

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 013 059**

51 Int. Cl.:

C12P 19/56	(2006.01)	C12N 15/81	(2006.01)
C12P 19/44	(2006.01)		
C12P 19/00	(2006.01)		
C12N 15/63	(2006.01)		
C12N 9/10	(2006.01)		
C12N 9/12	(2006.01)		
C12N 9/14	(2006.01)		
C12N 9/90	(2006.01)		
C12N 9/92	(2006.01)		
C12N 15/70	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2019 PCT/US2019/041957**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2020 WO20018506**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2019 E 19837740 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.11.2024 EP 3824093**

54 Título: **Producción de glicósidos de esteviol mediante biotransformación de células enteras**

30 Prioridad:

16.07.2018 US 201862698617 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.04.2025

73 Titular/es:

**MANUS BIO, INC. (100.00%)
43 Foundry Ave No. 230
Waltham, MA 02453, US**

72 Inventor/es:

**KUMARAN, AJIKUMAR, PARAYIL;
SANTOS, CHRISTINE, NICOLE S.;
DONALD, JASON, ERIC;
FOWLER, MARY, ELIZABETH;
PHILIPPE, RYAN, N.;
FREI, CHRISTOPHER, SCOTT y
LOVE, AARON**

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 3 013 059 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Producción de glicósidos de esteviol mediante biotransformación de células enteras

ANTECEDENTES

- 5 Las glicosiltransferasas de moléculas pequeñas están codificadas por una gran familia multigénica en el reino vegetal. Estas enzimas transfieren azúcares de nucleótidos a una amplia gama de metabolitos secundarios, alterando así las propiedades físicas y químicas de la molécula aceptora. Por ejemplo, los glicósidos de esteviol son una clase de compuestos que se encuentran en las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un arbusto perenne de la familia *Asteraceae* (*Compositae*) nativo de ciertas regiones de Sudamérica. Se caracterizan estructuralmente por una base única, el esteviol, que se diferencia por la presencia de residuos de carbohidratos en las posiciones C13 y C19.
- 10 Se acumulan en las hojas de stevia, componiendo aproximadamente del 10% al 20% del peso seco total. En una base de peso seco, los cuatro glicósidos principales que se encuentran en las hojas de *Stevia* típicamente incluyen el esteviósido (9,1%), el rebaudiósido A (3,8%), el rebaudiósido C (0,6-1,0%) y el dulcósido A (0,3%). Otros glicósidos de esteviol están presentes en pequeñas cantidades o en trazas, que incluyen el rebaudiósido B, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M y O, el dulcósido B, el esteviolbiósido y el rubusósido.
- 15 Se estima que el producto de glicosilación menor rebaudiósido M (RebM) es de aproximadamente 200-350 veces más potente que la sacarosa, y se describe como poseedor de un sabor limpio y dulce con un regusto ligeramente amargo o a regaliz. Prakash I. et al., Development of Next Generation Stevia Sweetener: Rebaudioside M, *Foods* 3(1), 162-175 (2014). Aunque RebM es de gran interés para la industria alimentaria mundial, su escasa prevalencia en el extracto de stevia requiere procedimientos innovadores para su síntesis.
- 20 Aún existe la necesidad de procedimientos económicos para producir glicósidos de alto valor que son productos menores del extracto natural de plantas.

El documento KR 2016/0116775 A desvela un microorganismo mutante y un procedimiento para producir esteviósido por el uso del microorganismo mutante. A partir de estas mutaciones se pudo observar un aumento de la producción de esteviósido. La presente invención difiere de este microorganismo mutante en que *ushA*, *galETKM* y *pgi* están suprimidos, inactivados o reducidos en su expresión y en que *pgm* y *galU* están sobreexpresados.

25

Sumario de la invención

La invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

30 La FIG. 1. Estructura de RebM. El andamiaje de esteviol (un diterpenoide) se muestra en un recuadro. El RebM contiene seis glucosilaciones: (1) una O-glicosilación C13, (2) una 1-2' glicosilación C13, (3) una 1-3' glicosilación C13, (4) una O-glicosilación C19, (5) una 1-2' glicosilación C19, y (6) una 1-3' glicosilación C19.

La FIG. 2. Productos de glicosilación producidos por la acción de las enzimas UGT sobre el esteviol y los intermediarios de glicósidos de esteviol.

35 La FIG. 3. Productos glicosilados producidos por la acción de las enzimas UGT sobre intermediarios de glicósido de esteviol que contienen ramnosa.

40 La FIG. 4. Conversión de esteviolbiósido en RebM. Para cinco compuestos principales de la vía RebM, las concentraciones de compuestos se muestran en relación con la concentración total de estos compuestos en una cepa de control que carece de las enzimas UGT. Las cepas se alimentaron con 0,2 mM de esteviolbiósido y se incubaron con sustrato durante 48 horas antes de la extracción. Las cepas 3 y 4 no muestran conversión de esteviolbiósido, mientras que la cepa 5 muestra una conversión sustancial a RebD y RebM.

45 La FIG. 5. Conversión de esteviósido y RebA en RebM. Se muestra la bioconversión de dos productos intermediarios disponibles comercialmente que se encuentran en el extracto de hoja, esteviósido y RebA, en RebM, utilizando las cepas 1 a 5. También se muestra la bioconversión del núcleo de esteviol. Los valores se expresan como porcentaje de la composición total de glicósidos de esteviol. La conversión de esteviol en RebM por todas las cepas muestra que todas las cepas son capaces de formar RebM. Al igual que en el caso del esteviolbiósido, tanto el esteviósido como RebA se convierten en RebM, pero sólo en la cepa 5. Para la conversión a partir de esteviósido y RebA, la relación RebD:RebM favorece fuertemente a RebM (1:20).

50 La FIG. 6. Bioconversión de glicósidos de esteviol en placas de 96 pocillos. Para cinco compuestos principales de la vía RebM, se muestran las concentraciones de compuestos con o sin enzimas UGT expresadas. Las cepas se alimentaron con 0,5 g/L de extracto de hoja de esteviósido/RebA y se incubaron con sustrato durante 48 horas antes del muestreo.

La FIG. 7. Bioconversión de un extracto de hoja de esteviósido/RebA a escala de biorreactor. Para cinco compuestos principales de la vía RebM, se tomaron muestras de las concentraciones de compuestos en los

medios en varios puntos de tiempo a lo largo de la fermentación. Las cepas se alimentaron con 2 g/L del extracto de hoja de esteviósido/RebA y se incubaron con sustrato durante un total de 30 horas.

La FIG. 8. Modificaciones genéticas para aumentar el flujo nativo de *E. coli* a UDP-glucosa. Metabolitos: G6P, glucosa-6-fosfato; G1P, glucosa-1-fosfato; 6PGL, 6-fosfoglucono-1,5-lactona; 6PG, 6-fosfogluconato; R5P, ribosa-5-fosfato; PRPP, 5-fosforibosil-1-pirofosfato; UMP, uridina monofosfato; UDP, uridina difosfato; UTP, uridina trifosfato; UDP-Glu, UDP-glucosa; UDP-Gal, UDP-galactosa; UDP-GlcNAc, UDP-N-acetilglucosamina; CTP, citidina trifosfato; dUDP, desoxiuridina-difosfato; RebA, rebaudiósido A; RebM, rebaudiósido M. Enzimas: 1. *glk*, glucoquinasa; 2. *pgi*, glucosa-6-fosfato isomerasa; 3. *zwf*, glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa; 4. *pgl*, 6-fosfogluconolactonasa; 5. *edd*, fosfogluconato deshidratasa; 6. *gnd*, 6-fosfogluconato deshidrogenasa; 7. *rpiA*, ribosa-5-fosfato isomerasa o *rpe*, ribulosa-fosfato 3-epimerasa; 8. *prs*, ribosa-fosfato difosfoquinasa; 9. *pyrEF*, orotato fosforibosiltransferasa y orotidina-5'fosfato-descarboxilasa; 10. *pyrK*, uridilato quinasa; 11. *ndk*, UDP quinasa; 12. *murG*, N-acetilglucosaminil transferasa; 13. *nrdaBEF*, ribonucleósido-difosfato reductasa; 14. *pyrG*, CTP sintasa; 15. *pgm*, fosfoglucomutasa; 16. *galU*, UDP-glucosa pirofosforilasa; 17. *galETKM*, UDP-glucosa-4-epimerasa / galactosa-1-fosfato uridililtransferasa / galactoquinasa / galactosa-1-epimerasa; 18. *ushA*, 5'-nucleotidasa / UDP-azúcar hidrolasa; 19. *UGT*, UDP-glicosiltransferasa. El esquema ilustra las modificaciones genómicas secuenciales que conducen de la cepa 1 a la cepa 5. La cepa 1 es una cepa base *E. coli*. La cepa 2 tiene una delección de 17, y la cepa 3 tiene una delección de adición de 18. La cepa 4 se construyó a partir de la cepa 3 eliminando la 2. La cepa 5 se construyó a partir de la cepa 4 sobreexpresando 15 y 16.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona células microbianas y procedimientos para producir productos de glicosilación avanzada a partir de intermediarios glicosilados inferiores. En diversas realizaciones, la célula microbiana expresa una o más enzimas glicosil transferasas dependientes de UDP (por ejemplo, intracelularmente), para la glicosilación de los intermediarios. En diversas realizaciones, la célula microbiana tiene una o más modificaciones genéticas que aumentan la disponibilidad de UDP-glucosa. Al incubar la cepa microbiana con los glicosidos intermediarios (por ejemplo, de un extracto vegetal o fracción del mismo), estos glicosidos intermediarios están disponibles para la célula para su posterior glicosilación por enzimas glicosiltransferasas expresadas intracelularmente. En algunas realizaciones, los productos de glicosilación avanzada pueden recuperarse de los medios o, en algunas realizaciones, se recuperan de los medios y de las células microbianas.

Los intermediarios de glicósido pueden ser cualquier metabolito secundario glicosilado, como los que se encuentran de forma natural en extractos vegetales, incluyendo terpenoides glicosilados, flavonoides glicosilados, cannabinoides glicosilados, policétidos glicosilados, estilbenoides glicosilados y polifenoles glicosilados, entre otros. En algunas realizaciones, el intermediario de glicósido es un terpenoide glicosilado, como el glucósido de esteviol o el mogrósido. En algunas realizaciones, el intermediario de glicósido tiene uno, dos, tres, cuatro o cinco grupos glicosilo, incluyendo grupos glicosilo seleccionados entre grupos glucosilo, galactosilo, mannosilo, xilosilo y ramnosilo, entre otros. En diversas realizaciones, el producto glicosilado tiene al menos cuatro grupos glicosilo, o al menos cinco grupos glicosilo, o al menos seis grupos glicosilo. En otras realizaciones, el producto tiene siete, ocho, nueve o más grupos glicosilo. En algunas realizaciones, la biosíntesis del producto implica al menos dos glicosilaciones del intermediario por la célula microbiana.

En algunas realizaciones, los intermediarios de glicósidos proceden de extracto de hoja de stevia. Por ejemplo, los glicósidos de esteviol con cinco, seis o más glicosilaciones (tal como RebD o RebM) pueden biosintetizarse a partir de intermediarios de glicósidos de esteviol como el esteviósido, el esteviolbiósido, el rebaudiósido A, el dulcósido A, el dulcósido B, el rebaudiósido C y el rebaudiósido F, entre otros. La célula microbiana expresa una o más enzimas glicosil transferasas dependientes de UDP para la glicosilación de estos precursores de menor valor. Al incubar la cepa microbiana con un extracto de hoja de stevia o una fracción del mismo que comprenda los intermediarios de glicósido de esteviol, estos intermediarios están disponibles para su posterior glicosilación a RebD o RebM u otro producto de glicosilación avanzada (por ejemplo, Rebl), que puede recuperarse de los medios y/o las células microbianas.

En diversas realizaciones, las enzimas glicosil transferasas dependientes de UDP se expresan "intracelularmente", en el sentido de que las enzimas no poseen péptidos o dominios de translocación o secreción de membrana. Por lo tanto, la expresión de las enzimas UGT tiene lugar en el citoplasma, y estas enzimas no se dirigen al exterior de la célula a través de una señal de secreción o transporte. En diversas realizaciones, las enzimas UGT no contienen dominios de anclaje de membrana. Es decir, en diversas realizaciones las enzimas UGT no comprenden un dominio transmembrana.

En algunas realizaciones, el procedimiento utiliza intermediarios avanzados en el extracto de hoja de stevia, a saber, esteviol (el intermediario de aglicona) y glicósidos de esteviol que tienen de una a cinco glicosilaciones, que están disponibles para la célula microbiana para glicosilación adicional. Los productos intermediarios avanzados del extracto de hoja de stevia se obtienen fácilmente de la extracción industrial existente de glicósidos de esteviol. Como se muestra en la Tabla 2, el extracto de hoja puede contener principalmente los intermediarios de la vía esteviósido y rebaudiósido A (RebA). En diversas realizaciones, el extracto de hoja de stevia es una extracción de glicósidos de esteviol. En algunas realizaciones, el extracto comprende uno o más de esteviósido, esteviolbiósido y rebaudiósido A,

ES 3 013 059 T3

5 como componentes destacados. En algunas realizaciones, el extracto comprende uno o más de los dulcósidos A, B, RebC y/o RebF como componentes destacados. Por lo general, un componente destacado representa al menos aproximadamente 10% de los glicósidos de esteviol del extracto o fracción del mismo, pero en algunas realizaciones puede representar al menos aproximadamente 20%, aproximadamente 25% o aproximadamente 30% de los glicósidos de esteviol del extracto o fracción del mismo.

10 El RebM se ilustra en la FIG. 1. El RebM contiene seis glicosilaciones de un núcleo de esteviol: (1) una O-glicosilación C13, (2) una 1-2' glicosilación C13, (3) una 1-3' glicosilación C13, (4) una O-glicosilación C19, (5) una 1-2' glicosilación C19, y (6) una 1-3' glicosilación C19. Aunque son posibles diversos productos de glicosilación (FIG. 2), El RebM puede sintetizarse a partir del esteviol mediante la acción de cuatro enzimas UGT, y cada una de las enzimas de glicosilación UGT es capaz de actuar sobre varios sustratos. Por ejemplo, tanto UGT91D2 como OsUGT1-2 son enzimas glicosilantes 1-2' que pueden producir esteviolbósido a partir de esteviolmonósido (por acción en C13), así como RebD a partir de RebA (por acción en C19). Además, la UGT76G1 es una enzima glicosilante 1-3' que puede producir RebA a partir de esteviósido (por acción en C13), así como RebM a partir de RebD (por acción en C19).

15 Las enzimas UGT para la glicosilación de esteviol y glicósidos de esteviol (incluida para la biosíntesis de RebM) se desvelan en el documento US 2017/0332673. En la Tabla 1, a continuación, se enumeran enzimas UGT de ejemplo:

Tabla 1 Ejemplo de enzimas UGT

Tipo de glicosilación	Enzima	ID de Gen	ID de Proteína	DESCRIPCIÓN
C13	SrUGT85C2	AY345978.1	AAR06916.1	
	MbUGTC13			US 2017/0332673
C19	SrUGT74G 1	AY345982.1	AAR06920.1	
	MbUGTc19	-	-	US 2017/0332673
	MbUGTc19-2			US 2017/0332673
1-2'	SrUGT91D1	AY345980.1	AAR06918.1	
	SrUGT91D2	ACE87855.1	ACE87855.1	
	SrUGT91D2e	-	-	US 2011/038967
	OsUGT1-2	NM_001057542.1	NP_001051007.2	WO 2013/022989
	MbUGT1,2	-	-	US 2017/0332673
	MbUGT1,2,2	-	-	US 2017/0332673
1-3'	SrUGT76G 1	FB917645.1	CAX02464.1	
	MbUGT1-3			US 2017/0332673
	76G1_L200A			US 2017/0332673
	MbUGT1-3_1			US 62/866,148
	MbUGT1-3_1.5			La presente divulgación
	MbUGT1-3_2			US 62/866.148

20 En la presente divulgación se proporcionan secuencias de aminoácidos para enzimas UGT de ejemplo como SEQ ID NÚM.: 1-17. SEQ ID NÚM.:1 es *Stevia rebaudiana* UGT85C2. SEQ ID NÚM.: 13 es SrUGT85C2 con una sustitución P215T, e inserción de Ala en la 2ª posición para aumentar la estabilidad. SEQ ID NÚM.:2 es *Stevia rebaudiana* UGT74G1 (con inserción de Ala en la 2ª posición). SEQ ID NÚM.:8 y 12 son permutantes circulares con

- base en SrUGT74G1 (MbUGTC19 y MbUGTC19-2). SEQ ID NÚM.:3 es *Stevia rebaudiana* UGT76G1. Los permutantes circulares con actividad de glicosilación 1-3' se desvelan como SEQ ID NÚM.:10 (MbUGT1-3) y SEQ ID NÚM.:15, 16 y 17 (MbUGT1-3_1, MbUGT1-3_1.5 y MbUGT1-3_2, respectivamente). UGT76G1 con una sustitución L200A, y Ala en la posición 2, se desvela como SEQ ID NÚM.:14. *Stevia rebaudiana* UGT91D1, UGT91D2 y UGT91D2e se desvelan como SEQ ID NÚM.:4, 5 y 6. *Oryza sativa* UGT1-2 se desvela como SEQ ID NÚM.:7. MbUGT1,2 y MbUGT1,2.2 son enzimas circulares permutantes con actividad glucosiladora 1-2' (SEQ ID NÚM.: 9 and 11).
- Se proporcionan enzimas UGT adicionales como SEQ ID NÚM.:18 a 46, de las especies *Siraitia grosvenorii* (fruta del monje), *Momordica charantia* (melón amargo), *Cucumis sativa* (Pepino), *Cucurbita maxima* (calabaza), *Cucurbita moschata* (calabaza, zapallo), *Prunus persica* (melocotón), *Theobroma cacao* (cacao), *Corchorus capsularis* (yute blanco), *Ziziphus jujube* (dátil rojo), *Vitis vinifera* (vid), *Juglans regia* (nogal), *Hevea brasiliensis* (árbol del caucho), *Manihot esculenta* (yuca), *Cephalotus follicularis* (planta jarro), y *Coffea Arabica* (café). Las enzimas UGT pueden seleccionarse y, opcionalmente, diseñarse en función del producto deseado y del intermediario disponible.
- En diversas realizaciones, la célula microbiana expresa al menos una, o al menos dos, o al menos tres, o al menos cuatro enzimas UGT. En algunas realizaciones, las enzimas UGT glicosilan un sustrato de glicósido de esteviol, incluidos los enumerados en la Tabla 2. En algunas realizaciones, la célula microbiana expresa cuatro enzimas UGT que glicosilan un intermediario glicosilado de esteviol, como una enzima glicosilante 13-0 UGT, una enzima glicosilante 19-0 UGT, una enzima glicosilante 1-2' UGT y una enzima glicosilante 1-3' UGT. La acción de estas clases generales de enzimas UGT sobre los intermediarios glicosilados de la hoja de stevia se representa en las FIGS. 2 y 3.
- En diversas realizaciones, la célula microbiana expresa una enzima UGT glicosilante 1-3'. Por ejemplo, la enzima UGT glicosilante 1-3' puede seleccionarse de SrUGT76G1, MbUGT1-3_1, MbUGT1-3_1.5 y MbUGT1-3_2, y sus derivados.
- En estas y otras realizaciones, la célula microbiana expresa una enzima UGT glicosilante 1-2'. Por ejemplo, la enzima UGT glicosilante 1-2' puede seleccionarse de SrUGT91D2, SrUGT91D1, SrUGT91D2e, OsUGT1-2, MbUGT1,2, MbUGT1,2.2, y sus derivados.
- En estas u otras realizaciones, la célula microbiana expresa una enzima UGT C13 O-glicosilante. Por ejemplo, la enzima UGT O-glicosilante C13 puede seleccionarse de SrUGT85C2 y sus derivados (por ejemplo, MbUGTC13).
- En estas u otras realizaciones, la célula microbiana expresa una enzima UGT C19 O-glicosilante. Por ejemplo, la enzima O-glicosilante C19 puede seleccionarse de SrUGT74G1, MbUGTc19 y sus derivados (por ejemplo, MbUGTc19-2).
- En estas u otras realizaciones, la célula microbiana expresa una enzima UGT glicosilante 1-3' y una enzima UGT glicosilante 1-2'. En algunas realizaciones, la célula microbiana expresa una enzima UGT glicosilante de 1-3', una enzima UGT glicosilante de 1-2' y una enzima UGT glicosilante de C13O. En algunas realizaciones, la célula microbiana expresa una enzima UGT glicosilante 1-3', una enzima UGT glicosilante 1-2', una enzima UGT O-glicosilante C19 y una enzima UGT O-glicosilante C13. En algunas realizaciones, la célula microbiana expresa una enzima UGT glicosilante 1-3', una enzima UGT glicosilante 1-2', una enzima UGT O-glicosilante C19, y una enzima UGT O-glicosilante C13. En algunas realizaciones, la célula microbiana expresa un SrUGT85C2 o derivado del mismo (por ejemplo, MbUGTC13), MbUGT1,2.2 o derivado del mismo, SrUGT74G1 o derivado del mismo (por ejemplo, MbUGTc19 o MbUGTc19-2), y SrUGT76G1 o MbUGT1-3_1 o derivado del mismo (por ejemplo, 76G1_L200A, MbUGT1-3_1.5, o MbUGT1-3_2). Sin suscribir a ninguna teoría, las enzimas UGT de ingeniería pueden proporcionar un mayor flujo de carbono a RebM (así como productos de mayor glicosilación), y en particular debido a los bolsillos de unión de sustrato que son más capaces de acomodar sustratos más grandes, sin pérdida sustancial de actividad en los intermediarios de menor glicosilación. En estas realizaciones, las enzimas UGT (como las enzimas UGT glicosilantes 1-3' y 1-2') pueden tener una mayor tasa de actividad (p. ej., tasa de unión a sustrato y rotación) con sustratos de esteviol más altamente glicosilados, como ReBA o ReBD.
- Los derivados de enzimas UGT generalmente comprenden una secuencia de aminoácido que tiene al menos aproximadamente 50% de identidad, al menos aproximadamente 60% de identidad, al menos aproximadamente 70% de identidad, al menos aproximadamente 80% de identidad, al menos aproximadamente 85% de identidad, o al menos aproximadamente 90% de identidad, o al menos aproximadamente 95% de identidad, o al menos 96%, 97%, 98% o 99% de identidad a una o más de SEQ ID NÚM.: 1 a 46. En algunas realizaciones, el derivado tiene de 1 a 20 o de 1 a 10, o de 1 a 5 modificaciones de aminoácidos (seleccionadas independientemente de sustituciones, inserciones y deleciones de aminoácidos), con respecto a uno de los SEQ ID NÚM.:1 a 46. En algunas realizaciones, por ejemplo con respecto a la producción de RebM y otros glicósidos de esteviol avanzados (p. ej, con al menos 5 grupos glicosilo) a partir de intermediarios de glicósidos de esteviol, los derivados de estas enzimas UGT comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 50% de identidad, al menos aproximadamente 60% de identidad, al menos aproximadamente 70% de identidad, al menos aproximadamente 80% de identidad, al menos aproximadamente 85% de identidad, o al menos aproximadamente 90% de identidad, o al menos aproximadamente 95% de identidad, o al menos aproximadamente 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con uno o más de las SEQ ID NÚM.: 1 a 17. En algunas realizaciones, el derivado tiene de 1 a 20 o de 1 a 10, o de 1 a 5 modificaciones de

aminoácidos (seleccionadas independientemente entre sustituciones, inserciones y deleciones de aminoácidos), con respecto a una de las SEQ ID NÚM.: 1 a 17.

5 En algunas realizaciones, la célula microbiana expresa una enzima UGT 1-3' que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 75% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NÚM.: 15, SEQ ID NÚM.: 16, SEQ ID NÚM.: 17. En algunas realizaciones, la UGT 1-3' comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 80% idéntica a SEQ ID NÚM.: 15, 16, o 17. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la enzima UGT 1-3' es al menos aproximadamente 85% idéntica a SEQ ID NÚM.: 15, 16 o 17, o al menos aproximadamente 90% idéntica a SEQ ID NÚM.: 15, 16 o 17 o al menos aproximadamente 95% idéntica a SEQ ID NÚM.: 15, 16 o 17, o al menos aproximadamente 98% idéntica a SEQ ID NÚM.: 15, 16, o 17. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la enzima UGT 1-3' comprende el aminoácido de SEQ ID NÚM.: 15, 16, o 17.

15 Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos puede tener de 1 a 20 modificaciones de aminoácidos seleccionadas independientemente entre sustituciones, deleciones e inserciones, con respecto a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NÚM.: 15, 16, o 17. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos tiene de 1 a 10 modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, de 1 a 5) seleccionadas independientemente de sustituciones, deleciones e inserciones, con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NÚM.: 15, 16, o 17. Las modificaciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NÚM.: 15, 16 o 17 pueden guiarse por las estructuras enzimáticas disponibles y la construcción de modelos homólogos. Se describen estructuras de ejemplo en, *por ejemplo*, Li, et al., Crystal Structure of Medicago truncatula UGT85H2-insights into the Structural Basis of a Multifunctional (iso) Flavonoid Glycosyltransferase, J. of Mol. Biol., 370.5 (2007): 951-963. Estructuras cristalinas disponibles públicamente (por ejemplo, entrada PDB: 2PQ6) pueden utilizarse para informar de las modificaciones de aminoácidos. Por ejemplo, se pueden realizar una o más modificaciones de aminoácidos en el sitio activo o en las proximidades del sitio activo para mejorar la unión del sustrato, y/o para mejorar las geometrías de reacción de estos sustratos con las cadenas laterales catalíticas.

25 En algunas realizaciones, la enzima UGT 1-3' comprende una sustitución de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 29, 200, 357 y 414 de SEQ ID NÚM.:3 (*Stevia rebaudiana* UGT76G1). Las sustituciones en estas posiciones, que se incluyen en la enzima de SEQ ID NÚM.:15 y 17 (posiciones 183, 354, 54 y 111, respectivamente, en SEQ ID NÚM.:15) pueden proporcionar mejoras drásticas en la actividad. En algunas realizaciones, la identidad de los aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 183, 354, 54 y 111 de SEQ ID NÚM.: 15, permite modificaciones adicionales en otras posiciones. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la enzima UGT 1-3' comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 60% idéntica a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NÚM.:15 o 17, en la que la enzima UGT comprende: una glicina (G) o treonina (T) en la posición correspondiente a la posición 54 de SEQ ID NÚM.:15; una leucina (L) o isoleucina (I) en la posición correspondiente a la posición 111 de SEQ ID NÚM.:15; una metionina (M) o leucina (L) en la posición correspondiente a la posición 183 de SEQ ID NÚM.:15; y una alanina (A), o glicina (G), o serina (S) en la posición correspondiente a la posición 354 de SEQ ID NÚM.:15. En algunas realizaciones, la enzima UGT 1-3' comprende una metionina (M) en la posición correspondiente a la posición 183 de SEQ ID NÚM.:15. En algunas realizaciones, la enzima UGT 1-3' comprende una glicina (G) en la posición correspondiente a la posición 54 de la SEQ ID NÚM.:15. En algunas realizaciones, la enzima UGT 1-3' comprende una leucina (L) en la posición correspondiente a la posición 111 de SEQ ID NÚM.:15. En algunas realizaciones, la UGT 1-3' tiene dos o tres de una metionina (M) en la posición correspondiente a la posición 183 de la SEQ ID NÚM.:15, una glicina (G) en la posición correspondiente a la posición 54 de la SEQ ID NÚM.:15, y una leucina (L) en la posición correspondiente a la posición 111 de la SEQ ID NÚM.:15. Estas modificaciones pueden aportar mejoras sustanciales a la actividad de la enzima.

45 En algunas realizaciones, la enzima UGT 1-3' comprende una inserción de 5 a aproximadamente 15 aminoácidos, tal como de 6 a 12 aminoácidos, o de aproximadamente 6 o aproximadamente 11 aminoácidos, después de la posición correspondiente a la posición 155 de SEQ ID NÚM.: 15. En algunas realizaciones, la inserción es una secuencia flexible e hidrófila en la que predominan los residuos de Glicina y Serina. En algunas realizaciones, la secuencia es GSGGSG (SEQ ID NÚM.:47) o GSGGSGGSG (SEQ ID NÚM.:48).

50 En diversas realizaciones, la enzima UGT 1-3' muestra una conversión mejorada de esteviósido a Reb A, y una conversión mejorada de RebD a RebM, en comparación con UGT76G1-L200A (SEQ ID NÚM.:14). Esta mejora de la conversión se demuestra en un ensayo de bioconversión en el que se alimenta con esteviósido o sustrato RebD a células microbianas que expresan la enzima UGT 1-3'. La mejora de la conversión puede demostrarse en reacciones con lisados celulares que contengan UGT 1-3' expresada de manera recombinante, o en reacciones in vitro con UGT 1-3' purificada o parcialmente purificada.

55 Los cambios en la secuencia de aminoácidos de una enzima pueden alterar su actividad o no tener ningún efecto mensurable. Los cambios silenciosos sin efecto mensurable suelen ser sustituciones conservadoras y pequeñas inserciones o deleciones en superficies expuestas a disolventes que se encuentran lejos de los sitios activos y de los sitios de unión a sustratos. En cambio, es más probable que la actividad enzimática se vea afectada por sustituciones no conservadoras, grandes inserciones o deleciones y cambios dentro de los sitios activos, los sitios de unión a sustratos y en posiciones enterradas importantes para el plegamiento o la conformación de la proteína. Los cambios que alteran la actividad enzimática pueden aumentar o disminuir la tasa de reacción o aumentar o disminuir la afinidad

o especificidad por un sustrato particular. Por ejemplo, los cambios que aumentan el tamaño de un sitio de unión al sustrato pueden permitir que una enzima actúe sobre sustratos más grandes y los cambios que sitúan una cadena lateral de aminoácidos catalítica más cerca de un sitio diana en un sustrato pueden aumentar la tasa enzimática.

5 El conocimiento de la estructura tridimensional de una enzima y la localización de los sitios activos relevantes, los sitios de unión a sustrato y otros sitios de interacción puede facilitar el diseño racional de derivados y proporcionar una visión mecanicista del fenotipo de cambios específicos. Las UGT vegetales comparten una estructura secundaria y terciaria muy conservada, aunque tienen una identidad de secuencia de aminoácidos relativamente baja. Osmani et al, Substrate specificity of plant UDP-dependent glycosyltransferases predicted from crystal structures and homology modeling, *Phytochemistry* 70 (2009) 325-347. Los sustratos aceptores y donantes de azúcar de las UGT se alojan en una hendidura formada entre los dominios N- y C-terminal. Diversas regiones de la secuencia primaria contribuyen a la formación del bolsillo de unión al sustrato, incluyendo dominios estructuralmente conservados, así como también regiones de bucle que difieren tanto con respecto a su secuencia de aminoácidos como a la longitud de la secuencia.

15 La construcción de derivados de UGT puede guiarse con base en el modelado homológico comparado con estructuras conocidas. Por ejemplo, con base en el análisis de la estructura cristalina de SrUGT76G1_L200A y en una alineación de la secuencia de aminoácidos de SrUGT76G1 con MbUGT3-1_1, se predice que el núcleo de esteviól del esteviósido está cerca (dentro de 4 Å) de los siguientes residuos de MbUGT3-1_1: I244, L280, W351, A354, I357, M362 y T438. Además, se predice que la glicosilación C19 1-2 está cerca (dentro de 4 Å) de T438. Se predice que el núcleo de esteviól de RebD está cerca (dentro de 4Å) de las siguientes cadenas laterales hidrófobas de MbUGT3-1_1: L239, M242, I244, L280, I353, A354 y I357. Se predice que la glicosilación C13 1-2' está cerca (dentro de 4 Å) de las siguientes cadenas laterales de enlace de hidrógeno de MbUGT3-1_1: S301 y D77. El posicionamiento y el contenido en aminoácidos de las hélices V341-Q352 y K355-A367 de MbUGT3-1_1 pueden ser importantes para la catálisis, ya que la mutación correspondiente a L200A se encuentra en un bucle entre estas hélices. Las posiciones L76 y/o D77 de MbUGT3-1_1 pueden interactuar con la glicosilación C13 del esteviósido.

25 La secuencia de aminoácidos de una o más de las enzimas UGT puede incluir opcionalmente una alanina insertada o sustituida en la posición 2 para disminuir el recambio en la célula. En diversas realizaciones, una o más enzimas UGT comprenden un residuo de aminoácido alanina insertado o sustituido en la posición 2 para proporcionar estabilidad adicional *in vivo*.

30 La identidad de secuencias de aminoácidos, es decir, el porcentaje de identidad de secuencia, puede determinarse mediante alineaciones de secuencias. Estas alineaciones pueden realizarse con diversos algoritmos conocidos, tal como el descrito por Karlin y Altschul (Karlin & Altschul (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 5873-5877), con hmmalign (paquete HMMER) o con el algoritmo CLUSTAL (Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994), *Nucleic Acids Res.*, 22, 4673-80). El grado de identidad de secuencia (coincidencia de secuencia) puede calcularse utilizando, por ejemplo, BLAST, BLAT o BlastZ (o BlastX). Un algoritmo similar se incorpora a los programas BLASTN y BLASTP de Altschul *et al.* (1990), *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410. Las alineaciones de proteínas BLAST pueden realizarse con el programa BLASTP, puntuación = 50, longitud de palabra = 3. Para obtener alineaciones con huecos con fines comparativos, se utiliza Gapped BLAST como se describe en Altschul *et al.* (1997), *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402. Al utilizar los programas BLAST y Gapped BLAST, se utilizan los parámetros por defecto de los respectivos programas.

40 Las enzimas UGT pueden estar integradas en el cromosoma de la célula microbiana, o alternativamente, se expresan extracromosómicamente. Por ejemplo, las enzimas UGT pueden expresarse a partir de un cromosoma artificial bacteriano (BAC) o de un cromosoma artificial de levadura (YAC).

45 La expresión de las enzimas UGT puede sintonizarse para una actividad óptima, utilizando, por ejemplo, módulos de genes (por ejemplo, operones) o expresión independiente de las enzimas UGT. Por ejemplo, la expresión de los genes u operones puede regularse mediante la selección de promotores, como promotores inducibles o constitutivos, con diferentes potencias (por ejemplo, fuerte, intermedia o débil). Algunos ejemplos no limitativos de promotores de diferente potencia son Trc, T5 y T7. Además, la expresión de genes u operones puede regularse mediante la manipulación del número de copias del gen u operón en la célula. En algunas realizaciones, la célula expresa una sola copia de cada enzima UGT. En algunas realizaciones, la expresión de genes u operones puede regularse manipulando el orden de los genes dentro de un módulo, donde los genes transcritos primero se expresan generalmente a un nivel más alto. En algunas realizaciones, la expresión de genes u operones se regula mediante la integración de uno o más genes u operones en el cromosoma.

55 La optimización de la expresión de UGT también puede lograrse mediante la selección de promotores y sitios de unión ribosómica apropiados. En algunas realizaciones, esto puede incluir la selección de plásmidos de alto número de copias, o plásmidos de número de copias único, bajo o medio. La etapa de terminación de la transcripción también puede ser objeto de regulación de la expresión génica, mediante la introducción o eliminación de estructuras como las horquillas.

La conversión de células enteras requiere que el sustrato (por ejemplo, intermediarios de glicósido) esté disponible para la célula para la glicosilación por las enzimas expresadas (por ejemplo, las enzimas expresadas intracelularmente) y preferiblemente el producto puede extraerse del medio extracelular. Los sistemas de células enteras presentan ventajas, ya que la célula proporciona la regeneración del cofactor UDP-glucosa. Esto contrasta

con los procedimientos que utilizan enzimas de lisis o secreción celular fuera de la célula, lo que requiere un suministro exógeno de UDP-glucosa o precursor de UDP-glucosa o mecanismo de regeneración de UDP-glucosa o sistema enzimático de regeneración de UDP-glucosa. En realizaciones de la presente invención, la catálisis (glicosilación) se lleva a cabo con células microbianas vivas, y el reciclaje del cofactor UDP-glucosa tiene lugar utilizando el metabolismo celular sin requerir la alimentación de enzimas o sustratos para la regeneración de UDP-glucosa.

El documento US 2017/0332673 describe cepas de *E. coli* que sobreexpresan enzimas de la vía MEP, junto con una vía de biosíntesis de esteviol corriente abajo, y enzimas UGT para impulsar la producción de RebM a partir de glucosa. Sin embargo, estas cepas no realizan la biocatálisis de los intermediarios glicósidos de esteviol alimentados a RebM, lo que puede deberse, en parte, a la incapacidad de la célula huésped para acceder al sustrato glicósido de esteviol. De acuerdo con la presente divulgación, las modificaciones genéticas de la célula microbiana permiten que los intermediarios glicosilados estén disponibles para su posterior glicosilación en un sistema de célula completa. Además, el producto puede recuperarse del medio extracelular, lo que facilita su purificación y procesamiento posterior.

En algunas realizaciones, la célula microbiana tiene una o más modificaciones genéticas que aumentan la disponibilidad de UDP-glucosa. En algunas realizaciones, sin suscribir a ninguna teoría, estas modificaciones también pueden causar estrés a la célula por la disponibilidad de glucosa, lo que conduce a una mayor expresión de transportadores endógenos para importar glicósidos de esteviol a la célula. Los niveles de UDP-glucosa de tipo silvestre en *E. coli* en crecimiento exponencial es de aproximadamente 2,5 mM (Bennett BD, Kimball EH, Gao M, Osterhout R, Van dien SJ, Rabinowitz JD. Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. Nat Chem Biol. 2009;5(8):593-9.). En algunas realizaciones, las modificaciones genéticas de la célula huésped se diseñan para aumentar la UDP-glucosa, p. ej., hasta al menos 5 mM, o al menos 10 mM, en células de crecimiento exponencial (p. ej., que no tienen expresión recombinante de enzimas UGT).

En algunas realizaciones, la célula microbiana tiene una delección, inactivación o actividad o expresión reducida de un gen que codifica una enzima que consume UDP-glucosa. Por ejemplo, la célula microbiana puede tener una delección, inactivación o actividad reducida de *ushA* (UDP-azúcar hidrolasa) y/o una o más de *galE*, *galT*, *galK* y *galM* (que son responsables de la biosíntesis de UDP-galactosa a partir de UDP-glucosa), u ortólogo de las mismas en la especie microbiana. En algunas realizaciones, los genes *galETKM* están inactivados, eliminados o sustancialmente reducidos en su expresión. Alternativamente, o además, la célula microbiana tiene una delección, inactivación, o actividad o expresión reducida de *E. coli otsA* (trehalosa-6-fosfato sintasa), u ortólogo de la misma en la especie microbiana. Alternativamente, o además, la célula microbiana tiene una delección, inactivación, o actividad o expresión reducida de *E. coli ugd* (UDP-glucosa 6-deshidrogenasa), u ortólogo de la misma en la especie microbiana. La reducción o eliminación de la actividad de *otsA* y *ugd* puede eliminar o reducir los sumideros de UDP-glucosa a trehalosa o UDP-glucuronidato, respectivamente.

Otros sumideros de UDP-glucosa que pueden reducirse o eliminarse incluyen la eliminación o reducción de la actividad o expresión de genes responsables de la glicosilación de lípidos y la biosíntesis de LPS, y genes responsables de la glicosilación de undecaprenil-difosfato (UPP). Los genes implicados en la glicosilación de lípidos o la biosíntesis de LPS incluyen *E. coli waaG* (lipopolisacárido glucosiltransferasa 1), *E. coli waaO* (UDP-D-glucosa:(glucosil)LPS α -1,3-glucosiltransferasa), y *E. coli waaJ* (UDP-glucosa:(glucosil)LPS α -1,2-glucosiltransferasa). Los genes responsables de la glicosilación del undecaprenil-difosfato (UPP) incluyen *E. coli yfdG* (translocasa de glucosa putativa ligada a bactoprenol), *E. coli yfdH* (bactoprenol glucosil transferasa), *E. coli yfdI* (glucosil transferasa específica de serotipo), y *E. coli wcaJ* (undecaprenil-fosfato glucosa fosfotransferasa). La supresión, inactivación o reducción de la actividad o expresión de uno o varios de estos productos génicos (o de los correspondientes ortólogos en la célula microbiana) puede aumentar la disponibilidad de UDP-glucosa.

En estas u otras realizaciones, la célula microbiana tiene una delección, inactivación, o actividad o expresión reducida de un gen que codifica una enzima que consume un precursor de UDP-glucosa. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la célula microbiana tiene una delección, inactivación, o actividad o expresión reducida de *pgi* (glucosa-6 fosfato isomerasa), u ortólogo de la misma en la especie microbiana de la célula huésped.

En estas u otras realizaciones, la célula tiene una sobreexpresión o actividad aumentada de uno o más genes que codifican una enzima implicada en la conversión de glucosa-6-fosfato en UDP-glucosa. Por ejemplo, la *pgm* (fosfoglucomutasa) y/o la *galU* (UTP-glucosa-1-fosfato uridililtransferasa) (u ortólogo o derivado de las mismas) pueden sobreexpresarse o modificarse para aumentar la productividad enzimática. Alternativa o adicionalmente, *E. coli ycjU* (β -fosfoglucomutasa), que convierte glucosa-6-fosfato en glucosa-1-fosfato, y *Bifidobacterium bifidum ugpA*, que convierte glucosa-1-fosfato en UDP, u ortólogo o derivado de estas enzimas, pueden sobreexpresarse, o modificarse para aumentar la productividad de la enzima.

Alternativamente, o además, la célula microbiana tiene una o más modificaciones genéticas que aumentan el flujo a la vía de las pentosas fosfato (PPP), tal como una sobreexpresión o actividad aumentada de *E. coli zwf* (u homólogo o derivado de ingeniería del mismo), que es una glucosa-6-fosfato deshidrogenasa dependiente de NADP+.

Alternativamente, o además, la célula microbiana tiene una o más modificaciones genéticas que aumentan el transporte de glucosa. Tales modificaciones incluyen el aumento de la expresión o actividad de *E. coli galP*

(galactosa:H+simportador) y *E. coli* glk (glucoquinasa), o alternativamente *Zymomonas mobilis* glf y *E. coli* glk, u homólogos, ortólogos o derivados de ingeniería de estos genes.

5 Alternativamente, o además, la célula microbiana tiene una o más modificaciones genéticas que aumentan la producción y el reciclado de UTP. Tales modificaciones incluyen una mayor expresión o actividad de *E. coli* pyrH (UMP quinasa), *E. coli* cmk (citidilato quinasa), *E. coli* adk (adenilato quinasa), o *E. coli* ndk (nucleósido difosfato quinasa), u homólogos, ortólogos o derivados de ingeniería de estas enzimas.

10 Alternativamente, o además, la célula microbiana tiene una o más modificaciones genéticas que aumentan la producción de UDP. Tales modificaciones incluyen la sobreexpresión o el aumento de la actividad de una o más de *E. coli* upp (uracilo fosforribosiltransferasa), *E. coli* dctA (C4 dicarboxilato/orotato:H+simportador), *E. coli* pyrE (orotato fosforribosiltransferasa), y *E. coli* pyrF (orotidina-5'-fosfato descarboxilasa), incluidos homólogos, ortólogos o derivados de ingeniería de los mismos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la célula microbiana sobreexpresa o tiene una mayor actividad de upp, pyrH y cmk, u homólogo o derivado de ingeniería de los mismos. Alternativamente, la célula microbiana sobreexpresa o tiene una mayor actividad de dctA, pyre, pyrH y cmk, u homólogo o derivado de ingeniería de los mismos.

15 Alternativamente, o además, la célula microbiana puede tener una o más modificaciones genéticas para eliminar o reducir la regulación de la captación de glucosa. Por ejemplo, la célula microbiana puede tener una delección, inactivación o expresión reducida de sgrS, que es un pequeño ARN regulador en *E. coli*.

20 Alternativamente, o además, la célula microbiana puede tener una o más modificaciones genéticas que reducen la desfosforilación de glucosa-1-fosfato. Las modificaciones de ejemplo incluyen delección, inactivación o expresión o actividad reducida de una o más de *E. coli* agp (glucosa-1-fosfatasa), *E. coli* yihX (α -D-glucosa-1-fosfato fosfatasa), *E. coli* ybiV (fosfatasa de azúcar), *E. coli* yidA (fosfatasa de azúcar), *E. coli* yigL (fosfosfatasa de azúcar), y *E. coli* phoA (fosfatasa alcalina), o un ortólogo de las mismas en la célula microbiana.

25 Alternativamente, o además, la célula microbiana puede tener una o más modificaciones genéticas que reducen la conversión de glucosa-1-fosfato a TDP-glucosa. Las modificaciones de ejemplo incluyen delección, inactivación, o expresión o actividad reducida de una o más de *E. coli* rffH (dTDP-glucosa pirofosforilasa) y *E. coli* rfbA (dTDP glucosa pirofosforilasa), o un ortólogo de las mismas en la célula microbiana.

30 Alternativamente, o además, la célula microbiana puede tener una o más modificaciones genéticas que reducen la conversión de glucosa-1-fosfato a ADP-glucosa. Las modificaciones de ejemplo incluyen la supresión, inactivación o reducción de la expresión o actividad de *E. coli* gigC (glucosa-1-fosfato adeniltransferasa), o un ortólogo de la misma en la célula microbiana.

En algunas realizaciones, la célula microbiana es una célula bacteriana que comprende las modificaciones genéticas: ushA y galETKM se suprimen, inactivan o reducen en expresión; pgi se suprime, inactiva o reduce en expresión; y pgm y galU se sobreexpresan o complementan.

35 En algunas realizaciones, los genes endógenos se editan, ya sea para inactivar o reducir la actividad enzimática cambiando la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada, o para reducir la expresión mediante la edición de secuencias de control de expresión. La edición puede modificar promotores endógenos, secuencias de unión ribosómica u otras secuencias de control de la expresión y/o, en algunas realizaciones, modificar factores de acción trans y/o cis en la regulación génica. La edición del genoma puede realizarse mediante técnicas de edición del genoma CRISPR/Cas, o técnicas similares que emplean nucleasas de dedos de zinc y TALEN. En algunas realizaciones, los genes endógenos se sustituyen por recombinación homóloga.

40 La célula microbiana en diversas realizaciones no expresa una vía de biosíntesis recombinante para la producción de precursores (por ejemplo, que comprende una o más enzimas vegetales). Por ejemplo, para las células microbianas que producen RebM (y otros productos de glicosilación avanzada) no expresan una vía de biosíntesis de esteviol, tal como copalil sintasa, kaureno sintasa, kaureno oxidasa y/o ácido kaurenoico hidroxilasa, de modo que la producción de RebM y otros productos de glicosilación avanzada depende de la alimentación de la célula con intermediarios de glicosidos de esteviol.

50 En diversas realizaciones, la célula microbiana es una bacteria seleccionada de *Escherichia* spp., *Bacillus* spp., *Rhodobacter* spp., *Zymomonas* spp., o *Pseudomonas* spp. En algunas realizaciones, la especie bacteriana se selecciona entre *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Zymomonas mobilis*, o *Pseudomonas putida*. En algunas realizaciones, la célula bacteriana es *E. coli*.

55 En otras realizaciones, la célula es una célula fúngica tal como una célula de levadura, tal como, por ejemplo, *Saccharomyces* spp., *Schizosaccharomyces* spp., *Pichia* spp., *Phaffia* spp., *Kluyveromyces* spp., *Candida* spp., *Talaromyces* spp., *Brettanomyces* spp., *Pachysolen* spp., *Debaryomyces* spp., *Yarrowia* spp., y cepas de levaduras poliploides industriales. En una realización, la levadura puede ser una especie de *Saccharomyces*, *Pichia*, o *Yarrowia*, incluidas *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, y *Yarrowia lipolytica*. En algunas

realizaciones, la célula de levadura expresa uno o más transportadores bacterianos, o derivados de los mismos, que importan intermediarios de glicósido a la célula para su posterior glicosilación.

En diversas realizaciones, la célula microbiana tiene una sobreexpresión de uno o más transportadores endógenos (por ejemplo, en comparación con una cepa microbiana parental), o en ciertas realizaciones, se modifica para expresar una proteína de transporte recombinante y/o de ingeniería. En algunas realizaciones, la célula microbiana expresa una o más copias adicionales de una proteína de transporte endógena, o un derivado de la misma. Por ejemplo, la expresión o la actividad de las proteínas transportadoras puede modificarse para aumentar el transporte al interior de la célula de los intermediarios de glicósidos de esteviol (p. ej., uno o varios de los esteviósidos, esteviolbiósidos y RebA, entre otros), al tiempo que se exporta el producto, como RebM y/o RebD, y/o otros glicósidos de esteviol glicosilados avanzados.

Las proteínas de transporte de ejemplo que pueden sobreexpresarse o modificarse por ingeniería para alterar la actividad o la especificidad de sustrato en la célula microbiana incluyen *E. coli* acrAD, xylE, ascF, bglF, chbA, ptsG/crr, wzxE, rfbX, así como ortólogos o derivados de los mismos. Los derivados y ortólogos de estas proteínas generalmente comprenden secuencias de aminoácido con al menos aproximadamente 30%, o al menos aproximadamente 40%, o al menos aproximadamente 50% de identidad, al menos aproximadamente 60% de identidad, al menos aproximadamente 70% de identidad, al menos aproximadamente 80% de identidad, al menos aproximadamente 85% de identidad, o al menos aproximadamente 90% de identidad, o al menos aproximadamente 95% de identidad, o al menos 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con la proteína de transporte de *E. coli*.

acrAD es una bomba de eflujo multifármaco de *E. coli* descrita en Aires JR and Nikaido H., Aminoglycosides are captured from both periplasm and cytoplasm by the AcrD multidrug efflux transporter of Escherichia coli, *J. Bacteriol.* 2005; 187(6):1923-9. Además, se describe una estructura homóloga en Yu, EW, et al., Structural basis of multiple drug-binding capacity of the AcrB multidrug efflux pump, *Science* 2003; 300(5621):976-80.

xylE es un transportador de xilosa de *E. coli* con homología a los transportadores de glucosa. xylE se describe en Sumiya M, et al., Molecular genetics of a receptor protein for D-xylose, encoded by the gene xylF, in Escherichia coli, *Recept Channels* 1995;3(2):117-28, con estructura descrita por Sun L, et al., Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT-1-4, *Nature* 2012;490(7420):361-6.

ascF se describe en Hall BG y Xu L, Nucleotide sequence, function, activation, and evolution of the cryptic asc operon of Escherichia coli K12, *Mol. Biol., Evol.* 1992;9(4):688-706. Se considera que el operón asc desempeña un papel en el metabolismo de la celobiosa en *E. coli*.

bglF se describe en Schnetz K, et al., Identification of catalytic residues in the beta-glucoside permease of Escherichia coli by site-specific mutagenesis and demonstration of interdomain cross-reactivity between the beta-glucoside and glucose systems, *J. Biol. Chem.*, 1990;265(23):13464-71. Una estructura homóloga se describe en Herzberg O., An atomic model for protein-protein phosphoryl group transfer, *J. Biol. Chem.*, 1992;276(34):24819-23. bglF cataliza el transporte y la fosforilación de betaglicósidos.

chba se describe en Keyhani NO, et al., The transport/phosphorylation of N,N'-diacetylchitobiose in Escherichia coli. Characterization of phosphor-IIB(Chb) and of a potential transition state analogue in the phosphotransfer reaction between the proteins IIA(Chb) and IIB(Chb). *J. Biol. Chem.*, 2000;275(42):33102-9; con estructura descrita en Tang C, et al., Solution structure of enzyme IIA(Chitobiose) from the N,N'-diacetylchitobiose branch of the Escherichia coli phosphotransferase system. *J. Biol. Chem.*, 2005;280(12): 11770-80. El sistema de fosfotransferasa de azúcar dependiente de fosfoenolpiruvato (azúcar PTS) es un importante sistema de transporte activo de carbohidratos que cataliza la fosforilación de los sustratos de azúcar entrantes de forma concomitante con su translocación a través de la membrana celular.

ptsG codifica la permeasa específica de glucosa del sistema de transporte fosfotransferasa (PTS) y se describe en Meins M, et al., Glucose permease of Escherichia coli. Purification of the IIGlc subunit and functional characterization of its oligomeric forms. *J. Biol. Chem.*, 1988;263(26): 12986-93. Se describe una estructura en Cai M, et al., Solution structure of the phosphoryl transfer complex between the signal-transducing protein IIA_{glucose} and the cytoplasmic domain of the glucose transporter IICB_{glucose} of the Escherichia coli glucose phosphotransferase system. *J. Biol. Chem.*, 2003;278(27):25191-206.

wzxE y su papel en el transporte molecular se describe en Rick PD, et al., Evidence that the wzxE gene of Escherichia coli K-12 encodes a protein involved in the transbilayer movement of a trisaccharide-lipid intermediate in the assembly of enterobacterial common antigen. *J. Biol. Chem.*, 2003;278(19): 16534-42.

rfbX es un transportador de lipopolisacáridos descrito en Hong Y, et al., Progress in our understanding of wzx flippase for translocation of bacterial membrane lipid-linked oligosaccharide. *J. Bacteriol.* 2018;200(1).

Otras proteínas de transporte incluyen aquellas seleccionadas de proteínas de transporte bacterianas o endógenas que transportan el intermediario de glicósido deseado a la célula, y/o transportan el producto deseado fuera de la célula. Por ejemplo, el transportador puede ser de la especie huésped, o de otra especie bacteriana o de levadura, y puede modificarse para ajustar su afinidad por los intermediarios o productos de glicósido particulares. Por ejemplo,

- la célula huésped puede sobreexpresar un transportador que sea al menos aproximadamente 30%, o al menos aproximadamente 40%, o al menos aproximadamente 50% idéntico a un transportador *E. coli* seleccionado entre ampG, araE, araJ, bcr, cynX, emrA, emrB, emrD, emrE, emrK, emrY, entS, exuT, fsr, fucP, galP, garP, glpT, gudP, gudT, hcaT, hsrA, kgtP, lacY, lgoT, lptI, lptA, lptB, lptC, lptD, lptE, lptF, lptG, mdfA, mdtD, mdtG, mdtH, mdtM, mdtL, mhpT, msaA, nanT, narK, narU, nepl, nimT, nupG, proP, setA, setB, setC, shiA, tfaP, tolC, tsgA, uhpT, xapB, xylE, yaaU, yajR, ybjJ, ycaD, ydeA, ydeF, ydfJ, ydhC, ydhP, ydjE, ydjK, ydiM, ydiN, yebQ, ydcO, yegT, yfaV, yfcJ, ygaY, ygcE, ygcS, yhhS, yhjE, yhjX, yidT, yihN, yjhB, e ynfM. En algunas realizaciones, el transportador es al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95% idéntico al transportador de *E. coli*.
- En algunas realizaciones, la célula microbiana expresa una proteína de transporte que es al menos 50% idéntica a un transportador de una célula eucariota, tal como una levadura, hongo o célula vegetal. En algunas realizaciones, la proteína transportadora es un transportador de la familia ABC, y que es opcionalmente de una subclase transportador PDR (resistencia pleiotrópica a fármacos), transportador MDR (resistencia a múltiples fármacos), transportador de la familia MFS (Superfamilia de Facilitadores Mayores), o transportador de la familia SWEET (también conocido como PQ-loop, Saliva, o familia MtN3). En otras realizaciones, la proteína transportadora es de una familia seleccionada entre: AAAP, SulP, LCT, APC, MOP, ZIP, MPT, VIC, CPA2, ThrE, OPT, Trk, BASS, DMT, MC, AEC, Amt, Nramp, TRP-CC, ACR3, NCS1, Pit, ArsAB, IISP, GUP, MIT, Ctr y CDF.
- En algunas realizaciones, el transportador es una proteína de transporte de la familia ABC (a/k/a transportadores de casetes de unión a ATP), que generalmente incluyen múltiples subunidades, una o dos de las cuales son proteínas transmembrana y una o dos de las cuales son ATPasas asociadas a membrana. Las subunidades ATPasa utilizan la energía de la unión y la hidrólisis del adenosín trifosfato (ATP) para energizar la translocación de diversos sustratos a través de las membranas, ya sea para la captación o para la exportación del sustrato. El transportador de la familia ABC puede ser de cualquier subclase, incluyendo, pero sin limitación: ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF y ABCG.
- En algunas realizaciones, la proteína de transporte es una proteína de transporte de la familia MFS (también conocida como Superfamilia de Facilitadores Principales), que son transportadores secundarios de polipéptido único capaces de transportar solutos pequeños en respuesta a gradientes de iones quimiosmóticos. Los compuestos transportados por las proteínas transportadoras del SMF pueden incluir azúcares simples, oligosacáridos, inositoles, fármacos, aminoácidos, nucleósidos, ésteres de organofosfatos, metabolitos del ciclo de Krebs y una gran variedad de aniones y cationes orgánicos e inorgánicos. A modo de ejemplo, entre las proteínas transportadoras MFS se incluyen XylE (de *E. coli*), QacA (de *S. aureus*), Bmr (de *B. subtilis*), UhpT (de *E. coli*), LacY (de *E. coli*), FucP (de *E. coli*), y ExtU (de *E. coli*).
- En algunas realizaciones, el transportador es de la familia SWEET (*Sugars Will Eventually be Exported Transporters*) de proteínas transportadoras (también conocida como la familia PQ-loop, Saliva o MtN3), que es una familia de transportadores de azúcar y un miembro de la superfamilia TOG. Los miembros eucariotas de la familia SWEET tienen 7 segmentos transmembrana (TMSs) en una disposición de repetición 3+1+3. A modo de ejemplo, las proteínas transportadoras de SWEET incluyen SWEET1, SWEET2, SWEET9, SWEET12, SWEET13 y SWEET14.
- En algunas realizaciones, la proteína de transporte es al menos aproximadamente 50% idéntica a una proteína de transporte de *S. cerevisiae*. En algunas realizaciones, el transportador es al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95% idéntico al transportador de *S. cerevisiae*. Los ejemplos de proteínas de transporte de *S. cerevisiae* incluyen AC1, ADP1, ANTI, AQR1, AQY3, ARN1, ARN2, ARR3, ATG22, ATP4, ATP7, ATP19, ATR1, ATX2, AUS1, AVT3, AVT5, AVT6, AVT7, AZR1, CAF16, CCH1, COT1, CRC1, CTR3, DAL4, DNF1, DNF2, DTR1, DUR3, ECM3, ECM27, ENB1, ERS1, FEN2, FLR1, FSF1, FUR4, GAP1, GET3, GEX2, GGC1, GUP1, HOL1, HCT10, HXT3, HXT5, HXT8, HXT9, HXT11, HXT15, KHA1, ITR1, LEU5, LYP1, MCH1, MCH5, MDL2, MME1, MNR2, MPH2, MPH3, MRS2, MRS3, MTM1, MUP3, NFT1, OAC1, ODC2, OPT1, ORT1, PCA1, PDR1, PDR3, PDR5, PDR8, PDR10, PDR11, PDR12, PDR15, PDR18, PDRI, PDRI 1, PET8, PHO89, PIC2, PMA2, PMC1, PMR1, PRM10, PUT4, QDR1, QDR2, QDR3, RCH1, SAL1, SAM3, SBH2, SEO1, SGE1, SIT1, SLY41, SMF1, SNF3, SNQ2, SPF1, SRP101, SSU1, STE6, STL1, SUL1, TAT2, THI7, THI73, TIM8, TIM13, TOK1, TOM7, TOM70, TPN1, TPO1, TPO2, TPO3, TPO4, TRK2, UGA4, VBA3, VBA5, VCX1, VMA1, VMA3, VMA4, VMA6, VMR1, VPS73, YEA6, YHK8, YIA6, YMC1, YMD8, YOR1, YPK9, YVC1, ZRT1; YBR241C, YBR287W, YDR061W, YDR338C, YFR045W, YGL114W, YGR125W, YIL166C, YKL050C, YMR253C, YMR279C, YNL095C, YOL075C, YPR003C e YPR011C.
- En algunas realizaciones, la proteína de transporte de *S. cerevisiae* se selecciona de una o más de ADP1, AQR1, ARN1, ARN2, ATR1, AUS1, AZR1, DAL4, DTR1, ENB1, FLR1, GEX2, HOL1, HXT3, HXT8, HXT11, NFT1, PDR1, PDR3, PDR5, PDR8, PDR10, PDR11, PDR12, PDR15, PDR18, QDR1, QDR2, QDR3, SEO1, SGE1, SIT1, SNQ2, SSU1, STE6, THI7, THI73, TIM8, TPN1, TPO1, TPO2, TPO3, TPO4, YHK8, YMD8, YOR1, e YVC1. En algunas realizaciones, la proteína de transporte de *S. cerevisiae* se selecciona de una o más de FLR1, PDR1, PDR3, PDR5, PDR10, PDR15, SNQ2, TPO1, y YOR1.

ES 3 013 059 T3

En algunas realizaciones, el transportador es al menos 50%, al menos 60% idéntico, al menos 70% idéntico, al menos 80% idéntico, o al menos 90 o 95% idéntico a XP_013706116.1 (de *Brassica napus*), NP_001288941.1 (de *Brassica rapa*), NEC1 (de *Petunia hybrida*), y SWEET13 (de *Triticum urartu*).

- 5 En diversas realizaciones con respecto a la biosíntesis de RebM, el procedimiento da como resultado al menos 40% de conversión, o al menos 50% de conversión, o al menos 75% de conversión de esteviósido, esteviolbiónido, y RebA a RebM. En algunas realizaciones, la proporción entre RebM y RebD es de al menos 2:1, o al menos 4:1, o al menos 6:1, o al menos 8:1, o al menos 9:1, o al menos 10:1, o al menos 15:1, o al menos 20:1.

- 10 El procedimiento puede realizarse mediante fermentación por lotes, fermentación alimentada por lotes, fermentación continua o fermentación semicontinua. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el procedimiento se lleva a cabo mediante fermentación por lotes o fermentación alimentada por lotes con tiempos de incubación inferiores a aproximadamente 72 horas, o en algunas realizaciones, inferiores a aproximadamente 48 horas, o inferiores a aproximadamente 24 horas.

- 15 Mientras que las enzimas UGT nativas son generalmente enzimas vegetales (que a menudo tienen temperaturas óptimas en el intervalo de 20-24° C) o se derivan de enzimas vegetales, la presente divulgación en algunas realizaciones permite la producción del producto glicosilado a alto rendimiento en células microbianas (por ejemplo, células bacterianas tales como *E. coli*), con productividad enzimática a temperaturas de aproximadamente 24° C o más, tal como de aproximadamente 24° C a aproximadamente 37° C, o de aproximadamente 27° C a aproximadamente 37° C, o de aproximadamente 30° C a aproximadamente 37° C.

- 20 En algunas realizaciones, el medio de fase de crecimiento o de producción puede contener uno o más detergentes en una cantidad suficiente para mejorar la permeabilidad celular, sin impacto significativo en el crecimiento o la viabilidad. Los detergentes de ejemplo incluyen Tween 20, Triton X-100 y SDS, entre otros.

En algunas realizaciones, el procedimiento es escalable para producción a gran escala. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el tamaño del cultivo es de al menos aproximadamente 100 L, al menos aproximadamente 200 L, al menos aproximadamente 500 L, al menos aproximadamente 1000 L o al menos aproximadamente 10000 L.

- 25 En diversas realizaciones, los procedimientos incluyen además recuperar producto glicosilado del cultivo celular o de lisados celulares. En algunas realizaciones, el cultivo produce al menos aproximadamente 100 mg/L, o al menos aproximadamente 200 mg/L, o al menos aproximadamente 500 mg/L, o al menos aproximadamente 1 g/L, o al menos aproximadamente 2 g/L, o al menos aproximadamente 5 g/L, o al menos aproximadamente 10 g/L, o al menos aproximadamente 20 g/L, o al menos aproximadamente 30 g/L, o al menos aproximadamente 40 g/L, o al menos aproximadamente 50 g/L del producto glicosilado, que en algunas realizaciones se extrae del medio de cultivo.

- 30 En algunas realizaciones, los productos glicosilados (por ejemplo, RebM) se purifican a partir de componentes del medio. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los procedimientos comprenden separar los medios de crecimiento de las células huésped, y aislar los productos de glicosilación deseados (por ejemplo, RebM) de los medios de crecimiento. En algunas realizaciones, el producto como RebM se extrae de manera adicional del material celular.

- 35 En algunos aspectos, la invención proporciona procedimientos para fabricar un producto que comprende un producto glicosilado, tal como RebM. El procedimiento comprende la incorporación del glucósido de esteviol diana (producido de acuerdo con la presente divulgación) en un producto, tal como un alimento, bebida, producto de cuidado bucal, edulcorante, agente aromatizante, u otro producto. Los glicósidos de esteviol purificados, preparados de acuerdo con la presente invención, pueden utilizarse en una variedad de productos, incluidos, entre otros, alimentos, bebidas, 40 texturantes (por ejemplo, almidones, fibras, gomas, grasas y miméticos de grasas, y emulsionantes), composiciones farmacéuticas, productos de tabaco, composiciones nutracéuticas, composiciones para la higiene bucal, y composiciones cosméticas. Los ejemplos no limitativos de sabores para los que se puede utilizar RebM en combinación incluyen lima, limón, naranja, fruta, plátano, uva, pera, piña, mango, almendra amarga, cola, canela, azúcar, algodón de azúcar y sabores de vainilla. Los ejemplos no limitativos de otros ingredientes alimentarios incluyen 45 sabores, acidulantes, y aminoácidos, colorantes, agentes de carga, almidones modificados, gomas, texturizantes, conservantes, antioxidantes, emulsionantes, estabilizantes, espesantes y agentes gelificantes.

- En algunos aspectos, la invención proporciona procedimientos para fabricar un producto edulcorante que comprende una pluralidad de edulcorantes de alta intensidad, dicha pluralidad incluyendo dos o más de un glucósido de esteviol, un mogrósido, sucralosa, aspartamo, neotamo, advantamo, acesulfamo potásico, sacarina, ciclamato, neohesperidina 50 dihidrocalcona, gnetifolina E, y/o piceatannol 4'-O-β-D-glucopiranosido. El procedimiento puede comprender además la incorporación del producto edulcorante a un alimento, bebida, producto de cuidado bucal, edulcorante, agente aromatizante u otro producto, incluidos los descritos anteriormente.

- Los glucósidos de esteviol diana, tal como RebM, y las composiciones edulcorantes que lo comprenden, pueden utilizarse en combinación con diversas sustancias fisiológicamente activas o ingredientes funcionales. Los ingredientes 55 funcionales generalmente se clasifican en categorías tal como carotenoides, fibra alimentaria, ácidos grasos, saponinas, antioxidantes, nutracéuticos, flavonoides, isotiocianatos, fenoles, esteroides y estanoles vegetales (fitoesteroides y fitoesteroides); polioles; prebióticos, probióticos; fitoestrógenos; proteína de soja; sulfuros/tioles;

aminoácidos; proteínas; vitaminas; y minerales. Los ingredientes funcionales también pueden clasificarse en función de sus beneficios para la salud, tal como cardiovasculares, reductores del colesterol, y antiinflamatorios.

Además, los glicósidos de esteviol diana, tal como RebM, y las composiciones edulcorantes obtenidas de acuerdo con la presente invención, pueden aplicarse como edulcorante de alta intensidad para producir bebidas y productos alimenticios sin calorías, reducidos en calorías o para diabéticos con características de sabor mejoradas. También puede utilizarse en bebidas, alimentos, productos farmacéuticos y otros productos en los que no puede emplearse azúcar. Además, el RebM y las composiciones edulcorantes pueden utilizarse como edulcorante no sólo para bebidas, alimentos y otros productos dedicados al consumo humano, sino también en piensos y forrajes con características mejoradas.

Los ejemplos de productos en los que pueden utilizarse glicósidos de esteviol diana y composiciones edulcorantes incluyen, entre otros, bebidas alcohólicas tal como vodka, vino, cerveza, licor y sake, etc.; zumos naturales; bebidas refrescantes; refrescos carbonatados; bebidas dietéticas; bebidas sin calorías; bebidas y alimentos reducidos en calorías; bebidas de yogur; zumos instantáneos; café instantáneo; tipos de bebidas instantáneas en polvo; productos enlatados; siropes; pasta de soja fermentada; salsa de soja; vinagre; aderezos; mayonesa; ketchups; curry; sopa; caldo instantáneo; salsa de soja en polvo; vinagre en polvo; tipos de galletas; galleta de arroz; galletas saladas; pan; chocolates; caramelo; caramelo; goma de mascar; gelatina; pudín; frutas y verduras en conserva; nata fresca; confitura; mermelada; pasta de flores; leche en polvo; helado; sorbete; verduras y frutas envasadas en botellas; judías enlatadas y hervidas; carne y alimentos hervidos en salsa azucarada; productos alimenticios vegetales agrícolas; marisco; jamón; salchichas; jamón de pescado; salchichas de pescado; pasta de pescado; productos de pescado frito; productos de marisco seco; productos alimenticios congelados; algas en conserva; carne en conserva; tabaco; productos medicinales; y muchos otros.

Durante la fabricación de productos tal como alimentos, bebidas, productos farmacéuticos, cosméticos, productos de mesa y goma de mascar, pueden utilizarse los procedimientos convencionales tales como mezclado, amasado, disolución, decapado, permeación, percolación, espolvoreado, atomización, infusión y otros procedimientos.

Las realizaciones de la invención se demuestran en los ejemplos siguientes.

Ejemplos

La Tabla 2 muestra el contenido de glicósidos de esteviol de tres lotes de extracto de hoja de stevia. Dos intermediarios, RebA y esteviósido, en la vía hacia RebM, son los dos glucósidos primarios de los lotes.

Tabla 2 Composición de Glicósidos de Esteviol de Extracto de Hoja de Stevia Disponible

%	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Rebaudiósido A	38,2	10,5	30,3
Esteviósido	8,5	9,0	18,4
Rebaudiósido C	12,9	4,2	16,6
Rebaudiósido B	4,3	7,1	1,2
Rubusósido	5,0	2,2	2,0
Rebaudiósido F	2,0	2,7	2,1
Esteviolbiósido	0,3	3,7	0,3
Rebaudiósido D	0,2	2,1	0,9
Dulcósido A	0,9	0,4	0,5

La FIG. 4 muestra la bioconversión de los glicósidos de esteviol glicosilados intermediarios. En el experimento, se administró 0,2 mM de esteviolbiósido a cepas modificadas de *E. coli* en placas de 96 pocillos. La formación del producto se examinó al cabo de 48 horas. La bioconversión de células enteras incluso de un intermediario temprano como el esteviolbiósido es posible, pero para la *E. coli* nativa el sustrato glicosilado no está disponible para las enzimas UGT (la cepa 5 muestra una actividad sustancial, mientras que las cepas 3 y 4 muestran una actividad insignificante). Los detalles de las cepas se describen en la FIG. 8. Los valores indicados en FIG. 4 son la concentración de

compuestos en relación con el control (la concentración de cada compuesto se divide por la concentración total de estos compuestos para el control de vector vacío). Las modificaciones contenidas en la cepa 5 demuestran la bioconversión del esteviolbiónido en RebM.

5 Cada una de las cepas 1-5 contenía un BAC (cromosoma artificial bacteriano), es decir, un plásmido de copia única, que expresa cuatro enzimas UGT por separado: MbUGTC13, MbUGT1.2_2, MbUGTc19_2 y 76G1_L200A. El control contenía el mismo esqueleto BAC, pero sin las enzimas UGT.

10 La FIG. 8 muestra modificaciones genéticas para aumentar el flujo nativo de *E. coli* a UDP-glucosa, un sustrato crítico para las UGT en la vía RebM. Un flujo mayor que el nativo hacia la UDP-glucosa puede permitir una mayor formación de RebM al aumentar la cantidad de sustrato disponible para las UGT. Las modificaciones resultantes en la cepa 5 también dan lugar a la capacidad de la célula para convertir los glicósidos de esteviol alimentados en RebM. Para las cepas 2 y 3, se suprimieron las enzimas que consumen UDP-glucosa (ushA, galETKM). La cepa 4 se construyó a partir de la cepa 3 suprimiendo una enzima (pgi) que consume un precursor de la UDP-glucosa, la glucosa-6-fosfato (G6P). La cepa 5 se construyó a partir de la cepa 4 mediante la sobreexpresión de dos enzimas que se utilizan para convertir G6P en UDP-glucosa (pgm, galU) a través de glucosa-1-fosfato (G1P).

15 La FIG. 5 muestra la conversión de dos intermediarios disponibles comercialmente que se encuentran en el extracto de hoja, esteviósido y RebA, en RebM. También se muestra la bioconversión del núcleo de esteviol. Los valores se expresan como porcentaje de la composición total de glicósidos de esteviol. La conversión de esteviol en RebM por todas las cepas muestra que todas las cepas son capaces de formar RebM. Al igual que en el caso del esteviolbiónido, tanto el esteviósido como RebA se convierten en RebM, pero sólo en la cepa 5. Es probable que sólo la cepa 5 ponga glicósidos de esteviol a disposición de las enzimas UGT. Para la conversión a partir de esteviósido y RebA, la relación RebD:RebM favorece fuertemente a RebM (1:20). El RebM fue secretado en el medio.

20 La FIG. 6 muestra la bioconversión de glicósidos de esteviol en placas de 96 pocillos. Para estos estudios, 76G1_L200A se sustituyó por MbUGT1-3_1.5. Para cinco compuestos principales de la vía RebM, se muestran las concentraciones de compuestos con o sin enzimas UGT expresadas. Las cepas se alimentaron con 0,5 g/L de extracto de hoja de esteviósido/RebA y se incubaron con sustrato durante 48 horas antes del muestreo. Como se muestra, las células producen casi exclusivamente RebM, con sólo pequeñas cantidades de Rebl y RebD.

25 La cepa se utilizó para experimentos iniciales en biorreactores. En particular, la cepa productora de RebM se inoculó a partir de un banco de células de trabajo en un tubo de centrifuga de 50 ml que contenía 10 ml de caldo LB (Luria-Bertani) con antibióticos adecuados. La primera semilla se cultivó durante 20 horas en una incubadora con agitación a 37°C. Transcurridas 20 horas, se inició el cultivo de la segunda semilla por inoculación de 100 ml de medio de fermentación en un matraz Erlenmeyer de 500 ml con la primera semilla. Esta segunda semilla se cultivó durante 10 horas antes de su transferencia a los biorreactores, cada uno de los cuales contenía 170 ml de medio de fermentación. El muestreo se realizó cada 10 horas. Los metabolitos relevantes en el medio se cuantificaron mediante LC-MS-MS y YSI. La densidad celular se midió con un espectrofotómetro a una absorbancia de 600 nm. La FIG. 7 muestra la bioconversión de un extracto de hoja de esteviósido/RebA a escala de biorreactor. Para cinco compuestos principales de la vía RebM, se tomaron muestras de las concentraciones de compuestos en los medios en varios puntos de tiempo a lo largo de la fermentación. Las cepas se alimentaron con 2 g/L del extracto de hoja de esteviósido/RebA y se incubaron con sustrato durante un total de 30 horas. Como se muestra en la FIG. 7, esteviósido y RebA se pierden con el tiempo, con el correspondiente aumento de productos altamente glicosilados como RebM, Rebl y RebD.

30 Las enzimas UGT que convierten intermediarios de la vía tal como esteviolbiónido, esteviósido y RebA a RebM se expresan en el citoplasma de *E. coli* y por lo tanto requieren que los intermediarios estén disponibles para las enzimas UGT, probablemente a través de la acción de un transportador o a través de una mayor permeabilidad de la membrana.

35 Los glicósidos de esteviol son moléculas grandes que probablemente no son captadas por cepas nativas de *E. coli* nativas. Esto explicaría la conversión insignificante de esteviolbiónido en RebM por parte de la cepa 1. Las cepas 1-4 pueden captar un intermediario anterior no glicosilado (esteviol) y convertirlo en RebM, lo que sugiere que la razón de la conversión insignificante es la falta de captación de glicósidos de esteviol en el citoplasma, y no la inactividad de las enzimas UGT en los intermediarios de la vía en estas condiciones.

45

SECUENCIAS

>SrUGT85C2 [*Stevia rebaudiana*]

(SEQ ID NÚM.:1)

MDAMATTEKKPHVIFIPFPAQSHIKAMLKLAQLLHHKGLQITFVNTDFIHNQFLESSGPHCLDG
APGFRFETIPDGVSHSPEASIPRESLLRSIETNFLDRFIDLVTKLPDPPTCIIISDGFLSVFTI
DAAKKGIPVMMYWTLAACGFMGFYHIHSLIEKGFAPLKDASYLTNGYLDTVIDWVPGMEGIRL
KDFPLDWSTDLNDKVLMTTEAPQRSHKVSHHIFHTFDELEPSIIKTLRLRYNHIYTIIGPLQLL
LDQIPEEKQTGITSLHGYSLVKEEPECFQWLQSKEPNSVVYVNFSTTVMSLEDMTEFGWGLA
NSNHYFLWIIIRSNLVIGENAVLPELEEHIIKRGFIASWCSEQKVLKHPVGGFLTHCGWGSTI
ESLSAGVPMICWPYSWDQLTNCRYICKEWVGLMGTKVKRDEVKRLVQELMGEKGGHKMRNKAK
DWKEKARIAIAPNGSSSLNIDKMVKEITVLRN

5 >SrUGT74G1 [*Stevia rebaudiana*]

(SEQ ID NÚM.:2)

MAEQQKIKKSPHVLIPFPLQGHINPFIQFGKRLISKGVKTLVTTIHTLNSTLNHSNTTTTTSI
ETQATSDGCDEGGFMSAGESYLETFKQVGSKSLADLIKKLQSEGTTIDAIYDSMTEWVLDVAI
EFGIDGGSFFTQACVNSLYYHVHKGLISLPLGETVSVPGFPVLQRWETPLILQNHQIQSPWS
QMLFGQFANIDQARWVFTNSFYKLEEEVIEWTRKIWNLKVIGPTLPSPMYLDKRLDDDKDNGFNL
YKANHHECMNWLDDKPKESVVYVAFGLSVKHGPEQVEEITRALIDSDVNFLWVIKHKKEGKLE
NLSEVIKTGKGLIVAWCKQLDVLAEVSGCFVTHCGFNSTLEAISLGVVVPVAMPQFSDQTTNAK
LLDEILGVGVVRKADENGIIVRRGNLASCIKMIMEEERGVIRKNAVKKWDLAKVAVHEGGSSDN
DIVEFVSELIKA

>SrUGT76G1 [*Stevia rebaudiana*]

(SEQ ID NÚM.:3)

MENKTETTVEERRRRIILFPVFPQGHINPILQLANVLYSKGFSITIFHTNFNPKPKTSNYPHFTFR
FILDNDPQDERISNLPTHGPIAGMRIPIINEHGADELRRLELMLLASEEDEEVSCLITDALWY
FAQSVADSLNLRRLVMTSSLENFHAVSLPQFDELGYLDPDDKTRLEEQASGFPMLKVKDIKS
AYSNWQILKEILGKMIKQTKASSGVIWNSFKELEESELETVIREIPAPSFLIPLPKHLTASSSS
LLDHDRTVFQWLDQPPSSVLYVSFGSTSEVDEKDFLEIARGLVDSKQSFVWVVRPGFVKGSTW
VEPLPDGFLGERGRIVKWPQQEVLAHGAIAGFWTHSGWNSTLESVCEGVPMTFSDFGLDQPLN
ARYMSDVLKGVVYLENGWERGEIANAIRVMVDEEGEYIRQNARVLKQKADVSLMKGGSSYESL
ESLVSYISSL

10 >SrUGT91D1 [*Stevia rebaudiana*]

(SEQ ID NÚM.:4)

MYNVTYHQNSKAMATSDSIVDDRKQLHVATFPWLAFGHILPFLQLSKLIAEKGHKVSFLSTTRN
IQRSSHSISPLINNVQTLTPRVQELPEDAEATTDVHPEDIQYLKKAVDGLQPEVTRFLEQHS
PDWIIYDFTHYWLPSIAASLGISRAYFCVITPWTIAYLAPSSDAMINDSDGRTTVEDLTPPKWFP
FPTKVCWRKHDLARMEPYEAPGISDGYRMGMVFKGSDCLLFCYHEFGTQWLPLETLHQVPVV
PVGLLPPEIPGDEKDETVVSIKKWLDGKQKGSVVYVALGSEALVSQTEVVVELALGLELSGLPFV
WAYRKPKGPAKSDSVELPDGFVERTDRGLVWTSWAPQLRILSHESVCGFLTHCGSGSIVEGLM
FGHPLIMLPIFCDQPLNARLLEDKQVGIETPRNEEDGCLTKESVARSLRSVVVENEGETYKANA
RALSKIYNDTKVEKEYVSQFVDYLEKNARAVAIKHES

>SrUGT91D2 [*Stevia rebaudiana*]

15 (SEQ ID NÚM.:5)

MATSDSIVDDRKQLHVATFPWLAFGHILPYLQLSKLIAEKGHKVSFLSTTRNIQRSSHSISPLI
NVVQTLTPRVQELPEDAEATTDVHPEDIQYLKKAASDGLQPEVTRFLEQHS PDWIIYDYTHYWL
PSIAASLGISRAHFSVTPWAIAYMGPSADAMINGSDGRTTVEDLTPPKWFPFPTKVCWRKHDL
ARLVYPYKAPGISDGYRMGLVVKGSDCLLSCYHEFGTQWLPLETLHQVPVVVGLLPPEVPGD
EKDETVVSIKKWLDGKQKGSVVYVALGSEVLVSQTEVVVELALGLELSGLPFVWAYRKPKGPAK
SDSVELPDGFVERTDRGLVWTSWAPQLRILSHESVCGFLTHCGSGSIVEGLMFGHPLIMLPIFG
DQPLNARLLEDKQVGIETPRNEEDGCLTKESVARSLRSVVVEKEGEIYKANARELSKIYNDTKV
EKEYVSQFVDYLEKNTRAVAIKHES

>SrUGT91D2e [*Stevia rebaudiana*]

(SEQ ID NÚM.:6)

MATSDSIVDDRKQLHVATFPWLAFGHILPYLQLSKLIKAEKHKVSEFLSTTRNIQRLSSHISPLI
NVVQTLTPRVQELPEDAEATTDVHPEDIPLYLKKASDGLQPEVTRFLEQHPDWIYDYTHYWLP
SIAASLGISRAHFSVTPWAIAYMGPSADAMINGS DGRITVEDLTPPKWFPFPTKVCWRKHDL
ARLVPHYKAPGISDGYRMGLVLKGSDCLLSKCYHEFGTQWLPLETLHQVFPVVPVGLLPPEIPGD
EKDETWVSIKKWLDGKQKGSVVYVALGSEVLVSQTEVVELALGLELSGLPFVWAYRKP KGP
DSVELPDGFVERTRDRGLVWTSWAPQLRILSHESVCGFLTHCGSGSIVEGLMFGHPLIMLPIFG
DQPLNARLLEDKQVGIETPRNEEDGCLTKESVARSLRSVVVEKEGEIYKANARELSKIYNDTKV
EKEYVSQFVDYLEKNARAVAIDHES

> OsUGT1-2 [*Oryza sativa*]

5 (SEQ ID NÚM.:7)

MDSGYSSSYAAAAGMHVVICPWLAFGHLLPCLDLAQR LASRGHRVSVFVSTPRNISR LPPVRPAL
APLVAFVALPLPRVEGLPDGAE STNDVPHDRPDMVELHRRAFDGLAAPFSEFLGTACADWVI
VDFHHWAAAAALEHKVPCAMMLLGS AHMIAS IADRRLEAETESPAAGQGRPAAAPT FEV
LIRTKGSSGMSLAERFSLT LSRSSLVVG RSCVEFEPETVPLLSTLRGKPITFLGLMPPLHEGR
EDGEDATVRWLDAQPAKSVVYVALGSEVPLGVEK VHELALGLELAGTRFLWALRKPTGVSDADL
LPAGFEERTRGRGVVATRWV PQMSILAHAAVGAFLTHCGWNSTIEGLMFGHPLIMLPIFGDQGP
NARLIEAKNAGLQVARNDGDGSFDREGVAAAIRAVAVEEESKVFQAKAKKLQEI VADMACHE
RIDGFIQQLRSYKD

>MbUGTC19 [Permutante circular]

(SEQ ID NÚM.:8)

MAECMNWLDKPKESVVYVAFGSLVKHGPEQVEEITRALIDSDVNF LWVIKHKEEGKLPENLSE
VIKTGKGLIVAWCKQLDVL AHSVGC FVTHCGFNSTLEAISLGVV VAMPQFSDQTTNAKLLDE
ILGVGVRVKADENGIVRRGNLASC IKMIMEEERGV IIRKNAVKWKDLAKVAVHEGGSSDNDIVE
FVSELIKAGSGEQKIKKSPH VLLIPFPLQGHINPFIQFGKRLISKGVKTTLVTTIHTLNSTLN
HSNTTTT SIEIQAISDGCDEGGEMSAGESYLETFKQVGSKSLADLIKKLQSEGT TIDAIYDSM
TEWVLDVAIEFGIDGGSFFTQACVVNSLYYHVHKG LISLPLGETVSVVPGFPVLQRWETPLILQN
HEQIQSPWSQMLFGQFANIDQARWVFTNSFYKLEEEVIEWTRKIWNLKVIGPTLPSMYLDRKLD
DDKDNGFNLYKANHH

10 >MbUGT1,2 [Permutante circular].

(SEQ ID NÚM.:9)

MAGSSGMSLAERFSLT LSRSSLVVG RSCVEFEPETVPLLSTLRGKPITFLGLMPPLHEGRREDG
EDATVRWLDAQPAKSVVYVALGSEVPLGVEK VHELALGLELAGTRFLWALRKPTGVSDADLPA
GFEERTRGRGVVATRWV PQMSILAHAAVGAFLTHCGWNSTIEGLMFGHPLIMLPIFGDQGP
NARLIEAKNAGLQVARNDGDGSFDREGVAAAIRAVAVEEESKVFQAKAKKLQEI VADMACHE
RIDGFIQQLRSYKDDSGYSSSYAAAAGMHVVICPWLAFGHLLPCLDLAQR LASRGHRVSVFVSTPRN
ISR LPPVRPALAPLVAFVALPLPRVEGLPDGAE STNDVPHDRPDMVELHRRAFDGLAAPFSEFLG
TACADWVI DVDFHHWAAAAALEHKVPCAMMLLGS AHMIAS IADRRLEAETESPAAGQGRPAA
APT FEVARMKLIRTK

>MbUGT1-3 [Permutante circular].

(SEQ ID NÚM.:10)

MANWQILKEILGKMIKQTKASSGVIWNSFKELEESELETVIREIPAPSFLIPLPKHLTASSSSL
LDHDRTVFQWLDQPPSSVLYVSFGSTSEVDEKDFLEIARGLVDSKQSF LWVVRPGFVKGSTWV
EPLPDGFLGERGRIVKVV PQQEVLAHGAIGAFWTHSGWNSTLESVCEGVPMI FSDFGLDQPLNA
RYMSDYLVKGVYLENGWERGETANAIRVMVDEGEYIRQNARVLKQKADVSLMKGGSSYESLE
SLVSYISSLENKTE TTVRRRRIILFPVVFQGHINPILQLANVLYSKGFSITIFHTNFNKPKTS
NYPHFTFRFILDNDPQDERISNLPTHGPLAGMRIPI INEHGADELRRLELELLMLASEEDEVSC
LITDALWYFAQSVADSLNLRRLVLMTSSLFNFHAHVSLPQFDELGYLDPDDKTRLEEQASGFPM
LKVKDIKSAYS

15

>MbUGT1,2,2 [Permutante circular].

(SEQ ID NÚM.:11)

MATKGS SGM SLAERFWLTL SRSSLVVGRSCVFEFETVPLLSTLRGKPIITFLGLMPPLHEGRRE
DGEDATVRWLDAQPAKSVVYVALGSEVPLGVEKVELALGLELAGTRFLWALRKPTGVSDADLL
PAGFEERTRGRGVVATRWVPQMSILAHAAVGAFLTHCGWNSTIEGLMFGHPLIMLPIFGDQGP
NARLIEAKNAGLQVARNDGDSFDREGVAAAIRAVAVEEESKVFQAKAKKLQEIIVADMACHERY
IDGFIQQLRSYKDDSGYSSSYAAAAGMHVVICPWLAFGHLLPCLDLAQLASRGHRVSVFVSTPR
NISRLPPVRPALAPLVAFAVALPLPRVEGLPDGAESTNDVPHDRPDMVELHRRAFDGLAAPFSEF
LGTACADWVIVDVFFHHWAAAAALEHKVPCAMMLLGS AEMIASIADERLEHAETESPAAGQGRP
AAAPTFEVARMKLIR

>MbUGTC19-2 [Permutante circular].

5 (SEQ ID NÚM.:12)

MANHHECMNWLD DPKESVYVAFGSLVKHGPEQVEEITRALIDSDVNFLWVIKHKKEEGKLPEN
LSEVIKTGKGLIVAWCKQLDVLAHESVGC FVTHCGFNSTLEAISLGVPVVAMPQFSDQTNAKL
LDEILGVGVVRVKADENGLVRRGNLASC IKMIMEEERGVIIRKNAVWKWDLAKVAVHEGGSSDND
IVEFVSELIKAGSGEQKIKKSPHVL LIPFLQGHINPFIQFGKRLISKGVKTTLVTTIHTLNS
TLNHSNTTTTTSIEIQAISDGCDEGGFMSAGESYLETFKQVGSKSLADLIKKLQSEGTTIDAIY
DSMTEWVLDVAIEFGIDGGSFFTQACVVNSLYYHVHKG LLSLPLGETVSVPGFPVLQRWETPLI
LQNHQIQSPWSQMLFGQFANIDQARWVFTNSFYKLEEBEVIEWTRKIWNLKVIGPTLPSMYL DK
RLDDDDKDN GFNLYKA

>MbUGTC13 (*Stevia rebaudiana* UGT85C2, P215T)

(SEQ ID NÚM.:13)

MADAMATTEKKPHVIFIPFPAQSHIKAMLKLAQLLHHKGLQITFVNTDFIHNQFLESSGPHCLD
GAPGERFETIPDGVSHSPEASIPRESLLRSIETNFLDRFIDLVTKLPDPPTCII SDGFLSVFT
IDAACKLGI PVM MYWTLAACGFMGFYHIHSLIEKGFAPLKDASYLTNGYLDTVI DWVPGMEGIR
LKDFPLDWSTDLNDKVLMTTEATQRSHKVSHHI FHTFDELEPSIIKTL SLRYNHIYTI GPLQL
LLDQIPEEKQGTGITS LHGYSLVKKEPECFQWLQSKEPNSVYVNF GSTTVM SLEDMTEFGWGL
ANSNHYFLWI IRSNLVIGENAVLPPELEEHIKKRGFIASWCSQEKVLKHP SVGGFLTHCGWGST
IESLSAGVPMICWPYSWDQLTNCRYICKEWVGLMGTKVKRDEVKRLVQELMGEGGHKMRNKA
KDWKEKARIAIAPNGSSSLNIDKMVKEITVLARN

10 >76G1_L200A [*Stevia rebaudiana*, L200A]

(SEQ ID NÚM.:14)

MAENKTETT VRRRRRIILFPVPFQGHINPILQLANVLYSKGFSITIFHTNFNKPKTSNYPHFTF
RFILDNDPQDERISNLPTHGFLAGMRIPIINEHGADELRRLELLMLASEEDEEV SCLITDALW
YFAQSVADSLNLRRLVLMTSSLFNFAHVSLPQFDELGYLDPDDKTRLEE QASGF PMLKVKDIK
SAYSNWQIAKEILGKMIKQTKASSGVIWNSFKEELESELETVIREIPAPSFLIPLPKHLTASSS
SLLDH DRTVFQWLDQQPPSSVLYV SFGSTSEVDEKDFLEIARGLVDSKQSF LWVVRPGFVKGST
WVEPLPDGFLGERGRIVKWVPQQEVLAHGAIGAFWTHSGWNSTLESVCEGVPMI FSDFGLDQPL
NARYMSDVLKVG VYLENGWERGEIANAIRVMVDEEGEYIRQNARVLKQKADVSLMKGGSSYES
LESLSYISSL

>MbUGT1-3_1 [Permutante circular].

(SEQ ID NÚM.:15)

MAFLWVVRPGFVKGSTWVEPLPDGFLGERGRIVKWVPQQEVLAHGAIGAFWTHGGWNSTLESVC
EGVPMI FSDFGLDQPLNARYMSDVLKVG VYLENGWERGEIANAIRRLMVDEEGEYIRQNARVLK
QKADVSLMKGGSSYESLESLSYISSLGGSGGSGGSRRRRIILFPVPFQGHINPMLQLANVLYS
KGFSITIFHTNFNKPKTSNYPHFTFRFILDNDPQDERISNLPTHGFLAGMRIPIINEHGADEL
RELELLMLASEEDEEV SCLITDALWYFAQSVADSLNLRRLVLMTSSLFNFAHVSLPQFDELGY
LDPDDKTRLEE QASGF PMLKVKDIKSAYSNWQIAKEILGKMIKQTKASSGVIWNSFKEELESEL
ETVIREIPAPSFLIPLPKHLTASSSSLLDH DRTVFQWLDQQPPSSVLYV SFGSTSEVDEKDFLE
IARGLVDSQS

15

>MbUGT1-3_1.5 [Permutante circular]

(SEQ ID NÚM.:16)

MAFLWVVRPGFVKGSTWVEPLPDGFLGERGRIVKWPQQEVLAHGAIGAFWTHGGWNSTLESVC
EGVPMIFSDFGLDQPLNARYMSDVLKGVVYLENGWERGEIANAIRRLMVDEEGEYIRQNARVLK
QKADVSLMKGGSSYESLESLSYISSLGSGGSGRRRIILFPVFPQGHINPMLQLANVLYS
KGFSITIFHTNFKPKTSNYPHFTFRFILDNDPQTTHTGFLAGMRIPINEHGADELRELELQM
LASEEDEEVSLITDALWYFAQSVADSLNLPRLVLMTSSLFNFAHVSLLPQFDELGYLDPDDKT
RLEEQASGFPMLKVKDIKSAYSNWQIAKEILGKMIKQTKASSGVIWNSFKELEESELETVIREI
PAPSFLIPLPKHLTASSSSLLDHDRTVFQWLDQQPPSSVLYVSFGSTSEVDEKDFLEIARGLVD
SQS

>MbUGT1-3_2 [Permutante circular].

5 (SEQ ID NÚM.:17)

MAFLWVVRPGFVKGSTWVEPLPDGFLGERGRIVKWPQQEVLAHGAIGAFWTHGGWNSTLESVC
EGVPMIFSDFGLDQPLNARYMSDVLKGVVYLENGWERGEIANAIRRLMVDEEGEYIRQNARVLK
QKADVSLMKGGSSYESLESLSYISSLGSGGSGRRRIILFPVFPQGHINPMLQLANVLYSKGF
SITIFHTNFKPKTSNYPHFTFRFILDNDPQDERISNLPTHGFLAGMRIPINEHGADELRELE
ELQMLASEEDEEVSLITDALWYFAQSVADSLNLPRLVLMTSSLFNFAHVSLLPQFDELGYLDP
DDKTRLEEQASGFPMLKVKDIKSAYSNWQIAKEILGKMIKQTKASSGVIWNSFKELEESELETV
IREIPAPSFLIPLPKHLTASSSSLLEHDRTVFQWLDQQPPSSVLYVSFGSTSEVDEKDFLEIAR
GLVDSQS

>SgUGT720-269-1 (*Siraitia grosvenorii*)

(SEQ ID NÚM.:18)

MEDRNAMDMSRIKYRQPLRPASMVQPRVLLFPFPALGHVVKPFLSLAELLSDAGIDVVFSTLEY
NHRRISNTEALASRFPPLHFETIPDGLFPNESRALADGPLYFSMREGTKPRFRQLIQSLNDGRW
PITCIITDIMLSSPIEVAEEFGIPVIAFCPCSARYLSIHFFIPKLVEEGQIPYADDDPIGEIQG
VPLFEGLLRRNHLPGSWSDKSADISFSHGLINQTLAAGRASALILNTFDELEAPFLTHLSSIFN
KIYTIIGPLHALSKSRLGDSSSASALSGFWKEDRACMSWLDQPPRSVVFVVSFGSTMKMKADEL
REFWYGLVSSGKPFCLVLRSDVVS GGEEAAELIEQMAEEEGAGGKLG MVVEWAAQEKVLSHPAVG
GFLTHCGWNSTVESIAAGVPMWCWPILGDQPSNATWIDRVWKIGVERNREWDRLTVEKMVRAL
MEGQKRVEIQRSMEKLSKLANEKVVRGINLHPTISLKKDTPPTSEHPRHEFENMRGMNYEMLVG
NAIKSPTLTKK

10 >SgUGT94-289-3 (*Siraitia grosvenorii*)

(SEQ ID NÚM.:19)

MTIFFSVEILVLGIAEFAAIAMDAQQGDDTTTILMLPWLGYGHLSAFLELAKSLSRNFHIYFC
STSVNLDAIKPKLPSSFSDSIQFVELHLPSSPEFPHLHTTNGLPPTLMPALHQAFSMAAQHFE
SILQTLAPHLIIYDSLQPWAPRVASSLKIPAINFNTTGVFVISQGLHP IHYPHKSFPFSEFVLH
NHWKAMYSTADGASTERTRKRGEAFLYCLHASC SVILINSFRELEGKMYDYLSVLLNKKVVPVG
PLVYEPNQDGEDEGYSSIKNWLDKKEPSSTVFVVSFGSEYFPSKEEMEEIAHGLEASEVNFIVV
RFPQGDNTSGIEDALPKGFLERAGERGMVVKGWAPQAKILKHWS TGGFVSHCGWNSVMESMMFG
VPIIGVPMHVDQPFNAGLVEEAGVGVEAKRDPDGKIQRDEVAKLIKVVVEKTR EDVRKKAREM
SEILRSKGEEKFDEMVAEISLLLKI

>SgUGT74-345-2 (*Siraitia grosvenorii*)

(SEQ ID NÚM.:20)

MDETTVNGRRASDVVVFAPRHHGMSPLQF SKRLVSKGLRVTFITTSATESLRRLNLPSSS
LDLQVIVSDVPESNDIATLEGYLRSEKATVSKTLADFIDGIGNPKFIVYDSVMPWVQEVARGR
LDAAPFFTQSSAVNHILNHVYGGSLIPAPENTAVSLP SMPVLQAE DLPAFPDDPEVVMNFM TS
QFSNFQDAKWIFNTFDQLECKKQSQVVNWMADRWPIKTVGPTIP SAYLDDGRLEDDRAFGLNL
LKPEDGKNTRQWQWLDSDKTASVLYISFGSLAILQEEQVKELAYFLKDTNLSFLWVLRDSELQK
LPHNFVQETSHRGLVVNWCSQLQVLSHRAVSCFVTHCGWNSTLEALSLGVPMVAIPQWVDQTTN
AKFVADVVRVGVVKKKDERIVTKEELEASIRQVVQGEGRNEFKHNAIKWKKLAKEAVDEGGSS
DKNIEEFVKTI A

15

>SgUGT75-281-2 (*Siraitia grosvenorii*)

(SEQ ID NÚM.:21)

MGDNGDGGEEKKELKENVKKKGKELGRQAIAGEGYINPSLQLARRLISLGVNVTFATTVLAGRRMKN
KTHQTATTTPGLSEATFSDGFDETLKPNGDLTHYFSELRRCGSESLTHLITSAANEGRPITFVI
YSLLLSWAADIASTYDIPSALEFAQPATVLALEYFYFHGYGDTICSKLQDPSSYIELPGLPLLT
SQDMPSFFSPSGPHAFILPPMREQAEFLGRQSQPKVLVNTFDALEADALRAIDKDKMLAIGPLI
PSALLGGNDS SDASFCGDLFQVSEEDYIEWLN SKPDSSVVI SVGSICVLSDEQEDELVHALLN
SGHTFLWVKRSKENNEGKQETDEEKLKLEEQGMVSWCRQVEVLKHPALGCFLTHCGWNSTI
ESLVSGLPVVAFPPQIDQATNAKLIEDVWKTGVRVKANTEGIVEREEIRRCLDLVMGSRDGGQE
EIERNAKKWELARQAIGEGSSSDSNLKTFLWEIDLEI

>SgUGT720-269-4 (*Siraitia grosvenorii*)

5 (SEQ ID NÚM.:22)

MAEQAHDLHVLLFPFPAEGHIKPFCLAEELLCNAGFHVTFLNTDYNHRRLHNLHLLAARFPSL
HFESISDGLPPDQPRDILDPKFFTSICQVTKPLFRELLSYKRISVVQTRPPITCVITDVI FR
FPIDVAEELDIPVFSFCTFSARFMFLYFWIPKLI EDGQLPYPNGNINQKLYGVAPAEGLLRCK
DLPGHWAFADDELKDDQLNFDVDTTASSRSSGLILNTFDDLEAPFLGRLSTIFKKIYAVGPIHSL
LNSHHCGGLWKEDHSCLAWLDSRAAKSVVVFVSGSLVKITSRQLMEFWHGLLNSGKSLFVLRSD
VVEGDDEKQVVEKIEYETKAEKGKWL VVGWAPQEKVLAHEAVGGFLTHSGWNSILESIAGVPMIS
CPKIGDQSSNCTWISKVWKIGLEMEDRYDRVSVETMVRSIMEQEGEKMQKTIAELAKQAKYKVS
KDGTSYQNLECLIQDIKLNQIEGFINNPNSDLLRV

>SgUGT94-289-2 (*Siraitia grosvenorii*)

(SEQ ID NÚM.:23)

MDAQQGHTTTILMLPWVGYGHLLPFLELAKSLSRKLFHIYFCSTSVSLDAIKPKLPPSISDD
SIQLVELRLPSSPELPPHLHTTNGLP SHLMPALHQA FVMAAQHFQVILQTLAPHLIYDILQPW
APQVASSLNI PAINFSTTGASMLSR TLHPHY P SSKFPISEFVLHNNHWRAMYTTADGALTEEGH
KIEETLANCLHTSCGVVLVNSFRELETKYIDYLSVLLNKKVVPVGPLVYEPNQEDEGEDEGYSSIK
NWLDKKEPSSTVFSVFGTEYFPSKEEMEEIAYGLELSEVNFIVVLRFPQGDSTSTIEDALPKGF
LERAGERAMVVKGWAPQAKILKHWS TGGVLSHCGWNSMMEGMMFGVPII AVPMHLDQPFNAGLV
EEAGVGVEAKRSDGKIQRREEVAKSIKEVVIEKTR EDVRKKAREMDTKHGPTYFSRSKVSSFGR
LYKINRPTTLTVGRFWSKQIKMKRE

10 >SgUGT94-289-1 (*Siraitia grosvenorii*)

(SEQ ID NÚM.:24)

MDAQRGHTTTILMFPWLGYGHLSAFL ELAKSLSRNFHIYFCSTSVNLDAIKPKLPSSSSSDSI
QLVELCLPSSPDQLPPHLHTTNALPPHLMPTLHQAFSMAAQHFAAILHTLAPHLIYDSFQPWA
PQLASSLNI PAINFNTTGASVLRMLHATHY P SSKFPISEFVLHDYWKAMYSAAGGAVTKKDHK
TGETLANCLHASC SVILINSFRELEEKYMDYLSVLLNKKVVPVGPLVYEPNQGDEGEDEGYSSIKN
WLDKKEPSSTVFSVFGSEYFPSKEEMEEI AHGLEASEVHFIVVVRFPQGDNTSAIEDALPKGFL
ERVGERGMVVKGWAPQAKILKHWS TGGFVSHCGWNSVMESMMFGVPIIGVPMHLDQPFNAGLAE
EAGVGVEAKRDPDGKIQRDEVAKLIKEVVVEKTR EDVRKKAREMSEILRSKGEEKMDEMVAAS
LFLKI

>XP_022151474.1 ácido 7-deoxiloganético glucosiltransferasa-como [*Momordica charantia*]

(SEQ ID NÚM.:25)

MAQPQTQARVLVFPYPTVGHIKPFLSLAE LLADGGLDVVFLSTEYNHRRIPNLEALASRFPTLH
FDTI PDGLPIDKPRVI IGGELYTSMRDGVKQRLRQVLQSYNDGSSPITCVICDVMLSGPIEAAE
ELGIPVVTFCPY SARYLCAHFVMPKLI EEGQIPFTDGNLAGEIQGVPLFGLLRRDHLPGFVFW
KSLSDVWVSHAF LNQT LAVGRTSALI INTLDELEAPFLAHLSSFDKIYPIGPLDALSKSRLGD
SSSSSTVLTA FWKEDQACMSWLD SQPKSVI FVSFGSTMRMTADKLV EFWHGLVNSGTRFLCVL
RSDIVEGGGAADLIKQVGETNGI VVEWAAQEKVLAHRAVGGFLTHCGWNSTME SIAGVPMMC
WQIYGDQMINATWIGKVKIGIERDDKWRSTVEKMIKELMEGEGKAEIQRSMEKFSKLANDKV
VKGGTSFENLELIVEY LKCLKPSN

15

>XP_022151546.1 ácido 7-deoxiloganético glucosiltransferasa-cómo [*Momordica charantia*]

(SEQ ID NÚM.:26)

MAQPRVLLFPFPAMGHVKPFLSLAELLSDAGVEVVFLSTEYNHRRIPDIGALAARFPTLHFETI
 PDGLPPDQPRVLADGHLVFSMLDGTKPRFRQLIQSLNGNPRPITCIINDVMLSSPIEVAEEFGI
 PVIAFCPCRSARFLSVHFFMPNFIEEAQIPYTDENPMGKIEEATVFEGLLRKDLPLGLWCAKSSN
 ISFSHRFINQTTAAGRASALILNTFDELESPFLNHLSSIFPKIYICIGPLNALSRSRLGKSSSSS
 SALAGFWKEDQAYMSWLESQPPRSVIFVSVFGSTMKMEAWKLAEFWYGLVNSGSPFLFVFRPDCV
 INSGDAAEVMGRGRGMVVEWASQEKVLAHPAVGGFLTHCGWNSTVESIVAGVPMCCPIVADQ
 LSNATWIHKVWKIGIEGDEKWDRTVEMMIKELMESQKGTERTSIEMLSKLANEKVVKGGTSL
 NNFELLVEDIKTLRRPYT

>XP_022151514.1 ácido 7-deoxiloganético glucosiltransferasa-cómo [*Momordica charantia*]

5 (SEQ ID NÚM.:27)

MEQSDSNSDDHQHHVLLFPFPAKGHIKPFCLCLAQLLCCAGLQVTFNLTDHNNHRRIDDRHRRLLA
 TQFPMHLFKSISDGLPPDHPDRLLDGKLIASMRRTVESLFRQILLSSYNGYNGNTNNVNSNGRRP
 PISCVITDVI FSPFVEVAEELGIPVFSFATFSARFLFLYFWIPKLIQEQQLPFPDGKTNQELYG
 VPGAEGTIIRCKDLPGSWSVVEAVAKNDPMNFVKQTLASSRSSGLILNTFEDLEAPFVTHLSNTFD
 KIYTI GPIHSLGTSHCGLWKEDYACLAWLDARPRKSVVFSVFGSLVKTT SRELMEHLWHGLVSS
 GKSFLLVLRSDVVEGEDEEQVVEKILESNNGEGKWL VVGWAPQEEVLAHEAIGGFLTHSGWNSTM
 ESIAAGVPMVCWPKIGDQPSNCTWVSRVWVGLMEERYDRSTVARMARSMMEQEGKEMERRIA
 ELAKRVKYRVGKDGESYRNLESIRDIKITKSSN

>XP_004147933.2 PREDICHO: ácido 7-deoxiloganético glucosiltransferasa-cómo [*Cucumis sativus*].

(SEQ ID NÚM.:28)

MGLSPTDHLVLLFPFPAKGHIKPFCLAHLLCNAGLRVTFLSTEHHHQKLHNLTHLAAQIPSLHF
 QSISDGLSLDHPNLLDGQLFKSMPQVTKPLFRQLLSYKDGTSPIITCVITDLILRFPMDVAQE
 LDIPVFCFSTFSARFLFLYFSIPKLLLEDGQIPYPEGNSNQVLHGIPGAEGLLRCKDLPGYWSVE
 AVANYNPMNFVNQTIATSKSHGLILNTFDELEVFFITNLSKIYKKVYITGPIHSLKKSQVQTY
 EFWKEDHSCLAWLDSQPPRSVMFVSVFGSIVKLVKSSQLKEFWNGLVDSGKAFLLVLRSDALVEET

10

GEDEKQKELVIKEIMETKEEGRWVI VNWAPQEKVLEHKAIGGFLTHSGWNSTLESVAVGVPMV
 SWPQIGDQPSNATWLSKVWIKGVEMEDSYDRSTVESKVRIMEHEDKKMENAIVELAKRVDDR
 SKEGTSYQNLQRLIEDIEGFKLN

>XP_022978164.1 ácido 7-deoxiloganético glucosiltransferasa-cómo [*Cucurbita maxima*]

(SEQ ID NÚM.:29)

MELSHTHHVVLLFPFPAKGHIKPFSLAQLLCCNAGLRVTFLNTDHHHRR IHDNLRLAAQLPTLHF
 DSVSDGLPPEPRNVFDGKLYESIRQVTSSLFRELLVSYNNGTSSGRPPITCVITDVMFRFPIC
 IAEELGIPVFTFSTFSARFLFLYFWIPKLLLEDGQLRYPEQELHGVPGAEGLI RWKDLPGFWSVE
 DVADWDPMNFVNQTLATSRSSGLILNTFDELEAPFLTSLSKIYKKIYSLGPI NSLLKNFQSQPQ
 YNLWKEDHSCMAWLDSQPRKSVVFSVFGSVVVKLTSRQLMEFWNGLVNSGMPFLLVLRSDVIEAG
 EEVVREIMERKAEGRWVIVSWAPQEEVLAHDAVGGFLTHSGWNSTLES LAAGVPMISWPQIGDQ
 TSNSTWISKVVRIGLQLEDGFDSSITETMVRSIMDQTMKKTVAELAERAKNRASKNGTSYRN
 FQTLIQDITNIIETHI

15 >XP_022950128.1 ácido 7-deoxiloganético glucosiltransferasa-cómo [*Cucurbita moschata*]

(SEQ ID NÚM.:30)

MELSPHHLVLLFPFPAKGHIKPFSLAQLLCCNAGARVTFLNTDHHHRR IHDLDRLAAQLPTLHF
 DSVSDGLPPEDES RNVFDGKLYESIRQVTSSLFRELLVSYNNGTSSGRPPITCVITDCMFRFPIC
 IAEELGIPVFTFSTFSARFLFLYFWIPKLLLEDGQLRYPEQELHGVPGAEGLI RCKDLPGFLSDE
 DVAHWKPINFVNQILATSRSSGLILNTFDELEAPFLTSLSKIYKKIYSLGPI NSLLKNFQSQPQ
 YNLWKEDHSCMAWLDSQPPKSVVFSVFGSVVVKLTNRQLVEFWNGLVNSGKPFLLVLRSDVIEAG
 EEVVRENMERKAEGRWVIVSWAPQEEVLAHDAVGGFLTHSGWNSTLES LAAGVPMISWTQIGDQ
 TSNSTWVSKVVRIGLQLEDGFDSTIETMVRSVMDQTMKKTVAELAERAKNRASKNGTSYRN
 FQTLIQDITNIIETHI

>XP_020422423.1 ácido 7-deoxiloganético glucosiltransferasa [*Prunus persica*].

(SEQ ID NÚM.:31)

MAMKQPHVVIIFPFLQGHMKPLLCCLAELLCHAGLHVTVVNTHHNHQRLANRQALSTHFPTLHFE
SISDGLPEDDPRTLNSQLLIALKTSIRPHFRELLKTSISLKAESNDTLVPPPSCIMTDGLVTFEAF
DVAEELGLPILSFNVPCPRYLWTCLCLPKLIENGQLPFQDDDMNVEITGVPGMEGLLHRQDLPG
FCRVKQADHPSLQFAINETQTLKRASALILDVYELDAPCISHMALMFPKIYTLGPHALLNSQ
IGDMSRGLASHGSLWKSIDLNCMTWLDSQPSKSIYVVSFGLTVHLTRAQVIEFWYGLVNSGHPFL
WVMRSDITSGDHQIPAELENGTKERGCIVDWVSQEEVLAHKS VGGFLTHSGWNSTLESIVAGLP
MICWPKLGDHYIISSTVCRQWKIGLQLNENCDSNIESMVQTLMGSKREEIQSSMDAISKLSRD
SVAEGGSSHNLEQLIEYIRNLQHQN

>EOY07351.1 UDP-glucosil transferasa 85A3, putativa [*Theobroma cacao*]

5 (SEQ ID NÚM.:32)

MRQPHVLVLPFPAQGHKPMPLCCLAELLCQAGLRVTFNLTHHSHRRLNQLDLSTRFPTLHFEV
SDGLPEDHPRNLVHFMHLVHSIKNVTKPLLRDLLTSLSLKTDIPVSCIIADGILSFAIDVAEE
LQIKVIIIFRTISSCCLWSYLCVPKLIQQGELQFSDSDMGQKVSSVPEMKGSLRLHDRPYSFGLK
QLEDPNFQFFVSETQAMTRASAVIFNTFDSLEAPVLSQMIPLLPKVYITIGPLHALRKARLGDLS
QHSSFNGLREADHNCITWLDSQPLRSVYVVSFGSHVVLTSSEELLEFWHGLVNSGKRFLWVLRP
DIIAGEKDHNIQIIAREPDLGTKEKGLLDVWAPQEEVLAHPSVGGFLTHCGWNSTLESIMVAGVPM
LCWPKLPDQLVNSSCVSEVWKIGLGLDKMCDRSTVEKMRALMEDRREEVMRSVDGISKLARES
VSHGSSSSNLEMLIQELET

>XP_022155979.1 beta-D-glucosil crocetina beta-1,6-glucosiltransferasa-como [*Momordica charantia*]

(SEQ ID NÚM.:33)

MDAHQQAETHTTILMLPWVGYGHLTAYLELAKALSRRNFHYCYCSTPVNIESIKPKLTIPCSSI
QFVELHLPSDDLPPNLHTTNGLP SHLMPTLHQAFSAAAPLFEEILQTLCPHLLIYDSLQPWAP
KIASLKIIPALNENTSGVSVIAQALHAIHHPDSKFPPLSDFILHNYWKSTYTTADGGASEKTRRA
REAFLYCLNSSGNAILINTFRELEGEYIDYLSLLLNNKKVPIGPLVYEPNQDEDEEYRSIKN
WLDKKEPCSTVFSFGSEYFPSNEEMEEIAPGLEESGANFIWVVRFPKLENRNGIIEEGLLERA
GERGMVIKEWAPQARILRHGSIGGFVSHCGWNSVMEIICGVVPIGVPMRVDQPYNAGLVEEAG
VGVEAKRDPDGKIQRHEVSKLIKQVVVEKTRDDVRKKVAQMSEILRRKGDEKIDEMVALISLLP
KG

10 >XP_022986080.1 beta-D-glucosil crocetina beta-1,6-glucosiltransferasa-como [*Cucurbita maxima*]

(SEQ ID NÚM.:34)

MDAQKAVDTPPTTVLMLPWVGYGHL SAYLELAKALSRRNFHVYFCSTPVNLD SIKPNLI PPPSS
IQFVDLHLPSPELPPHLHTTNGLP SHLKP TLHQAFSAAQHFEAILQTLSPHLLIYDSLQPWA
PRIASSLNIPAINFNTTAVSIIAHALHSVHYPDSKFPFSD FVLHDYWKAKYTTADGATSEKIRR
GAEAFLYCLNASCDVVLVNSFRELEGEYMDYLSVLLKVKVSVGPLVYEPSEGEDEEYWRICK
WLDKEALSTVLVFSFGSEYFPSKEEMEEI AHGLEESEANFIWVVRFPKGEE SCRGI EEALPKGF
VERAGERAMVVKWAPQGKILKHGSIGGFVSHCGWNSVLESIRFGVPIGVPMHLDQPYNAGLL
EEAGIGVEAKRDADGKIQRDQVASLIKRVVVEKTR EDIWKTVREMREVLRRRDDDMIDEMVAEI
SVVLKI

>XP_022156002.1 beta-D-glucosil crocetina beta-1,6-glucosiltransferasa-como [*Momordica charantia*]

(SEQ ID NÚM.:35)

MDARQQAETHTTILMLPWVGYGHL SAYLELAKALSRRNFHYCYCSTPVNIESIKPKLTIPCSSI
QFVELHLPSDDLPPNLHTTNGLP SHLMPALHQAFSAAAPLFEAILQTLCPHLLIYDSLQPWAP
QIASLKIIPALNENTTGVSVIARALHTI HHPDSKFPPLSEIVLHNYWKATHATADGANPEKFRRD
LEALLCCLHSSCNAILINTFRELEGEYIDYLSLLLNNKKVTPIGPLVYEPNQDEE QDEEYRSIKN
WLDKKEPYSTIFVFSFGSEYFPSNEEMEEIARGLEESGANFIWVVRFHKL ENGN GITEEGLLERA
GERGMVIQGWAPQARILRHGSIGGFVSHCGWNSVMEIICGVVPIGVPMGLDQPYNAGLVEEAG
VGVEAKRDPDGKIQRHEVSKLIKQVVVEKTRDDVRKKVAQMSEILRRKGDEKIDEMVALISLLP
KG

15

>XP_022943327.1 beta-D-glucosil crocetina beta-1,6-glucosiltransferasa-como [*Cucurbita moschata*]

(SEQ ID NÚM.:36)

MDAQKAVDTPPTTVLMLPWIGYGHL SAYLELAKALSRRNFHVYFCSTPVNLD SIKPNLIPPPPS
IQFVDLHLPSSPELPPHLHTTNGLP SHLKPTLHQAFSAAAQHFEAILQTLSPHLLIYDSLQPWA
PRIASSLNIPAINFNTAVSIIAHALHSVHYPDSKFPFSD FVLHDYWKAKYTTADGATSEKTRR
GVEAFLYCLNASCDVVLVNSFRELEGEYMDYLSVLLKKKVSVGPLYVYEPSEGEDEEYWRKK
WLDEKEALSTVLVSFGSEYFPPKEEMEEIAHGLEESEANFIWVVRFPKGEESSSRGIEEALPKG
FVERAGERAMVVKKWAPQ GKILKHGSI GG FVSHCGWNSVLESIRFGVPVIGAPMHL DQPYNAGL
LEEAGIGVEAKRDADGKIQRDQVASLIKQVVVEKTREDIWKKVREMRVLRRRDDDDMMI DEMV
AVISVVLKI

>XP_022996307.1 beta-D-glucosil crocetina beta-1,6-glucosiltransferasa-como [*Cucurbita maxima*]

5 (SEQ ID NÚM.:37)

MSSNLFLKISIPFGR LRDSALNCSVFHCKLHLAIAIAMD AQQAAANKSPTATTIFMLPWAGYGH L
SAYLELAKALSTRNFHYFCSTPVSLASIKPRLIPSCSSIQFVELHLPSSDEFPPHLHTTNGLP
SRLVPTFHQAFSEAAQTFEAFLQTLRPHLLIYDSLQPWAPRIASSLNIPAINFFTAGAFVSHV
LRAFHYPDSQFPSSDFVLHSRWKIKNTTAE SPTQAKLPKIGEAIGYCLNASRGVILTNSFRELE
GKYIDYLSVILKKRVFPIGPLYVYQPNQDEEDEDYSRIKNWLD RKEASSTVLVSFGSEFFLSKEE
TEAIAHGLEQSEANFIWGIRFPKGAKKNAIEEALPEGFLERAGGRAMVVEEWVPQ GKILKHGSI
GGFVSHCGWNSAMESIVCGVPIIGIPMQVDQPFNAGILEEAGVGVEAKRSDGKIQRDEVAKLI
KEVVVERTREDIRNKLEKINEILRSRREEKLDELATEISLLSRN

>XP_022957664.1 beta-D-glucosil crocetina beta-1,6-glucosiltransferasa-como [*Cucurbita moschata*]

(SEQ ID NÚM.:38)

MDAQQAAANKSPTASTIFMLPWVGYGHL SAYLELAKALSTRNFHVYFCSTPVSLASIKPRLIPSC
SSIQFVELHLPSSDEFPPHLHTTNGLP AHLVPTIHQAFAAAAQTFEAFLQTLRPHLLIYDSLQP
WAPRIASSLNIPAINFFTAGAFVSHVLRRAFHYPDSQFPSSDFVLHSRWKIKNTTAE SPTQVKI
PKIGEAIGYCLNASRGVILTNSFRELE GKYIDYLSVILKKRVLP IGPPLYVYQPNQDEEDEDYSRI
KNWLD RKEASSTVLVSFGSEFFLSKEETE AIAHGLEQSEANFIWGIRFPKGAKKNAIEEALPEG
FLERVGGRAMVVEEWVPQ GKILKHGNIGGFVSHCGWNSAMESIMCGVPIGIPMQVDQPFNAGI
LEEAGVGVEAKRSDGKIQRDEVAKLIKEVVVERTREDIRNKLEEINEILRTRREEKLDELATE
ISLLCKN

10 >OMO57892.1 UDP-glucuronosil/UDP-glucosiltransferasa [*Corchorus capsularis*]

(SEQ ID NÚM.:39)

MDSKQKKMSVLMFPWLAHGHS PFLELAKKLSKRN FHTFFFSTPINLNSIKSKLSPKYAQSIQF
VELHLP SLPDLPPHYHTTNGLP PHLMTLKKAFDMS SLQFSKILKTLNPDLLVYDFIQPWAPLL
ALS NKIPAVHFLCTSAAMSSFSVHAFKKPCEDFFFPNIYVHG NFMNAKFNNMENCSSDDSI SDQ

DRVLQCFERSTKIIILVKT FEELEGKFM DYLSVLLNKKIVPTG PLTQDPNEDEGDD DERTKLLLE
WL NKKSKSSTVFVSGSEYFLSKEEREEIAYGLELSKVNFIWVIRFPLGENKTNLEEALPQGFL
QRV SERGLVVENWAPQAKILQHSSIGGFVSHCGWSSVMESLKFVPIIAIAPMHL DQPLNARLVV
DVGVGLE VIRNHGSLEREEIAKLIKEVVVLGN GNDGEIVRRKAREMSNHIKKKGEKDMDELVEEL
MLICKMKPNSCHLS

15 >XP_015886141.1 PREDICHO: beta-D-glucosil crocetina beta-1,6-glucosiltransferasa-como isoforma X1 [*Ziziphus jujuba*].

(SEQ ID NÚM.:40)

MMERQRSIKVLMFPWLAHGHS PFLELAKRLTDRNFQIYFCSTPVNLT SVKPKLSQKYSSSIKL
VELHLP SLPDLPPHYHTTNGLALNLIPTLKKAFDMS SSSFS TILSTIKPDLLIYDFLQPWAPQL
ASC MNIPAVNFLSAGASMVSFVLHSIKYNGDDHDDEF LTTTELHLSDSMEAKFAEMTESSPDEHI
DRAVTC LERSNSLILIKS FRELEGGYLDYLSLSFAKKVVP IGPLVAQDTNPEDD SMDIINWLDK
KEKSTVFVSGSEYFLTNEEMEEIAYGLELSKVNFIWVIRFPLGQKMAVEEALPKGFLERVGE
KGMVVEDWAPQMKILGHSSIGGFVSHCGWSSLMESLKLGVPIIAMPQLDQPINAKLVERSGVG
LEVKRDKNGRIEREYLAKVIREIVVEKARQDIEKKAREMSNIITEKGEEEIDNVVEELAKLCGM

>XP_002271587.3 PREDICHO: beta-D-glucosil crocetina beta-1,6-glucosiltransferasa-como [*Vitis vinifera*].

(SEQ ID NÚM.:41)

MDARQSDGISVLMFPWLAHGHI SPFLQLAKKLSKRNFSTIYFCSTPVNLDPIKGLSESYSLSIQ
LVKLHLPSPPELPPQYHTTNGLPPLMPTLKMAFDMASPNFSLNLTLPDILLIYDFLQPWAPA
AASSLNIPAVQFLSTGATLQSF LAHRHRKPGIEFPFQEIHLPDY EIGRLNRFLEPSAGRISDRD
RANQCLERSRSLIKTFREIEAKYLDYVSDLTKKKMVTVGPELLQDPEDEDEATDIVEWLNKKC
EASAVFVSGSEYFVSKEEMEEIAHGLELSNVDFI WVVRFP MGEKIRLEDALPPGFLHRLGDRG
MVVEGWAPQRKILGHSSIGGFVSHCGWSSVMEGMKFGVPI IAMPMLDQPINAKLVEAVGVGRE
VKRDENRKLEREEIAKVIKEVVGEKNGENVRKARELSETLRKKGDEEIDVVVEELKQLCSY

>XP_018840205.1 PREDICHO: beta-D-glucosil crocetina beta-1,6-glucosiltransferasa-como [*Juglans regia*].

5 (SEQ ID NÚM.:42)

MDTARKRIRVVMPLWLAHGHI SPFLELSKKLAKRNFHIYFCSTPVNLSSTIKPKLSGKYSRSIQ
VELHLPSPPELPPQYHTTKGLPPLNATLKRAFD MAGPHFSNLTLPDILLIYDFLQPWAPA
AASQNTIPAINFLSTGAAMTSFVLHAMKKPGDEFPFPEIHLDECMKTRFVDLPEDHSPSDDNH
SDKDRALKCFERSSGFVMMKT FEELEGKYINFLSHLMQKKIVPVGPLVQNPVVRGDHEKAKTLEW
LDKRRQSSAVFVSGTEYFLSKBEMEEIAYGLELSNVNFIWVVRFPGEKVKLEEALPEGFLQR
VGEKGMVVEGWAPQAKILMHPSIGGFVSHCGWSSVMESIDFGVPIVAIPMQLDQPVNAKVVEQA
GVGVEVKRDRDGLEREEVATVIREVVMGNIGESVRKKEREMRDNI RKKGEEKMDGVAQELVQL
YNGIKNV

>XP_021652171.1 beta-D-glucosil crocetina beta-1,6-glucosiltransferasa-como [*Hevea brasiliensis*].

(SEQ ID NÚM.:43)

METLQRRKISVLMFPWLAHGHLSPFLELSKKLANKRNFHVYFCSTPVNLDSIKPKLSAEYSFSIQ
LVELHLPSSPELPLHYHTTNGLPPLMKNLNKNAFDMASSFFNLTLPDILLIYDFIQPWAPA
LASSLNIPAVNFLCTSMAMSCFGLHLNNQEAKFPFPGIYPRDYMRMKVFGALESSNDIKDGER
AGRCMDQSFHLILAKTFRELEGKYIDYLSVKLMKKIVPVGPLVQDPI FEDDEKIMDHHQVIKWL
EKKERLSTVVFVSGTEYFLSTEEMEEIAYGLELSKAHF IWVVRFP TGEKINLEESLPKRYLERV
QERKIVEGWAPQQKILRHSSIGGFVSHCGWSSIMESMKFGVPI IAMPMLDQPVNSRIVEDAG
VGEVRRNKSGELEREEIAKTIRKVVVEKDGKNVSRKAREMSDTRKKGEEEIDGVVDELLQLC
DVKTNYLQ

10 >XP_021619073.1 beta-D-glucosil crocetina beta-1,6-glucosiltransferasa-como [*Manihot esculenta*].

(SEQ ID NÚM.:44)

MATAQTRKISVLMFPWLAHGHLSPFLELSKKLANKRNFHVYFCSTPVNLDSIKPKLSP EYHFSIQ
FVELHLPSSPELPSHYHTTNGLPPLMKTLLKKA FDMASSFFNLTLPDILLIYDFLQPWAPA
LASSLNIPAVNFLC SSMAMSCFGLNLNKNKEIKFLFPEIYPRDYMEMKLFVFESSNQIKDGE
RAGRCIDQSFHVILAKTFRELEGKYIDYVSVKCNKKIVPVGPLVEDTIHEDDEKTMDDHHHHHD
EVIKWLEKKERSTTVFVSGSEYFLSKEEMEEIAHGLELSKVNFIWVVRFPKGEKINLEESLPE
GYLERIQERKIVEGWAPQRKILGHSSIGGFVSHCGWSSIMESMKLGVPI IAMPMLDQPINSR
IVEAAGVGEVSRNQSGELEEREEMAKTIRKVVVEREGVYVRRKAREMSDVL RKKGEEEEIDGVVD
ELVQLCDMKTNYL

>GAV83746.1 Proteína que contiene el dominio UDPGT [*Cephalotus follicularis*].

15 (SEQ ID NÚM.:45)

MDLKRRSIRVLMPLWLAHGHI SPFLELAKKLTNRNFLIYFCSTPINLNSIKPKLSSKYSFSIQ
VELHLPSPPELPPHYHTTNGLPPLMNTLKTAFDMASPSFLNLTLPDILLICDHLQPWAPSL
ASSLNIPATII FPTNSAIMMAFSLHAKNPGEEFPFPSININDDMVKSINFLHSASNGLTDMDRV
LQCLERSSNTMLLKTFRQLEAKYVDYSSALLKKKIVLAGPLVQVPDNEDEKIEI IKWLD SRGQS
STVVFVSGSEYFLSKEEREDIAHGLELSKVNFIWVVRFPVGEKVKLEEALPNGFAERIGERGLV
VEGWAPQAMILSHSSIGGFVSHCGWSSMMESMKFGVPI IAMPMLDQPLNARLVEDVGVGLEIK
RNKDGRFEREELARVIKEVLVYKNGDAVRSKAREMSEHIKKNGDQ EIDGVADALVKLCEMKTNS
LNQD

ES 3 013 059 T3

>*Coffea Arabica* UGT_1,6

(SEQ ID NÚM.:46)

MENHATFNVLMPLPWLAHGHVSPYLELAKKLTARNFNVYLCSSPATLSSVRSKLTEKFSQSIHLV
ELHLPKLPPELPAEYHTTNGLPPLMPTLKDAFDMAKPNFCNVLSLKPDLIYDLLQPWAPAAA
SAFNIPAVVFISSSATMTSFGLFHFKNPGTKYPYGNALFYRDYESVFEVENLTRDRDRTYRVINC
MERSKIIILIKGFNEIEGKYFDYFSCLTGKKVVPVGPLVQDPVLDDEDCRIMQWLNKKEKGSTV
FVSFGSEYFLSKKDMEEIAHGLEVSNVDFIWVVRFPKGENIVIEETLPKGFFERVGERGLVVNG
WAPQAKILTHPNVGGFVSHCGWNSVMESMKFGLPIIAMPMLDQPINARLIEEVGAGVEVLRDS
KGKLRERMAETINKVMKEASGESSVRKKARELQEKLELKGDEEIDDVVKELVQLCATKNKRNL
HYY

>Secuencia enlazadora permutante circular

5 (SEQ ID NÚM.:47)

GSGGSG

>Secuencia enlazadora permutante circular

(SEQ ID NÚM.:48)

GSGGSGGSG

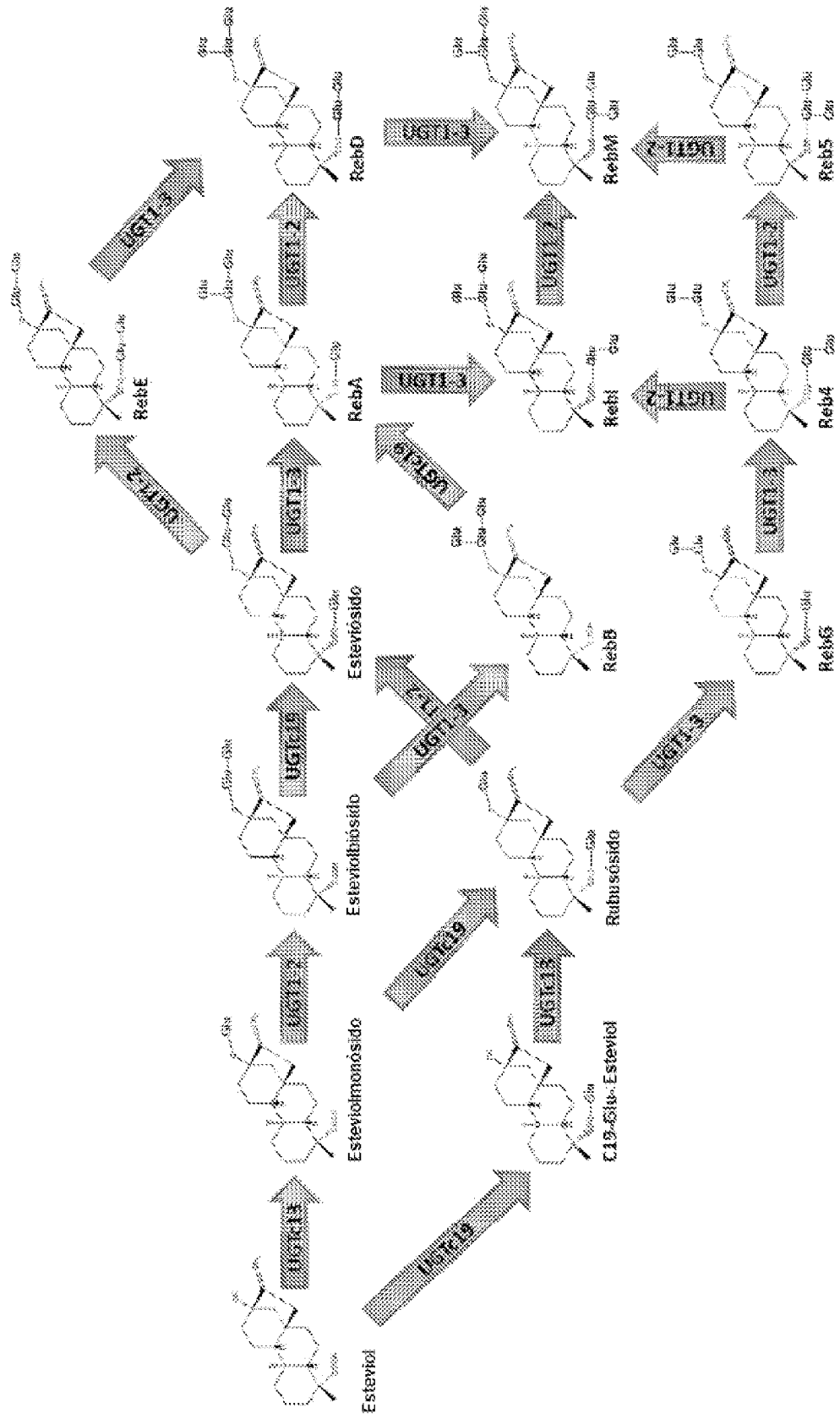
10

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir un producto glicosilado a partir de intermediarios de glicósido de esteviol, que comprende:
 - 5 proporcionar una célula bacteriana que exprese intracelularmente una o más enzimas glicosil transferasa dependientes de UDP, y en el que la célula bacteriana comprenda las modificaciones genéticas: la 5'-nucleotidasa / UDP azúcar hidrolasa A (ushA) está suprimida, inactivada o con expresión reducida; la UDP-glucosa-4-epimerasa / galactosa-1-fosfato uridililtransferasa / galactocinasa / galactosa-1-epimerasa (galETKM) están suprimidas, inactivadas o con expresión reducida; la glucosa-6-fosfato isomerasa (pgi) está suprimida, inactivada o con expresión reducida; y la fosfoglucomutasa (pgm) y la UDP-glucosa pirofosforilasa (galU) están sobreexpresadas;
 - 10 incubar la cepa bacteriana con los intermediarios de glicósidos de esteviol, y recuperar el producto glicosilado.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los intermediarios de glicósidos son glicósidos de esteviol de extracto de hoja de stevia.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el producto glicosilado comprende rebaudiósido M (RebM); o en el que el producto glicosilado comprende rebaudiósido K (RebK), rebaudiósido C+1 (RebC+1), y/o rebaudiósido C+2 (RebC+2).
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la célula bacteriana es *Escherichia spp.*, *Bacillus spp.*, *Rhodobacter spp.*, *Zymomonas spp.*, o *Pseudomonas spp.*
- 20 5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la célula bacteriana es *Escherichia coli*.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la célula microbiana expresa una o más enzimas UGT que comprenden la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NÚM.:1 a 45, o un derivado de la misma que tenga al menos un 90% de identidad con la misma.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la célula microbiana expresa una enzima UGT glicosilante 1-3' y una enzima UGT glicosilante 1-2'.
- 25 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la célula microbiana expresa además una enzima UGT O-glicosilante C13 y una enzima O-glicosilante C19.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el procedimiento da como resultado al menos un 40% de conversión en peso de intermediario de glicósido a producto glicosilado, o al menos un 50% de conversión en peso de intermediario de glicósido a producto glicosilado.
- 30 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el procedimiento da como resultado al menos un 75% en peso de conversión de intermediario de glicósido a producto glicosilado.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el procedimiento se realiza por fermentación por lotes.
- 35 12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que los intermediarios de glicósido se incuban con la célula durante aproximadamente 72 horas o menos.
13. Una célula bacteriana que comprende:
 - uno o más genes recombinantes que codifican las enzimas glicosil transferasa dependientes de UDP (UGT) para expresión intracelular; y
 - 40 una o más modificaciones genéticas que aumentan la disponibilidad de UDP-glucosa, las modificaciones genéticas incluyen: ushA y galETKM son suprimidas, inactivadas o reducidas en expresión; pgi es suprimida, inactivada o reducida en expresión; y pgm y galU son sobreexpresadas;
 - en la que la célula microbiana convierte los intermediarios de glicósidos de esteviol alimentados en un producto de glicósido de esteviol.
- 45 14. La célula bacteriana de la reivindicación 13, en la que la célula bacteriana es *Escherichia spp.*, *Bacillus spp.*, *Rhodobacter spp.*, *Zymomonas spp.*, o *Pseudomonas spp.*
15. La célula bacteriana de la reivindicación 14, en la que la célula bacteriana es *Escherichia coli*.

16. La célula bacteriana de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en la que la célula bacteriana no expresa una vía biosintética vegetal que produce un intermediario de glicósido de esteviol.

FIG. 2



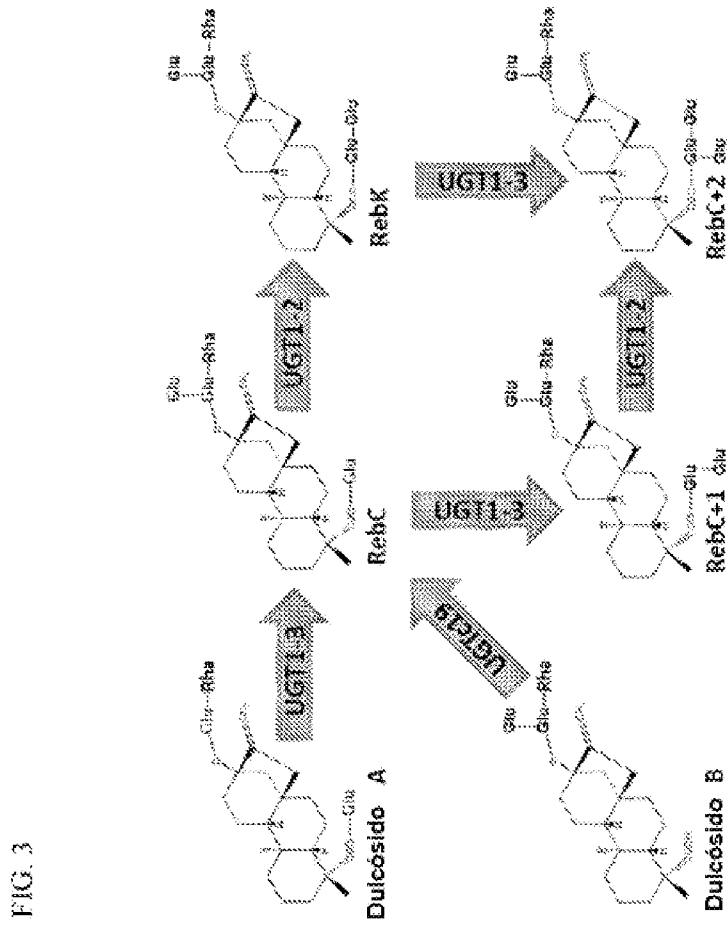


FIG. 4

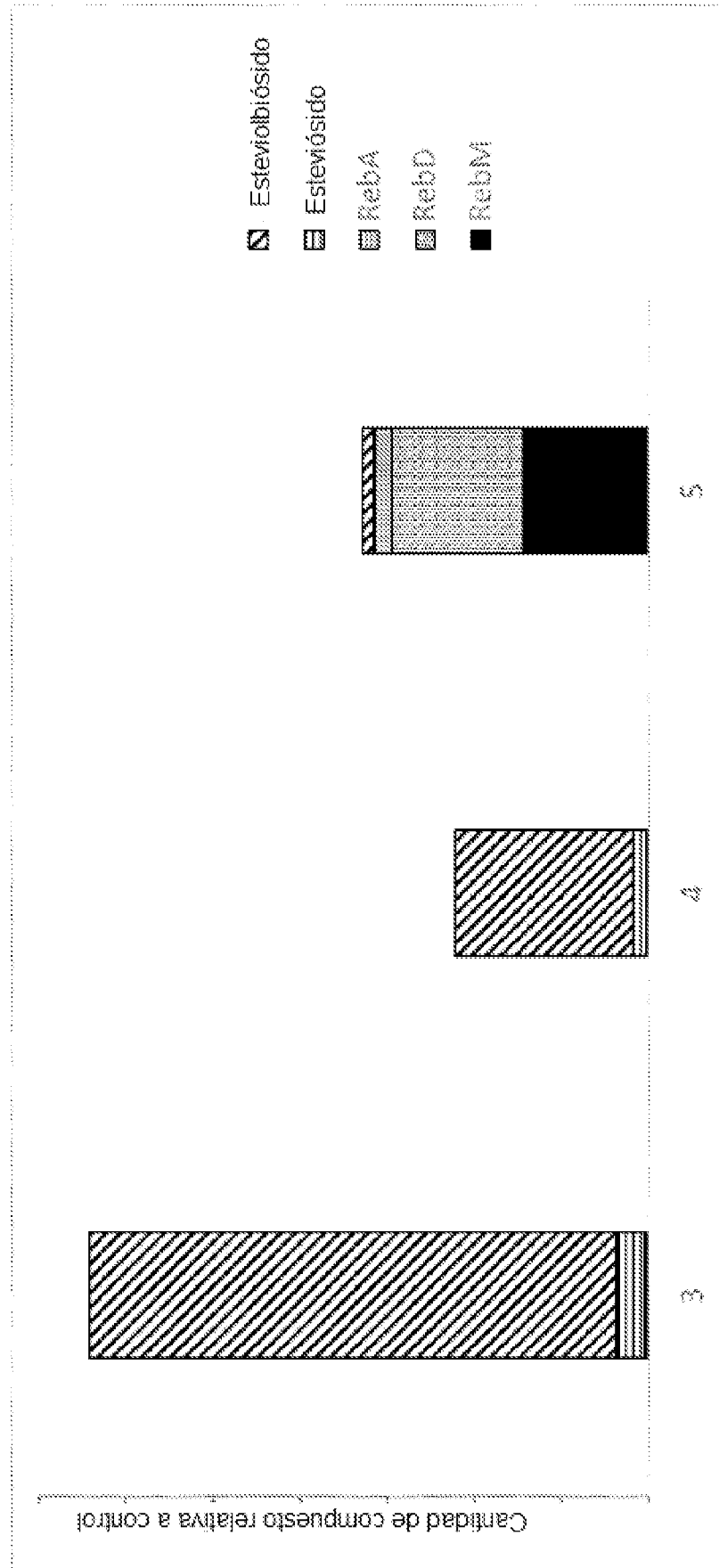


FIG. 5

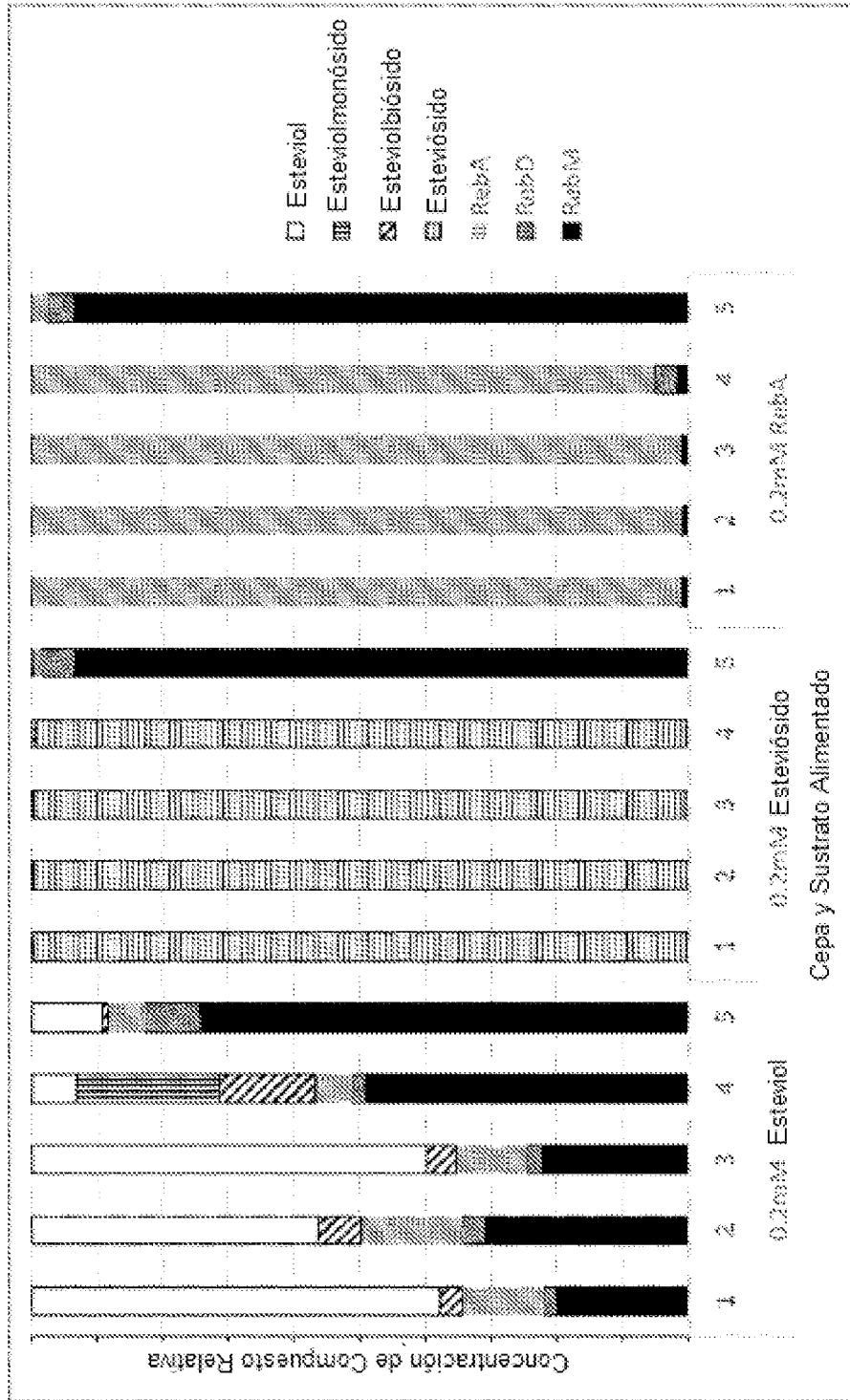


FIG. 6

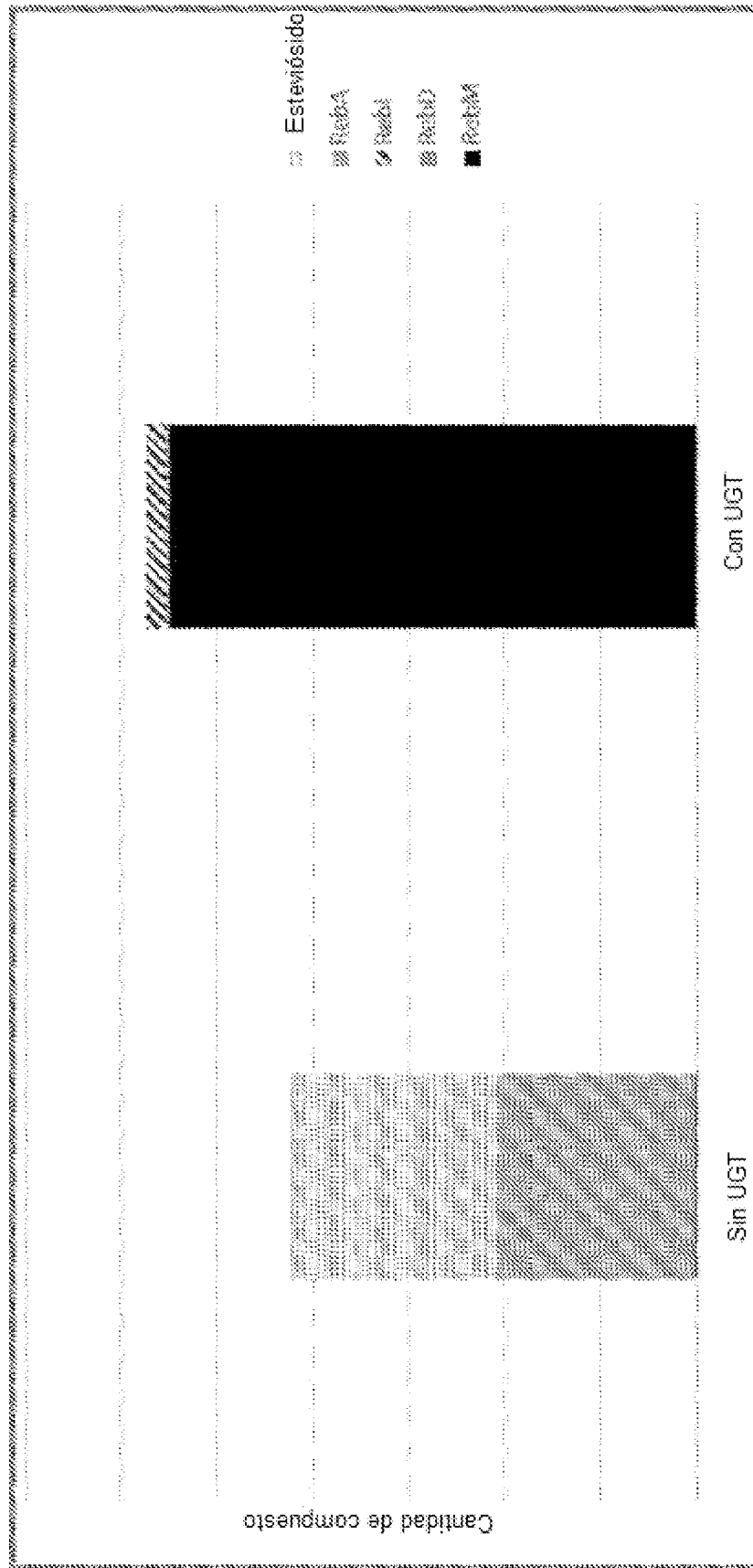


FIG. 7

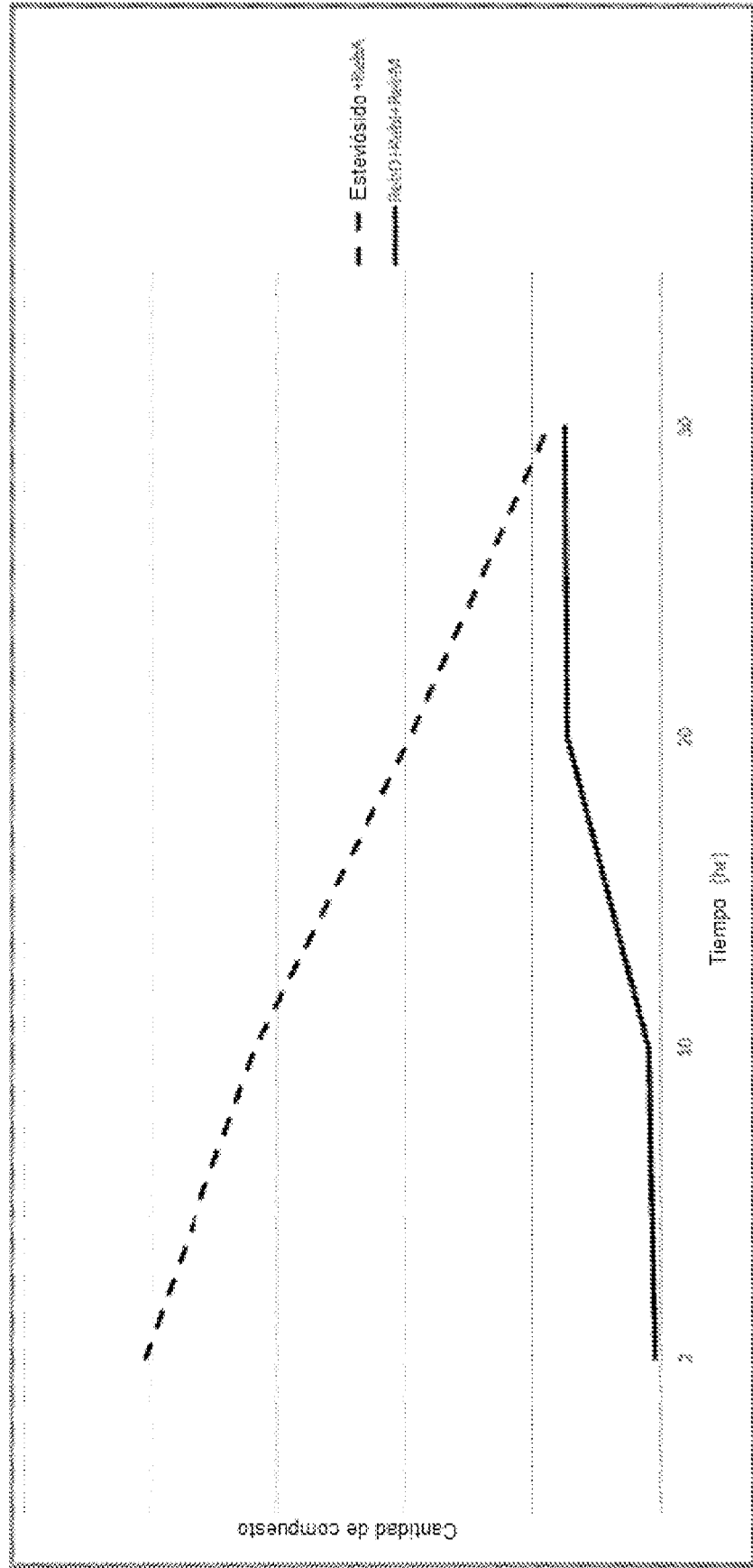


FIG. 8

