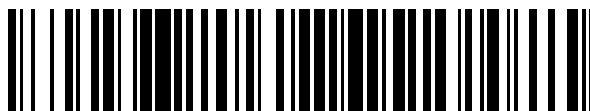


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 480**

51 Int. Cl.:

C12P 19/56 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2013 PCT/KR2013/011330**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.09.2014 WO14133248**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2013 E 13876125 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018 EP 2963122**

54 Título: **Método para preparar rebaudiósido A a partir de esteviósido**

30 Prioridad:

28.02.2013 KR 20130022176

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

02.07.2018

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
CJ Cheiljedang Center 330, Dongho-ro Jung-gu
Seoul 04560, KR**

72 Inventor/es:

**PARK, SUNG HEE;
KIM, JUNG EUN;
YOON, RAN YOUNG;
HONG, YOUNG HO;
KIM, SEONG BO y
PARK, SEUNG WON**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 674 480 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para preparar rebaudiósido A a partir de esteviósido

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un método para preparar rebaudiósido A a partir de sacarosa y esteviósido como materias primas mediante sacarosa sintasa y glicosiltransferasa.

10 Técnica anterior

Estevia es un edulcorante de alta potencia, más de 200 veces más dulce que el azúcar, y se obtiene mediante extracción en agua caliente de *Stevia rebaudiana Bertoni* que pertenece a la familia de las *Compositae*. Rebaudiósido A es conocido por tener menos sabor amargo y la calidad edulcorante más similar al azúcar entre los ingredientes edulcorantes de los extractos de estevia y es 400 veces más dulce que el azúcar y alcanza aproximadamente el 20% más o menos en los extractos, en el caso de plantas no modificadas. El ingrediente más predominante en los extractos es esteviósido, que es un precursor de rebaudiósido A. Para producir rebaudiósido A de alta pureza, es necesario llevar a cabo la mejora de las semillas con un alto contenido de rebaudiósido A, la gestión del cultivo, la recogida, gestión de las semillas, y similares, que implica problemas económicos en términos de tiempo y costes.

Para resolver estos problemas, se ha llevado a cabo una investigación para convertir esteviósido en rebaudiósido A. Los ejemplos típicos incluyen un método para convertir esteviósido en rebaudiósido A mediante la unión de una molécula de glucosa al esteviósido a través de una conversión enzimática utilizando beta-1,3-glucanasa derivada de microorganismos del suelo (publicación de patente coreana 2004-0026747A y patente de Estados Unidos n.º 6.469.947). Los ejemplos típicos de sustratos donantes de azúcar empleados en la conversión enzimática pueden incluir curdlan (beta-1,3-glucano). Curdlan es un material de alto coste con baja solubilidad y tiene el inconveniente de que su aplicación industrial es difícil. Además, aunque un informe especifica que curdlan convierte el esteviósido en el glucósido rebaudiósido mediante fermentación fúngica, el cultivo de los microorganismos tarda aproximadamente 15 días y produce también otros glicósidos de esteviol, tales como rebaudiósido B y similares, que hacen que la tasa de conversión hasta rebaudiósido A final sea solo de alrededor del 40%.

Problema técnico

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para preparar rebaudiósido A con una alta eficacia de producción superando la restricción de una tasa de producción baja de rebaudiósido A en una conversión enzimática derivada de microorganismos.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para preparar rebaudiósido A con una alta aplicabilidad industrial ya que el procedimiento de preparación es simple, menos largo y más económico.

Solución técnica

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para preparar rebaudiósido A, que incluye:

- (1) hacer reaccionar sacarosa y nucleótido difosfato en presencia de sacarosa sintasa para preparar nucleótido difosfato al que se ha unido la glucosa; y
- (2) hacer reaccionar el nucleótido difosfato al cual se ha unido glucosa con esteviósido en presencia de glicosiltransferasa para preparar rebaudiósido A.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un método *in-situ* para preparar rebaudiósido A a partir de esteviósido, que incluye: hacer reaccionar sacarosa, nucleótido difosfato, esteviósido, sacarosa sintasa y glicosiltransferasa para preparar rebaudiósido A. Se describe además rebaudiósido A preparado mediante el método para preparar rebaudiósido A de acuerdo con la presente invención.

Efectos ventajosos

El método para preparar rebaudiósido A de acuerdo con la presente invención proporciona rebaudiósido A con una alta pureza casi sin productos secundarios y con alto rendimiento.

El método para preparar rebaudiósido A de acuerdo con la presente invención es adecuado para la producción en masa ya que es económico debido al uso de materias primas baratas, y el procedimiento es sencillo y menos largo.

Descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra los resultados del análisis de HPLC, demostrando que la fructosa y la uridina difosfato al que se ha unido la glucosa se producen mediante la sacarosa sintasa. En la Fig. 1, (a) muestra la presencia de esteviósido (1) solo para el tiempo de reacción de 0 horas, (b) muestra que la uridina difosfato (2) a la cual se ha unido la glucosa se produce mediante la sacarosa sintasa tras el agotamiento del tiempo de reacción de 1 hora.

La Fig. 2 muestra los resultados del análisis de HPLC, demostrando que el esteviósido se convierte en rebaudiósido A mediante la glicosiltransferasa. En la Fig. 2, (a) muestra la presencia de esteviósido (1) solo para el tiempo de reacción de 0 horas, (b) muestra que esteviósido (1) y rebaudiósido A (2) están presentes después de un tiempo de reacción de 0,5 horas, y (c) muestra que todo el esteviósido (1) se convierte en rebaudiósido A (2) después de un tiempo de reacción de 1 hora.

La Fig. 3 muestra los resultados del análisis de HPLC, demostrando que rebaudiósido A (2) se produce a partir de esteviósido (1) mediante la sacarosa sintasa y la glicosiltransferasa. En la Fig. 3, (a) muestra la presencia de esteviósido (1) solo para el tiempo de reacción de 0 horas, cuando la concentración del sustrato de esteviósido es 100 mM, (b) muestra la presencia de rebaudiósido A (2) solo después de un tiempo de reacción de 24 horas, cuando la concentración del sustrato de esteviósido es 100 mM, y (c) muestra la presencia de esteviósido (1) y rebaudiósido (2) después de un tiempo de reacción de 24 horas, cuando la concentración del sustrato de esteviósido es 250 mM.

La Fig. 4 muestra un gráfico que demuestra los resultados de una evaluación del pH adecuada para la sacarosa sintasa y la glicosiltransferasa.

La Fig. 5 muestra un gráfico que demuestra los resultados de una evaluación de la temperatura adecuada para la sacarosa sintasa y la glicosiltransferasa.

Mejor forma de realización

Una realización de la presente invención se refiere a un método para preparar rebaudiósido A, que incluye:

(1) hacer reaccionar sacarosa y nucleótido difosfato en presencia de sacarosa sintasa para preparar nucleótido difosfato al que se ha unido la glucosa; y

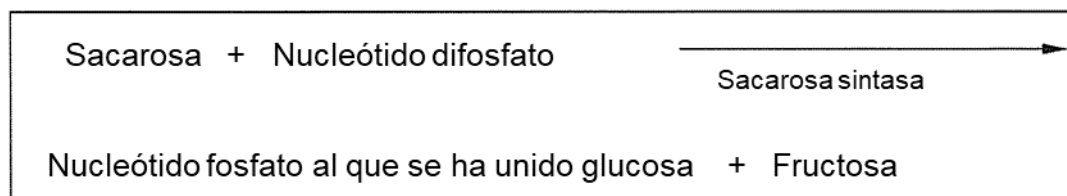
(2) hacer reaccionar el nucleótido difosfato al que se ha unido la glucosa con esteviósido en presencia de glicosiltransferasa para preparar rebaudiósido A. Las etapas (1) y (2) se llevan a cabo *in-situ* de forma secuencial o consecutiva, preferentemente *in-situ* de forma consecutiva.

Otra realización de la presente invención se refiere a un método para preparar rebaudiósido A a partir de esteviósido, que incluye: hacer reaccionar sacarosa, nucleótido difosfato, esteviósido, sacarosa sintasa y glicosiltransferasa para preparar rebaudiósido A. La reacción de sacarosa, nucleótido difosfato, esteviósido, sacarosa sintasa y glicosiltransferasa puede llevarse a cabo *in-situ*.

La expresión "in situ" utilizada en el presente documento significa que una reacción se lleva a cabo consecutivamente en un único sistema de reacción.

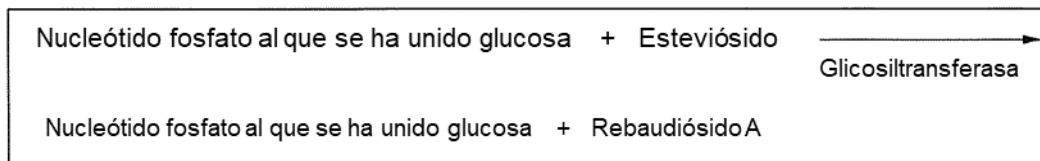
La sacarosa sintasa juega un papel en la producción de sacarosa transfiriendo reversiblemente la glucosa, que está unida a un nucleótido difosfato, a fructosa en el catabolismo de los azúcares vegetales. En la presente invención, la sacarosa sintasa demuestra actividad para separar el nucleótido difosfato al cual se ha unido la glucosa y fructosa haciendo reaccionar la sacarosa y el nucleótido difosfato en el intervalo de pH 5 a pH 10.

Reacción química 1



El nucleótido difosfato al que se ha unido la glucosa puede hacerse reaccionar con esteviósido por medio de glicosiltransferasa para producir rebaudiósido A.

Reacción química 2

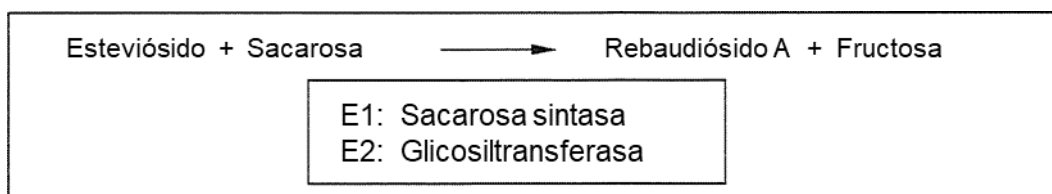


- 5 Las Reacciones químicas 1 y 2 de la presente invención pueden llevarse a cabo secuencialmente en reactores separados, pero se llevan a cabo preferentemente de forma consecutiva en el mismo reactor.

En la presente invención, Las Reacciones químicas 1 y 2 pueden combinarse en una sola fórmula de reacción de la siguiente forma:

10

Reacción química 3



- 15 La presente invención proporciona un sistema de reacción consecutivo, en el que una glucosa se une de forma específica en la posición C-3' del esteviósido 13-O-glucosa para sintetizar rebaudiósido A con alto rendimiento de acuerdo con la Reacción química 3 anterior.

- 20 En la presente invención, la sacarosa sintasa puede derivarse de arroz, maíz, trigo, bambú, *Arabidopsis thaliana*, césped, cebada, sorgo o patata. Preferentemente, la sacarosa sintasa se deriva de arroz, maíz, trigo, o cebada, de forma particularmente preferente de arroz, especialmente *Oryza sativa*. La sacarosa sintasa puede producirse a partir de *Escherichia coli*, *Bacillus*, levaduras, *Corynebacterium* o *Agrobacterium* recombinantes transformadas con un vector que contiene un gen de la sacarosa sintasa. La sacarosa sintasa puede además purificarse después de producirse a partir de *Escherichia coli* y similares. La sacarosa sintasa es bien conocida en la técnica. Aunque no está particularmente limitada, la sacarosa sintasa puede incluir una secuencia de bases que se muestra en la SEQ ID NO: 3.

- 25 En la presente invención, la sacarosa no está particularmente limitada siempre que puede servir como sustrato de la sacarosa sintasa para proporcionar glucosa al nucleótido difosfato. Los ejemplos de sacarosa pueden incluir azúcar en bruto o azúcar.

- 30 En la presente invención, la purina o pirimidina se pueden usar como el nucleótido difosfato. Preferentemente, se usa uridina difosfato como el nucleótido difosfato.

- 35 En la presente invención, la temperatura de reacción en la etapa (1) o la Reacción química 1 puede ser de 20°C a 60°C y el pH de la reacción puede estar en el intervalo de pH 5 a pH 10. Preferentemente, la temperatura de reacción es de 30°C a 55°C y el pH de la reacción está en el intervalo de pH 6 a pH 9, de forma particularmente preferida, la temperatura de reacción es de 35°C a 50°C y el pH de la reacción está en el intervalo de pH 7 a pH 8. En la presente invención, el tiempo de reacción en la etapa (1) o la Reacción química 1 es de 30 minutos a 48 horas, preferentemente de 1 hora a 36 horas, de forma particularmente preferente 1 hora a 24 horas, aunque sin limitarse a lo anterior.

- 40 En la presente invención, la glicosiltransferasa puede derivarse de *Oryza sativa*, *Stevia rebaudiana Bertoni*, *Bambusa oldhamii*, *Brachypodium distachyon*, *Hordeum vulgare*, *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, o *Arabidopsis thaliana*. Preferentemente, la glicosiltransferasa se deriva de *Oryza sativa*, *Stevia rebaudiana Bertoni*, o *Bambusa oldhamii*. De forma particularmente preferente, la glicosiltransferasa se deriva de *Stevia rebaudiana Bertoni*. La glicosiltransferasa puede producirse a partir de *Escherichia coli*, *Bacillus*, levaduras, *Corynebacterium* o *Agrobacterium* recombinantes transformadas con un vector que contiene un gen de la glicosiltransferasa. La glicosiltransferasa puede purificarse además después de producirse a partir de *Escherichia coli* y similares. La glicosiltransferasa es bien conocida en la técnica. Aunque no está particularmente limitada, la glicosiltransferasa puede incluir una secuencia de bases que se muestra en la SEQ ID NO: 4.

- 45 En la presente invención, el esteviósido se calienta en agua o es un extracto en solución acuosa etanólica de *Stevia rebaudiana*, o un material purificado de la misma, o un subproducto posterior a la producción de rebaudiósido A procedente del extracto. El esteviósido se puede usar en una cantidad de 10% en peso o más, preferentemente 50%

en peso o más, de forma particularmente preferente 70% en peso o más, de forma más particularmente preferente 80% en peso o más, basado en el peso total del glicósido de esteviol.

En la presente invención, la temperatura de reacción en la etapa (2) o la Reacción química 2 puede ser de 20°C a 60°C y el pH de la reacción puede estar en el intervalo de pH 5 a pH 10. Preferentemente, la temperatura de reacción es de 30°C a 55°C y el pH de la reacción está en el intervalo de pH 6 a pH 9. De forma particularmente preferente, la temperatura de reacción es de 35°C a 50°C y el pH de la reacción está en el intervalo de pH 7 a pH 8. En la presente invención, el tiempo de reacción en la etapa (2) o la Reacción química 2 puede ser de 30 minutos a 48 horas, preferentemente de 1 hora a 36 horas, de forma particularmente preferente 1 hora a 24 horas, aunque sin limitarse a lo anterior.

En la presente invención, la temperatura de reacción para la etapa de preparar rebaudiósido A haciendo reaccionar sacarosa, nucleótido difosfato, esteviósido, sacarosa sintasa y glicosiltransferasa *in-situ* puede ser de 20°C a 60°C y el pH de la reacción puede estar en el intervalo de pH 5 a pH 10. Preferentemente, la temperatura de reacción es de 30°C a 55°C y el pH de la reacción está en el intervalo de pH 6 a pH 9. De forma particularmente preferente, la temperatura de reacción es de 35°C a 50°C y el pH de la reacción está en el intervalo de pH 7 a pH 8.

En la presente invención, la purina o pirimidina se pueden usar como el nucleótido difosfato. Preferentemente, se usa uridina difosfato como el nucleótido difosfato. Se divulga además rebaudiósido A preparado mediante un método descrito en el presente documento.

Rebaudiósido A de acuerdo con la presente invención se caracteriza por que se produce utilizando la cantidad completa de esteviósido que reside en el glicósido esteviol. Dichas características pueden permitir que el contenido de esteviósido en el glicósido sea de un 5% en peso o menos, preferentemente de 3% en peso o menos, de forma particularmente preferente 1% en peso o menos, por lo tanto se puede omitir el paso de separar esteviósido de rebaudiósido A en un proceso de purificación, lo que conduce a un ahorro de costes. Además, en el caso de que solo una pequeña cantidad de rebaudiósido A esté presente como glicósido además de esteviósido en las materias primas como en la presente invención, el método de preparación tiene el mérito de que el producto tiene una alta pureza en la que el contenido de rebaudiósido A en glicósido de esteviol mediante conversión enzimática es del 99% o más. Además, la sacarosa que se usa como donante de azúcar en la presente invención puede adquirirse a un coste 50 veces menor que el curdlan utilizado como materia prima en las anteriores invenciones. Como resultado, la presente invención puede producir rebaudiósido A con alta pureza a bajo coste/alta eficacia en comparación con la técnica anterior.

A partir de ahora en el presente documento, la presente invención se describirá en mayor detalle con referencia a los siguientes ejemplos. Debe entenderse que estos ejemplos se proporcionan a fines ilustrativos únicamente y no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes de la presente invención.

Ejemplo 1: Recogida de genes y producción de proteínas recombinantes

1) Preparación del gen de la sacarosa sintasa a partir de *Escherichia coli* recombinante

Los cebadores utilizados en la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) tenían secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción para NdeI e HindIII que reaccionan respectivamente con una secuencia de bases parcial de ambos extremos de la sacarosa sintasa.

(DIRECTO) 5-CATATGGCTGCCAAGCTAGCTCG-3'
(INVERSO) 5'-AAGCTTTTACTTGGATGTGCTCTCTC-3'

Para la amplificación génica, el procedimiento de amplificación isotérmica repetido 30 ciclos consiste en desnaturalizar a 94°C durante 30 segundos, hibridar a 60°C durante 30 segundos, y extensión a 72°C durante 2 minutos, obteniendo por tanto aproximadamente 2,5 kb de producto de la PCR.

El fragmento de ADNc obtenido se insertó en un vector pET-28a(+) y se transformó en *Escherichia coli* BL21(DE3). Las *Escherichia coli* transformadas se inocularon sobre medio de placas que contenía kanamicina para seleccionar inicialmente cepas resistentes a kanamicina. Las cepas seleccionadas se sometieron a cultivo en medio líquido, seguido por purificación de los ADN. Finalmente, cuando los ADN se escindieron doblemente con NdeI e HindIII, se seleccionó una cepa confirmada por tener aproximadamente 2,5 kb de un fragmento de ADN. Como resultado de un análisis de secuencias de bases utilizando un secuenciador de ADN automatizado, la secuencia de bases (SEQ ID NO: 1) del gen de la sacarosa sintasa obtenida en la presente invención fue idéntica a la del gen de la sacarosa sintasa notificado a continuación:

SEQ ID NO: 1

TGCCAACAATCGCAACATGCCATGGTGGCCCTGCTGAGATTATTG
 TTGATGGGGTGTCTGGTCTGCACATTGATCCTTACCACAGTGACAAGGCT
 GCTGATATCTTGGTCAACTTCTTTGAGAAGTGCAAGCAGGATTCAACCTA
 CTGGGACAATATTTACAGGGAGGTCTGCAGAGGATTTACGAGAAGTAC
 ACCTGGAAGCTGTACTCTGAGAGGCTGATGACCTTGACTGGTGTATACG
 GATTCTGGAAGTACGTAAGCAACCTTGAGAGGCGCGAGACTCGCCGTTA
 CATTGAGATGTTCTATGCTCTGAAATACCGCAGCCTGGCCAGCGCCGTCC
 CATTGGCTGTCGATGGAGAGAGCACATCCAAGTAA

2) Preparación del gen de la glicosiltransferasa a partir de *Escherichia coli* recombinante

- 5 Los cebadores utilizados en la PCR tenían secuencias de reconocimiento de la enzima de restricción para NdeI y HindIII que reaccionan respectivamente con una secuencia de bases parcial de ambos extremos del gen de la glicosiltransferasa derivado de *Stevia rebaudiana*.

10 (DIRECTO) 5'-CATATGGAAAATAAAACGGA-3'
 (INVERSO) 5'-AAGCTTTTACAACGATGAAATGT-3'

- 15 Para la amplificación génica, se repitió el procedimiento de amplificación isotérmica durante 30 ciclos consistente en desnaturalizar a 94°C durante 30 segundos, hibridar a 60°C durante 30 segundos, y extensión a 72°C durante 2 minutos, obteniendo por tanto aproximadamente 1,4 kb de producto de la PCR. El fragmento de ADNc obtenido se insertó en un vector pET-28a(+) y se transformó en *Escherichia coli* BL21(DE3). Las *Escherichia coli* transformadas se inocularon sobre medio de placas que contenía kanamicina para seleccionar inicialmente cepas resistentes a kanamicina. Las cepas inicialmente seleccionadas se sometieron a cultivo en medio líquido, seguido por purificación de los ADN. Finalmente, cuando los ADN se escindieron doblemente con NdeI e HindIII, se seleccionó una cepa confirmada por tener aproximadamente 1,4 kb de un fragmento de ADN. Como resultado de un análisis de
- 20 secuencias de bases utilizando un secuenciador de ADN automatizado, la secuencia de bases (SEQ ID NO: 2) del gen de la glicosiltransferasa obtenida en la presente invención fue idéntica a la del gen de la glicosil transferasa notificado a continuación:

SEQ ID NO: 2

AGAAGTGCTAGCTCATGGAGCAATAGGCGCATTCTGGACTCATA
 GCGGATGGAACCTACGTTGGAAAGCGTTTGTGAAGGTGTTCTATGATT
 TTCTCGGATTTTGGGCTCGATCAACCGTTGAATGCTAGATACATGAGTGA
 TGTTTTGAAGGTAGGGGTGTATTTGGAAAATGGGTGGGAAAGAGGAGAG
 ATAGCAAATGCAATAAGAAGAGTTATGGTGGATGAAGAAGGAGAATAC
 ATTAGACAGAATGCAAGAGTTTTGAAACAAAAGGCAGATGTTTCTTTGA
 TGAAGGGTGGTTCGTCTTACGAATCATTAGAGTCTCTAGTTTCTTACATT
 TCATCGTTGTAA

25

3) Producción de proteína recombinante

- 30 Un tubo de ensayo que contenía 5 ml de medio LB se inoculó con *Escherichia coli* BL21(DE3) recombinante liofilizada, seguido por un cultivo de siembra en una estufa incubadora a 37°C hasta que la absorbancia a 600 nm llegó a ser 2,0. La solución de siembra cultivada se añadió a un matraz de 2000 ml que contenía 500 ml de medio LB y a continuación se cultivó. Además, se añadió IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactiopiranosido) 0,1 mM hasta que la absorbancia a 600 nm llegó a ser 0,4, induciendo por tanto la expresión másica de la sacarosa sintasa y la glicosiltransferasa, respectivamente. Las condiciones de cultivo se ajustaron de tal manera que la velocidad de

agitación fue de 180 rpm y la temperatura del cultivo fue de 37°C durante el procedimiento, mientras que la velocidad de agitación era de 120 rpm y la temperatura del cultivo era de 16°C tras la adición de IPTG. La solución de cultivo de la cepa transformada se centrifugó a 6.000 g a 4°C durante 20 minutos, seguido por lavado dos veces con tampón Tris/ácido clorhídrico 50 mM, añadiendo a continuación tampón Tris-ácido clorhídrico 50 mM, pH 7,5 para lisar la solución de células con un sonicador. El lisado celular se centrifugó de nuevo a 13.000 g a 4°C durante 20 minutos para separar el sobrenadante celular como una solución de enzimas. Para identificar exactamente las propiedades de las enzimas, la solución de enzimas se purificó utilizando una columna de superflujo Ni-NTA. Se midió el peso molecular de la enzima purificada mediante SDS-PAGE. Como resultado, se confirmó que la sacarosa sintasa derivada de arroz (*Oryza sativa*) tenía una longitud de 92 kDa (SEQ ID NO: 3) y la glicosiltransferasa (UDP-glicosiltransferasa) derivada de estevia (*Stevia rebaudiana*) tenía una longitud de 57 kDa (SEQ ID NO: 4).

Ejemplo 2: Medición de la actividad enzimática utilizando HPLC

1) Medición de la actividad de la sacarosa sintasa

Se midió la actividad de la sacarosa sintasa derivada de arroz (*Oryza sativa*) por medio de HPLC. Las condiciones de análisis por HPLC para medir la actividad de la sacarosa sintasa derivada de arroz (*Oryza sativa*) eran las siguientes:

Condiciones para el análisis por HPLC

- Longitud de onda del detector: 260 nm
- Caudal: 1 ml/min
- Volumen de inyección de la muestra: 10 µl
- Columna: C18 4,6 x 250 mM (5 µm de tamaño de poro)
- Disolvente:

A: Persulfato de tetrabutilamonio 8 mM en fosfato de potasio 100 mM [pH 5,3]
B: 70% de disolvente A + 30% de metanol

El tiempo de análisis total se ajustó a 30 minutos, donde el análisis comenzó con el gradiente 100% de disolvente A, para un tiempo de análisis de 15 minutos el gradiente del disolvente B aumentó a 20%, y a continuación, para un tiempo de análisis de 17 minutos, el gradiente volvió a 100% de disolvente A.

La actividad de la sacarosa sintasa derivada de arroz (*Oryza sativa*) se confirmó mediante reacción enzimática para ver si el azúcar bruto o el azúcar (sacarosa) y la uridina difosfato reaccionaban para producir uridina difosfato a la cual se unió la glucosa. Las condiciones de las reacciones enzimáticas fueron las siguientes:

sacarosa 100 mM, uridina difosfato 10 mM y 0,1 mg/ml de sacarosa sintasa (preparada en el Ejemplo 1-3) en tampón fosfato 50 mM (pH 6,5) se sometieron a reacción enzimática a 37°C durante 1 hora. Tras calentar a 100°C durante 5 minutos para detener la reacción, se llevó a cabo el análisis de HPLC para medir la cantidad producida de uridina difosfato al que se ha unido la glucosa. Como resultado, se confirmó que la uridina difosfato se convirtió en uridina difosfato a la que se ha unido glucosa, indicando una conversión del 90% en comparación con la concentración molar inicial (Fig. 1). En la Fig. 1, (a) muestra que solo uridina difosfato (1) está presente en el tiempo de reacción de 0 horas, (b) muestra que la uridina difosfato a la que se ha unido glucosa (2) se produce mediante la sacarosa sintasa para tras el agotamiento para el tiempo de reacción de 1 hora.

2) Medición de la actividad de la glicosiltransferasa

Las condiciones del análisis por HPLC para medir la glicosiltransferasa (UDP-glicosiltransferasa) derivada de estevia (*Stevia rebaudiana*) fueron las siguientes:

Condiciones para el análisis por HPLC

- Longitud de onda del detector: 210 nm
- Caudal: 1 ml/min
- Volumen de inyección de la muestra: 10 µl
- Columna: C18 4,6 x 250 mM (5 µm de tamaño de poro)
- Disolvente: Acetonitrilo: fosfato de sodio 10 mM [pH 2,6] = 32:68

Se confirmó la actividad de la glicosiltransferasa (UDP-glicosiltransferasa) derivada de estevia (*Stevia rebaudiana*) mediante conversión enzimática para ver si la unión de una molécula de glucosa a esteviósido conduce a la conversión a rebaudiósido A. Las condiciones para la reacción enzimática fueron del siguiente modo: esteviósido 2 mM (> 96%), uridina difosfato glucosa 10 mM, y 0,1 mg/ml de glicosiltransferasa derivada de estevia, (preparada en el Ejemplo 1-3) en tampón fosfato 50 mM (pH 7,0) se sometieron a reacción enzimática a 37°C durante una hora. El esteviósido usado como sustrato de la reacción enzimática era esteviósido puro con una pureza del 96% o más. Se

usó un espécimen mixto que contenía aproximadamente 3% de rebaudiósido A como un material estándar y tras reacción en el momento del análisis de HPLC. La reacción se detuvo calentando a 100°C durante 5 minutos, seguido por llevar a cabo la HPLC para medir la cantidad producida de rebaudiósido A. Como un resultado de análisis, se confirmó que el esteviósido se había convertido en rebaudiósido A con un 100% de conversión en comparación con la concentración molar (Fig. 2). La Fig. 2 muestra los resultados del análisis de HPLC, demostrando que el esteviósido se convierte en rebaudiósido A mediante la glicosiltransferasa. En la Fig. 2, (a) muestra la presencia de esteviósido (1) solo para el tiempo de reacción de 0 horas, (b) muestra que esteviósido (1) y rebaudiósido A (2) están presentes después de un tiempo de reacción de 0,5 horas, y (c) muestra que todo el esteviósido (1) se convierte en rebaudiósido A (2) después de un tiempo de reacción de 1 hora.

Ejemplo 3: Medición de la tasa de conversión de esteviósido a rebaudiósido A mediante reacción *in-situ* de la sacarosa sintasa y glicosiltransferasa

Se confirmó la tasa de conversión de esteviósido a rebaudiósido A mediante reacción *in-situ* de la sacarosa sintasa y la glicosiltransferasa (UDP-glicosiltransferasa). Las condiciones de las reacciones enzimáticas fueron las siguientes: Las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo usando tampón fosfato 50 mM (pH 6,5) que contenía sacarosa 1 M, uridina difosfato 200 mM, esteviósido 100~250 mM y 0,1 mg/ml de sacarosa sintasa (preparados en los ejemplos 1-3) y 0,1 mg/ml de glicosil transferasa (preparada en los Ejemplos 1-3) a una temperatura de 45°C durante 24 horas. El sustrato utilizado en la presente invención era la mezcla de esteviósido especificada en el Ejemplo 2. Tras completarse las reacciones, las reacciones se detuvieron calentando a 100°C durante 5 minutos. Después de esto, se llevó a cabo el análisis por HPLC para medir la concentración de rebaudiósido A dependiendo de la concentración de esteviósido. La tasa de conversión de esteviósido a rebaudiósido A se calculó a partir de la concentración molar de rebaudiósido A producida en comparación con la concentración molar de esteviósido utilizada (Fig. 3 y Tabla 1 (Tasa de conversión tras la reacción durante 24 horas)).

TABLA 1

Concentración de esteviósido (mM)	Tasa de conversión (%)
100	100
150	63,90
200	56,72
250	39,96

La Fig. 3 muestra los resultados del análisis de HPLC, demostrando que rebaudiósido A (2) se produce a partir de esteviósido (1) mediante la sacarosa sintasa y la glicosiltransferasa. En la Fig. 3, (a) muestra la presencia de esteviósido (1) solo para el tiempo de reacción de 0 horas, cuando la concentración del sustrato es 100 mM, (b) muestra la presencia de rebaudiósido A (2) solo después de un tiempo de reacción de 24 horas, cuando la concentración del sustrato es 100 mM, y (c) muestra la presencia de esteviósido (1) y rebaudiósido (2) después de un tiempo de reacción de 24 horas, cuando la concentración del sustrato es 250 mM.

Ejemplo 4

Estabilidad del pH en la reacción *in-situ* de la sacarosa sintasa y la glicosiltransferasa

Uridina difosfato, a la cual se unió glucosa, producida mediante la sacarosa sintasa derivada de arroz (*Oryza sativa*) se convirtió en rebaudiósido A haciéndola reaccionar con esteviósido mediante la glicosiltransferasa, disociando uridina difosfato. Cuando los dos tipos de enzimas estuvieron presentes en un único reactor y se produjo rebaudiósido A, se comprobó el pH óptimo. Las condiciones para el análisis de HPLC para medir el pH óptimo son del siguiente modo:

Condiciones para el análisis HPLC

- Longitud de onda del detector: 210 nm
- Caudal: 1 ml/min
- Volumen de inyección de la muestra: 10 µl
- Columna: C18 4,6 x 250 mM (5 µm de tamaño de poro)
- Disolvente: Acetonitrilo: fosfato de sodio 10 mM [pH 2,6] = 32:68

Se confirmó el pH óptimo a través de la reacción compleja de la sacarosa sintasa y la glicosiltransferasa (UDP-glicosiltransferasa). Las condiciones de las reacciones enzimáticas fueron las siguientes: Se llevaron a cabo las reacciones enzimáticas utilizando tampón fosfato 50 mM (pH 6,5) que contenía sacarosa 1M, uridina difosfato 200 mM, esteviósido 40 mM y 0,1 mg/ml de sacarosa sintasa (preparados en los ejemplos 1-3) y 0,1 mg/ml de glicosil transferasa (preparada en los Ejemplos 1-3) a una temperatura de 45°C durante 24 horas. Como tampón, de pH 2,5

a pH 12,0, se utilizó tampón universal. Las reacciones se detuvieron calentando a 100°C durante 5 minutos. Después de esto, se llevó a cabo el análisis de HPLC para medir la tasa de producción de rebaudiósido A. Comparando la cantidad producida de rebaudiósido A, se consideró que el pH de la reacción para el sistema de reacción que muestra el valor máximo era un pH óptimo para la reacción compleja. Se confirmó que el pH óptimo para la reacción compleja de la sacarosa sintasa y la glicosiltransferasa era aproximadamente pH 7,5 en una reacción llevada a cabo a una temperatura de 45°C durante 60 minutos (Fig. 4 y Tabla 2).

TABLA 2

pH	Actividad relativa de la enzima (%)
2,5	2,99
3,0	2,85
4,0	2,66
5,0	38,55
5,5	78,66
6,0	84,54
6,5	85,45
7,0	93,24
7,5	100
8,0	93,04
8,5	86,42
9,0	85,12
10,0	84,01
11,0	80,47
12,0	52,34

10 Ejemplo 4

Estabilidad de la temperatura en una reacción *in-situ* de la sacarosa sintasa y la glicosiltransferasa

Uridina difosfato, a la cual se unió glucosa, producida mediante la sacarosa sintasa derivada de arroz (*Oryza sativa*) se convirtió en rebaudiósido A haciéndola reaccionar con esteviósido mediante la glicosiltransferasa, disociando uridina difosfato. Cuando los dos tipos de enzimas estuvieron presentes en un único reactor y se produjo rebaudiósido A, se comprobó la temperatura óptima. Las condiciones del análisis por HPLC para medir el pH óptimo fueron las siguientes:

20 Condiciones para el análisis por HPLC

- Longitud de onda del detector: 210 nm
- Caudal: 1 ml/min
- Volumen de inyección de la muestra: 10 µl
- Columna: C18 4,6 x 250 mM (5 µm de tamaño de poro)
- Disolvente: Acetonitrilo: fosfato de sodio 10 mM [pH 2,6] = 32:68

Se confirmó la temperatura óptima a través de la reacción compleja de la sacarosa sintasa y la glicosiltransferasa (UDP-glicosiltransferasa). Las condiciones de las reacciones enzimáticas fueron las siguientes: Se llevaron a cabo las reacciones enzimáticas utilizando tampón fosfato 50 mM (pH 6,5) que contenía sacarosa 1M, uridina difosfato 200 mM, esteviósido 40 mM y 0,1 mg/ml de sacarosa sintasa y 0,1 mg/ml de glicosiltransferasa a temperaturas de 4°C, 20°C, 30°C, 37°C, 45°C, 60°C, 70°C, y 80°C. Las reacciones se detuvieron calentando a 100°C durante 5 minutos. Después de esto, se llevó a cabo el análisis de HPLC para medir la tasa de producción de rebaudiósido A. Comparando la cantidad producida de rebaudiósido A, se consideró que la temperatura de la reacción para el sistema de reacción que muestra el valor máximo era una temperatura óptima para la reacción compleja. Se confirmó que la temperatura óptima para la reacción compleja de la sacarosa sintasa y la glicosiltransferasa era aproximadamente de 45°C en una reacción llevada a cabo a pH 6,5 durante 60 minutos. La actividad relativa de la enzima se resumió en la Fig. 5 y la Tabla 3.

TABLA 3

Temperatura (°C)	Actividad relativa de la enzima (%)
4	10,19
20	17,20
30	31,21
37	80,48
45	100
60	39,24
70	9,71
80	10,40

<110> CJCHEILJEDANG CORPORATION

5 <120> Un método para la preparación de Rebaudiósido A a partir de esteviósido

<130> P13-5119

<150> 2013/0022176

10 <151> 28-02-2013

<160> 4

<170> KopatentIn 2.0

15

<210> 1

<211> 2427

<212> ADN

<213> Secuencia de ADN de la sacarosa sintasa

20

<400> 1

atggctgcca agctagctcg cctccacagt ctccgcgaac gcctcgggtgc caccttctcg	60
tctcatccca atgagttgat tgcactcttc tctaggtatg ttaaccaggg aaagggaatg	120
ctccagcgtc accagctgct tgcggagttc gatgccttga tcgaagctga caaagagaaa	180
tatgctccct ttgaagacat tctccgggct gctcaggaag ccattgtgct gccgccctgg	240
gttgacttgg ccatcaggcc aaggcctggt gtctgggact acattcgggt gaatgtaagt	300
gagttggcag tggaagagct gagtgtttct gagtacttgg cattcaagga acagcttggt	360
gatggacaca ccaacagcaa ctttgttctt gagcttgatt ttgagccctt caatgcctcc	420
ttcccgcgcc cgtccatgtc caagtccatc ggaaatgggg tgcagttcct taaccgtcac	480
ctgtcgtcca agttgttcca ggacaaggag agcctctacc ccttgctgaa cttcctgaaa	540
gcccataacc acaagggcac gacaatgatg ctgaatgaca gaattcagag ccttcgtggg	600
ctccaatcat cccttagaaa ggcagaagaa tatctgatgg gcattcctca agacacgccc	660
tactcggagt tcaaccacag gttccaagag ctcggtttgg agaagggttg gggtgactgt	720
gcaaagcgtg tgcttgacac catccacttg cttcttgacc ttcttgaggc ccctgatccg	780
gccaaacttg agaagttcct tggaactatt ccaatgatgt tcaatgttgt tatcctgtct	840
ccgcatggat actttgcca atccaatgtg ttgggatacc ctgatactgg tggtcagggtt	900
gtgtacattt tggaccaagt ccgcgctttg gagaatgaga tgcttttgag gatcaagcag	960
caaggccttg atatcacacc taagatcctc attgtaacca ggctgttgcc tgatgctggt	1020
ggtactacat gcggccagcg tgtggagaag gttattggaa ctgagcacac tgacattctt	1080
cgtgttccat tcaggagtga gaatggtatc ctccgcaagt ggatctcccg ttttgatgtc	1140
tggccattcc tggaacata cactgaggat gttgcaaacg aaattatgag ggaaatgcaa	1200
gccaaacctg atctcatcat tggcaattac agtgatggaa accttggtgc cactctgctg	1260
gctcaciaat taggagttac ccagtgtacc attgctcatg ccttgagaaa aaccaaatat	1320

cccaactcag acatatactt ggacaagttt gacagccagt accacttctc atgccaattc	1380
actgctgac ttatcgccat gaatcacact gatttcatca tcaccagtac attccaagaa	1440
attgctggaa gcaaggacac tgtggggcag tatgaatcac acattgcatt cacccttct	1500
gggctttacc gagttgtgca tggcatagat gtttttgatc ccaagttcaa cattgtctct	1560
cctggagctg acatgagtgt ctacttcccg tacaccgagg ctgacaagag gctcactgct	1620
ttccaccctg aaattgagga gcttctctac agtgaagtcg agaacgatga acacaagttt	1680
gtattgaagg acaagaacaa gccaatcatc ttctccatgg ctcgctcttga ccgagtgaag	1740
aacatgacag gtctgggtga gatgtatggt aagaatgcac atctcaggga tttggcaaac	1800
cttgtgattg tttgtggtga ccacggcaat cagtccaagg acagggagga gcaggctgag	1860
ttcaagaaga tgtacggtct cattgaccag tacaagttga aggggcatat ccgctggatc	1920
tcagctcaga tgaaccgtgt tcgtaacggg gagttgtacc gatacatttg tgacaccaag	1980
ggagtctttg tccagcctgc attctatgaa gcgtttggtc tgactgtcat cgaagccatg	2040
acatgtggtt tgccaacaat cgcaacatgc catggtggcc ctgctgagat tattgttgat	2100
ggggtgtctg gtctgcacat tgatccttac cacagtgaac aggctgctga tatcttggtc	2160
aacttctttg agaagtgcaa gcaggattca acctactggg acaatatttc acagggaggt	2220
ctgcagagga tttacgagaa gtacacctgg aagctgtact ctgagaggct gatgaccttg	2280
actggtgtat acggattctg gaagtacgta agcaaccttg agaggcgga gactcgccgt	2340
tacattgaga tgttctatgc tctgaaatac cgcagcctgg ccagcgccgt cccattggct	2400
gtcgtggag agagcacatc caagtaa	2427

<210> 2

<211> 1377

<212> ADN

<213> Secuencia de ADN de la glicosiltransferasa

<400> 2

ES 2 674 480 T3

atggaaaata aaacggagac caccgttcgc cggcgccgga gaataatatt attcccggta	60
ccatttcaag gccacattaa cccaattctt cagctagcca atgtgttgta ctctaaagga	120
ttcagtatca ccatctttca caccaacttc aacaaaccca aaacatctaa ttaccctcac	180
ttcactttca gattcatcct cgacaacgac ccacaagacg aacgcatttc caatctaccg	240
actcatggtc cgctcgctgg tatgoggatt ccgattatca acgaacacgg agctgacgaa	300
ttacgacgcg aactggaact gttgatgtta gcttctgaag aagatgaaga ggtatcgtgt	360
ttaatcacgg atgctctttg gtacttcgcg caatctgttg ctgacagtct taacctccga	420
cggcttgttt tgatgacaag cagcttgttt aattttcatg cacatgtttc acttcctcag	480
tttgatgagc ttggttacct cgatcctgat gacaaaaccc gtttggaaga acaagcgagt	540
gggtttccta tgctaaaagt gaaagacatc aagtctgcgt attcgaactg gcaaatactc	600
aaagagatat tagggaagat gataaaacaa acaaaagcat cttcaggagt catctggaac	660
tcatttaagg aactcgaaga gtctgagctc gaaactgtta tccgtgagat cccggctcca	720
agtttcttga taccactccc caagcatttg acagcctctt ccagcagctt actagaccac	780
gatcgaaccg tttttcaatg gttagaccaa caaccgcaa gttcgggtact gtatgttagt	840
tttggtagta ctagtgaagt ggatgagaaa gatttcttgg aaatagctcg tgggttggtt	900
gatagcaagc agtcgttttt atgggtggtt cgacctgggt ttgtcaaggg ttcgacgtgg	960
gtcgaaccgt tgccagatgg gttcttgggt gaaagaggac gtattgtgaa atgggttcca	1020
cagcaagaag tgctagctca tggagcaata ggcgcattct ggactcatag cggatggaac	1080
tctacgttgg aaagcgtttg tgaaggtgtt cctatgattt tctcggattt tgggctcgat	1140
caaccgttga atgctagata catgagtgat gttttgaagg taggggtgta tttggaaaat	1200
gggtgggaaa gaggagagat agcaaagca ataagaagag ttatggtgga tgaagaagga	1260
gaatacatta gacagaatgc aagagttttg aaacaaaagg cagatgtttc tttgatgaag	1320
ggtggttcgt cttacgaatc attagagtct ctagtttctt acatttcacg gttgtaa	1377

<210> 3
 <211> 808
 <212> PRT
 <213> Sacarosa sintasa

 <400> 3

ES 2 674 480 T3

Met	Ala	Ala	Lys	Leu	Ala	Arg	Leu	His	Ser	Leu	Arg	Glu	Arg	Leu	Gly	1	5	10	15
Ala	Thr	Phe	Ser	Ser	His	Pro	Asn	Glu	Leu	Ile	Ala	Leu	Phe	Ser	Arg	20	25	30	
Tyr	Val	Asn	Gln	Gly	Lys	Gly	Met	Leu	Gln	Arg	His	Gln	Leu	Leu	Ala	35	40	45	
Glu	Phe	Asp	Ala	Leu	Ile	Glu	Ala	Asp	Lys	Glu	Lys	Tyr	Ala	Pro	Phe	50	55	60	
Glu	Asp	Ile	Leu	Arg	Ala	Ala	Gln	Glu	Ala	Ile	Val	Leu	Pro	Pro	Trp	65	70	75	80
Val	Ala	Leu	Ala	Ile	Arg	Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Trp	Asp	Tyr	Ile	Arg	85	90	95	
Val	Asn	Val	Ser	Glu	Leu	Ala	Val	Glu	Glu	Leu	Ser	Val	Ser	Glu	Tyr	100	105	110	
Leu	Ala	Phe	Lys	Glu	Gln	Leu	Val	Asp	Gly	His	Thr	Asn	Ser	Asn	Phe	115	120	125	
Val	Leu	Glu	Leu	Asp	Phe	Glu	Pro	Phe	Asn	Ala	Ser	Phe	Pro	Arg	Pro	130	135	140	
Ser	Met	Ser	Lys	Ser	Ile	Gly	Asn	Gly	Val	Gln	Phe	Leu	Asn	Arg	His				

ES 2 674 480 T3

145					150						155				160
Leu	Ser	Ser	Lys	Leu	Phe	Gln	Asp	Lys	Glu	Ser	Leu	Tyr	Pro	Leu	Leu
				165					170					175	
Asn	Phe	Leu	Lys	Ala	His	Asn	His	Lys	Gly	Thr	Thr	Met	Met	Leu	Asn
			180					185					190		
Asp	Arg	Ile	Gln	Ser	Leu	Arg	Gly	Leu	Gln	Ser	Ser	Leu	Arg	Lys	Ala
		195					200					205			
Glu	Glu	Tyr	Leu	Met	Gly	Ile	Pro	Gln	Asp	Thr	Pro	Tyr	Ser	Glu	Phe
	210					215					220				
Asn	His	Arg	Phe	Gln	Glu	Leu	Gly	Leu	Glu	Lys	Gly	Trp	Gly	Asp	Cys
225				230						235					240
Ala	Lys	Arg	Val	Leu	Asp	Thr	Ile	His	Leu	Leu	Leu	Asp	Leu	Leu	Glu
				245					250					255	
Ala	Pro	Asp	Pro	Ala	Asn	Leu	Glu	Lys	Phe	Leu	Gly	Thr	Ile	Pro	Met
			260					265					270		
Met	Phe	Asn	Val	Val	Ile	Leu	Ser	Pro	His	Gly	Tyr	Phe	Ala	Gln	Ser
		275					280					285			
Asn	Val	Leu	Gly	Tyr	Pro	Asp	Thr	Gly	Gly	Gln	Val	Val	Tyr	Ile	Leu
	290					295					300				
Asp	Gln	Val	Arg	Ala	Leu	Glu	Asn	Glu	Met	Leu	Leu	Arg	Ile	Lys	Gln
305				310						315					320
Gln	Gly	Leu	Asp	Ile	Thr	Pro	Lys	Ile	Leu	Ile	Val	Thr	Arg	Leu	Leu
				325					330					335	
Pro	Asp	Ala	Val	Gly	Thr	Thr	Cys	Gly	Gln	Arg	Val	Glu	Lys	Val	Ile
			340					345					350		
Gly	Thr	Glu	His	Thr	Asp	Ile	Leu	Arg	Val	Pro	Phe	Arg	Ser	Glu	Asn
		355					360					365			
Gly	Ile	Leu	Arg	Lys	Trp	Ile	Ser	Arg	Phe	Asp	Val	Trp	Pro	Phe	Leu
	370					375					380				
Glu	Thr	Tyr	Thr	Glu	Asp	Val	Ala	Asn	Glu	Ile	Met	Arg	Glu	Met	Gln
385				390						395					400
Ala	Lys	Pro	Asp	Leu	Ile	Ile	Gly	Asn	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asn	Leu	Val
				405					410					415	
Ala	Thr	Leu	Leu	Ala	His	Lys	Leu	Gly	Val	Thr	Gln	Cys	Thr	Ile	Ala
			420					425					430		
His	Ala	Leu	Glu	Lys	Thr	Lys	Tyr	Pro	Asn	Ser	Asp	Ile	Tyr	Leu	Asp
	435						440					445			
Lys	Phe	Asp	Ser	Gln	Tyr	His	Phe	Ser	Cys	Gln	Phe	Thr	Ala	Asp	Leu
	450					455					460				
Ile	Ala	Met	Asn	His	Thr	Asp	Phe	Ile	Ile	Thr	Ser	Thr	Phe	Gln	Glu
465				470						475					480
Ile	Ala	Gly	Ser	Lys	Asp	Thr	Val	Gly	Gln	Tyr	Glu	Ser	His	Ile	Ala

ES 2 674 480 T3

485								490				495			
Phe	Thr	Leu	Pro	Gly	Leu	Tyr	Arg	Val	Val	His	Gly	Ile	Asp	Val	Phe
			500					505					510		
Asp	Pro	Lys	Phe	Asn	Ile	Val	Ser	Pro	Gly	Ala	Asp	Met	Ser	Val	Tyr
		515					520					525			
Phe	Pro	Tyr	Thr	Glu	Ala	Asp	Lys	Arg	Leu	Thr	Ala	Phe	His	Pro	Glu
	530					535					540				
Ile	Glu	Glu	Leu	Leu	Tyr	Ser	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	His	Lys	Phe
545					550					555					560
Val	Leu	Lys	Asp	Lys	Asn	Lys	Pro	Ile	Ile	Phe	Ser	Met	Ala	Arg	Leu
				565					570					575	
Asp	Arg	Val	Lys	Asn	Met	Thr	Gly	Leu	Val	Glu	Met	Tyr	Gly	Lys	Asn
			580					585					590		
Ala	His	Leu	Arg	Asp	Leu	Ala	Asn	Leu	Val	Ile	Val	Cys	Gly	Asp	His
		595					600					605			
Gly	Asn	Gln	Ser	Lys	Asp	Arg	Glu	Glu	Gln	Ala	Glu	Phe	Lys	Lys	Met
	610					615					620				
Tyr	Gly	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Lys	Leu	Lys	Gly	His	Ile	Arg	Trp	Ile
625					630					635					640
Ser	Ala	Gln	Met	Asn	Arg	Val	Arg	Asn	Gly	Glu	Leu	Tyr	Arg	Tyr	Ile
				645					650					655	
Cys	Asp	Thr	Lys	Gly	Val	Phe	Val	Gln	Pro	Ala	Phe	Tyr	Glu	Ala	Phe
			660					665					670		
Gly	Leu	Thr	Val	Ile	Glu	Ala	Met	Thr	Cys	Gly	Leu	Pro	Thr	Ile	Ala
		675					680					685			
Thr	Cys	His	Gly	Gly	Pro	Ala	Glu	Ile	Ile	Val	Asp	Gly	Val	Ser	Gly
	690					695					700				
Leu	His	Ile	Asp	Pro	Tyr	His	Ser	Asp	Lys	Ala	Ala	Asp	Ile	Leu	Val
705					710					715					720
Asn	Phe	Phe	Glu	Lys	Cys	Lys	Gln	Asp	Ser	Thr	Tyr	Trp	Asp	Asn	Ile
				725					730					735	
Ser	Gln	Gly	Gly	Leu	Gln	Arg	Ile	Tyr	Glu	Lys	Tyr	Thr	Trp	Lys	Leu
			740					745					750		
Tyr	Ser	Glu	Arg	Leu	Met	Thr	Leu	Thr	Gly	Val	Tyr	Gly	Phe	Trp	Lys
		755					760					765			
Tyr	Val	Ser	Asn	Leu	Glu	Arg	Arg	Glu	Thr	Arg	Arg	Tyr	Ile	Glu	Met
	770					775					780				
Phe	Tyr	Ala	Leu	Lys	Tyr	Arg	Ser	Leu	Ala	Ser	Ala	Val	Pro	Leu	Ala
785					790					795					800
Val	Asp	Gly	Glu	Ser	Thr	Ser	Lys								
				805											

<211> 458
 <212> PRT
 <213> Glicosiltransferasa

5 <400> 4

```

Met Glu Asn Lys Thr Glu Thr Thr Val Arg Arg Arg Arg Arg Ile Ile
 1          5          10          15

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

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

Asn Phe Asn Lys Pro Lys Thr Ser Asn Tyr Pro His Phe Thr Phe Arg
 50          55          60

Phe Ile Leu Asp Asn Asp Pro Gln Asp Glu Arg Ile Ser Asn Leu Pro
 65          70          75          80

Thr His Gly Pro Leu Ala Gly Met Arg Ile Pro Ile Ile Asn Glu His
      85          90          95

Gly Ala Asp Glu Leu Arg Arg Glu Leu Glu Leu Leu Met Leu Ala Ser
      100          105          110

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

Phe Ala Gln Ser Val Ala Asp Ser Leu Asn Leu Arg Arg Leu Val Leu
      130          135          140

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 674 480 T3

Ser	Phe	Leu	Trp	Val	Val	Arg	Pro	Gly	Phe	Val	Lys	Gly	Ser	Thr	Trp	305	310	315	320
Val	Glu	Pro	Leu	Pro	Asp	Gly	Phe	Leu	Gly	Glu	Arg	Gly	Arg	Ile	Val	325	330	335	
Lys	Trp	Val	Pro	Gln	Gln	Glu	Val	Leu	Ala	His	Gly	Ala	Ile	Gly	Ala	340	345	350	
Phe	Trp	Thr	His	Ser	Gly	Trp	Asn	Ser	Thr	Leu	Glu	Ser	Val	Cys	Glu	355	360	365	
Gly	Val	Pro	Met	Ile	Phe	Ser	Asp	Phe	Gly	Leu	Asp	Gln	Pro	Leu	Asn	370	375	380	
Ala	Arg	Tyr	Met	Ser	Asp	Val	Leu	Lys	Val	Gly	Val	Tyr	Leu	Glu	Asn	385	390	395	400
Gly	Trp	Glu	Arg	Gly	Glu	Ile	Ala	Asn	Ala	Ile	Arg	Arg	Val	Met	Val	405	410	415	
Asp	Glu	Glu	Gly	Glu	Tyr	Ile	Arg	Gln	Asn	Ala	Arg	Val	Leu	Lys	Gln	420	425	430	
Lys	Ala	Asp	Val	Ser	Leu	Met	Lys	Gly	Gly	Ser	Ser	Tyr	Glu	Ser	Leu	435	440	445	
Glu	Ser	Leu	Val	Ser	Tyr	Ile	Ser	Ser	Leu	450	455								

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar rebaudiósido A, que comprende:

- 5 (1) hacer reaccionar sacarosa y nucleótido difosfato en presencia de sacarosa sintasa para preparar nucleótido difosfato al que se ha unido la glucosa; y
 (2) hacer reaccionar el nucleótido difosfato al cual se ha unido glucosa con esteviósido en presencia de glicosiltransferasa para preparar rebaudiósido A.
- 10 2. El método para preparar rebaudiósido A de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la sacarosa sintasa se deriva de arroz, maíz, trigo, bambú, *Arabidopsis thaliana*, césped, cebada, sorgo o patata.
3. El método para preparar rebaudiósido A de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la sacarosa sintasa se produce a partir de *Escherichia coli*, *Bacillus*, levaduras, *Corynebacterium* o *Agrobacterium* recombinantes
15 transformados con un vector que contiene un gen de la sacarosa sintasa.
4. El método para preparar rebaudiósido A de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la sacarosa sintasa tiene una secuencia de bases que se muestra en la SEQ ID NO: 3.
- 20 5. El método para preparar rebaudiósido A de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la glicosiltransferasa se deriva de *Oryza sativa*, *Stevia rebaudiana Bertoni*, *Bambusa oldhamii*, *Brachypodium distachyon*, *Hordeum vulgare*, *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, o *Arabidopsis thaliana*.
6. El método para preparar rebaudiósido A de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la
25 glicosiltransferasa se deriva de *Escherichia coli*, *Bacillus*, levaduras, *Corynebacterium* o *Agrobacterium* recombinantes, transformados con un vector que contiene un gen de la glicosiltransferasa.
7. El método para preparar rebaudiósido A de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la
30 glicosiltransferasa tiene una secuencia de bases que se muestra en la SEQ ID NO: 4.
8. El método para preparar rebaudiósido A de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que las etapas (1) y (2) se llevan a cabo consecutivamente *in-situ*.
9. El método para preparar rebaudiósido A de acuerdo con la reivindicación 8, en el que una temperatura de
35 reacción *in-situ* es de 20°C a 60°C y el pH de la reacción está en el intervalo de pH 5 a pH 10.
10. Un método para preparar rebaudiósido A a partir de esteviósido, que comprende:
 hacer reaccionar sacarosa, nucleótido difosfato, esteviósido, sacarosa sintasa y glicosiltransferasa *in-situ* para
40 preparar rebaudiósido A.
11. El método para preparar rebaudiósido A a partir de esteviósido de acuerdo con la reivindicación 10, la temperatura de reacción es de 20°C a 60°C y el pH de la reacción está en el intervalo de pH 5 a pH 10.
12. El método para preparar rebaudiósido A a partir de esteviósido de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en el
45 que la sacarosa sintasa se deriva de arroz, maíz, trigo, bambú, *Arabidopsis thaliana*, césped, cebada, sorgo o patata.
13. El método para preparar rebaudiósido A a partir de esteviósido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que la glicosiltransferasa se deriva de *Oryza sativa*, *Stevia rebaudiana Bertoni*,
50 *Bambusa oldhamii*, *Brachypodium distachyon*, *Hordeum vulgare*, *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, o *Arabidopsis thaliana*.

Figura 1

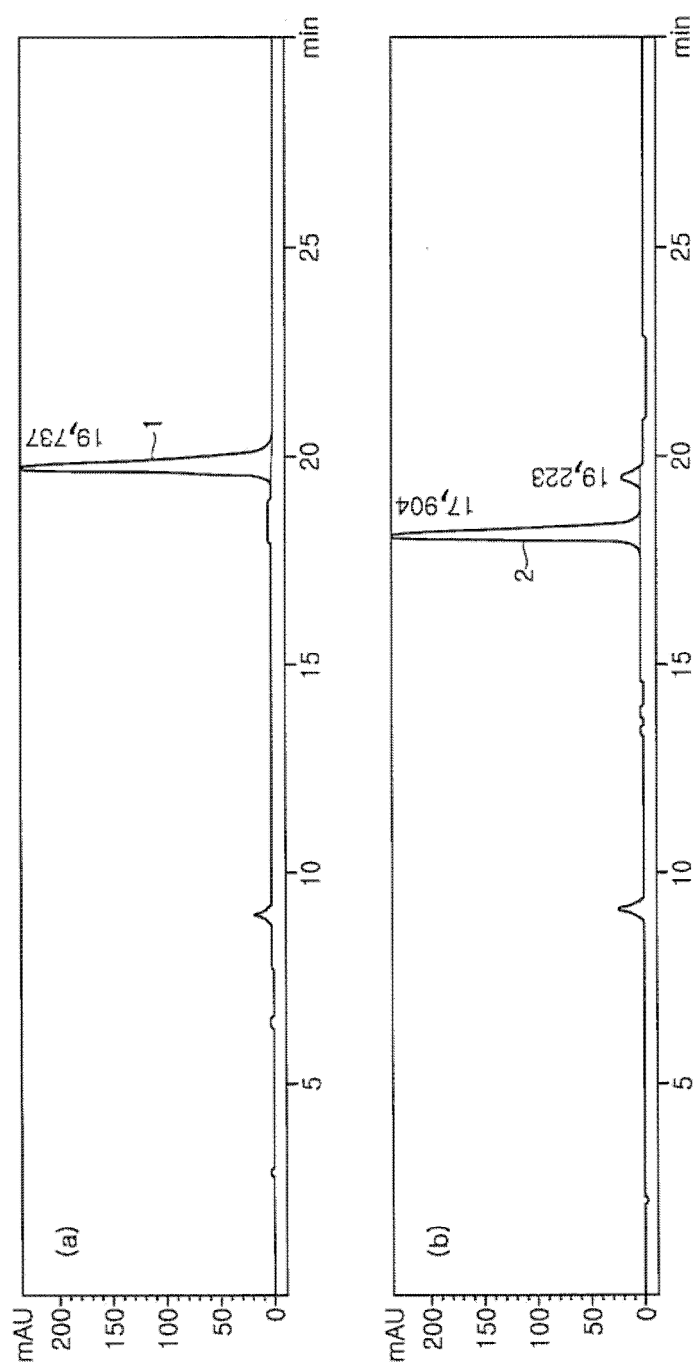


Figura 2

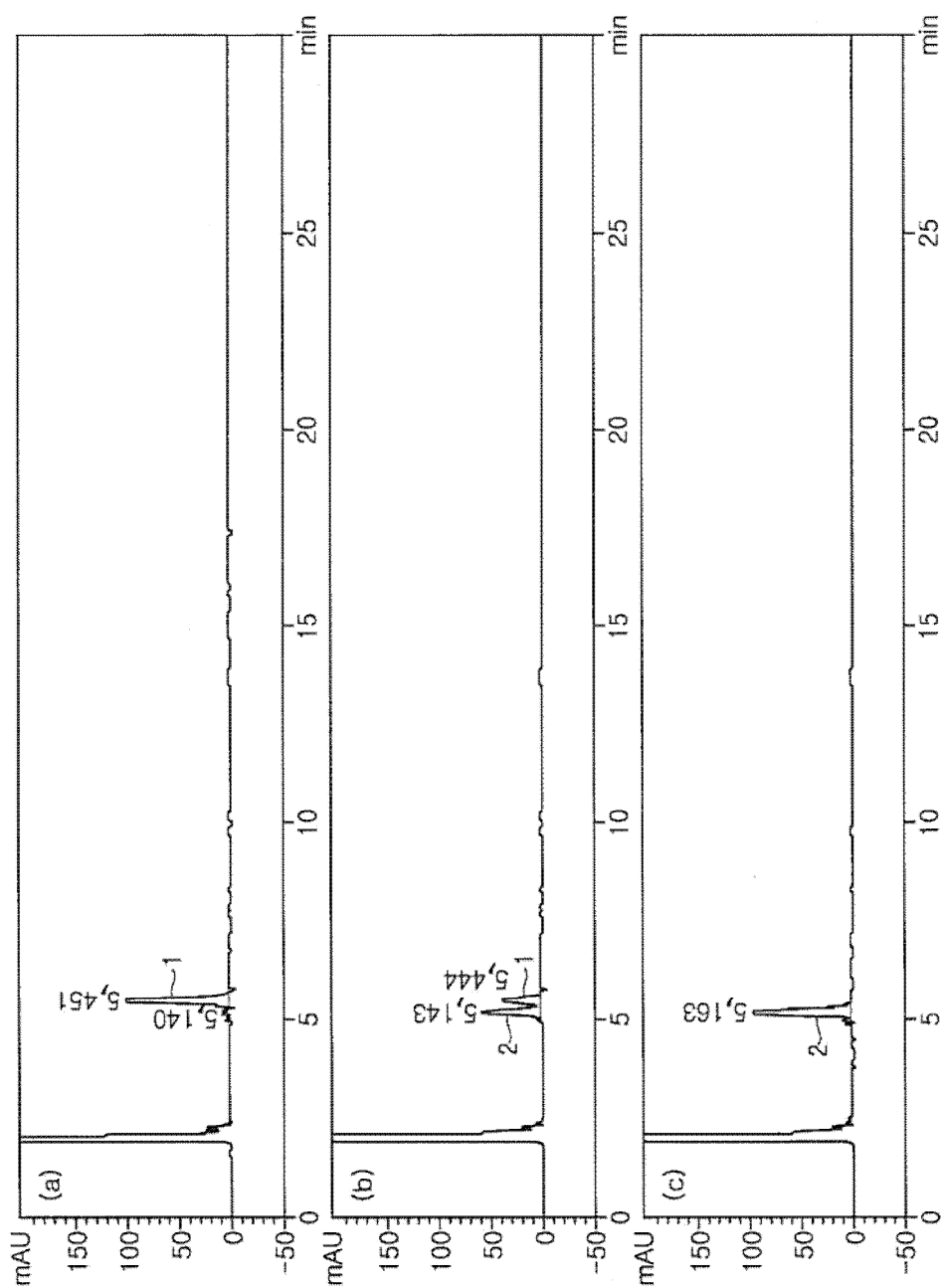


Figura 3

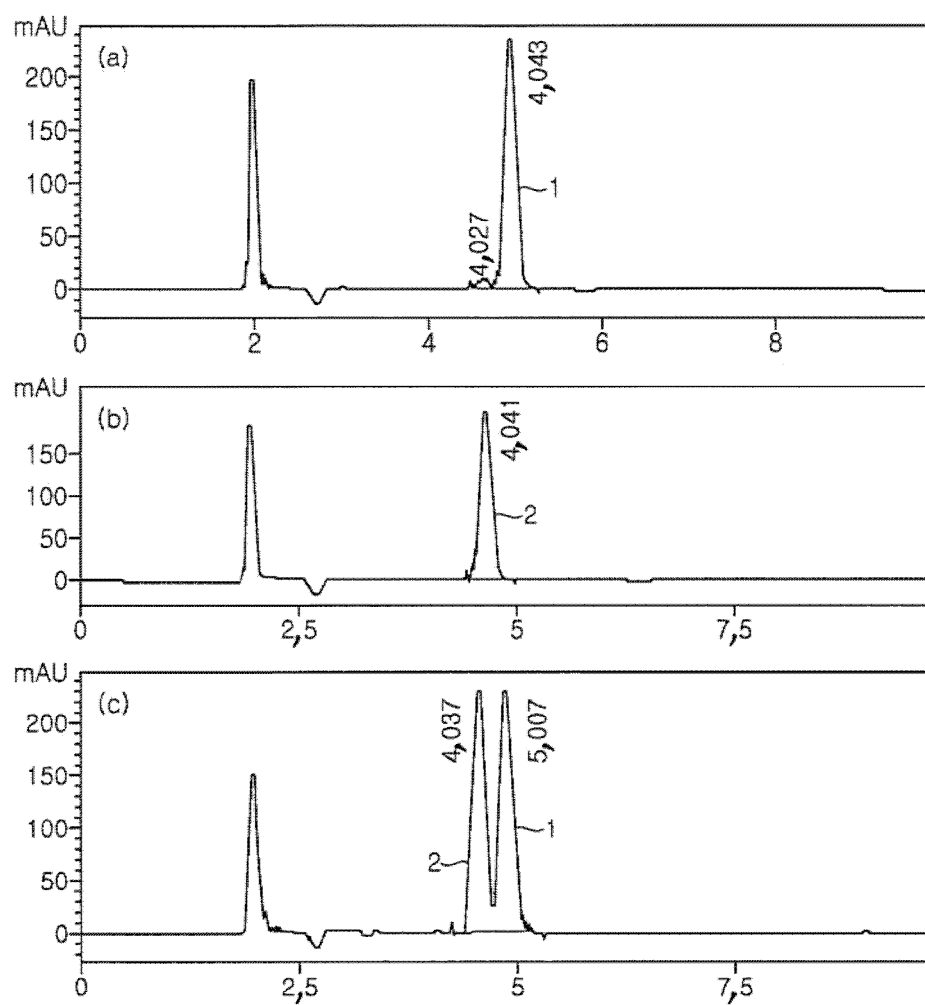


Figura 4

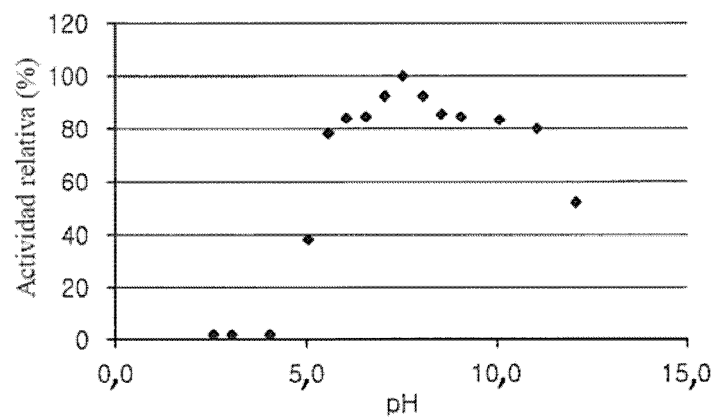


Figura 5

