



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112021000876-4 A2



(22) Data do Depósito: 16/07/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 13/04/2021

(54) Título: PRODUÇÃO DE GLICOSÍDEOS DE ESTEVIOL ATRAVÉS DA BIOTRANSFORMAÇÃO COM CÉLULAS INTEIRAS

(51) Int. Cl.: C12P 19/56; C12P 19/44; C12P 19/00; C12N 15/63.

(30) Prioridade Unionista: 16/07/2018 US 62/698,617.

(71) Depositante(es): MANUS BIO, INC..

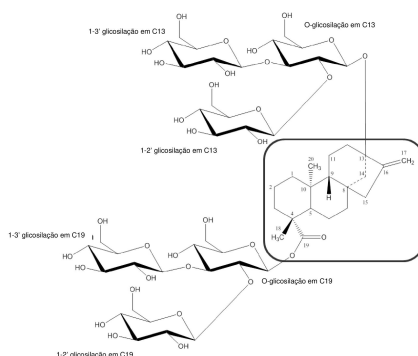
(72) Inventor(es): AJIKUMAR PARAYIL KUMARAN; CHRISTINE NICOLE S. SANTOS; JASON ERIC DONALD; MARY ELIZABETH FOWLER; RYAN N. PHILIPPE; CHRISTOPHER SCOTT FREI; AARON LOVE.

(86) Pedido PCT: PCT US2019041957 de 16/07/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/018506 de 23/01/2020

(85) Data da Fase Nacional: 18/01/2021

(57) Resumo: PRODUÇÃO DE GLICOSÍDEOS DE ESTEVIOL ATRAVÉS DA BIOTRANSFORMAÇÃO COM CÉLULAS INTEIRAS. Em vários aspectos e modalidades, a invenção fornece células microbianas e métodos para a produção de produtos de glicosilação avançados a partir de intermediários glicosilados inferiores. A célula microbiana expressa uma ou mais enzimas glicosil transferase dependentes de UDP no citoplasma, para a glicosilação dos intermediários. Ao incubar a cepa microbiana com um extrato vegetal, ou fração do mesmo, compreendendo os intermediários, esses intermediários glicosilados ficam disponíveis para glicosilação adicional pela célula, e os produtos da glicosilação avançados podem ser recuperados a partir dos meios e/ou das células microbianas.



**PRODUÇÃO DE GLICOSÍDEOS DE ESTEVIOL ATRAVÉS DA
BIOTRANSFORMAÇÃO COM CÉLULAS INTEIRAS**
PRIORIDADE

[001] Este pedido reivindica a prioridade ao, e o benefício do, Pedido Provisório US Nº 62/698.617 depositado em 16 de julho de 2018, que é incorporado a este documento por referência em sua totalidade.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[002] As glicosil transferases de pequenas moléculas são codificadas por uma grande família multigênica no reino vegetal. Essas enzimas transferem açúcares a partir de açúcares de nucleotídeo para uma ampla gama de metabólitos secundários, alterando assim as propriedades físicas e químicas da molécula aceptora. Por exemplo, os glicosídeos de esteviol são uma classe de compostos encontrados nas folhas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, um arbusto perene da família *Asteraceae* (*Compositae*) nativa de certas regiões da América do Sul. São caracterizados estruturalmente por uma única base, esteviol, diferindo pela presença de resíduos de carboidratos nas posições C13 e C19. Eles se acumulam em folhas de estêvia, compondo aproximadamente 10% a 20% do peso seco total. Em uma base de peso seco, os quatro principais glicosídeos encontrados nas folhas de *Stevia* normalmente incluem esteviosídeo (9,1%), rebaudiosídeo A (3,8%), rebaudiosídeo C (0,6-1,0%) e dulcosídeo A (0,3%). Outros glicosídeos de esteviol estão presentes em quantidades pequenas ou traços, incluindo rebaudiosídeo B, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M e O, dulcosídeo B, esteviolbiosídeo e rubusosídeo.

[003] O produto de glicosilação menor, rebaudiosídeo M (RebM), é estimado como sendo cerca de 200-350 vezes mais potente do que a sacarose e é descrito como possuindo um sabor doce e limpo com um gosto residual ligeiramente amargo ou de alcaçuz. Prakash I. et al., Development of Next Generation Stevia Sweetener: Rebaudioside M, *Foods* 3(1), 162-175 (2014). Embora RebM seja de grande interesse para a indústria global de alimentos, sua baixa prevalência no extrato de estêvia requer processos inovadores para sua síntese.

[004] Permanece uma necessidade de métodos econômicos para produzir glicosídeos de alto valor que sejam produtos secundários do extrato vegetal

natural.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[005] Em vários aspectos e modalidades, a invenção fornece células microbianas e métodos para produzir produtos de glicosilação avançados a partir de intermediários glicosilados inferiores. A célula microbiana expressa uma ou mais enzimas glicosil transferases dependentes de UDP para glicosilação dos intermediários. Ao incubar a cepa microbiana com um extrato vegetal ou fração deste compreendendo os intermediários glicosídeos, esses intermediários estão disponíveis para glicosilação adicional pelas células microbianas. Em várias modalidades, os produtos de glicosilação avançados são recuperados a partir do meio e/ou das células microbianas.

[006] Os intermediários glicosídeos podem ser qualquer metabólito secundário glicosilado, como aqueles encontrados naturalmente em extratos vegetais, incluindo terpenoides glicosilados, flavonoides, canabinoides, policetídeos, estilbenoides e polifenóis, entre outros. Em algumas modalidades, o intermediário glicosilado é um terpenoide glicosilado, como glicosídeo de esteviol ou mogrosídeo, e pode encontrar uso como um adoçante. Em algumas modalidades, a biossíntese do produto envolve pelo menos duas reações de glicosilação do intermediário glicosídeo na célula microbiana.

[007] Em algumas modalidades, os intermediários glicosídeos são de extrato de folha de estévia. Por exemplo, RebM e outros produtos de glicosilação avançados podem ser biossintetizados a partir de intermediários glicosídeos de esteviol, como esteviosídeo, esteviolbiosídeo, rebaudiosídeo A (RebA) e rebaudiosídeo C (RebC), entre outros. A célula microbiana expressa uma ou mais enzimas glicosil transferase dependentes de UDP no citoplasma, para a glicosilação dos intermediários de valor inferior. Ao incubar a cepa microbiana com um extrato de folha de estévia ou fração deste compreendendo os intermediários glicosídeos de esteviol, esses intermediários estão disponíveis para as células para glicosilação adicional e esses produtos podem ser recuperados a partir do meio e/ou das células microbianas. Por conseguinte, esse processo usa intermediários avançados no extrato de folha de estévia, especialmente glicosídeos de esteviol com uma a cinco glicosilações (bem como, em algumas modalidades, o núcleo de aglicona, esteviol). Intermediários avançados de extrato

de folha de estévia estão prontamente disponíveis a partir da extração industrial existente de glicosídeos de esteviol.

[008] Em várias modalidades, a célula microbiana expressa pelo menos uma, ou pelo menos duas, ou pelo menos três, ou pelo menos quatro enzimas UGT que glicosilam um intermediário glicosídeo e podem ser selecionadas a partir daquelas listadas na Tabela 1 e daquelas fornecidas neste documento como SEQ ID NOS: 1-45, bem como derivados destas. Em várias modalidades, as enzimas UGT são independentemente selecionadas a partir de enzimas UGT de 1-2' glicosilação, enzimas UGT de 1-3' glicosilação e enzimas UGT de O-glicosilação. Em várias modalidades, essas enzimas são expressas intracelularmente, em que não contêm translocação de membrana ou sinais de secreção.

[009] Em algumas modalidades, particularmente no que diz respeito à glicosilação de intermediários glicosídeos de esteviol em extrato de folha de estévia, a célula microbiana expressa quatro enzimas UGT, como uma enzima UGT de 13-O glicosilação, uma enzima UGT de 19-O glicosilação, uma enzima UGT de 1-2' glicosilação e uma enzima UGT de 1-3' glicosilação.

[010] Em várias modalidades, a célula microbiana expressa uma enzima UGT de 1-3' glicosilação. Por exemplo, a enzima UGT de 1-3' glicosilação pode ser selecionada a partir de SrUGT76G1, MbUGT1-3 e derivados destas (por exemplo, UGT76G1_L200A ou MbUGT1-3_1, MbUGT1-3_1.5 ou MbUGT1-3_2).

[011] Nessas e em outras modalidades, a célula microbiana expressa uma enzima UGT de 1-2' glicosilação. Por exemplo, a enzima UGT de 1-2' glicosilação pode ser selecionada a partir de SrUGT91D2, SrUGT91D1, SrUGT91D2e, OsUGT1-2, MbUGT1,2, MbUGT1,2.2 e derivados destas.

[012] Nessas ou em outras modalidades, a célula microbiana expressa uma enzima UGT de O-glicosilação em C13. Por exemplo, a enzima UGT de O-glicosilação em C13 pode ser selecionada a partir de SrUGT85C2 e derivados desta (por exemplo, MbUGTC13).

[013] Nessas ou em outras modalidades, a célula microbiana expressa uma enzima UGT de O-glicosilação em C19. Por exemplo, a enzima de O-glicosilação em C19 pode ser selecionada a partir de SrUGT74G1, MbUGTc19 e derivados destas (por exemplo, MbUGTc19-2).

[014] A conversão com células inteiras requer que as enzimas que são

expressas intracelularmente atuem em substrato alimentado externamente (por exemplo, intermediários glicosilados) e que a célula forneça regeneração do cofator UDP-glicose. Isso em contraste com os processos que dependem de enzimas que são purificadas ou secretadas fora da célula, que requerem um suprimento exógeno de UDP-glicose ou precursor de UDP-glicose ou mecanismo de regeneração de UDP-glicose ou sistema de enzimas de regeneração de UDP-glicose. Em modalidades da presente invenção, a catálise (glicosilação) é realizada com células microbianas vivas. A reciclagem de cofator UDP-glicose ocorre usando o metabolismo celular nativo sem necessidade de enzimas adicionais fornecidas externamente ou de alimentação de substrato.

[015] Em conformidade com a presente divulgação, modificações genéticas à célula microbiana permitem que intermediários glicosídeos estejam disponíveis para glicosilação adicional por enzimas expressas intracelularmente. Em algumas modalidades, produtos glicosilados avançados podem ser recuperados a partir do meio, em oposição a extraídos de células lisadas. Em algumas modalidades, a célula microbiana tem uma ou mais modificações genéticas que aumentam a disponibilidade de UDP-glicose. Em algumas modalidades, sem desejar ser limitado pela teoria, essas modificações também podem estressar a célula por disponibilidade de glicose, levando à expressão aumentada de transportadores endógenos para importar os intermediários glicosídeos para dentro da célula. Em algumas modalidades, sem desejar ser limitado pela teoria, as células são tornadas permeáveis através de modificação genética ou componentes do meio, permitindo a difusão passiva de produtos e substratos.

[016] Em várias modalidades, a célula microbiana tem uma superexpressão de um ou mais transportadores endógenos (por exemplo, em comparação com uma cepa microbiana parental) ou, em certas modalidades, é mudada para expressar uma proteína de transporte recombinante e/ou modificada. Em algumas modalidades, a célula microbiana expressa uma ou mais cópias adicionais de uma proteína de transporte endógena ou um derivado desta. Por exemplo, a expressão ou atividade de proteínas de transporte pode ser mudada para aumentar o transporte para dentro da célula de substratos de glicosídeo de esteviol (por exemplo, um ou mais dentre esteviosídeo,

esteviolbiosídeo, RebA e/ou RebC), enquanto exporta o produto, como RebM e/ou RebD, bem como outros produtos de glicosilação avançados. Proteínas de transporte exemplares que podem ser superexpressas ou modificadas para atividade alterada ou especificidade de substrato na célula microbiana incluem *E. coli* acrAD, xylE, ascF, bglF, chbA, ptsG/crr, wzxE, rfbX, bem como ortólogos ou derivados destas. Outras proteínas de transporte incluem aquelas selecionadas a partir de proteínas de transporte bacterianas ou endógenas que transportam o intermediário glicosídeo desejado. Por exemplo, o transportador pode ser da espécie hospedeira ou de outra espécie bacteriana ou de levedura e pode ser modificado para ajustar sua afinidade aos intermediários ou produtos glicosídeos específicos.

[017] Em várias modalidades, o método resulta em pelo menos 40% de conversão, ou pelo menos 50% de conversão, ou pelo menos 75% de conversão dos intermediários glicosídeos em produto desejado (por exemplo, conversão de esteviosídeo, esteviolbiosídeo e RebA em RebD, RebM e/ou outros rebaudiosídeos altamente glicosilados). Na produção de RebM, o perfil do produto pode favorecer fortemente RebM em vez de RebD.

[018] O método pode ser realizado por fermentação descontínua, fermentação descontínua alimentada, fermentação contínua ou fermentação semicontínua. Por exemplo, em algumas modalidades, o método é conduzido por fermentação descontínua com tempos de incubação de menos de cerca de 72 horas ou, em algumas modalidades, menos de cerca de 48 horas ou menos de cerca de 24 horas.

[019] Em alguns aspectos, a invenção fornece métodos para fazer um produto compreendendo um glicosídeo de esteviol avançado, como RebM. O método compreende incorporar o glicosídeo de esteviol alvo a um produto, como um alimento, bebida, produto de higiene oral, adoçante, agente aromatizante ou outro produto. Em alguns aspectos, a invenção fornece métodos para fazer uma composição adoçante compreendendo uma pluralidade de adoçantes de alta intensidade, como dois ou mais dentre um glicosídeo de esteviol, um mogrosídeo, sucralose, aspartame, neotame, advantame, acessulfame de potássio, sacarina, ciclamato, neoesperidina dihidrocalcona, gnetifolina E e/ou piceatanol 4'-O- β -D-glicopiranosídeo.

[020] Outros aspectos e modalidades da invenção ficarão evidentes a partir da seguinte descrição detalhada.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[021] FIG. 1. Estrutura de RebM. O andaime de esteviol (um diterpenoide) é mostrado em uma caixa. RebM contém seis glicosilações: (1) uma O-glicosilação em C13, (2) uma 1-2' glicosilação em C13, (3) uma 1-3' glicosilação em C13, (4) uma O-glicosilação em C19, (5) uma 1-2' glicosilação em C19 e (6) uma 1-3' glicosilação em C19.

[022] FIG. 2. Produtos de glicosilação produzidos pela ação de enzimas UGT sobre esteviol e intermediários glicosídeos de esteviol.

[023] FIG. 3. Produtos glicosilados produzidos pela ação de enzimas UGT sobre intermediários glicosídeos de esteviol contendo ramnose.

[024] FIG. 4. Conversão de esteviolbiosídeo em RebM. Para cinco compostos principais na via do RebM, as concentrações dos compostos são mostradas em relação à concentração total desses compostos em uma cepa controle que carece das enzimas UGT. As cepas foram alimentadas com esteviolbiosídeo de 0,2 mM e incubadas com substrato por 48 horas antes da extração. As Cepas 3 e 4 não mostram nenhuma conversão de esteviolbiosídeo, enquanto a Cepa 5 mostra uma conversão substancial em RebD e RebM.

[025] FIG. 5. Conversão de esteviosídeo e RebA em RebM. A bioconversão de dois intermediários comercialmente disponíveis encontrados no extrato de folha, esteviosídeo e RebA, em RebM é mostrada usando as Cepas 1 a 5. Também é mostrada a bioconversão do núcleo de esteviol. Os valores são relatados como a porcentagem da composição total de glicosídeo de esteviol. A conversão de esteviol em RebM por todas as cepas mostra que todas as cepas são capazes de formar RebM. Como foi o caso do esteviolbiosídeo, tanto esteviosídeo quanto RebA são convertidos em RebM, mas apenas na Cepa 5. Para conversão a partir de esteviosídeo e RebA, a razão de RebD:RebM favorece fortemente RebM (1:20).

[026] FIG. 6. Bioconversão de glicosídeos de esteviol em placas de 96 poços. Para cinco compostos principais na via do RebM, as concentrações de compostos são mostradas com ou sem enzimas UGT expressas. As cepas foram alimentadas com 0,5 g/L de extrato de folha de esteviosídeo/RebA e incubadas

com substrato por 48 horas antes da amostragem.

[027] FIG. 7. Bioconversão de um extrato de folha de esteviosídeo/RebA em escala de biorreator. Para cinco compostos principais na via do RebM, as concentrações de compostos no meio foram amostradas em vários pontos de tempo durante a fermentação. As cepas foram alimentadas com 2 g/L de extrato de folha de esteviosídeo/RebA e incubadas com substrato por um total de 30 horas.

[028] FIG. 8. Modificações genéticas para aumentar o fluxo de *E. coli* nativa para UDP-glicose. Metabólitos: G6P, glicose-6-fosfato; G1P, glicose-1-fosfato; 6PGL, 6-fosfoglucono-1,5-lactona; 6PG, 6-fosfogluconato; R5P, ribose-5-fosfato; PRPP, 5-fosforibosil-1-pirofosfato; UMP, monofosfato de uridina; UDP, difosfato de uridina; UTP, trifosfato de uridina; UDP-Gli, UDP-glicose; UDP-Gal, UDP-galactose; UDP-GlcNAc, UDP-N-acetilglucosamina; CTP, trifosfato de citidina; dUDP, desoxiuridina-difosfato; RebA, rebaudiosídeo A; RebM, rebaudiosídeo M. Enzimas: 1. *glk*, glucoquinase; 2. *pgi*, glicose-6-fosfato isomerase; 3. *zwf*, glicose-6-fosfato-1-desidrogenase; 4. *pgl*, 6-fosfogliconolactonase; 5. *edd*, fosfogluconato desidratase; 6. *gnd*, 6-fosfogluconato desidrogenase; 7. *rpiA*, ribose-5-fosfato isomerase ou *rpe*, ribulose-fosfato 3-epimerase; 8. *prs*, ribose-fosfato difosfoquinase; 9. *pirEF*, orotato fosforibosiltransferase e orotidina-5'fosfato-descarboxilase; 10. *pyrK*, uridilato cinase; 11. *ndk*, UDP quinase; 12. *murG*, N-acetilglucosaminil transferase; 13. *nrdABEF*, ribonucleosídeo-difosfato redutase; 14. *pyrG*, CTP sintase; 15. *pgm*, fosfoglucomutase; 16. *galU*, UDP-glicose pirofosforilase; 17. *galETKM*, UDP-glicose-4-epimerase/galactose-1-fosfato uridililtransferase/galactoquinase/galactose-1-epimerase; 18. *ushA*, 5'-nucleotidase/UDP-açúcar hidrolase; 19. *UGT*, UDP-glicosil transferase. O esquema ilustra as modificações genômicas sequenciais que levam da Cepa 1 à Cepa 5. A Cepa 1 é uma cepa de base de *E. coli*. A Cepa 2 tem uma deleção de 17, e a Cepa 3 tem uma deleção adicional de 18. A Cepa 4 foi criada a partir da Cepa 3 deletando 2. A Cepa 5 foi criada a partir da Cepa 4 superexpressando 15 e 16.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[029] Em vários aspectos e modalidades, a invenção fornece células

microbianas e métodos para produzir produtos de glicosilação avançados a partir de intermediários glicosilados inferiores. Em várias modalidades, a célula microbiana expressa uma ou mais enzimas glicosil transferase dependentes de UDP (por exemplo, intracelularmente) para glicosilação dos intermediários. Em várias modalidades, a célula microbiana tem uma ou mais modificações genéticas que aumentam a disponibilidade de UDP-glicose. Ao incubar a cepa microbiana com os intermediários glicosídeos (por exemplo, a partir de um extrato vegetal ou fração deste), esses intermediários glicosídeos estão disponíveis para a célula para glicosilação adicional por enzimas glicosil transferases expressas intracelularmente. Em algumas modalidades, os produtos de glicosilação avançados podem ser recuperados a partir do meio ou, em algumas modalidades, são recuperados a partir do meio e das células microbianas.

[030] Os intermediários glicosilados podem ser qualquer metabólito secundário glicosilado, como aqueles encontrados naturalmente em extratos vegetais, incluindo terpenoides glicosilados, flavonoides glicosilados, canabinoides glicosilados, policetídeos glicosilados, estilbenoides glicosilados e polifenóis glicosilados, entre outros. Em algumas modalidades, o glicosídeo intermediário é um terpenoide glicosilado, como glicosídeo de esteviol ou mogrosídeo. Em algumas modalidades, o intermediário glicosídeo tem um, dois, três, quatro ou cinco grupos glicosil, incluindo grupos glicosil selecionados a partir de grupos glucosil, galactosil, manosil, xilosil e ramnosil, entre outros. Em várias modalidades, o produto glicosilado tem pelo menos quatro grupos glicosil, ou pelo menos cinco grupos glicosil, ou pelo menos seis grupos glicosil. Em outras modalidades, o produto tem sete, oito, nove ou mais grupos glicosil. Em algumas modalidades, a biossíntese do produto envolve pelo menos duas glicosilações do intermediário pela célula microbiana.

[031] Em algumas modalidades, os intermediários glicosídeos são de extrato de folha de estévia. Por exemplo, glicosídeos de esteviol com cinco, seis ou mais glicosilações (como RebD ou RebM) podem ser biossintetizados a partir de intermediários glicosídeos de esteviol, como esteviosídeo, esteviolbiosídeo, rebaudiosídeo A, dulcosídeo A, dulcosídeo B, rebaudiosídeo C e rebaudiosídeo F, entre outros. A célula microbiana expressa uma ou mais enzimas glicosil transferase dependentes de UDP para glicosilação desses precursores de valor

inferior. Ao incubar a cepa microbiana com um extrato de folha de estévia ou fração deste compreendendo os intermediários glicosídeos de esteviol, esses intermediários estão disponíveis para glicosilação adicional em RebD ou RebM ou outro produto de glicosilação avançado (por exemplo, Rebl), que pode ser recuperado a partir do meio e/ou de células microbianas.

[032] Em várias modalidades, as enzimas glicosil transferase dependentes de UDP são expressas "intracelularmente", em que as enzimas não possuem translocação de membrana ou peptídeos ou domínios de secreção. Assim, a expressão das enzimas UGT ocorre no citoplasma e essas enzimas não são direcionadas para fora da célula por meio de uma secreção ou sinal de transporte. Em várias modalidades, as enzimas UGT não contêm domínios de ancoragem à membrana. Ou seja, em várias modalidades, as enzimas UGT não compreendem um domínio transmembranar.

[033] Em algumas modalidades, o processo usa intermediários avançados no extrato de folha de estévia, especialmente esteviol (o intermediário de aglicona) e glicosídeos de esteviol com uma a cinco glicosilações, que estão disponíveis para a célula microbiana para glicosilação adicional. Intermediários avançados de extrato de folha de estévia estão prontamente disponíveis a partir da extração industrial existente de glicosídeos de esteviol. Como mostrado na Tabela 2, o extrato de folha pode conter principalmente os intermediários de via do esteviosídeo e rebaudiosídeo A (RebA). Em várias modalidades, o extrato de folha de estévia é uma extração de glicosídeos de esteviol. Em algumas modalidades, o extrato compreende um ou mais dentre esteviosídeo, esteviolbiosídeo e rebaudiosídeo A como componentes proeminentes. Em algumas modalidades, o extrato compreende um ou mais dentre dulcosídeo A, dulcosídeo B, RebC e/ou RebF como componentes proeminentes. Um componente proeminente geralmente constitui pelo menos cerca de 10% dos glicosídeos de esteviol no extrato ou fração deste, mas em algumas modalidades pode constituir pelo menos cerca de 20%, ou pelo menos cerca de 25%, ou pelo menos cerca de 30% dos glicosídeos de esteviol no extrato ou fração deste.

[034] RebM é ilustrado na FIG. 1. RevM contém seis glicosilações de um núcleo de esteviol: (1) uma O-glicosilação em C13, (2) uma 1-2' glicosilação em C13, (3) uma 1-3' glicosilação em C13, (4) uma O-glicosilação em C19, (5) uma 1-

2' glicosilação em C19 e (6) uma 1-3' glicosilação em C19. Embora vários produtos de glicosilação sejam possíveis (FIG. 2), RebM pode ser sintetizado a partir de esteviol através da ação de quatro enzimas UGT e cada uma das enzimas de glicosilação UGT é capaz de atuar em uma série de substratos. Por exemplo, tanto UGT91D2 quanto OsUGT1-2 são enzimas de 1-2' glicosilação que podem produzir esteviolbiosídeo a partir de esteviolmonosídeo (por ação em C13), bem como RebD a partir de RebA (por ação em C19). Adicionalmente, UGT76G1 é uma enzima de 1-3' glicosilação que pode produzir RebA a partir de esteviosídeo (por ação em C13), bem como RebM a partir de RebD (por ação em C19).

[035] As enzimas UGT para glicosilação de esteviol e glicosídeos de esteviol (incluindo para biossíntese de RebM) são divulgadas em US 2017/0332673, que é incorporado a este documento por referência em sua totalidade. Enzimas UGT exemplares estão listadas na Tabela 1 abaixo (os pedidos de patente referenciados são incorporados a este documento por referência em sua totalidade):

Tabela 1: Exemplo de Enzimas UGT

Tipo de glicosilação	Enzima	ID do gene	ID da proteína	Descrição
C13	SrUGT85C2	AY345978.1	AAR06916.1	
	MbUGTC13			US 2017/0332673
C19	SrUGT74G1	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'	SrUGT76G1	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			Esta divulgação
	MbUGT1-3_2			US 62/866.148

[036] Sequências de aminoácidos para enzimas UGT exemplares são fornecidas por esta divulgação como SEQ ID NOS: 1-17. SEQ ID NO: 1 é *Stevia rebaudiana* UGT85C2. SEQ ID NO: 13 é SrUGT85C2 com uma substituição P215T e inserção de uma Ala na 2ª posição para aumentar a estabilidade. SEQ ID NO: 2 é *Stevia rebaudiana* UGT74G1 (com inserção de Ala na 2ª posição). SEQ ID NOS: 8 e 12 são permutantes circulares baseados em SrUGT74G1 (MbUGTC19 e MbUGTC19-2). SEQ ID NO: 3 é *Stevia rebaudiana* UGT76G1. Permutantes circulares com atividade de 1-3' glicosilação são divulgados como SEQ ID NO: 10 (MbUGT1-3) e SEQ ID NOS: 15, 16 e 17 (MbUGT1-3_1, MbUGT1-3_1.5 e MbUGT1-3_2, respectivamente). UGT76G1 com uma substituição L200A e Ala na posição 2 é divulgada como SEQ ID NO: 14. *Stevia rebaudiana* UGT91D1, UGT91D2 e UGT91D2e são divulgadas como SEQ ID NOS: 4, 5 e 6. *Oryza sativa* UGT1-2 é divulgada como SEQ ID NO: 7. MbUGT1,2 e MbUGT1,2.2 são enzimas permutantes circulares com atividade de 1-2' glicosilação (SEQ ID NOS: 9 e 11).

[037] Enzimas UGT adicionais são fornecidas como SEQ ID NOS: 18 a 46, das espécies *Siraitia grosvenorii* (fruta do monge), *Momordica charantia* (melão amargo), *Cucumis sativa* (pepino), *Cucurbita maxima* (abóbora), *Cucurbita moschata* (abóbora-cheirosa), *Prunus persica* (pêssego), *Theobroma cacao* (cacau), *Corchorus capsularis* (juta branca), *Ziziphus jujube* (tâmara vermelha), *Vitis vinifera* (videira), *Juglans regia* (noqueira), *Hevea brasiliensis* (seringueira), *Manihot esculenta* (mandioca), *Cephalotus follicularis* (planta de jarro) e *Coffea Arabica* (café). As enzimas UGT podem ser selecionadas e, opcionalmente, modificadas com base no produto desejado e no intermediário disponível.

[038] Em várias modalidades, a célula microbiana expressa pelo menos uma, ou pelo menos duas, ou pelo menos três, ou pelo menos quatro enzimas UGT. Em algumas modalidades, as enzimas UGT glicosilam um substrato de

glicosídeo de esteviol, incluindo aqueles listados na Tabela 2. Em algumas modalidades, a célula microbiana expressa quatro enzimas UGT que glicosilam um intermediário glicosídeo de esteviol, como uma enzima UGT de 13-O glicosilação, uma enzima UGT de 19-O glicosilação, uma enzima UGT de 1-2' glicosilação e uma enzima UGT de 1-3' glicosilação. A ação dessas classes gerais de enzimas UGT sobre intermediários glicosilados de folha de estévia está representada nas FIGS. 2 e 3.

[039] Em várias modalidades, a célula microbiana expressa uma enzima UGT de 1-3' glicosilação. Por exemplo, a enzima UGT de 1-3' glicosilação pode ser selecionada a partir de SrUGT76G1, MbUGT1-3_1, MbUGT1-3_1.5 e MbUGT1-3_2 e derivados destas.

[040] Nessas e em outras modalidades, a célula microbiana expressa uma enzima UGT de 1-2' glicosilação. Por exemplo, a enzima UGT de 1-2' glicosilação pode ser selecionada a partir de SrUGT91D2, SrUGT91D1, SrUGT91D2e, OsUGT1-2, MbUGT1,2, MbUGT1,2.2 e derivados destas.

[041] Nessas ou em outras modalidades, a célula microbiana expressa uma enzima UGT de O-glicosilação em C13. Por exemplo, a enzima UGT de O-glicosilação em C13 pode ser selecionada a partir de SrUGT85C2 e derivados desta (por exemplo, MbUGTC13).

[042] Nessas ou em outras modalidades, a célula microbiana expressa uma enzima UGT de O-glicosilação em C19. Por exemplo, a enzima de O-glicosilação em C19 pode ser selecionada a partir de SrUGT74G1, MbUGTc19 e derivados destas (por exemplo, MbUGTc19-2).

[043] Nessas ou em outras modalidades, a célula microbiana expressa uma enzima UGT de 1-3' glicosilação e uma enzima UGT de 1-2' glicosilação. Em algumas modalidades, a célula microbiana expressa uma enzima UGT de 1-3' glicosilação, uma enzima UGT de 1-2' glicosilação e uma enzima UGT de O-glicosilação em C13. Em algumas modalidades, a célula microbiana expressa uma enzima UGT de 1-3' glicosilação, uma enzima UGT de 1-2' glicosilação, uma enzima UGT de O-glicosilação em C19 e uma enzima UGT de O-glicosilação em C19. Em algumas modalidades, a célula microbiana expressa uma enzima UGT de 1-3' glicosilação, uma enzima UGT de 1-2' glicosilação, uma enzima UGT de O-glicosilação em C19 e uma enzima UGT de O-glicosilação em C13. Em

algumas modalidades, a célula microbiana expressa uma SrUGT85C2 ou derivado desta (por exemplo, MbUGTC13), MbUGT1,2.2 ou derivado desta, SrUGT74G1 ou derivado desta (por exemplo, MbUGTc19 ou MbUGTc19-2) e SrUGT76G1 ou MbUGT1-3_1 ou derivado destas (por exemplo, 76G1_L200A, MbUGT1-3_1.5 ou MbUGT1-3_2). Sem serem limitadas pela teoria, as enzimas UGT modificadas podem fornecer fluxo de carbono aumentado para RebM (bem como produtos de glicosilação superiores) e particularmente devido a bolsas de ligação de substrato que são mais capazes de acomodar substratos maiores, sem perda substancial de atividade em intermediários glicosilados inferiores. Nessas modalidades, as enzimas UGT (como as enzimas UGT de 1-3' e 1-2' glicosilação) podem ter uma taxa de atividade aumentada (por exemplo, taxa de ligação e renovação do substrato) com substratos de esteviol mais altamente glicosilados, como RebA ou RebD.

[044] Derivados de enzimas UGT geralmente compreendem uma sequência de aminoácidos com pelo menos cerca de 50% de identidade, pelo menos cerca de 60% de identidade, pelo menos cerca de 70% de identidade, pelo menos cerca de 80% de identidade, pelo menos cerca de 85% de identidade, ou pelo menos cerca de 90% de identidade, ou pelo menos cerca de 95% de identidade, ou pelo menos 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade com uma ou mais das SEQ ID NOS: 1 a 46. Em algumas modalidades, o derivado tem de 1 a 20 ou de 1 a 10, ou de 1 a 5 modificações de aminoácidos (independentemente selecionadas a partir de substituições, inserções e deleções de aminoácidos), no que diz respeito a uma das SEQ ID NOS: 1 a 46. Em algumas modalidades, por exemplo, com relação à produção de RebM e outros glicosídeos de esteviol avançados (por exemplo, com pelo menos 5 grupos glicosil) a partir de intermediários glicosídeos de esteviol, os derivados dessas enzimas UGT compreendem uma sequência de aminoácidos com pelo menos cerca de 50% de identidade, pelo menos cerca de 60% de identidade, pelo menos cerca de 70% de identidade, pelo menos cerca de 80% de identidade, pelo menos cerca de 85% de identidade, ou pelo menos cerca de 90% de identidade, ou pelo menos cerca de 95% de identidade, ou pelo menos 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade com uma ou mais das SEQ ID NOS: 1 a 17. Em algumas modalidades, o derivado tem de 1 a 20 ou de 1 a 10, ou de 1 a 5 modificações de aminoácidos

(independentemente selecionadas a partir de substituições, inserções e deleções de aminoácidos), no que diz respeito a uma das SEQ ID NOS: 1 a 17.

[045] Em algumas modalidades, a célula microbiana expressa uma enzima UGT de 1-3' compreendendo uma sequência de aminoácidos que é pelo menos cerca de 75% idêntica à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 ou SEQ ID NO: 17. Em algumas modalidades, o UGT de 1-3' compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos cerca de 80% idêntica à SEQ ID NO: 15, 16 ou 17. Em algumas modalidades, a sequência de aminoácidos da enzima UGT de 1-3' é pelo menos cerca de 85% idêntica à SEQ ID NO: 15, 16 ou 17, ou pelo menos cerca de 90% idêntica à SEQ ID NO: 15, 16, ou 17 ou pelo menos cerca de 95% idêntica à SEQ ID NO: 15, 16 ou 17, ou pelo menos cerca de 98% idêntica à SEQ ID NO: 15, 16 ou 17. Em algumas modalidades, a sequência de aminoácidos da enzima UGT de 1-3' compreende o aminoácido de SEQ ID NO: 15, 16 ou 17.

[046] Por exemplo, a sequência de aminoácidos pode ter de 1 a 20 modificações de aminoácidos independentemente selecionadas a partir de substituições, deleções e inserções, no que diz respeito à sequência de aminoácidos SEQ ID NO: 15, 16 ou 17. Em algumas modalidades, a sequência de aminoácidos tem de 1 a 10 modificações de aminoácidos (por exemplo, de 1 a 5) independentemente selecionadas a partir de substituições, deleções e inserções, no que diz respeito à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, 16, ou 17. As modificações de aminoácidos à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, 16 ou 17 podem ser guiadas por estruturas de enzima disponíveis e construção de modelos de homologia. Estruturas exemplares são descritas em, *por exemplo*, 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. Estruturas cristalinas publicamente disponíveis (*por exemplo*, entrada PDB: 2PQ6) podem ser usadas para informar modificações de aminoácidos. Por exemplo, uma ou mais modificações de aminoácidos podem ser feitas ao sítio ativo ou à vizinhança do sítio ativo para melhorar a ligação do substrato e/ou para melhorar as geometrias de reação desses substratos com cadeias laterais catalíticas.

[047] Em algumas modalidades, a enzima UGT de 1-3' compreende uma

substituição de aminoácido nas posições correspondentes às posições 29, 200, 357 e 414 da SEQ ID NO: 3 (*Stevia rebaudiana* UGT76G1). As substituições nessas posições, que estão incluídas nas enzimas de SEQ ID NOS: 15 e 17 (posições 183, 354, 54 e 111, respectivamente, em SEQ ID NO: 15) podem fornecer melhorias dramáticas à atividade. Em algumas modalidades, a identidade de aminoácidos nas posições correspondentes às posições 183, 354, 54 e 111 da SEQ ID NO: 15 permite modificações adicionais em outras posições. Por exemplo, em algumas modalidades, a enzima UGT de 1-3' compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos cerca de 60% idêntica à sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 ou 17, em que a enzima UGT compreende: uma glicina (G) ou treonina (T) na posição correspondente à posição 54 da SEQ ID NO: 15; uma leucina (L) ou isoleucina (I) na posição correspondente à posição 111 da SEQ ID NO: 15; uma metionina (M) ou leucina (L) na posição correspondente à posição 183 da SEQ ID NO: 15; e uma alanina (A), ou glicina (G), ou serina (S) na posição correspondente à posição 354 da SEQ ID NO: 15. Em algumas modalidades, a enzima UGT de 1-3' compreende uma metionina (M) na posição correspondente à posição 183 da SEQ ID NO: 15. Em algumas modalidades, a enzima UGT de 1-3' compreende uma glicina (G) na posição correspondente à posição 54 da SEQ ID NO: 15. Em algumas modalidades, a enzima UGT de 1-3' compreende uma leucina (L) na posição correspondente à posição 111 da SEQ ID NO: 15. Em algumas modalidades, a UGT de 1-3' tem duas ou três dentre uma metionina (M) na posição correspondente à posição 183 da SEQ ID NO: 15, uma glicina (G) na posição correspondente à posição 54 da SEQ ID NO: 15 e uma leucina (L) na posição correspondente à posição 111 da SEQ ID NO: 15. Essas modificações podem fornecer melhorias substanciais à atividade da enzima.

[048] Em algumas modalidades, a enzima UGT de 1-3' compreende uma inserção de 5 a cerca de 15 aminoácidos, como de 6 a 12 aminoácidos, ou cerca de 6 ou cerca de 11 aminoácidos, após a posição correspondente à posição 155 da SEQ ID NO: 15. Em algumas modalidades, a inserção é uma sequência flexível e hidrofílica que é predominantemente resíduos de Glicina e Serina. Em algumas modalidades, a sequência é GSGGSG (SEQ ID NO: 47) ou GSGGSGGSG (SEQ ID NO: 48).

[049] Em várias modalidades, a enzima UGT de 1-3' mostra conversão melhorada de esteviosídeo em Reb A e conversão melhorada de RebD em RebM, em comparação com UGT76G1-L200A (SEQ ID NO: 14). Essa conversão melhorada é exibida em um ensaio de bioconversão onde o esteviosídeo ou substrato de RebD é alimentado às células microbianas expressando a enzima UGT de 1-3'. A conversão melhorada pode ser demonstrada em reações com lisados celulares contendo UGT de 1-3' expressa de forma recombinante ou reações in vitro com UGT de 1-3' purificada ou parcialmente purificada.

[050] Mudanças na sequência de aminoácidos de uma enzima podem alterar sua atividade ou não ter nenhum efeito mensurável. Mudanças silenciosas sem efeito mensurável muitas vezes são substituições conservadoras e pequenas inserções ou deleções em superfícies expostas a solvente que estão localizadas longe dos sítios ativos e dos sítios de ligação do substrato. Em contraste, a atividade enzimática é mais provável de ser afetada por substituições não conservadoras, grandes inserções ou deleções e mudanças dentro de sítios ativos, sítios de ligação do substrato e em posições ocultas importantes para o enovelamento ou conformação da proteína. Mudanças que alteram a atividade enzimática podem aumentar ou diminuir a taxa de reação ou aumentar ou diminuir a afinidade ou especificidade por um substrato específico. Por exemplo, mudanças que aumentam o tamanho de um sítio de ligação do substrato podem permitir que uma enzima atue em substratos maiores e mudanças que posicionam uma cadeia lateral catalítica de aminoácidos mais perto de um sítio alvo em um substrato podem aumentar a taxa enzimática.

[051] O conhecimento da estrutura tridimensional de uma enzima e a localização dos sítios ativos relevantes, sítios de ligação do substrato e outros sítios de interação pode facilitar o projeto racional de derivados e fornecer uma visão mecanicista do fenótipo de mudanças específicas. As UGTs vegetais compartilham uma estrutura secundária e terciária altamente conservada, embora tenham uma identidade de sequência de aminoácidos relativamente baixa. Osmani et al, Substrate specificity of plant UDP-dependent glycosyltransferases predicted from crystal structure and homology modeling, *Phytochemistry* 70 (2009) 325-347. Os substratos aceitador de açúcar e doador de açúcar de UGTs são acomodados em uma fenda formada entre os domínios de terminais N e C. Várias

regiões da sequência primária contribuem para a formação da bolsa de ligação de substrato, incluindo domínios estruturalmente conservados, bem como regiões de alça diferindo tanto no que diz respeito à sua sequência de aminoácidos quanto ao comprimento da sequência.

[052] A construção de derivados de UGT pode ser guiada com base na modelagem de homologia em comparação com estruturas conhecidas. Por exemplo, com base na análise da estrutura cristalina de SrUGT76G1_L200A e um alinhamento de sequência de aminoácidos de SrUGT76G1 a MbUGT3-1_1, prevê-se que o núcleo de esteviol de esteviosídeo está próximo (dentro de 4 Å) dos seguintes resíduos de MbUGT3-1_1: I244, L280, W351, A354, I357, M362 e T438. Adicionalmente, prevê-se que a 1-2 glicosilação em C19 está próxima (dentro de 4 Å) de T438. Prevê-se que o núcleo de esteviol de RebD está próximo (dentro de 4 Å) das seguintes cadeias laterais hidrofóbicas de MbUGT3-1_1: L239, M242, I244, L280, I353, A354 e I357. Prevê-se que a 1-2' glicosilação em C13 está próxima (dentro de 4 Å) das seguintes cadeias laterais de ligação de hidrogênio de MbUGT3-1_1: S301 e D77. O posicionamento e o conteúdo de aminoácidos das hélices V341-Q352 e K355-A367 de MbUGT3-1_1 podem ser importantes para a catálise, pois a mutação correspondente a L200A está em uma alça entre essas hélices. As posições L76 e/ou D77 de MbUGT3-1_1 podem interagir com a glicosilação em C13 de esteviosídeo.

[053] A sequência de aminoácidos de uma ou mais enzimas UGT pode incluir opcionalmente uma alanina inserida ou substituída na posição 2 para diminuir a renovação na célula. Em várias modalidades, uma ou mais enzimas UGT compreendem um resíduo de aminoácido alanina inserido ou substituído na posição 2 para fornecer estabilidade adicional *in vivo*.

[054] A identidade das sequências de aminoácidos, isto é, a porcentagem de identidade de sequência, pode ser determinada por meio de alinhamentos de sequências. Tais alinhamentos podem ser realizados com vários algoritmos conhecidos, como o descrito por Karlin e Altschul (Karlin & Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-5877), com hmalign (pacote HMMER) ou com o algoritmo CLUSTAL (Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-80). O grau de identidade de sequência (correspondência de sequência) pode ser calculado usando, por exemplo, BLAST, BLAT ou BlastZ (ou

BlastX). Um algoritmo semelhante é incorporado aos programas BLASTN e BLASTP de Altschul et al (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410. Os alinhamentos de proteína BLAST podem ser realizados com o programa BLASTP, pontuação = 50, comprimento de palavra = 3. Para obter alinhamentos com lacunas para fins comparativos, Gapped BLAST é utilizado como descrito em Altschul et al (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402. Ao utilizar os programas BLAST e Gapped BLAST, os parâmetros padrão dos respectivos programas são usados.

[055] As enzimas UGT podem ser integradas ao cromossomo da célula microbiana ou, alternativamente, serem expressas extracromossomicamente. Por exemplo, as enzimas UGT podem ser expressas a partir de um cromossomo artificial bacteriano (BAC) ou cromossomo artificial de levedura (YAC).

[056] A expressão das enzimas UGT pode ser ajustada para atividade ótima, usando, por exemplo, módulos de gene (por exemplo, operons) ou expressão independente das enzimas UGT. Por exemplo, a expressão dos genes ou operons pode ser regulada através da seleção de promotores, como promotores induzíveis ou constitutivos, com diferentes intensidades (por exemplo, forte, intermediária ou fraca). Vários exemplos não-limitativos de promotores de diferentes intensidades incluem Trc, T5 e T7. Adicionalmente, a expressão de genes ou operons pode ser regulada através da manipulação do número de cópia do gene ou operon na célula. Em algumas modalidades, a célula expressa uma única cópia de cada enzima UGT. Em algumas modalidades, a expressão de genes ou operons pode ser regulada através da manipulação da ordem dos genes dentro de um módulo, onde os genes transcritos primeiro são geralmente expressos em um nível superior. Em algumas modalidades, a expressão de genes ou operons é regulada através da integração de um ou mais genes ou operons ao cromossomo.

[057] A otimização da expressão de UGT também pode ser alcançada através da seleção de promotores apropriados e sítios de ligação de ribossomos. Em algumas modalidades, isto pode incluir a seleção de plasmídeos com elevado número de cópias, ou plasmídeos com número de cópia único, baixo ou médio. A etapa de terminação da transcrição também pode ser direcionada para a regulação da expressão gênica, através da introdução ou eliminação de estruturas como haste-alças.

[058] A conversão com células inteiras requer que o substrato (por exemplo, intermediários glicosídeos) esteja disponível para a célula para glicosilação pelas enzimas expressas (por exemplo, as enzimas expressas intracelularmente) e, preferencialmente, o produto pode ser extraído a partir do meio extracelular. Os sistemas com células inteiras têm vantagens, uma vez que a célula fornece a regeneração do cofator UDP-glicose. Isso em contraste com os processos que usam enzimas da lise celular ou da secreção fora da célula, que requerem um suprimento de UDP-glicose exógeno ou precursor de UDP-glicose ou mecanismo de regeneração de UDP-glicose ou sistema de enzima de regeneração de UDP-glicose. Nas modalidades da presente invenção, a catálise (glicosilação) é realizada com células microbianas vivas e a reciclagem do cofator UDP-glicose ocorre usando o metabolismo celular sem necessidade de alimentação de enzima ou alimentação de substrato para regeneração de UDP-glicose.

[059] US 2017/0332673 descreve cepas de *E. coli* que superexpressam enzimas da via do MEP, juntamente com uma via da biossíntese de esteviol a jusante e enzimas UGT para conduzir a produção de RebM a partir da glicose. No entanto, essas cepas não realizam a biocatálise de intermediários de glicosídeo de esteviol alimentados em RebM, o que pode ser, em parte, devido à incapacidade da célula hospedeira de obter acesso ao substrato de glicosídeo de esteviol. De acordo com a presente divulgação, as modificações genéticas à célula microbiana permitem que intermediários glicosilados estejam disponíveis para glicosilação adicional em um sistema celular inteiro. Adicionalmente, o produto pode ser recuperado a partir do meio extracelular, o que facilita a purificação e o processamento a jusante do produto.

[060] Em algumas modalidades, a célula microbiana tem uma ou mais modificações genéticas que aumentam a disponibilidade de UDP-glicose. Em algumas modalidades, sem desejar ser limitado pela teoria, essas modificações também podem estressar a célula por disponibilidade de glicose, levando à expressão aumentada de transportadores endógenos para importar glicosídeos de esteviol para dentro da célula. Os níveis de UDP-glicose de tipo selvagem em *E. coli* em crescimento exponencial são de cerca de 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.). Em algumas modalidades, as modificações genéticas à célula hospedeira são modificadas para aumentar UDP-glicose, por exemplo, para pelo menos 5 mM, ou pelo menos 10 mM, em células crescendo exponencialmente (por exemplo, que não têm expressão recombinante de enzimas UGT).

[061] Em algumas modalidades, a célula microbiana tem uma deleção, inativação ou atividade ou expressão reduzida de um gene codificando uma enzima que consome UDP-glicose. Por exemplo, a célula microbiana pode ter uma deleção, inativação ou atividade reduzida de *ushA* (hidrolase de UDP-açúcar) e/ou um ou mais dentre *galE*, *galT*, *galK* e *galM* (que são responsáveis pela biossíntese de UDP-galactose a partir de UDP-glicose) ou ortólogo destes na espécie microbiana. Em algumas modalidades, os genes *galETKM* são inativados, deletados ou substancialmente reduzidos na expressão. Alternativamente ou adicionalmente, a célula microbiana tem uma deleção, inativação ou atividade ou expressão reduzida de *E. coli* *otsA* (trealose-6-fosfato sintase) ou ortólogo desta na espécie microbiana. Alternativamente ou adicionalmente, a célula microbiana tem uma deleção, inativação ou atividade ou expressão reduzida de *E. coli* *ugd* (UDP-glicose 6-desidrogenase) ou ortólogo desta na espécie microbiana. Reduzir ou eliminar a atividade de *otsA* e *ugd* pode remover ou reduzir os sumidouros de UDP-glicose em trealose ou UDP-glucuronidato, respectivamente.

[062] Outros sumidouros de UDP-glicose que podem ser reduzidos ou eliminados incluem eliminar ou reduzir a atividade ou expressão de genes responsáveis por glicosilar lipídeos e biossíntese de LPS e genes responsáveis por glicosilar undecaprenil-difosfato (UPP). Os genes envolvidos na glicosilação de lipídios ou na biossíntese de LPS incluem *E. coli* *waaG* (lipopolissacarídeo glucosiltransferase 1), *E. coli* *waaO* (UDP-D-glicose: (glucosil) LPS α -1,3-glucosiltransferase)) e *E. coli* *waaJ* (UDP-glicose: (glucosil)LPS α -1,2-glucosiltransferase)). Os genes responsáveis por glicosilar undecaprenil-difosfato (UPP) incluem *E. coli* *yfdG* (putativa glicose translocase ligada a bactoprenol), *E. coli* *yfdH* (bactoprenol glucosil transferase), *E. coli* *yfdI* (glucosil transferase de sorotipo específico) e *E. coli* *wcaJ* (undecaprenil-fosfato glicose fosfotransferase). A deleção, inativação ou redução na atividade ou expressão de um ou mais

desses produtos gênicos (ou ortólogos correspondentes na célula microbiana) podem aumentar a disponibilidade de UDP-glicose.

[063] Nessas ou em outras modalidades, a célula microbiana tem uma deleção, inativação ou atividade ou expressão reduzida de um gene codificando uma enzima que consome um precursor de UDP-glicose. Por exemplo, em algumas modalidades, a célula microbiana tem uma deleção, inativação ou atividade ou expressão reduzida de *pgi* (glicose-6 fosfato isomerase) ou ortólogo desta na espécie microbiana da célula hospedeira.

[064] Nessas ou em outras modalidades, a célula tem uma superexpressão ou atividade aumentada de um ou mais genes codificando uma enzima envolvida na conversão de glicose-6-fosfato em UDP-glicose. Por exemplo, *pgm* (fosfoglucomutase) e/ou *galU* (UTP-glicose-1-fosfato uridililtransferase) (ou ortólogo ou derivado deste) podem ser superexpressos ou mudados para aumentar a produtividade da enzima. Alternativamente ou adicionalmente, *E. coli* *ycjU* (β -fosfoglucomutase), que converte glicose-6-fosfato em glicose-1-fosfato, e *Bifidobacterium bifidum* *ugpA*, que converte glicose-1-fosfato em UDP, ou ortólogo ou derivado dessas enzimas, podem ser superexpressas ou mudadas para aumentar a produtividade da enzima.

[065] Alternativamente ou adicionalmente, a célula microbiana tem uma ou mais modificações genéticas que aumentam o fluxo para a via da pentose fosfato (PPP), como uma superexpressão ou aumento da atividade de *E. coli* *zwf* (ou homólogo ou derivado modificado desta), que é um NADP + -dependente de glicose-6-fosfato desidrogenase.

[066] Alternativamente ou adicionalmente, a célula microbiana tem uma ou mais modificações genéticas que aumentam o transporte de glicose. Tais modificações incluem expressão ou atividade aumentada de *E. coli* *galP* (galactose: simportador de H⁺) e *E. coli* *glk* (glucoquinase), ou alternativamente *Zymomonas mobilis* *glf* e *E. coli* *glk*, ou homólogos, ortólogos ou derivados modificados desses genes.

[067] Alternativamente ou adicionalmente, a célula microbiana tem uma ou mais modificações genéticas que aumentam a produção e reciclagem de UTP. Tais modificações incluem expressão ou atividade aumentadas de *E. coli* *pyrH* (UMP quinase), *E. coli* *cmk* (citidilato quinase), *E. coli* *adk* (adenilato quinase) ou

E. coli ndk (nucleosídeo difosfato quinase) ou homólogos, ortólogos, ou derivados modificados dessas enzimas.

[068] Alternativamente ou adicionalmente, a célula microbiana tem uma ou mais modificações genéticas que aumentam a produção de UDP. Tais modificações incluem a superexpressão ou atividade aumentada de um ou mais dentre *E. coli* upp (uracil fosforibosiltransferase), *E. coli* dctA (C4 dicarboxilato/orotato: simportador de H⁺), *E. coli* pirE (orotato fosforibosiltransferase) e *E. coli* pyrF (orotidina-5'-fosfato descarboxilase), incluindo homólogos, ortólogos ou derivados modificados destas. Por exemplo, em algumas modalidades, a célula microbiana superexpressa ou tem atividade aumentada de upp, pyrH e cmk ou homólogo ou derivado modificado destes. Alternativamente, a célula microbiana superexpressa ou tem atividade aumentada de dctA, pyrE, pyrH e cmk ou homólogo ou derivado modificado destes.

[069] Alternativamente ou adicionalmente, a célula microbiana pode ter uma ou mais modificações genéticas para remover ou reduzir a regulação da captação de glicose. Por exemplo, a célula microbiana pode ter uma deleção, inativação ou expressão reduzida de sgrS, que é um pequeno RNA regulador em *E. coli*.

[070] Alternativamente ou adicionalmente, a célula microbiana pode ter uma ou mais modificações genéticas que reduzem a desfosforilação de glicose-1-fosfato. Modificações exemplares incluem deleção, inativação ou expressão ou atividade reduzida de uma ou mais dentre *E. coli* agp (glicose-1-fosfatase), *E. coli* yihX (α -D-glicose-1-fosfato fosfatase), *E. coli* ybiV (fosfatase de açúcar), *E. coli* yidA (fosfatase de açúcar), *E. coli* yigL (fosfoaçúcar fosfatase) e *E. coli* phoA (fosfatase alcalina) ou um ortólogo destas na célula microbiana.

[071] Alternativamente ou adicionalmente, a célula microbiana pode ter uma ou mais modificações genéticas que reduzem a conversão de glicose-1-fosfato em TDP-glicose. Modificações exemplares incluem deleção, inativação ou expressão ou atividade reduzida de uma ou mais dentre *E. coli* rffH (dTDP-glicose pirofosforilase) e *E. coli* rfbA (dTDP glicose pirofosforilase) ou um ortólogo destas na célula microbiana.

[072] Alternativamente ou adicionalmente, a célula microbiana pode ter uma ou mais modificações genéticas que reduzem a conversão de glicose-1-

fosfato em ADP-glicose. Modificações exemplares incluem deleção, inativação ou expressão ou atividade reduzida de *E. coli* *gigC* (glicose-1-fosfato adenililtransferase) ou um ortólogo desta na célula microbiana.

[073] Em algumas modalidades, a célula microbiana é uma célula bacteriana compreendendo as modificações genéticas: *ushA* e *galETKM* são deletadas, inativadas ou reduzidas em expressão; *pgi* é deletada, inativada ou reduzida em expressão; e *pgm* e *galU* são superexpressas ou complementadas.

[074] Em algumas modalidades, os genes endógenos são editados seja para inativar ou para reduzir a atividade enzimática, alterando a sequência de aminoácidos da proteína codificada, ou para reduzir a expressão através da edição de sequências de controle de expressão. A edição pode modificar promotores endógenos, sequências de ligação ribossomal ou outras sequências de controle de expressão e/ou, em algumas modalidades, modifica fatores de ação trans e/ou cis na regulação gênica. A edição de genoma pode ocorrer usando técnicas de edição de genoma CRISPR/Cas ou técnicas semelhantes empregando nucleases de dedo de zinco e TALENs. Em algumas modalidades, os genes endógenos são substituídos por recombinação homóloga.

[075] A célula microbiana em várias modalidades não expressa uma via da biossíntese recombinante para a produção de precursores (por exemplo, compreendendo uma ou mais enzimas vegetais). Por exemplo, para células microbianas produzindo RebM (e outros produtos de glicosilação avançados) de acordo com modalidades da invenção não expressam uma via da biossíntese de esteviol, como copalil sintetase, caureno sintase, caureno oxidase e/ou hidroxilase de ácido caurenóico, tal que a produção de RebM e outros produtos de glicosilação avançados depende da alimentação de intermediários de glicosídeo de esteviol à célula.

[076] Em várias modalidades, a célula microbiana é uma bactéria selecionada a partir de *Escherichia* spp., *Bacillus* spp., *Rhodobacter* spp., *Zymomonas* spp. ou *Pseudomonas* spp. Em algumas modalidades, a espécie bacteriana é selecionada a partir de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Zymomonas mobilis* ou *Pseudomonas putida*. Em algumas modalidades, a célula bacteriana é *E. coli*.

[077] Em outras modalidades, a célula é uma célula fúngica, como uma

célula de levedura, como, por exemplo, *Saccharomyces spp.*, *Schizosaccharomyces spp.*, *Pichia spp.*, *Phaffia spp.*, *Kluyveromyces spp.*, *Candida spp.*, *Talaromyces spp.*, *Brettanomyces spp.*, *Pachysolen spp.*, *Debaryomyces spp.*, *Yarrowia spp.* e cepas de leveduras poliploides industriais. Em uma modalidade, a levedura pode ser uma espécie de *Saccharomyces*, *Pichia* ou *Yarrowia*, incluindo *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* e *Yarrowia lipolytica*. Em algumas modalidades, a célula de levedura expressa um ou mais transportadores bacterianos, ou derivados destes, que importam intermediários de glicosídeo para dentro da célula para glicosilação adicional.

[078] Em várias modalidades, a célula microbiana tem uma superexpressão de um ou mais transportadores endógenos (por exemplo, em comparação com uma cepa microbiana parental) ou, em certas modalidades, é mudada para expressar uma proteína de transporte recombinante e/ou modificada. Em algumas modalidades, a célula microbiana expressa uma ou mais cópias adicionais de uma proteína de transporte endógena ou um derivado desta. Por exemplo, a expressão ou atividade de proteínas de transporte pode ser mudada para aumentar o transporte para dentro da célula de intermediários de glicosídeo de esteviol (por exemplo, um ou mais dentre esteviosídeo, esteviolbiosídeo e RebA, entre outros), ao exportar produtos, como RebM e/ou RebD e/ou outros glicosídeos de esteviol glicosilados avançados.

[079] Proteínas de transporte exemplares que podem ser superexpressas ou modificadas para atividade alterada ou especificidade de substrato na célula microbiana incluem *E. coli* acrAD, xylE, ascF, bglF, chbA, ptsG/crr, wzxE, rfbX, bem como ortólogos ou derivados destas. Derivados e ortólogos dessas proteínas geralmente compreendem sequências de aminoácidos com pelo menos cerca de 30%, ou pelo menos cerca de 40%, ou pelo menos cerca de 50% de identidade, pelo menos cerca de 60% de identidade, pelo menos cerca de 70% de identidade, pelo menos cerca de 80% de identidade, pelo menos cerca de 85% de identidade, ou pelo menos cerca de 90% de identidade, ou pelo menos cerca de 95% de identidade, ou pelo menos 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade com a proteína de transporte de *E. coli*.

[080] acrAD is an *E. coli* multidrug efflux pump described in 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. Adicionalmente, uma estrutura homóloga é descrita em Yu, EW, et al., Structural basis of multiple drug-binding capacity of the AcrB multidrug efflux pump, *Science* 2003; 300 (5621):976-80.

[081] xylE é um transportador de xilose de *E. coli* com homologia aos transportadores de glicose. xylE é descrito em 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, com estrutura descrita por Sun L, et al., Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT-1-4, *Nature* 2012; 490(7420):361-6.

[082] ascF é descrito por Hall BG e 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. Considera-se que o operon asc desempenha um papel no metabolismo da celobiose em *E. coli*.

[083] bglF é descrito por 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. Uma estrutura homóloga é descrita em Herzberg O., An atomic model for protein-protein phosphoryl group transfer, *J. Biol. Chem.* 1992; 276(34):24819-23. bglF catalisa o transporte e a fosforilação de beta-glucosídeos.

[084] chba é descrito em 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; com a estrutura descrita em 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. O sistema de fosfotransferase de açúcar dependente de fosfoenolpiruvato (açúcar PTS) é um sistema principal de transporte ativo de carboidrato que catalisa a fosforilação de substratos de açúcar de entrada concomitantemente com sua translocação através da membrana celular.

[085] ptsG codifica a permease específica de glicose do sistema de

transporte de fosfotransferase (PTS) e é descrito em 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. Uma estrutura é descrita em Cai M, et al., Solution structure of the phosphoryl transfer complex between the signal-transduction 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.

[086] wzxE e seu papel no transporte molecular são descritos por 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.

[087] rfbX é um transportador de lipopolissacarídeo descrito em Hong Y, et al., Progress in our understanding of wzx flippase for translocation of bacterial membrane lipid-linked oligosaccharide. *J. Bacteriol.* 2018; 200(1).

[088] Outras proteínas de transporte incluem aquelas selecionadas a partir de proteínas de transporte bacterianas ou endógenas que transportam o intermediário glicosídeo desejado para dentro da célula e/ou transportam o produto desejado para fora da célula. Por exemplo, o transportador pode ser da espécie hospedeira ou de outra espécie bacteriana ou de levedura e pode ser modificado para ajustar sua afinidade aos intermediários ou produtos glicosídeos específicos. Por exemplo, a célula hospedeira pode superexpressar um transportador que é pelo menos cerca de 30%, ou pelo menos cerca de 40%, ou pelo menos cerca de 50% idêntico a um transportador de *E. coli* selecionado dentre 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, lptA, lptB, lptC, lptD, lptE, lptF, lptG, mdx, mdtD, mdtG, mdtH, mdtM, mdtL, mhpT, msbA, nanT, narK, narX, narY, 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. Em algumas modalidades, o transportador é pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90% ou pelo menos cerca de 95% idêntico ao

transportador de *E. coli*.

[089] Em algumas modalidades, a célula microbiana expressa uma proteína de transporte que é pelo menos 50% idêntica a um transportador de uma célula eucariótica, como uma levedura, fungo ou célula vegetal. Em algumas modalidades, a proteína de transporte é um transportador da família ABC e que é opcionalmente de uma subclasse transportador PDR (resistência pleiotrópica a drogas), transportador MDR (resistência a múltiplas drogas), transportador da família MFS (Superfamília de Facilitadores Principais) ou SWEET (também conhecido como família PQ-alça, Saliva ou MtN3). Em outras modalidades, a proteína de transporte é de uma família selecionada dentre: AAP, 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 e CDF.

[090] Em algumas modalidades, o transportador é uma proteína de transporte da família ABC (também conhecido como transportadores de cassete de ligação a ATP), que geralmente inclui várias subunidades, uma ou duas das quais são proteínas de transmembrana e uma ou duas das quais são ATPases associadas à membrana. As subunidades ATPase utilizam a energia da ligação e hidrólise do trifosfato de adenosina (ATP) para energizar a translocação de vários substratos através das membranas, seja para captação ou exportação do substrato. O transportador da família ABC pode ser de qualquer subclasse, incluindo, mas não se limitando a: ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF e ABCG.

[091] Em algumas modalidades, a proteína de transporte é uma proteína de transporte da família MFS (também conhecida como Superfamília de Facilitadores Principais), que são carregadores secundários de polipeptídeo único capazes de transportar pequenos solutos em resposta a gradientes de íons quimiosmóticos. Os compostos transportados pelas proteínas de transporte MFS podem incluir açúcares simples, oligossacarídeos, inositóis, drogas, aminoácidos, nucleosídeos, ésteres organofosfatos, metabólitos do ciclo de Krebs e uma grande variedade de ânions e cátions orgânicos e inorgânicos. A título de exemplo, as proteínas de transporte MFS incluem Xyle (de *E. coli*), QacA (de *S. aureus*), Bmr (de *B. subtilis*), UhpT (de *E. coli*), LacY (de *E. coli*), FucP (de *E. coli*) e ExtU (de *E. coli*).

[092] Em algumas modalidades, o transportador é da família de proteínas de transporte SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporters (Transportadores de Açúcares Eventualmente Serão Exportados)) (também conhecida como família PQ-alça, Saliva ou MtN3), que é uma família de transportadores de açúcar e um membro da superfamília TOG. Os membros da família eucariótica de SWEET têm 7 segmentos de transmembrana (TMSs) em um arranjo de repetição 3+1+3. A título de exemplo, as proteínas de transporte SWEET incluem SWEET1, SWEET2, SWEET9, SWEET12, SWEET13 e SWEET14.

[093] Em algumas modalidades, a proteína de transporte é pelo menos 50% idêntica a uma proteína de transporte de *S. cerevisiae*. Em algumas modalidades, o transportador é pelo menos cerca de 60%, pelo menos cerca de 70%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 90% ou pelo menos cerca de 95% idêntico ao transportador de *S. cerevisiae*. Proteínas de transporte de *S. cerevisiae* exemplares incluem AC1, ADP1, ANT1, 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.

[094] Em algumas modalidades, a proteína de transporte de *S. cerevisiae* é selecionada de uma ou mais dentre 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. Em algumas modalidades, a proteína de transporte de *S. cerevisiae* é selecionada de uma ou mais dentre FLR1, PDR1, PDR3, PDR5, PDR10, PDR15, SNQ2, TPO1 e YOR1.

[095] Em algumas modalidades, o transportador é pelo menos 50%, pelo menos 60% idêntico, pelo menos 70% idêntico, pelo menos 80% idêntico ou pelo menos 90 ou 95% idêntico a XP_013706116.1 (de *Brassica napus*), NP_001288941.1 (de *Brassica rapa*), NEC1 (de *Petunia hybrida*) e SWEET13 (de *Triticum urartu*).

[096] Em várias modalidades com relação à biossíntese de RebM, o método resulta em pelo menos 40% de conversão, ou pelo menos 50% de conversão, ou pelo menos 75% de conversão de esteviosídeo, esteviolbiosídeo e RebA em RebM. Em algumas modalidades, a razão de RebM para RebD é de pelo menos 2:1, ou pelo menos 4:1, ou pelo menos 6:1, ou pelo menos 8:1, ou pelo menos 9:1, ou pelo menos 10:1, ou pelo menos 15:1, ou pelo menos 20:1.

[097] O método pode ser realizado por fermentação descontínua, fermentação descontínua alimentada, fermentação contínua ou fermentação semicontínua. Por exemplo, em algumas modalidades, o método é conduzido por fermentação descontínua ou fermentação descontínua fermentada com tempos de incubação de menos de cerca de 72 horas, ou, em algumas modalidades, menos de cerca de 48 horas ou menos de cerca de 24 horas.

[098] Embora as enzimas UGT nativas sejam geralmente enzimas vegetais (que muitas vezes têm temperaturas ótimas na faixa de 20-24 °C) ou sejam derivadas a partir de enzimas vegetais, a presente divulgação em algumas modalidades permite a produção do produto glicosilado com alto rendimento em células microbianas (por exemplo, células bacterianas, como *E. coli*), com produtividade de enzima a temperaturas de cerca de 24 °C ou mais, como de cerca de 24 °C a cerca de 37 °C, ou de cerca de 27 °C a cerca de 37 °C, ou de cerca de 30 °C a cerca de 37 °C.

[099] Em algumas modalidades, o meio de fase de crescimento ou produção pode conter um ou mais detergentes em uma quantidade suficiente para potencializar a permeabilidade celular, sem impacto significativo no crescimento

ou viabilidade. Detergentes exemplares incluem Tween 20, Triton X-100 e SDS, entre outros.

[0100] Em algumas modalidades, o processo é escalonável para produção em grande escala. Por exemplo, em algumas modalidades, o tamanho da cultura é de pelo menos cerca de 100 L, pelo menos cerca de 200 L, pelo menos cerca de 500 L, pelo menos cerca de 1.000 L, ou pelo menos cerca de 10.000 L.

[0101] Em várias modalidades, os métodos incluem adicionalmente recuperar o produto glicosilado da cultura celular ou dos lisados celulares. Em algumas modalidades, a cultura produz pelo menos cerca de 100 mg/L, ou pelo menos cerca de 200 mg/L, ou pelo menos cerca de 500 mg/L, ou pelo menos cerca de 1 g/L, ou pelo menos cerca de 2 g/L, ou pelo menos cerca de 5 g/L, ou pelo menos cerca de 10 g/L, ou pelo menos cerca de 20 g/L, ou pelo menos cerca de 30 g/L, ou pelo menos cerca de 40 g/L, ou pelo menos cerca de 50 g/L do produto glicosilado, que, em algumas modalidades é extraído do meio de cultura.

[0102] Em algumas modalidades, os produtos glicosilados (por exemplo, RebM) são purificados dos componentes da mídia. Assim, em algumas modalidades, os métodos compreendem separar o meio de crescimento das células hospedeiras e isolar os produtos de glicosilação desejados (por exemplo, RebM) do meio de crescimento. Em algumas modalidades, o produto como RebM é adicionalmente extraído do material celular.

[0103] Em alguns aspectos, a invenção fornece métodos para fazer um produto compreendendo um produto glicosilado, como RebM. O método compreende incorporar o glicosídeo de esteviol alvo (produzido de acordo com a divulgação) a um produto, como um alimento, bebida, produto de higiene oral, adoçante, agente aromatizante ou outro produto. Os glicosídeos de esteviol purificados, preparados de acordo com a presente invenção, podem ser usados em uma variedade de produtos, incluindo, mas não se limitando a, alimentos, bebidas, texturantes (por exemplo, amidos, fibras, gomas, gorduras e miméticos de gordura e emulsificantes), composições farmacêuticas, produtos de tabaco, composições nutracêuticas, composições de higiene oral e composições cosméticas. Exemplos não limitativos de sabores para os quais RebM pode ser usado em combinação incluem sabores de lima, limão, laranja, fruta, banana, uva, pera, abacaxi, manga, amêndoa amarga, cola, canela, açúcar, algodão doce e

baunilha. Exemplos não limitativos de outros ingredientes alimentares incluem aromas, acidulantes e aminoácidos, agentes corantes, agentes de volume, amidos modificados, gomas, texturizantes, conservantes, antioxidantes, emulsificantes, estabilizantes, espessantes e agentes gelificantes.

[0104] Em alguns aspectos, a invenção fornece métodos para fazer um produto adoçante compreendendo uma pluralidade de adoçantes de alta intensidade, a referida pluralidade incluindo dois ou mais dentre um glicosídeo de esteviol, um mogrosídeo, sucralose, aspartame, neotame, advantame, acessulfame de potássio, sacarina, ciclamato, neoesperidina di-hidrocalcona, gnetifolina E e/ou piceatanol 4'-O- β -D-glicopiranosídeo. O método pode compreender adicionalmente incorporar o produto adoçante a um alimento, bebida, produto de higiene oral, adoçante, agente aromatizante ou outro produto, incluindo aqueles descritos acima.

[0105] O(s) glicosídeo(s) de esteviol alvo(s), como RebM, e composições adoçantes que compreendem o(s) mesmo(s) podem ser usados em combinação com várias substâncias fisiologicamente ativas ou ingredientes funcionais. Ingredientes funcionais geralmente são classificados em categorias como carotenoides, fibra alimentar, ácidos graxos, saponinas, antioxidantes, nutracêuticos, flavonoides, isotiocianatos, fenóis, esteróis e estanois vegetais (fitoesteróis e fitoestanois); polióis; prebióticos, probióticos; fitoestrogênios; proteína de soja; sulfetos/tióis; aminoácidos; proteínas; vitaminas; e minerais. Ingredientes funcionais também podem ser classificados com base em seus benefícios à saúde, como cardiovasculares, redutores de colesterol e anti-inflamatórios.

[0106] Adicionalmente, glicosídeo(s) de esteviol alvo(s), como RebM, e composições adoçantes obtidas de acordo com esta invenção podem ser aplicados como um adoçante de alta intensidade para produzir bebidas de zero caloria, calorias reduzidas ou diabéticas e produtos alimentícios com características de sabor melhoradas. Também podem ser usados em bebidas, gêneros alimentícios, produtos farmacêuticos e outros produtos nos quais açúcar não pode ser usado. Adicionalmente, RebM e composições adoçantes podem ser usados como um adoçante não apenas em bebidas, gêneros alimentícios e outros produtos destinados ao consumo humano, mas também em rações e forragens

para animais com características melhoradas.

[0107] Exemplos de produtos nos quais glicosídeo(s) de esteviol alvo(s) pode(m) ser usado(s) como composição(ões) adoçante(s) incluem, mas não estão limitados a, bebidas alcoólicas como vodka, vinho, cerveja, licor e saquê etc.; sucos naturais; bebidas refrescantes; refrigerantes gaseificados; bebidas dietéticas; bebidas com zero calorias; bebidas e alimentos com calorias reduzidas; bebidas de iogurte; sucos instantâneos; café instantâneo; bebidas instantâneas do tipo em pó; produtos enlatados; xaropes; pasta de soja fermentada; molho de soja; vinagre; molhos; maionese; ketchups; curry; sopa; caldo instantâneo; molho de soja em pó; vinagre em pó; tipos de biscoitos; biscoito de arroz; bolachas; pão; chocolates; caramelo; doce; goma de mascar; gelatina; pudim; frutas e vegetais em conserva; creme fresco; geleia; marmelada; pasta de flores; leite em pó; sorvete; sorbet; vegetais e frutas embalados em garrafas; feijão enlatado e cozido; carne e alimentos cozidos em molho adoçado; produtos alimentares vegetais agrícolas; frutos do mar; presunto; linguiça; presunto de peixe; salsicha de peixe; pasta de peixe; produtos de peixe fritos; produtos de frutos do mar secos; produtos alimentícios congelados; algas marinhas em conserva; carne em conserva; tabaco; produtos medicinais; e muitos outros.

[0108] Durante a fabricação de produtos como gêneros alimentícios, bebidas, produtos farmacêuticos, cosméticos, de mesa e goma de mascar, os métodos convencionais, como mistura, amassadura, dissolução, decapagem, permeação, percolação, aspersão, atomização, infusão e outros métodos podem ser usados.

[0109] As modalidades da invenção são demonstradas nos seguintes exemplos não limitativos.

EXEMPLOS

[0110] A Tabela 2 mostra o conteúdo de glicosídeo de esteviol de três lotes de extrato de folha de estêvia. Dois intermediários, RebA e esteviosídeo, na via para RebM, são os dois glicosídeos primários nos lotes.

Tabela 2: Composição de Glicosídeo de Esteviol do Extrato de Folha de Estêvia Disponível

%	Lote 1	Lote 2	Lote 3
Rebaudiosídeo A	38,2	10,5	30,3

Esteviosídeo	8,5	9,0	18,4
Rebaudiosídeo C	12,9	4,2	16,6
Rebaudiosídeo B	4,3	7,1	1,2
Rubusosídeo	5,0	2,2	2,0
Rebaudiosídeo F	2,0	2,7	2,1
Esteviolbiosídeo	0,3	3,7	0,3
Rebaudiosídeo D	0,2	2,1	0,9
Dulcosídeo A	0,9	0,4	0,5

[0111] A FIG. 4 mostra a bioconversão de intermediários de glicosídeo de esteviol glicosilados. No experimento, esteviolbiosídeo 0,2 mM foi alimentado a cepas modificadas de *E. coli* em placas de 96 poços. A formação do produto foi examinada após 48 horas. A bioconversão com células inteiras mesmo de um intermediário inicial, como o esteviolbiosídeo, é possível, mas para *E. coli* nativa o substrato glicosilado não está disponível para as enzimas UGT (a Cepa 5 mostra atividade substancial, enquanto as Cepas 3 e 4 mostram atividade insignificante). Os detalhes das Cepas são descritos na FIG. 8. Os valores relatados na FIG. 4 são a concentração do composto em relação ao controle (a concentração de cada composto é dividida pela concentração total desses compostos para o controle do vetor vazio). As modificações contidas na Cepa 5 demonstram a bioconversão de esteviolbiosídeo em RebM.

[0112] Cada uma das Cepas 1-5 continha um BAC (cromossomo bacteriano artificial), que é um plasmídeo de cópia única, que expressa quatro enzimas UGT separadamente: MbUGTC13, MbUGT1.2_2, MbUGTc19_2 e 76G1_L200A. O controle continha a mesma estrutura BAC, mas sem as enzimas UGT.

[0113] A FIG. 8 mostra modificações genéticas para aumentar o fluxo de *E. coli* nativa para UDP-glicose, um substrato crítico para as UGTs na via do RebM. Fluxo maior que o nativo para UDP-glicose pode permitir uma maior formação de RebM, aumentando a quantidade de substrato disponível para as UGTs. As modificações resultando na Cepa 5 também resultam na capacidade da célula converter glicosídeos de esteviol alimentados em RebM. Para as Cepas 2 e 3, as enzimas que consomem UDP-glicose (*ushA*, *galETKM*) foram deletadas. A Cepa 4 foi criada a partir da Cepa 3 deletando uma enzima (*pgi*) que consome um precursor de UDP-glicose, glicose-6-fosfato (G6P). A Cepa 5 foi criada a partir da

Cepa 4 pela superexpressão de duas enzimas que são usadas para converter G6P em UDP-glicose (pgm, galU) por meio de glicose-1-fosfato (G1P).

[0114] A FIG. 5 mostra a conversão de dois intermediários comercialmente disponíveis encontrados no extrato de folha, esteviosídeo e RebA, em RebM. Também é mostrada a bioconversão do núcleo de esteviol. Os valores são relatados como a porcentagem da composição total de glicosídeo de esteviol. A conversão de esteviol em RebM por todas as cepas mostra que todas as cepas são capazes de formar RebM. Como foi o caso do esteviolbiosídeo, tanto o esteviosídeo quanto o RebA são convertidos em RebM, mas apenas na Cepa 5. É provável que apenas a Cepa 5 torne os glicosídeos de esteviol disponíveis para as enzimas UGT. Para a conversão de esteviosídeo e RebA, a razão de RebD:RebM favorece fortemente RebM (1:20). RebM foi secretado no meio.

[0115] A FIG. 6. mostra a bioconversão de glicosídeos de esteviol em placas de 96 poços. Para esses estudos, 76G1_L200A foi substituído por MbUGT1-3_1.5. Para cinco compostos principais na via do RebM, as concentrações de compostos são mostradas com ou sem enzimas UGT expressas. As cepas foram alimentadas com 0,5 g/L de extrato de folha de esteviosídeo/RebA e incubadas com substrato por 48 horas antes da amostragem. Como mostrado, as células fazem quase exclusivamente RebM, com apenas pequenas quantidades de Rebl e RebD.

[0116] A cepa foi usada para experimentos iniciais de biorreator. Especificamente, a cepa produtora de RebM foi inoculada a partir de um banco de células de trabalho em um tubo para centrífuga de 50 mL contendo 10 mL de caldo LB (Luria-Bertani) com antibióticos adequados. A primeira semente foi cultivada por 20 horas em uma incubadora com agitação a 37 °C. Após 20 horas, a segunda cultura de semente foi então iniciada inoculando 100 mL de meio de fermentação em um Erlenmeyer de 500 mL usando a primeira semente. Essa segunda semente foi cultivada por 10 horas antes de ser transferida para os biorreatores, cada um contendo 170 mL de meio de fermentação. A amostragem foi realizada a cada 10 horas. Metabólitos relevantes no meio foram quantificados usando LC-MS-MS e YSI. A densidade celular foi medida por meio de um espectrofotômetro com absorvância de 600 nm. A FIG. 7. mostra a bioconversão de um extrato de folha de esteviosídeo/RebA em escala de biorreator. Para cinco

compostos principais na via do RebM, as concentrações de compostos no meio foram amostradas em vários pontos de tempo durante a fermentação. As cepas foram alimentadas com 2 g/L de extrato de folha de esteviosídeo/RebA e incubadas com substrato por um total de 30 horas. Como mostrado na FIG. 7, o esteviosídeo e o RebA são perdidos ao longo do tempo, com o aumento correspondente em produtos altamente glicosilados, como RebM, Rebl e RebD.

[0117] As enzimas UGT que convertem intermediários da via, como esteviolbiosídeo, esteviosídeo e RebA em RebM, são expressas no citoplasma de *E. coli* e, assim, requerem que os intermediários se tornem disponíveis para as enzimas UGT, provavelmente através da ação de um transportador ou através de permeabilidade aumentada da membrana.

[0118] Os glicosídeos de esteviol são moléculas grandes que provavelmente não são absorvidas pelas cepas nativas de *E. coli*. Isso explicaria a conversão insignificante de esteviolbiosídeo em RebM pela Cepa 1. As Cepas 1-4 podem tomar um intermediário não glicosilado anterior (esteviol) e convertê-lo em RebM, sugerindo que a razão para a conversão insignificante é a falta de captação de glicosídeos de esteviol para o citoplasma, não a inatividade das enzimas UGT nos intermediários da via nessas condições.

SEQUÊNCIAS

>SrUGT85C2 [*Stevia rebaudiana*]

(SEQ ID NO:1)

MDAMATTEKKPHVIFIPFPAQSHIKAMLKLAQLLHHKGLQITFVNTDFIHNQ
FLESSGPHCLDGAPGFRFETIPDGVSHSPEASIPRESLLRSIETNFLDRFIDLVTKL
PDPPTCIISDGFLSVFTIDAACKLGIPVMMYWTAAACGFMGFYHIHSLIEKGFAPLK
DASYLTNGYLDTVIDWVPGMEGIRLKDFPLDWSTDLNDKVLMFTTEAPQRSHKV
SHHIFHTFDELEPSIIKTLRLRYNHIYTIGPLQLLLDQIPEEKKQTGITS LHGYSLVKE
EPECFQWLQSKEPNSVVYVNFGSTTVMSLEDMTEFGWGLANSNHFLWIIRSNL
VIGENAVLPPELEEHKRGFIASWCSQEKVLKHPSVGGFLTHCGWGSTIESLSA
GVPMICWPYSWDQLTNCRYICKEWVGLEMGTKVKRDEVKRLVQELMGEGGH
KMRNKAKDWEKARIAIAPNGSSSLNIDKMVKEITVLARN

>SrUGT74G1 [*Stevia rebaudiana*]

(SEQ ID NO:2)

MAEQQKIKKSPHVLLIPFPLQGHINPFIQFGKRLISKGVKTTLVTTIHTLNSTL

NHSNTTTTTSIEIQAISDGCDEGGFMSAGESYLETFKQVGSKSLADLIKKLQSEGTT
 IDAIYDSMTEWVLDVAIEFGIDGGSFFTQACVVNSLYYHVHKGLISLPLGETVSV
 GFPVLQRWETPLILQNHEQIQSPWSQMLFGQFANIDQARWVFTNSFYKLEEEVIE
 WTRKIWNLKVIGPTLPSMYLDKRLDDDKDNGFNLYKANHHECMNWLDDKPKES
 VVYVAFGSLVKHGPEQVEEITRALIDSDVNFLWVIKHKEEGKLPENLSEVIKTGKG
 LIVAWCKQLDLVAHESVGCFFVTHCGFNSTLEAISLGVPVAMPQFSDQTTNAKLL
 DEILGVGVRVKADENGIVRRGNLASCIMIMEEEERGVIIRKNAVKKWDLAKVAVHE
 GGSSDNDIVEFVSELIKA

>SrUGT76G1 [*Stevia rebaudiana*]

(SEQ ID NO:3)

MENKTETTVRRRRRIILFPVPFQGHINPILQLANVLYSKGFSITIFHTNFKP
 KTSNYPHFTFRFILDNDPQDERISNLPTHGPLAGMRIPINEHGADELRRLELLML
 ASEEDEEVSCLITDALWYFAQSVADSLNLRRLVMTSSLFNFHAHVSLPQFDELG
 YLDPDDKTRLEEQASGFPMLKVVDIKSAYSNWQILKEILGKMIKQTKASSGVIWNS
 FKELEESELETVIREIPAPSFLIPLPKHLTASSSSLLDHDRTVFQWLDQQPPSSVLY
 VSFGSTSEVDEKDFLEIARGLVDSKQSFLWVVRPGFVKGSTWVEPLPDGFLGER
 GRIVKWVPQQEVLAHGAIGAFWTHSGWNSTLESVCEGVPMIFSDFGLDQPLNAR
 YMSDVLKVGVYLENGWERGEIANAIRVMVDEEGEYIRQNARVLKQKADVSLMK
 GGSSYESLESLSYISSL

>SrUGT91D1 [*Stevia rebaudiana*]

(SEQ ID NO:4)

MYNVTYHQNSKAMATSDSIVDDRKQLHVATFPWLAFGHILPFLQLSKLIAE
 KGHKVSFLSTTRNIQRLSSHISPLINVVQLTLPRVQELPEDAEATTDVHPEDIQYLK
 KAVDGLQPEVTRFLEQHSPDWIYDFTHYWLPSIAASLGISRAYFCVITPWTIAYLA
 PSSDAMINDSDGRTTVEDLTTPPKWFPFPTKVCWRKHDLARMEPYEAPGISDGY
 RMGMVFKGSDCLLFKCYHEFGTQWLPLLETLHQVPVVPVGLLPPEIPGDEKDET
 WWSIKKWLDGKQKGSVVYVALGSEALVSQTEVVELALGLELSGLPFVWAYRKPK
 GPAKSDSVELPDGFVERTDRGLVWTSWAPQLRILSHESVCGFLTHCGSGSIVE
 GLMFGHPLIMLPIFCDQPLNARLLEDKQVGIEIPRNEEDGCLTKESVARSLRSVVV
 ENEGEIYKANARALSKIYNDTKVEKEYVSQFVDYLEKNARAVAIKHES

>SrUGT91D2 [*Stevia rebaudiana*]

(SEQ ID NO:5)

MATSDSIVDDRKQLHVATFPWLAFGHILPYLQLSKLIAEKGHKVSFLSTTR

NIQRLSSHISPLINVVQLTLPRVQELPEDAEATTDVHPEDIPYLKKASDGLQPEVTR
 FLEQHSPDWIYYDYTHYWLPSIAASLGISRAHFSVTTTPWAIAYMGPSADAMINGSD
 GRTTVEDLTTPPKWFPFPTKVCWRKHDLARLVPYKAPGISDGYRMGLVLKGSDC
 LLSKCYHEFGTQWLPLLETLHQVPVVPVGLLPPEVPGDEKDETWVSIKKWLDGK
 QKGSVVYVALGSEVLVSQTEVVVELALGLELSGLPFVWAYRKPKGPAKSDSVELP
 DGFVERTRDRGLVWTSWAPQLRILSHESVCGFLTHCGSGSIVEGLMFGHPLIML
 PIFGDQPLNARLLEDKQVGIEIPRNEEDGCLTKESVARSLRSVVVEKEGEIYKANA
 RELSKIYNDTKVEKEYVSQFVDYLEKNTRAVAIHES

>SrUGT91D2e [*Stevia rebaudiana*]

(SEQ ID NO:6)

MATSDSIVDDRKQLHVATFPWLAFGHILPYLQLSKLIAEKGHKVSFLSTTR
 NIQRLSSHISPLINVVQLTLPRVQELPEDAEATTDVHPEDIPYLKKASDGLQPEVTR
 FLEQHSPDWIYYDYTHYWLPSIAASLGISRAHFSVTTTPWAIAYMGPSADAMINGSD
 GRTTVEDLTTPPKWFPFPTKVCWRKHDLARLVPYKAPGISDGYRMGLVLKGSDC
 LLSKCYHEFGTQWLPLLETLHQVPVVPVGLLPPEIPGDEKDETWVSIKKWLDGKQ
 KGSVVYVALGSEVLVSQTEVVVELALGLELSGLPFVWAYRKPKGPAKSDSVELPD
 GFVERTRDRGLVWTSWAPQLRILSHESVCGFLTHCGSGSIVEGLMFGHPLIMLPI
 FGDQPLNARLLEDKQVGIEIPRNEEDGCLTKESVARSLRSVVVEKEGEIYKANAR
 ELSKIYNDTKVEKEYVSQFVDYLEKNARAVAIHES

> OsUGT1-2 [*Oryza sativa*]

(SEQ ID NO:7)

MDSGYSSSYAAAAGMHVVICPWLAFGHLLPCLDLAQLASRGHRVSFVS
 TPRNISRLPPVRPALAPLVAFFVALPLPRVEGLPDGAESTNDVPHDRPDMVELHRR
 AFDGLAAPFSEFLGTACADWWIVDVFFHHWAAAAALEHKVPCAMMLLGSAHMIASI
 ADRRLERAETESPAAAGQGRPAAAPTFEVARMKLIRTKGSSGMSLAERFSLTLS
 RSSLVVGRSCVEFEPETVPLLSTLRGKPITFLGLMPPLHEGRREDGEDATVRWL
 DAQPAKSVVYVALGSEVPLGVEKVHELALGLELAGTRFLWALRKPTGVSDADLL
 PAGFEERTRGRGVVATRWVPQMSILAHAAVGAFTHCGWNSTIEGLMFGHPLIM
 LPIFGDQGPNARLIEAKNAGLQVARNDGDGSFDFREGVAAAIRAVAVEEESSKVFAQ
 AKAKKLQEIVADMACHERYIDGFIQQLRSYKD

>MbUGTC19 [Permutante circular]

(SEQ ID NO:8)

MAECMNWLDDKPKESVVYVAFGSLVKHGPEQVEEITRALIDSDVNFLWVI

KHKEEGKLPENLSEVIKTGKGLIVAWCKQLDVLAHESVGC FVTHCGFNSTLEAISL
 GVPVVAMPQFSDQTTNAKLLDEILGVGVRVKADENGIVRRGNLASCIMIMEEER
 GVIRKNAVKKWDLAKVAVHEGGSSDNDIVEFVSELKAGSGEQQKIKKSPHVLLI
 PFPLQGHINPFIQFGKRLISKGVKTTLVTTIHTLNSTLNHSNTTTTSIEIQAISDGCD
 EGGFMSAGESYLETFKQVGSKSLADLIKKLQSEGTTIDAIYDSMTEWVLDVAIEF
 GIDGGSFFTQACVVNSLYYHVHKG LISLPLGETVSVPGFPVLQRWETPLILQNHE
 QIQSPWSQMLFGQFANIDQARWVFTNSFYKLEEEVIEWTRKIWNLKVIGPTLPSM
 YLDKRLDDDDKDN GFNLYKANHH

>MbUGT1,2 [Permutante circular]

(SEQ ID NO:9)

MAGSSGMSLAERFSLTL SRSSLVVG RSCVEFEPETVPLLSTLRGKPITFLG
 LMPPLHEGRREDGEDATVRWLD AQPASVVYVALGSEVPLGVEKVHELALGLEL
 AGTRFLWALRKPTGVSDADLLPAGFEERTRGRGVVATRWVPQMSILAHAAVGA
 FLTHCGWNSTIEGLMFGHPLIMLP IFGDQGP NARLIEAKNAGLQVARNDGDGSFD
 REGVAAAIRAVAVEEESSKVFQAKAKKLQEIVADMACHERYIDGFIQQLRSYKDD
 SGYSSSYAAAAGMHVVICPWLA FGHLLPCLDLAQLASRGHRVSFVSTPRNISRL
 PPVRPALAPLVAFAVALPLPRVEGLPDGAESTNDVPHDRPDMVELHRRAFDGLAA
 PFSEFLGTACADWVIVDVFH HWA AAAA LEHKVPCAMMLLGS AHMIASIADRRLE
 RAETESPAAAGQGRPAAAPT FEVARMKLIRTK

>MbUGT1-3 [Permutante circular]

(SEQ ID NO:10)

MANWQILKEILGKMIKQTKASSGVIWNSFKELEEESELETVIREIPAPSFLIPL
 PKHLTASSSSLLDHDRTVFQWLDQQPPSSVLYVSFGSTSEVDEKDFLEIARGLVD
 SKQSFLWVVRPGFVKGSTWVEPLPDGFLGERGRIVKWVPQQEVLAHGAIGAFW
 THSGWNSTLESVCEGVPMIFSDFGLDQPLNARYMSDVLKVG VYLENGWERGEI
 ANAIRRMVDEEGEYIRQNARVLKQKADVSLMKGGSSYESLESLSYISSLENKT
 ETTVRRRRRIILFPVPFQGHINPILQLANVLYSKGFSITIFHTNFNKP KTSNYPHFTF
 RFILDNDPQDERISNLPTHGPLAGMRIPIINEHGADELRRLELLMLASEEDEEVS
 CLITDALWYFAQSVADSLNLRRLV LMTSSLFNFAHVSLPQFDELGYLDPDDKTR
 LEEQASGFPM LKVVDIKSAYS

>MbUGT1,2.2 [Permutante circular]

(SEQ ID NO:11)

MATKGSSGMSLAERFWLTL SRSSLVVG RSCVEFEPETVPLLSTLRGKPIT

FLGLMPPLHEGRREDGEDATVRWLDAQPAKSVVYVALGSEVPLGVEKVHELAL
GLELAGTRFLWALRKPTGVSDADLLPAGFEERTRGRGVVATRWVPQMSILAHAA
VGAFLTHCGWNSTIEGLMFGHPLIMLPIFGDQGP NARLIEAKNAGLQVARNDGD
GSFDREGVAAAIRAVAVEEESSKVFQAKAKKLQEIVADMACHERYIDGFIQQLRS
YKDDSGYSSSYAAAAGMHVVICPWLAFGHLLPCLDLAQRLASRGHRVSFVSTPR
NISRLPPVRPALAPLVAFVALPLPRVEGLPDGAESTNDVPHDRPDMVELHRRRAFD
GLAAPFSEFLGTACADWVIVDVFHHWAAAAALEHKVPCAMMLLGSAEMIASIADE
RLEHAETESPAAAGQGRPAAAPTFEVARMKLIR

>MbUGTC19-2 [Permutante circular]

(SEQ ID NO:12)

MANHHECMNWLD DDKPKESVVYVAFGSLVKHGP EQVEEITRALIDSDVNFL
WVIKHKEEGKLPENLSEVIKTGKGLIVAWCKQLDVL AHESVGC FVTHCGFNSTLE
AISLGVPVVAMPQFSDQTTNAKLLDEILGVGV RVKADENGIVRRGNL ASCIKMIME
EERGVIIRKNAV KWKDLAKVAVHEGGSSDNDIVEFVSELIKAGSGEQQKIKKSPH
VLLIPFPLQGHINPFIQFGKRLISKGVKTTLVTTIHTLNSTLNHSNTTTTSIEIQAISD
GCDEGGFMSAGESYLETFKQVGSKSLADLIKKLQSEGTTIDAIYDSMTEWVLDV
AIEFGIDGGSFFTQACVVNSLYYHVHKGLISLPLGETVSVPGFPVLQRWETPLILQ
NHEQIQSPWSQMLFGQFANIDQARWVFTNSFYKLEEEVIEWTRKIWN LKVIGPTL
PSMYLDKRLDDDDKDNGFNLYKA

>MbUGTC13 (*Stevia rebaudiana* UGT85C2, P215T)

(SEQ ID NO:13)

MADAMATTEKKPHVIFIPFPAQSHIKAM LKLAQLLHHKGLQITFVNTDFIHN
QFLESSGPHCLDGAPGFRFETIPDGVSHSPEASIPIRESLLRSIETNFLDRFIDLVT
KLDPDPPTCIISDGFLSVFTIDAAKKLGIPVM MYWTLAACGFMGFYHIHSLIEKGFAP
LKDASYLTNGYLD TVIDWVPGMEGIRLKDFPLDWSTD LNDKVLMTTEATQRSH
KVSHHIFHTFDELEPSIIKTL SLRYNHIYTIGPLQLLLDQIPEEKKQTGITS LHGYSLV
KEEPECFQWLQSKEPNSVVYVNF GSTTVMSLED MTEFGWGLANSNHYFLWIIRS
NLVIGENAVLPPELEEHKKRGFIASWCSQE KVLKHPSVGGFLTHCGWGSTIESL
SAGVPMICWPYSWDQLTNCRYICKEW EVGLEMGTKVKRDEVKRLVQELMGEG
GHKMRNKAKDWKEKARIAIAPNGSSSLNIDKMVKEITVLARN

>76G1_L200A [*Stevia rebaudiana*, L200A]

(SEQ ID NO:14)

MAENKTETT VRRRRRIILFPVPFQGHINPILQLANVLYSKGFSITIFHTNFNK

PKTSNYPHFTFRFILDNDPQDERISNLPTHGPLAGMRIPINEHGADELRRLELLML
 LASEEDEEVSCCLITDALWYFAQSVADSLNLRRLVLMTSSLFNFHAHVSLPQFDEL
 GYLDPDDKTRLEEQASGFPMMLKVVDIKSAYSNWQIAKEILGKMIKQTKASSGVIW
 NSFKELEEESELETVIREIPAPSFLIPLPKHLTASSSSLLDHDRTVFQWLDQQPPSS
 VLYVSFGSTSEVDEKDFLEIARGLVDSKQSFLWVVRPGFVKGSTWVEPLPDGFL
 GERGRIVKWVPQQEVLHAHAIGAFWTHSGWNSTLESVCEGVPMIFSDFGLDQP
 LNARYMSDVLKVGIVYLENGWERGEIANAIRRMVDEEGEYIRQNARVLKQKADV
 SLMKGGSSYESLESLSYISSL

>MbUGT1-3_1 [Permutante circular]

(SEQ ID NO:15)

MAFLWVVRPGFVKGSTWVEPLPDGFLGERGRIVKWVPQQEVLHAHAIGA
 FWTHGGWNSTLESVCEGVPMIFSDFGLDQPLNARYMSDVLKVGIVYLENGWER
 GEIANAIRRLMVDEEGEYIRQNARVLKQKADVSLMKGGSSYESLESLSYISSLG
 SGGSGGSGRRRRRIILFPVPFQGHINPMLQLANVLYSKGFSITIFHTNFKPKTSNY
 PHFTFRFILDNDPQDERISNLPTHGPLAGMRIPINEHGADELRRLELLMLASEED
 EEVSCCLITDALWYFAQSVADSLNLRRLVLMTSSLFNFHAHVSLPQFDELGYLDPD
 DKTRLEEQASGFPMMLKVVDIKSAYSNWQIAKEILGKMIKQTKASSGVIWNSFKELE
 ESELETVIREIPAPSFLIPLPKHLTASSSSLLDHDRTVFQWLDQQPPSSVLYVSFG
 STSEVDEKDFLEIARGLVDSQS

>MbUGT1-3_1.5 [Permutante circular]

(SEQ ID NO:16)

MAFLWVVRPGFVKGSTWVEPLPDGFLGERGRIVKWVPQQEVLHAHAIGA
 FWTHGGWNSTLESVCEGVPMIFSDFGLDQPLNARYMSDVLKVGIVYLENGWER
 GEIANAIRRLMVDEEGEYIRQNARVLKQKADVSLMKGGSSYESLESLSYISSLG
 SGGSGGSGRRRRRIILFPVPFQGHINPMLQLANVLYSKGFSITIFHTNFKPKTSNY
 PHFTFRFILDNDPQTTHGPLAGMRIPINEHGADELRRLELQMLASEEDEEVSCCL
 ITDALWYFAQSVADSLNLRRLVLMTSSLFNFHAHVSLPQFDELGYLDPDDKTRLEE
 QASGFPMMLKVVDIKSAYSNWQIAKEILGKMIKQTKASSGVIWNSFKELEEESELET
 VIREIPAPSFLIPLPKHLTASSSSLLDHDRTVFQWLDQQPPSSVLYVSFGSTSEVDE
 KDFLEIARGLVDSQS

>MbUGT1-3_2 [Permutante circular]

(SEQ ID NO:17)

MAFLWVVRPGFVKGSTWVEPLPDGFLGERGRIVKWVPQQEVLHAHAIGA

FWTHGGWNSTLESVCEGVPMIFSDFGLDQPLNARYMSDVLKVG VYLENGWER
 GEIANAIRRLMVDEEGEYIRQNARVLKQKADVSLMKGGSSYESLESLSVSYISSLG
 SGGSGRRRRRIILFPVPFQGHINPMLQLANVLYSKGFSITIFHTNFNKP KTSNYPHF
 TFRFILDNDPQDERISNLP THGPLAGMRIPIINEHGADELRRLELQMLASEEDEE
 VSCLITDALWYFAQSVADSLNLPRLVMTSSLNFHFAHVSLPQFDELGYLDPDDK
 TRLEEQASGFPM LKV KDIKSAYS NWQIAKEILGKMIKQTKASSGVIWNSFKEEES
 ELETVIREIPAPSFLIPLPKHLTASSSSLLEH DRTVFQWLDQQPPSSVLYVSFGSTS
 EVDEKDFLEIARGLVDSQS

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

(SEQ ID NO:18)

MEDRNAME DMSRIKYRPQPLRPAS MVQPRVLLFPFPALGHVKPFLSLAELL
 SDAGIDV VFLSTEYNHRRISNTEALASRFPTLHFETIPDGLPPNESRALADGPLYF
 SMREGTKPRFRQLIQSLNDGRWPITCIITDIMLSSPIEVAEEFGIPVIAFCPCSARYL
 SIHFFIPKLVEEGQIPYADDDPIGEIQGVPLFEGLLRRNHLPGSWSDKSADISFSH
 GLINQTLAAGRASALILNTFDELEAPFLTHLSSIFNKIYTIGPLHALSKSRLGDSSSS
 ASALSGFWKEDRACMSWLD CQPPRSVVFVSFGSTMKMKADELREFWYGLVSS
 GKPFLCVLRSDV VSGGEAAELIEQMAEEEGAGGKLGMMVVEWAAQEKVLSHPAV
 GGFLTHCGWNSTVESIAAGVPM MCWPILGDQPSNATWIDRVWKIGVERN NREW
 DRLTVEKMVRALMEGQKRVEIQRSMEKLSKLANEKVV RGINLHPTISLKKDTPPT
 SEHPRHEFENMRGMNYEMLVGNAIKSPTLTKK

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

(SEQ ID NO:19)

MTIFFSVEILVLGIAEFAAIAMDAAQQGDTTILMLPWLG YGHL SAFLELAKS
 LSRRNFHIYFCSTSVNLDAIKPKLPSSFSDSIQFVELHLPSSPEFP PHLHTTNGLPP
 TLMPALHQA F SMAAQHFESILQTLAPHL LIYDSLQPWAPRVASSLKIPAINFNTTG
 VFVISQGLHPIHYPHSKFPFSEFVLHNHWKAMYSTADGASTERTRKRGEAFLYCL
 HASCSVILINSFRELEGKYMDYLSVLLNKKVVPVGPLVYEPNQDGEDEGYSSIKN
 WLDKKEPSSTVFVSFGSEYFPSKEEMEEIAHGLEASEVNFIWVVRFPQGDNTSGI
 EDALPKGFLERAGERGMVVKGWAPQAKILKHWSTGGFVSHCGWNSVMESMMF
 GVPIIGVPMHVDQPFNAGLVEEAGVGVEAKRDPDGKIQRDEVAKLIKEVVVEKTR
 EDVRKKAREMSEILRSKGEEKFDEMVAEISLLKI

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

(SEQ ID NO:20)

MDETTVNGGRRASDVVVFAPPRHGHMSPMLQFSKRLVSKGLRVTFLLITTS
 ATESLRLNLPPSSSLDLQVISDPESNDIATLEGYLRSFKATVSKTLADFIDGIGNP
 PKFIVYDSVMPWVQEVARGRGLDAAPFFTQSSAVNHILNHVYGGSL SIPAPENTA
 VSLPSMPVLQAEDLPAFPDDPEVVMNFMSTQFSNFQDAKWIFFNTFDQLECKKQ
 SQVVNWMADRWPIKTVGPTIPSAYLDDGRLEDDRAFGNLLKPEDGKNTRQWQ
 WLDSKDTASVLYISFGSLAILQEEQVKELAYFLKDTNLSFLWVLRDSELQKLPHNF
 VQETSHRGLVVNWCSQLQVLSHRAVSCFVTHCGWNSTLEALSLGVPMVAIPQW
 VDQTTNAKFVADVWRVGV RVKKKDERIVTKEELEASIRQVVQGEGRNEFKHNAI
 KWKKLAKEAVDEGGSSDKNIEEFVKTIA

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

(SEQ ID NO:21)

MGDNGDGGEKKELKENVKKGKELGRQAIGEGYINPSLQLARRLISLGVNV
 TFATTVLAGRMMKNKTHQTATTPGLSFATFSDGFDDTLKPNGDLTHYFSELRR
 CGSESLTHLITSAANEGRPITFVIYSLLLSWAADIASYDIPSALFFAQPATVLALYF
 YYFHGYGDTICSKLQDPSSYIELPGLPLLT SQDMPSFFSPSGPHAFILPPMREQA
 EFLGRQSQPKVLVNTFDALADALRAIDKLKMLAIGPLIPSALLGGNDSSDASFCG
 DLFQVSSSEDYIEWLNSKPDSSVYISVGSICVLSDEQEDELVHALLNSGHTFLWV
 KRSKENNEGVKQETDEEKLKLEE QGKMVSWCRQVEVLKHPALGCFLTHCGW
 NSTIESLVSGLPVVAFPQQIDQATNAKLIEDVWKTGVRVKANTEGIVEREEIRRCL
 DLVMGSRDGQKEEIERNAKKWKELARQAIGEGGSSDSNLKTFLWEIDLEI

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

(SEQ ID NO:22)

MAEQAHDLLHVLLFPFPAEGHIKPFLCLAELLNAGFHVTFNLTDYNHRRL
 HNLHLLAARFSLHFESISDGLPPDQPRDILDPKFFISICQVTKPLFRELLLSYKRIS
 SVQTGRPPITCVITDVIFRFPIDVAEELDIPVFSFCTFSARFMFLYFWIPKLIEDGQL
 PYPNGNINQKLYGVAPEAEGLLRCKDLPGHWAFADDELKDDQLNFVDQTTASSRS
 SGLILNTFDDLEAPFLGRLSTIFKKIYAVGPIHSLNHHCGLWKEDHSCLAWLDS
 RAAKSVFVVSFGSLVKITSRQLMEFWHGLLSGKSFLFVLRSDVVEGDDEKQVV
 KEIYETKAEGKWL VVGWAPQEKVLAHEAVGGFLTHSGWNSILESIAAGVPMISCP
 KIGDQSSNCTWISKVWKIGLEMEDRYDRVSVETMVR SIMEQEGEKMQKTIAELA
 KQAKYKVS KDGTSYQNLECLIQDIKKLNQIEGFINNPNFSDLLRV

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

(SEQ ID NO:23)

MDAQQGHTTTILMLPWVG YGHLLPFLELAKSLSRRKLFHIYFCSTSVSLDA
 IKPKLPSSISSDDSIQLVELRLPSSPELPPHLHTTNGLP SHLMPALHQA FVMAAQH
 FQVILQTLAPHLIIYDILQPWAPQVASSLNIPAINFSTTGASMLSRTLHP THYPSSK
 FPISEFVLHNHWRAMYTTADGALTEEGHKIEETLANCLHTSCGVVLVNSFRELET
 KYIDYLSVLLNKKVVPVGPLVYEPNQEGEGEGYSSIKNWLDKKEPSSTVFVSFGT
 EYFPSKEEMEEIAYGLELSEVNFIWVLRFPQGDSTSTIEDALPKGFLERAGERAM
 VVKGWAPQAKILKHWSTGGLVSHCGWNSMMEGMMFGVPPIAVPMHLDQPFNA
 GLVEEAGVGVEAKRDSGDKIQREEVAKSIKEVVIEKTREDVRKKAREMDTKHGPT
 YFSRSKVSSFGRLYKINRPTTLTVGRFWSKQIKMKRE

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

(SEQ ID NO:24)

MDAQRGHTTTILMFPWLG YGHLSAFLELAKSLSRRNFHIYFCSTSVNLDAI
 KPKLPSSSSSDSIQLVELCLPSSPDQLPPHLHTTNALPPHLMPTLHQA FFSMAAQH
 FAAILHTLAPHLIIYDSFQPWAPQLASSLNIPAINFNNTTGASVLTRMLHATHYPSSK
 FPISEFVLHDYWKAMYSAGGAVTKKDHKIGETLANCLHASCSVILINSFRELEEK
 YMDYLSVLLNKKVVPVGPLVYEPNQDGEDEGYSSIKNWLDKKEPSSTVFVSFGS
 EYFPSKEEMEEIAHGLEASEVHFIWVVRFPQGDNTSAIEDALPKGFLERVGERGM
 VVKGWAPQAKILKHWSTGGFVSHCGWNSVMESMMFGVPPIIGVPMHLDQPFNAG
 LAEEAGVGVEAKRDPDGDKIQRDEVAKLIKEVVVEKTREDVRKKAREMSEILRSKG
 EEKMDDEMVA AISLFLKI

>XP_022151474.1 ácido 7-desoxiloganético semelhante à
 glucosiltransferase [*Momordica charantia*]

(SEQ ID NO:25)

MAQPQTQARVLVPYPTVGH IKPFLSLAELLADGGLDVVFLSTEYNHRRIP
 NLEALASRFPTLHFDTIPDGLPIDKPRVIIGGELYTSMRDGVKQRLRQVLQSYNDG
 SSPITCVICDVMLSGPIEAAEELGIPVVTFCPYSARYLCAHFVMPKLIIEGQIPFTD
 GNLAGEIQGVPLFGGLLRDHLPGFWFVKSLSDEVWSHAFLNQTLAVGRTSALII
 NTLDELEAPFLAHLSTFDKIYPIGPLDALSKSRLGDSSSSSTVLTA FWKEDQACM
 SWLDSQPPKSVIFVSFGSTMRMTADKLVEFWHGLVNSGTRFLCVLRSDIVEGGG
 AADLIKQVGETGNGIVVEWAAQEKVLAHRAVGGFLTHCGWNSTMESIAAGVPM
 MCWQIYGDQMINATWIGKVWKIGIERDDKWDRSTVEKMIKELMEGEKGAEIQRS
 MEKFSKLANDKVVKGGTSFENLELIVEYLKCLKPSN

>XP_022151546.1 ácido 7-desoxiloganético semelhante à

glucosiltransferase [*Momordica charantia*]

(SEQ ID NO:26)

MAQPRVLLFPFPAMGHVKPFLSLAELLSDAGVEVVFLSTEYNHRRIPDIGA
LAARFPTLHFETIPDGLPPDQPRVLADGHLYFSMLDGTKPRFRQLIQSLNGNPRPI
TCIINDVMLSSPIEVAEEFGIPVIAFCPCCSARFLSVHFFMPNFIEEAQIPYTDENPM
GKIEEATVFEGLLRKDLPLGLWCAKSSNISFSHRFINQTIAAGRASALILNTFDELE
SPFLNHLSSIFPKIYCIGPLNALSRSRLGKSSSSSSSALAGFWKEDQAYMSWLESQ
PPRSVIFVSFGSTMKMEAWKLAEFWYGLVNSGSPFLFVFRPDCVINSGDAAEVM
EGRGRGMVVEWASQEKVLAHPAVGGFLTHCGWNSTVESIVAGVPM MCCPIVAD
QLSNATWIHKVWKIGIEGDEKWDRSTVEMMIKELMESQKGTEIRTSIEMLSKLAN
EKVVKGGTSLNNFELLVEDIKTLRRPYT

>XP_022151514.1 ácido 7-desoxiloganético semelhante à
glucosiltransferase [*Momordica charantia*]

(SEQ ID NO:27)

MEQSDSNSDDHQHHVLLFPFPAKGHIKPFLCLAQLLCGAGLQVTFLNTDH
NHRRIDDRHRLLATQFPMLHFKSISDGLPPDHPDLDDGKLIASMRRVTESLFR
QLLLSYNGYGNGTNNVSNSGRRPPISCVITDVIFSFPVEVAEELGIPVFSFATFSA
RFLFLYFWIPKLIQEGQLPFPDGKTNQELYGVPGAEGIIIRCKDLPGSWSVEAVAK
NDPMNFVKQTLASSRSSGLILNTFEDLEAPFVTHLSNTFDKIYTIGPIHSLLGTSHC
GLWKEDYACLAWLDARPRKSVFVSFGSLVKTTRELMELWHGLVSSGKSFLLV
LRSDVVEGEDEEQVVKEILESNGEGKWLVGWAPQEEVLAHEAIGGFLTHSGW
NSTMESIAAGVPMVCWPKIGDQPSNCTWVSRVWKVGLEMEERYDRSTVARMA
RSMMEQEGKEMERRIAELAKRVKYRVGKDGESYRNLESLIRDIKITKSSN

>XP_004147933.2 PREVISTO: ácido 7-desoxiloganético semelhante à
glucosiltransferase [*Cucumis sativus*]

(SEQ ID NO:28)

MGLSPTDHSVLLFPFPAKGHIKPFFCLAHLLCNAGLRVTFLSTEHHHQKLHN
LTHLAAQIPSLHFQSISDGLSLDHPRLNLLDGQLFKSMPQVTKPLFRQLLLSYKDGT
SPITCVITDLILRFPMDVAQELDIPVFCFSTFSARFLFLYFSIPKLLEDGQIPYPEGN
SNQVLHGIPGAEGLLRCKDLPGYWSVEAVANYNPMNFVNQTIATSKSHGLILNTF
DELEVPFITNLSKIYKKVYTIGPIHSLLKKSQVTQYEFWKEDHSCLAWLDSQPPRS
VMFVSFGSIVKLKSSQLKEFWNGLVDSGKAFLLVLRSDALVEETGEEDEKQKELV
IKEIMETKEEGRWVIVNWAPQEKVLEHKAIGGFLTHSGWNSTLESVAVGVPMVS

WPQIGDQPSNATWLSKVWKIGVEMEDSYDRSTVESKVRSIMHEHEDKKMENAIVE
LAKRVDDRVSKEGTSYQNLQRLIEDIEGFKLN

>XP_022978164.1 ácido 7-desoxiloganético semelhante à
glucosiltransferase [*Cucurbita maxima*]

(SEQ ID NO:29)

MELSHTHHVLLFPFPAKGHIKPFSLAQLLCNAGLRVTFLNTDHHHRRRIHD
LNRLAAQLPTLHFDSVSDGLPPDEPRNVFDGKLYESIRQVTSSLFRELLVSYNNG
TSSGRPPITCVITDVMFRFPIDIAEELGIPVFTFSTFSARFLFLIFWIPKLLEDGQLRY
PEQELHGVPGAEGLRWKDLPGFWSVEDVADWDPMNFVNQTLATSRSSGLILNT
FDELEAPFLTSLSKIYKKIYSLGPINSLLKNFQSQPQYNLWKEDHSCMAWLDSQP
RKSVFVSFGSVVKLTSRQLMEFWNGLVNSGMPFLLVLRSDVIEAGEEVRIM
ERKAEGRWVIVSWAPQEEVLAHDAVGGFLTHSGWNSTLESAAAGVPMISWPQI
GDQTSNSTWISKVWRIGLQLEDGFDSSTIETMVRSIMDQTMKTVAEALAEAKN
RASKNGTSYRNFQTLIQDITNIIETHI

> XP_022950128.1 ácido 7-desoxiloganético semelhante à
glucosiltransferase [*Cucurbita moschata*]

(SEQ ID NO:30)

MELSPTHHLLLFPFPAKGHIKPFSLAQLLCNAGARVTFLNTDHHHRRRIHD
LDRLAAQLPTLHFDSVSDGLPPDESRNVFDGKLYESIRQVTSSLFRELLVSYNNG
TSSGRPPITCVITDCMFRFPIDIAEELGIPVFTFSTFSARFLFLFFWIPKLLEDGQLR
YPEQELHGVPGAEGLRCKDLPGFLSDEDVAHWKPINFVNQILATSRSSGLILNTF
DELEAPFLTSLSKIYKKIYSLGPINSLLKNFQSQPQYNLWKEDHSCMAWLDSQPP
KSVFVSFGSVVKLTNRQLVEFWNGLVNSGKPFLLVLRSDVIEAGEEVRNME
RKAEGRWMIWVSWAPQEEVLAHDAVGGFLTHSGWNSTLESAAAGVPMISWTQIG
DQTSNSTWVSKVWRIGLQLEDGFDSFTIETMVRSVMDQTMKTVAEALAEAKNR
ASKNGTSYRNFQTLIQDITNIIETHI

>XP_020422423.1 glicosiltransferase de ácido 7-desoxiloganético [*Prunus
persica*]

(SEQ ID NO:31)

MAMKQPHVIFPFLQGHMKPLLCLAELLCHAGLHVTVNTHHHNQRLAN
RQALSTHFPTLHFESISDGLPEDDPRTLNSQLLALKTSIRPHFRELLKTISLKAESN
DTLVPPPSCIMTDGLVTFAFDVAEELGLPILSFNVPCPRYLWTCLCLPKLIENGQL
PFQDDDMNVEITGVPGMEGLLHRQDLPGFCRVKQADHPSLQFAINETQTLKRAS

ALILDTVYELDAPCISHMALMFPKIYTLGPLHALLNSQIGDMSRGLASHGSLWKSD
LNCMTWLDSQPSKSIYVSFGTLVHLTRAQVIEFWYGLVNSGHPFLWVMRSDITS
GDHQIPAELENGTKERGCIWDWVSQEEVLAHKS VGGFLTHSGWNSTLESIVAGL
PMICWPKLGDHYIISSTVCRQWKIGLQLNENCDRSNIESMVQTLMGSKREEIQSS
MDAISKLSRDSVAEGGSSHNNLEQLIEYIRNLQHQN

>EOY07351.1 UDP-glucosil transferase 85A3, putativo [*Theobroma cacao*]
(SEQ ID NO:32)

MRQPHVLVLPFPAQGHKPMCLLAELLCQAGLRVTFLNTHHSHRRLNNLQ
DLSTRFPTLHFESVSDGLPEDHPRNLVHFMHLVHSIKNVTKPLLRDLLTSLSLKTD
IPPVSCIADGILSFAIDVAEELQIKVIIFRTISSCCLWSYLCVPKLIQQGELQFSDSD
MGQKVSSVPEMKGSLRLHDPYSFGLKQLEDPNFQFFVSETQAMTRASAVIFNT
FDSLEAPVLSQMIPLLPKVYTIGPLHALRKARLGDL SQHSSFNGNLREADHNCIT
WLDSQPLRSVVYVSFGSHVLTSEELLEFWHGLVNSGKRFLWVLRPDIIAGEKD
HNQIIAREPDLGTKEKGLLVDWAPQEEVLAHPSVGGFLTHCGWNSTLES MVAGV
PMLCWPKLPDQLVNSSCVSEVWKIGLDLKDMDRSTVEKMVRALMEDRREEVM
RSVDGISKLARESVSHGGSSSSNLEMLIQELET

>XP_022155979.1 beta-D-glucosil crocetina semelhante à beta-1,6-
glucosiltransferase [*Momordica charantia*]
(SEQ ID NO:33)

MDAHQQAETTTILMLPWVG YGHLTAYLELAKALSRRNFHIYYCSTPVNIE
SIKPKLTIPCSSIQFVELHLPSSDDLPPNLHTTNGLP SHLMPTLHQAFSAAAPLFEE
ILQTLCPHLLIYDSLQPWAPKIASLKI PALNFNTSGVS VIAQALHAIHPDSKFPLS
DFILHNYWKSTYTTADGGASEKTRRAREAFLYCLNSSGNAILINTFRELEGEYIDY
LSLLLNNKKVPIGPLVYEPNQDEDQDEEYRSIKNWLDKKEPCSTVFVSFGSEYFPS
NEEMEEIAPGLEESGANFIWVVRFPKLENRNGIIEEGLLERAGERGMVKEWAPQ
ARILRHGSIGGFVSHCGWNSVMESIICGVPVIGVPMRVDQPYNAGLVEEAGVGV
EAKRDPDGKIQRHEVSKLIKQVVVEKTRDDVRKKVAQMSEILRRKGDEKIDEMVA
LISLLPKG

>XP_022986080.1 beta-D-glucosil crocetina semelhante à beta-1,6-
glucosiltransferase [*Cucurbita maxima*]
(SEQ ID NO:34)

MDAQKAVDTPPTTVLMLPWIGYGHLSAYLELAKALSRRNFHVYFCSTPVN
LDSIKPNLIPPPSSIQFVDLHLPSSPELPPHLHTTNGLP SHLKPTLHQAFSAAAQHF

EAILQTLSPHLLIYDSLQPWAPRIASSLNIPAINFNTTAVSIIAHALHSVHYPDSKFPP
 SDFVLHDYWKAKYTTADGATSEKIRRGAEAFLYCLNASCDVVLVNSFRELEGEY
 MDYLSVLLKKKKVSVGPLVYEPSEGEEDDEEYWRIKKWLDEKEALSTVLVSFGSE
 YFPSKEEMEEIAHGLEESEANFIWVVRFPKGEESECRGIEEALPKG FVERAGERAM
 VVKKWAPQGKILKHGSIGGFVSHCGWNSVLESIRFGVPVIGVPMHLDQPYNAGL
 LEEAGIGVEAKRDADGKIQRDQVASLIKRVVVEKTREDIWKTVREMREVLRRRDD
 DMIDEMVAEISVVLKI

>XP_022156002.1 beta-D-glucosil crocetina semelhante à beta-1,6-
 glucosiltransferase [*Momordica charantia*]

(SEQ ID NO:35)

MDARQQAETHTTILMLPWVG YGHLSAYLELAKALSRRNFHIYYCSTPVNIE
 SIKPKLTIPCSSIQFVELHLPFSDDLPPNLHTTNGLP SHLMPALHQA FSAAAPLFEA
 ILQTLCPHLLIYDSLQPWAPQIASSLKIPALNFNTTGVSVIARALHTIHPDSKFPLS
 EIVLHNYWKATHATADGANPEKFRRDLEALLCCLHSSCNAILINTFRELEGEYIDY
 LLLLLNKKVTPIGPLVYEPNQDEEQDEEYRSIKNWLDKKEPYSTIFVSFGSEYFPS
 NEEMEEIARGLEESGANFIWVVRFHKL ENGNGITEEGLLERAGERGMVIQGWAP
 QARILRHGSIGGFVSHCGWNSVMESIICGVPVIGVPMGLDQPYNAGLVEEAGVG
 VEAKRDPDGKIQRHEVSKLIKQVVVEKTRDDVRKKVAQMSEILRRKGDEKIDEMV
 ALISLLLKG

>XP_022943327.1 beta-D-glucosil crocetina semelhante à beta-1,6-
 glucosiltransferase [*Cucurbita moschata*]

(SEQ ID NO:36)

MDAQKAVDTPPTTVLMLPWIG YGHLSAYLELAKALSRRNFHVYFCSTPVN
 LDSIKPNLIPPPPSIQFVDLHLPSSPELPPHLHTTNGLP SHLKPTLHQA FSAAAQHF
 EAILQTLSPHLLIYDSLQPWAPRIASSLNIPAINFNTTAVSIIAHALHSVHYPDSKFPP
 SDFVLHDYWKAKYTTADGATSEKTRRGVEAFLYCLNASCDVVLVNSFRELEGEY
 MDYLSVLLKKKKVSVGPLVYEPSEGEEDDEEYWRIKKWLDEKEALSTVLVSFGSE
 YFPPKEEMEEIAHGLEESEANFIWVVRFPKGEESSSRGIEEALPKG FVERAGERA
 MVVKKWAPQGKILKHGSIGGFVSHCGWNSVLESIRFGVPVIGAPMHLDQPYNAG
 LLEEAGIGVEAKRDADGKIQRDQVASLIKQVVVEKTREDIWKKVREMREVLRRRD
 DDDMMIDEMVAVISVVLKI

>XP_022996307.1 beta-D-glucosil crocetina semelhante à beta-1,6-
 glucosiltransferase [*Cucurbita maxima*]

(SEQ ID NO:37)

MSSNLFLKISIPFGRLRDSALNCSVFHCKLHLAIAIAMDAQQAANKSPTATTI
FMLPWAGYGHLSAYLELAKALSTRNFHIYFCSTPVSLASIKPRLIPSCSSIQFVELH
LPSSDEFPPHLHTTNGLP SRLVPTFHQAFSEAAQTFEAFLQTLRPHLLIYDSLQP
WAPRIASSLNIPAINFFTAGAFVSHVLRAFHYPD SQFPSSDFVLHSRWKIKNTTA
ESPTQAKLPKIGEAGYCLNASRGVILTNSFRELEGKYIDYLSVILKKRVFPIGPLVY
QPNQDEEDEDYSRIKNWLD RKEASSTVLVSFGSEFFLSKEETEAIAHGLEQSEAN
FIWGIRFPKGAKKNAIEEALPEGFLERAGGRAMVVEEWVPQGKILKHGSIGGFVS
HCGWNSAMESIVCGVPIIGIPMQVDQPFNAGILEEAGVGVEAKRDS DGKIQRDEV
AKLIKEVVVERTREDIRNKLEKINEILRSRREEKLDELATEISLLSRN

>XP_022957664.1 beta-D-glucosil crocetina semelhante à beta-1,6-
glucosiltransferase [*Cucurbita moschata*]

(SEQ ID NO:38)

MDAQQAANKSPTASTIFMLPWVGYGHLSAYLELAKALSTRNFHVYFCSTP
VSLASIKPRLIPSCSSIQFVELHLPSSDEFPPHLHTTNGLP AHLVPTIHQAFAAAAQ
TFEAFLQTLRPHLLIYDSLQPWAPRIASSLNIPAINFFTAGAFVSHVLRAFHYPD S
QFPSSDFVLHSRWKIKNTTAESPTQVKIPKIGEAGYCLNASRGVILTNSFRELEG
KYIDYLSVILKKRVLP IGPPLVYQPNQDEEDEDYSRIKNWLD RKEASSTVLVSFGSE
FFLSKEETEAIAHGLEQSEANFIWGIRFPKGAKKNAIEEALPEGFLERVGGRAMV
EEWVPQGKILKHGNIGGFVSHCGWNSAMESIMCGVPVIGIPMQVDQPFNAGILE
EAGVGVEAKRDS DGKIQRDEVAKLIKEVVVERTREDIRNKLEEINEILRTRREEKL
DELATEISLLCKN

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

(SEQ ID NO:39)

MDSKQKKMSVLMFPWLAYGHISPFLELAKKLSKRNFHTFFFSTPINLNSIK
SKLSPKYAQSIQFVELHLP SLPDLP PHYHTTNGLP PHLMNTLKKAFDMSSLQFSKI
LKTLPDLLVYDFIQPWAPLLALSNKIPAVHFLCTSAAMSSFSVHAFKKPCEDFPF
PNIYVHGNFMNAKFNNMENCSSDDSDQDRVLQCFERSTKIILVKT FEELEGKF
MDYLSVLLNKKIVPTGPLTQDPNEDEGDDERTKLLLEWLNKKSSTVFVSFGS
EYFLSKEEREEIAYGLELSKVNFIWVIRFPLGENKTNLEEALPQGFLQRVSERGLV
VENWAPQAKILQHSSIGGFVSHCGWSSVMESLKFGVP IIAIPMHLDQPLNARLVV
DVGVGLEVIRNHGSLEREEIAKLIKEVVLGNGNDGEIVRRKAREMSNHIKKKGEK

DMDELVEELMLICKMKPNSCHLS

>XP_015886141.1 PREVISTO: beta-D-glucosil crocetina semelhante à beta-1,6-glucosiltransferase isoforma X1 [*Ziziphus jujuba*]

(SEQ ID NO: 40)

MMERQRSIKVLMFPWLAHGHISPFLLELAKRLTDRNFQIYFCSTPVNLTSVK
PKLSQKYSSSIKLVELHLPSPDLPPHYHTTNGLALNLIPTLKKAFFDMSSSSSFSTIL
STIKPDLLIYDFLQPWAPQLASCMNIPAVNFLSAGASMVSFVLHSIKYNGDDHDDE
FLTTELHLSDSMEAKFAEMTESSPDEHIDRAVTCLERSNSLILIKSFRELEGKYLDY
LSLSFAKKVVPIGPLVAQDTNPEDDSMDIINWLDKKEKSSTVFVSFGSEYYLTNEE
MEEIAYGLELSKVNFIWVVRFPPLGQKMAVEEALPKGFLERVGEKGMVVEDWAPQ
MKILGHSSIGGFVSHCGWSSLMESLKLGVPIIAMPMQLDQPINAKLVERSGVGLE
VKRDKNRIEREYLAKVIREIVVEKARQDIEKKAREMSNIITEKGEEEIDNVVEELA
KLCGM

>XP_002271587.3 PREVISTO: beta-D-glucosil crocetina semelhante à beta-1,6-glucosiltransferase [*Vitis vinifera*]

(SEQ ID NO:41)

MDARQSDGISVLMFPWLAHGHISPFLQLAKKLSKRNFISIYFCSTPVNLDPI
KGKLSESYSLSIQLVKLHLPSPPELPPQYHTTNGLPPLMPTLKMAFFDMASPNFS
NILKTLHPDLLIYDFLQPWAPAAASSLNIPAVQFLSTGATLQSFLAHRHRKPGIEFP
FQEIHLDPYEIGRLNRFLEPSAGRISDRDRANQCLERSSRFSLIKTFREIEAKYLDY
VSDLTKKKMVTVGPLLQDPEDEDEATDIVEWLNKKCEASAVFVSFGSEYFVSKE
EMEEIAHGLELSNVDFIWVVRFPMPGKIRLEDALPPGFLHRLGDRGMVVEGWAP
QRKILGHSSIGGFVSHCGWSSVMEGMKFGVPIIAMPMHLDQPINAKLVEAVGVG
REVKRDENRKLEREEIAKVIKEVVGEKNGENVRRKARELSETLRKKGDDEIDVVV
EELKQLCSY

>XP_018840205.1 PREVISTO: beta-D-glucosil crocetina semelhante à beta-1,6-glucosiltransferase [*Juglans regia*]

(SEQ ID NO:42)

MDTARKRIRVVMLPWLAHGHISPFLLELSKKLAKRNFHIYFCSTPVNLSSIKP
KLSGKYSRSIQLVELHLPSPPELPPQYHTTKGLPPLNATLKRAFFDMAGPHFSNIL
KTLSPDLLIYDFLQPWAPAAIASQNIPAINFLSTGAAMTSFVLHAMKKPGDEFPPF
EIHLDCEMKTRFVDLPEDHSPSDDHNHISDKDRALKCFERSSGFVMMKTFEELE
GKYINFLSHLMQKKIVPVGPLVQNPVRGDHEKAKTLEWLDKRKQSSAVFVSFGT

EYFLSKEEMEEIAYGLELSNVNFIWVVRFPPEGEKVKLEEALPEGFLQRVGEKGMV
 VEGWAPQAKILMHPSIGGFVSHCGWSSVMESIDFGVPIVAIPMQLDQPVNAKVV
 EQAGVGVEVKRDRDGKLEREEVATVIREVVMGNIGESVRKKEREMRDNIRKKGE
 EKMDGVAQELVQLYGNIGKNV

>XP_021652171.1 beta-D-glucosil crocetina semelhante à beta-1,6-
 glucosiltransferase [*Hevea brasiliensis*]

(SEQ ID NO:43)

METLQRRKISVLMFPWLAHGHLSPFLELSKKLNKRNFHVYFCSTPVNLDSI
 KPKLSAEYSFSIQLVELHLPSSPELPLHYHTTNGLPPLMKNLKNAFDMASSSFF
 NILKTLKPDLLIYDFIQPWAPALASSLNIPAVNFLCTSMAMSCFGLHLNNQEAKFPF
 PGIYPRDYMRMKVFGALESSNDIKDGERAGRCMDQSFHLILAKTFRELEGKYID
 YLSVKLMKKIVPVGPLVQDPIFEDDEKIMDHHQVIKWLEKKERLSTVFVSFGTEYF
 LSTEEMEEIAYGLELSKAHFIWVVRFPTEGEKINLEESLPKRYLERVQERGKIVEGW
 APQQKILRHSSIGGFVSHCGWSSIMESMKFGVPPIAMPNMNDQPVNSRIVEDAGV
 GIEVRRNKSGELEREEIAKTIRKVVVEKDGNVSRKAREMSDTIRKKGEEEEIDGVV
 DELLQLCDVKTNYLQ

>XP_021619073.1 beta-D-glucosil crocetina semelhante à beta-1,6-
 glucosiltransferase [*Manihot esculenta*]

(SEQ ID NO:44)

MATAQTRKISVLMFPWLAHGHLSPFLELSKKLANRNFHVYFCSTPVNLDSI
 KPKLSPEYHFSIQFVELHLPSSPELPSHYHTTNGLPPLMKTLKKAFFDMASSSFF
 NILKTLNPDLLIYDFLQPWAPALASSLNIPAVNFLCSSMAMSCFGLNLNKNKEIKFL
 FPEIYPRDYMEMKLFRVFESSNQIKDGERAGRCIDQSFHVLAKTFRELEGKYID
 YVSVKCNKKIVPVGPLVEDTIHEDDEKTMDDHHHHHHDEVIKWLEKKERSTTVFVS
 FGSEYFLSKEEMEEIAHGLELSKVNFIWVVRFPKGEKINLEESLPEGYLERIQERG
 KIVEGWAPQRKILGHSSIGGFVSHCGWSSIMESMKLGVPIAMPNMNDQPINSRIV
 EAAGVGIEVSRNQSGELEREEMAKTIRKVVVEREGVYVRRKAREMSDVLRRKKGE
 EEIDGVVDELVQLCDMKTNYL

>GAV83746.1 proteína contendo domínio UDPGT [*Cephalotus follicularis*]

(SEQ ID NO:45)

MDLKRRSIRVLMFPWLAHGHISPFLELAKKLTNRNFLIYFCSTPINLNSIKPK
 LSSKYSFSIQLVELHLPSPPELPPHYHTTNGLPPLHLMNTLKTAFDMASPSFLNILKT
 LKPDLLICDHLQPWAPSLASSLNIPAIIFPTNSAIMMAFSLHHAKNPGEEFFPFSINI

NDDMVKSINFLHSASNGLTDMDRV LQCLERSSENTMLLKTRQLEAKYVDYSSALL
 KKKIVLAGPLVQVPDNEDEKIEIIKWLD SRGQSSTVFVSFGSEYFLSKEEREDIAH
 GLELSKVNFIWVVRFPVGEKVKLEEALPNGFAERIGERGLVVEGWAPQAMILSHS
 SIGGFVSHCGWSSMMESMKFGVPIIAMP MHIDQPLNARLVEDVGVGLEIKRNKD
 GRFEREELARVIKEVLVYKNGDAVRSKAREMSEHIKKNGDQEIDGVADALVKLCE
 MKTNSLNQD

>*Coffea Arabica* UGT_1,6

(SEQ ID NO:46)

MENHATFNVLM LPWLAHGHVSPYLELAKKLTARNFN VYLCSSPATLSSVR
 SKLTEKFSQSIHLVELHLPKLP ELPAEYHTTNGLP PHLMP TLKDAFDMAKPNFCN
 VLKSLKPDLLIYDLLQPWAP EAASAFNIPAVVFISSATMTS FGLHFFKNPGTKYP
 YGNAIFYRDIYESVFVENLTRRDRDTYRVINCMERSSKIILIKGFNEIEGKYFDYFSC
 LTGKKVVPVGPLVQDPVLDD EDCRIMQWLNKKEKGSTVFVSFGSEYFLSKKDME
 EIAHGLEVSNVDFIWVVRFPKGENIVIEETLPKGFFERVGERGLV VNGWAPQAKIL
 THPNVGGFVSHCGWNSVMESMKFGLPIIAMP MHLDPINARLIEEVGAGVEVLR
 DSKGKLHRERMAETINKVMKEASGESVRKKARELQEKLELKGDEEIDDVVKELV
 QLCATKNKRNGLHYY

>Sequência de ligante permutante circular

(SEQ ID NO:47)

GSGGSG

>Sequência de ligante permutante circular

(SEQ ID NO:48)

GSGGSGGSG

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir um produto glicosilado a partir de intermediários glicosídeos, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

fornece uma célula microbiana que expressa uma ou mais enzimas glicosil transferases dependentes de UDP de forma intracelular,
incubar a cepa microbiana com os intermediários glicosídeos, e
recuperar o produto glicosilado.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que os intermediários glicosídeos são fornecidos como um extrato vegetal ou fração deste.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o intermediário glicosídeo é um metabólito secundário glicosilado, opcionalmente selecionado dentre um terpenoide glicosilado, um flavonoide glicosilado, um canabinoide glicosilado, um policetídeo glicosilado, um estilbenoide glicosilado e um polifenol glicosilado.

4. Método, de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que o intermediário glicosídeo é um terpenoide glicosilado.

5. Método, de acordo com a reivindicação 4, **caracterizado** pelo fato de que o intermediário glicosídeo é o glicosídeo de esteviol ou mogrosídeo.

6. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que o intermediário glicosídeo tem um, dois, três, quatro ou cinco grupos glicosil.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que os grupos glicosil são independentemente selecionados dentre os grupos glucosil, galactosil, manosil, xilosil e ramnosil.

8. Método, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado** pelo fato de que o produto glicosilado tem pelo menos cinco grupos glicosil, ou pelo menos seis grupos glicosil.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que o produto glicosilado tem sete, oito ou nove grupos glicosil.

10. Método, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado** pelo fato de que a biossíntese do produto envolve pelo menos duas reações de glicosilação do intermediário na célula microbiana.

11. Método, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de

que os intermediários glicosídeos são glicosídeos de esteviol do extrato de folha de estêvia.

12. Método, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que os intermediários glicosídeos de esteviol compreendem um ou mais dentre esteviosídeo, esteviolbiosídeo, rebaudiosídeo A, dulcosídeo A, dulcosídeo B, rebaudiosídeo C e rebaudiosídeo F.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que o extrato compreende esteviosídeo, esteviolbiosídeo e Rebaudiosídeo A como componentes proeminentes.

14. Método, de acordo com a reivindicação 13, **caracterizado** pelo fato de que o produto glicosilado compreende RebM.

15. Método, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que o produto glicosilado compreende RebK, RebC+1 e/ou RebC+2.

16. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana é uma célula bacteriana.

17. Método, de acordo com a reivindicação 16, **caracterizado** pelo fato de que a célula bacteriana é *Escherichia* spp., *Bacillus* spp., *Rhodobacter* spp., *Zymomonas* spp., ou *Pseudomonas* spp.

18. Método, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** pelo fato de que a célula bacteriana é *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Zymomonas mobilis*, ou *Pseudomonas putida*.

19. Método, de acordo com a reivindicação 18, **caracterizado** pelo fato de que a célula bacteriana é *E. coli*.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizado** pelo fato de que a célula bacteriana compreende as modificações genéticas: *ushA* e *galETKM* são deletadas, inativadas ou têm sua expressão reduzida; *pgi* é deletada, inativada ou tem sua expressão reduzida; e *pgm* e *galU* são superexpressas.

21. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana é uma célula de levedura.

22. Método, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizado** pelo fato de que a levedura é *Saccharomyces* spp., *Schizosaccharomyces* spp., *Pichia* spp., *Phaffia* spp., *Kluyveromyces* spp., *Candida* spp., *Talaromyces* spp., *Brettanomyces*

spp., *Pachysolen spp.*, *Debaryomyces spp.*, ou *Yarrowia spp.*

23. Método, de acordo com a reivindicação 22, **caracterizado** pelo fato de que a levedura é *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, ou *Yarrowia lipolytica*.

24. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana expressa uma ou mais enzimas UGT compreendendo a sequência de aminoácidos de qualquer uma das SEQ ID NOS: 1 a 45, ou um derivado desta.

25. Método, de acordo com a reivindicação 24, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana expressa uma enzima UGT de 1-3' glicosilação.

26. Método, de acordo com a reivindicação 25, **caracterizado** pelo fato de que a enzima UGT de 1-3' glicosilação é selecionada dentre SrUGT76G1, MbUGT1-3, MbUGT1-3_1, MbUGT1-3_1.5, MbUGT1-3_2, e seus derivados.

27. Método, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizado** pelo fato de que a enzima UGT de 1-3' glicosilação é SrUGT76G1 compreendendo uma substituição L200A.

28. Método, de acordo com a reivindicação 26, **caracterizado** pelo fato de que a enzima UGT de 1-3' glicosilação compreende uma sequência de aminoácidos que é pelo menos 70% idêntica à sequência de aminoácidos da SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 ou SEQ ID NO:17.

29. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 28, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana expressa uma enzima UGT de 1-2' glicosilação.

30. Método, de acordo com a reivindicação 29, **caracterizado** pelo fato de que a enzima UGT de 1-2' glicosilação é selecionada dentre SrUGT91D2, SrUGT91D1, SrUGT91D2e, OsUGT1-2, MbUGT1,2, MbUGT1,2.2, e seus derivados.

31. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 30, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana expressa uma enzima UGT de O-glicosilação em C13.

32. Método, de acordo com a reivindicação 31, **caracterizado** pelo fato de que a enzima UGT de O-glicosilação em C13 é SrUGT85C2 ou um derivado desta compreendendo, opcionalmente, uma substituição P215T.

33. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 32,

caracterizado pelo fato de que a célula microbiana expressa uma enzima UGT de O-glicosilação em C19.

34. Método, de acordo com a reivindicação 33, **caracterizado** pelo fato de que a enzima UGT de O-glicosilação em C19 é SrUGT74G1, MbUGTc19 ou um derivado desta.

35. Método, de acordo com a reivindicação 24, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana expressa uma enzima UGT de 1-3' glicosilação e uma enzima UGT de 1-2' glicosilação e, opcionalmente, uma enzima UGT de O-glicosilação em C13 e uma enzima de O-glicosilação em C19.

36. Método, de acordo com a reivindicação 35, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana expressa uma enzima UGT de 1-3' glicosilação, uma enzima UGT de 1-2' glicosilação, uma enzima UGT de O-glicosilação em C19 e uma enzima UGT de O-glicosilação em C13.

37. Método, de acordo com a reivindicação 36, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana expressa: uma SrUGT85C2 ou seu derivado; MbUGT1,2 ou seu derivado; SrUGT74G1 ou seu derivado; e uma enzima selecionada dentre SrUGT76G1 ou seu derivado, MbUGT1-3_1 ou seu derivado, MbUGT1-3_1.5 ou seu derivado, e MbUGT1-3_2 ou seu derivado.

38. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 37, **caracterizado** pelo fato de que as enzimas UGT são integradas no cromossomo da célula microbiana.

39. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 37, **caracterizado** pelo fato de que as enzimas UGT são expressas extracromossomicamente.

40. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 39, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma ou mais modificações genéticas que aumentam a disponibilidade de UDP-glicose.

41. Método, de acordo com a reivindicação 40, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma deleção, inativação ou atividade ou expressão reduzida de um gene que codifica uma enzima que consome UDP-glicose.

42. Método, de acordo com a reivindicação 41, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma deleção, inativação ou atividade reduzida de ushA ou seu ortólogo e/ou um ou mais dentre galE, galT, galK e galM, ou ortólogo.

43. Método, de acordo com a reivindicação 42, **caracterizado** pelo fato de que os genes galETKM são inativados, deletados ou têm sua expressão reduzida.

44. Método, de acordo com a reivindicação 40, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma deleção, inativação ou atividade ou expressão reduzida de otsA (trealose-6-fosfato sintase) ou seu ortólogo.

45. Método, de acordo com a reivindicação 40, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma deleção, inativação ou atividade ou expressão reduzida de ugd (UDP-glicose 6-desidrogenase) ou seu ortólogo.

46. Método, de acordo com a reivindicação 40, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma deleção, inativação ou expressão reduzida de waaG, waaO, waaJ, yfdG, yfdI e/ou wcaJ, ou seus ortólogos.

47. Método, de acordo com a reivindicação 40, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma deleção, inativação ou atividade ou expressão reduzida de pgi (glicose-6 fosfato isomerase) ou seu ortólogo.

48. Método, de acordo com a reivindicação 40, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma superexpressão ou aumento da atividade de um ou mais genes que codificam uma enzima envolvida na conversão de glicose-6-fosfato em UDP-glicose, que é opcionalmente pgm (fosfoglucomutase) e/ou galU (UTP-glicose-1-fosfato uridililtransferase), ou ortólogo ou derivado das mesmas.

49. Método, de acordo com a reivindicação 40, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma superexpressão ou aumento da atividade ou expressão de ycjU (β -fosfoglucomutase) e ugpA de *Bifidobacterium bifidum*, ou ortólogo ou derivado das mesmas.

50. Método, de acordo com a reivindicação 40, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma ou mais modificações genéticas que aumentam o fluxo para a via das pentoses fosfato (PPP) e que é, opcionalmente, uma superexpressão ou atividade de zwf de *E. coli* ou homólogo ou derivado modificado da mesma.

51. Método, de acordo com a reivindicação 40, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma ou mais modificações genéticas que aumentam o transporte de glicose e que incluem, opcionalmente, aumento da expressão ou atividade de galP de *E. coli* e glk (glucoquinase) de *E. coli* ou, alternativamente, glf de *Zymomonas mobilis* e glk de *E. coli*, ou homólogos, ortólogos ou derivados

modificados das mesmas.

52. Método, de acordo com a reivindicação 40, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma ou mais modificações genéticas que aumentam a produção e reciclagem de UTP e que, opcionalmente, incluem um aumento da expressão ou atividade de pyrH (UMP quinase) de *E. coli*, cmk (citidilato quinase) de *E. coli*, adk (adenilato quinase) de *E. coli*, ou ndk (nucleosídeo difosfato quinase) de *E. coli*, ou homólogos, ortólogos, ou derivados modificados dessas enzimas.

53. Método, de acordo com a reivindicação 40, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma ou mais modificações genéticas que aumentam a produção de UDP e que, opcionalmente, incluem: superexpressão ou atividade aumentada de upp (uracil fosforibosiltransferase), pyrH (UMP quinase) e cmk (citidilato quinase), ou homólogo ou derivados modificados das mesmas; ou superexpressão ou atividade aumentada de dctA (C4 dicarboxilato/otato: simportador de H⁺), pyrE (otato fosforibosiltransferase), pyrH (UMP quinase) e cmk (citidilato quinase), ou homólogo ou derivados modificados das mesmas.

54. Método, de acordo com a reivindicação 40, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma ou mais modificações genéticas para remover ou reduzir a regulação da captação de glicose, que incluem, opcionalmente, deleção, inativação ou expressão reduzida de pequeno RNA regulador sgrS.

55. Método, de acordo com a reivindicação 40, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma ou mais modificações genéticas que reduzem a desfosforilação da glicose-1-fosfato, que incluem, opcionalmente, deleção, inativação ou expressão ou atividade reduzida de uma ou mais dentre agp (glicose-1-fosfatase) de *E. coli*, yihX (α -D-glicose-1-fosfato fosfatase) de *E. coli*, ybiV (açúcar fosfatase) de *E. coli*, yidA (açúcar fosfatase) de *E. coli*, yigL (fosfoaçúcar fosfatase) de *E. coli* e phoA (fosfatase alcalina) de *E. coli*, ou um ortólogo das mesmas.

56. Método, de acordo com a reivindicação 40, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma ou mais modificações genéticas que reduzem a conversão da glicose-1-fosfato em TDP-glicose, que incluem, opcionalmente, uma deleção, inativação ou expressão ou atividade reduzida de uma ou mais dentre rffH (dTDP-glicose pirofosforilase) de *E. coli* e rfbA (dTDP glicose pirofosforilase) de *E. coli*, ou um ortólogo das mesmas.

57. Método, de acordo com a reivindicação 40, **caracterizado** pelo fato de

que a célula microbiana tem uma ou mais modificações genéticas que reduzem a expressão da glicose-1-fosfato em ADP-glicose e que incluem, opcionalmente, deleção, inativação ou expressão ou atividade reduzida de *gigC* (glicose-1-fosfato adenililtransferase) de *E. coli*, ou um ortólogo da mesma.

58. Método, de acordo com a reivindicação 40, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana é uma célula bacteriana que compreende as modificações genéticas: *ushA* e *galETKM* são deletadas, inativadas ou têm sua expressão reduzida; *pgi* é deletada, inativada ou tem sua expressão reduzida; e *pgm* e *galU* são superexpressas.

59. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 58, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana expressa uma proteína de transporte endógena que transporta o(s) intermediário(s) glicosídeo(s) para dentro da célula.

60. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 58, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana superexpressa uma proteína de transporte recombinante que transporta o(s) intermediário(s) glicosídeo(s) para dentro da célula.

61. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 59 ou 60, **caracterizado** pelo fato de que a cepa microbiana expressa uma proteína de transporte selecionada dentre *acrAD*, *xylE*, *ascF*, *bglF*, *chbA*, *ptsG/crr*, *wzxE*, *rfbX* de *E. coli*, ou um ortólogo ou derivado das mesmas.

62. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 61, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana expressa um transportador endógeno ou recombinante que transporta o produto glicosilado para fora da célula.

63. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 62, **caracterizado** pelo fato de que o método resulta em pelo menos 40% de conversão do intermediário glicosídeo em produto glicosilado em peso.

64. Método, de acordo com a reivindicação 63, **caracterizado** pelo fato de que o método resulta em pelo menos 50% de conversão do intermediário glicosídeo em produto glicosilado em peso.

65. Método, de acordo com a reivindicação 64, **caracterizado** pelo fato de que o método resulta em pelo menos 75% de conversão do intermediário glicosídeo em produto glicosilado em peso.

66. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 65, **caracterizado** pelo fato de que uma razão de RebM para RebD de pelo menos 5:1 é recuperada como o produto glicosilado.

67. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 66, **caracterizado** pelo fato de que o método é realizado por fermentação descontínua, fermentação contínua ou fermentação semicontínua.

68. Método, de acordo com a reivindicação 67, **caracterizado** pelo fato de que o método é realizado por fermentação descontínua alimentada.

69. Método, de acordo com a reivindicação 68, **caracterizado** pelo fato de que os intermediários glicosídeos são incubados com a célula por cerca de 72 horas ou menos.

70. Célula microbiana **caracterizada** pelo fato de que compreende:
um ou mais genes recombinantes que codificam enzima(s) glicosil transferase dependente(s) de UDP (UGT) para expressão intracelular; e
uma ou mais modificações genéticas que aumentam a disponibilidade de UDP-glicose.

71. Célula microbiana, de acordo com a reivindicação 70, **caracterizada** pelo fato de que a célula microbiana converte os intermediários glicosídeos alimentados em um produto glicosilado.

72. Célula microbiana, de acordo com a reivindicação 71, **caracterizada** pelo fato de que a célula microbiana é uma célula bacteriana.

73. Célula microbiana, de acordo com a reivindicação 72, **caracterizada** pelo fato de que a célula bacteriana é *Escherichia* spp., *Bacillus* spp., *Rhodobacter* spp., *Zymomonas* spp., ou *Pseudomonas* spp.

74. Célula microbiana, de acordo com a reivindicação 73, **caracterizada** pelo fato de que a célula bacteriana é selecionada dentre *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Rhodobacter capsulatus*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Zymomonas mobilis*, ou *Pseudomonas putida*.

75. Célula microbiana, de acordo com a reivindicação 74, **caracterizada** pelo fato de que a célula bacteriana é *E. coli*.

76. Célula microbiana, de acordo com a reivindicação 75, **caracterizada** pelo fato de que a célula bacteriana compreende as modificações genéticas: *ushA* e *galETKM* são deletadas, inativadas ou têm sua expressão reduzida; *pgi* é deletada,

inativada ou tem sua expressão reduzida; e pgm e galU são superexpressas.

77. Célula microbiana, de acordo com a reivindicação 70, **caracterizada** pelo fato de que a célula microbiana é uma célula de levedura.

78. Célula microbiana, de acordo com a reivindicação 77, **caracterizada** pelo fato de que a levedura é *Saccharomyces spp.*, *Schizosaccharomyces spp.*, *Pichia spp.*, *Phaffia spp.*, *Kluyveromyces spp.*, *Candida spp.*, *Talaromyces spp.*, *Brettanomyces spp.*, *Pachysolen spp.*, *Debaryomyces spp.*, ou *Yarrowia spp.*

79. Célula microbiana, de acordo com a reivindicação 78, **caracterizada** pelo fato de que a célula de levedura é selecionada dentre *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, e *Yarrowia lipolytica*.

80. Célula microbiana, de acordo com qualquer uma das reivindicações 70 a 79, **caracterizada** pelo fato de que a célula microbiana não expressa uma via biossintética vegetal que produz um intermediário glicosídeo.

81. Célula microbiana, de acordo com qualquer uma das reivindicações 70 a 80, **caracterizada** pelo fato de que a célula microbiana expressa uma proteína de transporte endógena ou recombinante que transporta o intermediário glicosídeo para dentro da célula.

82. Célula microbiana, de acordo com qualquer uma das reivindicações 70 a 81, **caracterizada** pelo fato de que a célula microbiana expressa uma enzima UGT de 1-3' glicosilação, que é opcionalmente selecionada dentre SrUGT76G1, MbUGT1-3, MbUGT1-3_1, MbUGT1-3_1.5, MbUGT1-3_2, ou um derivado das mesmas.

83. Célula microbiana, de acordo com a reivindicação 82, **caracterizada** pelo fato de que a célula microbiana expressa uma enzima UGT de 1-2' glicosilação, que é opcionalmente selecionada dentre SrUGT91D2, SrUGT91D1, SrUGT91D2e, OsUGT1-2, MbUGT1,2, MbUGT1,2.2, e derivados das mesmas.

84. Célula microbiana, de acordo com a reivindicação 83, **caracterizada** pelo fato de que a célula microbiana expressa uma enzima UGT de O-glicosilação em C13, que é opcionalmente selecionada dentre SrUGT85C2 e seus derivados.

85. Célula microbiana, de acordo com a reivindicação 84, **caracterizada** pelo fato de que a célula microbiana expressa uma enzima UGT de O-glicosilação em C19, que é opcionalmente selecionada dentre SrUGT74G1, MbUGTc19, e seus derivados.

86. Célula microbiana, de acordo com a reivindicação 82, **caracterizada** pelo fato de que a célula microbiana expressa uma enzima UGT de 1-3' glicosilação, uma enzima UGT de 1-2' glicosilação, uma enzima UGT de O-glicosilação em C19 e uma enzima UGT de O-glicosilação em C13.

87. Célula microbiana, de acordo com a reivindicação 86, **caracterizada** pelo fato de que a célula microbiana expressa uma SrUGT85C2 ou seu derivado, MbUGT1,2 ou seu derivado, SrUGT74G1 ou seu derivado, e SrUGT76G1 ou seu derivado.

88. Célula microbiana, de acordo com a reivindicação 86 ou 87, **caracterizada** pelo fato de que as enzimas UGT são integradas no cromossomo da célula microbiana.

89. Célula microbiana, de acordo com a reivindicação 86 ou 87, **caracterizada** pelo fato de que as enzimas UGT são expressas extracromossomicamente.

90. Célula microbiana, de acordo com a reivindicação 70, **caracterizada** pelo fato de que a célula microbiana tem uma deleção, inativação ou atividade ou expressão reduzida de um gene que codifica uma enzima que consome UDP-glicose.

91. Método, de acordo com a reivindicação 90, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma deleção, inativação ou atividade reduzida de ushA ou seu ortólogo e/ou um ou mais dentre galE, galT, galK e galM, ou ortólogo.

92. Método, de acordo com a reivindicação 91, **caracterizado** pelo fato de que os genes galETKM são inativados, deletados ou têm sua expressão reduzida.

93. Método, de acordo com a reivindicação 70, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma deleção, inativação ou atividade ou expressão reduzida de otsA (trealose-6-fosfato sintase) ou seu ortólogo.

94. Método, de acordo com a reivindicação 70, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma deleção, inativação ou atividade ou expressão reduzida de ugd (UDP-glicose 6-desidrogenase) ou seu ortólogo.

95. Método, de acordo com a reivindicação 70, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma deleção, inativação ou expressão reduzida de waaG, waaO, waaJ, yfdG, yfdI e/ou wcaJ, ou seus ortólogos.

96. Método, de acordo com a reivindicação 70, **caracterizado** pelo fato de

que a célula microbiana tem uma deleção, inativação ou atividade ou expressão reduzida de *pgi* (glicose-6 fosfato isomerase) ou seu ortólogo.

97. Método, de acordo com a reivindicação 70, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma superexpressão ou aumento da atividade de um ou mais genes que codificam uma enzima envolvida na conversão de glicose-6-fosfato em UDP-glicose, que é opcionalmente *pgm* (fosfoglucomutase) e/ou *galU* (UTP-glicose-1-fosfato uridililtransferase), ou ortólogo ou derivado das mesmas.

98. Método, de acordo com a reivindicação 70, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma superexpressão ou aumento da atividade ou expressão de *ycjU* (β -fosfoglucomutase) e *ugpA* de *Bifidobacterium bifidum*, ou ortólogo ou derivado das mesmas.

99. Método, de acordo com a reivindicação 70, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma ou mais modificações genéticas que aumentam o fluxo para a via das pentoses fosfato (PPP) e que é, opcionalmente, uma superexpressão ou atividade aumentada de *zwf* de *E. coli* ou homólogo ou derivado modificado da mesma.

100. Método, de acordo com a reivindicação 70, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma ou mais modificações genéticas que aumentam o transporte de glicose e que incluem, opcionalmente, aumento da expressão ou atividade de *galP* de *E. coli* e *glk* (glucoquinase) de *E. coli* ou, alternativamente, *glf* de *Zymomonas mobilis* e *glk* de *E. coli*, ou homólogos, ortólogos ou derivados modificados desses genes.

101. Método, de acordo com a reivindicação 70, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma ou mais modificações genéticas que aumentam a produção e reciclagem de UTP e que, opcionalmente, incluem um aumento da expressão ou atividade de *pyrH* (UMP quinase) de *E. coli*, *cmk* (citidilato quinase) de *E. coli*, *adk* (adenilato quinase) de *E. coli*, ou *ndk* (nucleosídeo difosfato quinase) de *E. coli*, ou homólogos, ortólogos, ou derivados modificados dessas enzimas.

102. Método, de acordo com a reivindicação 70, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma ou mais modificações genéticas que aumentam a produção de UDP e que, opcionalmente, incluem: superexpressão ou atividade aumentada de *upp* (uracil fosforibosiltransferase), *pyrH* (UMP quinase) e *cmk* (citidilato quinase), ou homólogo ou derivados modificados das mesmas; ou

superexpressão ou atividade aumentada de *dctA* (C4 dicarboxilato/orotato: simportador de H⁺), *pyrE* (orotato fosforibosiltransferase), *pyrH* (UMP quinase) e *cmk* (citidilato quinase), ou homólogo ou derivados modificados das mesmas.

103. Método, de acordo com a reivindicação 70, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma ou mais modificações genéticas para remover ou reduzir a regulação da captação de glicose, que incluem, opcionalmente, deleção, inativação ou expressão reduzida de pequeno RNA regulador *sgrS*.

104. Método, de acordo com a reivindicação 70, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma ou mais modificações genéticas que reduzem a desfosforilação da glicose-1-fosfato, que incluem, opcionalmente, deleção, inativação ou expressão ou atividade reduzida de uma ou mais dentre *agp* (glicose-1-fosfatase) de *E. coli*, *yihX* (α -D-glicose-1-fosfato fosfatase) de *E. coli*, *ybiV* (açúcar fosfatase) de *E. coli*, *yidA* (açúcar fosfatase) de *E. coli*, *yigL* (fosfoaçúcar fosfatase) de *E. coli* e *phoA* (fosfatase alcalina) de *E. coli*, ou um ortólogo das mesmas na célula microbiana.

105. Método, de acordo com a reivindicação 70, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma ou mais modificações genéticas que reduzem a conversão da glicose-1-fosfato em TDP-glicose, que incluem, opcionalmente, uma deleção, inativação ou expressão ou atividade reduzida de uma ou mais dentre *rffH* (dTDP-glicose pirofosforilase) de *E. coli* e *rfbA* (dTDP glicose pirofosforilase) de *E. coli*, ou um ortólogo das mesmas.

106. Método, de acordo com a reivindicação 70, **caracterizado** pelo fato de que a célula microbiana tem uma ou mais modificações genéticas que reduzem a expressão da glicose-1-fosfato em ADP-glicose e que incluem, opcionalmente, deleção, inativação ou expressão ou atividade reduzida de *gigC* (glicose-1-fosfato adenililtransferase) de *E. coli*, ou um ortólogo da mesma.

FIG. 1

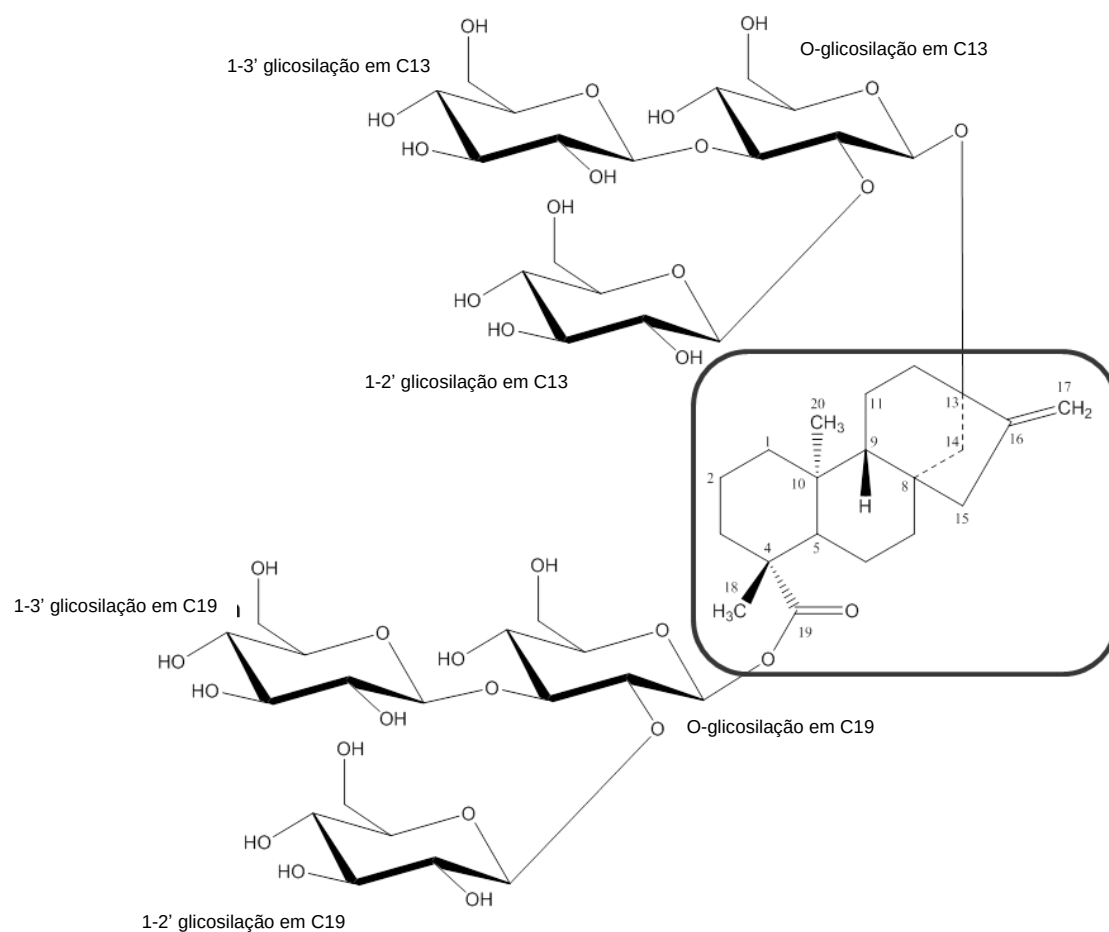


FIG. 2

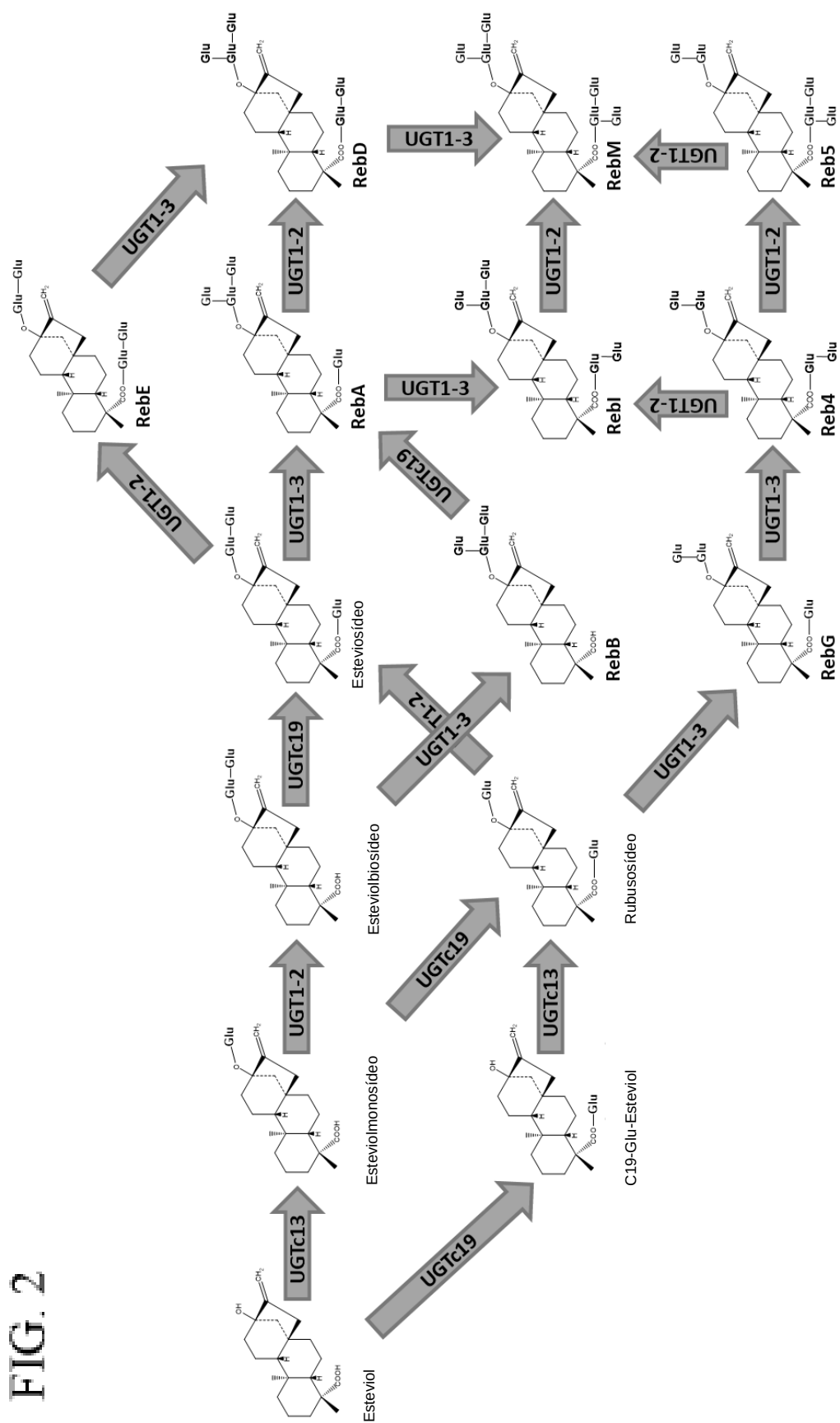


FIG. 3

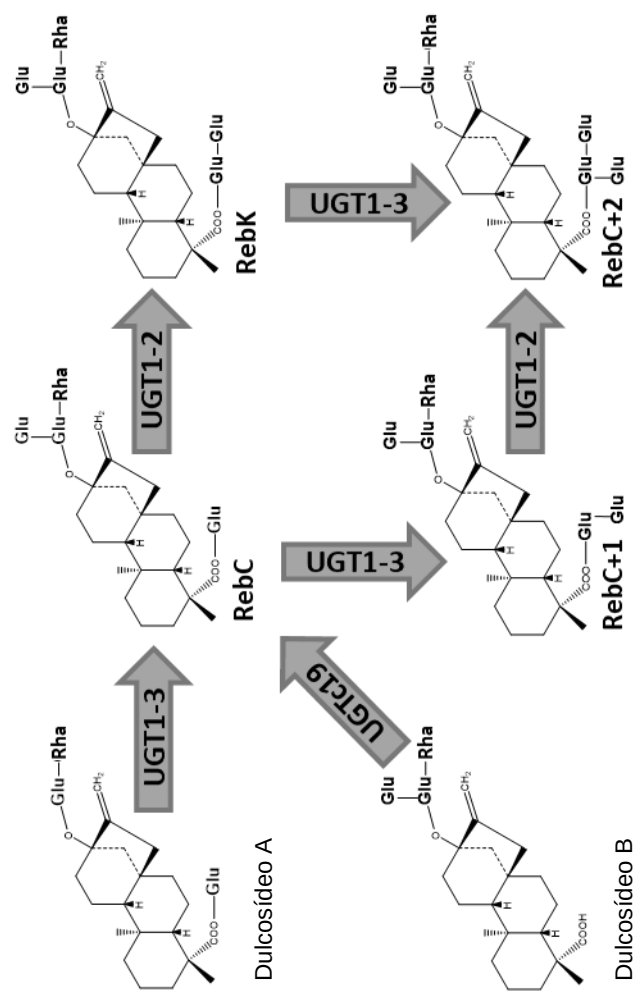


FIG. 4

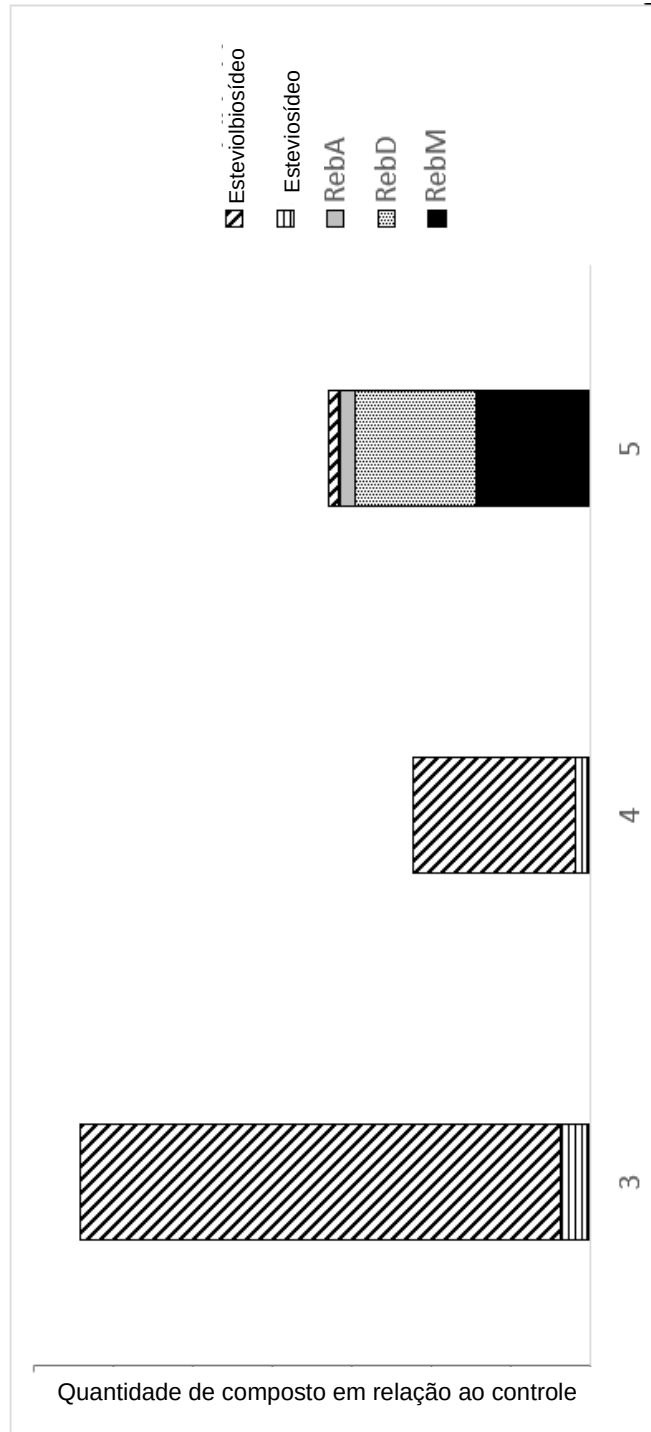


FIG. 5

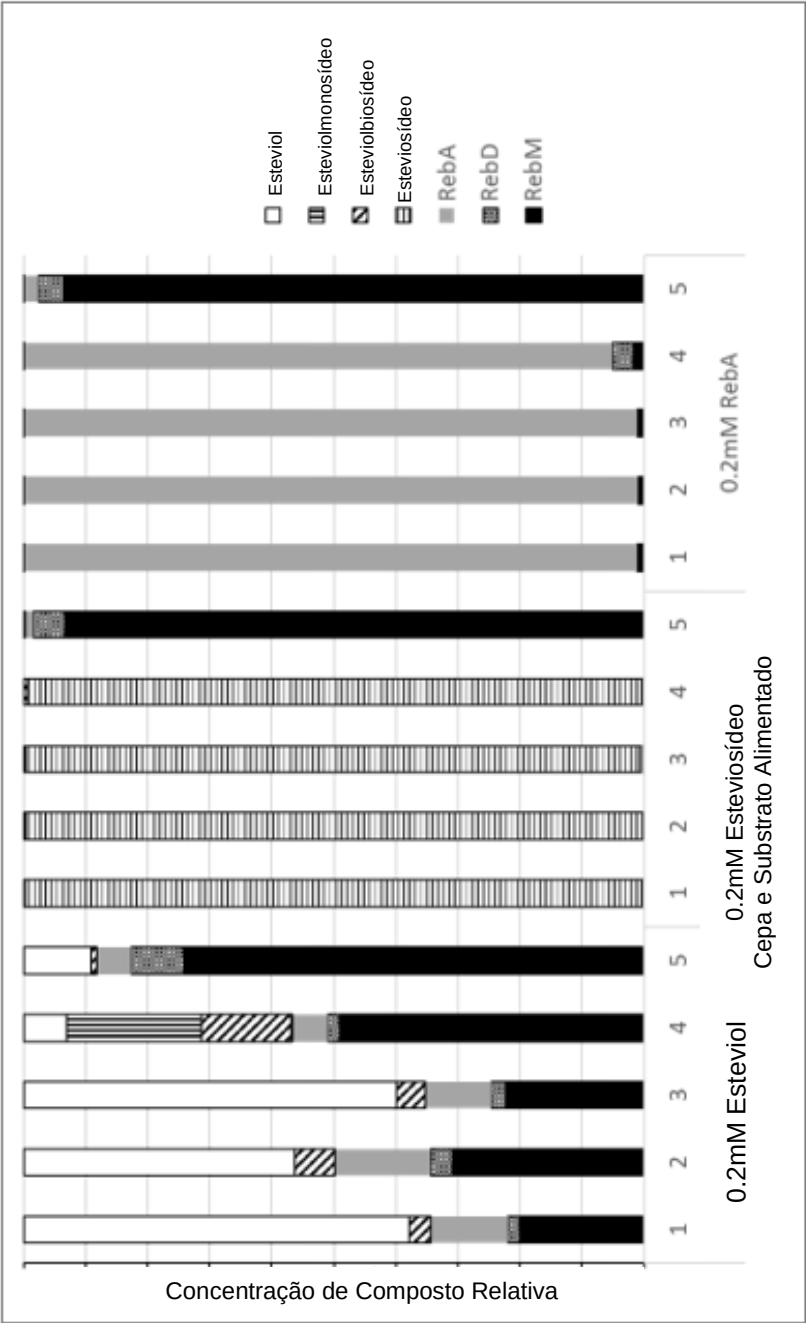


FIG. 6

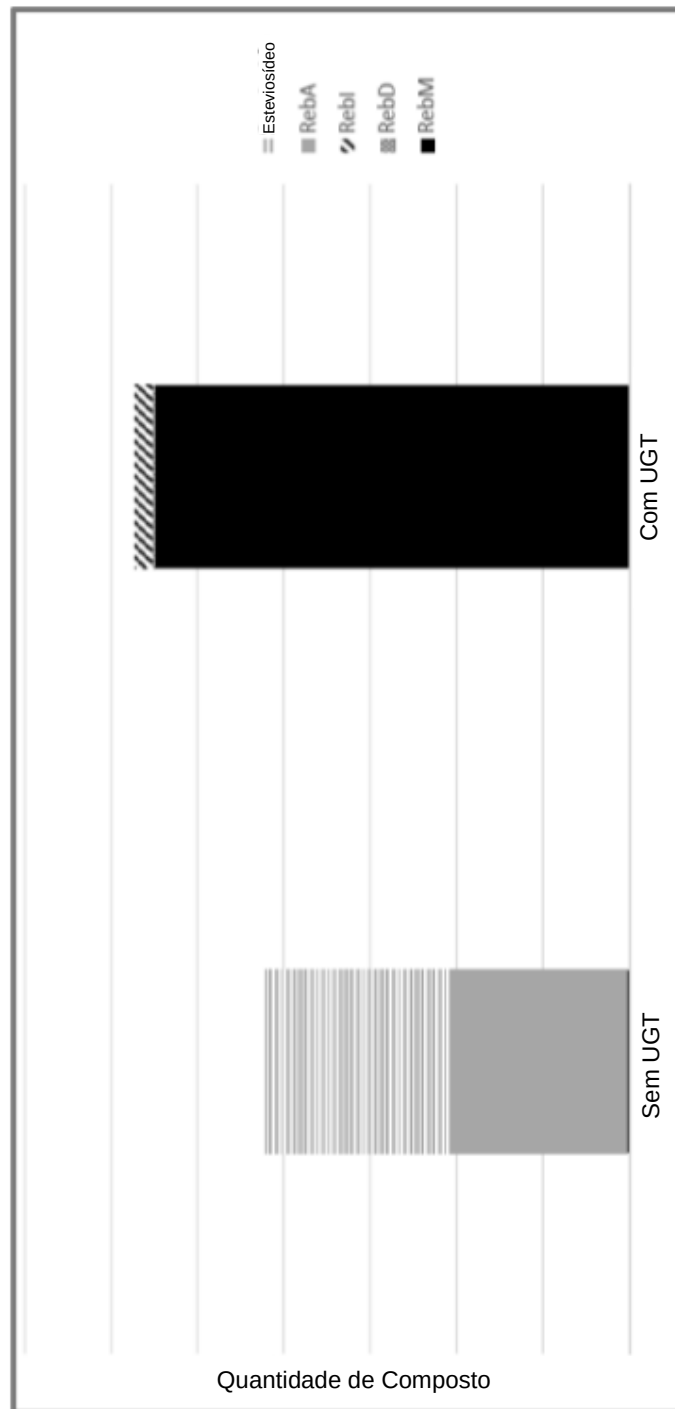


FIG. 7

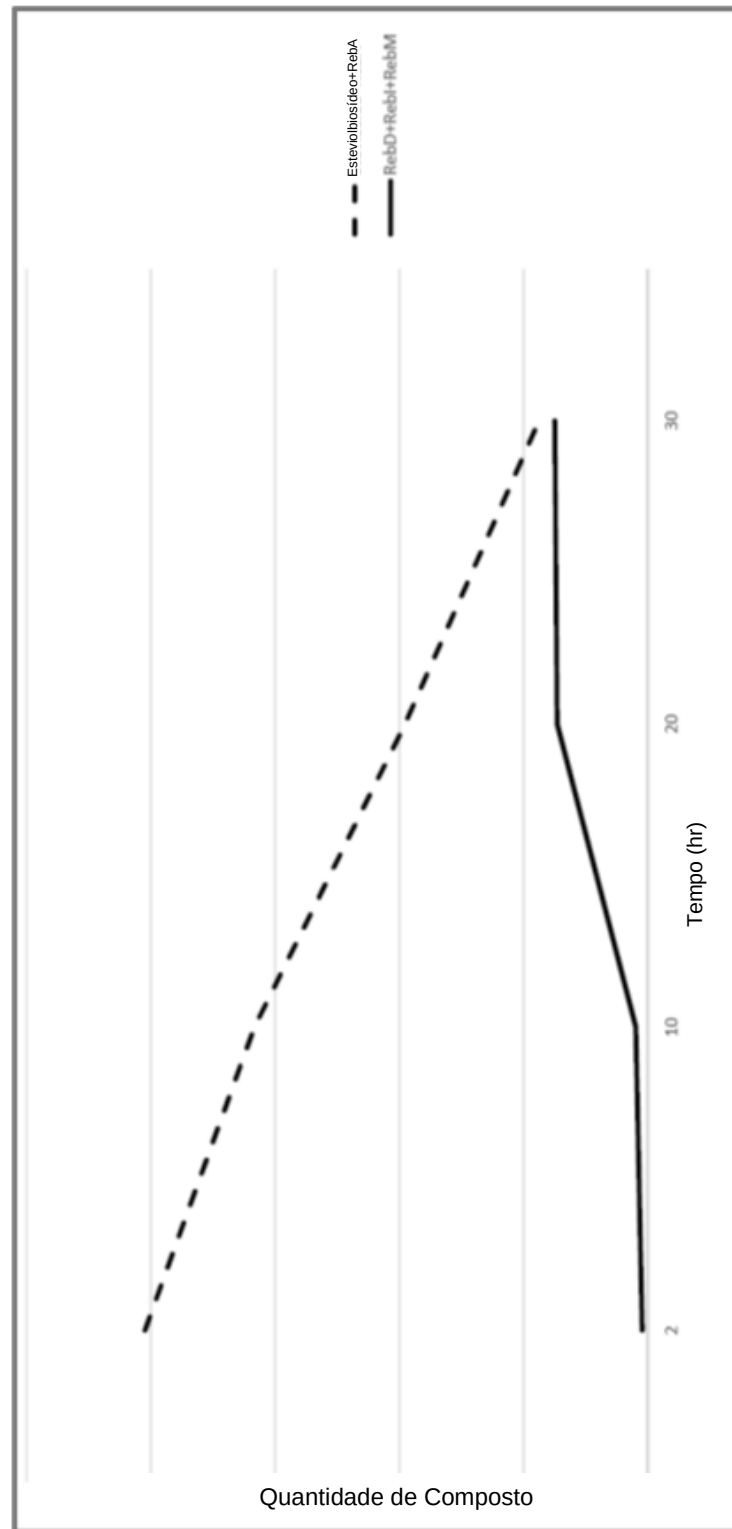
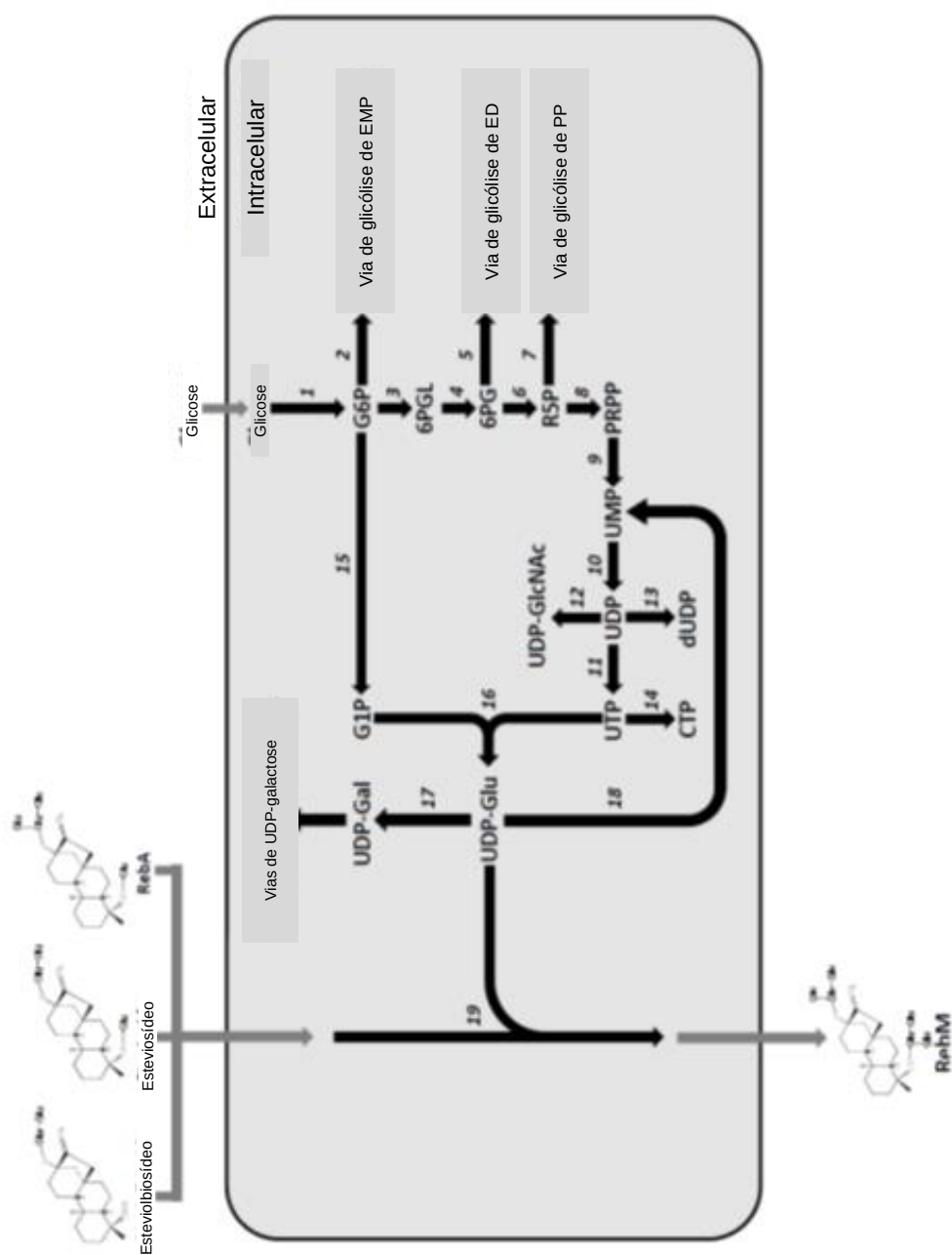


FIG. 8



RESUMO**PRODUÇÃO DE GLICOSÍDEOS DE ESTEVIOL ATRAVÉS DA
BIOTRANSFORMAÇÃO COM CÉLULAS INTEIRAS**

Em vários aspectos e modalidades, a invenção fornece células microbianas e métodos para a produção de produtos de glicosilação avançados a partir de intermediários glicosilados inferiores. A célula microbiana expressa uma ou mais enzimas glicosil transferase dependentes de UDP no citoplasma, para a glicosilação dos intermediários. Ao incubar a cepa microbiana com um extrato vegetal, ou fração do mesmo, compreendendo os intermediários, esses intermediários glicosilados ficam disponíveis para glicosilação adicional pela célula, e os produtos da glicosilação avançados podem ser recuperados a partir dos meios e/ou das células microbianas.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 2021_752 LIS.txt
- Data de Geração do Código: 25/03/2021
- Hora de Geração do Código: 18:24:21
- Código de Controle:
 - Campo 1: E7D6E30F052C3633
 - Campo 2: CABA9CF8834AC685