile Lys Lys Ser Pro His Val Leu Leu Ile  
 1 5 10 15

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

Arg Leu Ile Ser Lys Gly Val Lys Thr Thr Leu Val Thr Thr Ile His  
 35 40 45

Thr Leu Asn Ser Thr Leu Asn His Ser Asn Thr Thr Thr Ser Ile  
 50 55 60

Glu Ile Gln Ala Ile Ser Asp Gly Cys Asp Glu Gly Gly Phe Met Ser  
 65 70 75 80

Ala Gly Glu Ser Tyr Leu Glu Thr Phe Lys Gln Val Gly Ser Lys Ser  
 85 90 95

Leu Ala Asp Leu Ile Lys Lys Leu Gln Ser Glu Gly Thr Thr Ile Asp  
 100 105 110

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

Glu Phe Gly Ile Asp Gly Gly Ser Phe Phe Thr Gln Ala Cys Val Val  
 130 135 140

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

Gly Glu Thr Val Ser Val Pro Gly Phe Pro Glu Leu Gln Arg Trp Glu

11/37

370                                      375                                      380  
 Leu Leu Asp Glu Ile Leu Gly Val Gly Val Arg Val Lys Ala Asp Glu  
 385                                      390                                      395                                      400  
  
 Asn Gly Ile Val Arg Arg Gly Asn Leu Ala Ser Cys Ile Lys Met Ile  
                                     405                                      410                                      415  
  
 Met Glu Glu Glu Arg Gly Val Ile Ile Arg Lys Asn Ala Val Lys Trp  
                                     420                                      425                                      430  
  
 Lys Asp Leu Ala Lys Val Ala Val His Glu Gly Gly Ser Ser Asp Asn  
                                     435                                      440                                      445  
  
 Asp Ile Val Glu Phe Val Ser Glu Leu Ile Lys Ala  
                                     450                                      455                                      460  
  
 <210> 5  
 <211> 1458  
 <212> DNA  
 <213> Stevia rebaudiana  
  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1458)  
  
 <400> 5  
 atg tac aac gtt act tat cat caa aat tca aaa gca atg gct acc agt  
 48  
 Met Tyr Asn Val Thr Tyr His Gln Asn Ser Lys Ala Met Ala Thr Ser  
 1                                      5                                      10                                      15  
  
 gac tcc ata gtt gac gac cgt aag cag ctt cat gtt gcg acg ttc cca  
 96  
 Asp Ser Ile Val Asp Asp Arg Lys Gln Leu His Val Ala Thr Phe Pro  
                                     20                                      25                                      30  
  
 tgg ctt gct ttc ggt cac atc ctc cct tac ctt cag ctt tcg aaa ttg  
 144  
 Trp Leu Ala Phe Gly His Ile Leu Pro Tyr Leu Gln Leu Ser Lys Leu  
                                     35                                      40                                      45  
  
 ata gct gaa aag ggt cac aaa gtc tcg ttt ctt tct acc acc aga aac  
 192  
 Ile Ala Glu Lys Gly His Lys Val Ser Phe Leu Ser Thr Thr Arg Asn

```

50                               55                               60
att caa cgt ctc tct tct cat atc tcg cca ctc ata aat gtt gtt caa
240
Ile Gln Arg Leu Ser Ser His Ile Ser Pro Leu Ile Asn Val Val Gln
65                               70                               75                               80

ctc aca ctt cca cgt gtc caa gag ctg ccg gag gat gca gag gcg acc
288
Leu Thr Leu Pro Arg Val Gln Glu Leu Pro Glu Asp Ala Glu Ala Thr
85                               90                               95

act gac gtc cac cct gaa gat att cca tat ctc aag aag gct tct gat
336
Thr Asp Val His Pro Glu Asp Ile Pro Tyr Leu Lys Lys Ala Ser Asp
100                               105                               110

ggg ctt caa ccg gag gtc acc cgg ttt cta gaa caa cac tct ccg gac
384
Gly Leu Gln Pro Glu Val Thr Arg Phe Leu Glu Gln His Ser Pro Asp
115                               120                               125

tgg att att tat gat tat act cac tac tgg ttg cca tcc atc gcg gct
432
Trp Ile Ile Tyr Asp Tyr Thr His Tyr Trp Leu Pro Ser Ile Ala Ala
130                               135                               140

agc ctc ggt atc tca cga gcc cac ttc tcc gtc acc act cca tgg gcc
480
Ser Leu Gly Ile Ser Arg Ala His Phe Ser Val Thr Thr Pro Trp Ala
145                               150                               155                               160

att gct tat atg gga ccc tca gct gac gcc atg ata aat ggt tca gat
528
Ile Ala Tyr Met Gly Pro Ser Ala Asp Ala Met Ile Asn Gly Ser Asp
165                               170                               175

ggg cga acc acg gtt gag gat ctc acg aca ccg ccc aag tgg ttt ccc
576
Gly Arg Thr Thr Val Glu Asp Leu Thr Thr Pro Pro Lys Trp Phe Pro
180                               185                               190

ttt ccg acc aaa gta tgc tgg cgg aag cat gat ctt gcc cga ctg gtg
624
Phe Pro Thr Lys Val Cys Trp Arg Lys His Asp Leu Ala Arg Leu Val
195                               200                               205

cct tac aaa gct ccg ggg ata tct gat gga tac cgt atg ggg ctg gtt
672
Pro Tyr Lys Ala Pro Gly Ile Ser Asp Gly Tyr Arg Met Gly Leu Val
210                               215                               220

```

ctt aag gga tct gat tgt ttg ctt tcc aaa tgt tac cat gag ttt gga  
 720  
 Leu Lys Gly Ser Asp Cys Leu Leu Ser Lys Cys Tyr His Glu Phe Gly  
 225 230 235 240

act caa tgg cta cct ctt ttg gag aca cta cac caa gta ccg gtg gtt  
 768  
 Thr Gln Trp Leu Pro Leu Leu Glu Thr Leu His Gln Val Pro Val Val  
 245 250 255

ccg gtg gga tta ctg cca ccg gaa ata ccc gga gac gag aaa gat gaa  
 816  
 Pro Val Gly Leu Leu Pro Pro Glu Ile Pro Gly Asp Glu Lys Asp Glu  
 260 265 270

aca tgg gtg tca atc aag aaa tgg ctc gat ggt aaa caa aaa ggc agt  
 864  
 Thr Trp Val Ser Ile Lys Lys Trp Leu Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ser  
 275 280 285

gtg gtg tac gtt gca tta gga agc gag gtt ttg gtg agc caa acc gag  
 912  
 Val Val Tyr Val Ala Leu Gly Ser Glu Val Leu Val Ser Gln Thr Glu  
 290 295 300

gtt gtt gag tta gca ttg ggt ctc gag ctt tct ggg ttg cca ttt gtt  
 960  
 Val Val Glu Leu Ala Leu Gly Leu Glu Leu Ser Gly Leu Pro Phe Val  
 305 310 315 320

tgg gct tat aga aaa cca aaa ggt ccc gcg aag tca gac tcg gtg gag  
 1008  
 Trp Ala Tyr Arg Lys Pro Lys Gly Pro Ala Lys Ser Asp Ser Val Glu  
 325 330 335

ttg cca gac ggg ttc gtg gaa cga act cgt gac cgt ggg ttg gtc tgg  
 1056  
 Leu Pro Asp Gly Phe Val Glu Arg Thr Arg Asp Arg Gly Leu Val Trp  
 340 345 350

acg agt tgg gca cct cag tta cga ata ctg agc cat gag tcg gtt tgt  
 1104  
 Thr Ser Trp Ala Pro Gln Leu Arg Ile Leu Ser His Glu Ser Val Cys  
 355 360 365

ggt ttc ttg act cat tgt ggt tct gga tca att gtg gaa ggg cta atg  
 1152  
 Gly Phe Leu Thr His Cys Gly Ser Gly Ser Ile Val Glu Gly Leu Met  
 370 375 380

ttt ggt cac cct cta atc atg cta ccg att ttt ggg gac caa cct ctg  
 1200

Phe Gly His Pro Leu Ile Met Leu Pro Ile Phe Gly Asp Gln Pro Leu  
385 390 395 400

aat gct cga tta ctg gag gac aaa cag gtg gga atc gag ata cca aga  
1248

Asn Ala Arg Leu Leu Glu Asp Lys Gln Val Gly Ile Glu Ile Pro Arg  
405 410 415

aat gag gaa gat ggt tgc ttg acc aag gag tcg gtt gct aga tca ctg  
1296

Asn Glu Glu Asp Gly Cys Leu Thr Lys Glu Ser Val Ala Arg Ser Leu  
420 425 430

agg tcc gtt gtt gtg gaa aaa gaa ggg gag atc tac aag gcg aac gcg  
1344

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

agg gag ctg agt aaa atc tat aac gac act aag gtt gaa aaa gaa tat  
1392

Arg Glu Leu Ser Lys Ile Tyr Asn Asp Thr Lys Val Glu Lys Glu Tyr  
450 455 460

gta agc caa ttc gta gac tat ttg gaa aag aat gcg cgt gcg gtt gcc  
1440

Val Ser Gln Phe Val Asp Tyr Leu Glu Lys Asn Ala Arg Ala Val Ala  
465 470 475 480

atc gat cat gag agt taa  
1458

Ile Asp His Glu Ser  
485

<210> 6

<211> 485

<212> PRT

<213> Stevia rebaudiana

<400> 6

Met Tyr Asn Val Thr Tyr His Gln Asn Ser Lys Ala Met Ala Thr Ser  
1 5 10 15

Asp Ser Ile Val Asp Asp Arg Lys Gln Leu His Val Ala Thr Phe Pro  
20 25 30

Trp Leu Ala Phe Gly His Ile Leu Pro Tyr Leu Gln Leu Ser Lys Leu  
35 40 45

Ile Ala Glu Lys Gly His Lys Val Ser Phe Leu Ser Thr Thr Arg Asn  
50 55 60

Ile Gln Arg Leu Ser Ser His Ile Ser Pro Leu Ile Asn Val Val Gln  
65 70 75 80

Leu Thr Leu Pro Arg Val Gln Glu Leu Pro Glu Asp Ala Glu Ala Thr  
85 90 95

Thr Asp Val His Pro Glu Asp Ile Pro Tyr Leu Lys Lys Ala Ser Asp  
100 105 110

Gly Leu Gln Pro Glu Val Thr Arg Phe Leu Glu Gln His Ser Pro Asp  
115 120 125

Trp Ile Ile Tyr Asp Tyr Thr His Tyr Trp Leu Pro Ser Ile Ala Ala  
130 135 140

Ser Leu Gly Ile Ser Arg Ala His Phe Ser Val Thr Thr Pro Trp Ala  
145 150 155 160

Ile Ala Tyr Met Gly Pro Ser Ala Asp Ala Met Ile Asn Gly Ser Asp  
165 170 175

Gly Arg Thr Thr Val Glu Asp Leu Thr Thr Pro Pro Lys Trp Phe Pro  
180 185 190

Phe Pro Thr Lys Val Cys Trp Arg Lys His Asp Leu Ala Arg Leu Val  
195 200 205

Pro Tyr Lys Ala Pro Gly Ile Ser Asp Gly Tyr Arg Met Gly Leu Val  
210 215 220

Leu Lys Gly Ser Asp Cys Leu Leu Ser Lys Cys Tyr His Glu Phe Gly  
225 230 235 240

Thr Gln Trp Leu Pro Leu Leu Glu Thr Leu His Gln Val Pro Val Val  
245 250 255

Pro Val Gly Leu Leu Pro Pro Glu Ile Pro Gly Asp Glu Lys Asp Glu  
260 265 270

Thr Trp Val Ser Ile Lys Lys Trp Leu Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ser  
275 280 285

Val Val Tyr Val Ala Leu Gly Ser Glu Val Leu Val Ser Gln Thr Glu  
290 295 300

Val Val Glu Leu Ala Leu Gly Leu Glu Leu Ser Gly Leu Pro Phe Val  
305 310 315 320

Trp Ala Tyr Arg Lys Pro Lys Gly Pro Ala Lys Ser Asp Ser Val Glu  
325 330 335

Leu Pro Asp Gly Phe Val Glu Arg Thr Arg Asp Arg Gly Leu Val Trp  
340 345 350

Thr Ser Trp Ala Pro Gln Leu Arg Ile Leu Ser His Glu Ser Val Cys  
355 360 365

Gly Phe Leu Thr His Cys Gly Ser Gly Ser Ile Val Glu Gly Leu Met  
370 375 380

Phe Gly His Pro Leu Ile Met Leu Pro Ile Phe Gly Asp Gln Pro Leu  
385 390 395 400

Asn Ala Arg Leu Leu Glu Asp Lys Gln Val Gly Ile Glu Ile Pro Arg  
405 410 415

Asn Glu Glu Asp Gly Cys Leu Thr Lys Glu Ser Val Ala Arg Ser Leu  
420 425 430

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

Arg Glu Leu Ser Lys Ile Tyr Asn Asp Thr Lys Val Glu Lys Glu Tyr  
450 455 460

Val Ser Gln Phe Val Asp Tyr Leu Glu Lys Asn Ala Arg Ala Val Ala  
 465 470 475 480

Ile Asp His Glu Ser  
 485

<210> 7  
 <211> 1377  
 <212> DNA  
 <213> Stevia rebaudiana

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(1377)

<400> 7  
 atg gaa aat aaa acg gag acc acc gtt cgc cgg cgc cgg aga ata ata  
 48  
 Met Glu Asn Lys Thr Glu Thr Thr Val Arg Arg Arg Arg Arg Ile Ile  
 1 5 10 15

tta ttc ccg gta cca ttt caa ggc cac att aac cca att ctt cag cta  
 96  
 Leu Phe Pro Val Pro Phe Gln Gly His Ile Asn Pro Ile Leu Gln Leu  
 20 25 30

gcc aat gtg ttg tac tct aaa gga ttc agt atc acc atc ttt cac acc  
 144  
 Ala Asn Val Leu Tyr Ser Lys Gly Phe Ser Ile Thr Ile Phe His Thr  
 35 40 45

aac ttc aac aaa ccc aaa aca tct aat tac cct cac ttc act ttc aga  
 192  
 Asn Phe Asn Lys Pro Lys Thr Ser Asn Tyr Pro His Phe Thr Phe Arg  
 50 55 60

ttc atc ctc gac aac gac cca caa gac gaa cgc att tcc aat cta ccg  
 240  
 Phe Ile Leu Asp Asn Asp Pro Gln Asp Glu Arg Ile Ser Asn Leu Pro  
 65 70 75 80

act cat ggt ccg ctc gct ggt atg cgg att ccg att atc aac gaa cac  
 288  
 Thr His Gly Pro Leu Ala Gly Met Arg Ile Pro Ile Ile Asn Glu His  
 85 90 95

gga gct gac gaa tta cga cgc gaa ctg gaa ctg ttg atg tta gct tct  
 336

Gly Ala Asp Glu Leu Arg Arg Glu Leu Glu Leu Leu Met Leu Ala Ser  
 100 105 110  
 gaa gaa gat gaa gag gta tcg tgt tta atc acg gat gct ctt tgg tac  
 384  
 Glu Glu Asp Glu Glu Val Ser Cys Leu Ile Thr Asp Ala Leu Trp Tyr  
 115 120 125  
 ttc gcg caa tct gtt gct gac agt ctt aac ctc cga ccg ctt gtt ttg  
 432  
 Phe Ala Gln Ser Val Ala Asp Ser Leu Asn Leu Arg Pro Leu Val Leu  
 130 135 140  
 atg aca agc agc ttg ttt aat ttt cat gca cat gtt tca ctt cct cag  
 480  
 Met Thr Ser Ser Leu Phe Asn Phe His Ala His Val Ser Leu Pro Gln  
 145 150 155 160  
 ttt gat gag ctt ggt tac ctc gat cct gat gac aaa acc cgt ttg gaa  
 528  
 Phe Asp Glu Leu Gly Tyr Leu Asp Pro Asp Asp Lys Thr Arg Leu Glu  
 165 170 175  
 gaa caa gcg agt ggg ttt cct atg cta aaa gtg aaa gac atc aag tct  
 576  
 Glu Gln Ala Ser Gly Phe Pro Met Leu Lys Val Lys Asp Ile Lys Ser  
 180 185 190  
 gcg tat tcg aac tgg caa ata ctc aaa gag ata tta ggg aag atg ata  
 624  
 Ala Tyr Ser Asn Trp Gln Ile Leu Lys Glu Ile Leu Gly Lys Met Ile  
 195 200 205  
 aaa caa aca aaa gca tct tca gga gtc atc tgg aac tca ttt aag gaa  
 672  
 Lys Gln Thr Lys Ala Ser Ser Gly Val Ile Trp Asn Ser Phe Lys Glu  
 210 215 220  
 ctc gaa gag tct gag ctc gaa act gtt atc cgt gag atc ccg gct cca  
 720  
 Leu Glu Glu Ser Glu Leu Glu Thr Val Ile Arg Glu Ile Pro Ala Pro  
 225 230 235 240  
 agt ttc ttg ata cca ctc ccc aag cat ttg aca gcc tct tcc agc agc  
 768  
 Ser Phe Leu Ile Pro Leu Pro Lys His Leu Thr Ala Ser Ser Ser Ser  
 245 250 255  
 tta cta gac cac gat cga acc gtt ttt caa tgg tta gac caa caa ccg  
 816  
 Leu Leu Asp His Asp Arg Thr Val Phe Gln Trp Leu Asp Gln Gln Pro  
 260 265 270

cca agt tcg gta ctg tat gtt agt ttt ggt agt act agt gaa gtg gat  
864

Pro Ser Ser Val Leu Tyr Val Ser Phe Gly Ser Thr Ser Glu Val Asp  
275 280 285

gag aaa gat ttc ttg gaa ata gct cgt ggg ttg gtt gat agc aag cag  
912

Glu Lys Asp Phe Leu Glu Ile Ala Arg Gly Leu Val Asp Ser Lys Gln  
290 295 300

tcg ttt tta tgg gtg gtt cga cct ggg ttt gtc aag ggt tcg acg tgg  
960

Ser Phe Leu Trp Val Val Arg Pro Gly Phe Val Lys Gly Ser Thr Trp  
305 310 315 320

gtc gaa ccg ttg cca gat ggg ttc ttg ggt gaa aga gga cgt att gtg  
1008

Val Glu Pro Leu Pro Asp Gly Phe Leu Gly Glu Arg Gly Arg Ile Val  
325 330 335

aaa tgg gtt cca cag caa gaa gtg cta gct cat gga gca ata ggc gca  
1056

Lys Trp Val Pro Gln Gln Glu Val Leu Ala His Gly Ala Ile Gly Ala  
340 345 350

ttc tgg act cat agc gga tgg aac tct acg ttg gaa agc gtt tgt gaa  
1104

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

ggt gtt cct atg att ttc tcg gat ttt ggg ctc gat caa ccg ttg aat  
1152

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

gct aga tac atg agt gat gtt ttg aag gta ggg gtg tat ttg gaa aat  
1200

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

ggg tgg gaa aga gga gag ata gca aat gca ata aga aga gtt atg gtg  
1248

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

gat gaa gaa gga gaa tac att aga cag aat gca aga gtt ttg aaa caa  
1296

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

aag gca gat gtt tct ttg atg aag ggt ggt tcg tct tac gaa tca tta  
1344

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

gag tct cta gtt tct tac att tca tcg ttg taa  
1377

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

<210> 8

<211> 458

<212> PRT

<213> Stevia rebaudiana

<400> 8

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 Pro Leu Val Leu  
130 135 140

Met Thr Ser Ser Leu Phe Asn Phe His Ala His Val Ser Leu Pro Gln  
 145 150 155 160

Phe Asp Glu Leu Gly Tyr Leu Asp Pro Asp Asp Lys Thr Arg Leu Glu  
 165 170 175

Glu Gln Ala Ser Gly Phe Pro Met Leu Lys Val Lys Asp Ile Lys Ser  
 180 185 190

Ala Tyr Ser Asn Trp Gln Ile Leu Lys Glu Ile Leu Gly Lys Met Ile  
 195 200 205

Lys Gln Thr Lys Ala Ser Ser Gly Val Ile Trp Asn Ser Phe Lys Glu  
 210 215 220

Leu Glu Glu Ser Glu Leu Glu Thr Val Ile Arg Glu Ile Pro Ala Pro  
 225 230 235 240

Ser Phe Leu Ile Pro Leu Pro Lys His Leu Thr Ala Ser Ser Ser Ser  
 245 250 255

Leu Leu Asp His Asp Arg Thr Val Phe Gln Trp Leu Asp Gln Gln Pro  
 260 265 270

Pro Ser Ser Val Leu Tyr Val Ser Phe Gly Ser Thr Ser Glu Val Asp  
 275 280 285

Glu Lys Asp Phe Leu Glu Ile Ala Arg Gly Leu Val Asp Ser Lys Gln  
 290 295 300

Ser Phe Leu Trp Val Val Arg Pro Gly Phe Val Lys Gly Ser Thr Trp  
 305 310 315 320

Val Glu Pro Leu Pro Asp Gly Phe Leu Gly Glu Arg Gly Arg Ile Val  
 325 330 335

Lys Trp Val Pro Gln Gln Glu Val Leu Ala His Gly Ala Ile Gly Ala  
 340 345 350

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9  
 <211> 2004  
 <212> DNA  
 <213> Arabidopsis thaliana

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(2004)

<400> 9  
 atg gat gat act acg tat aag cca aag aac att ctc att act gga gct  
 48

Met Asp Asp Thr Thr Tyr Lys Pro Lys Asn Ile Leu Ile Thr Gly Ala  
 1 5 10 15

gct gga ttt att gct tct cat gtt gcc aac aga tta atc cgt aac tat  
 96

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

cct gat tac aag atc gtt gtt ctt gac aag ctt gat tac tgt tca gat  
144

Pro Asp Tyr Lys Ile Val Val Leu Asp Lys Leu Asp Tyr Cys Ser Asp  
35 40 45

ctg aag aat ctt gat cct tct ttt tct tca cca aat ttc aag ttt gtc  
192

Leu Lys Asn Leu Asp Pro Ser Phe Ser Ser Pro Asn Phe Lys Phe Val  
50 55 60

aaa gga gat atc gcg agt gat gat ctc gtt aac tac ctt ctc atc act  
240

Lys Gly Asp Ile Ala Ser Asp Asp Leu Val Asn Tyr Leu Leu Ile Thr  
65 70 75 80

gaa aac att gat acg ata atg cat ttt gct gct caa act cat gtt gat  
288

Glu Asn Ile Asp Thr Ile Met His Phe Ala Ala Gln Thr His Val Asp  
85 90 95

aac tct ttt ggt aat agc ttt gag ttt acc aag aac aat att tat ggt  
336

Asn Ser Phe Gly Asn Ser Phe Glu Phe Thr Lys Asn Asn Ile Tyr Gly  
100 105 110

act cat gtt ctt ttg gaa gcc tgt aaa gtt aca gga cag atc agg agg  
384

Thr His Val Leu Leu Glu Ala Cys Lys Val Thr Gly Gln Ile Arg Arg  
115 120 125

ttt atc cat gtg agt acc gat gaa gtc tat gga gaa acc gat gag gat  
432

Phe Ile His Val Ser Thr Asp Glu Val Tyr Gly Glu Thr Asp Glu Asp  
130 135 140

gct gct gta gga aac cat gaa gct tct cag ctg tta ccg acg aat cct  
480

Ala Ala Val Gly Asn His Glu Ala Ser Gln Leu Leu Pro Thr Asn Pro  
145 150 155 160

tac tct gca act aag gct ggt gct gag atg ctt gtg atg gct tat ggt  
528

Tyr Ser Ala Thr Lys Ala Gly Ala Glu Met Leu Val Met Ala Tyr Gly  
165 170 175

aga tca tat gga ttg cct gtt att acg act cgc ggg aac aat gtt tat  
576

Arg Ser Tyr Gly Leu Pro Val Ile Thr Thr Arg Gly Asn Asn Val Tyr  
180 185 190

ggg cct aac cag ttt cct gaa aaa atg att cct aag ttc atc ttg ttg  
624

Gly Pro Asn Gln Phe Pro Glu Lys Met Ile Pro Lys Phe Ile Leu Leu  
 195 200 205  
 gct atg agt ggg aag ccg ctt ccc atc cat gga gat gga tct aat gtc  
 672  
 Ala Met Ser Gly Lys Pro Leu Pro Ile His Gly Asp Gly Ser Asn Val  
 210 215 220  
 cgg agt tac ttg tac tgc gaa gac gtt gct gag gct ttt gag gtt gtt  
 720  
 Arg Ser Tyr Leu Tyr Cys Glu Asp Val Ala Glu Ala Phe Glu Val Val  
 225 230 235 240  
 ctt cac aaa gga gaa atc ggt cat gtc tac aat gtc ggc aca aaa aga  
 768  
 Leu His Lys Gly Glu Ile Gly His Val Tyr Asn Val Gly Thr Lys Arg  
 245 250 255  
 gaa agg aga gtg atc gat gtg gct aga gac atc tgc aaa ctt ttc ggg  
 816  
 Glu Arg Arg Val Ile Asp Val Ala Arg Asp Ile Cys Lys Leu Phe Gly  
 260 265 270  
 aaa gac cct gag tca agc att cag ttt gtg gag aac cgg ccc ttt aat  
 864  
 Lys Asp Pro Glu Ser Ser Ile Gln Phe Val Glu Asn Arg Pro Phe Asn  
 275 280 285  
 gat caa agg tac ttc ctt gat gat cag aag ctg aag aaa ttg ggg tgg  
 912  
 Asp Gln Arg Tyr Phe Leu Asp Asp Gln Lys Leu Lys Lys Leu Gly Trp  
 290 295 300  
 caa gag cga aca aat tgg gaa gat gga ttg aag aag aca atg gac tgg  
 960  
 Gln Glu Arg Thr Asn Trp Glu Asp Gly Leu Lys Lys Thr Met Asp Trp  
 305 310 315 320  
 tac act cag aat cct gag tgg tgg ggt gat gtt tct gga gct ttg ctt  
 1008  
 Tyr Thr Gln Asn Pro Glu Trp Trp Gly Asp Val Ser Gly Ala Leu Leu  
 325 330 335  
 cct cat ccg aga atg ctt atg atg ccc ggt gga aga ctt tct gat gga  
 1056  
 Pro His Pro Arg Met Leu Met Met Pro Gly Gly Arg Leu Ser Asp Gly  
 340 345 350  
 tct agt gag aag aaa gac gtt tca agc aac acg gtc cag aca ttt acg  
 1104  
 Ser Ser Glu Lys Lys Asp Val Ser Ser Asn Thr Val Gln Thr Phe Thr  
 355 360 365

ggt gta aca cct aag aat ggt gat tct ggt gac aaa gct tcg ttg aag  
1152

Val Val Thr Pro Lys Asn Gly Asp Ser Gly Asp Lys Ala Ser Leu Lys  
370 375 380

ttt ttg atc tat ggt aag act ggt tgg ctt ggt ggt ctt cta ggg aaa  
1200

Phe Leu Ile Tyr Gly Lys Thr Gly Trp Leu Gly Gly Leu Leu Gly Lys  
385 390 395 400

cta tgt gag aag caa ggg att aca tat gag tat ggg aaa gga cgt ctg  
1248

Leu Cys Glu Lys Gln Gly Ile Thr Tyr Glu Tyr Gly Lys Gly Arg Leu  
405 410 415

gag gat aga gct tct ctt gtg gcg gat att cgt agc atc aaa cct act  
1296

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

cat gtg ttt aat gct gct ggt tta act ggc aga ccc aac gtt gac tgg  
1344

His Val Phe Asn Ala Ala Gly Leu Thr Gly Arg Pro Asn Val Asp Trp  
435 440 445

tgt gaa tct cac aaa cca gag acc att cgt gta aat gtc gca ggt act  
1392

Cys Glu Ser His Lys Pro Glu Thr Ile Arg Val Asn Val Ala Gly Thr  
450 455 460

ttg act cta gct gat gtt tgc aga gag aat gat ctc ttg atg atg aac  
1440

Leu Thr Leu Ala Asp Val Cys Arg Glu Asn Asp Leu Leu Met Met Asn  
465 470 475 480

ttc gcc acc ggt tgc atc ttt gag tat gac gct aca cat cct gag ggt  
1488

Phe Ala Thr Gly Cys Ile Phe Glu Tyr Asp Ala Thr His Pro Glu Gly  
485 490 495

tcg ggt ata ggt ttc aag gaa gaa gac aag cca aat ttc ttt ggt tct  
1536

Ser Gly Ile Gly Phe Lys Glu Glu Asp Lys Pro Asn Phe Phe Gly Ser  
500 505 510

ttc tac tcg aaa acc aaa gcc atg gtt gag gag ctc ttg aga gaa ttt  
1584

Phe Tyr Ser Lys Thr Lys Ala Met Val Glu Glu Leu Leu Arg Glu Phe  
515 520 525

gac aat gta tgt acc ttg aga gtc cgg atg cca atc tcc tca gac cta  
1632

Asp Asn Val Cys Thr Leu Arg Val Arg Met Pro Ile Ser Ser Asp Leu  
530 535 540

aac aac ccg aga aac ttc atc acg aag atc tcg cgc tac aac aaa gtg  
1680

Asn Asn Pro Arg Asn Phe Ile Thr Lys Ile Ser Arg Tyr Asn Lys Val  
545 550 555 560

gtg gac atc ccg aac agc atg acc gta cta gac gag ctt ctc cca atc  
1728

Val Asp Ile Pro Asn Ser Met Thr Val Leu Asp Glu Leu Leu Pro Ile  
565 570 575

tct atc gag atg gcg aag aga aac cta aga ggc ata tgg aat ttc acc  
1776

Ser Ile Glu Met Ala Lys Arg Asn Leu Arg Gly Ile Trp Asn Phe Thr  
580 585 590

aac cca ggg gtg gtg agc cac aac gag ata ttg gag atg tac aag aat  
1824

Asn Pro Gly Val Val Ser His Asn Glu Ile Leu Glu Met Tyr Lys Asn  
595 600 605

tac atc gag cca ggt ttt aaa tgg tcc aac ttc aca gtg gaa gaa caa  
1872

Tyr Ile Glu Pro Gly Phe Lys Trp Ser Asn Phe Thr Val Glu Glu Gln  
610 615 620

gca aag gtc att gtt gct gct cga agc aac aac gaa atg gat gga tct  
1920

Ala Lys Val Ile Val Ala Ala Arg Ser Asn Asn Glu Met Asp Gly Ser  
625 630 635 640

aaa cta agc aag gag ttc cca gag atg ctc tcc atc aaa gag tca ctg  
1968

Lys Leu Ser Lys Glu Phe Pro Glu Met Leu Ser Ile Lys Glu Ser Leu  
645 650 655

ctc aaa tac gtc ttt gaa cca aac aag aga acc taa  
2004

Leu Lys Tyr Val Phe Glu Pro Asn Lys Arg Thr  
660 665

<210> 10

<211> 667

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 10

Met Asp Asp Thr Thr Tyr Lys Pro Lys Asn Ile Leu Ile Thr Gly Ala  
1 5 10 15

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

Pro Asp Tyr Lys Ile Val Val Leu Asp Lys Leu Asp Tyr Cys Ser Asp  
35 40 45

Leu Lys Asn Leu Asp Pro Ser Phe Ser Ser Pro Asn Phe Lys Phe Val  
50 55 60

Lys Gly Asp Ile Ala Ser Asp Asp Leu Val Asn Tyr Leu Leu Ile Thr  
65 70 75 80

Glu Asn Ile Asp Thr Ile Met His Phe Ala Ala Gln Thr His Val Asp  
85 90 95

Asn Ser Phe Gly Asn Ser Phe Glu Phe Thr Lys Asn Asn Ile Tyr Gly  
100 105 110

Thr His Val Leu Leu Glu Ala Cys Lys Val Thr Gly Gln Ile Arg Arg  
115 120 125

Phe Ile His Val Ser Thr Asp Glu Val Tyr Gly Glu Thr Asp Glu Asp  
130 135 140

Ala Ala Val Gly Asn His Glu Ala Ser Gln Leu Leu Pro Thr Asn Pro  
145 150 155 160

Tyr Ser Ala Thr Lys Ala Gly Ala Glu Met Leu Val Met Ala Tyr Gly  
165 170 175

Arg Ser Tyr Gly Leu Pro Val Ile Thr Thr Arg Gly Asn Asn Val Tyr  
180 185 190

Gly Pro Asn Gln Phe Pro Glu Lys Met Ile Pro Lys Phe Ile Leu Leu  
195 200 205

Ala Met Ser Gly Lys Pro Leu Pro Ile His Gly Asp Gly Ser Asn Val  
 210 215 220

Arg Ser Tyr Leu Tyr Cys Glu Asp Val Ala Glu Ala Phe Glu Val Val  
 225 230 235 240

Leu His Lys Gly Glu Ile Gly His Val Tyr Asn Val Gly Thr Lys Arg  
 245 250 255

Glu Arg Arg Val Ile Asp Val Ala Arg Asp Ile Cys Lys Leu Phe Gly  
 260 265 270

Lys Asp Pro Glu Ser Ser Ile Gln Phe Val Glu Asn Arg Pro Phe Asn  
 275 280 285

Asp Gln Arg Tyr Phe Leu Asp Asp Gln Lys Leu Lys Lys Leu Gly Trp  
 290 295 300

Gln Glu Arg Thr Asn Trp Glu Asp Gly Leu Lys Lys Thr Met Asp Trp  
 305 310 315 320

Tyr Thr Gln Asn Pro Glu Trp Trp Gly Asp Val Ser Gly Ala Leu Leu  
 325 330 335

Pro His Pro Arg Met Leu Met Met Pro Gly Gly Arg Leu Ser Asp Gly  
 340 345 350

Ser Ser Glu Lys Lys Asp Val Ser Ser Asn Thr Val Gln Thr Phe Thr  
 355 360 365

Val Val Thr Pro Lys Asn Gly Asp Ser Gly Asp Lys Ala Ser Leu Lys  
 370 375 380

Phe Leu Ile Tyr Gly Lys Thr Gly Trp Leu Gly Gly Leu Leu Gly Lys  
 385 390 395 400

Leu Cys Glu Lys Gln Gly Ile Thr Tyr Glu Tyr Gly Lys Gly Arg Leu  
 405 410 415

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

His Val Phe Asn Ala Ala Gly Leu Thr Gly Arg Pro Asn Val Asp Trp  
 435 440 445

Cys Glu Ser His Lys Pro Glu Thr Ile Arg Val Asn Val Ala Gly Thr  
 450 455 460

Leu Thr Leu Ala Asp Val Cys Arg Glu Asn Asp Leu Leu Met Met Asn  
 465 470 475 480

Phe Ala Thr Gly Cys Ile Phe Glu Tyr Asp Ala Thr His Pro Glu Gly  
 485 490 495

Ser Gly Ile Gly Phe Lys Glu Glu Asp Lys Pro Asn Phe Phe Gly Ser  
 500 505 510

Phe Tyr Ser Lys Thr Lys Ala Met Val Glu Glu Leu Leu Arg Glu Phe  
 515 520 525

Asp Asn Val Cys Thr Leu Arg Val Arg Met Pro Ile Ser Ser Asp Leu  
 530 535 540

Asn Asn Pro Arg Asn Phe Ile Thr Lys Ile Ser Arg Tyr Asn Lys Val  
 545 550 555 560

Val Asp Ile Pro Asn Ser Met Thr Val Leu Asp Glu Leu Leu Pro Ile  
 565 570 575

Ser Ile Glu Met Ala Lys Arg Asn Leu Arg Gly Ile Trp Asn Phe Thr  
 580 585 590

Asn Pro Gly Val Val Ser His Asn Glu Ile Leu Glu Met Tyr Lys Asn  
 595 600 605

Tyr Ile Glu Pro Gly Phe Lys Trp Ser Asn Phe Thr Val Glu Glu Gln  
 610 615 620

Ala Lys Val Ile Val Ala Ala Arg Ser Asn Asn Glu Met Asp Gly Ser  
625 630 635 640

Lys Leu Ser Lys Glu Phe Pro Glu Met Leu Ser Ile Lys Glu Ser Leu  
645 650 655

Leu Lys Tyr Val Phe Glu Pro Asn Lys Arg Thr  
660 665

<210> 11  
<211> 60  
<212> DNA  
<213> Stevia rebaudiana

<400> 11  
gagtaaaatc tataacgaca ctaaggtgga aaaagaatat gtaagccaat tcgtagactt  
60

<210> 12  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Nhân tạo

<220>  
<223> Axit nucleic nhân tạo

<400> 12  
cacccatatg gatgcaatgg ctacaactga gaa  
33

<210> 13  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Nhân tạo

<220>  
<223> Axit nucleic nhân tạo

<400> 13  
agatctctag tttcttgcta gcacggtgat tt  
32

<210> 14  
<211> 35  
<212> DNA

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic nhân tạo

<400> 14

cacccatatg gcggaacaac aaaagatcaa gaaat  
35

<210> 15

<211> 35

<212> DNA

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic nhân tạo

<400> 15

ggatccttaa gccttaatta gctcacttac aaatt  
35

<210> 16

<211> 29

<212> DNA

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic nhân tạo

<400> 16

cacccatatg gaaaataaaa cggagacca  
29

<210> 17

<211> 32

<212> DNA

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic nhân tạo

<400> 17

ggatccttac aacgatgaaa tgtaagaaac ta  
32

<210> 18

<211> 33

<212> DNA

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic nhân tạo

<400> 18

acagatctat ggatgcaatg gctacaactg aga  
33

<210> 19

<211> 34

<212> DNA

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic nhân tạo

<400> 19

tagtcgacta gtttcttgct agcacggtga tttc  
34

<210> 20

<211> 42

<212> DNA

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic nhân tạo

<400> 20

aagcggccgc atgtacaacg ttacttatca tcaaaattca aa  
42

<210> 21

<211> 31

<212> DNA

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic nhân tạo

<400> 21

cgttaattaa ctctcatgat cgatggcaac c  
31

<210> 22

<211> 34

<212> DNA

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic nhân tạo

<400> 22

aagcggccgc atggcggaac aacaaaagat caag

34

<210> 23

<211> 37

<212> DNA

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic nhân tạo

<400> 23

cgттааттаа gccttaatta gctcacttac aaattcg

37

<210> 24

<211> 33

<212> DNA

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic nhân tạo

<400> 24

aaggatccat ggaaaataaaa acggagacca ccg

33

<210> 25

<211> 44

<212> DNA

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic nhân tạo

<400> 25

gcgtcgactt acaacgatga aatgtaagaa actagagact ctaa

44

<210> 26

<211> 33

<212> DNA

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic nhân tạo

<400> 26

ggatccatgg atgatactac gtataagcca aag  
33

<210> 27

<211> 32

<212> DNA

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic nhân tạo

<400> 27

ctcgagttag gttctcttgt ttgggtcaaa ga  
32

<210> 28

<211> 22

<212> DNA

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic nhân tạo

<400> 28

caagtcccca accaaattcc gt  
22

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic nhân tạo

<400> 29

cacgaacccg tctggcaact c  
21

<210> 30

<211> 25

<212> DNA

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic nhân tạo

<400> 30

cccgtgtgat ttcttccact tgttc  
25

<210> 31

<211> 21

<212> DNA

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic nhân tạo

<400> 31

caagaaccca tctggcaacg g  
21

<210> 32

<211> 23

<212> DNA

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic nhân tạo

<400> 32

gctttgtcac cagaatcacc att  
23

<210> 33

<211> 28

<212> DNA

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic nhân tạo

<400> 33

gattattaaa cttctttgcg tccatcca  
28

<210> 34

<211> 32

<212> DNA

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic nhân tạo

<400> 34

cctctatact ttaacgtcaa ggagaaaaaa cc  
32

<210> 35

<211> 39

<212> DNA

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic nhân tạo

<400> 35

tgccgcgcgg cagccatatg tacaacgtta cttatcatc  
39

<210> 36

<211> 39

<212> DNA

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Axit nucleic nhân tạo

<400> 36

gttagcagcc ggatccttaa ctctcatgat cgatggcaa  
39

Fig.1

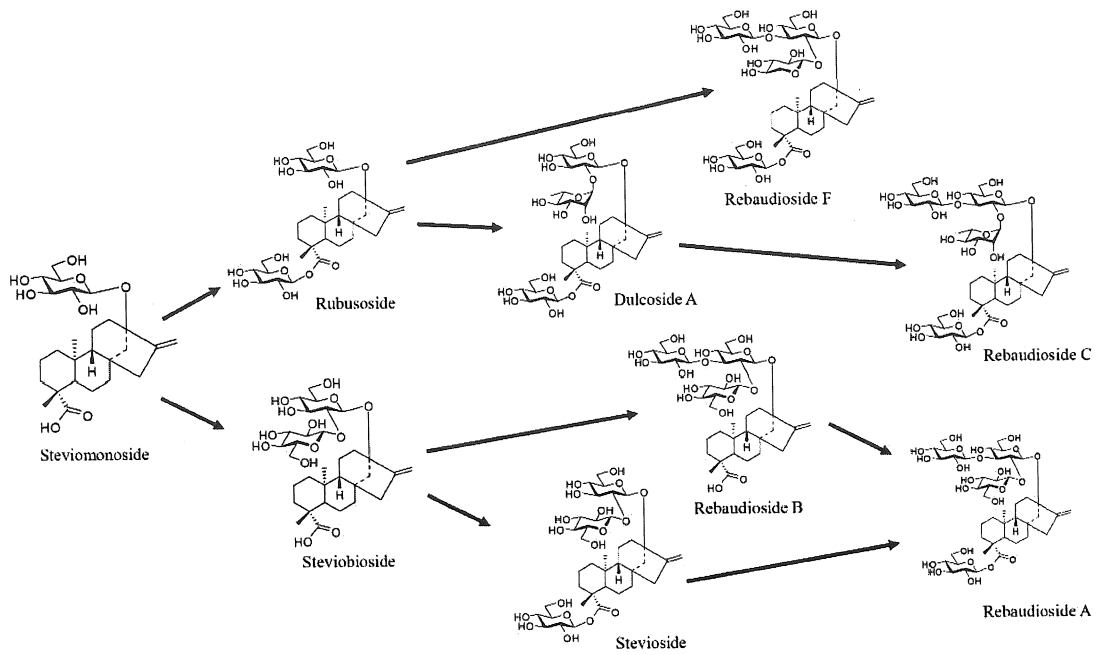
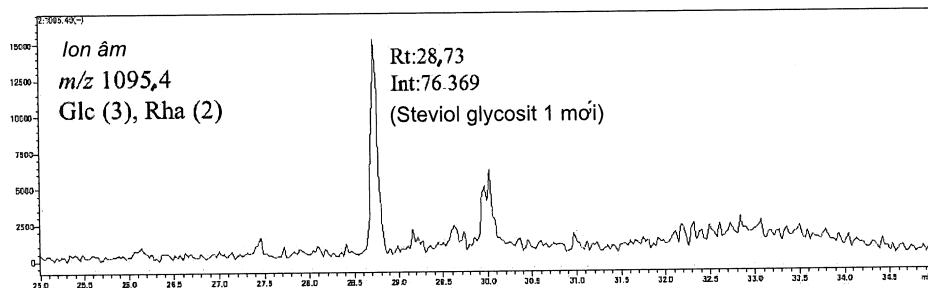
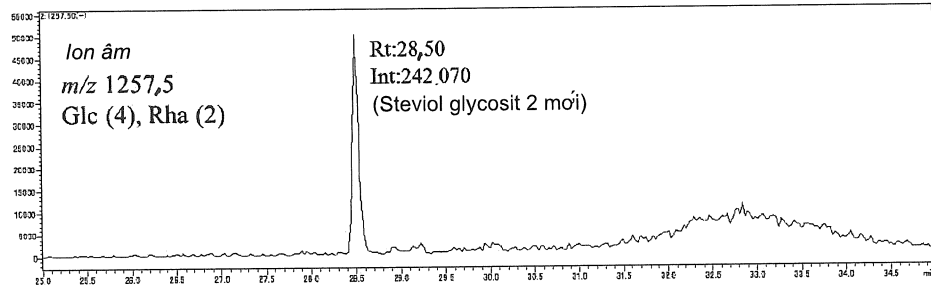


Fig.2



Sắc phổ ion được chọn của cơ thể thực vật stevia mới phát triển từ SIC (Mẫu 1) ở  $m/z$  1095,4

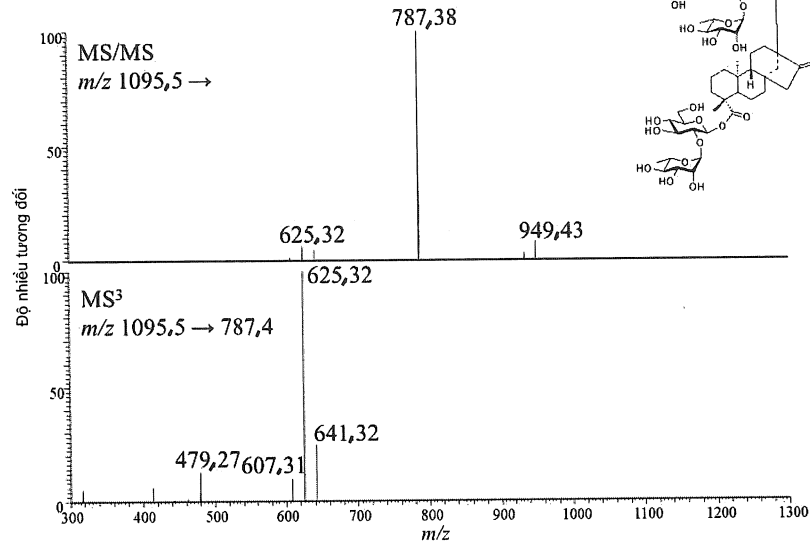
Fig.3



Sắc phổ ion được chọn của cơ thể thực vật stevia mới phát triển từ SIC (Mẫu 1) ở  $m/z$  1257,5

Fig.4

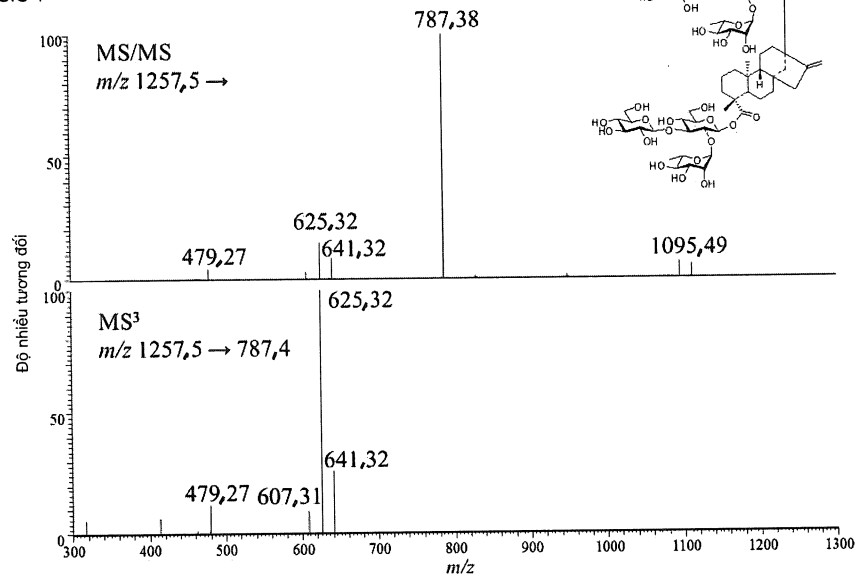
Mẫu lá được phát triển  
từ SIC 1



Khối phổ MS/MS và MS<sup>3</sup> được phân đoạn của steviol glycosit 1 mới (tương ứng với  $m/z$  1095,4, Rt:28,73)

Fig.5

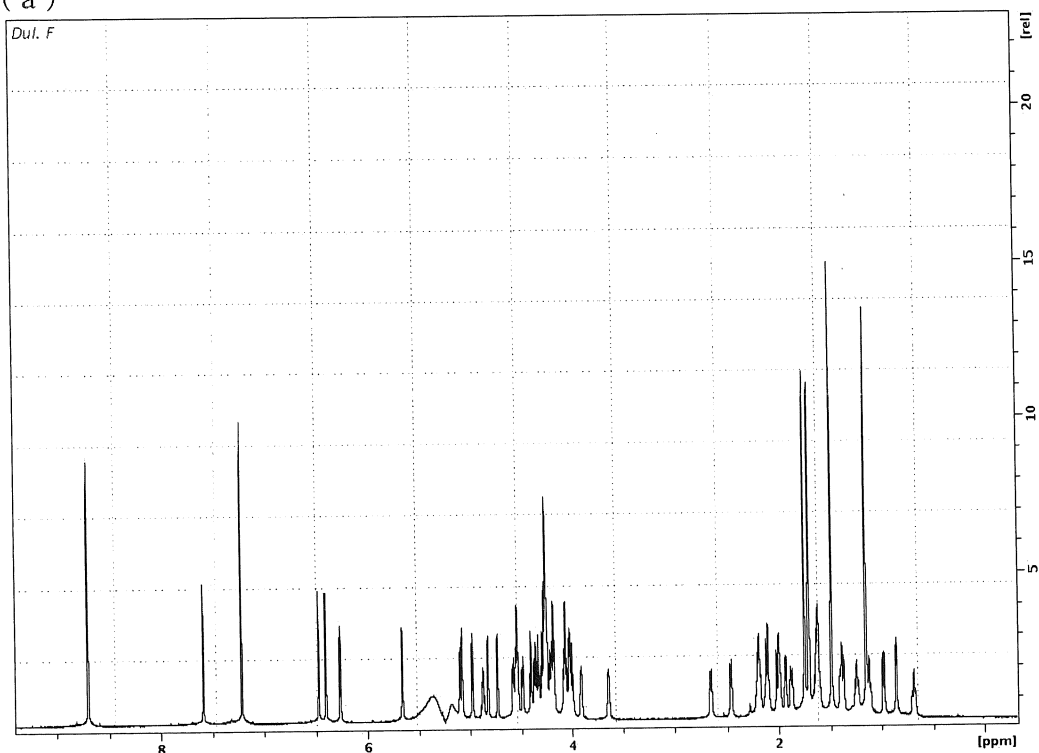
Mẫu lá được phát triển  
từ SIC 1



Khối phổ MS/MS và MS<sup>3</sup> được phân đoạn của steviol glycosit 1 mới (tương ứng với  $m/z$  1257,5, Rt:28,50)

Fig.6

( a )

 $^1\text{H}$ -NMR của hợp chất 15 (800MHz, Pyr-d5)

( b )

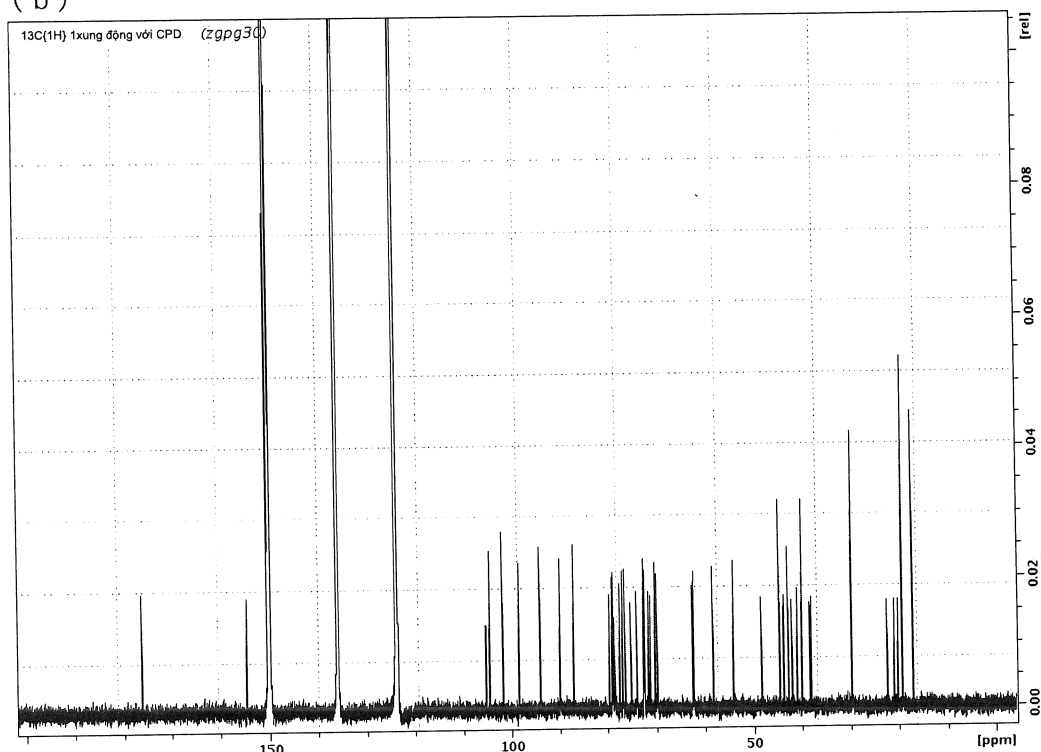
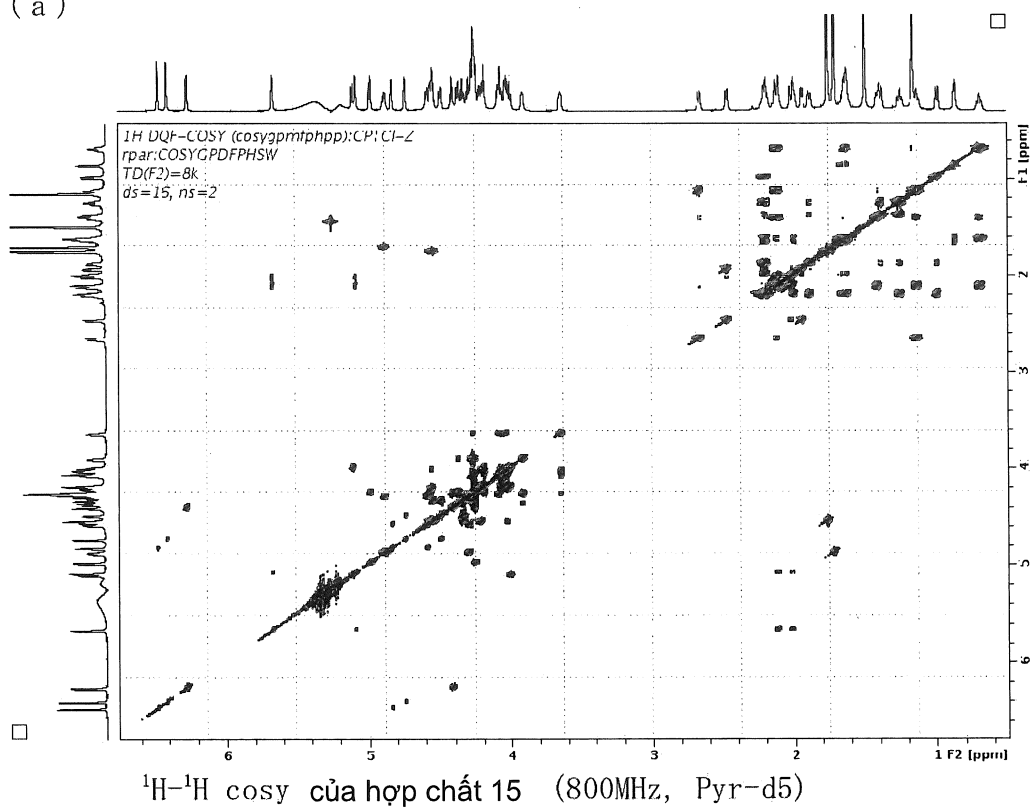
 $^{13}\text{C}$ -NMR của hợp chất 15 (200MHz, Pyr-d5)

Fig.7

(a)



(b)

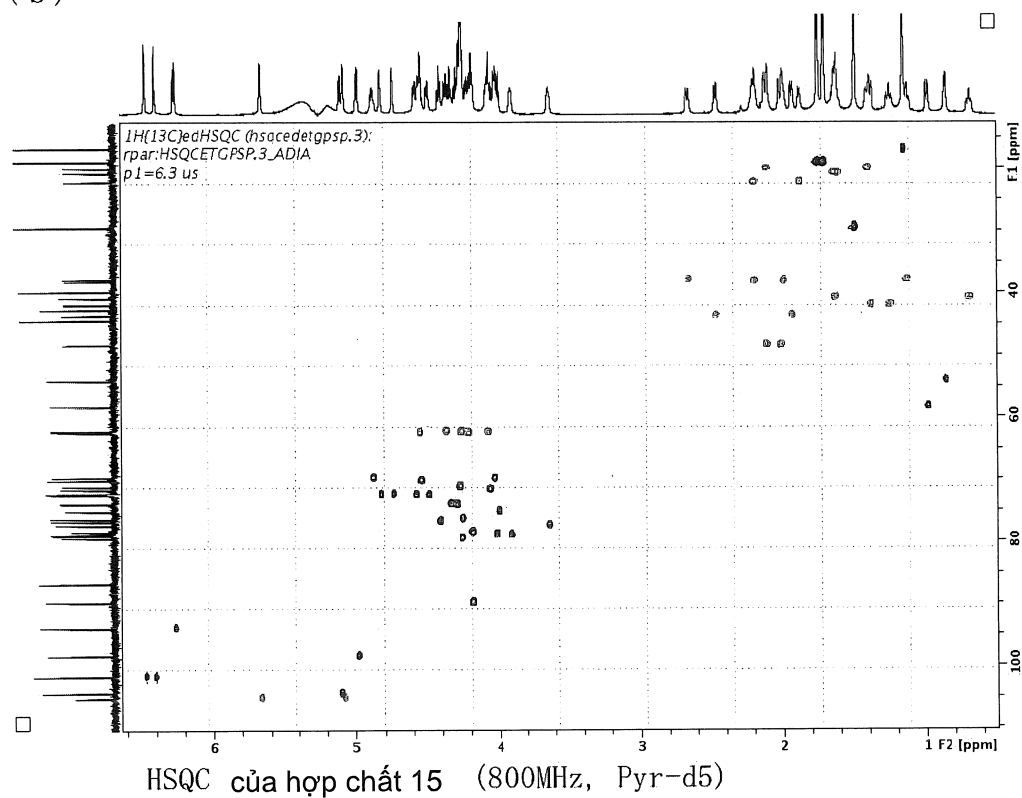


Fig.8

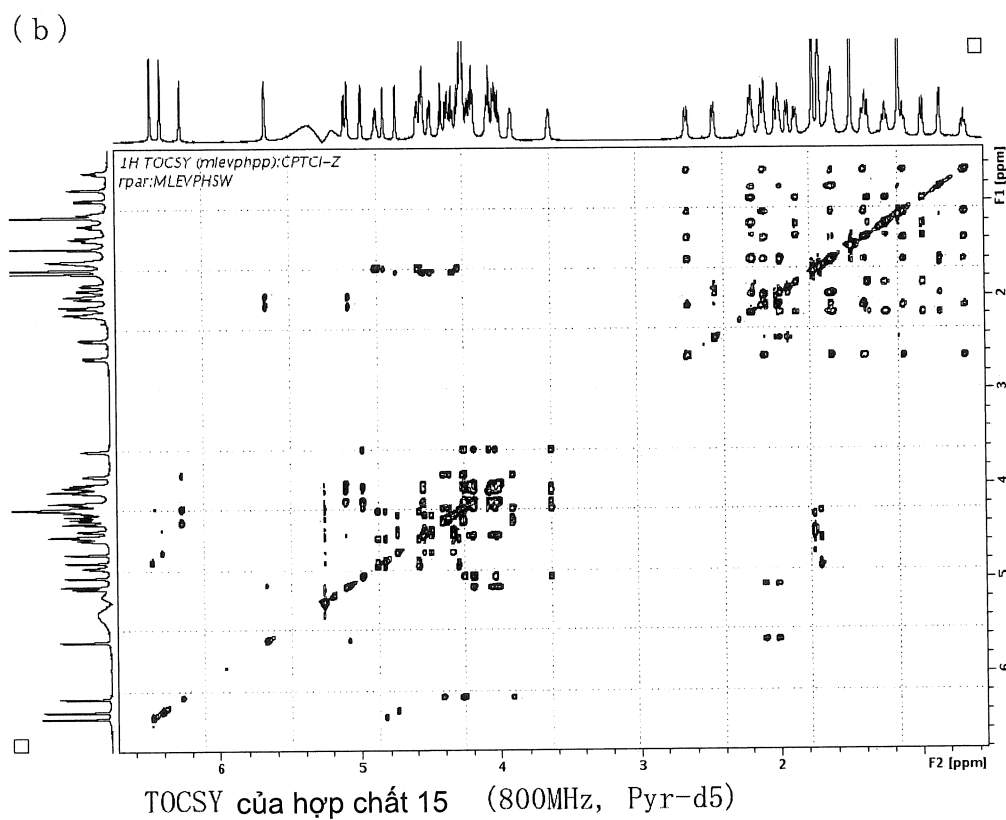
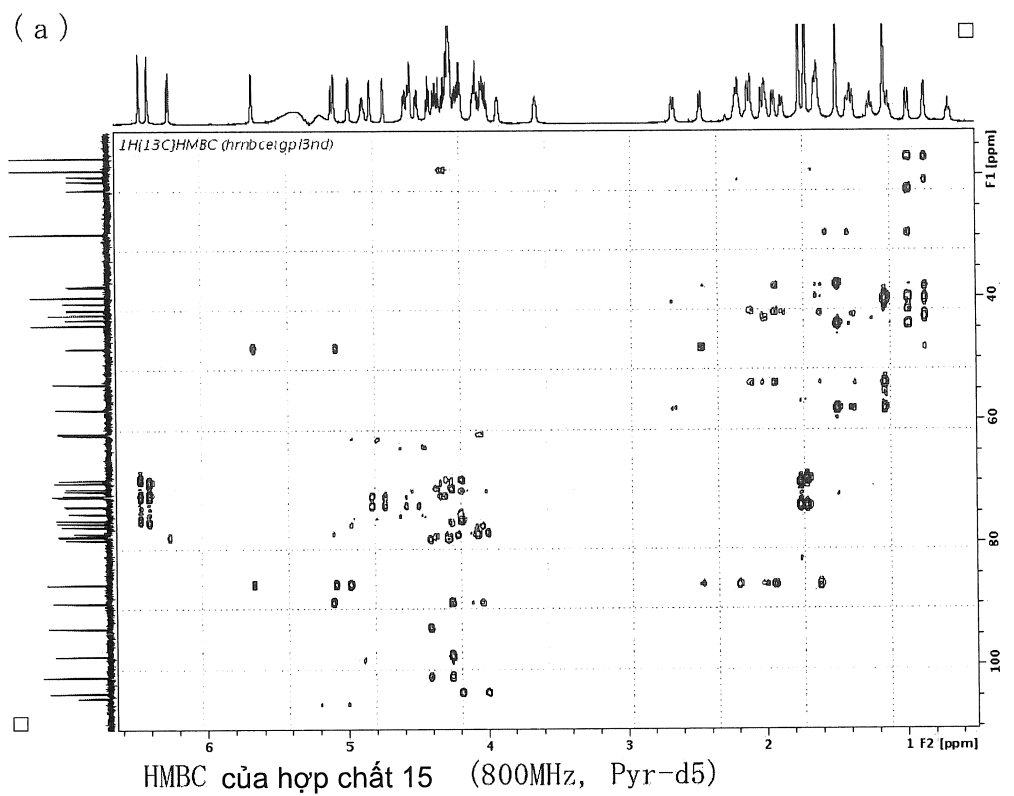


Fig.9

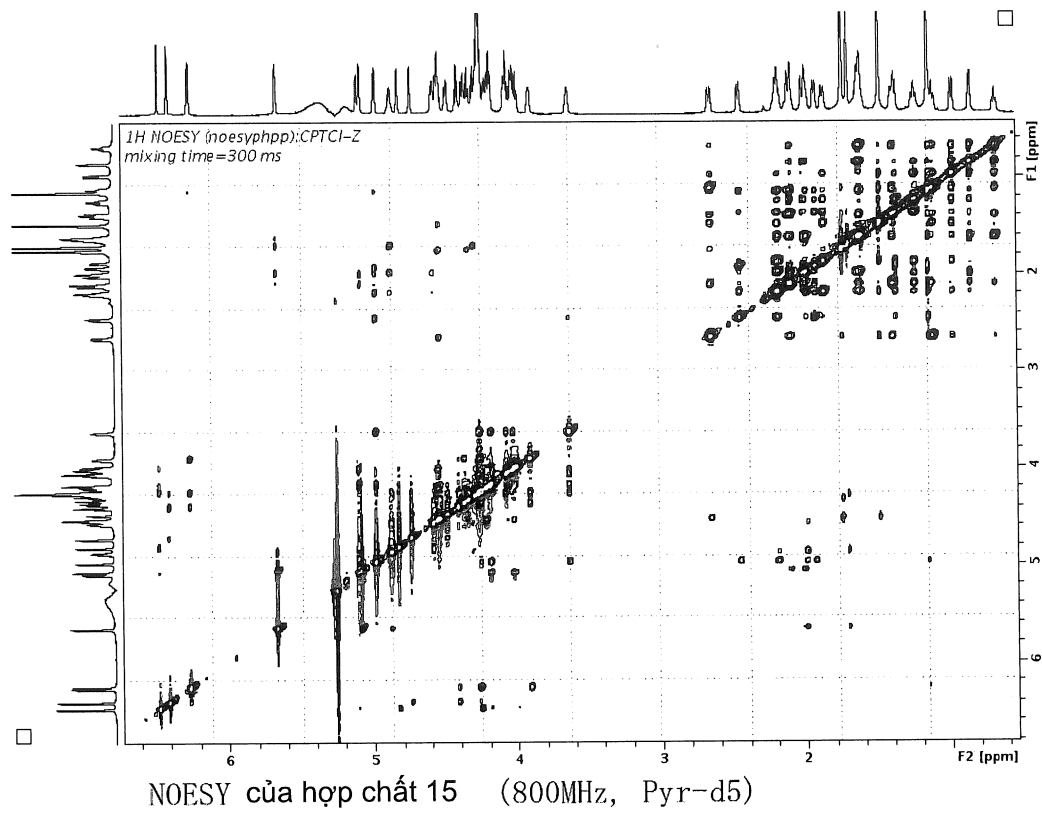
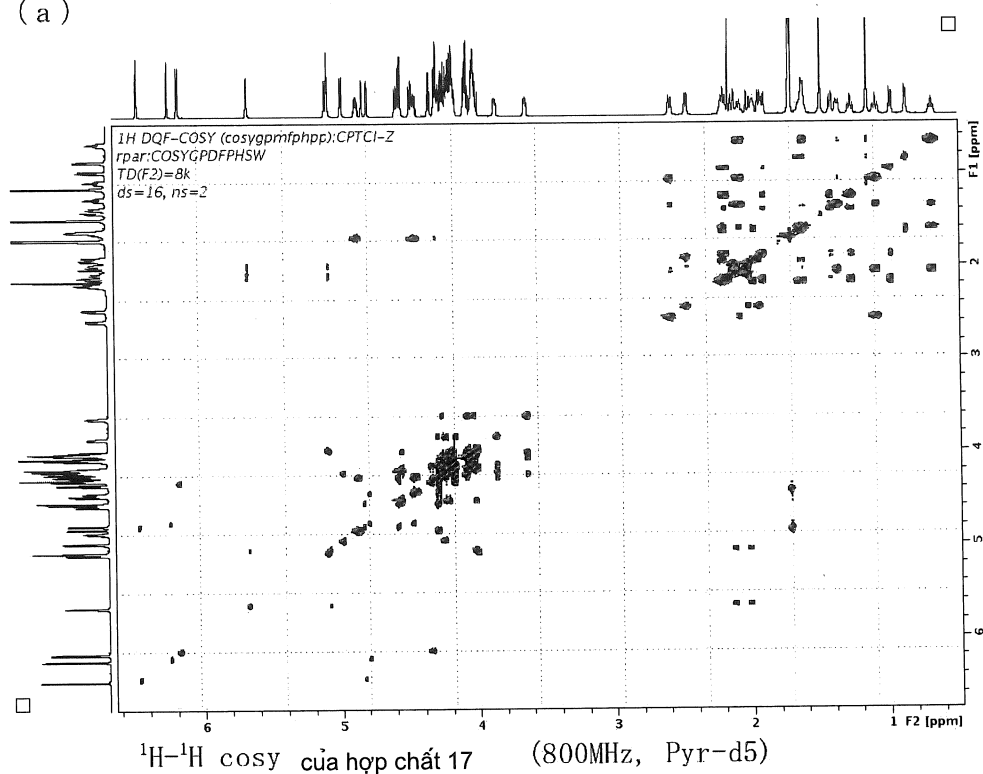




Fig.11

(a)



(b)

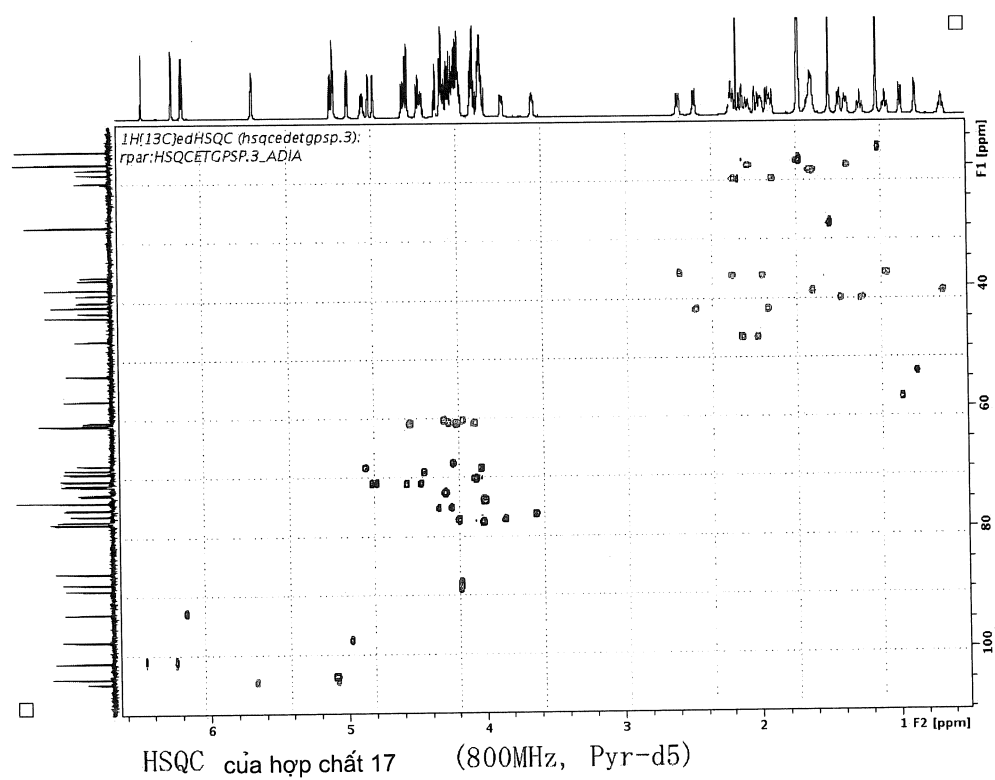
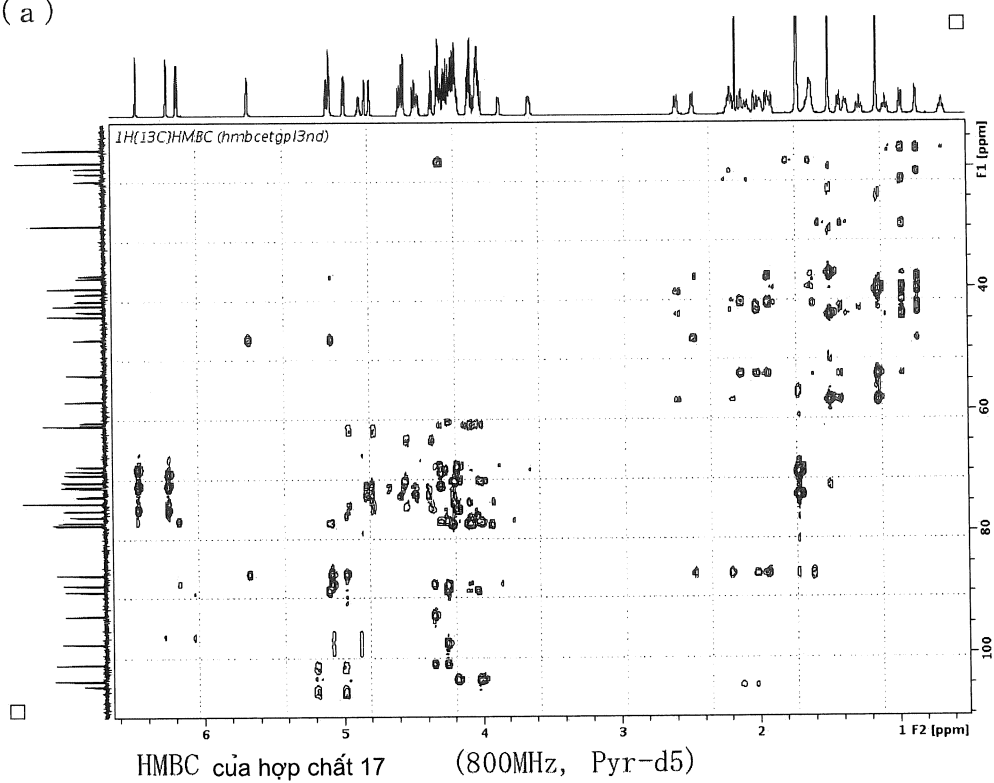


Fig.12

(a)



(b)

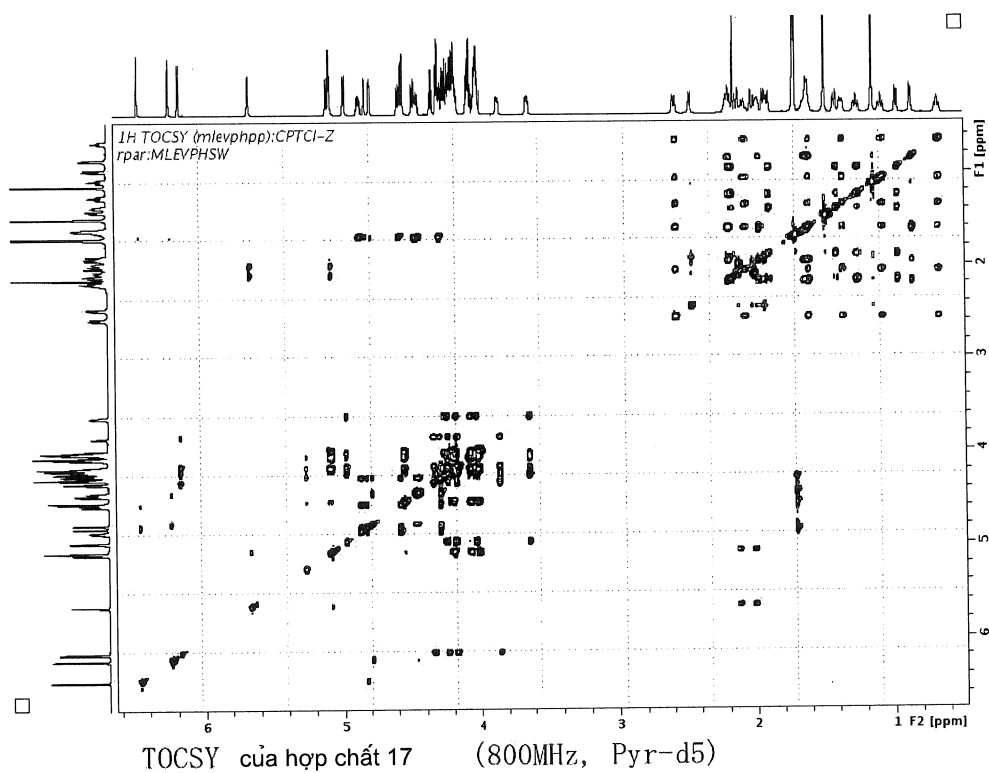


Fig.13

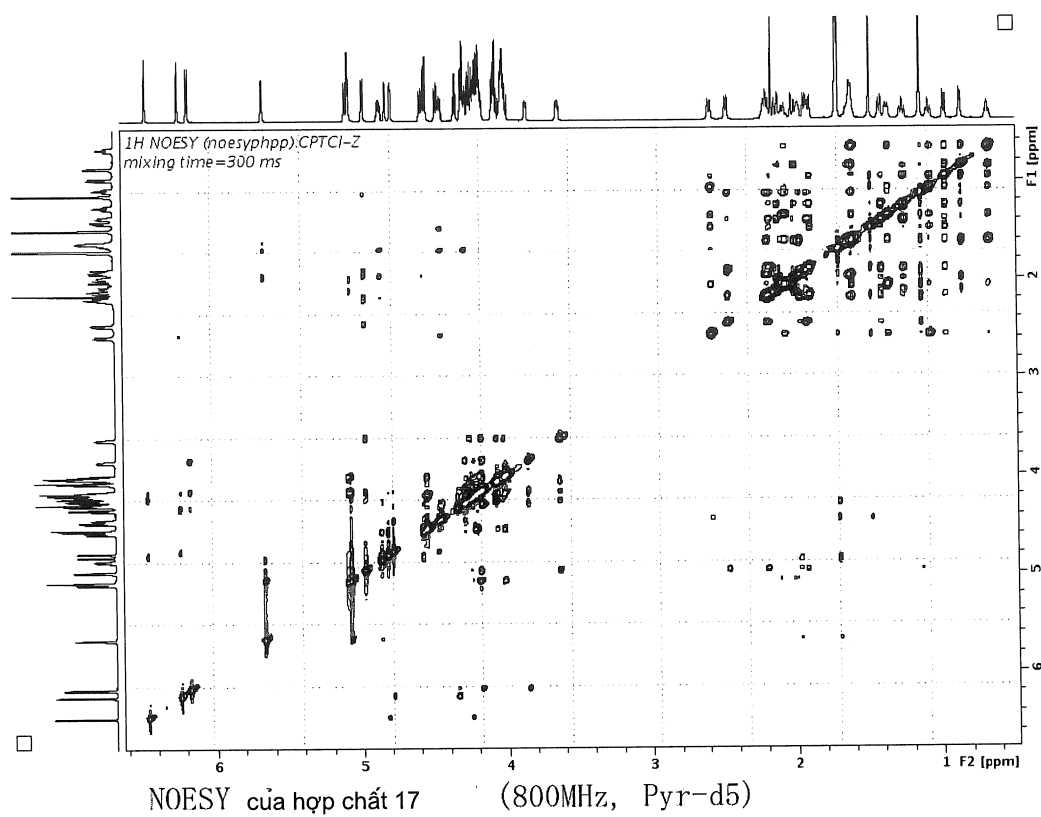
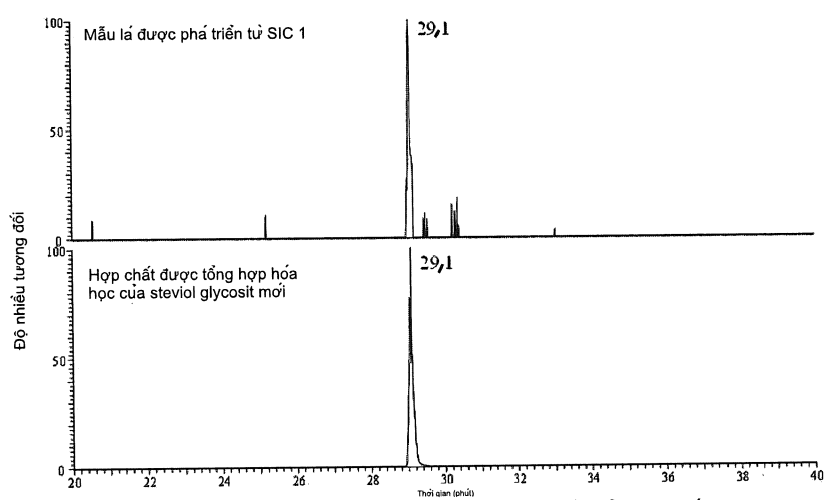
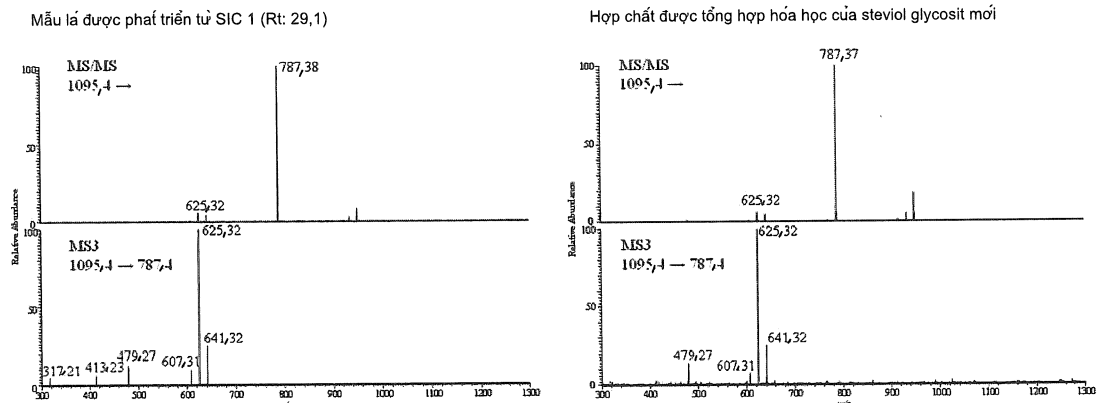


Fig.14



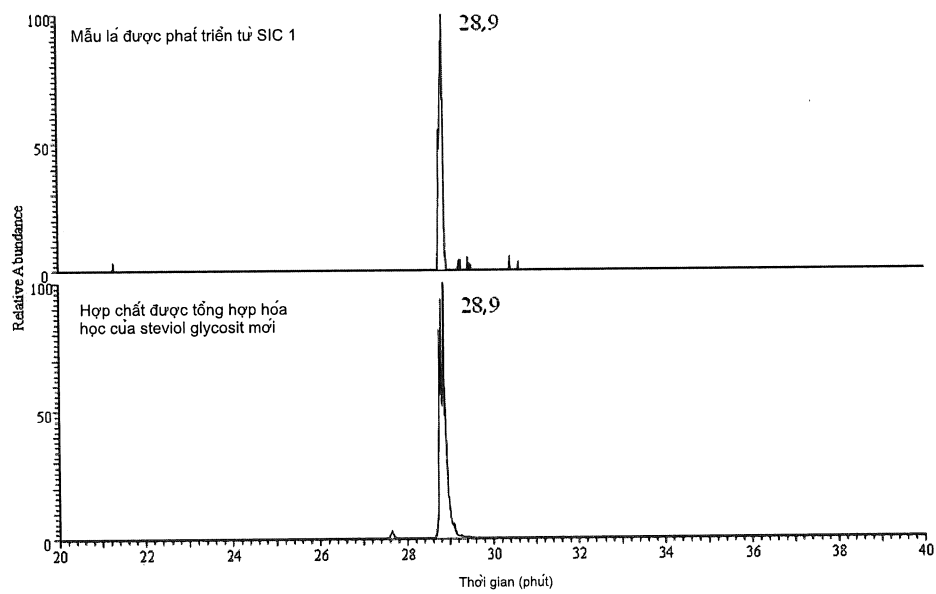
Sắc phổ ion được chiết của steviol glycosit mới 1 (dịch chiết lá stevia) và sản phẩm tổng hợp hóa học dạng  $\beta$  của hợp chất 15)

Fig.15



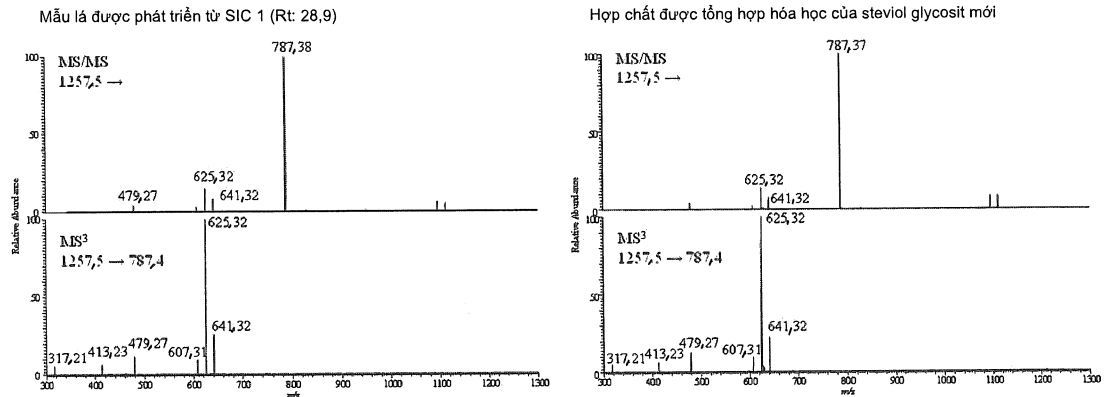
Khối phổ MS/MS và MS<sup>3</sup> được phân đoạn của steviol glycosit 1 mới (dịch chiết lá stevia) và sản phẩm được tổng hợp hóa học (dạng β của hợp chất 15)

Fig.16



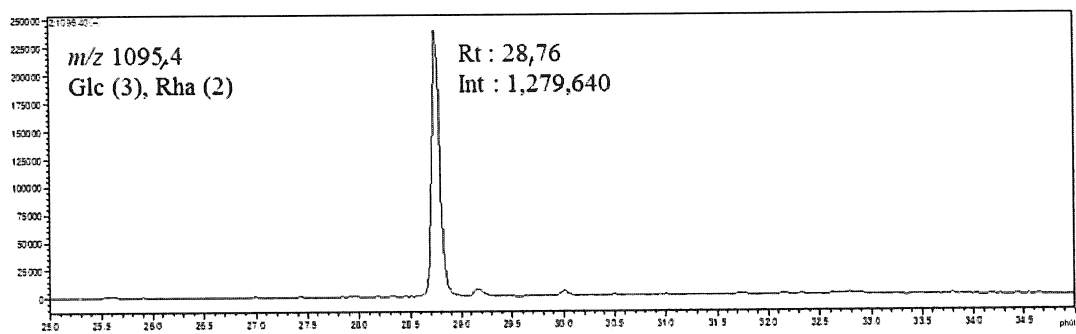
Sắc phổ ion được chiết của steviol glycosit mới 2 (dịch chiết lá stevia) và sản phẩm tổng hợp hóa học (dạng β của hợp chất 17)

Fig.17



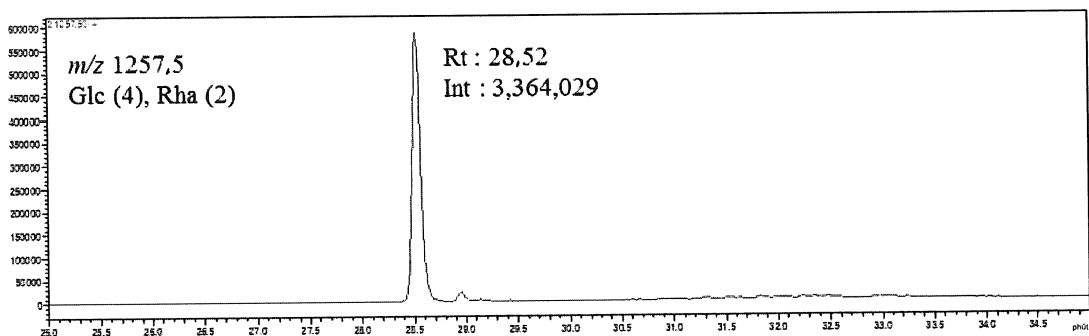
Khối phổ MS/MS và MS<sup>3</sup> được phân đoạn của steviol glycosit 2 mới (dịch chiết lá stevia) và sản phẩm được tổng hợp hóa học (dạng  $\beta$  của hợp chất 17)

Fig.18



Sắc phổ ion được chọn của mẫu tổng hợp sinh học ở  $m/z$  là 1095,4

Fig.19



Sắc phổ ion được chọn của mẫu tổng hợp sinh học ở  $m/z$  là 1257,5

Fig.20

