

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 371**

51 Int. Cl.:

C07H 15/256 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2015 PCT/US2015/053782**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.04.2016 WO16054544**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2015 E 15847221 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 3201212**

54 Título: **Edulcorantes no calóricos y métodos de síntesis**

30 Prioridad:

03.10.2014 US 201462059498 P
31.12.2014 US 201462098929 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.12.2018

73 Titular/es:

CONAGEN INC. (100.0%)
15 DeAngelo Drive
Bedford, Massachusetts 01730, US

72 Inventor/es:

MAO, GUOHONG y
YU, XIAODAN

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 693 371 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

Edulcorantes no calóricos y métodos de síntesis.

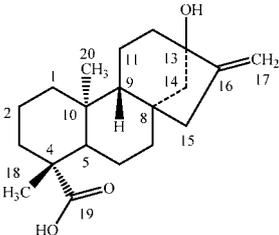
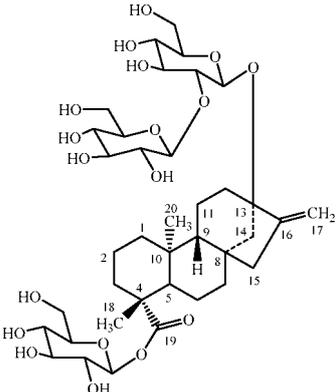
Antecedentes de la divulgación.

5 La presente divulgación se refiere en general a edulcorantes naturales. Más particularmente, la presente invención se refiere a métodos de síntesis de los edulcorantes no calóricos rebaudiósido KA y rebaudiósido E.

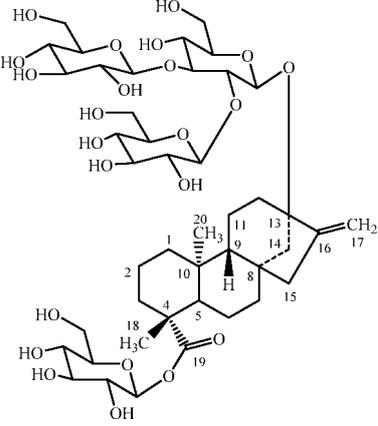
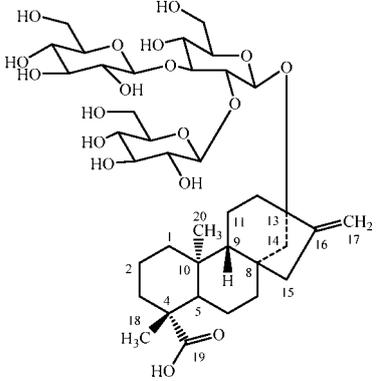
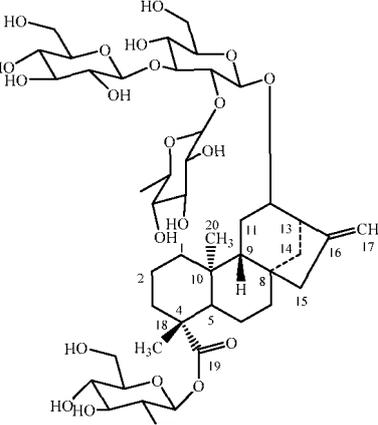
10 Los glicósidos de esteviol son productos naturales aislados de las hojas de *Stevia rebaudiana*. Los glicósidos de esteviol son ampliamente usados como edulcorantes de alta intensidad y bajos en calorías y son significativamente más dulces que la sacarosa. Como edulcorantes naturales, los diferentes glucósidos de esteviol tienen diferentes grados de dulzor y regusto. El dulzor de los glicósidos de esteviol es significativamente más alta que la de la sacarosa. Por ejemplo, el esteviósido es 100-150 veces más dulce que la sacarosa con regusto amargo. El rebaudiósido C es entre 40 y 60 veces más dulce que la sacarosa. El dulcósido A es aproximadamente 30 veces más dulce que la sacarosa.

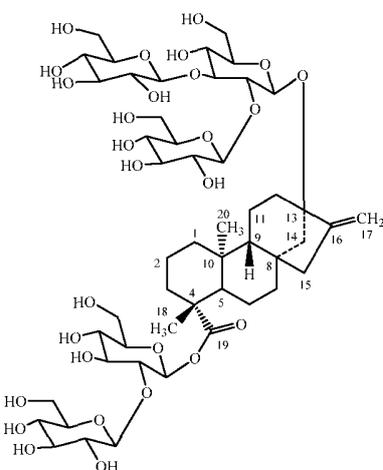
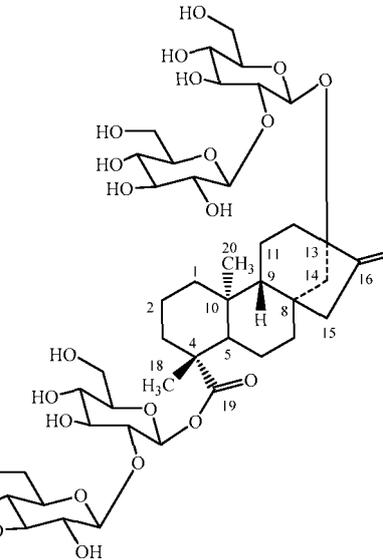
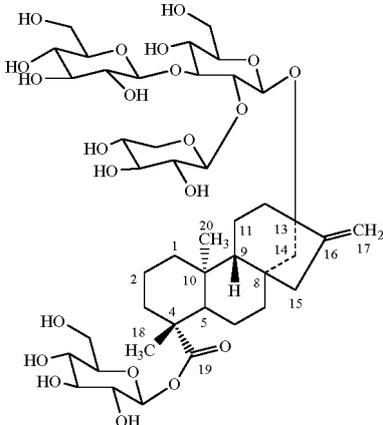
15 Los glicósidos de esteviol de origen natural comparten la misma estructura básica de esteviol, pero difieren en el contenido de residuos de carbohidratos (por ejemplo, residuos de glucosa, ramnosa y xilosa) en las posiciones C13 y C19. Los glicósidos de esteviol con estructuras conocidas incluyen esteviol, esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F y dulcósido A (véase, por ejemplo, la tabla 1). Otros glicósidos de esteviol son rebaudiósido M, rebaudiósido N y rebaudiósido O.

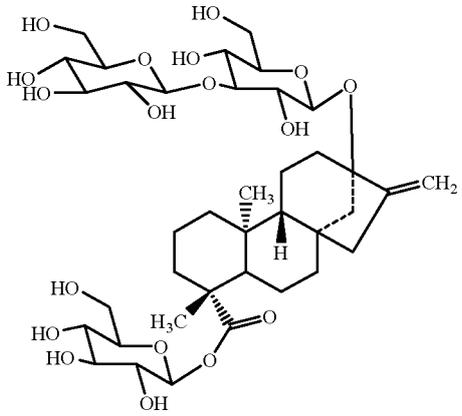
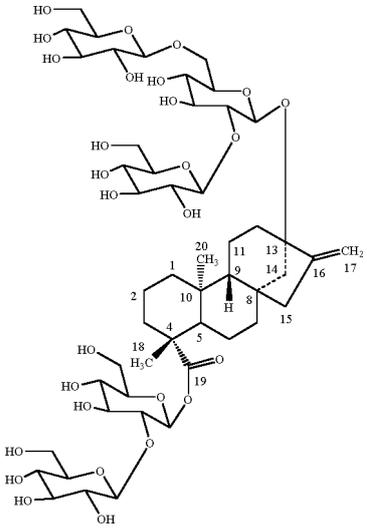
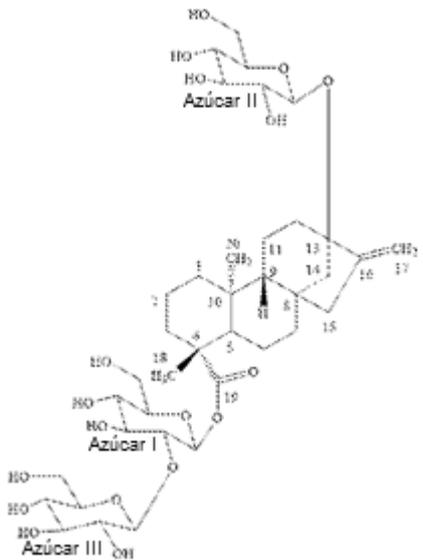
Tabla 1. Glicósidos de esteviol.

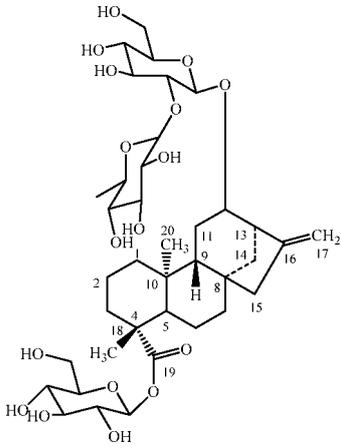
Nombre	Estructura	Fórmula molecular	Peso molecular
Esteviol		$C_{20}H_{30}O_3$	318
Esteviósido		$C_{38}H_{60}O_{18}$	804

ES 2 693 371 T3

<p>Rebaudiósido A</p>	 <p>The structure shows a steroid nucleus with a methyl group at C-10 (C-20) and a vinyl group at C-16 (C-17). It is linked via an ether bridge at C-13 to a branched chain of four pyranose rings. The rings are numbered 1 through 20, with the methyl group at C-20 and the vinyl group at C-16/17.</p>	<p>$C_{44}H_{70}O_{23}$</p>	<p>966</p>
<p>Rebaudiósido-B</p>	 <p>The structure is identical to Rebaudiósido A, showing a steroid nucleus with a methyl group at C-10 (C-20) and a vinyl group at C-16 (C-17), linked via an ether bridge at C-13 to a branched chain of four pyranose rings.</p>	<p>$C_{38}H_{60}O_{18}$</p>	<p>804</p>
<p>Rebaudiósido C</p>	 <p>The structure is identical to Rebaudiósido A, showing a steroid nucleus with a methyl group at C-10 (C-20) and a vinyl group at C-16 (C-17), linked via an ether bridge at C-13 to a branched chain of four pyranose rings.</p>	<p>$C_{44}H_{70}O_{22}$</p>	<p>950</p>

<p>Rebaudiósido D</p>	 <p>The structure shows a central bicyclic core (cyclohexane fused to a six-membered ring) with a methyl group at C-10 and a double bond between C-16 and C-17. It is substituted with a methyl group at C-4, a hydroxyl group at C-5, and a hydroxyl group at C-8. The core is linked via an oxygen atom to a chain of four glucose units. The glucose units are linked in a 1-3-6-2 sequence, with the top two units being alpha-D-glucopyranose and the bottom two being beta-D-glucopyranose.</p>	<p>$C_{50}H_{80}O_{28}$</p>	<p>1128</p>
<p>Rebaudiósido E</p>	 <p>The structure is identical to Rebaudiósido D, showing the same bicyclic core and glucose chain.</p>	<p>$C_{44}H_{70}O_{23}$</p>	<p>966</p>
<p>Rebaudiósido F</p>	 <p>The structure is identical to Rebaudiósido D, showing the same bicyclic core and glucose chain.</p>	<p>$C_{43}H_{68}O_{22}$</p>	<p>936</p>

<p>Rebaudiósido G</p>		<p>$C_{38}H_{60}O_{18}$</p>	<p>804</p>
<p>Rebaudiósido D2 (Nota: la designación Rebaudiósido D2 se ha usado en algunos documentos de la técnica anterior, por ejemplo, WO2014/193888 para una estructura de rebaudiósido diferente)</p>		<p>$C_{50}H_{80}O_{28}$</p>	<p>1128</p>
<p>Rebaudiósido KA</p>		<p>$C_{38}H_{60}O_{18}$</p>	<p>804</p>

Dulcósido A		$C_{38}H_{60}O_{17}$	788
-------------	---	----------------------	-----

En peso seco, el esteviósido, el rebaudiósido A, el rebaudiósido C y el dulcósido A representan el 9.1, 3.8, 0.6 y 0.3% del peso total de los glicósidos de esteviol en las hojas, respectivamente, mientras que los otros glicósidos de esteviol están presentes en cantidades mucho más bajas. Los extractos de la planta de *Stevia rebaudiana* están disponibles comercialmente, que por lo general contienen esteviósido y rebaudiósido A como compuestos primarios. Los otros glicósidos de esteviol por lo general están presentes en el extracto de stevia como componentes menores. Por ejemplo, la cantidad de rebaudiósido A en preparaciones comerciales puede variar desde aproximadamente 20% a más del 90% del contenido total de glicósido de esteviol, mientras que la cantidad de rebaudiósido B puede ser desde aproximadamente 1-2%, la cantidad de rebaudiósido C puede ser aproximadamente 7-15%, y la cantidad de rebaudiósido D puede ser aproximadamente 2% del total de glicósidos de esteviol.

La mayoría de los glucósidos de esteviol están formados por varias reacciones de glicosilación de esteviol, que por lo general son catalizadas por las UDP-glicosiltransferasas (UGTs) usando uridina 5'-difosfoglucosa (UDP-glucosa) como un donante de la unidad estructural de azúcar. Las UGT en las plantas constituyen un grupo muy diverso de enzimas que transfieren un residuo de glucosa de UDP-glucosa a esteviol. Por ejemplo, la glicosilación del C-3' de la C-13-O-glucosa del esteviósido produce rebaudiósido A; y la glicosilación del C-2' de la 19-O-glucosa del esteviósido produce el rebaudiósido E. Además, la glicosilación del rebaudiósido A (en C-2' -19-O-glucosa) o el rebaudiósido E (en C-3' -13-O-glucosa) produce rebaudiósido D. (Figura 1).

Los edulcorantes alternativos están recibiendo una atención creciente debido al conocimiento de muchas enfermedades en proporción con el consumo de alimentos y bebidas con alto contenido de azúcar. Aunque hay edulcorantes artificiales disponibles, muchos edulcorantes artificiales tales como la dulzor, el ciclamato de sodio y la sacarina han sido prohibidos o restringidos por algunos países debido a preocupaciones sobre su seguridad. Por lo tanto, los edulcorantes no calóricos de origen natural son cada vez más populares. Uno de los principales obstáculos para el uso generalizado de edulcorantes de stevia son sus atributos de sabor indeseables. De acuerdo con lo anterior, existe la necesidad de desarrollar edulcorantes alternativos y métodos para su producción para proporcionar la mejor combinación de potencia de dulzor y perfil de sabor.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona ahora un método de producción de rebaudiósido KA y/o rebaudiósido E a partir de rubusósido, comprendiendo el método:

proporcionar una mezcla de reacción que comprende:

- 30 (A)
- (i) rubusósido,
 - (ii) uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa) como sustrato; y
 - (iii) la glicosiltransferasa HVI que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. NO 5; o
- (B)
- 35 (i) rubusósido,
- (ii) sacarosa, UDP y UDP-glucosa as sustratos y

(ii) la glicosiltransferasa HVI que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. NO: 5 con una sacarosa sintasa;

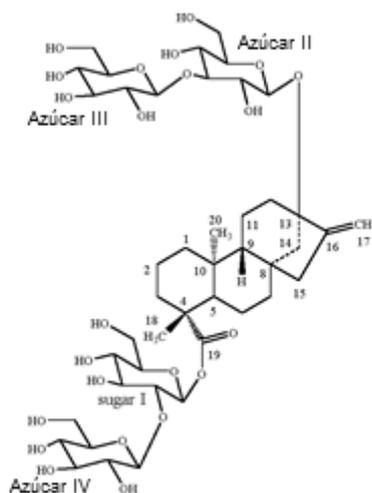
incubar la mezcla de reacción para producir el rebaudiósido KA, en el que una glucosa se acopla covalentemente al C2' de la glucosa 19-O de rubusósido para producir el rebaudiósido KA y/o rebaudiósido E, en el que la glucosa se acopla covalentemente además por dicha glicosiltransferasa al C2' de la 13-O-glucosa del rebaudiósido KA; y obtener el rebaudiósido KA de la mezcla de reacción para usar como edulcorante.

5

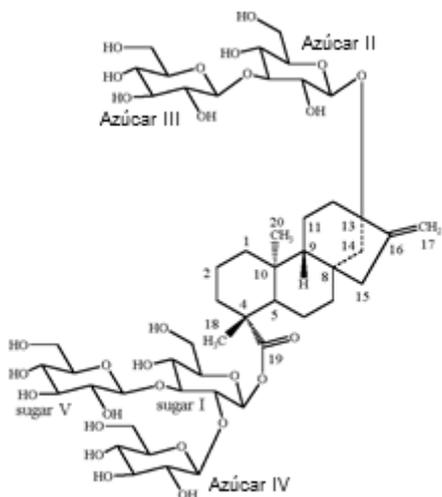
Un método de la invención puede comprender además incorporar el rebaudiósido KA como edulcorante en un producto de consumo por vía oral, que es una bebida u otro producto de consumo por vía oral.

También se describen en este documento y se mencionan a continuación, pero no reivindicados en las presentes reivindicaciones, son edulcorantes designados rebaudiósido V y rebaudiósido W que consisten en las estructuras químicas mostradas a continuación:

10



Reb V



Reb W

En ciertas realizaciones, el rebaudiósido KA se puede obtener para uso como un único edulcorante, y el producto tiene una intensidad de dulzor equivalente a aproximadamente 1% a aproximadamente 4% (% p/v) de solución de sacarosa. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el producto de consumo por vía oral puede incluir además un edulcorante adicional, donde el producto tiene una intensidad de dulzor equivalente a aproximadamente 1% a aproximadamente 10% (% p/v) de solución de sacarosa. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, cada ingrediente edulcorante en el producto puede ser un edulcorante de alta intensidad. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las

15

realizaciones precedentes, cada ingrediente edulcorante en el producto puede ser un edulcorante natural de alta intensidad. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el edulcorante adicional puede ser uno o más edulcorantes seleccionados de un extracto de stevia, un glicósido de esteviol, esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido D2, rebaudiósido E, rebaudiósido F, rebaudiósido G, rebaudiósido M, dulcósido A, rubusósido, esteviolbiósido, sacarosa, jarabe de maíz con alto contenido de fructosa, glucosa, xilosa, arabinosa, ramnosa, eritritol, xilitol, manitol, sorbitol, inositol, AceK, aspartame, neotame, sucralosa, sacarina, naringina dihidrocalcona (NarDHC), neohesperidina dihidrocalcona (NDHC), rubusósido, mogrósido IV, siamenósido I, mogrósido V, monatina, taumatina, monelina, brazzeína, L-alanina, glicina, Lo Han Guo, hernandulcina, filodulcina, trilobtain y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el producto de bebida y el producto de consumo pueden incluir además uno o más aditivos seleccionados de un carbohidrato, un poliol, un aminoácido o sal del mismo, un poliaminoácido o sal del mismo, un ácido de azúcar o sal del mismo, un nucleótido, un ácido orgánico, un ácido inorgánico, una sal orgánica, una sal de ácido orgánico, una sal de base orgánica, una sal inorgánica, un compuesto amargo, un saborizante, un ingrediente saborizante, un compuesto astringente, una proteína, un hidrolizado de proteínas, un surfactante, un emulsionante, un flavonoide, un alcohol, un polímero y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el rebaudiósido V tiene una pureza desde aproximadamente 50% a aproximadamente 100% en peso antes de añadirse al producto. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el W tiene una pureza desde aproximadamente 50% a aproximadamente 100% en peso antes de añadirse al producto. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el rebaudiósido V en el producto es un rebaudiósido V polimorfo o rebaudiósido amorfo V. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el rebaudiósido V en el producto es un estereoisómero de rebaudiósido V. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el rebaudiósido W en el producto es un rebaudiósido W polimorfo o rebaudiósido W amorfo. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el rebaudiósido W en el producto es un estereoisómero de rebaudiósido W.

Otros aspectos de la presente divulgación se dirigen a un método de preparación de un producto de bebida y un producto de consumo mediante la inclusión de rebaudiósido KA sintetizado en el producto o en los ingredientes para preparar el producto de bebida y el producto de consumo, donde el rebaudiósido KA está presente en el producto a una concentración desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm. Otros aspectos de la presente divulgación se dirigen a un método para mejorar el dulzor de un producto de bebida y un producto de consumo mediante la adición desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm de rebaudiósido KA sintetizado, donde el rebaudiósido KA sintetizado agregado mejora el dulzor del producto de bebida y el producto de consumo en comparación con un producto de bebida o producto de consumo correspondiente que carece del rebaudiósido KA sintetizado.

Otros aspectos de la presente divulgación se dirigen a un método de preparación de un producto de bebida edulcorado o un producto de consumo edulcorado mediante: a) proporcionar un producto de bebida o un producto de consumo que contiene uno o más edulcorantes; y b) añadir desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm de uno o más rebaudiósidos sintetizados, incluyendo el rebaudiósido KA, y seleccionado entre el rebaudiósido V, el rebaudiósido W, el rebaudiósido KA, el rebaudiósido M y el rebaudiósido G, y combinaciones de los mismos en el producto de bebida o el producto de consumo.

En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el método incluye además la adición de uno o más aditivos al producto de bebida o al producto de consumo. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el producto de consumo por vía oral contiene además uno o más aditivos. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el uno o más aditivos se seleccionan de un carbohidrato, un poliol, un aminoácido o sal del mismo, un poli-aminoácido o sal del mismo, un ácido de azúcar o sal del mismo, un nucleótido, un ácido orgánico, un ácido inorgánico, una sal orgánica, una sal de ácido orgánico, una sal de base orgánica, una sal inorgánica, un compuesto amargo, un saborizante, un ingrediente saborizante, un compuesto astringente, una proteína, una hidrolizado de proteína, un surfactante, un emulsionante, un flavonoide, un alcohol, un polímero y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, cada ingrediente edulcorante en el producto es un edulcorante de alta intensidad. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, cada ingrediente edulcorante en el producto es un edulcorante natural de alta intensidad. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el edulcorante se selecciona de un extracto de stevia, un glicósido de esteviol, esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido D2, rebaudiósido E, rebaudiósido F, rebaudiósido G, rebaudiósido M, dulcósido A, rubusósido, esteviolbiósido, sacarosa, jarabe de maíz con alto en fructosa, fructosa, glucosa, xilosa, arabinosa, ramnosa, eritritol, xilitol, manitol, sorbitol, inositol, Acek, aspartame, neotame, sucralosa, sacarina, naringina dihidrocalcona (NarDHC), neohesperidina dihidrocalcona (NDHC), rubusósido, mogrósido IV, siamenósido I, mogrósido V, monatina, taumatina, monelina, brazzeína, L-alanina, glicina, Lo Han Guo, hernandulcina, filodulcina, trilobtain y combinaciones de los mismos. En ciertas

realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el rebaudiósido V tiene una pureza desde aproximadamente 50% a aproximadamente 100% en peso antes de añadirse al producto. En ciertas

- realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el rebaudiósido V en el producto es un rebaudiósido V polimorfo o rebaudiósido V amorfo. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el rebaudiósido W tiene una pureza de aproximadamente 50% a aproximadamente 100% en peso antes de añadirse al producto. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el rebaudiósido W en el producto es un rebaudiósido W polimorfo o rebaudiósido W amorfo.
- 5 Breve descripción de los dibujos
- La divulgación se comprenderá mejor y otras características, aspectos y ventajas distintas de las expuestas anteriormente se harán evidentes cuando se considere la siguiente descripción detallada de la misma. Tal descripción detallada hace referencia a los siguientes dibujos, en los que:
- 10 La figura 1 representa una ruta de biosíntesis de glucósidos de esteviol a partir de esteviol.
- La figura 2 representa el análisis de SDS-PAGE de proteínas recombinantes purificadas indicadas por las flechas: A: HV1, B: UGT76G1, C: EUGT11, D: AtSUS1, E: UGT76G1-SUS1 (GS), F: EUGT11-SUS1 (EUS).
- 15 La figura 3 representa la reacción de catálisis HV1 para producir el rebaudiósido KA ("Reb KA") y rebaudiósido E ("Reb E") a partir de rubusósido. A-C: muestra los tiempos de retención de HPLC de patrones de rubusósido ("Rub"), esteviósido ("Ste") y rebaudiósido E ("Reb E"). Reb KA producido enzimáticamente por HV1 solo a las 6 h (D), 12 h (F) y 24 horas (H); Reb KA y Reb E producidos enzimáticamente por el sistema de acoplamiento UGT-SUS (HV1-AtSUS1) a las 6 h (E), 12 h (G) y 24 h (I).
- 20 La figura 4 representa la conversión de Reb E en rebaudiósido Z por HV1. (A): muestra el tiempo de retención de HPLC del rebaudiósido E ("Reb E"). Rebaudiósido Z ("Reb Z") producido enzimáticamente por HV1 en el sistema de acoplamiento HV1-AtSUS1 a las 3 h (B), 7 h (C), 24 h (D) y 44 h (E).
- La figura 5 representa la conversión de Reb KA a Reb E por HV1. (A-B): muestra los tiempos de retención de HPLC de rebaudiósido KA ("Reb KA") y rebaudiósido E estándar ("Reb E"). Reb E enzimáticamente producido por HV1 solo a las 12 h (C); Reb E producido enzimáticamente por el sistema de acoplamiento UGT-SUS (HV1-AtSUS1) a las 12 h (D).
- 25 La figura 6 representa la reacción de catálisis EUGT11 para producir Reb KA y esteviósido a partir de rubusósido. (AF): muestra los tiempos de retención de HPLC de patrones de rubusósido ("Rub"), esteviósido ("Ste"), rebaudiósido G ("Reb G"), rebaudiósido E ("Reb E"), rebaudiósido D ("Reb D") y rebaudiósido D2 ("Reb D2"). Reacción enzimática por EUGT11 solo a las 12 h (G) y 48 h (J); reacción enzimática por el sistema de acoplamiento UGT-SUS (EUGT11-AtSUS1) a las 12 h (H) y 48 h (K); reacción enzimática por la proteína de fusión EUS a las 12 h (I) y 48 h (L).
- 30 La figura 7 representa la conversión de Reb KA a Reb E y Reb D2 por las proteínas de fusión EUGT11 y EUS. (A-C): muestra los tiempos de retención de HPLC de patrones de rebaudiósido KA ("Reb KA"), rebaudiósido E ("Reb E") y rebaudiósido D2 ("Reb D2"). Reacción enzimática por EUGT11 solo a las 12 h (D) y 48 h (G); reacción enzimática por el sistema de acoplamiento UGT-SUS (EUGT11-AtSUS1) a las 12 h (E) y 48 h (H); reacción enzimática por la proteína de fusión EUS a las 12 h (F) y 48 h (I).
- 35 La figura 8 representa la producción UGT76G1 de rebaudiósido G in vitro. (A-B): muestra los tiempos de retención de HPLC de patrones de rubusósido ("Rub") y rebaudiósido G ("Reb G"). Reacción enzimática por UGT76G1 solo a las 12 h (C) y 24 h (F); reacción enzimática por el sistema de acoplamiento UGT-SUS (EUGT11-AtSUS1) a las 12 h (D) y 24 h (G); reacción enzimática por la proteína de fusión GS a las 12 h (E) y 48 h (H).
- 40 La figura 9 representa la reacción de catálisis UGT76G1 para producir los glicósidos de esteviol Reb V y Reb W a partir del rebaudiósido KA. (A-D): muestra los tiempos de retención de HPLC de patrones de rubusósido ("Rub"), rebaudiósido D ("Reb D"), rebaudiósido E ("Reb E") y rebaudiósido KA ("Reb KA"). Reacción enzimática por UGT76G1 solo a las 6 h (E) y 12 h (H); reacción enzimática por el sistema de acoplamiento UGT-SUS (UGT76G1-AtSUS1) a las 6 h (F) y 12 h (I); reacción enzimática por la proteína de fusión GS a las 6 h (G) y 12 h (J).
- 45 La figura 10 representa la conversión UGT76G1 de Reb V a Reb W in vitro. (A-B): muestra los tiempos de retención de HPLC de Reb V y Reb W. (C): reacción enzimática por el sistema de acoplamiento UGT76G1-AtSUS1 a las 6 h.
- La figura 11 representa la conversión HV1 de Reb G a Reb V. (A-C): muestra los tiempos de retención de HPLC de patrones de rebaudiósido G ("Reb G"), rebaudiósido A ("Reb A") y rebaudiósido E ("Reb E"). Reacción enzimática por HV1 solo a las 12 h (D) y 24 h (F); reacción enzimática por el sistema de acoplamiento UGT-SUS (HV1-AtSUS1) a las 12 h (E) y las 24 h (G).
- 50 La figura 12 representa la conversión EUGT11 de Reb G a Reb V. (A-D): muestra los tiempos de retención de HPLC de patrones de rebaudiósido G ("Reb G"), rebaudiósido A ("Reb A"), rebaudiósido E ("Reb E") y rebaudiósido D ("Reb D") patrones. Reacción enzimática por EUGT11 solo a las 12 h (E) y 24 h (H); reacción enzimática por el sistema de acoplamiento UGT-SUS (EUGT11-AtSUS1) a las 12 h (F) y 24 h (I); reacción enzimática por la enzima de fusión EUS a las 12 h (G) y 24 h (J).

5 La figura 13 representa la producción in vitro de Reb W a partir de rubusósido catalizada por una combinación de un polipéptido HV1 recombinante, una UGT76G1 recombinante, una enzima de fusión GS y un AtSUS1 recombinante. (A-F): muestra los patrones de rubusósido ("Rub"), esteviósido ("Ste"), Rebaudiósido G ("Reb G"), rebaudiósido A ("Reb A"), Rebaudiósido D ("Reb D") y rebaudiósido E ("Reb E"). Reb W producido enzimáticamente por HV1, UGT76G1 y AtSUS1 a las 6 horas (G), 12 h (I) y 24 h (K); Reb W producido enzimáticamente por HV1 y proteína de fusión GS a las 6 horas (H), 12 h (J) y 24 h (L).

10 La figura 14 representa la producción in vitro de Reb W a partir de rubusósido catalizada por una combinación de un polipéptido EUGT11 recombinante, una UGT76G1 recombinante, una enzima de fusión GS y un AtSUS1 recombinante. (A-E): muestra los patrones de rubusósido ("Rub"), esteviósido ("Ste"), rebaudiósido G ("Reb G"), rebaudiósido E ("Reb E") y rebaudiósido D ("Reb D"). Reb W producido enzimáticamente por EUGT11, UGT76G1 y AtSUS1 a las 12 horas (F) y 48 h (H); Reb W producido enzimáticamente por EUGT11 y proteína de fusión GS a las 12 horas (G) y 48 horas (I).

15 La figura 15 representa la producción in vitro de Reb W a partir de Reb G catalizada por una combinación de un polipéptido HV1 recombinante, una UGT76G1 recombinante, una enzima de fusión GS y un AtSUS1 recombinante. A-D muestra los patrones de rebaudiósido G ("Reb G"), rebaudiósido A ("Reb A"), Rebaudiósido D ("Reb D"), rebaudiósido y rebaudiósido E ("Reb E"). Reb V y Reb W producidos enzimáticamente por HV1, UGT76G1 y AtSUS1 a las 6 horas (E), 12 h (G) y 36 h (I); Reb V y Reb W producidos enzimáticamente por HV1 y proteínas de fusión GS a las 6 horas (F), 12 h (H) y 36 h (J).

20 La figura 16 representa la producción in vitro de Reb W a partir de Reb G catalizada por una combinación de un polipéptido EUGT11 recombinante, una UGT76G1 recombinante, una enzima de fusión GS y un AtSUS1 recombinante. (A-D): muestra los patrones de rebaudiósido G ("Reb G"), rebaudiósido A ("Reb A"), rebaudiósido E ("Reb E") y rebaudiósido D ("Reb D"). Reb W producido enzimáticamente por EUGT11, UGT76G1 y AtSUS1 a las 12 horas (E) y 48 h (G); Reb W producido enzimáticamente por EUGT11 y proteína de fusión GS a las 12 horas (F) y 48 horas (H).

La figura 17 representa las estructuras de Reb V y Reb G.

La figura 18 representa las correlaciones de TOCSY y HMBC clave de Reb V.

25 La figura 19 representa las estructuras de Reb W y Reb V.

La figura 20 representa las correlaciones de TOCSY y HMBC clave de Reb W.

La figura 21 representa la ruta de biosíntesis de los glucósidos de esteviol.

30 La figura 22 representa la producción in vitro de Reb M a partir de Reb D catalizada por UGT76G1 y enzima de fusión GS. (A-B): muestra los tiempos de retención de HPLC de patrones de rebaudiósido D ("Reb D") y rebaudiósido M ("Reb M"). Reacción enzimática por UGT76G1 solo a las 3 h (C) y 6 h (F); reacción enzimática por el sistema de acoplamiento UGT-SUS (UGT76G1-AtSUS1) a las 3 h (D) y 6 h (G); reacción enzimática por la enzima de fusión GS a las 3 h (E) y 6 h (H).

35 La figura 23 representa la producción in vitro de Reb D y Reb M a partir de Reb E catalizada por UGT76G1 y enzima de fusión GS. (A-C): muestra los tiempos de retención de HPLC de patrones de rebaudiósido E ("Reb E"), rebaudiósido D ("Reb D") y rebaudiósido M ("Reb M"). Reacción enzimática por UGT76G1 solo a las 3 h (D), 12 h (G) y 24 h (J); reacción enzimática por el sistema de acoplamiento UGT-SUS (UGT76G1-AtSUS1) a las 3 h (E), 12 h (H) y 24 h (K); reacción enzimática por la enzima de fusión GS a las 3 h (F), 12 h (I) y 24 h (L).

40 La figura 24 representa la producción in vitro de Reb D y Reb M a partir de esteviósido catalizado por una combinación de un HV1 recombinante, una UGT76G1 recombinante, una enzima de fusión GS y/o un AtSUS1 recombinante (A-D): muestra los tiempos de retención de HPLC de patrones de esteviósido ("Ste"), rebaudiósido A ("Reb A"), rebaudiósido D ("Reb D") y rebaudiósido M ("Reb M"). Reacción enzimática por HV1 y UGT76G1 en el sistema de acoplamiento UGT-SUS a las 6 h (E), 12 h (H) y 24 h (K); reacción enzimática por HV1 y enzima de fusión GS a las 6 h (F), 12 h (I) y 24 h (L). Reacción enzimática por UGT76G1 y HV1 a las 6 h (G), 12 h (J) y 24 h (M).

45 La figura 25 representa la producción in vitro de Reb D y Reb M a partir del rebaudiósido A catalizada por una combinación de HV1 recombinante, una UGT76G1 recombinante, una enzima de fusión GS y/o un AtSUS1 recombinante. (A-C): muestra los tiempos de retención de HPLC de patrones de rebaudiósido A ("Reb A"), rebaudiósido D ("Reb D") y rebaudiósido M ("Reb M"). Reacción enzimática por HV1 y UGT76G1 en el sistema de acoplamiento UGT-SUS a las 6 h (D), 12 h (G) y 24 h (J); reacción enzimática por HV1 y enzima de fusión GS a las 6 h (E), 12 h (H) y 24 h (K). Reacción enzimática por UGT76G1 y HV1 a las 6 h (F), 12 h (I) y 24 h (J).

50 La figura 26 representa la estructura de Reb M.

La figura 27 muestra las correlaciones de TOCSY y HMBC clave de Reb M.

Descripción detallada

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en el arte a la que pertenece la divulgación. Aunque cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en este documento se pueden usar en la práctica o prueba de la presente divulgación, los materiales y métodos preferidos se describen a continuación.

5 El término "complementario" se usa según su significado común y habitual, tal como lo entiende un experto en el arte, y se usa sin limitación para describir la proporción entre las bases de nucleótidos que son capaces de hibridar entre sí. Por ejemplo, con respecto al ADN, la adenosina es complementaria a la timina y la citosina es complementaria a la guanina. De acuerdo con lo anterior, la tecnología en cuestión también incluye fragmentos de ácido nucleico aislados que son complementarios a las secuencias completas como se informa en la lista de secuencias que se acompaña, así como aquellas secuencias de ácido nucleico sustancialmente similares.

10 Los términos "ácido nucleico" y "nucleótido" se usan según sus respectivos significados comunes y habituales, tal como los entiende un experto en el arte, y se usan sin limitación para referirse a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos ya sea en forma de cadena simple o doble. A menos que se limite específicamente, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia y se metabolizan de manera similar a los nucleótidos de origen natural. A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácido nucleico también abarca implícitamente variantes modificadas de forma conservadora o degeneradas de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada.

15 El término "aislado" se usa según su significado común y habitual, tal como lo entiende un experto en el arte, y cuando se usa en el contexto de un ácido nucleico aislado o un polipéptido aislado, se usa sin limitación para referirse a un ácido nucleico o polipéptido que, de la mano del hombre, existe aparte de su entorno nativo y, por lo tanto, no es un producto de la naturaleza. Un ácido nucleico o polipéptido aislado puede existir en una forma purificada o puede existir en un entorno no nativo tal como, por ejemplo, en una célula huésped transgénica.

20 Los términos "que incuba" e "incubación", como se usan en este documento, se refieren a un proceso de mezcla de dos o más entidades químicas o biológicas (tal como un compuesto químico y una enzima) y permitirles interactuar en condiciones favorables para producir una composición de glicósido de esteviol.

25 El término "variante degenerada" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que tiene una secuencia de residuos que difiere de una secuencia de ácido nucleico de referencia en una o más sustituciones de codones degenerados. Las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados (o todos) está sustituida con una base mixta y/o residuos de desoxinosina. Una secuencia de ácido nucleico y todas sus variantes degeneradas expresarán el mismo aminoácido o polipéptido.

30 Los términos "polipéptido", "proteína" y "péptido" se usan según sus respectivos significados comunes y habituales, tal como los entiende un experto en el arte; los tres términos se usan indistintamente, y se usan sin limitación para referirse a un polímero de aminoácidos, o análogos de aminoácidos, independientemente de su tamaño o función. Aunque la "proteína" se usa a menudo en referencia a polipéptidos relativamente grandes, y el "péptido" se usa a menudo en referencia a polipéptidos pequeños, el uso de estos términos en la técnica se solapa y varía. El término "polipéptido", como se usa en este documento, se refiere a péptidos, polipéptidos y proteínas, a menos que se indique lo contrario. Los términos "proteína", "polipéptido" y "péptido" se usan indistintamente en este documento cuando se hace referencia a un producto polinucleotídico. De este modo, los polipéptidos de ejemplo incluyen productos polinucleotídicos, proteínas de origen natural, homólogos, ortólogos, parálogos, fragmentos y otros equivalentes, variantes y análogos de los anteriores.

35 Los términos "fragmento de polipéptido" y "fragmento", cuando se usan en referencia a un polipéptido de referencia, se usan según sus significados comunes y habituales para un experto normal en el arte, y se usan sin limitación para referirse a un polipéptido en el que los residuos de aminoácidos se eliminan en comparación con el propio polipéptido de referencia, pero donde la secuencia de aminoácidos restante suele ser idéntica a las posiciones correspondientes en el polipéptido de referencia. Tales eliminaciones pueden ocurrir en el término amino o en el término carboxi del polipéptido de referencia, o alternativamente ambos.

40 El término "fragmento funcional" de un polipéptido o proteína se refiere a un fragmento peptídico que es una porción del polipéptido o proteína de longitud completa, y tiene sustancialmente la misma actividad biológica, o realiza sustancialmente la misma función que la longitud completa polipéptido o proteína (por ejemplo, llevando a cabo la misma reacción enzimática).

45 Los términos "polipéptido variante", "secuencia de aminoácidos modificada" o "polipéptido modificado", que se usan indistintamente, se refieren a una secuencia de aminoácidos que es diferente del polipéptido de referencia por uno o más aminoácidos, por ejemplo, por una o más sustituciones, deleciones y/o adiciones de aminoácidos. En un aspecto, una variante es una "variante funcional" que conserva parte o toda la capacidad del polipéptido de referencia.

50 El término "variante funcional" incluye además variantes conservativamente sustituidas. El término "variante sustituida de manera conservadora" se refiere a un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de un péptido de

referencia en una o más sustituciones de aminoácidos conservativas, y mantiene parte o toda la actividad del péptido de referencia. Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es una sustitución de un residuo de aminoácido con un residuo funcionalmente similar. Los ejemplos de sustituciones conservativas incluyen la sustitución de un residuo no polar (hidrófobo), tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro; la sustitución de un residuo cargado o polar (hidrófilo) por otro tal como entre la arginina y la lisina, entre la glutamina y la asparagina, entre la treonina y la serina; la sustitución de un residuo básico tal como lisina o arginina por otro; o la sustitución de un residuo ácido, tal como el ácido aspártico o el ácido glutámico por otro; o la sustitución de un residuo aromático, tal como fenilalanina, tirosina o triptófano por otro. Se espera que tales sustituciones tengan poco o ningún efecto sobre el peso molecular aparente o el punto isoelectrico de la proteína o polipéptido. La frase "variante sustituida de forma conservadora" también incluye péptidos en los que un residuo se reemplaza con un residuo derivado químicamente, siempre que el péptido resultante mantenga parte o toda la actividad del péptido de referencia como se describe en este documento.

El término "variante", en proporción con los polipéptidos de la tecnología en cuestión, incluye además un polipéptido funcionalmente activo que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 75%, al menos 76%, al menos 77%, al menos 78%, al menos 79%, al menos 80%, al menos 81%, al menos 82%, al menos 83%, al menos 84%, al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, e incluso 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de referencia.

El término "homólogo" en todas sus formas gramaticales y variaciones ortográficas se refiere a la proporción entre polinucleótidos o polipéptidos que poseen un "origen evolutivo común", incluidos polinucleótidos o polipéptidos de superfamilias y polinucleótidos o proteínas homólogas de diferentes especies (Reeck et al., Cell 50:667, 1987). Tales polinucleótidos o polipéptidos tienen homología de secuencia, como se refleja por su similitud de secuencia, ya sea en términos de porcentaje de identidad o la presencia de aminoácidos específicos o motivos en posiciones conservadas. Por ejemplo, dos polipéptidos homólogos pueden tener secuencias de aminoácidos que son al menos 75%, al menos 76%, al menos 77%, al menos 78%, al menos 79%, al menos 80%, al menos 81%, al menos 82%, al menos 83%, al menos 84%, al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, e incluso 100% idénticas.

El "porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos (%)" con respecto a las secuencias polipeptídicas variantes de la tecnología en cuestión se refiere al porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los residuos de aminoácidos de un polipéptido de referencia después de la alineación de las secuencias y la introducción de brechas, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y no considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia.

La alineación con el propósito de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de diversas maneras que están dentro de la habilidad de la técnica, por ejemplo, usando un software informático disponible públicamente tal como software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en el arte pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluidos los algoritmos necesarios para lograr la alineación máxima en toda la longitud de las secuencias que se comparan. Por ejemplo, el % de identidad de secuencia de aminoácidos se puede determinar usando el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2. El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 se puede descargar de ncbi.nlm.nih.gov. NCBI-BLAST2 usa varios parámetros de búsqueda, en el que todos esos parámetros de búsqueda se configuran en valores predeterminados que incluyen, por ejemplo, desenmascarar sí, hebra = todos, ocurrencias esperadas 10, longitud mínima de complejidad baja = 15/5, evaluación de múltiples etapas = 0.01, constante para paso múltiple = 25, reducción para alineación final con brechas = 25 y matriz de puntuación = BLOSUM62. En situaciones en las que se emplea NCBI-BLAST2 para comparaciones de secuencias de aminoácidos, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada (que alternativamente se puede expresar como una secuencia de aminoácidos A dada que tiene o comprende un cierto% de identidad de secuencia de aminoácidos con, con o contra una secuencia de aminoácidos B dada) se calcula de la siguiente manera: 100 veces la fracción X/Y donde X es el número de residuos de aminoácidos marcados como coincidencias idénticas por el programa de alineación de secuencias NCBI-BLAST2 en la alineación de A y B de ese programa, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se apreciará que donde la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de la secuencia de aminoácidos de B a A.

En este sentido, las técnicas para determinar la "similitud" de la secuencia de aminoácidos son bien conocidas en la técnica. En general, "similitud" se refiere a la comparación exacta de aminoácido a aminoácido de dos o más polipéptidos en el lugar apropiado, donde los aminoácidos son idénticos o poseen propiedades químicas y/o físicas similares, tal como la carga o la hidrofobicidad. Un denominado "porcentaje de similitud" puede entonces determinarse entre las secuencias polipeptídicas comparadas. Las técnicas para determinar la identidad de la secuencia de aminoácidos y ácidos nucleicos también son bien conocidas en la técnica e incluyen la determinación de la secuencia de nucleótidos del ARNm para ese gen (generalmente a través de un intermedio de ADNc) y la determinación de la secuencia de aminoácidos codificada en este, y la comparación de esta con una segunda secuencia de aminoácidos. En general, "identidad" se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido o de aminoácido a

5 aminoácido de dos polinucleótidos o secuencias polipeptídicas, respectivamente. Se pueden comparar dos o más secuencias de polinucleótidos determinando su "porcentaje de identidad", al igual que dos o más secuencias de aminoácidos. Los programas disponibles en el Paquete de Análisis de Secuencias de Wisconsin, Versión 8 (disponible de Genetics Computer Group, Madison, Wis.), por ejemplo, el programa GAP, son capaces de calcular tanto la identidad entre dos polinucleótidos como la identidad y similitud entre dos secuencias de polipéptidos, respectivamente. Los expertos en el arte conocen otros programas para calcular la identidad o similitud entre secuencias.

Una posición de aminoácido "correspondiente a" una posición de referencia se refiere a una posición que se alinea con una secuencia de referencia, como se identifica al alinear las secuencias de aminoácidos. Tales alineaciones se pueden hacer a mano o usando programas de alineación de secuencias bien conocidos como ClustalW2, Blast 2, etc.

10 A menos que se especifique lo contrario, el porcentaje de identidad de dos secuencias polipeptídicas o polinucleotídicas se refiere al porcentaje de residuos de aminoácidos o nucleótidos idénticos a lo largo de toda la longitud de la más corta de las dos secuencias.

La "secuencia codificante" se usa según su significado común y habitual, tal como la entiende un experto en el arte, y se usa sin limitación para referirse a una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos específica.

15 "Secuencias reguladoras apropiadas" se usa según su significado común y habitual, como lo entiende un experto en el arte, y se usa sin limitación para referirse a secuencias de nucleótidos ubicadas aguas arriba (secuencias no codificantes 5'), dentro o aguas abajo (secuencias no codificantes 3') de una secuencia codificante, y que influyen en la transcripción, el procesamiento o la estabilidad del ARN, o la traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores, secuencias líder de traducción, intrones y secuencias de reconocimiento de poliadenilación.

20 El "promotor" se usa de acuerdo con su significado normal y habitual, tal como lo entiende un experto en la técnica, y se usa sin limitación para referirse a una secuencia de ADN capaz de controlar la expresión de una secuencia de codificación o ARN funcional. En general, una secuencia codificante se ubica 3' a una secuencia promotora. Los promotores se pueden derivar en su totalidad de un gen nativo, o estar compuestos de diferentes elementos derivados de diferentes promotores encontrados en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de ADN sintético. Los expertos en el arte entenderán que diferentes promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tipos de células, o en diferentes etapas de desarrollo, o en respuesta a diferentes condiciones ambientales. Los promotores, que hacen que un gen se exprese en la mayoría de los tipos de células en la mayoría de los casos, se conocen comúnmente como "promotores constitutivos". Además, se reconoce que dado que en la mayoría de los casos los límites exactos de las secuencias reguladoras no se han definido completamente, los fragmentos de ADN de diferentes longitudes pueden tener una actividad promotora idéntica.

35 El término "unido operativamente" se refiere a la asociación de secuencias de ácido nucleico en un único fragmento de ácido nucleico de modo que la función de uno se ve afectada por el otro. Por ejemplo, un promotor está unido operativamente con una secuencia codificante cuando es capaz de afectar a la expresión de esa secuencia codificante (esto es, que la secuencia codificante está bajo el control transcripcional del promotor). Las secuencias codificantes se pueden unir operativamente a secuencias reguladoras en orientación de sentido o antisentido.

40 El término "expresión", como se usa en este documento, se usa según su significado común y habitual, tal como lo entiende un experto en el arte, y se usa sin limitación para referirse a la transcripción y la acumulación estable de sentido (ARNm) o ARN antisentido derivado del fragmento de ácido nucleico de la tecnología en cuestión. La "sobrexpresión" se refiere a la producción de un producto génico en organismos transgénicos o recombinantes que excede los niveles de producción en organismos normales o no transformados.

45 La "transformación" se usa según su significado común y habitual, tal como lo entiende un experto en el arte, y se usa sin limitación para referirse a la transferencia de un polinucleótido a una célula diana. El polinucleótido transferido se puede incorporar en el genoma o el ADN cromosómico de una célula diana, lo que resulta en una herencia genéticamente estable, o puede replicarse independientemente del cromosoma del huésped. Los organismos huésped que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformados se denominan organismos "transgénicos" o "recombinantes" o "transformados".

50 Los términos "transformado", "transgénico" y "recombinante", cuando se usan en este documento en proporción con las células huésped, se usan según sus significados comunes y habituales según entiende por un experto en el arte, y se usan sin limitación para referirse a una célula de un organismo huésped, tal como una planta o célula microbiana, en la que se ha introducido una molécula de ácido nucleico heteróloga. La molécula de ácido nucleico se puede integrar de manera estable en el genoma de la célula huésped, o la molécula de ácido nucleico puede estar presente como una molécula extracromosómica. Dicha molécula extracromosómica puede ser autoreplicante. Se entiende que las células, tejidos o sujetos transformados abarcan no solo el producto final de un proceso de transformación, sino también su progenie transgénica.

55 Los términos "recombinante", "heterólogo" y "exógeno", cuando se usan en este documento en proporción con polinucleótidos, se usan según sus significados comunes y habituales según entiende un experto normal en el arte, y se

usan sin limitación para referirse a un polinucleótido (por ejemplo, una secuencia de ADN o un gen) que se origina en una fuente extraña a la célula huésped particular o, si es de la misma fuente, se modifica de su forma original. De este modo, un gen heterólogo en una célula huésped incluye un gen que es endógeno a la célula huésped particular pero que se ha modificado mediante, por ejemplo, el uso de mutagénesis dirigida al sitio u otras técnicas recombinantes. Los términos también incluyen copias múltiples de origen no natural de una secuencia de ADN de origen natural. De este modo, los términos se refieren a un segmento de ADN que es extraño o heterólogo a la célula, u homólogo a la célula pero en una posición o forma dentro de la célula huésped en la que el elemento no se encuentra normalmente.

De manera similar, los términos "recombinante", "heterólogo" y "exógeno", cuando se usan en este documento en proporción con una secuencia de polipéptido o aminoácido, significan una secuencia de polipéptido o aminoácidos que se origina en una fuente extraña a la célula huésped particular o, si es de la misma fuente, se modifica de su forma original. De este modo, los segmentos de ADN recombinante se pueden expresar en una célula huésped para producir un polipéptido recombinante.

Los términos "plásmido", "vector" y "casete" se usan según sus significados comunes y habituales, tal como los entiende un experto en el arte, y se usan sin limitación para referirse a un elemento cromosómico adicional. a menudo portan genes que no forman parte del metabolismo central de la célula, y generalmente en forma de moléculas de ADN de doble cadena circular. Tales elementos pueden ser secuencias de replicación autónoma, secuencias de integración del genoma, secuencias de fagos o nucleótidos, lineales o circulares, de un ADN o ARN de cadena simple o doble, derivados de cualquier fuente, en la que se hayan unido o recombinado un número de secuencias de nucleótidos en una construcción única que es capaz de introducir un fragmento promotor y una secuencia de ADN para un producto génico seleccionado junto con la secuencia no traducida 3' apropiada en una célula. El "casete de transformación" se refiere a un vector específico que contiene un gen extraño y que tiene elementos además del gen extraño que facilita la transformación de una célula huésped en particular. El "casete de expresión" se refiere a un vector específico que contiene un gen extraño y tiene elementos además del gen extraño que permite una expresión mejorada de ese gen en un huésped extraño.

El ADN recombinante estándar y las técnicas de clonación molecular usadas en este documento son bien conocidas en la técnica y están descritas, por ejemplo, por Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 (en lo que sigue "Maniatis"); y por Silhavy, T. J., Bannan, M. L. and Enquist, L. W. *Experiments with Gene Fusions*; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N.Y., 1984; y por Ausubel, F. M. et al., in 'Current Protocols in Molecular Biology', publicado por Greene Publishing and Wiley-Interscience, 1987.

Como se usa en este documento, "sintético" o "sintetizado orgánicamente" o "sintetizado químicamente" o "sintetizando orgánicamente" o "sintetizando químicamente" o "síntesis orgánica" o "síntesis química" se usan para referirse a la preparación de los compuestos a través de una serie de reacciones químicas; esto no incluye la extracción del compuesto, por ejemplo, de una fuente natural.

El término "producto de consumo por vía oral", como se usa en este documento, se refiere a cualquier bebida, producto alimenticio, suplemento dietético, nutracéutico, composición farmacéutica, composición higiénica dental y producto cosmético que se ponen en contacto con la boca del hombre o animal, incluidas las sustancias que son ingeridos y posteriormente expulsados de la boca y sustancias que se beben, se comen, se tragan o se ingieren de otra manera; y que son seguros para el consumo humano o animal cuando se usan en un intervalo de concentraciones generalmente aceptable.

El término "producto alimenticio" como se usa en este documento se refiere a frutas, verduras, jugos, productos cárnicos tales como jamón, tocino y salchichas; productos de huevo, concentrados de frutas, gelatinas y productos similares a la gelatina, tales como mermeladas, jaleas, conservas y similares; productos lácteos tales como helado, crema agria, yogur y sorbete; glaseados, siropes incluyendo melaza; productos de maíz, trigo, centeno, soja, avena, arroz y cebada, productos de cereales, carnes de nuez y productos de nueces, pasteles, galletas, confitería tales como caramelos, gomitas, gotas con sabor a frutas y chocolates, chicles, mentas, cremas, glaseado, helados, tartas y panes. "Producto alimenticio" también se refiere a condimentos tales como hierbas, especias y condimentos, potenciadores del sabor, tales como el glutamato monosódico. "Producto alimenticio" también se refiere a los productos envasados preparados, tales como edulcorantes dietéticos, edulcorantes líquidos, aromatizantes de mesa, mezclas de sabores granulados que, al reconstituirse con agua, brindan bebidas no carbonatadas, mezclas de pudín instantáneo, café y té instantáneos, blanqueadores de café, mezclas de leche malteada, alimentos para mascotas, piensos para ganado, tabaco y materiales para aplicaciones de horneado, tales como mezclas para hornear en polvo para la preparación de panes, galletas, pasteles, tortitas, rosquillas y similares. "Producto alimenticio" también se refiere a alimentos y bebidas dietéticos o bajos en calorías que contienen poca o nada de sacarosa.

Como se usa en este documento, el término "estereoisómero" es un término general para todos los isómeros de moléculas individuales que difieren solo en la orientación de sus átomos en el espacio. "Estereoisómero" incluye enantiómeros e isómeros de compuestos con más de un centro quiral que no son imágenes especulares entre sí (diastereoisómeros).

Como se usa en este documento, el término "rebaudiósido V amorfo" se refiere a una forma sólida no cristalina de rebaudiósido V. Como se usa en este documento, el término "rebaudiósido W amorfo" se refiere a una forma sólida no cristalina de rebaudiósido W.

5 Como se usa en este documento, el término "intensidad de dulzor" se refiere a la fuerza relativa de la sensación dulce observada o experimentada por un individuo, por ejemplo, un ser humano, o un grado o cantidad de dulzor detectado por un catador, por ejemplo en una escala de brix.

10 Como se usa en este documento, el término "potenciar el dulzor" se refiere al efecto del rebaudiósido V y/o el rebaudiósido W para incrementar, aumentar, intensificar, acentuar, magnificar y/o potenciar la percepción sensorial de una o más características de dulzor de un producto de bebida o un producto de consumo de la presente divulgación sin cambiar su naturaleza o calidad, en comparación con un producto de consumo por vía oral correspondiente que no contiene rebaudiósido V y/o rebaudiósido W.

15 Como se usa en este documento, el término "sabor(es) desagradable(s)" se refiere a una cantidad o grado de sabor que no se encuentra característica o generalmente en un producto de bebida o un producto de consumo de la presente divulgación. Por ejemplo, un sabor desagradable es un sabor indeseable de un consumible edulcorado para los consumidores, tal como, un sabor amargo, un sabor a regaliz, un sabor metálico, un sabor aversivo, un sabor astringente, un inicio tardío de dulzor, un efecto persistente de gusto dulce, y similares, etc.

20 Como se usa en este documento, el término "% p/v" se refiere al peso de un compuesto, tal como un azúcar, (en gramos) por cada 100 ml de un producto líquido consumible por vía oral de la presente divulgación que contiene tal compuesto. Como se usa en este documento, el término "% p/p" se refiere al peso de un compuesto, tal como un azúcar, (en gramos) por cada gramo de un producto de consumo por vía oral de la presente divulgación que contiene tal compuesto.

25 Como se usa en este documento, el término "ppm" se refiere a parte (s) por millón en peso, por ejemplo, el peso de un compuesto, tal como el rebaudiósido V y/o el rebaudiósido W (en miligramos) por kilogramo de un producto de consumo por vía oral de la presente divulgación que contiene tal compuesto (esto es, mg/kg) o el peso de un compuesto, tal como el rebaudiósido V y/o el rebaudiósido W (en miligramos) por litro de un producto de consumo por vía oral de la presente divulgación que contiene tal compuesto (esto es, mg/L); o por volumen, por ejemplo, el volumen de un compuesto, tal como el rebaudiósido V y/o el rebaudiósido W (en mililitros) por litro de un producto de consumo por vía oral de la presente divulgación que contiene tal compuesto (esto es, ml/L).

30 La siguiente divulgación se refiere a diversos edulcorantes no calóricos y a métodos de síntesis de edulcorantes no calóricos. Sin embargo, la invención reivindicada debe entenderse por referencia a las presentes reivindicaciones.

Edulcorantes sintéticos no calóricos: Rebaudiósido V sintético

35 En un aspecto, la presente divulgación está dirigida a un edulcorante sintético no calórico. El edulcorante sintético no calórico es un glicósido de esteviol de tipo rebaudiósido sintético y se le ha dado el nombre de "Rebaudiósido V". El rebaudiósido V ("Reb V") es un glicósido de esteviol que tiene cuatro unidades de β -D-glucosilo en su estructura conectada a la aglicona esteviol, una unidad estructural de esteviol aglicona con una unidad Glc β 1-3-Glc β 1 en C-13 en la forma del enlace éter y otra unidad Glc β 1-2-Glc β 1 en la posición C-19 en forma de un enlace éter.

El rebaudiósido V tiene la fórmula molecular $C_{44}H_{70}O_{23}$ y el nombre IUPAC, éster (2-O- β -D-glucopiranosil- β -D-glucopiranosilo) del ácido 13-[(3-O- β -D-glucopiranosil- β -D-glucopiranosil)oxi] ent-kaur-16-en-19-oico sobre la base de RMN 1D y 2D extensa, así como datos de espectros de masas de alta resolución y estudios de hidrólisis.

40 Edulcorantes sintéticos no calóricos: Rebaudiósido sintético W

45 En un aspecto, la presente divulgación está dirigida a un edulcorante sintético no calórico. El edulcorante sintético no calórico es un glicósido de esteviol de tipo rebaudiósido sintético y se le ha dado el nombre de "Rebaudiósido W". El rebaudiósido W ("Reb W") es un glicósido de esteviol que tiene cinco unidades de β -D-glucosilo en su estructura conectada al aglicona esteviol, una unidad estructural de esteviol aglicona con una unidad Glc β 1-3-Glc β 1 en C-13 en la forma del enlace éter y una unidad Glc β 1-2 (Glc β 1-3) -Glc β 1 en la posición C-19 en forma de un enlace éter.

El rebaudiósido W tiene la fórmula molecular $C_{50}H_{80}O_{28}$ y el nombre IUPAC, éster [(2-O- β -D-glucopiranosil-3-O- β -D-glucopiranosil- β -D-glucopiranosilo) del ácido 13-[(3-O- β -D-glucopiranosil- β -D-glucopiranosil)oxi]ent-kaur-16-en-19-oico.

Edulcorantes sintéticos no calóricos: Rebaudiósido sintético KA

50 En un aspecto, la presente divulgación está dirigida a un edulcorante sintético no calórico. El edulcorante sintético no calórico es un glicósido de esteviol de tipo rebaudiósido sintético y se le ha dado el nombre de "Rebaudiósido KA". El rebaudiósido KA ("Reb KA") es un glicósido de esteviol que tiene tres unidades β -D-glucosilo en su estructura conectada al aglicona esteviol, una unidad estructural de esteviol aglicona con una unidad Glc β 1 en C-13 en forma de enlace éter y una unidad Glc β 1-2-Glc β 1 en C-19 en forma de enlace éter. El rebaudiósido KA tiene la fórmula molecular $C_{38}H_{60}O_{18}$

y el nombre IUPAC, éster (2-O-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosilo) del ácido 13-β-D-glucopiranosiloxi] ent-kaur-16-en-19-oico sobre la base de la RMN 1D y 2D extensa, así como los datos de espectros de masas de alta resolución y los estudios de hidrólisis.

Edulcorantes sintéticos no calóricos: Rebaudiósido sintético G

- 5 En un aspecto, la presente divulgación está dirigida a un edulcorante sintético no calórico. El edulcorante sintético no calórico es un glicósido de esteviol de tipo rebaudiósido sintético y se le ha dado el nombre de "Rebaudiósido G". Rebaudiósido G ("Reb G") es un glicósido de esteviol que tiene tres unidades de β-D-glucosilo en su estructura conectada a la aglicona esteviol, una unidad estructural de esteviol aglicona con una unidad Glc β1-3-Glc β1 en C-13 en forma de enlace éter y una unidad Glc β1 en C-19 en forma de enlace éter.
- 10 El rebaudiósido G tiene la fórmula molecular $C_{38}H_{60}O_{18}$ y el nombre IUPAC, éster -β-D-glucopiranosilo del ácido 13-[(3-O-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil)oxi] ent-kaur-16-en-19-oico sobre la base de RMN 1D y 2D extensa, así como los datos de espectros de masas de alta resolución y estudios de hidrólisis.

Edulcorantes sintéticos no calóricos: Rebaudiósido sintético M

- 15 En un aspecto, la presente divulgación está dirigida a un edulcorante sintético no calórico. El edulcorante sintético no calórico es un glicósido de esteviol de tipo rebaudiósido sintético y se le ha dado el nombre de "Rebaudiósido M". El rebaudiósido M ("Reb M") es un glicósido de esteviol que tiene seis unidades de β-D-glucosilo en su estructura conectada al aglicona esteviol, una unidad estructural de esteviol aglicona con una unidad Glc β1-2 (Glc β1-3) -Glc β1 en la posición C-13 en forma de un enlace éter y una unidad Glc β1-2 (Glc β1-3) -Glc1 en la posición C-19 en forma de un enlace éter.
- 20 El rebaudiósido M tiene la fórmula molecular $C_{56}H_{90}O_{33}$ y el nombre IUPAC, éster [(2-O-β-D-glucopiranosil-3-O-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosilo) del ácido 13-[(2-O-β-D-glucopiranosil-3-O-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil)oxi] ent-kaur-16-en-19-oico sobre la base de RMN 1D y 2D extensa también como datos de espectros de masas de alta resolución y estudios de hidrólisis.

Métodos para sintetizar glicósidos de esteviol

- 25 Método de producción de rebaudiósido V a partir de rebaudiósido G. En otro aspecto, la presente divulgación se dirige a un método de síntesis de rebaudiósido V a partir de rebaudiósido G. El método comprende preparar una mezcla de reacción que comprende rebaudiósido G; sustratos seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP) y uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa); y una HV1 UDP-glicosiltransferasa; con o sin sacarosa sintasa (SUS) e incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido V, en el que una glucosa se acopla covalentemente al rebaudiósido G para producir el rebaudiósido V.
- 30

- Método de producción de rebaudiósido V a partir de rebaudiósido G. En otro aspecto, la presente divulgación se dirige a un método de síntesis de rebaudiósido V a partir de rebaudiósido G. El método comprende preparar una mezcla de reacción que comprende rebaudiósido G; sustratos seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP) y uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa); una uridina difosfato glicosiltransferasa (UDP-glicosiltransferasa) seleccionada del grupo que consiste en una EUGT11, una enzima de fusión UDP-glicosiltransferasa-sacarosa sintasa (SUS); con o sin sacarosa sintasa (SUS) e incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido V, en el que una glucosa se acopla covalentemente al rebaudiósido G para producir el rebaudiósido V.
- 35

- Método de producción de rebaudiósido V a partir de rebaudiósido KA. En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un método de síntesis de rebaudiósido V a partir de rebaudiósido KA. El método comprende preparar una mezcla de reacción que comprende rebaudiósido KA; sustratos seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP) y uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa); una uridina difosfo glicosiltransferasas (UDP-glicosiltransferasa) seleccionada del grupo que consiste en una UDP-glicosiltransferasa (UGT76G1) y una enzima de fusión UDP-glicosiltransferasa-sacarosa sintasa; con o sin sacarosa sintasa (SUS) e incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido V, en el que una glucosa se acopla covalentemente al rebaudiósido KA para producir el rebaudiósido V.
- 40
- 45

- Método de producción de rebaudiósido V a partir de rubusósido. En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un método de síntesis de rebaudiósido V a partir de rubusósido. El método comprende preparar una mezcla de reacción que comprende rubusósido; sustratos seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP) y uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa); uridina difosfato glicosiltransferasa (s) (UDP-glicosiltransferasa) seleccionada del grupo que consiste en una UDP-glicosiltransferasa (UGT76G1), HV1 y una enzima de fusión UDP-glicosiltransferasa-sacarosa sintasa; con o sin sacarosa sintasa (SUS) e incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido V, en el que una glucosa se acopla covalentemente al rubusósido para producir el rebaudiósido KA. Continuamente, una glucosa se acopla covalentemente al rebaudiósido KA para producir el rebaudiósido V.
- 50

Método de producción de rebaudiósido V de rubusósido. En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un método de síntesis de una mezcla de rebaudiósido A y rebaudiósido V a partir de rubusósido. El método comprende preparar una mezcla de reacción que comprende rubusósido; sustratos seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP) y uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa); uridina difosfato glicosiltransferasa (s) (UDP-glicosiltransferasa) seleccionada del grupo que consiste en una UDP-glicosiltransferasa (UGT76G1), EUGT11 y una enzima de fusión UDP-glicosiltransferasa-sacarosa sintasa; con o sin sacarosa sintasa; e incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido V, en el que una glucosa se acopla covalentemente al rebaudiósido KA para producir el rebaudiósido V. Una glucosa se acopla covalentemente al rebaudiósido para producir el rebaudiósido G. Continuamente, una glucosa se acopla covalentemente al rebaudiósido G para producir el rebaudiósido V.

Método de producción de rebaudiósido W a partir de rebaudiósido V. En otro aspecto, la presente divulgación se dirige a un método de síntesis de rebaudiósido W a partir de rebaudiósido V. El método comprende preparar una mezcla de reacción que comprende rebaudiósido V; sustratos seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP) y uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa); una uridina difosfato glicosiltransferasa (UDP-glicosiltransferasa) seleccionada del grupo que consiste en una UDP-glicosiltransferasa (UGT76G1) y una enzima de fusión UDP-glicosiltransferasa-sacarosa sintasa; con o sin sacarosa sintasa e incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido W, en el que una glucosa se acopla covalentemente al rebaudiósido V para producir el rebaudiósido W.

Método de producción de rebaudiósido W a partir de rebaudiósido G. En otro aspecto, la presente divulgación se dirige a un método de síntesis de rebaudiósido W a partir de rebaudiósido G. El método comprende preparar una mezcla de reacción que comprende rebaudiósido G; sustratos seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP) y uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa); una uridina difosfo glicosiltransferasa (UDP-glicosiltransferasa) seleccionada entre el grupo que consiste en una uridina difosfo glicosiltransferasa (UGT76G1), una enzima de fusión UDP-glicosiltransferasa-sacarosa sintasa y un HV1; con o sin sacarosa sintasa; e incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido W, en el que una glucosa se acopla covalentemente al rebaudiósido G para producir el rebaudiósido V por HV1. Continuamente, una glucosa se acopla covalentemente al rebaudiósido V para producir el rebaudiósido W por UGT76G1.

Método de producción de rebaudiósido W a partir de rebaudiósido G. En otro aspecto, la presente divulgación se dirige a un método de síntesis de rebaudiósido W a partir de rebaudiósido G. El método comprende preparar una mezcla de reacción que comprende rebaudiósido G; sustratos seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP) y uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa); una uridina difosfo glicosiltransferasa (UDP-glicosiltransferasa) seleccionada del grupo que consiste en una enzima de fusión UGT76G1, una EUGT11 y una UDP-glicosiltransferasa-sacarosa sintasa; e incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido W, en el que una glucosa se acopla covalentemente al rebaudiósido G para producir el rebaudiósido V por EUGT11. Continuamente, una glucosa se acopla covalentemente al rebaudiósido V para producir el rebaudiósido W por UGT76G1.

Método de producción de rebaudiósido W a partir de rebaudiósido KA. En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un método de síntesis de rebaudiósido W a partir de rebaudiósido KA. El método comprende preparar una mezcla de reacción que comprende rebaudiósido KA; sustratos seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP) y uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa); una uridina difosfo glicosiltransferasa (UDP-glicosiltransferasa) seleccionada del grupo que consiste en una uridina difosfo glicosiltransferasa (UGT76G1), y una enzima de fusión UDP-glicosiltransferasa-sacarosa sintasa; con o sin sacarosa sintasa; e incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido W, en el que una glucosa se acopla covalentemente al rebaudiósido KA para producir el rebaudiósido V. Continuamente, una glucosa se acopla covalentemente al rebaudiósido V para producir el rebaudiósido W.

Método de producción de rebaudiósido W a partir de rubusósido. En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un método de síntesis de rebaudiósido W a partir de rubusósido. El método comprende preparar una mezcla de reacción que comprende rubusósido; sustratos seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP) y uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa); uridina difosfo glicosiltransferasas seleccionadas del grupo que consiste en una enzima de fusión UGT76G1, HV1 y UDP-glicosiltransferasa-sacarosa sintasa; con o sin sacarosa sintasa e incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir una mezcla de rebaudiósido W.

Método de producción de rebaudiósido W a partir de rubusósido. En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un método de síntesis de rebaudiósido W a partir de rubusósido. El método comprende preparar una mezcla de reacción que comprende rubusósido; sustratos seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP) y uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa); uridina difosfo glicosiltransferasas seleccionadas del grupo que consiste en una enzima de fusión UGT76G1, EUGT11 y una UDP-glicosiltransferasa-sacarosa sintasa; con o sin sacarosa sintasa e incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido W.

Método de producción de una mezcla de estaviósido y rebaudiósido KA a partir de rubusósido. En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un método de síntesis de una mezcla de esteviósido y rebaudiósido KA a partir de rubusósido. El método comprende preparar una mezcla de reacción que comprende rubusósido; sustratos

5 seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP) y uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa); una UDP-glicosiltransferasa seleccionada del grupo que consiste en una enzima de fusión EUGT11 y UDP-glicosiltransferasa-sacarosa sintasa; con o sin sacarosa sintasa; e incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir una mezcla de esteviósido y rebaudiósido KA, en el que una glucosa se acopla covalentemente a C2'-19-O-glucosa de rubusósido para producir el rebaudiósido KA; una glucosa se acopla de manera covalente a C2'-13-O-glucosa de rubusósido para producir el esteviósido.

10 Método de producción de rebaudiósido KA a partir de rubusósido. En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un método de síntesis de un rebaudiósido KA a partir de rubusósido. El método comprende preparar una mezcla de reacción que comprende rubusósido; sustratos seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP) y uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa); y HV1 UDP-glicosiltransferasa; con o sin sacarosa sintasa; e incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido KA, en el que una glucosa se acopla covalentemente a la C2'-19-O-glucosa de rubusósido para producir un rebaudiósido KA.

15 Método de producción de rebaudiósido G a partir de rubusósido. En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un método de síntesis de un rebaudiósido G a partir de rubusósido. El método comprende preparar una mezcla de reacción que comprende rubusósido; sustratos seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP) y uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa); una UDP-glicosiltransferasa seleccionada del grupo que consiste en UGT76G1 y una enzima de fusión UDP-glicosiltransferasa-sacarosa sintasa; con o sin sacarosa sintasa; e incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido G, en el que una glucosa se acopla covalentemente a la C3'-13-O-glucosa de rubusósido para producir un rebaudiósido G.

20 Método de producción de rebaudiósido E a partir de rebaudiósido KA. En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un método de síntesis de rebaudiósido E a partir de rebaudiósido KA. El método comprende preparar una mezcla de reacción que comprende rebaudiósido KA; sustratos seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP) y uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa); y HV1 UDP-glicosiltransferasa; con o sin sacarosa sintasa; e incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido E, en el que una glucosa se acopla covalentemente a las C2'13-O-glucosa del rebaudiósido KA para producir el rebaudiósido E.

25 Método de producción de rebaudiósido E a partir de rebaudiósido KA. En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un método de síntesis de rebaudiósido E a partir de rebaudiósido KA. El método comprende preparar una mezcla de reacción que comprende rebaudiósido KA; sustratos seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP) y uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa); una UDP-glicosiltransferasa de un grupo de EUGT11 y una enzima de fusión UDP-glicosiltransferasa-sacarosa sintasa; con o sin sacarosa sintasa; e incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido E, en el que una glucosa se acopla covalentemente al C2' 13-O-glucosa del rebaudiósido KA para producir el rebaudiósido E.

30 Método de producción de rebaudiósido E a partir de rubusósido. En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un método de síntesis de rebaudiósido E a partir de rubusósido. El método comprende preparar una mezcla de reacción que comprende rubusósido; un sustrato seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP) y uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa); y una UDP-glicosiltransferasa del grupo de EUGT11 y una enzima de fusión de UDP-glicosiltransferasa-sacarosa sintasa; con o sin sacarosa sintasa; incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido E, en el que una glucosa se acopla covalentemente a rubusósido para producir una mezcla de rebaudiósido KA y esteviósido. Continuamente, una glucosa se acopla covalentemente al rebaudiósido KA y al esteviósido para producir el rebaudiósido E.

35 Método de producción de rebaudiósido E a partir de rubusósido. En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un método de síntesis de rebaudiósido E a partir de rubusósido. El método comprende preparar una mezcla de reacción que comprende rubusósido; sustratos seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP) y uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa); y HV1 UDP-glicosiltransferasa; con o sin sacarosa sintasa; incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido E, en el que una glucosa se acopla covalentemente al rubusósido para producir el rebaudiósido KA; e incubar adicionalmente el rebaudiósido KA con HV1 para producir el rebaudiósido E.

40 Método de producción de rebaudiósido D2 a partir de rubusósido. En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un método de síntesis de rebaudiósido D2 a partir de rubusósido. El método comprende preparar una mezcla de reacción que comprende rubusósido; sustratos seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP) y uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa); una UDP-glicosiltransferasa del grupo de EUGT11 y una enzima de fusión de UDP-glicosiltransferasa-sacarosa sintasa; con o sin sacarosa sintasa; incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido D2, en el que una glucosa se acopla covalentemente al rubusósido para producir una mezcla de esteviósido y rebaudiósido KA; incubar adicionalmente la mezcla de esteviósido y rebaudiósido KA con EUGT11 para producir el rebaudiósido E, en el que una glucosa está acoplada covalentemente al esteviósido y el rebaudiósido KA para producir el rebaudiósido E; e incubar adicionalmente el rebaudiósido E con EUGT11 para producir el rebaudiósido D2, en el que una glucosa se acopla covalentemente al rebaudiósido E para producir el rebaudiósido D2.

Método de producción de rebaudiósido D2 a partir de rebaudiósido KA. En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un método de síntesis de rebaudiósido D2 a partir de rebaudiósido KA. El método incluye la preparación de una mezcla de reacción que comprende rebaudiósido KA, sustratos seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP) y uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa), una UDP-glicosiltransferasa seleccionada del grupo que consiste en un EUGT11 y una enzima de fusión UDP-glicosiltransferasa-sacarosa sintasa, con o sin sacarosa sintasa; incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido D2, en el que una glucosa se acopla covalentemente al rebaudiósido KA para producir el rebaudiósido E; incubar adicionalmente la mezcla de rebaudiósido E con EUGT11 para producir el rebaudiósido D2, en el que una glucosa se acopla covalentemente al rebaudiósido E para producir el rebaudiósido D2.

Método de producción de rebaudiósido Z a partir de rebaudiósido E. En otro aspecto, la presente divulgación se dirige a un método de síntesis de rebaudiósido Z a partir de rebaudiósido E. El método comprende preparar una mezcla de reacción que comprende rebaudiósido E; sustratos seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP) y uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa); y HV1 UDP-glicosiltransferasa; y sacarosa sintasa, incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido Z, en el que una glucosa se acopla covalentemente al rebaudiósido E para producir el rebaudiósido Z, en el que una glucosa se acopla covalentemente a la C2'-13-O-glucosa del rebaudiósido E para producir el rebaudiósido Z1. Una glucosa se acopla de manera covalente a C2'-19-O-glucosa del rebaudiósido E para producir el rebaudiósido Z2.

Método de producción de rebaudiósido M a partir de rebaudiósido D. En otro aspecto, la presente divulgación se dirige a un método de síntesis de rebaudiósido M a partir de rebaudiósido D. El método incluye la preparación de una mezcla de reacción que comprende rebaudiósido D, sustratos seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP), uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa) y combinaciones de los mismos, y una UDP-glicosiltransferasa seleccionada del grupo que consiste en UGT76G1, una enzima de fusión UDP-glicosiltransferasa-sacarosa sintasa, y combinaciones de los mismos, con o sin sacarosa sintasa; e incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido M, en el que una glucosa se acopla covalentemente al rebaudiósido D para producir el rebaudiósido M.

Método de producción de rebaudiósido D y rebaudiósido M a partir de esteviósido. En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un método de síntesis de rebaudiósido D y rebaudiósido M a partir de esteviósido. El método incluye la preparación de una mezcla de reacción que comprende esteviósido, sustratos seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP), uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa) y combinaciones de los mismos, y una UDP-glicosiltransferasa seleccionada del grupo que consiste en HV1, UGT76G1, una enzima de fusión UDP-glicosiltransferasa-sacarosa sintasa, y combinaciones de los mismos, con o sin sacarosa sintasa; e incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido D y/o rebaudiósido M. Por ejemplo, en realizaciones, la mezcla de reacción se puede incubar durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido D, y la mezcla de reacción que comprende el rebaudiósido D se incuba adicionalmente (por ejemplo, con UGT76G1 y/o la enzima de fusión) para producir el rebaudiósido M. En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción comprenderá HV1 y UGT76G1. En otras realizaciones, la mezcla de reacción comprenderá HV1 y la enzima de fusión.

En ciertas realizaciones, una glucosa se acopla covalentemente al esteviósido para producir el rebaudiósido A y/o rebaudiósido E. Por ejemplo, una glucosa se puede acoplar covalentemente al esteviósido mediante UGT76G1 o la enzima de fusión para producir el rebaudiósido A y/o una glucosa se puede acoplar covalentemente al esteviósido por HV1 para producir el rebaudiósido E. Continuamente, una glucosa se puede acoplar covalentemente al rebaudiósido A por HV1 para producir el rebaudiósido D y/o una glucosa se puede acoplar covalentemente al rebaudiósido E mediante UGT76G1 o la enzima de fusión para producir el rebaudiósido D. Una glucosa puede además ser acoplada covalentemente al rebaudiósido D mediante UGT76G1 o la enzima de fusión para producir el rebaudiósido M.

Método de producción de rebaudiósido D y rebaudiósido M a partir de rebaudiósido A. En otro aspecto, la presente divulgación se dirige a un método de síntesis de rebaudiósido D y rebaudiósido M a partir de rebaudiósido A. El método incluye la preparación de una mezcla de reacción que comprende rebaudiósido A, sustratos seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP), uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa) y combinaciones de los mismos, y una UDP-glicosiltransferasa seleccionada del grupo que consiste en HV1, UGT76G1, una enzima de fusión UDP-glicosiltransferasa-sacarosa sintasa, y combinaciones de las mismas, con o sin sacarosa sintasa; e incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido D y/o rebaudiósido M. Por ejemplo, en realizaciones, la mezcla de reacción (por ejemplo, que comprende HV1) puede incubarse durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido D, y la mezcla de reacción que comprende rebaudiósido D incubado adicionalmente (por ejemplo, con UGT76G1 y/o la enzima de fusión) para producir el rebaudiósido M. En ciertas realizaciones, la mezcla de reacción comprenderá HV1 y UGT76G1. En otras realizaciones, la mezcla de reacción comprenderá HV1 y la enzima de fusión.

Una glucosa se acopla covalentemente al rebaudiósido A para producir el rebaudiósido D. Por ejemplo, una glucosa se puede acoplar covalentemente al rebaudiósido A por HV1 para producir el rebaudiósido D. Continuamente, una glucosa se puede acoplar covalentemente al rebaudiósido D mediante UGT76G1 o la enzima de fusión para producir el rebaudiósido M.

Método de producción de rebaudiósido D y rebaudiósido M a partir de rebaudiósido E. En otro aspecto, la presente divulgación se dirige a un método de síntesis de rebaudiósido D y rebaudiósido M a partir de rebaudiósido E. El método incluye la preparación de una mezcla de reacción que comprende rebaudiósido E, sustratos seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP), uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa), y combinaciones de los mismos, y una UDP-glicosiltransferasa seleccionada del grupo que consiste en una UGT76G1, una fusión UDP-glicosiltransferasa-sacarosa sintasa enzima, y combinaciones de los mismos, con o sin sacarosa sintasa; e incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido D y/o rebaudiósido M. Por ejemplo, en realizaciones, la mezcla de reacción (por ejemplo, que comprende UGT76G1 y/o la enzima de fusión) puede incubarse durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido D, y la mezcla de reacción que comprende rebaudiósido D se incubaba más para producir el rebaudiósido M.

Una glucosa se acopla covalentemente al rebaudiósido E para producir el rebaudiósido D. Por ejemplo, una glucosa se puede acoplar covalentemente al rebaudiósido E mediante UGT76G1 o la enzima de fusión para producir el rebaudiósido D. Continuamente, una glucosa se puede acoplar covalentemente el rebaudiósido D por UGT76G1 o la enzima de fusión para producir el rebaudiósido M.

La mayoría de los glicósidos de esteviol están formados por varias reacciones de glicosilación de esteviol, que por lo general son catalizadas por las UDP-glicosiltransferasas (UGT) usando uridina 5'-difosfoglucosa (UDP-glucosa) como un donante de la unidad estructural de azúcar. En las plantas, las UGT son un grupo de enzimas muy divergentes que transfieren un residuo de glucosa de UDP-glucosa a esteviol.

La uridina difosfo glicosiltransferasa (UGT76G1) es una UGT con una actividad de glicosilación de 1,3-13-O-glucosa para producir un glicósido relacionado (rebaudiósido A y D). Sorprendente e inesperadamente, se descubrió que UGT76G1 también tiene actividad de glicosilación de 1,3-19-O-glucosa para producir el rebaudiósido G a partir de rubusósido, y para producir el rebaudiósido M a partir de rebaudiósido D. UGT76G1 puede convertir el rebaudiósido KA a Reb V y continuar para formar Reb W. Una UGT76G1 particularmente apropiado tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1.

La EUGT11 (descrita en el documento WO 2013022989) es una UGT que tiene actividad de glicosilación de 1,2-19-O-glucosa y 1,2-13-O-glucosa. Se sabe que EUGT11 cataliza la producción de esteviósido para rebaudiósido E y rebaudiósido A para rebaudiósido D. Sorprendente e inesperadamente, se descubrió que EUGT11 se puede usar in vitro para sintetizar rebaudiósido D2 a partir de rebaudiósido E por una nueva actividad enzimática (actividad de glicosilación de β 1,6 -13-O-glucosa) (Solicitud de Patente de EE. UU. No. de Serie 14/269,435, asignada a Conagen, Inc.). EUGT11 tiene actividad de glicosilación de 1,2-19-O-glucosa para producir el rebaudiósido KA a partir de rubusósido. Un EUGT11 particularmente apropiado tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

HV1 es un UGT con una actividad de glicosilación de 1,2-19-O-glucosa para producir glicósidos de esteviol relacionados (rebaudiósido E, D y Z). Sorprendente e inesperadamente, se descubrió que HV1 también tiene actividad de glicosilación de 1,2-19-O-glucosa para producir el rebaudiósido KA a partir de rubusósido. HV1 también puede convertir Reb G en Reb V y Reb KA en Reb E. Un HV1 particularmente apropiado tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5.

El método puede incluir además añadir una sacarosa sintasa a la mezcla de reacción que contiene la uridina difosfo (UDP) glicosiltransferasa. La sacarosa sintasa cataliza la reacción química entre NDP-glucosa y D-fructosa para producir NDP y sacarosa. La sacarosa sintasa es una glicosiltransferasa. El nombre sistemático de esta clase de enzimas es NDP-glucosa: D-fructosa 2-alfa-D-glicosiltransferasa. Otros nombres de uso común incluyen la UDP glucosafructosa glicosiltransferasa, sacarosa sintasa, sacarosa-UDP glicosiltransferasa, la sacarosa-uridina difosfato glicosiltransferasa, y uridina difosfoglucosa-fructosa glicosiltransferasa. La adición de la sacarosa sintasa a la mezcla de reacción que incluye una uridina difosfoglicosiltransferasa crea un "sistema de acoplamiento UGT-SUS". En el sistema de acoplamiento UGT-SUS, la UDP-glucosa se puede regenerar a partir de UDP y sacarosa, lo que permite omitir la adición de UDP-glucosa extra a la mezcla de reacción o usar UDP en la mezcla de reacción. La sacarosa sintasa apropiada puede ser, por ejemplo, una sacarosa sintasa 1 de *Arabidopsis*; una sacarosa sintasa 3 de *Arabidopsis*; y una sacarosa sintasa de *Vigna radiata*. Una sacarosa sintasa particularmente apropiada puede ser, por ejemplo, sacarosa sintasa 1 de *Arabidopsis*. Una sacarosa sintasa 1 de *Arabidopsis* es la sacarosa sintasa 1 de *Arabidopsis thaliana* (AtSUS1), que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.

En otro aspecto, la enzima de fusión uridina difosfo glicosiltransferasa se puede usar en los métodos. Una enzima de fusión de uridina difosfo glicosiltransferasa particularmente apropiada puede ser una enzima de fusión UGT-SUS 1. La UDP-glicosiltransferasa puede ser una enzima de fusión UDP-glicosiltransferasa que incluye un dominio de uridina difosfoglicosiltransferasa acoplado a un dominio de sacarosa sintasa. En particular, la enzima de fusión UDP-glicosiltransferasa incluye un dominio de uridina difosfo glicosiltransferasa acoplado a un dominio de sacarosa sintasa. Adicionalmente, la enzima de fusión UGT-SUS1 tiene actividad de sacarosa sintasa y, de este modo, puede regenerar UDP-glucosa a partir de UDP y sacarosa. Una enzima de fusión UGT-SUS1 particularmente apropiada puede ser, por ejemplo, una enzima de fusión UGT76G1-AtSUS1 (denominada como "GS") que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9. Otra enzima de fusión UGT-SUS1 particularmente apropiada puede ser, por ejemplo, una EUGT11-SUS1 (denominada como "EUS") que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:11.

Los dominios de sacarosa sintasa apropiados pueden ser, por ejemplo, una sacarosa sintasa 1 de *Arabidopsis*; una sacarosa sintasa 3 de *Arabidopsis*; y una sacarosa sintasa de *Vigna radiata*. Un dominio de sacarosa sintasa particularmente apropiado puede ser, por ejemplo, sacarosa sintasa 1 de *Arabidopsis* sacarosa. Una sacarosa sintasa de *Arabidopsis* particularmente apropiada es la sacarosa sintasa 1 de *Arabidopsis thaliana* (AtSUS1), que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.

La enzima de fusión UGT76G1-AtSUS1 ("GS") puede tener una secuencia de polipéptidos con al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% e incluso 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:9. Adecuadamente, la secuencia de aminoácidos de la enzima de fusión de UGT-AtSUS1 tiene al menos 80% de identidad a la SEQ ID NO:9. Más adecuadamente, la secuencia de aminoácidos de la enzima de fusión de UGT-AtSUS1 tiene al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, e incluso 100% de identidad de la secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:9.

El ácido nucleico aislado puede incluir una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la enzima de fusión UGT-AtSUS1 que tiene una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, e incluso 100% de homología de la secuencia a la secuencia del ácido nucleico establecida en la SEQ ID NO:10. Adecuadamente, el ácido nucleico aislado incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la enzima de fusión UDP-glicosiltransferasa que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 9. Más adecuadamente, el ácido nucleico aislado incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la enzima de fusión UDP-glicosiltransferasa que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, e incluso 100% de identidad de la secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:9. El ácido nucleico aislado incluye, de este modo, aquellas secuencias de nucleótidos que codifican fragmentos funcionales de la SEQ ID NO:10, variantes funcionales de la SEQ ID NO: 9 u otros polipéptidos homólogos que tienen, por ejemplo, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, e incluso 100% de identidad de la secuencia con SEQ ID NO:9. Como saben los expertos en el arte, la secuencia de ácido nucleico que codifica la UDP glicosiltransferasa se puede optimizar en codones para la expresión en un organismo huésped apropiado tal como, por ejemplo, bacterias y levaduras.

La enzima de fusión EUGT11-SUS1 ("EUS") puede tener una secuencia de polipéptidos con al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% e incluso 100% idéntica a la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:11. Adecuadamente, la secuencia de aminoácidos de la enzima de fusión EUGT11-SUS1 tiene al menos 80% de identidad a la SEQ ID NO:11. Más adecuadamente, la secuencia de aminoácidos de la enzima de fusión EUGT11-SUS1 tiene al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, e incluso 100% de identidad de la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:11.

El ácido nucleico aislado puede incluir una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la enzima de fusión EUGT11-SUS1 que tiene una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, e incluso 100% de homología de la secuencia a la secuencia del ácido nucleico establecida en SEQ ID NO:12. Adecuadamente, el ácido nucleico aislado incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la enzima de fusión EUGT11-SUS1 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80% de identidad de la secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:11. Más adecuadamente, el ácido nucleico aislado incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la enzima de fusión EUGT11-SUS1 que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, e incluso 100% de identidad de la secuencia con la secuencia de aminoácidos establecida en SEQ ID NO:11. El ácido nucleico aislado, de este modo, incluye aquellas secuencias de nucleótidos que codifican fragmentos funcionales de la SEQ ID NO:11, variantes funcionales de la SEQ ID NO:11 u otros polipéptidos homólogos que tienen, por ejemplo, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, e incluso 100% de identidad de la secuencia con SEQ ID NO:11. Como saben los expertos en el arte, la secuencia de ácido nucleico que codifica el EUGT11-SUS1 se puede optimizar en codones para la expresión en un organismo huésped apropiado tal como, por ejemplo, bacterias y levaduras.

Productos de consumo por vía oral

En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un producto de consumo por vía oral que tiene una cantidad edulcorante de rebaudiósido V, seleccionado del grupo que consiste en un producto de bebida y un producto de consumo. En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un producto de consumo por vía oral que tiene una

5 cantidad edulcorante de rebaudiósido W, seleccionado del grupo que consiste en un producto de bebida y un producto de consumo. En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un producto de consumo por vía oral que tiene una cantidad edulcorante de rebaudiósido KA, seleccionado del grupo que consiste en un producto de bebida y un producto de consumo. En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un producto de consumo por vía oral que tiene una cantidad edulcorante de rebaudiósido G, seleccionado del grupo que consiste en un producto de bebida y un producto de consumo. En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un producto de consumo por vía oral que tiene una cantidad edulcorante de rebaudiósido M, seleccionado del grupo que consiste en un producto de bebida y un producto de consumo.

10 El producto de consumo por vía oral puede tener una intensidad de dulzor equivalente a aproximadamente 1% (% p/v) a aproximadamente 4% (% p/v) de solución de sacarosa.

15 El producto de consumo por vía oral puede tener desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm rebaudiósido V. El producto de consumo por vía oral puede tener desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm rebaudiósido W. El producto de consumo por vía oral puede tener desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm rebaudiósido KA. El producto de consumo por vía oral puede tener desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm rebaudiósido G. El producto de consumo por vía oral puede tener desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm rebaudiósido M.

20 El rebaudiósido V puede ser el único edulcorante en el producto de consumo por vía oral. El rebaudiósido W puede ser el único edulcorante en el producto de consumo por vía oral. El rebaudiósido KA puede ser el único edulcorante en el producto de consumo por vía oral. El rebaudiósido G puede ser el único edulcorante en el producto de consumo por vía oral. El rebaudiósido M puede ser el único edulcorante en el producto de consumo por vía oral.

25 El producto de consumo por vía oral también puede tener al menos un edulcorante adicional. El al menos un edulcorante adicional puede ser un edulcorante natural de alta intensidad, por ejemplo. El edulcorante adicional se puede seleccionar entre un extracto de stevia, un glicósido de esteviol, esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido D2, rebaudiósido E, rebaudiósido F, dulcósido A, rubusósido, esteviolbósido, sacarosa, jarabe de maíz de alta fructosa, fructosa, glucosa, xilosa, arabinosa, ramnosa, eritritol, xilitol, manitol, sorbitol, inositol, AceK, aspartame, neotame, sucralosa, sacarina, naringina dihidrocalcona (NarDHC), neohesperidina dihidrocalcona (NDHC), rubusósido, mogrósido IV, siamenósido I, mogrósido V, monatin, taumatin, monellin, brazzein, L-alanina, glicina, Lo Han Guo, hernandulcina, filodulcina, trilobtain, y combinaciones de los mismos.

30 El producto de consumo por vía oral también puede tener al menos un aditivo. El aditivo puede ser, por ejemplo, un carbohidrato, un poliol, un aminoácido o una sal del mismo, un poliaminoácido o sal del mismo, un ácido de azúcar o una sal del mismo, un nucleótido, un ácido orgánico, un ácido inorgánico, una sal orgánica, una sal de ácido orgánico, una sal de base orgánica, una sal inorgánica, un compuesto amargo, un saborizante, un ingrediente aromatizante, un compuesto astringente, una proteína, un hidrolizado de proteínas, un surfactante, un emulsionante, un flavonoide, un alcohol, un polímero, y combinaciones de los mismos.

35 En un aspecto, la presente divulgación se dirige a un producto de bebida que comprende una cantidad edulcorante de rebaudiósido V. En un aspecto, la presente divulgación se dirige a un producto de bebida que comprende una cantidad edulcorante de rebaudiósido W. En un aspecto, la presente divulgación está dirigida a un producto de bebida que comprende una cantidad edulcorante de rebaudiósido KA. En un aspecto, la presente divulgación se dirige a un producto de bebida que comprende una cantidad edulcorante de rebaudiósido G. En un aspecto, la presente divulgación se dirige a un producto de bebida que comprende una cantidad edulcorante de rebaudiósido M.

45 El producto de bebida puede ser, por ejemplo, un producto de bebida carbonatada y un producto de bebida no carbonatada. El producto de bebida también puede ser, por ejemplo, un refresco, una bebida de fuente, una bebida congelada y lista para tomar, café, té, una bebida láctea, un refresco en polvo, un concentrado líquido, agua aromatizada, agua mejorada, jugo de fruta, una bebida con sabor a zumo de frutas, una bebida deportiva y una bebida energética.

50 En algunas realizaciones, un producto de bebida de la presente divulgación puede incluir uno o más ingredientes de bebida tales como, por ejemplo, acidulantes, zumos de fruta y/o zumos de verduras, pulpa, etc., saborizantes, colorantes, conservantes, vitaminas, etc. minerales, electrolitos, eritritol, tagatosa, glicerina y dióxido de carbono. Tales productos de bebida se pueden proporcionare en cualquier forma apropiada, tal como un concentrado de bebida y una bebida carbonatada, lista para beber.

55 En ciertas realizaciones, los productos de bebida de la presente divulgación pueden tener cualquiera de las numerosas formulaciones o constituciones específicas diferentes. La formulación de un producto de bebida de la presente divulgación puede variar en cierta medida, dependiendo de factores tales como el segmento de mercado deseado del producto, sus características nutricionales deseadas, el perfil de sabor y similares. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, generalmente puede ser una opción añadir ingredientes adicionales a la formulación de un producto de bebida particular. Por ejemplo, se pueden añadir edulcorantes adicionales (esto es, más y/u otros), aromatizantes, electrolitos, vitaminas, zumos de frutas u otros productos de frutas, saborizantes, agentes de enmascaramiento y similares, potenciadores del sabor y/o carbonatación que por lo general se pueden añadir a cualquiera de tales formulaciones para

5 variar el sabor, la sensación en la boca, las características nutricionales, etc. En las realizaciones, el producto de bebida puede ser una bebida de cola que contiene agua, aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm de rebaudiósido V, un acidulante y aromatizante. En realizaciones, el producto de bebida puede ser una bebida de cola que contiene agua, aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm de rebaudiósido W, un acidulante y saborizante.

10 En realizaciones, el producto de bebida puede ser una bebida de cola que contiene agua, aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm de rebaudiósido M, un acidulante y saborizante. Los aromas de ejemplo pueden ser, por ejemplo, aromatizantes de cola, aromatizantes de cítricos y aromatizantes de especias. En algunas realizaciones, la carbonatación en forma de dióxido de carbono se puede añadir para la efervescencia. En otras realizaciones, se pueden añadir conservantes, dependiendo de los otros ingredientes, técnica de producción, vida útil deseada, etc. En ciertas realizaciones, se puede añadir cafeína. En algunas realizaciones, el producto de bebida puede ser una bebida carbonatada con sabor a cola, que contiene característicamente agua carbonatada, edulcorante, extracto de nuez de cola y/u otro saborizante, colorante de caramelo, uno o más ácidos, y opcionalmente otros ingredientes.

15 Las cantidades apropiadas de rebaudiósido V, rebaudiósido W, rebaudiósido KA, rebaudiósido M o rebaudiósido G presentes en el producto de bebida pueden ser, por ejemplo, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm. En algunas realizaciones, bajas concentraciones de rebaudiósido V, rebaudiósido W, rebaudiósido KA, rebaudiósido M o rebaudiósido G, por ejemplo, menos de 100 ppm, y tiene un dulzor equivalente a las soluciones de sacarosa que tienen concentraciones entre 10.000 ppm a 30.000 ppm. La concentración final que varía desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 95 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 90 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 85 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 80 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 75 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 70 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 65 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 60 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 55 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 50 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 45 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 40 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 35 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 30 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 25 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 20 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 15 ppm, o desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 10 ppm. Alternativamente, el rebaudiósido V o el rebaudiósido W pueden estar presentes en productos de bebidas de la presente divulgación a una concentración final que varía desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 15 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 25 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 30 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 35 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 45 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 55 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 60 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 65 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 70 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 75 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 80 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 85 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 90 ppm a aproximadamente 100 ppm, o desde aproximadamente 95 ppm a aproximadamente 100 ppm.

45 En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un consumible que comprende una cantidad edulcorante de rebaudiósido V. En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un consumible que comprende una cantidad edulcorante de rebaudiósido W. En otro aspecto, la presente divulgación se dirige a un consumible que comprende una cantidad edulcorante de rebaudiósido KA. En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un consumible que comprende una cantidad edulcorante de rebaudiósido G. En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un consumible que comprende una cantidad edulcorante de rebaudiósido M. El consumible puede ser, por ejemplo, un producto alimenticio, un nutraceutico, un producto farmacéutico, un suplemento dietético, una composición higiénica dental, una composición de gel comestible, un producto cosmético y un saborizante de mesa.

50 Como se usa en este documento, "suplemento (s) dietético (s)" se refiere a compuestos destinados a complementar la dieta y proporcionar nutrientes, tales como vitaminas, minerales, fibra, ácidos grasos, aminoácidos, etc., que pueden faltar o no se consumen en cantidades suficientes en una dieta. Se puede usar cualquier suplemento dietético apropiado conocido en la técnica. Ejemplos de suplementos dietéticos apropiados pueden ser, por ejemplo, nutrientes, vitaminas, minerales, fibra, ácidos grasos, hierbas, ingredientes botánicos, aminoácidos y metabolitos.

55 Como se usa en este documento, "nutraceutico (s)" se refiere a compuestos, que incluyen cualquier alimento o parte de un alimento que puede proporcionar beneficios medicinales o para la salud, incluida la prevención y/o el tratamiento de enfermedades o trastornos (por ejemplo, fatiga, insomnio, efectos del envejecimiento, pérdida de memoria, trastornos del estado de ánimo, enfermedades cardiovasculares y niveles altos de colesterol en la sangre, diabetes, osteoporosis, inflamación, trastornos autoinmunes, etc.). Se puede usar cualquier nutraceutico apropiado conocido en la técnica. En algunas realizaciones, los nutraceuticos se pueden usar como suplementos para alimentos y bebidas y como formulaciones farmacéuticas para aplicaciones enterales o parenterales que pueden ser formulaciones sólidas, tales como cápsulas o comprimidos, o formulaciones líquidas, tales como soluciones o suspensiones.

En algunas realizaciones, los suplementos dietéticos y nutracéuticos pueden contener hidrocoloides protectores (tales como gomas, proteínas, almidones modificados), aglutinantes, agentes formadores de película, agentes/materiales de encapsulación, materiales de pared/cubierta, compuestos de matriz, recubrimientos, emulsionantes, agentes con actividad de superficie, agentes solubilizantes (aceites, grasas, ceras, lecitinas, etc.), adsorbentes, portadores, rellenos, cocompuestos, agentes dispersantes, agentes humectantes, auxiliares de procesamiento (solventes), agentes de flujo, agentes enmascaradores del sabor, agentes de ponderación, agentes gelificantes, agentes formadores de gel, antioxidantes y antimicrobianos.

Como se usa en este documento, un "gel" se refiere a un sistema coloidal en el que una red de partículas abarca el volumen de un medio líquido. Aunque los geles se componen principalmente de líquidos y, de este modo, presentan densidades similares a los líquidos, los geles tienen la coherencia estructural de los sólidos debido a la red de partículas que abarca el medio líquido. Por esta razón, los geles generalmente parecen ser sólidos, materiales como gelatina. Los geles se pueden usar un número de aplicaciones. Por ejemplo, los geles se pueden usar en alimentos, pinturas y adhesivos. Los geles que se pueden comer se conocen como "composiciones de gel comestibles". Las composiciones de gel comestibles por lo general se consumen como bocadillos, como postres, como parte de los alimentos básicos, o junto con los alimentos básicos. Los ejemplos de composiciones de gel comestibles apropiadas pueden ser, por ejemplo, postres en gel, pudines, mermeladas, jaleas, pastas, bagatelas, aspics, malvaviscos, caramelos de goma y similares. En algunas realizaciones, las mezclas de gel comestibles generalmente son sólidos en polvo o granulares a los que se puede añadir un fluido para formar una composición de gel comestible. Los ejemplos de fluidos apropiados pueden ser, por ejemplo, agua, fluidos lácteos, fluidos análogos a lácteos, jugos, alcohol, bebidas alcohólicas y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de fluidos lácteos apropiados pueden ser, por ejemplo, leche, leche cultivada, nata, suero líquido y mezclas de los mismos. Los ejemplos de fluidos análogos de productos lácteos apropiados pueden ser, por ejemplo, leche de soja y blanqueador de café no lácteo.

Como se usa en este documento, el término "ingrediente gelificante" se refiere a cualquier material que puede formar un sistema coloidal dentro de un medio líquido. Los ejemplos de ingredientes gelificantes apropiados pueden ser, por ejemplo, gelatina, alginato, carageenan, goma, pectina, konjac, agar, ácido alimentario, cuajo, almidón, derivados de almidón y combinaciones de los mismos. Es bien conocido para los expertos en el arte que la cantidad de ingrediente gelificante usado en una mezcla de gel comestible o una composición de gel comestible puede variar considerablemente dependiendo de un número de factores tales como, por ejemplo, el ingrediente gelificante particular usado, la base del fluido particular usada, y las propiedades deseadas del gel.

Las mezclas de gel y las composiciones de gel de la presente divulgación se pueden preparar por cualquier método apropiado conocido en la técnica. En algunas realizaciones, las mezclas de gel comestibles y las composiciones de gel comestibles de la presente divulgación se pueden preparar usando otros ingredientes además del agente gelificante. Los ejemplos de otros ingredientes apropiados pueden ser, por ejemplo, un ácido alimentario, una sal de un ácido alimentario, un sistema regulador, un agente de carga, un secuestrante, un agente de reticulación, uno o más sabores, uno o más colores, y combinaciones de los mismos.

Se puede usar cualquier composición farmacéutica apropiada conocida en la técnica. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica de la presente divulgación puede contener desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm de rebaudiósido V, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica de la presente divulgación puede contener desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm de rebaudiósido W, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica de la presente divulgación puede contener desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm de rebaudiósido KA, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica de la presente divulgación puede contener desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm de rebaudiósido G, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden usar para formular fármacos farmacéuticos que contienen uno o más agentes activos que ejercen un efecto biológico. De acuerdo con lo anterior, en algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden contener uno o más agentes activos que ejercen un efecto biológico. Los agentes activos apropiados son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, The Physician's Desk Reference). Tales composiciones se pueden preparar según procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., USA.

El rebaudiósido V, el rebaudiósido W, el rebaudiósido KA, el rebaudiósido M o el rebaudiósido G se pueden usar con cualquier composición de higiene oral y dental apropiada conocida en la técnica. Los ejemplos de composiciones de higiene oral y dental apropiadas pueden ser, por ejemplo, pastas dentales, pulimentos dentales, hilo dental, colutorios, enjuagues bucales, dentífricos, aerosoles bucales, refrescos bucales, enjuagues de placa, analgésicos dentales y similares.

Las cantidades apropiadas de rebaudiósido V, rebaudiósido W, rebaudiósido KA, rebaudiósido M o rebaudiósido G presentes en los consumibles pueden ser, por ejemplo, desde aproximadamente 5 partes por millón (ppm) a aproximadamente 100 partes por millón (ppm). En algunas realizaciones, bajas concentraciones de rebaudiósido V,

rebaudiósido W, rebaudiósido KA, rebaudiósido M, o rebaudiósido G, por ejemplo, menos de 100 ppm, tiene un dulzor equivalente a las soluciones de sacarosa que tienen concentraciones entre 10.000 ppm a 30.000 ppm. La concentración final que varía desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 95 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 90 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 85 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 80 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 75 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 70 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 65 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 60 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 55 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 50 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 45 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 40 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 35 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 30 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 25 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 20 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 15 ppm, o desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 10 ppm. Alternativamente, rebaudiósido V o rebaudiósido W puede estar presente en productos de consumo de la presente divulgación a una concentración final que varía desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 15 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 25 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 30 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 35 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 45 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 55 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 60 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 65 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 70 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 75 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 80 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 85 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 90 ppm a aproximadamente 100 ppm, o desde aproximadamente 95 ppm a aproximadamente 100 ppm.

En ciertas realizaciones, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm de rebaudiósido V, rebaudiósido W, rebaudiósido KA, rebaudiósido M o rebaudiósido G está presente en las composiciones de productos alimenticios. Como se usa en este documento, "composición (es) de producto alimenticio" se refiere a cualquier material ingerible sólido o líquido que puede, pero no es necesario, tener un valor nutricional y estar destinado al consumo humano y animal.

Los ejemplos de composiciones de productos alimenticios apropiados pueden ser, por ejemplo, composiciones de confitería, tales como caramelos, mentas, gotas con sabor a frutas, productos de cacao, chocolates y similares; condimentos, tales como el ketchup, la mostaza, la mayonesa y similares; chicles; composiciones de cereales; productos horneados, tales como panes, pasteles, tartas, galletas y similares; productos lácteos, tales como leche, queso, crema, helado, crema agria, yogur, sorbete y similares; composiciones edulcorantes de mesa; sopas guisos comida de conveniencia; carnes, tales como jamón, tocino, salchichas, cecinas y similares; gelatinas y productos similares a la gelatina, tales como mermeladas, jaleas, conservas y similares; frutas; verduras; productos de huevo; glaseados; siropes incluyendo melaza; aperitivos; carnes de nueces y productos de nueces; y alimentación animal.

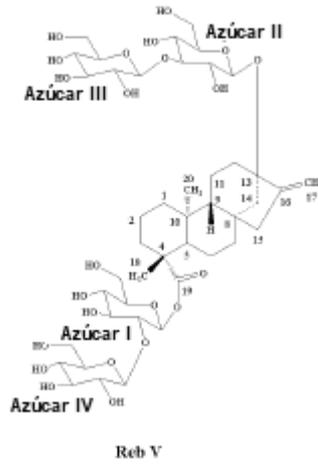
Las composiciones de productos alimenticios también pueden ser hierbas, especias y condimentos, sabores naturales y sintéticos, y potenciadores del sabor, tales como glutamato monosódico. En algunas realizaciones, las composiciones de productos alimenticios pueden ser, por ejemplo, productos envasados preparados, tales como edulcorantes dietéticos, edulcorantes líquidos, mezclas de sabores granulados, alimentos para mascotas, piensos para ganado, tabaco y materiales para aplicaciones de horneado, tales como mezclas para hornear en polvo para la preparación de panes, galletas, pasteles, tortitas, rosquillas y similares. En otras realizaciones, las composiciones de productos alimenticios también pueden ser alimentos y bebidas dietéticas y bajas en calorías que contienen poca o ninguna sacarosa.

En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el rebaudiósido V, el rebaudiósido W, el rebaudiósido KA, el rebaudiósido M o el rebaudiósido G es el único edulcorante, y el producto tiene una intensidad de dulzor equivalente a aproximadamente el 1% a aproximadamente 4% (% p/v) de solución de sacarosa. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, los productos de consumo y productos de bebidas pueden incluir además un edulcorante adicional, donde el producto tiene una intensidad de dulzor equivalente a aproximadamente 1% a aproximadamente 10% (% p/v) de solución de sacarosa. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, cada ingrediente edulcorante en el producto es un edulcorante de alta intensidad. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, cada ingrediente edulcorante en el producto puede ser un edulcorante natural de alta intensidad. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el edulcorante adicional contiene uno o más edulcorantes seleccionados de un extracto de stevia, un glicósido de esteviol, esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido D2, rebaudiósido F, dulcósido A, rubusósido, esteviolbiónido, sacarosa, jarabe de maíz alto en fructosa, fructosa, glucosa, xilosa, arabinosa, ramnosa, eritritol, xilitol, manitol, sorbitol, inositol, AceK, aspartame, neotame, sucralosa, sacarina, naringina dihidrocalcona (NarDHC), neohesperidin dihidrocalcona (NDHC), rubusósido, mogrósido IV, siamenósido I, mogrósido V, monatina, taumatina, monelina, brazzeina, L-alanina, glicina, Lo Han Guo, hernandulcina, filodulcina,

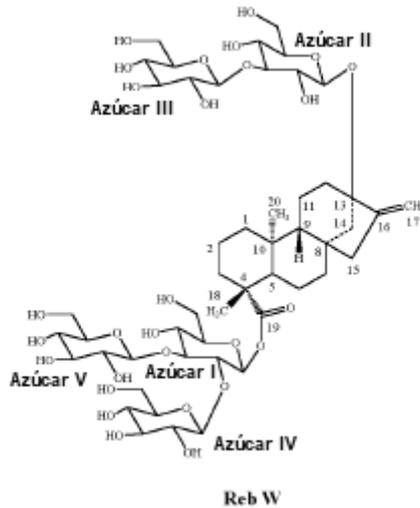
5 trilobtain y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, los productos de consumo y productos de bebidas pueden incluir además uno o más aditivos seleccionados de un carbohidrato, un poliol, un aminoácido o sal del mismo, un poliaminoácido o sal del mismo, un ácido de azúcar o sal del mismo, un nucleótido, un ácido orgánico, un ácido inorgánico, una sal orgánica, una sal de ácido orgánico, una sal de base orgánica, una sal inorgánica, un compuesto amargo, un saborizante, un ingrediente saborizante, un compuesto astringente, una proteína, un hidrolizado de proteínas, un surfactante, un emulsionante, un flavonoide, un alcohol, un polímero y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones que se pueden combinar con cualquiera de las realizaciones precedentes, el rebaudiósido D2 tiene una pureza de aproximadamente 50% a aproximadamente 100% en peso antes de añadirse al producto.

10 Edulcorante

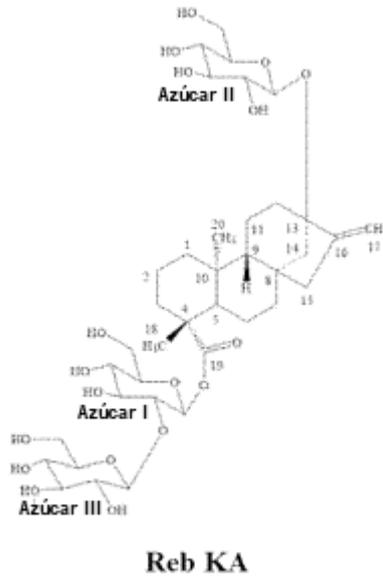
En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un edulcorante que consiste en una estructura química:



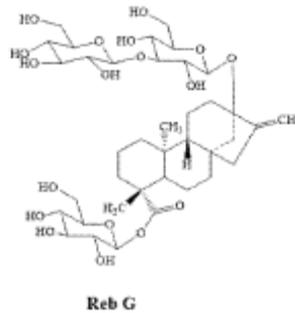
En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un edulcorante que consiste en una estructura química:



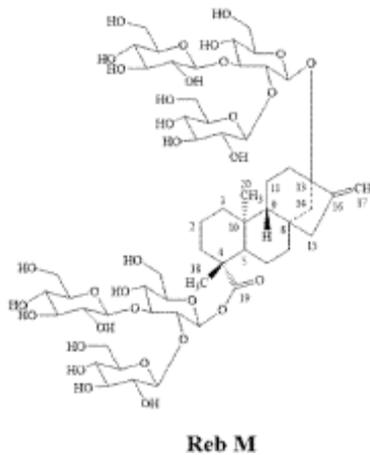
15 En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un edulcorante que consiste en una estructura química:



En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un edulcorante que consiste en una estructura química:



En otro aspecto, la presente divulgación está dirigida a un edulcorante que consiste en una estructura química:



5

En ciertas realizaciones, el edulcorante puede incluir además al menos uno de un relleno, un agente de carga y un agente antiaglomerante. Rellenos apropiados, agentes de carga y agentes antiaglomerantes son conocidos en la técnica.

10

En ciertas realizaciones, el edulcorante rebaudiósido V, el rebaudiósido W, el rebaudiósido KA, el rebaudiósido M o rebaudiósido G se pueden incluir y/o añadir a una concentración final que sea suficiente para endulzar y/o aumentar el dulzor de los productos de consumo y productos de bebidas. La "concentración final" de rebaudiósido V, rebaudiósido

W, rebaudiósido KA, rebaudiósido M, o rebaudiósido G se refiere a la concentración de rebaudiósido V, rebaudiósido W, rebaudiósido KA, rebaudiósido M, rebaudiósido G presente en los productos de consumo finales y productos de bebidas. (esto es, después de que se hayan agregado todos los ingredientes y/o compuestos para producir los productos de consumo y los productos de bebidas). De acuerdo con lo anterior, en ciertas realizaciones, rebaudiósido V, rebaudiósido W, rebaudiósido KA, rebaudiósido M, o rebaudiósido G se incluyen y/o se añaden a un compuesto o ingrediente usado para preparar los productos de consumo y productos de bebidas. El rebaudiósido V, el rebaudiósido W, el rebaudiósido KA, el rebaudiósido M o el rebaudiósido G pueden estar presentes en un solo compuesto o ingrediente, o en múltiples compuestos e ingredientes. En otras realizaciones, el rebaudiósido V, rebaudiósido W, rebaudiósido KA, rebaudiósido M, o rebaudiósido G se incluyen y/o se añaden a los productos de consumo y productos de bebidas. En ciertas realizaciones preferidas, el rebaudiósido V, el rebaudiósido W, el rebaudiósido KA, el rebaudiósido M o el rebaudiósido G se incluyen y/o se añaden a una concentración final que varía desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 95 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 90 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 85 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 80 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 75 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 70 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 65 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 60 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 55 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 50 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 45 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 40 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 35 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 30 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 25 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 20 ppm, desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 15 ppm, o desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 10 ppm. Alternativamente, el rebaudiósido V o rebaudiósido W se incluye y/o adiciona a una concentración final que varía desde aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 15 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 25 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 30 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 35 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 45 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 55 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 60 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 65 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 70 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 75 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 80 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 85 ppm a aproximadamente 100 ppm, desde aproximadamente 90 ppm a aproximadamente 100 ppm, o desde aproximadamente 95 ppm a aproximadamente 100 ppm. Por ejemplo, el rebaudiósido V o el rebaudiósido W se pueden incluir y/o añadir a una concentración final de aproximadamente 5 ppm, aproximadamente 10 ppm, aproximadamente 15 ppm, aproximadamente 20 ppm, aproximadamente 25 ppm, aproximadamente 30 ppm, aproximadamente 35 ppm, aproximadamente 40 ppm, aproximadamente 45 ppm, aproximadamente 50 ppm, aproximadamente 55 ppm, aproximadamente 60 ppm, aproximadamente 65 ppm, aproximadamente 70 ppm, aproximadamente 75 ppm, aproximadamente 80 ppm, aproximadamente 85 ppm, aproximadamente 90 ppm, aproximadamente 95 ppm, o aproximadamente 100 ppm, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores.

En ciertas realizaciones, el rebaudiósido V, el rebaudiósido W, el rebaudiósido KA, el rebaudiósido M o el rebaudiósido G es el único edulcorante incluido y/o añadido a los productos de consumo y los productos de bebidas. En tales realizaciones, los productos de consumo y los productos de bebidas tienen una intensidad de dulzor equivalente a aproximadamente 1% a aproximadamente 4% (% p/v) de solución de sacarosa, aproximadamente 1% a aproximadamente 3% (% p/v) de solución de sacarosa, o aproximadamente 1% a aproximadamente 2% (% p/v) de solución de sacarosa. Alternativamente, los productos de consumo y los productos de bebida tienen una intensidad de dulzor equivalente a aproximadamente 1% a aproximadamente 4% (% p/v) de solución de sacarosa, aproximadamente 2% a aproximadamente 4% (% p/v) de solución de sacarosa, aproximadamente 3% a aproximadamente 4% (% p/v) de solución de sacarosa, o aproximadamente 4%. Por ejemplo, los productos de consumo y los productos de bebida pueden tener una intensidad de dulzor equivalente a aproximadamente 1%, aproximadamente 2%, aproximadamente 3%, o aproximadamente 4% (% p/v) de solución de sacarosa, incluyendo cualquier intervalo entre estos valores.

Los productos de consumo y productos de bebidas de la presente divulgación pueden incluir una mezcla de rebaudiósido V, rebaudiósido W, rebaudiósido KA, rebaudiósido M o rebaudiósido G y uno o más edulcorantes de la presente divulgación en una proporción suficiente para lograr una intensidad del dulzor, características nutricionales, perfil de sabor, sensación en la boca u otro factor organoléptico.

La divulgación se comprenderá más completamente después de considerar los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

En este ejemplo, se sintetizaron fragmentos de ADN de longitud completa de todos los genes UGT candidatos.

5 Específicamente, los ADNc fueron codones optimizados para la expresión de *E. coli* (Genscript, Piscataway, NJ). El ADN sintetizado se clonó en un vector de expresión bacteriano pETite N-His SUMO Kan Vector (Lucigen). Para la secuencia de nucleótidos que codifica las enzimas de fusión UDP-glicosiltransferasa (UGT76G1-AtSUS1 y EUGT11-AtSUS1), se insertó un enlace GSG (codificado por la secuencia de nucleótidos: ggttctgtgt) en un encuadre entre una secuencia de nucleótidos que codifica el dominio de uridina difosfo glicosiltransferasa y la secuencia de nucleótidos que codifica la sacarosa sintasa 1 de *A. thaliana* (AtSUS1). La tabla 2 resume los números de proteína y de identificador de secuencia.

Tabla 2. Números de identificación de secuencias.

Nombre	SEQ ID NO	Descripción
UGT76G1	SEQ ID NO: 1	Aminoácido
UGT76G1	SEQ ID NO: 2	Ácido nucleico
EUGT11	SEQ ID NO: 3	Aminoácido
EUGT11	SEQ ID NO: 4	Ácido nucleico
HV1	SEQ ID NO: 5	Aminoácido
HV1	SEQ ID NO: 6	Ácido nucleico
AtSUS1	SEQ ID NO: 7	Aminoácido
AtSUS1	SEQ ID NO: 8	Ácido nucleico
Enzima de fusión GS	SEQ ID NO: 9	Aminoácido
Enzima de fusión GS	SEQ ID NO: 10	Ácido nucleico
Enzima de fusión EUS	SEQ ID NO: 11	Aminoácido
Enzima de fusión EUS	SEQ ID NO: 12	Ácido nucleico

10 Cada construcción de expresión se transformó en *E. coli* BL21 (DE3), que posteriormente se hizo crecer en medios LB que contenían 50 µg/mL de kanamicina a 37 °C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0.8-1.0. La expresión de la proteína se indujo mediante la adición de isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM y el cultivo se hizo crecer adicionalmente a 16 °C, durante 22 h. Las células se recogieron por centrifugación (3,000 x g; 10 min; 4 °C). Las pellas celulares se recogieron y se usaron inmediatamente o se almacenaron a -80 °C.

15 Las pellas celulares se resuspendieron en solución reguladora de lisis (solución reguladora de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.2, 25 µg/mL de lisozima, 5 µg/mL de DNasa I, imidazol 20 mM, NaCl 500 mM, glicerol al 10% y 0.4 % de TRITON X-100). Las células se rompieron por sonicación a 4 °C, y los residuos celulares se clarificaron por centrifugación (18,000 x g; 30 min). El sobrenadante se cargó en una columna de afinidad equilibrada (solución reguladora de equilibrio: solución reguladora de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.2, imidazol 20 mM, NaCl 500 mM, glicerol al 10%) Ni-NTA (Qiagen). Después de cargar la muestra de proteína, la columna se lavó con solución reguladora de equilibrio para eliminar las proteínas contaminantes no unidas. Los polipéptidos UGT recombinantes etiquetados con His se eluyeron mediante una solución reguladora de equilibrio que contenía imidazol 250 mM. Las proteínas de fusión HV1 (61.4kD), UGT76G1 (65.4kD), AtSUS1 (106.3kD), EUGT11 (62kD), UGT76G1-SUS1 (GS) (157.25kD) y EUGT11-AtSUS1 (155kD) purificadas se mostraron en la figura 2.

25 Ejemplo 2

En este ejemplo, los polipéptidos recombinantes UGT candidatos se analizaron para determinar la actividad de la glicosiltransferasa usando glicósidos de esteviol probados como sustrato.

30 Por lo general, el polipéptido recombinante (10 µg) se probó en un sistema de reacción in vitro de 200 µL. El sistema de reacción contiene solución reguladora de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.2, MgCl₂ 3 mM, 1 mg/ml de sustrato de glicósido de esteviol, UDP-glucosa 1 mM. La reacción se realizó a 30 °C y se terminó añadiendo 200 µL de 1-butanol. Las muestras se extrajeron tres veces con 200 µL de 1-butanol. La fracción combinada se secó y se disolvió en 70 µL de metanol al 80% para un análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Se usó rubusósido (99%, Blue California, CA), Reb G purificado (98.8%), Reb KA (98.4%) y Reb V (80%) como sustrato en reacciones in vitro.

La reacción de glicosilación catalizada por UGT se acopló a una reacción generadora de UDP-glucosa catalizada por una sacarosa sintasa (tal como AtSUS1). En este método, la UDP-glucosa se generó a partir de la sacarosa y UDP, de manera que se puede omitir la adición de UDP-glucosa extra. En el ensayo, se añadió AtSUS1 recombinante en el sistema de reacción UGT y la UDP-glucosa se puede regenerar a partir de UDP. La secuencia AtSUS1 (Bieniawska et al., Plant J. 2007, 49: 810-828) se sintetizó e insertó en un vector de expresión bacteriano. La proteína AtSUS1 recombinante se expresó y purificó por cromatografía de afinidad.

El análisis de HPLC se realizó usando un sistema Dionex UPLC ultimate 3000 (Sunnyvale, CA), que incluye una bomba cuaternaria, un compartimento de columna de temperatura controlada, un muestreador automático y un detector de absorbancia UV. Se usaron las columnas Phenomenex Luna NH₂, Luna C18 o Synergi Hydro-RP con columna protectora para la caracterización de glicósidos de esteviol. Se usó acetonitrilo en agua o en solución reguladora Na₃PO₄ para la elución isocrática en el análisis de HPLC. La longitud de onda de detección fue de 210 nm.

Ejemplo 3

En este ejemplo, se analizaron los polipéptidos HV1 recombinantes para transferir una unidad estructural de azúcar a rubusósido para producir el rebaudiósido KA ("Minor diterpene glycosides from the leaves of *Stevia rebaudiana*". Journal of Natural Products (2014), 77(5), 1231-1235) en todas las condiciones de reacción con o sin AtSUS1.

Como se muestra en la figura 3, los polipéptidos HV1 recombinantes transfirieron una unidad estructural de azúcar a rubusósido para producir Reb KA en todas las condiciones de reacción con o sin AtSUS1. El rubusósido se convirtió completamente a Reb KA y Reb E por el HV1 recombinante en un sistema de reacción de acoplamiento UGT-SUS (G, I). Sin embargo, solo el rubósido parcial se convirtió en Reb KA después de 24 horas (H) por el polipéptido HV1 recombinante solo sin estar acoplado a AtSUS1, lo que indica que AtSUS1 mejoró la eficiencia de conversión en el sistema de acoplamiento UGT-SUS. En el sistema de reacción de acoplamiento HV1-AtSUS1, el Reb KA producido se puede convertir continuamente a Reb E.

Ejemplo 4

En este ejemplo, la actividad de HV1 se analizó usando Reb E como un sustrato.

El sustrato Reb E (0.5 mg/ml) se incubó con el polipéptido HV1 recombinante (20 µg) y AtSUS1 (20 µg) en un sistema de reacción de acoplamiento UGT-SUS (200 µL) en condiciones similares a las usadas en los ejemplos anteriores. Como se muestra en la figura 4, Reb Z se produjo mediante la combinación del polipéptido HV1 recombinante y AtSUS1. Estos resultados indicaron que HV1 puede transferir una unidad estructural de glucosa a Reb E para formar RZ. La figura 4 muestra que el rebaudiósido Z ("Reb Z") se puede producir a partir del rebaudiósido E ("Reb E") catalizado por un polipéptido HV1 recombinante y un AtSUS1 recombinante en un sistema de reacción de acoplamiento HV1-AtSUS1. HV1 puede transferir una glucosa a Reb E para producir Reb Z, mezcla de Reb Z1 y Reb Z2 en la proporción entre 60:40 y 70:30 (solicitud provisional de EE. UU. No. 61/898,571, asignada a Conagen Inc.).

Ejemplo 5

En este ejemplo, para confirmar la conversión de Reb KA en Reb E, se incubó el sustrato Reb KA purificado con HV1 recombinante con o sin AtSUS1. Como se muestra en la figura 5, Reb E fue producido por el polipéptido HV1 recombinante en ambas condiciones de reacción. Sin embargo, el polipéptido AtSUS1 en un sistema de reacción de acoplamiento UGT-SUS puede mejorar la eficiencia de la reacción. Todo el sustrato Reb KA se puede convertir completamente a Reb E en el sistema de acoplamiento UGT-SUS (D).

Ejemplo 6

En este ejemplo, se analizó la actividad de EUGT11 usando rubusósido como sustrato.

Como se muestra en la figura 6, EUGT11 puede transferir una unidad estructural de azúcar a rubusósido para producir Reb KA y esteviósido en todas las condiciones de reacción con o sin AtSUS1. AtSUS1 mejoró la eficiencia de conversión en el sistema de acoplamiento UGT-SUS. En el sistema de reacción de acoplamiento HV1-AtSUS1, Reb E puede ser convertido continuamente por EUGT11. La proteína de fusión EUS presentó una mayor actividad en las mismas condiciones de reacción. Todos los Reb KA y el esteviósido producidos se convirtieron completamente en Reb E por EUS a las 48 horas. Reb E se puede convertir continuamente a Reb D2.

Ejemplo 7

En este ejemplo, la actividad de EUGT11 se analizó usando Reb KA como sustrato.

El EUGT11 es un UGT con una actividad de glicosilación de 1,2-19-O-glucosa para producir el glicósido de esteviol relacionado (Solicitud publicada PCT WO2013/022989, asignada a Evolve SA). Por ejemplo, EUGT11 puede catalizar la reacción para producir Reb E a partir de esteviósido. EUGT11 también tiene una actividad de glicosilación de 1,6-13-O-glucosa que puede transferir una molécula de glucosa al rebaudiósido E para formar el rebaudiósido D2 (solicitud de patente de los Estados Unidos No. de serie 14/269,435, asignada a Conagen, Inc.). En los experimentos, encontramos

que EUGT11 puede transferir un residuo de glucosa a Reb KA para formar Reb E. Como se muestra en la figura 7, EUGT11 puede transferir una unidad estructural de azúcar a Reb KA para producir Reb E en todas las condiciones de reacción con (E, H) o sin AtSUS1 (D, G). AtSUS1 mejoró la eficiencia de conversión en el sistema de acoplamiento UGT-SUS (E, H). En el sistema de reacción de acoplamiento EUGT11-AtSUS1 (E, H) y el sistema de reacción de fusión EUS (F, I), todo Reb KA se convirtió completamente y el Reb E producido se puede convertir continuamente a Reb D2.

Ejemplo 8

En este ejemplo, la actividad de UGT76G1 se analizó usando rubusósido como sustrato.

UGT76G1 tiene actividad de glicosilación de 1,3-13-O-glucosa que puede transferir una molécula de glucosa a esteviósido para formar rebaudiósido A y a Reb E para formar rebaudiósido D. En el ejemplo, encontramos que UGT76G1 puede transferir un residuo de glucosa a rubusósido para formar rebaudiósido G.

Como se muestra en la figura 8, UGT76G1 puede transferir una unidad estructural de azúcar a rubusósido para producir Reb G en todas las condiciones de reacción con (D, G) o sin AtSUS1 (C, F). AtSUS1 mejoró la eficiencia de conversión en el sistema de acoplamiento UGT-SUS. La proteína de fusión GS mostró una mayor actividad en las mismas condiciones de reacción (E, H). Todo el rubusósido se convirtió completamente a Reb G por GS a las 12 h (E).

Ejemplo 9

En este ejemplo, la actividad de UGT76G1 se analizó usando rebaudiósido KA como sustrato.

Para identificar adicionalmente la actividad enzimática de UGT76G1, se realizó un ensayo in vitro usando rebaudiósido KA como sustrato. Sorprendentemente, un novedoso glicósido de esteviol (rebaudiósido V "Reb V") se produjo en un momento temprano del tiempo. En momentos posteriores, el Reb V producido en la reacción se convirtió en otro nuevo glicósido de esteviol (rebaudiósido W "RebW").

Como se muestra en la figura 9, UGT76G1 puede transferir una unidad estructural de azúcar a Reb KA para producir Reb V en todas las condiciones de reacción con (F, I) o sin AtSUS1 (E, H). AtSUS1 mejoró la eficiencia de conversión en el sistema de acoplamiento UGT-SUS (F, I). En el sistema de reacción de acoplamiento UGT76G1-AtSUS1 (I) y el sistema de reacción de fusión GS (J), el Reb V producido se convirtió completamente en Reb W a las 12 h.

Ejemplo 10

En este ejemplo, la actividad de UGT76G1 se analizó usando Reb V como sustrato.

Se introdujo Reb V purificado como sustrato en el sistema de reacción. Como se muestra en la figura 10C, sorprendentemente Reb V se convirtió completamente en Reb W mediante el polipéptido recombinante UGT76G1 en el sistema de acoplamiento UGT-SUS1 a las 6 h.

Ejemplo 11

En este ejemplo, la actividad de HV1 se analizó usando Reb G como un sustrato.

Como se muestra en la figura 11, los polipéptidos HV1 recombinantes transfirieron una unidad estructural de azúcar al rebaudiósido G para producir Reb V en todas las condiciones de reacción con o sin AtSUS1. Reb G se convirtió completamente a Reb V mediante el HV1 recombinante en un sistema de reacción de acoplamiento UGT-SUS (E, G). Sin embargo, solo el Reb G parcial se convirtió en Reb V después de 24 horas (F) por el polipéptido HV1 recombinante solo sin estar acoplado a AtSUS1, lo que indica que AtSUS1 mejoró la eficiencia de conversión en el sistema de acoplamiento UGT-SUS.

Ejemplo 12

En este ejemplo, la actividad de EUGT11 se analizó usando Reb G como sustrato.

Como se muestra en la figura 12, los polipéptidos EUGT11 recombinantes transfirieron una unidad estructural de azúcar al rebaudiósido G para producir Reb V en todas las condiciones de reacción con (F, I) o sin AtSUS1 (E, H). Se combinó más Reb G a Reb V mediante el EUGT11 recombinante en un sistema de reacción de acoplamiento UGT-SUS (F, I). Sin embargo, solo el Reb G parcial se convirtió en Reb V por el polipéptido EUGT11 recombinante solo sin estar acoplado a AtSUS1 (E, H), lo que indica que AtSUS1 mejoró la eficiencia de conversión en el sistema de acoplamiento UGT-SUS. La proteína de fusión EUS presentó una mayor actividad en las mismas condiciones de reacción (G, J). Todo el Reb G en el sistema de reacción se convirtió completamente a Reb V por EUS a las 24 horas (J).

Ejemplo 13

En este ejemplo, se analizaron las actividades combinadas de HV1 con UGT76G1, usando rubusósido como sustrato.

El sustrato rubusósido se incubó con el polipéptido HV1 recombinante, UGT76G1 y AtSUS1 en un sistema de reacción de acoplamiento UGT-SUS en condiciones similares a las usadas en los ejemplos anteriores. Los productos fueron analizados por HPLC. Como se muestra en la figura 13, Reb V y Reb W se produjeron mediante la combinación del polipéptido HV1 recombinante, UGT76G1 y AtSUS1.

- 5 De este modo, el polipéptido HV1 recombinante, que mostró una actividad de glicosilación de 1,2-19-O-glucosa y 1,2-13-O-glucosa, se puede usar en combinación con otras enzimas UGT (tal como UGT76G1, que mostró una actividad de glicosilación de 1,3-13-O-glucosa y 1,3-19-O-glucosa) para la biosíntesis compleja, de múltiples etapas de los glicósidos de esteviol. Si la proteína recombinante HV1 se combinó con la proteína de fusión GS en el sistema de reacción, Reb V y Reb W, también se produjeron Reb V y Reb W por estas enzimas UGT, lo que indica que se puede generar una
10 reacción de acoplamiento UGT-SUS mediante la proteína de fusión GS.

Ejemplo 14

En este ejemplo, se analizaron las actividades combinadas de EUGT11 con UGT76G1 usando rubusósido como sustrato.

- 15 El sustrato rebusósido se incubó con el polipéptido EUGT11 recombinante, UGT76G1 y AtSUS1 en un sistema de reacción de acoplamiento UGT-SUS en condiciones similares a las usadas en los ejemplos anteriores. Los productos fueron analizados por HPLC. Como se muestra en la figura 14, Reb W se produjo mediante la combinación del polipéptido EUGT11 recombinante, UGT76G1 y AtSUS1. De este modo, el polipéptido EUGT11 recombinante, que
20 mostró una actividad de glicosilación de 1, 2-19-O-glucosa y 1, 2-13-O-glucosa, se puede usar en combinación con otras enzimas UGT (tal como UGT76G1, que mostró una actividad de glicosilación de 1,3-13-O-glucosa y 1,3-19-O-glucosa) para la biosíntesis compleja, de múltiples etapas de los glicósidos de esteviol. Si la proteína recombinante EUGT11 se combinó con la proteína de fusión GS en el sistema de reacción, también se produjo Reb W por estas
enzimas UGT, lo que indica que se puede generar una reacción de acoplamiento UGT-SUS mediante la proteína de fusión GS.

Ejemplo 15

- 25 En este ejemplo, se analizaron las actividades combinadas de HV1 con UGT76G1 usando Reb G como sustrato.

El sustrato Reb G se incubó con el polipéptido HV1 recombinante, UGT76G1 y AtSUS1 en un sistema de reacción de acoplamiento UGT-SUS en condiciones similares a las usadas en los ejemplos anteriores. Los productos fueron analizados por HPLC. Como se muestra en la figura 15, Reb V y Reb W se produjeron mediante la combinación del polipéptido HV1 recombinante, UGT76G1 y AtSUS1. Después de 12 horas, todo el sustrato rubusósido se convirtió en
30 Reb V, y después de 36 horas, todo el Reb V producido se convirtió en Reb W. De este modo, el polipéptido HV1 recombinante, que mostró una actividad de glicosilación de 1,2-19-O-glucosa y 1,2-13-O-glucosa se puede usar en combinación con otras enzimas UGT (tal como UGT76G1, que mostró una actividad de 1,3-13-O-glucosa y 1,3-19-O-glucosa) para la biosíntesis compleja, de múltiples etapas de los glicósidos de esteviol. Si la proteína recombinante HV1 se combinó con la proteína de fusión GS en el sistema de reacción, también se produjeron Reb V y Reb W por estas
35 enzimas UGT, lo que indica que se puede generar una reacción de acoplamiento UGT-SUS mediante la proteína de fusión GS.

Ejemplo 16

En este ejemplo, se analizaron las actividades combinadas de EUGT11 con UGT76G1 usando Reb G como sustrato.

- 40 El sustrato Reb G se incubó con el polipéptido EUGT11 recombinante, UGT76G1 y AtSUS1 en un sistema de reacción de acoplamiento UGT-SUS en condiciones similares a las usadas en los ejemplos anteriores. Los productos fueron analizados por HPLC. Como se muestra en la figura 16, Reb W se produjo mediante la combinación del polipéptido recombinante EUGT11, UGT76G1 y AtSUS1. De este modo, el polipéptido EUGT11 recombinante, que mostró una actividad de glicosilación de 1, 2-19-O-glucosa y 1, 2-13-O-glucosa, se puede usar en combinación con otras enzimas UGT (tal como UGT76G1, que mostró una actividad de glicosilación de 1,3-13-O-glucosa y 1,3-19-O-glucosa) para la
45 biosíntesis compleja, de múltiples etapas de los glicósidos de esteviol. Si la proteína recombinante EUGT11 se combinó con la proteína de fusión GS en el sistema de reacción, también se produjo Reb W por estas enzimas UGT, lo que indica que se puede generar una reacción de acoplamiento UGT-SUS mediante la proteína de fusión GS.

Ejemplo 17

En este ejemplo, se analizó la actividad de las enzimas de fusión UGT76G1 y GS usando Reb D como un sustrato.

- 50 El sustrato Reb D se incubó con el UGT76G1 recombinante en condiciones similares a las usadas en los ejemplos anteriores. Los productos fueron analizados por HPLC. Como se muestra en la figura 22, Reb M fue producido por el UGT76G1 con (Figura 22D y G) o sin AtSUS1 (Figura 22C y F) en las reacciones. De este modo, el polipéptido UGT76G1 recombinante, que mostró una actividad de glicosilación de 1, 3-19-O-glucosa, se puede usar en la biosíntesis del rebaudiósido M. Reb D se convirtió completamente en Reb M por el UGT76G1 recombinante en un
55 sistema de reacción de acoplamiento UGT-SUS (figura 22G). Sin embargo, solo la Reb D parcial se convirtió en Reb M

después de 6 horas (F) por el polipéptido UGT76G1 recombinante solo sin estar acoplado a AtSUS1, lo que indica que AtSUS1 mejoró la eficiencia de conversión en el sistema de acoplamiento UGT-SUS. La proteína de fusión GS mostró una actividad similar a la reacción de acoplamiento UGT76G1-AtSUS1 en las mismas condiciones de reacción (E, H). Toda la Reb D se convirtió completamente en Reb M por GS a las 6 h (H), lo que indica que se puede generar la reacción de acoplamiento UGT-SUS mediante la proteína de fusión GS.

Ejemplo 18

En este ejemplo, se analizó la actividad de las enzimas de fusión UGT76G1 y GS usando Reb E como sustrato.

El sustrato Reb E se incubó con la enzima de fusión GS o UGT76G1 recombinante en condiciones similares a las usadas en los ejemplos anteriores. Los productos fueron analizados por HPLC. Como se muestra en la figura 23, Reb D fue producido por el UGT76G1 con (Figura 23E, H y K) o sin AtSUS1 (Figura 22D, G y J) y enzima de fusión GS (Figura 23F, I y L) en las reacciones. Además, Reb M se formó a partir de Reb D producida en las reacciones. De este modo, el polipéptido UGT76G1 recombinante, que mostró una actividad de glicosilación de 1,3-13-O-glucosa y 1,3-19-O-glucosa, se puede usar en la biosíntesis de rebaudiósido D y rebaudiósido M. Reb E se convirtió completamente a Reb M por el UGT76G1 recombinante en un sistema de reacción de acoplamiento UGT-SUS después de 24 horas (Figura 23K). Sin embargo, solo Reb D se convirtió completamente de Reb E después de 24 horas (J) por el polipéptido UGT76G1 recombinante solo sin estar acoplado a AtSUS1, lo que indica que AtSUS1 mejoró la eficiencia de conversión en el sistema de acoplamiento UGT-SUS a través de la producción continua de UDPG. La proteína de fusión GS mostró una actividad similar a la reacción de acoplamiento UGT76G1-AtSUS1 en las mismas condiciones de reacción (Figura 23F, I y L), lo que indica que la reacción de acoplamiento UGT-SUS se puede generar por la proteína de fusión GS.

Ejemplo 19

En este ejemplo, se analizaron las actividades combinadas de HV1 con UGT76G1 usando esteviósido como sustrato.

El sustrato de esteviósido se incubó con el polipéptido HV1 recombinante y UGT76G1 o la enzima de fusión GS en condiciones similares a las usadas en los ejemplos anteriores. Los productos fueron analizados por HPLC. Como se muestra en la figura 24, la Reb A se produjo mediante la combinación del polipéptido HV1 recombinante y UGT76G1 en todas las reacciones. Adicionalmente, Reb D y Reb M se detectaron en las reacciones usando la combinación del polipéptido HV1 recombinante, el polipéptido UGT76G1 y AtSUS1 (Figura 24E, H y K) o la combinación de la enzima de fusión GS recombinante y el polipéptido HV1 (Figura 24F, I y L). El polipéptido HV1 recombinante, que mostró una actividad de glicosilación de 1, 2-19-O-glucosa, se puede usar en combinación con otras enzimas UGT (tal como UGT76G1, que mostró una actividad de glicosilación de 1,3-13-O-glucosa y 1,3-19-O-glucosa) para la biosíntesis compleja, de múltiples etapas de rebaudiósido D y rebaudiósido M. Los resultados también mostraron que AtSUS1 mejoró la eficiencia de conversión en el sistema de acoplamiento UGT-SUS a través de la producción continua de UDPG (Figura 24E, H y K). La proteína de fusión GS mostró una actividad similar a la reacción de acoplamiento UGT76G1-AtSUS1 en las mismas condiciones de reacción (Figura 24F, I y L), lo que indica que la reacción de acoplamiento UGT-SUS se puede generar por la proteína de fusión GS.

Ejemplo 20

En este ejemplo, HV1 combinado con actividades de UGT76G1 se analizaron usando Reb A como sustrato.

El sustrato Reb A se incubó con el polipéptido HV1 recombinante y UGT76G1 o enzima de fusión GS en condiciones similares a las usadas en los ejemplos anteriores. Los productos fueron analizados por HPLC. Como se muestra en la figura 25, Reb D se produjo mediante la combinación del polipéptido HV1 recombinante y UGT76G1 en todas las reacciones. Adicionalmente, se detectó Reb M en las reacciones usando la combinación del polipéptido HV1 recombinante, polipéptido UGT76G1 y AtSUS1 (Figura 25D, G y J) o la combinación de la enzima de fusión GS recombinante y el polipéptido HV1 (Figura 25E, H y K). El polipéptido HV1 recombinante, que mostró una actividad de glicosilación de 1, 2-19-O-glucosa, se puede usar en combinación con otras enzimas UGT (tal como UGT76G1, que mostró una actividad de glicosilación de 1,3-19-O-glucosa) para la biosíntesis compleja, de múltiples etapas del rebaudiósido D y del rebaudiósido M. Los resultados también mostraron que AtSUS1 mejoró la eficiencia de conversión en el sistema de acoplamiento UGT-SUS a través de la producción continua de UDPG (Figura 25D, G y J). La proteína de fusión GS mostró una actividad similar a la reacción de acoplamiento UGT76G1-AtSUS1 en las mismas condiciones de reacción (Figura 25E, H y K), lo que indica que la reacción de acoplamiento UGT-SUS puede ser generada por la proteína de fusión GS.

Ejemplo 21

En este ejemplo, la estructura de Reb V se analizó por RMN.

El material usado para la caracterización de Reb V se produjo usando la conversión enzimática de Reb G y se purificó por HPLC. Los datos HRMS se generaron con un instrumento LTQ Orbitrap Discovery HRMS, con su resolución establecida en 30k. Los datos escaneados desde m/z 150 a 1500 en modo de electroaspersión de iones positivos. El voltaje de la aguja se ajustó a 4 kV; las otras condiciones de la fuente fueron gas de protección = 25, gas auxiliar = 0, gas de barrido = 5 (todos los flujos de gas en unidades arbitrarias), voltaje capilar = 30 V, temperatura capilar = 300 °C y

voltaje de la lente del tubo = 75. La muestra se diluyó con 2: 2: 1 acetonitrilo: metanol: agua (igual que el eluyente de infusión) e inyectado 50 microlitros. Los espectros de RMN se adquirieron en instrumentos Bruker Avance DRX 500 MHz o Varian INOVA 600 MHz usando secuencias de pulsos estándar. Los espectros de RMN 1D (^1H y ^{13}C) y 2D (TOCSY, HMQC y HMBC) se realizaron en $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

5 La fórmula molecular de Reb V se ha deducido como $\text{C}_{44}\text{H}_{70}\text{O}_{23}$ en base a su espectro de masas de alta resolución positiva (HR) que mostraba iones aductos correspondientes a $[\text{M} + \text{Na}]^+$ en m/z 989.4198; esta composición fue apoyada por los datos de espectro ^{13}C RMN. Los datos de espectro ^1H RMN de Reb V mostraron la presencia de dos singletes de metilo a δ 0.97 y 1.40, dos protones olefínicos como singletes a δ 5.06 y 5.71 de un doble enlace exocíclico, nueve protones sp^3 metileno y dos protones sp^3 metino entre δ 0.74-2.72, característicos de los diterpenoides ent-kaurane
10 aislados anteriormente del género *Stevia*. El esqueleto básico de diterpenoides ent-kaurane fue apoyado por los estudios COSY y TOCSY que mostraron correlaciones clave: H-1/H-2; H-2/H-3; H-5/H-6; H-6/H-7; H-9/H-11; H-11/H-12. El espectro ^1H RMN de Reb V también mostró la presencia de cuatro protones anoméricos resonantes a δ 5.08, 5.38, 5.57, y 6.23; sugiriendo cuatro unidades de azúcar en su estructura. La hidrólisis ácida de Reb V con H_2SO_4 al 5% produjo D-glucosa que se identificó por comparación directa con una muestra auténtica por TLC. La hidrólisis enzimática
15 de Reb V proporcionó una aglicona que se identificó como esteviol por comparación de ^1H RMN y TLC conjunta con compuesto estándar. Las constantes de acoplamiento grandes observadas para los cuatro protones anoméricos de las unidades estructurales de glucosa a δ 5.08 (d, $J=7.8$ Hz), 5.38 (d, $J=8.1$ Hz), 5.57 (d, $J=8.0$ Hz), y 6.23 (d, $J=7.8$ Hz), sugirió su β -orientación según lo informado para los glicósidos de esteviol. Los valores de ^1H y ^{13}C RMN para Reb V se asignaron en base a los datos de TOCSY, HMQC y HMBC y se proporcionan en la tabla 3.

20 Tabla 3. Datos de espectros de ^1H y ^{13}C RMN (desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento) para Reb V y Reb G^{a-c}.

Posición	Reb V		Reb G	
	^1H RMN	^{13}C RMN	^1H RMN	^{13}C RMN
1	0.74 m, 1.66 m	41.1	0.78 m, 1.69 m	41.3
2	1.43 m, 2.18 m	20.4	1.44 m, 2.20 m	20.0
3	1.06 m, 2.72 d (12.8)	38.4	1.05 m, 2.70 d (11.6)	38.8
4	---	44.8	---	44.9
5	1.32 m	57.9	1.32 m	57.8
6	1.84 m, 2.20 m	22.7	1.87 m, 2.24 m	22.6
7	1.06 m, 1.70 m	42.2	1.07 m, 1.72 m	42.2
8	---	42.5	---	43.1
9	0.91 d (7.8)	54.5	0.92 d (7.6)	54.4
10	---	40.2	---	40.4
11	1.72 m	21.0	1.75 m	21.2
12	2.18 m, 2.38 m	38.3	2.26 m, 2.38 m	37.7
13	---	87.6	---	86.4
14	1.68 m, 2.43 m	44.8	1.78 m, 2.50 m	44.6
15	1.96 m, 2.24 m	48.9	2.06 m, 2.32 m	48.2
16	---	153.7	---	155.0
17	5.06 s, 5.71 s	105.7	5.00 s, 5.49 s	104.8
18	1.40 s	29.6	1.32 s	28.8
19	---	176.4	---	177.4
20	0.97 s	16.7	1.25 s	16.2

ES 2 693 371 T3

1'	6.23 d (7.8)	94.2	6.16 d (7.6)	96.4
2'	3.98 m	74.5	4.01 m	74.5
3'	4.14 m	79.3	4.09 m	79.3
4'	4.36 m	71.6	4.34 m	71.6
5'	4.24 m	79.9	4.22 m	79.9
6'	4.06 m, 4.48 m	62.6	4.04 m, 4.44 dd (3.2, 7.6)	62.6
1"	5.08 d (7.8)	99.6	5.06 d (7.4)	99.9
2"	3.94 m	74.7	3.92 m	74.5
3"	4.04 m	89.3	4.06 m	89.5
4"	4.28 m	71.2	4.23 m	71.0
5"	4.00 m	78.2	4.02 m	78.1
6"	4.24 m, 4.58 m	63.0	4.27 m, 4.56 dd (2.8, 8.4)	63.1
1'''	5.38 d (8.1)	106.4	5.27 d (8.4)	106.5
2'''	4.16 m	76.1	4.14 m	76.0
3'''	4.34 m	79.2	4.37 m	79.3
4'''	4.26 m	72.2	4.28 m	72.2
5'''	3.78 m	78.8	3.89 m	78.8
6'''	4.14 m, 4.44 m	63.2	4.18 m, 4.48 m	63.2
1''''	5.57 d (8.0)	105.7		
2''''	3.96 m	76.5		
3''''	4.32 m	79.6		
4''''	4.20 m	72.5		
5''''	3.87 m	79.0		
6''''	4.12 m, 4.46 m	63.5		

^a asignaciones realizadas en base a las correlaciones TOCSY, HMQC y HMBC; ^b Los valores de desplazamiento químico están en δ (ppm); ^c Las constantes de acoplamiento están en Hz.

5 En base a los resultados de los datos de espectros de RMN y los experimentos de hidrólisis de Reb V, se concluyó que existen cuatro unidades de β -D-glucosilo en su estructura conectadas a la aglicona esteviol. Una comparación cercana de los valores de ^1H y ^{13}C RMN de Reb V con Reb G sugirió la presencia de una unidad estructural de aglicona esteviol con una unidad 3-O- β -D-glucobiosilo en C-13 en forma de enlace éter y otra unidad β -D-glucosilo en la posición C-19 en forma de un enlace éster, dejando la asignación de la cuarta unidad estructural β -D-glucosilo (Figura 17). El desplazamiento de campo descendente para los desplazamientos químicos ^1H y ^{13}C en la posición 2 del azúcar I de la unidad estructural β -D-glucosilo apoyó la presencia de la unidad β -D-glucosilo en esta posición. La estructura fue apoyada además por las correlaciones clave TOCSY y HMBC como se muestra en la figura 18. Sobre la base de los resultados de la RMN y de los datos del espectro de masas, así como de los estudios de hidrólisis, la estructura de Reb V producida por la conversión enzimática de Reb G se dedujo como éster -(2-O- β -D-glucopiranosil- β -D-glucopiranosilo) del ácido 13-[(3-O- β -D-glucopiranosil- β -D-glucopiranosil)oxi] ent-kaur-16-en-19-oico.

15 Hidrólisis ácida de Reb V. A una solución de Reb V (5 mg) en MeOH (10 ml) se añadieron 3 ml de H_2SO_4 al 5% y la mezcla se calentó a reflujo durante 24 horas. La mezcla de reacción se neutralizó luego con carbonato de sodio saturado y se extrajo con acetato de etilo (EtOAc) (2 x 25 ml) para dar una fracción acuosa que contenía azúcares y una

fracción de EtOAc que contenía la parte de aglicona. La fase acuosa se concentró y se comparó con los azúcares estándar usando los sistemas TLC EtOAc/n-butanol/agua (2:7:1) y CH₂Cl₂/MeOH/agua (10:6:1); los azúcares fueron identificados como D-glucosa.

5 Se disolvió hidrólisis enzimática de Reb V. Reb V (1 mg) en 10 ml de solución reguladora de acetato de sodio 0.1 M, pH 4.5 y se añadió pectinasa cruda de *Aspergillus niger* (50 µL, Sigma-Aldrich, P2736). La mezcla se agitó a 50 °C, durante 96 h. El producto precipitado durante la reacción a partir de la hidrólisis de 1 se identificó como esteviol por comparación de su TLC conjunta con compuesto estándar y datos de espectro ¹H RMN. Un compuesto llamado Reb V se confirmó como éster -(2-O-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosilo) del ácido 13-[(3-O-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil)oxi] ent-kaur-16-en-19-oico sobre la base de 1D y 2D RMN extensa, así como datos de espectros de masas de alta resolución y estudios de hidrólisis.

Ejemplo 22

En este ejemplo, la estructura de Reb W se analizó mediante RMN.

15 El material usado para la caracterización de Reb W se produjo usando la conversión enzimática de Reb V y se purificó por HPLC. Los datos HRMS se generaron con un instrumento LTQ Orbitrap Discovery HRMS, con su resolución establecida en 30k. Los datos escaneados desde m/z 150 a 1500 en modo de electroaspersión de iones positivos. El voltaje de la aguja se ajustó a 4 kV; las otras condiciones de la fuente fueron gas de protección = 25, gas auxiliar = 0, gas de barrido = 5 (todos los flujos de gas en unidades arbitrarias), voltaje capilar = 30 V, temperatura capilar = 300 °C y voltaje de la lente del tubo = 75. La muestra se diluyó con 2:2:1 acetonitrilo:metanol:agua (igual que el eluyente de infusión) e se inyectaron 50 microlitros. Los espectros de RMN se adquirieron en instrumentos Bruker Avance DRX 500 MHz o Varian INOVA 600 MHz usando secuencias de pulsos estándar. Los espectros de RMN ID (¹H y ¹³C) y 2D (TOCSY, HMQC y HMBC) se realizaron en C₅D₅N.

25 La fórmula molecular de Reb W se ha deducido como C₅₀H₈₀O₂₈ en base a su espectro de masas de alta resolución positiva (HR) que mostró iones aductos correspondientes a [M+ Na]⁺ en m/z 1151.4708; esta composición fue apoyada por los datos de espectro ¹³C RMN. Los datos de espectro ¹H RMN de Reb W mostraron la presencia de dos singletes de metilo a δ 0.92 y 1.39, dos protones olefínicos como singletes a δ 5.10 y 5.73 de un doble enlace exocíclico, nueve protones sp³ metileno y dos sp³ metino entre δ 0.72-2.72, característicos de los diterpenoides ent-kaurane aislados anteriormente del género *Stevia*. El esqueleto básico de diterpenoides ent-kaurane fue apoyado por los estudios TOCSY que mostraron correlaciones clave: H-1/H-2; H-2/H-3; H-5/H-6; H-6/H-7; H-9/H-11; H-11/H-12. El espectro de ¹H RMN de Reb W también mostró la presencia de cinco protones anoméricos resonantes a δ 5.10, 5.34, 5.41, 5.81, y 6.14; sugiriendo cinco unidades de azúcar en su estructura. La hidrólisis ácida de Reb W con H₂SO₄ al 5% produjo D-glucosa que se identificó por comparación directa con una muestra auténtica por TLC. La hidrólisis enzimática de Reb W proporcionó una aglicona que se identificó como esteviol por comparación de ¹H RMN y TLC conjunta con compuesto estándar. Las grandes constantes de acoplamiento observadas para los cinco protones anoméricos de las unidades estructurales de glucosa a δ 5.10 (d, J=7.4 Hz), 5.34 (d, J=7.9 Hz), 5.41 (d, J=7.9 Hz), 5.89 (d, J=7.9 Hz), y 6.14 (d, J=7.9 Hz), sugirieron su orientación β según lo informado para los glicósidos de esteviol [1-5, 9-13]. Los valores de ¹H y ¹³C RMN para Reb W se asignaron en base a los datos de TOCSY, HMQC y HMBC y se proporcionan en la tabla 4.

Tabla 4. Datos de espectros de ¹H y ¹³C RMN (cambios químicos y constantes de acoplamiento) para Reb W y Reb V^{a-b}.

Posición	Reb W		Reb V	
	¹ H RMN	¹³ C RMN	¹ H RMN	¹³ C RMN
1	0.72 m, 1.67 m	41.0	0.78 m, 1.69 m	41.1
2	1.42 m, 2.18 m	20.4	1.44 m, 2.20 m	20.4
3	1.06 m, 2.72 d (13.4)	38.6	1.05 m, 2.70 d (11.6)	38.4
4	---	44.8	---	44.8
5	1.34 m	57.9	1.32 m	57.9
6	1.84 m, 2.18 m	22.8	1.87 m, 2.24 m	22.7
7	1.07 m, 1.69 m	42.3	1.07 m, 1.72 m	42.2
δ	---	42.4	---	42.5
9	0.90 d (5.8)	54.5	0.92 d (7.6)	54.5
10	---	40.1	---	40.2

ES 2 693 371 T3

11	1.66 m	21.0	1.75 m	21.0
12	2.20 m, 2.39 m	38.3	2.26 m, 2.38 m	38.3
13	---	87.8	---	87.6
14	1.63 m, 2.06 m	44.8	1.78 m, 2.50 m	44.8
15	2.06 m, 2.04 m	48.8	2.06 m, 2.32 m	48.9
16	---	153.5	---	153.7
17	5.10 s, 5.73 s	105.9	5.00 s, 5.49 s	105.7
18	1.39 s	29.4	1.32 s	29.6
19	---	176.5	---	176.4
20	0.92 s	16.6	1.25 s	16.7
1'	6.14 d (7.9)	94.1	6.16 d (7.6)	94.2
2'	3.98 m	79.6	4.01 m	80.7
3'	4.20 m	88.9	4.09 m	79.3
4'	4.34 m	70.0	4.34 m	71.2
5'	4.24 m	79.4	4.22 m	79.9
6'	4.02 m, 4.39	62.6	4.04 m, 4.44 dd (3.2, 7.6)	62.6
1"	5.10 d (7.4)	99.5	5.06 d (7.4)	99.6
2"	3.90 m	74.7	3.92 m	74.7
3"	4.04 m	89.3	4.06 m	89.3
4"	4.25 m	70.4	4.23 m	70.3
5"	3.98 m	78.6	4.02 m	78.2
6"	4.27 m, 4.54 m	62.9	4.27 m, 4.56 dd (2.8, 8.4)	63.0
1'''	5.34 d (7.9)	106.3	5.27 d (8.4)	106.4
2'''	4.12 m	76.1	4.14 m	76.1
3'''	4.33 m	79.2	4.37 m	79.2
4'''	4.25 m	72.1	4.28 m	72.2
5'''	3.88 m	78.8	3.89 m	78.8
6'''	4.16 m, 4.53 m	63.0	4.18 m, 4.48 m	63.2
1''''	5.41 d (7.9)	105.3	5.27 d (8.4)	105.7
2''''	4.12 m	73.4	4.14 m	76.5
3''''	4.28 m	88.9	4.37 m	79.6
4''''	4.20 m	72.1	4.28 m	72.5
5''''	3.78 m	79.0	3.89 m	79.0
6''''	4.08 m, 4.42 m	62.9	4.18 m, 4.48 m	63.5
1'''''	5.81 d (7.9)	104.0		

2 ^{''''}	4.09 m	77.2		
3 ^{''''}	4.24 m	79.3		
4 ^{''''}	4.14 m	72.0		
5 ^{''''}	3.76 m	79.2		
6 ^{''''}	4.04 m, 4.36 m	62.3		
^a asignación realizada en base a las correlaciones TOCSY, HMQC y HMBC; ^b Los valores de desplazamiento químico están en δ (ppm); ^c Las constantes de acoplamiento están en Hz.				

En base a los resultados de los datos de espectro RMN y los experimentos de hidrólisis de Reb W, se concluyó que hay cinco unidades de β -D-glucosilo en su estructura conectadas al aglicona esteviol. Una comparación cercana de los valores de ^1H y ^{13}C RMN de RebW con Reb V sugirió la presencia de una unidad estructural aglicona de esteviol con una unidad 3-O- β -D-glucobiosilo en C-13 en forma de enlace éter y una unidad 2-O- β -D-glucobiosilo en la posición C-19 en forma de un enlace éster, dejando la asignación de la quinta unidad estructural β -D-glucosilo (Figura 19). El cambio de campo descendente para los cambios químicos ^1H y ^{13}C en la posición 3 del azúcar I de la unidad estructural β -D-glucosilo apoyó la presencia de la unidad β -D-glucosilo en esta posición. La estructura fue apoyada además por las correlaciones clave TOCSY y HMBC como se muestra en la figura 20. Sobre la base de los resultados de la RMN y de los datos del espectro de masas, así como de los estudios de hidrólisis, la estructura de Reb W producida por la conversión enzimática de Reb V se dedujo como éster -[(2-O- β -Dglucopiranosil-3-O- β -D-glucopiranosil- β -D-glucopiranosilo) del ácido 13-[(3-O- β -D-glucopiranosil- β -D-glucopiranosil)oxi] ent-kaur-16-en-19-oico.

Hidrólisis ácida de Reb W. A una solución de Reb W (5 mg) en MeOH (10 ml) se añadieron 3 ml de H_2SO_4 al 5% y la mezcla se calentó a reflujo durante 24 horas. La mezcla de reacción se neutralizó luego con carbonato de sodio saturado y se extrajo con acetato de etilo (EtOAc) (2 x 25 ml) para dar una fracción acuosa que contenía azúcares y una fracción de EtOAc que contenía la parte de aglicona. La fase acuosa se concentró y se comparó con los azúcares estándar usando los sistemas TLC EtOAc/n-butanol/agua (2:7:1) y $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{agua}$ (10:6:1); los azúcares fueron identificados como D-glucosa.

Hidrólisis enzimática de Reb W. Se disolvió Reb W (1 mg) en 10 ml de solución reguladora de acetato de sodio 0.1 M, pH 4.5 y se añadió pectinasa cruda de *Aspergillus niger* (50 μL , Sigma-Aldrich, P2736). La mezcla se agitó a 50 $^\circ\text{C}$, durante 96 h. El producto precipitó durante la reacción y se filtró y luego se cristalizó. El producto resultante obtenido de la hidrólisis de Reb W se identificó como esteviol mediante la comparación de su TLC conjunta con el compuesto estándar y los datos de espectro ^1H RMN. Un compuesto llamado Reb W se confirmó como éster-[(2-O- β -D-glucopiranosil-3-O- β -D-glucopiranosil- β -D-glucopiranosilo) del ácido 13-[(3-O- β -D-glucopiranosil- β -D-glucopiranosil)oxi] ent-kaur-16-en-19-oico, sobre la base de la 1D y 2D RMN extensa, así como de los datos de espectros de masas de alta resolución y los estudios de hidrólisis.

Después del análisis de RMN, las estructuras de Reb V y Reb W se identificaron como nuevos glicósidos de esteviol. Los resultados anteriores demostraron además que UGT76G1 no solo tiene una actividad de glicosilación de 1,3-13-O-glucosa sino también una actividad de glicosilación de 1,3-19-O-glucosa.

30 Ejemplo 23

En este ejemplo, la estructura de Reb M se analizó por RMN.

El material usado para la caracterización de Reb M se produjo a partir de la conversión enzimática de Reb D y se purificó por HPLC. Los datos HRMS se generaron con un instrumento LTQ Orbitrap Discovery HRMS, con su resolución establecida en 30k. Los datos escaneados desde m/z 150 a 1500 en modo de electroaspersión de iones positivos. El voltaje de la aguja se ajustó a 4 kV; las otras condiciones de la fuente fueron gas de protección = 25, gas auxiliar = 0, gas de barrido = 5 (todos los flujos de gas en unidades arbitrarias), voltaje capilar = 30 V, temperatura capilar = 300 $^\circ\text{C}$ y voltaje de la lente del tubo = 75. La muestra se diluyó con 2:2:1 acetonitrilo:metanol:agua (igual que el eluyente de infusión) y se inyectaron 50 microlitros.

Los espectros de RMN se adquirieron en instrumentos Bruker Avance DRX 500 MHz o Varian INOVA 600 MHz usando secuencias de pulsos estándar. Los espectros de RMN 1D (^1H y ^{13}C) y 2D (COSY, HMQC y HMBC) se realizaron en $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

La fórmula molecular del compuesto Reb M se ha deducido como $\text{C}_{56}\text{H}_{90}\text{O}_{33}$ sobre la base de su espectro de masas de alta resolución positiva (HR) que mostró un ion $[\text{M}+\text{NH}_4+\text{CH}_3\text{CN}]^+$ en m/z 1349.5964; esta composición fue apoyada por los datos de espectro ^{13}C RMN. El espectro de ^1H RMN de Reb M mostró la presencia de dos singletes de metilo a δ 1.35 y 1.42, dos protones olefínicos como singletes a δ 4.92 y 5.65 de un doble enlace exocíclico, nueve protones de

metileno y dos metinos entre δ 0.77-2.77 característicos para los diterpenoides ent-kaurane aislados anteriormente del género *Stevia*. El esqueleto básico de diterpenoides ent-kaurane fue apoyado por correlaciones COSY (H-1/H-2; H-2/H-3; H-5/H-6; H-6/H-7; H-9/H-11; H-11/H-12) y HMBC (H-1/C-2, C-10; H-3/C-1, C-2, C-4, C-5, C-18, C-19; H-5/C-4, C-6, C-7, C-9, C-10, C-18, C-19, C-20; H-9/C-8, C-10, C-11, C-12, C-14, C-15; H-14/C-8, C-9, C-13, C-15, C-16 y H-17/C-13, C-15, C-16). El espectro de ^1H RMN de Reb M también mostró la presencia de protones anoméricos resonantes a δ 5.33, 5.47, 5.50, 5.52, 5.85, y 6.43; Sugiriendo seis unidades de azúcar en su estructura. La hidrólisis enzimática de Reb M proporcionó una aglicona que se identificó como esteviol por comparación de TLC conjunta con compuesto estándar. La hidrólisis ácida de Reb M con H_2SO_4 al 5% produjo glucosa que se identificó por comparación directa con muestras auténticas mediante TLC. Los valores de ^1H RMN y ^{13}C para protones y carbonos seleccionados en Reb M se asignaron en base a las correlaciones TOCSY, HMQC y HMBC (Tabla 5).

En base a los resultados de los datos de espectro RMN de Reb M, se concluyó que hay seis unidades de glucosilo en su estructura (figura 26). Una comparación cercana del espectro de ^1H y ^{13}C RMN de Reb M con rebaudiósido D sugirió que Reb M también es un glicósido de esteviol que tiene tres residuos de glucosa que están unidos en el hidroxilo C-13 como un sustituyente glucotriosilo 2,3-ramificado y la unidad estructural glucobiosilo 2-sustituida en forma de un éster en C-19 que deja la asignación de la unidad estructural glucosilo adicional. Las correlaciones clave de TOCSY y HMBC mostradas en la figura 27 sugirieron la colocación de la sexta unidad estructural glucosilo en la posición C-3 del azúcar I. Las constantes de acoplamiento grandes observadas para los seis protones anoméricos de las unidades estructurales de glucosa en δ 5.33 (d, $J=8.4$ Hz), 5.47 (d, $J=7.8$ Hz), 5.50 (d, $J=7.4$ Hz), 5.52 (d, $J=7.4$ Hz), 5.85 (d, $J=7.4$ Hz) y 6.43 (d, $J=7.8$ Hz), sugirió su orientación β según lo informado para los glicósidos de esteviol. Sobre la base de los resultados de los estudios de RMN y de espectros de masas y en comparación con los valores de espectro de rebaudiósido M reportados en la literatura, la estructura de Reb M producida por la reacción enzimática se asignó como el éster -[(2-O- β -D-glucopiranosil-3-O- β -D-glucopiranosil- β -D-glucopiranosilo) del ácido 13-[(2-O- β -D-glucopiranosil-3-O- β -D-glucopiranosil- β -D-glucopiranosil)oxi] ent-kaur-16-en-19-oico.

Tabla 5. Los datos de espectros de ^1H y ^{13}C RMN (cambios químicos y constantes de acoplamiento) para Reb M producidos por la reacción enzimática^{a-c}.

Posición	^1H RMN	^{13}C RMN
1	0.77 t (12.4), 1.78 m	40.7
2	1.35 m, 2.24 m	20.0
3	1.01 m, 2.32 m	38.8
4	---	44.7
5	1.08 d (12.4)	57.8
6	2.23 m, 2.45 q (12.8)	23.9
7	1.44 m, 1.83 m	43.0
8	---	41.6
9	0.93 d (7.4)	54.7
10	---	40.1
11	1.68 m, 1.82 m	20.7
12	1.86 m, 2.28 m	38.8
13	---	88.0
14	2.04 m, 2.77 m	43.7
15	1.91 m, 2.03 m	46.8
16	---	153.8
17	4.92 s, 5.65 s	105.2
18	1.35 s	28.7
19	---	177.4

ES 2 693 371 T3

20	1.42 s	17.2
1'	6.43 d (7.8)	95.4
2'	4.54 m	77.3
3'	4.58 m	89.1
4'	4.22 m	70.5
5'	4.16 m	78.8
6'	4.18 m, 4.35 m	62.1
1"	5.50 d (7.4)	96.7
2"	4.19 m	81.9
3"	5.03 m	88.4
4"	4.12 m	70.8
5"	3.98 m	78.1
6"	4.22 m, 4.36 m	62.9
1'''	5.52 d (7.4)	105.4
2'''	4.24 m	76.0
3'''	4.16 m	78.9
4'''	4.02 m	73.6
5'''	3.78 ddd (2.8, 6.4, 9.4)	78.0
6'''	4.32 m, 4.54 m	64.4
1''''	5.47 d (7.8)	104.4
2''''	4.00 m	75.9
3''''	4.40 m	78.2
4''''	4.12 m	71.6
5''''	3.96 m	78.4
6''''	4.20 m, 4.32 m	62.5
1'''''	5.85 d (7.4)	104.7
2'''''	4.20 m	75.9
3'''''	4.30 m	78.9
4'''''	4.14 m	73.7
5'''''	3.94 ddd (2.8, 6.4, 9.9)	78.3
6'''''	4.32 m, 4.67 d (10.6)	64.4
1''''''	5.33 d (8.4)	104.6
2''''''	3.98 m	76.2
3''''''	4.43 m	78.5
4''''''	4.16 m	71.7

5 ^{''''}	3.88 ddd (2.1, 6.4, 9.4)	78.9
6 ^{''''}	4.10 m, 4.35 m	62.5
^a asignaciones hechas sobre la base de las correlaciones TOCSY, HSQC y HMBC; ^b Los valores de desplazamiento químico están en δ (ppm); ^c Las constantes de acoplamiento están en Hz.		

5 Hidrólisis ácida del compuesto 1: A una solución de Reb M producido (5 mg) en MeOH (10 ml) se le añadieron 3 ml de H₂SO₄ al 5% y la mezcla se calentó a reflujo durante 24 horas. La mezcla de reacción se neutralizó luego con carbonato de sodio saturado y se extrajo con acetato de etilo (EtOAc) (2 x 25 ml) para dar una fracción acuosa que contenía azúcares y una fracción de EtOAc que contenía la parte de aglicona. La fase acuosa se concentró y se comparó con los azúcares estándar usando los sistemas TLC EtOAc/n-butanol/agua (2:7:1) y CH₂Cl₂/MeOH/agua (10:6:1); los azúcares fueron identificados como D-glucosa.

10 Hidrólisis enzimática del compuesto: Se disolvió Reb M obtenido (1 mg) en 10 ml de solución reguladora de acetato de sodio 0.1 M, pH 4.5 y se añadió pectinasa cruda de *Aspergillus niger* (50 uL, Sigma-Aldrich, P2736). La mezcla se agitó a 50 °C, durante 96 h. El producto precipitado durante la reacción a partir de la hidrólisis de 1 se identificó como esteviol por comparación de su TLC conjunta con compuesto estándar y datos de espectro ¹H RMN.

15 Se obtuvo un compuesto denominado rebaudiósido M (Reb M) mediante bioconversión. Las asignaciones de espectros completas de ¹H y ¹³C RMN para el rebaudiósido M (Reb M) se realizaron sobre la base de una RMN 1D y 2D extensa, así como datos de espectros de masas de alta resolución, que sugirieron la estructura como éster -[(2-O- β -D-glucopiranosil-3-O- β -D-glucopiranosil- β -D-glucopiranosilo) del ácido 13-[(2-O- β -D-glucopiranosil-3-O- β -D-glucopiranosil- β -D-glucopiranosil)oxi] *ent*-kaur-16-en-19-oico.

Ejemplo 24

En este ejemplo, se discute la ruta de biosíntesis de los glicósidos de esteviol.

20 La figura 21 es un esquema que ilustra las nuevas rutas de biosíntesis de glicósidos de esteviol a partir de rubusósido. Como se describe en este documento, el polipéptido HV1 recombinante ("HV1") contiene una actividad de glicosilación de 1,2-O-glucosa que transfiere una segunda unidad estructural de glucósido al C-2' de 19-O-glucosa de rubusósido para producir el rebaudiósido KA ("Reb KA"); el polipéptido EUGT11 recombinante ("EUGT11") contiene una actividad de glicosilación de 1,2-O-glucosa que transfiere una segunda unidad estructural de glucosa al C-2' de 19-O-glucosa de rubusósido para producir el rebaudiósido KA; o transfiere una segunda unidad estructural de glucosa a la C-2' de 13-O-glucosa de rubusósido para producir esteviósido; la enzima UGT76G1 recombinante ("UGT76G1") contiene una actividad de glicosilación de 1,3-O-glucosa que transfiere una segunda unidad estructural de glucosa al C-3' de 13-O-glucosa de rubusósido para producir el rebaudiósido G ("Reb G"). Tanto HV1 como EUGT11 transfieren una segunda unidad estructural de azúcar al C-2' de 19-O-glucosa del rebaudiósido G para producir el rebaudiósido V ("Reb V"), o transfieren una segunda unidad estructural de glucosa al C-2' de 13-O-glucosa del rebaudiósido KA para producir el rebaudiósido E ("Reb E"). La figura 21 también muestra que una enzima UGT76G1 recombinante cataliza la reacción que transfiere la tercera unidad estructural de azúcar a C-3' de la C-19-O-glucosa del rebaudiósido V para producir el rebaudiósido W ("Reb W") y EUGT11 puede transferir continuamente la tercera unidad estructural de glucosa a C-6' de la C-13-O-glucosa de rebaudiósido E para producir el rebaudiósido D2. El HV1 puede transferir la tercera unidad estructural de glucosa a C-2' de la C-13-O-glucosa del rebaudiósido E para producir el rebaudiósido Z1 ("Reb Z1"), y puede transferir la tercera unidad estructural de glucosa a C-2' de la C-19-O-glucosa del rebaudiósido E para producir el rebaudiósido Z2 ("Reb Z2"). Tanto HV1 como EUGT11 pueden catalizar la conversión de esteviósido a Reb E y la conversión de rebaudiósido A ("Reb A") a rebaudiósido D ("Reb D"). La UGT76G1 puede transferir la tercera unidad estructural de glucosa a C-3' de la C-13-O-glucosa del rebaudiósido E ("Reb E") para formar el rebaudiósido D ("Reb D"). La UGT76G1 también cataliza la conversión de esteviósido en rebaudiósido A ("Reb A") y la conversión de rebaudiósido D ("Reb D") en rebaudiósido M ("Reb M").

Lista de secuencias

<110> Conagen Inc.

Mao, Guohong

Yu, Xiaodan

45 Luo, Yang

Lin, Ying

<120> Edulcorantes no calóricos y métodos de síntesis

<130> 32559-48
 <160> 12
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 5 <211> 458
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Sintética
 10 <400> 1

```

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
    
```


ES 2 693 371 T3

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

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

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

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

<210> 2

<211> 1377

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 2

ES 2 693 371 T3

```

atggagaata agacagaaac aaccgtaaga cggaggcggga ggattatcct gttccctgta      60
ccatttcagg gccatattaa tccgatcctc caattagcaa acgtcctcta ctccaaggga      120
tttcaataa caatcttcca tactaacttt aacaagccta aaacgagtaa ttatcctcac      180
tttacattca ggttcattct agacaacgac cctcaggatg agcgtatctc aaatttacct      240
acgcatggcc ccttggcagg tatgcaata ccaataatca atgagcatgg agccgatgaa      300
ctcogtogcg agttagagct totcatgctc gcaagtgagg aagacgagga agtttcgtgc      360
ctaataactg atgcgctttg gtacttcgcc caatcagtcg cagactcact gaatctacgc      420
cgtttgggcc ttatgacaag ttcattatc aactttcaag cacatgtatc actgccgcaa      480
tttgacgagt tgggttacct ggaccggat gacaaaacgc gattggagga acaagcgtcg      540
ggcttcccca tgctgaaagt caaagatatt aagagcgtt atagtaattg gcaaattctg      600
aaagaaattc tcggaaaaat gataaagcaa accaaagcgt cctctggagt aatctggaac      660
tccttcaagg agttagagga atctgaactt gaaacggtca tcagagaaat ccccgctccc      720
tcgtttctaa ttccactacc caagcacctt actgcaagta gcagttccct cctagatcat      780
gaccgaaccg tgtttcagtg gctggatcag caacccccgt cgtcagttct atatgtaagc      840
tttgggagta cttcggaaagt ggatgaaaag gacttcttag agattgcgcg agggctcgtg      900
gatagcaaac agagcttcct gtgggtagtg agaccgggat tcgttaaggg ctcgacgtgg      960
gtcgagccgt tgccagatgg ttttctaggg gagagagggga gaatcgtgaa atgggttcca     1020
cagcaagagg ttttggctca cggagctata ggggcctttt ggaccactc tggttggaat     1080
tctactcttg aaagtgtctg tgaaggcgtt ccaatgatat tttctgattt tgggcttgac     1140
cagcctctaa acgctcgcta tatgtctgat gtgttgaagg ttggcgtgta cctggagaat     1200
ggttgggaaa ggggggaaat tgccaacgcc atacccggg taatggtgga cgaggaaggt     1260
gagtacatac gtcagaacgc togggtttta aaacaaaag cggacgtcag ccttatgaag     1320
ggaggtagct cctatgaatc cctagaatcc ttggtaaact atatatcttc gttataa       1377

```

<210> 3

<211> 462

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 3

ES 2 693 371 T3

Met Asp Ser Gly Tyr Ser Ser Ser Tyr Ala Ala Ala Ala Gly Met His
 1 5 10 15

Val Val Ile Cys Pro Trp Leu Ala Phe Gly His Leu Leu Pro Cys Leu
 20 25 30

Asp Leu Ala Gln Arg Leu Ala Ser Arg Gly His Arg Val Ser Phe Val
 35 40 45

Ser Thr Pro Arg Asn Ile Ser Arg Leu Pro Pro Val Arg Pro Ala Leu
 50 55 60

Ala Pro Leu Val Ala Phe Val Ala Leu Pro Leu Pro Arg Val Glu Gly
 65 70 75 80

Leu Pro Asp Gly Ala Glu Ser Thr Asn Asp Val Pro His Asp Arg Pro
 85 90 95

Asp Met Val Glu Leu His Arg Arg Ala Phe Asp Gly Leu Ala Ala Pro
 100 105 110

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

Val Phe His His Trp Ala Ala Ala Ala Ala Leu Glu His Lys Val Pro
 130 135 140

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

Asp Arg Arg Leu Glu Arg Ala Glu Thr Glu Ser Pro Ala Ala Ala Gly
 165 170 175

ES 2 693 371 T3

Gln Gly Arg Pro Ala Ala Ala Pro Thr Phe Glu Val Ala Arg Met Lys
 180 185 190

Leu Ile Arg Thr Lys Gly Ser Ser Gly Met Ser Leu Ala Glu Arg Phe
 195 200 205

Ser Leu Thr Leu Ser Arg Ser Ser Leu Val Val Gly Arg Ser Cys Val
 210 215 220

Glu Phe Glu Pro Glu Thr Val Pro Leu Leu Ser Thr Leu Arg Gly Lys
 225 230 235 240

Pro Ile Thr Phe Leu Gly Leu Met Pro Pro Leu His Glu Gly Arg Arg
 245 250 255

Glu Asp Gly Glu Asp Ala Thr Val Arg Trp Leu Asp Ala Gln Pro Ala
 260 265 270

Lys Ser Val Val Tyr Val Ala Leu Gly Ser Glu Val Pro Leu Gly Val
 275 280 285

Glu Lys Val His Glu Leu Ala Leu Gly Leu Glu Leu Ala Gly Thr Arg
 290 295 300

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

Leu Pro Ala Gly Phe Glu Glu Arg Thr Arg Gly Arg Gly Val Val Ala
 325 330 335

Thr Arg Trp Val Pro Gln Met Ser Ile Leu Ala His Ala Ala Val Gly
 340 345 350

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

Phe Gly His Pro Leu Ile Met Leu Pro Ile Phe Gly Asp Gln Gly Pro
 370 375 380

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

Asn Asp Gly Asp Gly Ser Phe Asp Arg Glu Gly Val Ala Ala Ala Ile
 405 410 415

Arg Ala Val Ala Val Glu Glu Glu Ser Ser Lys Val Phe Gln Ala Lys
 420 425 430

Ala Lys Lys Leu Gln Glu Ile Val Ala Asp Met Ala Cys His Glu Arg
 435 440 445

Tyr Ile Asp Gly Phe Ile Gln Gln Leu Arg Ser Tyr Lys Asp
 450 455 460

ES 2 693 371 T3

<211> 1389

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Sintética

<400> 4

```

atggattcgg gttactcttc ctccatgcg gggctgagg gtatgcacgt tgttatctgt      60
ccgtggctgg cttttggtca cctgctgccg tgcctggatc tggcacagcg tctggcttca      120
cgcgcccatc gtgtcagctt cgtgtctacc ccgcgcaata ttccgctct gccgccggtt      180
cgtccggcac tggctccgct ggttgcatth gtcgctctgc cgtgcccgcg cgtggaaggt      240
ctgccggatg gtgcggaaag taccaacgac gtcccgcatg atcccccga catggttgaa      300
ctgcaccgtc gtgcattoga tggctctggca gcaccgtttt ccgaatttct gggtagcgcg      360
tgcccgatt gggatgatcg tgacgtcttt catcactggg cggcgggggc ggcgctggaa      420
cataaagttc cgtgtgcaat gatgctgctg ggctcagctc acatgattgc gtcgatcgca      480
gaccgtgcc tggaacgtgc agaaaccgaa agtccggctg cggccggcca gggtcgcccg      540
gcagctggc cgaccttoga agtggccgc atgaaactga ttctacgaa aggcagctct      600
ggtatgagcc tggcagaacg ctttagtctg accctgtccc gtagttccct ggtggttgg      660
cgcagttgag ttgaatttga accggaaacc gtcccgtgc tgtccacgct gcgtggtaaa      720
ccgatcaact ttctgggtct gatgccgccc ctgatgaag gccgtcgca agatggtgaa      780
gacgcaacgg tgcgttggct ggatgcacag ccggctaaaa gcgtcgtgta tgtcgccctg      840
ggctctgaag tgccgctggg tgtggaaaaa gttcacgaac tggcactggg cctggaactg      900
gctggcaccg gtttctctg ggcactgctg aaaccgacgg gtgtgagcga tgcggacctg      960
ctgccggccg gttttgaaga acgtaccgc ggccgtggtg ttgtcgcaac gcgttgggtc     1020
ccgcaaatga gcattctggc gcattgccca gtggcgccct ttctgacca ctgtggttgg     1080
aacgacacga tcgaaggcct gatgtttggt caccgctga ttatgctgcc gatcttcggc     1140
gatcagggtc cgaacgcacg tctgattgaa gcgaaaaatg ccggcctgca agttgcgccc     1200
aacgatggcg acggttcttt cgaccgtgag ggtgtggctg cggccattcg cgcagtggct     1260
gttgaagaag aatcatcgaa agtttttcag gcgaaagcca aaaaactgca agaaatcgtc     1320
gcggatatgg cctgccacga acgctacatt gatggtttca ttcagcaact gcgctcctac     1380

aaagactaa                                                                 1389

```

<210> 5

<211> 459

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 693 371 T3

<223> Sintética

<400> 5

Met Asp Gly Asn Ser Ser Ser Ser Pro Leu His Val Val Ile Cys Pro
 1 5 10 15

Trp Leu Ala Leu Gly His Leu Leu Pro Cys Leu Asp Ile Ala Glu Arg
 20 25 30

Leu Ala Ser Arg Gly His Arg Val Ser Phe Val Ser Thr Pro Arg Asn
 35 40 45

Ile Ala Arg Leu Pro Pro Leu Arg Pro Ala Val Ala Pro Leu Val Asp
 50 55 60

Phe Val Ala Leu Pro Leu Pro His Val Asp Gly Leu Pro Glu Gly Ala
 65 70 75 80

Glu Ser Thr Asn Asp Val Pro Tyr Asp Lys Phe Glu Leu His Arg Lys
 85 90 95

Ala Phe Asp Gly Leu Ala Ala Pro Phe Ser Glu Phe Leu Arg Ala Ala
 100 105 110

Cys Ala Glu Gly Ala Gly Ser Arg Pro Asp Trp Leu Ile Val Asp Thr
 115 120 125

Phe His His Trp Ala Ala Ala Ala Ala Val Glu Asn Lys Val Pro Cys
 130 135 140

Val Met Leu Leu Leu Gly Ala Ala Thr Val Ile Ala Gly Phe Ala Arg
 145 150 155 160

Gly Val Ser Glu His Ala Ala Ala Ala Val Gly Lys Glu Arg Pro Ala
 165 170 175

Ala Glu Ala Pro Ser Phe Glu Thr Glu Arg Arg Lys Leu Met Thr Thr
 180 185 190

Gln Asn Ala Ser Gly Met Thr Val Ala Glu Arg Tyr Phe Leu Thr Leu

ES 2 693 371 T3

<210> 6

<211> 1380

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Sintética

<400> 6

```

atggatggta actcctcctc ctccgctgtg catgtggta tttgtccgtg gctggctctg      60
ggtcacctgc tgcctgtctt ggatattgct gaacgtctgg cgtcacgcgg ccatcgtgtc     120
agttttgtgt ccaccccgcg caacattgcc cgtctgccgc cgctgcgtcc ggctgttgca     180
ccgctgggtg atttcgtcgc actgccgctg ccgcatgttg acggctctgcc ggagggtgcg     240
gaatcgacca atgatgtgcc gtatgacaaa ttgaaactgc accgtaaggc gttcogatgtt     300
ctggcggccc cgttttagcga atttctgcgt gcagcttgcg cagaagggtc aggttctcgc     360
ccggattggc tgattgtgga caccttcat cactgggcgg cggcggcggc ggtgaaaaac     420
aaagtgccgt gtgttatgct gctgctgggt gcagcaacgg tgatcgtctg tttcgcgcgt     480
ggtgttagcg aacatgcggc ggcggcgggt ggtaaagaac gtccggctgc ggaagccccg     540
agttttgaaa ccgaacgtcg caagctgatg accacgcaga atgcctccgg catgaccgtg     600
gcagaacgct atttcctgac gctgatgcgt agcgatctgg ttgccatccg ctcttgcgca     660
gaatgggaac cggaaagcgt ggcagcactg accacgctgg caggtaaacc ggtggttccg     720
ctgggtctgc tgcgcgcgag tccggaaggc ggtcgtggcg tttccaaaga agatgctgcg     780
gtccgttggc tggacgcaca gccggcaaag tcagtcgtgt acgtgcact gggttcggaa     840
gtcccgctgc gtgcggaaca agttcacgaa ctggcactgg gcctggaact gagcgtgctt     900
cgctttctgt gggcgtctcg taaaccgacc gatgcaccgg acgccgcagt gctgccgcgg     960
ggtttcgaag aacgtaccog cggccgtggt ctggttgtca cgggttgggt gccgcagatt    1020
ggcgttctgg ctcatggtgc ggtggctgcg tttctgacce actgtggctg gaactctacg    1080
atcgaaggcc tgctgttcgg tcatccgctg attatgctgc cgatcagctc tgatcagggc    1140
ccgaatgcgc gcctgatgga aggccgtaaa gtcggtatgc aagtgccgcg tgatgaatca    1200
gacggctcgt ttcgtcgcga agatgttgcc gcaaccgtcc gcgccgtggc agttgaagaa    1260
gacggctcgt cgtcttcac ggctaaccgg aaaaagatgc aagaaattgt ggccgatggc    1320
gcatgccacg aacgttgtat tgacggtttt atccagcaac tgcgcagtta caaggcgtga    1380

```

<210> 7

10 <211> 808

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 693 371 T3

<223> Sintética

<400> 7

Met Ala Asn Ala Glu Arg Met Ile Thr Arg Val His Ser Gln Arg Glu
 1 5 10 15

Arg Leu Asn Glu Thr Leu Val Ser Glu Arg Asn Glu Val Leu Ala Leu
 20 25 30

Leu Ser Arg Val Glu Ala Lys Gly Lys Gly Ile Leu Gln Gln Asn Gln
 35 40 45

Ile Ile Ala Glu Phe Glu Ala Leu Pro Glu Gln Thr Arg Lys Lys Leu
 50 55 60

Glu Gly Gly Pro Phe Phe Asp Leu Leu Lys Ser Thr Gln Glu Ala Ile
 65 70 75 80

Val Leu Pro Pro Trp Val Ala Leu Ala Val Arg Pro Arg Pro Gly Val
 85 90 95

Trp Glu Tyr Leu Arg Val Asn Leu His Ala Leu Val Val Glu Glu Leu
 100 105 110

Gln Pro Ala Glu Phe Leu His Phe Lys Glu Glu Leu Val Asp Gly Val
 115 120 125

Lys Asn Gly Asn Phe Thr Leu Glu Leu Asp Phe Glu Pro Phe Asn Ala
 130 135 140

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

Phe Leu Asn Arg His Leu Ser Ala Lys Leu Phe His Asp Lys Glu Ser
 165 170 175

Leu Leu Pro Leu Leu Lys Phe Leu Arg Leu His Ser His Gln Gly Lys
 180 185 190

Asn Leu Met Leu Ser Glu Lys Ile Gln Asn Leu Asn Thr Leu Gln His
 195 200 205

Thr Leu Arg Lys Ala Glu Glu Tyr Leu Ala Glu Leu Lys Ser Glu Thr
 210 215 220

ES 2 693 371 T3

Leu Tyr Glu Glu Phe Glu Ala Lys Phe Glu Glu Ile Gly Leu Glu Arg
 225 230 235 240

Gly Trp Gly Asp Asn Ala Glu Arg Val Leu Asp Met Ile Arg Leu Leu
 245 250 255

Leu Asp Leu Leu Glu Ala Pro Asp Pro Cys Thr Leu Glu Thr Phe Leu
 260 265 270

Gly Arg Val Pro Met Val Phe Asn Val Val Ile Leu Ser Pro His Gly
 275 280 285

Tyr Phe Ala Gln Asp Asn Val Leu Gly Tyr Pro Asp Thr Gly Gly Gln
 290 295 300

Val Val Tyr Ile Leu Asp Gln Val Arg Ala Leu Glu Ile Glu Met Leu
 305 310 315 320

Gln Arg Ile Lys Gln Gln Gly Leu Asn Ile Lys Pro Arg Ile Leu Ile
 325 330 335

Leu Thr Arg Leu Leu Pro Asp Ala Val Gly Thr Thr Cys Gly Glu Arg
 340 345 350

Leu Glu Arg Val Tyr Asp Ser Glu Tyr Cys Asp Ile Leu Arg Val Pro
 355 360 365

Phe Arg Thr Glu Lys Gly Ile Val Arg Lys Trp Ile Ser Arg Phe Glu
 370 375 380

Val Trp Pro Tyr Leu Glu Thr Tyr Thr Glu Asp Ala Ala Val Glu Leu
 385 390 395 400

Ser Lys Glu Leu Asn Gly Lys Pro Asp Leu Ile Ile Gly Asn Tyr Ser
 405 410 415

Asp Gly Asn Leu Val Ala Ser Leu Leu Ala His Lys Leu Gly Val Thr
 420 425 430

Gln Cys Thr Ile Ala His Ala Leu Glu Lys Thr Lys Tyr Pro Asp Ser
 435 440 445

Asp Ile Tyr Trp Lys Lys Leu Asp Asp Lys Tyr His Phe Ser Cys Gln
 450 455 460

Phe Thr Ala Asp Ile Phe Ala Met Asn His Thr Asp Phe Ile Ile Thr
 465 470 475 480

ES 2 693 371 T3

Ser Thr Phe Gln Glu Ile Ala Gly Ser Lys Glu Thr Val Gly Gln Tyr
 485 490 495

Glu Ser His Thr Ala Phe Thr Leu Pro Gly Leu Tyr Arg Val Val His
 500 505 510

Gly Ile Asp Val Phe Asp Pro Lys Phe Asn Ile Val Ser Pro Gly Ala
 515 520 525

Asp Met Ser Ile Tyr Phe Pro Tyr Thr Glu Glu Lys Arg Arg Leu Thr
 530 535 540

Lys Phe His Ser Glu Ile Glu Glu Leu Leu Tyr Ser Asp Val Glu Asn
 545 550 555 560

Lys Glu His Leu Cys Val Leu Lys Asp Lys Lys Lys Pro Ile Leu Phe
 565 570 575

Thr Met Ala Arg Leu Asp Arg Val Lys Asn Leu Ser Gly Leu Val Glu
 580 585 590

Trp Tyr Gly Lys Asn Thr Arg Leu Arg Glu Leu Ala Asn Leu Val Val
 595 600 605

Val Gly Gly Asp Arg Arg Lys Glu Ser Lys Asp Asn Glu Glu Lys Ala
 610 615 620

Glu Met Lys Lys Met Tyr Asp Leu Ile Glu Glu Tyr Lys Leu Asn Gly
 625 630 635 640

Gln Phe Arg Trp Ile Ser Ser Gln Met Asp Arg Val Arg Asn Gly Glu
 645 650 655

Leu Tyr Arg Tyr Ile Cys Asp Thr Lys Gly Ala Phe Val Gln Pro Ala
 660 665 670

Leu Tyr Glu Ala Phe Gly Leu Thr Val Val Glu Ala Met Thr Cys Gly
 675 680 685

Leu Pro Thr Phe Ala Thr Cys Lys Gly Gly Pro Ala Glu Ile Ile Val
 690 695 700

His Gly Lys Ser Gly Phe His Ile Asp Pro Tyr His Gly Asp Gln Ala
 705 710 715 720

Ala Asp Thr Leu Ala Asp Phe Phe Thr Lys Cys Lys Glu Asp Pro Ser
 725 730 735

ES 2 693 371 T3

His Trp Asp Glu Ile Ser Lys Gly Gly Leu Gln Arg Ile Glu Glu Lys
 740 745 750

Tyr Thr Trp Gln Ile Tyr Ser Gln Arg Leu Leu Thr Leu Thr Gly Val
 755 760 765

Tyr Gly Phe Trp Lys His Val Ser Asn Leu Asp Arg Leu Glu Ala Arg
 770 775 780

Arg Tyr Leu Glu Met Phe Tyr Ala Leu Lys Tyr Arg Pro Leu Ala Gln
 785 790 795 800

Ala Val Pro Leu Ala Gln Asp Asp
 805

<210> 8

<211> 2427

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 8

```

atggcaaacg ctgaacgtat gataacgcgc gtccacagcc aacgtgagcg tttgaacgaa      60
acgcttgttt ctgagagaaa cgaagtcctt gccttgcttt ccagggttga agccaaaggt      120
aaaggtatth tacaacaaaa ccagatcatt gctgaattcg aagctttgcc tgaacaaacc      180
cggaagaaac ttgaaggtgg tcctttcttt gaccttctca aatccactca ggaagcaatt      240
gtgttgccac catgggttgc tctagctgtg aggccaaggc ctggtgtttg ggaataactta      300
cgagtcaatc tccatgctct tgtcgttgaa gaactccaac ctgctgagtt tcttcatttc      360
aaggaagaac tcgttgatgg agttaagaat ggtaatttca ctcttgagct tgatttcgag      420
ccattcaatg cgtctatccc togtccaaca ctccacaaat acattggaaa tgggtgttgac      480
ttccttaacc gtcatttatc ggctaagctc ttccatgaca aggagagttt gcttccattg      540
cttaagtccc ttcgtcttca cagccaccag ggcaagaacc tgatggtgag cgagaagatt      600
cagaacctca aactctgca acacacctg aggaaagcag aagagtatct agcagagctt      660
aagtcgaaa cactgtatga agagtttgag gccaaagttg aggagattgg tcttgagagg      720
ggatggggag acaatgcaga gcggtgcctt gacatgatac gtcttctttt ggaccttctt      780
gaggcgcttg atccttgcac tcttgagact tttcttggaa gactaccaat ggtgttcaac      840
gttgtgatcc tctctccaca tggttacttt gctcaggaca atgttcttgg ttaccctgac      900
actggtggac aggttgttta cattcttgat caagttcgtg ctctggagat agagatgctt      960
    
```

ES 2 693 371 T3

```

caacgtatta agcaacaagg actcaacatt aaaccaagga ttctcattct aactcgactt 1020
ctacctgatg cggtaggaac tacatgcggt gaacgtctcg agagagttta tgattctgag 1080
tactgtgata ttcttcgtgt gcccttcaga acagagaagg gtattgttcg caaatggatc 1140
tcaaggttcg aagtctggcc atatctagag acttacaccg aggatgctgc ggttgagcta 1200
tcgaaagaat tgaatggcaa gcctgacctt atcattggta actacagtga tggaaatctt 1260
gttgcttctt tattggctca caaacttggg gtcactcagt gtaccattgc tcatgctctt 1320
gagaaaacaa agtaccgga ttctgatatc tactggaaga agcttgacga caagtacat 1380
ttctcatgcc agttcactgc ggatattttc gcaatgaacc aactgattt catcatcact 1440
agtactttcc aagaaattgc tggaagcaa gaaactggtg ggcagtatga aagccacaca 1500
gcctttactc ttcccggtt gtatcgagtt gttcacggga ttgatgtgtt tgatcccaag 1560
ttcaacattg tctctcctgg tgctgatatg agcatctact tcccttacac agaggagaag 1620
cgtagattga ctaagttcca ctctgagatc gaggagctcc tctacagcga tgttgagaac 1680
aaagagcact tatgtgtgct caaggacaag aagaagccga ttctcttcac aatggctagg 1740
cttgatcgtg tcaagaactt gtcaggtctt gttgagtggg acgggaagaa caccgccttg 1800
cgtgagctag ctaacttggg tgttggttga ggagacagga ggaagagtc aaaggacaat 1860
gaagagaaag cagagatgaa gaaaatgtat gatctcattg aggaatacaa gctaaacggt 1920
cagttcaggt ggatctctc tcagatggac cgggtaagga acggtgagct gtaccggtac 1980
atctgtgaca ccaaggggtc tttgtccaa cctgcattat atgaagcctt tgggttaact 2040
gttggtggagg ctatgacttg tggttaccg actttcgcca cttgcaaagg tgggccagct 2100
gagatcattg tgcacggtaa atcgggttc cacattgacc cttaccatgg tgatcaggct 2160
gctgatactc ttgctgattt cttcaccaag tgtaaggagg atccatctca ctgggatgag 2220
atctcaaaag gagggcttca gaggattgag gagaaataca cttggcaaat ctattcacag 2280
aggctcttga cattgactgg tgtgtatgga ttctggaagc atgtctcga ccttgaccgt 2340
cttgaggctc gcogttacct tgaaatgttc tatgcattga agtatcgccc attggctcag 2400
gctgttctc ttgcacaaga tgattga 2427

```

<210> 9

<211> 1268

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 9

```

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

```

ES 2 693 371 T3

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

ES 2 693 371 T3

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

ES 2 693 371 T3

Phe Glu Ala Leu Pro Glu Gln Thr Arg Lys Lys Leu Glu Gly Gly Pro
515 520 525

Phe Phe Asp Leu Leu Lys Ser Thr Gln Glu Ala Ile Val Leu Pro Pro
530 535 540

Trp Val Ala Leu Ala Val Arg Pro Arg Pro Gly Val Trp Glu Tyr Leu
545 550 555 560

Arg Val Asn Leu His Ala Leu Val Val Glu Glu Leu Gln Pro Ala Glu
565 570 575

Phe Leu His Phe Lys Glu Glu Leu Val Asp Gly Val Lys Asn Gly Asn
580 585 590

Phe Thr Leu Glu Leu Asp Phe Glu Pro Phe Asn Ala Ser Ile Pro Arg
595 600 605

Pro Thr Leu His Lys Tyr Ile Gly Asn Gly Val Asp Phe Leu Asn Arg
610 615 620

His Leu Ser Ala Lys Leu Phe His Asp Lys Glu Ser Leu Leu Pro Leu
625 630 635 640

Leu Lys Phe Leu Arg Leu His Ser His Gln Gly Lys Asn Leu Met Leu
645 650 655

Ser Glu Lys Ile Gln Asn Leu Asn Thr Leu Gln His Thr Leu Arg Lys
660 665 670

Ala Glu Glu Tyr Leu Ala Glu Leu Lys Ser Glu Thr Leu Tyr Glu Glu
675 680 685

Phe Glu Ala Lys Phe Glu Glu Ile Gly Leu Glu Arg Gly Trp Gly Asp
690 695 700

Asn Ala Glu Arg Val Leu Asp Met Ile Arg Leu Leu Leu Asp Leu Leu
705 710 715 720

Glu Ala Pro Asp Pro Cys Thr Leu Glu Thr Phe Leu Gly Arg Val Pro
725 730 735

Met Val Phe Asn Val Val Ile Leu Ser Pro His Gly Tyr Phe Ala Gln
740 745 750

Asp Asn Val Leu Gly Tyr Pro Asp Thr Gly Gly Gln Val Val Tyr Ile
755 760 765

ES 2 693 371 T3

Leu Asp Gln Val Arg Ala Leu Glu Ile Glu Met Leu Gln Arg Ile Lys
 770 775 780

Gln Gln Gly Leu Asn Ile Lys Pro Arg Ile Leu Ile Leu Thr Arg Leu
 785 790 795 800

Leu Pro Asp Ala Val Gly Thr Thr Cys Gly Glu Arg Leu Glu Arg Val
 805 810 815

Tyr Asp Ser Glu Tyr Cys Asp Ile Leu Arg Val Pro Phe Arg Thr Glu
 820 825 830

Lys Gly Ile Val Arg Lys Trp Ile Ser Arg Phe Glu Val Trp Pro Tyr
 835 840 845

Leu Glu Thr Tyr Thr Glu Asp Ala Ala Val Glu Leu Ser Lys Glu Leu
 850 855 860

Asn Gly Lys Pro Asp Leu Ile Ile Gly Asn Tyr Ser Asp Gly Asn Leu
 865 870 875 880

Val Ala Ser Leu Leu Ala His Lys Leu Gly Val Thr Gln Cys Thr Ile
 885 890 895

Ala His Ala Leu Glu Lys Thr Lys Tyr Pro Asp Ser Asp Ile Tyr Trp
 900 905 910

Lys Lys Leu Asp Asp Lys Tyr His Phe Ser Cys Gln Phe Thr Ala Asp
 915 920 925

Ile Phe Ala Met Asn His Thr Asp Phe Ile Ile Thr Ser Thr Phe Gln
 930 935 940

Glu Ile Ala Gly Ser Lys Glu Thr Val Gly Gln Tyr Glu Ser His Thr
 945 950 955 960

Ala Phe Thr Leu Pro Gly Leu Tyr Arg Val Val His Gly Ile Asp Val
 965 970 975

Phe Asp Pro Lys Phe Asn Ile Val Ser Pro Gly Ala Asp Met Ser Ile
 980 985 990

Tyr Phe Pro Tyr Thr Glu Glu Lys Arg Arg Leu Thr Lys Phe His Ser
 995 1000 1005

Glu Ile Glu Glu Leu Leu Tyr Ser Asp Val Glu Asn Lys Glu His
 1010 1015 1020

ES 2 693 371 T3

Leu Cys Val Leu Lys Asp Lys Lys Lys Pro Ile Leu Phe Thr Met
 1025 1030 1035

Ala Arg Leu Asp Arg Val Lys Asn Leu Ser Gly Leu Val Glu Trp
 1040 1045 1050

Tyr Gly Lys Asn Thr Arg Leu Arg Glu Leu Ala Asn Leu Val Val
 1055 1060 1065

Val Gly Gly Asp Arg Arg Lys Glu Ser Lys Asp Asn Glu Glu Lys
 1070 1075 1080

Ala Glu Met Lys Lys Met Tyr Asp Leu Ile Glu Glu Tyr Lys Leu
 1085 1090 1095

Asn Gly Gln Phe Arg Trp Ile Ser Ser Gln Met Asp Arg Val Arg
 1100 1105 1110

Asn Gly Glu Leu Tyr Arg Tyr Ile Cys Asp Thr Lys Gly Ala Phe
 1115 1120 1125

Val Gln Pro Ala Leu Tyr Glu Ala Phe Gly Leu Thr Val Val Glu
 1130 1135 1140

Ala Met Thr Cys Gly Leu Pro Thr Phe Ala Thr Cys Lys Gly Gly
 1145 1150 1155

Pro Ala Glu Ile Ile Val His Gly Lys Ser Gly Phe His Ile Asp
 1160 1165 1170

Pro Tyr His Gly Asp Gln Ala Ala Asp Thr Leu Ala Asp Phe Phe
 1175 1180 1185

Thr Lys Cys Lys Glu Asp Pro Ser His Trp Asp Glu Ile Ser Lys
 1190 1195 1200

Gly Gly Leu Gln Arg Ile Glu Glu Lys Tyr Thr Trp Gln Ile Tyr
 1205 1210 1215

Ser Gln Arg Leu Leu Thr Leu Thr Gly Val Tyr Gly Phe Trp Lys
 1220 1225 1230

His Val Ser Asn Leu Asp Arg Leu Glu Ala Arg Arg Tyr Leu Glu
 1235 1240 1245

Met Phe Tyr Ala Leu Lys Tyr Arg Pro Leu Ala Gln Ala Val Pro

ES 2 693 371 T3

1250

1255

1260

Leu Ala Gln Asp Asp
1265

<210> 10

<211> 3807

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 10

```

atggagaata agacagaaac aaccgtaaga cggaggcgga ggattatctt gttccctgta      60
ccatttcagg gccatattaa tccgatcctc caattagcaa acgtcctcta ctccaagggg      120
ttttcaataa caatcttcca tactaacttt aacaagccta aaacgagtaa ttatcctcac      180
tttacattca ggttcattct agacaacgac cctcaggatg agcgtatctc aaatttacct      240
acgcatggcc cottggcagg tatgcaata ccaataatca atgagcatgg agccgatgaa      300
ctccgtcgcg agttagagct tctcatgctc gcaagtgagg aagacgagga agtttcgtgc      360
ctaataactg atgcgctttg gtacttcgcc caatcagtcg cagactcact gaatctacgc      420
cgtttggtcc ttatgacaag ttcattattc aactttcacg cacatgtatc actgccgcaa      480
tttgacgagt tgggttacct ggaccgggat gacaaaacgc gattggagga acaagcgtcg      540
ggcttcccca tgctgaaagt caaagatatt aagagcgctt atagtaattg gcaaattctg      600
aaagaaattc tcggaaaaat gataaagcaa accaaagcgt cctctggagt aatctggaac      660
tccttcaagg agttagagga atctgaactt gaaacgggtca tcagagaaat ccccgtccc      720
tcgttcttaa ttccactacc caagcacctt actgcaagta gcagttccct cctagatcat      780
gaccgaaccg tgtttcagtg gctggatcag caacccccgt cgtcagttct atatgtaagc      840
tttgggagta cttcggaaagt ggatgaaaag gacttcttag agattgcgcg agggctcgtg      900
gatagcaaac agagcttcct gtgggtagtg agaccgggat tcgtaaggg ctcgacgtgg      960
gtcgagccgt tgccagatgg ttttctaggg gagagagggg gaatcgtgaa atgggtcca      1020
cagcaagagg ttttggtcca cggagctata ggggcctttt ggaccactc tggttggaat      1080
tctactcttg aaagtgtctg tgaaggcgtt ccaatgatat tttctgattt tgggcttgac      1140
cagcctctaa acgctcgtc tatgtctgat gtgtgaagg ttggcgtgta cctggagaat      1200
ggttgggaaa ggggggaaat tgccaacgcc atacgccggg taatggtgga cgaggaaggt      1260
gagtacatac gtcagaacgc tcgggtttta aaacaaaaag cggacgtcag ccttatgaag      1320
ggaggtagct cctatgaatc cctagaatcc ttggtaagct atatatcttc gttaggttct      1380
ggtgcaaacg ctgaacgtat gataacgcgc gtccacagcc aacgtgagcg tttgaacgaa      1440

```

10

ES 2 693 371 T3

acgcttgttt ctgagagaaa cgaagtcctt gccttgcttt ccagggttga agccaaaaggt 1500
 aaaggtatatt tacaacaaaa ccagatcatt gctgaattcg aagctttgcc tgaacaaaacc 1560
 cggaagaaac ttgaaggtgg tcctttcttt gaccttctca aatccactca ggaagcaatt 1620
 gtgttgccac catgggttgc tctagctgtg aggccaaggc ctggtgtttg ggaataactta 1680
 cgagtcaatc tccatgctct tgcgttgaa gaactccaac ctgctgagtt tcttcatttc 1740
 aaggaagaac tcgttgatgg agttaagaat ggtaatcca ctcttgagct tgatttcgag 1800
 ccattcaatg cgtctatccc tcgtccaaca ctccacaaat acattggaaa tgggtgtgac 1860
 ttccttaacc gtcatttata ggctaagctc ttccatgaca aggagagttt gcttccattg 1920
 cttaaagtcc ttogtcttca cagccaccag ggcaagaacc tgatgttgag cgagaagatt 1980
 cagaacctca acactctgca acacacctg aggaaagcag aagagtatct agcagagctt 2040
 aagtccgaaa cactgtatga agagtttgag gccaaagttg aggagattgg tcttgagagg 2100
 ggtgggggag acaatgcaga gcgtgtcctt gacatgatac gtcttctttt ggaccttctt 2160
 gaggcgctg atccttgcac tcttgagact tttcttgaa gagtaccaat ggtgttcaac 2220
 gttgtgatcc tctctccaca tggttacttt gctcaggaca atgttcttgg ttaccctgac 2280
 actggtggac aggttgttta cattcttgat caagttcgtg ctctggagat agagatgctt 2340
 caacgtatta agcaacaagg actcaacatt aaaccaagga ttctcattct aactcgactt 2400
 ctacctgatg cggtaggaac tacatgcggt gaacgtctcg agagagttta tgattctgag 2460
 tactgtgata ttcttctgtg gcccttcaga acagagaagg gtattgttcg caaatggatc 2520
 tcaaggttcg aagtctggcc atatctagag acttacaccg aggatgctgc ggttgagcta 2580
 tcgaaagaat tgaatggcaa gcctgacctt atcattggta actacagtga tggaaatctt 2640
 gttgcttctt tattggctca caaacttggg gtoactcagt gtaccattgc tcatgctctt 2700
 gagaaaacaa agtaccogga ttctgatata tactggaaga agcttgacga caagtaccat 2760
 ttctcatgcc agttcactgc ggatattttc gcaatgaacc aactgattt catcatcact 2820
 agtactttcc aagaaattgc tggaaagcaa gaaactgttg ggcagtatga aagccacaca 2880
 gcctttactc ttcccggatt gtatcgagtt gttcacggga ttgatgtgtt tgatcccaag 2940
 ttcaacattg tctctcctgg tgctgatatg agcatctact tcccttacac agaggagaag 3000
 cgtagattga ctaagttoca ctctgagatc gaggagctcc tctacagcga tgttgagaac 3060
 aaagagcact tatgtgtgct caaggacaag aagaagccga ttctcttcac aatggctagg 3120
 cttgatcgtg tcaagaactt gtcaggtctt gttgagtggg acgggaagaa caccgccttg 3180
 cgtgagctag ctaacttggg tgttggttga ggagacagga ggaaagagtc aaaggacaat 3240
 gaagagaaag cagagatgaa gaaaatgtat gatctcattg aggaatacaa gctaaacggt 3300

ES 2 693 371 T3

```

cagttcaggt ggatctcctc tcagatggac cgggtaagga acggtgagct gtaccggtac      3360
atctgtgaca ccaaggggtgc ttttgtccaa cctgcattat atgaagcctt tgggttaact      3420
gttgtggagg ctatgacttg tggtttaccg actttcgcca cttgcaaagg tgggtccagct      3480
gagatcattg tgcacggtaa atcgggtttc cacattgacc cttaccatgg tgatcaggct      3540
gctgatactc ttgctgattt cttcaccaag tgtaaggagg atccatctca ctgggatgag      3600
atctcaaaag gagggttca gaggattgag gagaaataca cttggcaaat ctattcacag      3660
aggctcttga cattgactgg tgtgtatgga ttctggaagc atgtctcgaa ccttgaccgt      3720
cttgaggctc gccgttacct tgaaatgttc tatgcattga agtatcgccc attggctcag      3780
gctgttctc  ttgcacaaga tgattga                                           3807

```

<210> 11

<211> 1272

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 11

```

Met Asp Ser Gly Tyr Ser Ser Ser Tyr Ala Ala Ala Ala Gly Met His
 1          5          10          15

Val Val Ile Cys Pro Trp Leu Ala Phe Gly His Leu Leu Pro Cys Leu
 20          25          30

Asp Leu Ala Gln Arg Leu Ala Ser Arg Gly His Arg Val Ser Phe Val
 35          40          45

Ser Thr Pro Arg Asn Ile Ser Arg Leu Pro Pro Val Arg Pro Ala Leu
 50          55          60

Ala Pro Leu Val Ala Phe Val Ala Leu Pro Leu Pro Arg Val Glu Gly
 65          70          75          80

Leu Pro Asp Gly Ala Glu Ser Thr Asn Asp Val Pro His Asp Arg Pro
 85          90          95

Asp Met Val Glu Leu His Arg Arg Ala Phe Asp Gly Leu Ala Ala Pro
100          105          110

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

Val Phe His His Trp Ala Ala Ala Ala Leu Glu His Lys Val Pro
130          135          140

```

ES 2 693 371 T3

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

Asp Arg Arg Leu Glu Arg Ala Glu Thr Glu Ser Pro Ala Ala Ala Gly
 165 170 175

Gln Gly Arg Pro Ala Ala Ala Pro Thr Phe Glu Val Ala Arg Met Lys
 180 185 190

Leu Ile Arg Thr Lys Gly Ser Ser Gly Met Ser Leu Ala Glu Arg Phe
 195 200 205

Ser Leu Thr Leu Ser Arg Ser Ser Leu Val Val Gly Arg Ser Cys Val
 210 215 220

Glu Phe Glu Pro Glu Thr Val Pro Leu Leu Ser Thr Leu Arg Gly Lys
 225 230 235 240

Pro Ile Thr Phe Leu Gly Leu Met Pro Pro Leu His Glu Gly Arg Arg
 245 250 255

Glu Asp Gly Glu Asp Ala Thr Val Arg Trp Leu Asp Ala Gln Pro Ala
 260 265 270

Lys Ser Val Val Tyr Val Ala Leu Gly Ser Glu Val Pro Leu Gly Val
 275 280 285

Glu Lys Val His Glu Leu Ala Leu Gly Leu Glu Leu Ala Gly Thr Arg
 290 295 300

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

Leu Pro Ala Gly Phe Glu Glu Arg Thr Arg Gly Arg Gly Val Val Ala
 325 330 335

Thr Arg Trp Val Pro Gln Met Ser Ile Leu Ala His Ala Val Gly
 340 345 350

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

Phe Gly His Pro Leu Ile Met Leu Pro Ile Phe Gly Asp Gln Gly Pro
 370 375 380

Asn Ala Arg Leu Ile Glu Ala Lys Asn Ala Gly Leu Gln Val Ala Arg

ES 2 693 371 T3

Leu Leu Pro Leu Leu Lys Phe Leu Arg Leu His Ser His Gln Gly Lys
 645 650 655
 Asn Leu Met Leu Ser Glu Lys Ile Gln Asn Leu Asn Thr Leu Gln His
 660 665 670
 Thr Leu Arg Lys Ala Glu Glu Tyr Leu Ala Glu Leu Lys Ser Glu Thr
 675 680 685
 Leu Tyr Glu Glu Phe Glu Ala Lys Phe Glu Glu Ile Gly Leu Glu Arg
 690 695 700
 Gly Trp Gly Asp Asn Ala Glu Arg Val Leu Asp Met Ile Arg Leu Leu
 705 710 715 720
 Leu Asp Leu Leu Glu Ala Pro Asp Pro Cys Thr Leu Glu Thr Phe Leu
 725 730 735
 Gly Arg Val Pro Met Val Phe Asn Val Val Ile Leu Ser Pro His Gly
 740 745 750
 Tyr Phe Ala Gln Asp Asn Val Leu Gly Tyr Pro Asp Thr Gly Gly Gln
 755 760 765
 Val Val Tyr Ile Leu Asp Gln Val Arg Ala Leu Glu Ile Glu Met Leu
 770 775 780
 Gln Arg Ile Lys Gln Gln Gly Leu Asn Ile Lys Pro Arg Ile Leu Ile
 785 790 795 800
 Leu Thr Arg Leu Leu Pro Asp Ala Val Gly Thr Thr Cys Gly Glu Arg
 805 810 815
 Leu Glu Arg Val Tyr Asp Ser Glu Tyr Cys Asp Ile Leu Arg Val Pro
 820 825 830
 Phe Arg Thr Glu Lys Gly Ile Val Arg Lys Trp Ile Ser Arg Phe Glu
 835 840 845
 Val Trp Pro Tyr Leu Glu Thr Tyr Thr Glu Asp Ala Ala Val Glu Leu
 850 855 860
 Ser Lys Glu Leu Asn Gly Lys Pro Asp Leu Ile Ile Gly Asn Tyr Ser
 865 870 875 880
 Asp Gly Asn Leu Val Ala Ser Leu Leu Ala His Lys Leu Gly Val Thr
 885 890 895

ES 2 693 371 T3

Gln Cys Thr Ile Ala His Ala Leu Glu Lys Thr Lys Tyr Pro Asp Ser
 900 905 910

Asp Ile Tyr Trp Lys Lys Leu Asp Asp Lys Tyr His Phe Ser Cys Gln
 915 920 925

Phe Thr Ala Asp Ile Phe Ala Met Asn His Thr Asp Phe Ile Ile Thr
 930 935 940

Ser Thr Phe Gln Glu Ile Ala Gly Ser Lys Glu Thr Val Gly Gln Tyr
 945 950 955 960

Glu Ser His Thr Ala Phe Thr Leu Pro Gly Leu Tyr Arg Val Val His
 965 970 975

Gly Ile Asp Val Phe Asp Pro Lys Phe Asn Ile Val Ser Pro Gly Ala
 980 985 990

Asp Met Ser Ile Tyr Phe Pro Tyr Thr Glu Glu Lys Arg Arg Leu Th
 995 1000 1005

Lys Phe His Ser Glu Ile Glu Glu Leu Leu Tyr Ser Asp Val Glu
 1010 1015 1020

Asn Lys Glu His Leu Cys Val Leu Lys Asp Lys Lys Lys Pro Ile
 1025 1030 1035

Leu Phe Thr Met Ala Arg Leu Asp Arg Val Lys Asn Leu Ser Gly
 1040 1045 1050

Leu Val Glu Trp Tyr Gly Lys Asn Thr Arg Leu Arg Glu Leu Ala
 1055 1060 1065

Asn Leu Val Val Val Gly Gly Asp Arg Arg Lys Glu Ser Lys Asp
 1070 1075 1080

Asn Glu Glu Lys Ala Glu Met Lys Lys Met Tyr Asp Leu Ile Glu
 1085 1090 1095

Glu Tyr Lys Leu Asn Gly Gln Phe Arg Trp Ile Ser Ser Gln Met
 1100 1105 1110

Asp Arg Val Arg Asn Gly Glu Leu Tyr Arg Tyr Ile Cys Asp Thr
 1115 1120 1125

Lys Gly Ala Phe Val Gln Pro Ala Leu Tyr Glu Ala Phe Gly Leu
 1130 1135 1140

ES 2 693 371 T3

Thr Val Val Glu Ala Met Thr Cys Gly Leu Pro Thr Phe Ala Thr
 1145 1150 1155

Cys Lys Gly Gly Pro Ala Glu Ile Ile Val His Gly Lys Ser Gly
 1160 1165 1170

Phe His Ile Asp Pro Tyr His Gly Asp Gln Ala Ala Asp Thr Leu
 1175 1180 1185

Ala Asp Phe Phe Thr Lys Cys Lys Glu Asp Pro Ser His Trp Asp
 1190 1195 1200

Glu Ile Ser Lys Gly Gly Leu Gln Arg Ile Glu Glu Lys Tyr Thr
 1205 1210 1215

Trp Gln Ile Tyr Ser Gln Arg Leu Leu Thr Leu Thr Gly Val Tyr
 1220 1225 1230

Gly Phe Trp Lys His Val Ser Asn Leu Asp Arg Leu Glu Ala Arg
 1235 1240 1245

Arg Tyr Leu Glu Met Phe Tyr Ala Leu Lys Tyr Arg Pro Leu Ala
 1250 1255 1260

Gln Ala Val Pro Leu Ala Gln Asp Asp
 1265 1270

<210> 12

<211> 3819

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Sintética

<400> 12

```

atggattcgg gttactcttc ctectatgcg gcggtcggg gtatgcacgt tgttatctgt      60
ccgtggctgg ctttttgtca cctgctgcog tgccctggatc tggcacagcg tctggcttca      120
cgcggccatc gtgtcagctt cgtgtctacc ccgcgcaata ttccgcgtct gccgcccgtt      180
cgtccggcac tggtccgct ggttgcatth gtcgctctgc cgtgcccgcg cgtggaaggt      240
ctgcccgatg gtgcggaaag taccaacgac gtgccgatg atcgcccgga catggttgaa      300
ctgcaccgtc gtgcattcga tggctctggca gcaccgtttt ccgaatttct gggtaaggcg      360
tgcccgatt gggatgatcg tgacgtcttt catcactggg cggcggcggc ggcgctggaa      420
cataaagttc cgtgtgcaat gatgctgctg ggctcagctc acatgattgc gtcgatcgca      480
    
```

ES 2 693 371 T3

gaccgtcgcc tggaacgtgc agaaaccgaa agtccggctg cggccggcca gggtcgccc 540
gcagctgogc ogacottoga agtggccogc atgaaactga ttogtaogaa aggcagctct 600
ggtatgagcc tggcagaacg ctttagtctg accctgtccc gtagtccct ggtggttgg 660
cgcagttgog ttgaatttga accggaaacc gtccogctgc tgtccacgct gcgtggtaaa 720
ccgatcacct ttctgggtct gatgccogcg ctgcatgaag gccgtogoga agatggtgaa 780
gacgcaacgg tgcgttggct ggatgcacag ccggctaaaa gcgtcgtgta tgtcgccctg 840
ggctctgaag tgcogctggg tgtggaaaaa gttcacgaac tggcactggg cctggaactg 900
gctggcaccg gcttctgtg ggcactgogt aaaccgacgg gtgtgagoga tgcggacctg 960
ctgcccggcg gttttgaaga acgtaccogc ggcogtgggt ttgtcgcaac gcgttgggtc 1020
ccgcaaatga gcattctggc gcctgccgca gtgggcgctt ttctgacca ctgtggttgg 1080
aacagcacga tcgaaggcct gatggttggc caaccogctg ttatgctgoc gatcttggc 1140
gatcagggtc cgaacgcacg tctgattgaa gcgaaaaatg ccggcctgca agttgcogc 1200
aacgatggcg acggttcttt cgaccogtgg ggtgtggctg cggccattcg cgcagtggct 1260
gttgaagaag aatcatogaa agttttcag gcgaaagcca aaaaactgca agaatogtc 1320
gcgatatgg cctgccacga acgctacatt gatggtttca ttcagcaact gcgctcctac 1380
aaagacgggt ctggtgcaaa cgtgaaact atgataacgc gcgtccacag ccaacgtgag 1440
cgtttgaacg aaacgcttgt ttctgagaga aacgaagtcc ttgccttgc ttccaggggt 1500
gaagccaaag gtaaaggtat tttacaacaa aaccagatca ttgctgaatt cgaagctttg 1560
cctgaacaaa ccggaagaa acttgaaggt ggtcctttct ttgacctct caaatccact 1620
caggaagcaa ttgtgttgc accatgggtt gctctagctg tgaggccaag gcctggtgtt 1680
tgggaatact tacgagtcaa tctccatgct cttgtcgttg aagaactcca acctgctgag 1740
ttctctcatt tcaaggaaga actogttgat ggagttaaga atgtaattt cactcttgg 1800
cttgatttgc agccattcaa tgcgtctatc cctcgtccaa cactccacaa atacattgga 1860
aatggtgttg acttccttaa ccgtcattta tcggctaagc tcttccatga caaggagagt 1920
ttgcttccat tgcttaagtt ccttctctt cacagccacc agggcaagaa cctgatgttg 1980
agcgagaaga ttcagaacct caaactctg caacacacct tgaggaaagc agaagagtat 2040
ctagcagagc ttaagtccga aacactgtat gaagagttt aggccaagtt tgaggagatt 2100
ggtcttgaga ggggatggg agacaatgca gagcgtgtcc ttgacatgat acgtctctt 2160
ttggacctt ttgagggcc tgatccttgc actcttgaga cttttcttgg aagagtacca 2220
atggtgttca acgttgtgat cctctctcca catggttact ttgctcagga caatgtctt 2280
ggttacctg aactggtgg acaggttgtt tacattctt atcaagttcg tgctctggag 2340
atagagatgc ttcaacgtat taagcaacaa ggactcaaca ttaaccaag gattctcatt 2400

ES 2 693 371 T3

ctaactcgac ttctacctga tgcggtagga actacatgcg gtgaacgtct cgagagagtt	2460
tatgattctg agtactgtga tattctctgt gtgcccttca gaacagagaa gggattgtt	2520
cgcaaatgga tctcaagggt cgaagtctgg ccatactag agacttacac cgaggatgct	2580
gcggttgagc tatcgaaaga attgaatggc aagcctgacc ttatcattgg taactacagt	2640
gatgaaatc ttgttgcttc tttattggct cacaaaactg gtgtcactca gtgtaccatt	2700
gctcatgctc ttgagaaaac aaagtaccgg gattctgata tctactggaa gaagcttgac	2760
gacaagtacc atttctcatg ccagttcact gcggatattt tcgcaatgaa ccacactgat	2820
ttcatcatca ctagtacttt ccaagaaatt gctggaagca aagaaactgt tgggcagtat	2880
gaaagccaca cagcctttac tcttcccgga ttgtatcgag ttgttcacgg gattgatgtg	2940
ttgatccca agttcaacat tgtctctcct ggtgctgata tgagcatcta cttcccttac	3000
acagaggaga agcgtagatt gactaagttc cactctgaga tcgaggagct cctctacagc	3060
gatgttgaga acaaagagca cttatgtgtg ctcaaggaca agaagaagcc gattctcttc	3120
acaatggcta ggcttgatcg tgtcaagaac ttgtcaggtc ttgttgagtg gtacgggaag	3180
aacaccogct tgcgtgagct agctaacttg gttgtgttg gaggagacag gaggaagag	3240
tcaaaggaca atgaagagaa agcagagatg aagaaaatgt atgatctcat tgaggaatac	3300
aagctaaacg gtcagttcag gtggatctcc tctcagatgg accgggtaag gaacgggtgag	3360
ctgtaccggt acatctgtga caccaagggt gcttttgtcc aacctgcatt atatgaagcc	3420
tttgggttaa ctgttgtgga ggctatgact tgtggtttac cgactttcgc cacttgcaaa	3480
ggtggtccag ctgagatcat tgtgcacggg aaatcgggtt tccacattga cccttaccat	3540
ggtgatcagg ctgctgatac tcttgctgat ttcttcacca agtgaagga ggatccatct	3600
cactgggatg agatctcaaa aggagggctt cagaggattg aggagaaata cacttggcaa	3660
atctattcac agaggctctt gacattgact ggtgtgtatg gattctggaa goatgtctcg	3720
aaccttgacc gtcttgaggc tcgccgttac cttgaaatgt tctatgcatt gaagtatcgc	3780
ccattggctc aggctgttcc tcttgcacaa gatgattga	3819

REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de rebaudiósido KA y/o rebaudiósido E a partir de rubusósido, comprendiendo el método: proporcionar una mezcla de reacción que comprende:
- (A)
- 5 (i) rubusósido,
(ii) uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa) como sustrato; y
(iii) la glicosiltransferasa HVI que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. NO 5; o
- (B)
- (i) rubusósido,
- 10 (ii) sacarosa, UDP y UDP-glucosa como sustratos y
(ii) la glicosiltransferasa HVI que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID. NO: 5 con una sacarosa sintasa
- 15 incubar la mezcla de reacción para producir el rebaudiósido KA, en el que una glucosa se acopla covalentemente al C2' de la glucosa 19-O de rubusósido para producir el rebaudiósido KA y/o rebaudiósido E, en el que la glucosa se acopla más covalentemente por dicha glicosiltransferasa al C2' de la 13-O-glucosa del rebaudiósido KA; y obtener el rebaudiósido KA de la mezcla de reacción para usar como edulcorante.
2. Un método según la reivindicación 1, en el que el rebaudiósido KA se obtiene para usar como un único edulcorante.
3. Un método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que se emplea una sacarosa sintasa seleccionada del grupo que consiste en una sacarosa sintasa 1 de *Arabidopsis*; una sacarosa sintasa 3 de *Arabidopsis*; y una sacarosa sintasa de *Vigna radiata*.
- 20 4. Un método según la reivindicación 3, en el que la sacarosa sintasa es una sacarosa sintasa 1 de *Arabidopsis thaliana*.
5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el rebaudiósido KA se proporciona en una composición edulcorante que incluye al menos uno de un relleno, un agente de carga y un agente antiaglomerante.
- 25 6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende además incorporar el rebaudiósido KA como edulcorante en un producto de consumo por vía oral, que es una bebida u otro producto de consumo por vía oral.

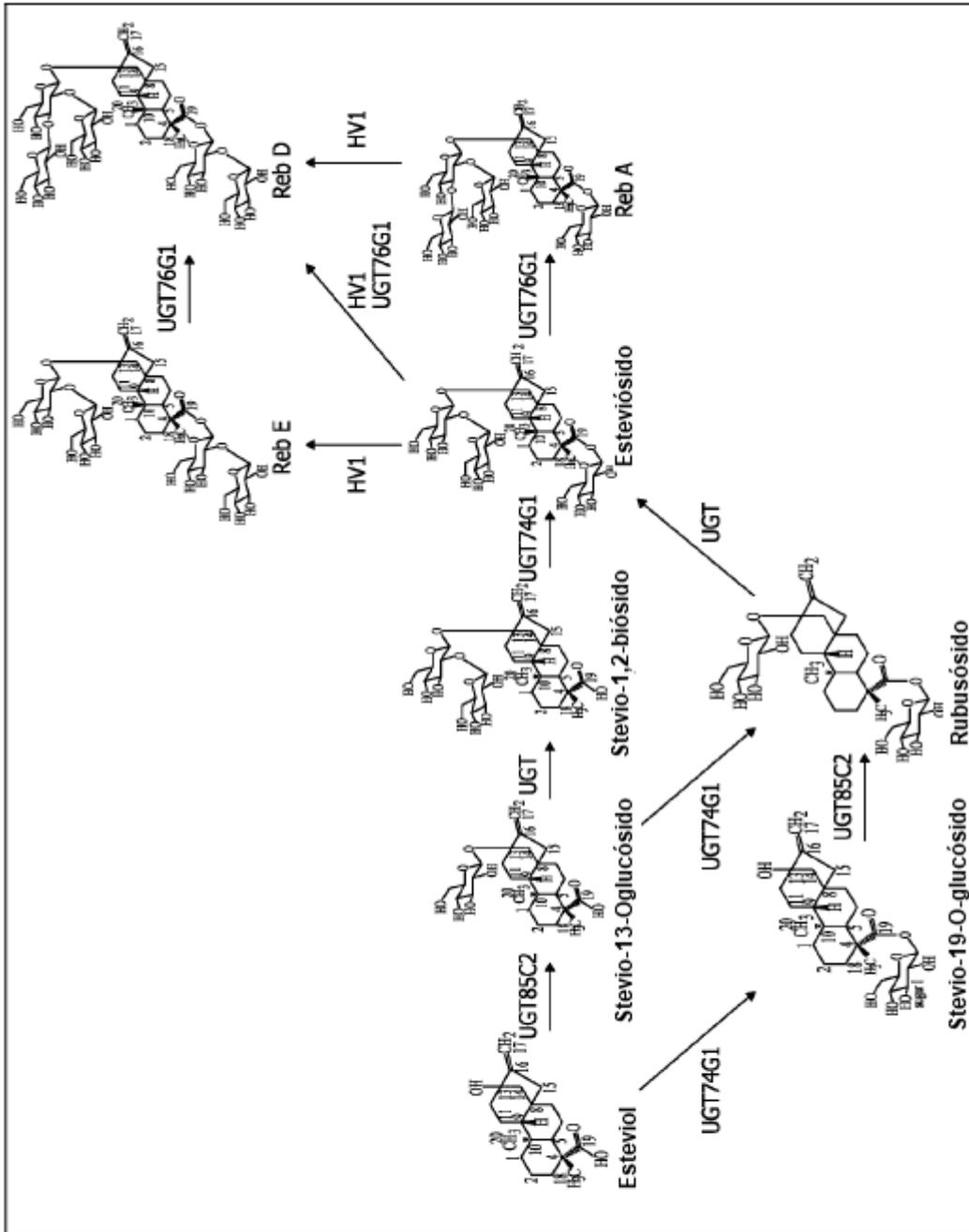


FIG. 1

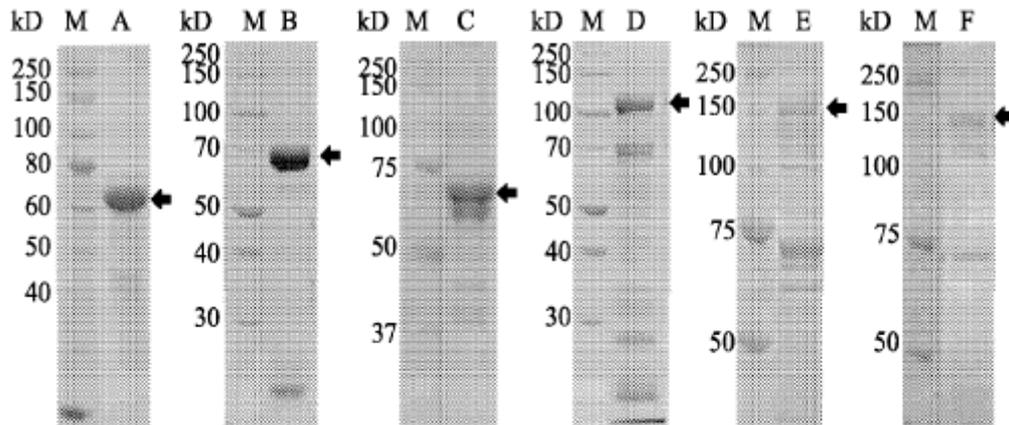


FIG. 2

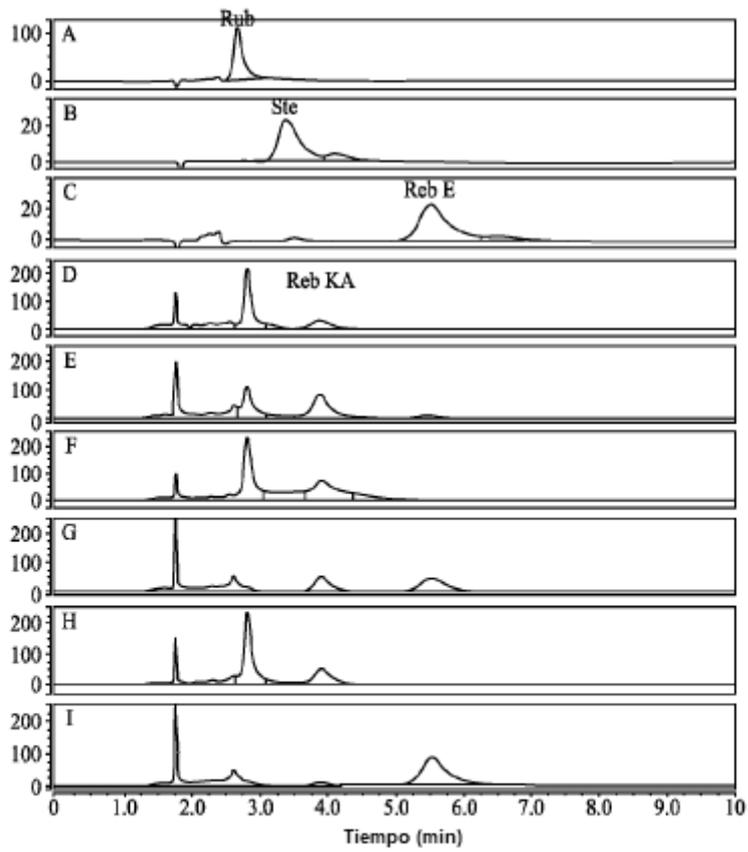


FIG. 3

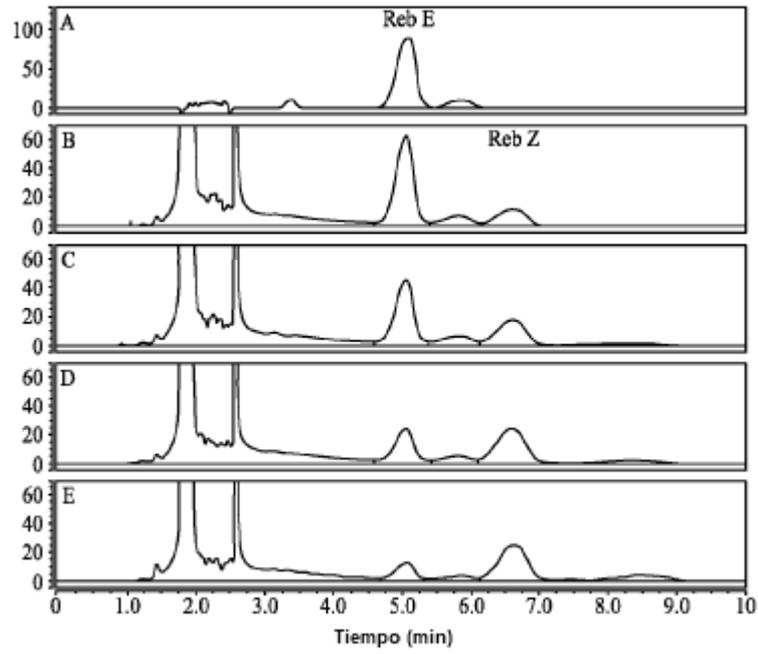


FIG. 4

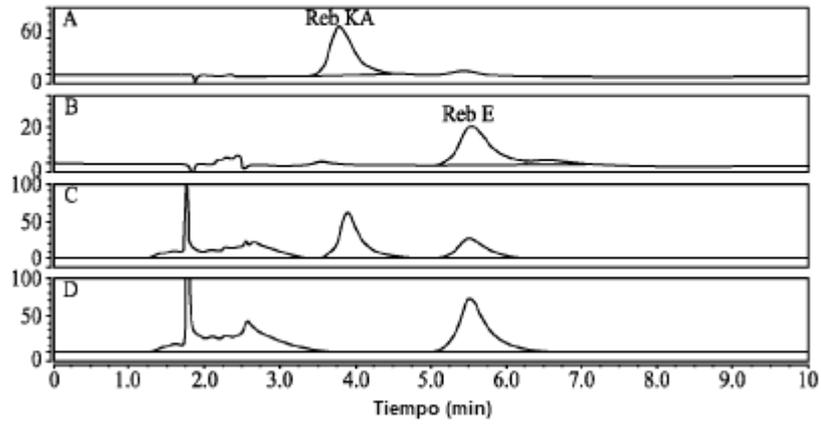


FIG. 5

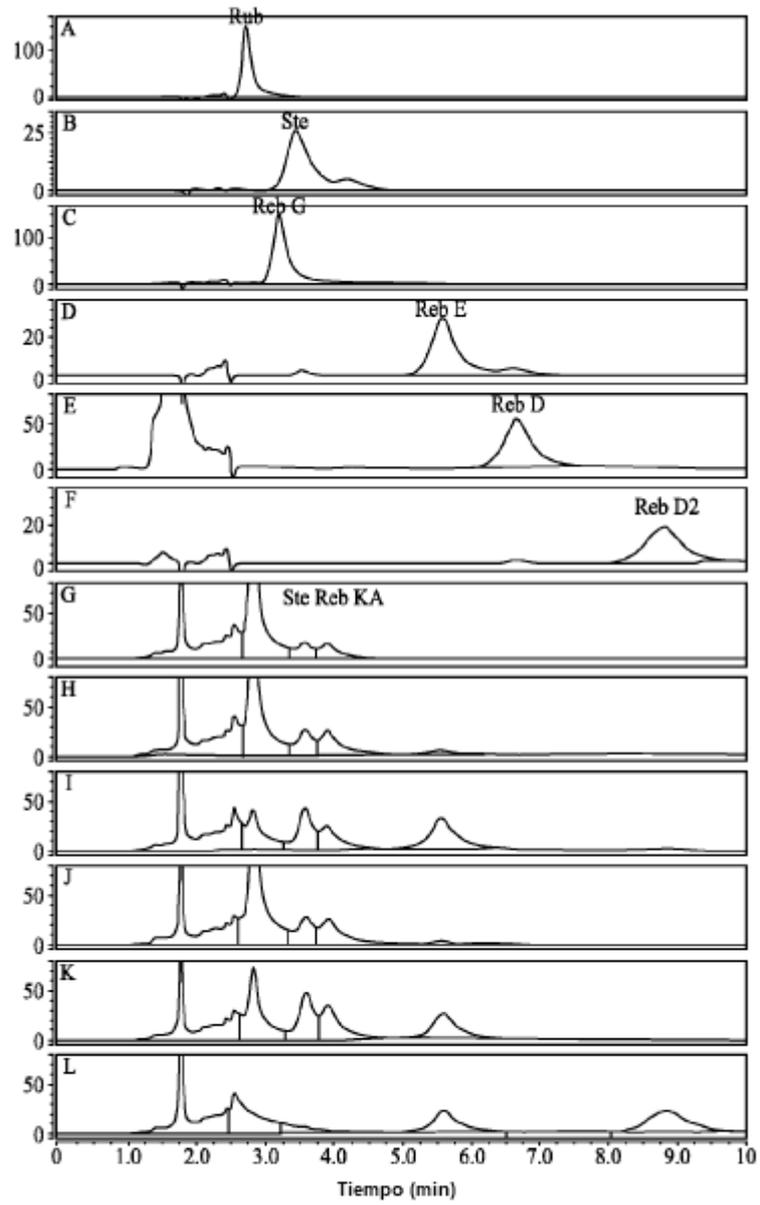


FIG. 6

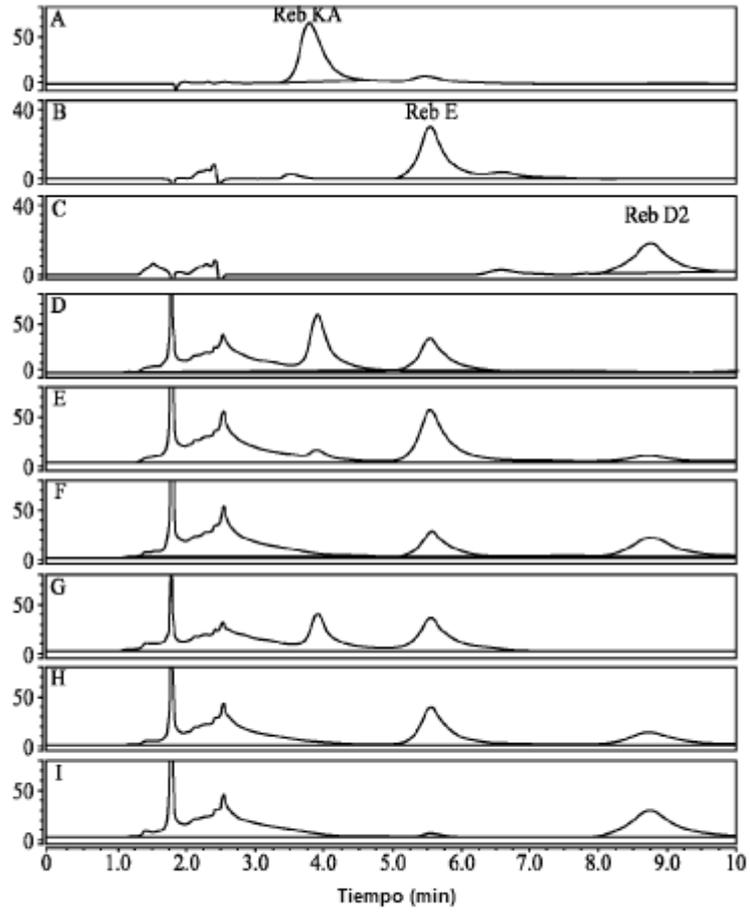


FIG. 7

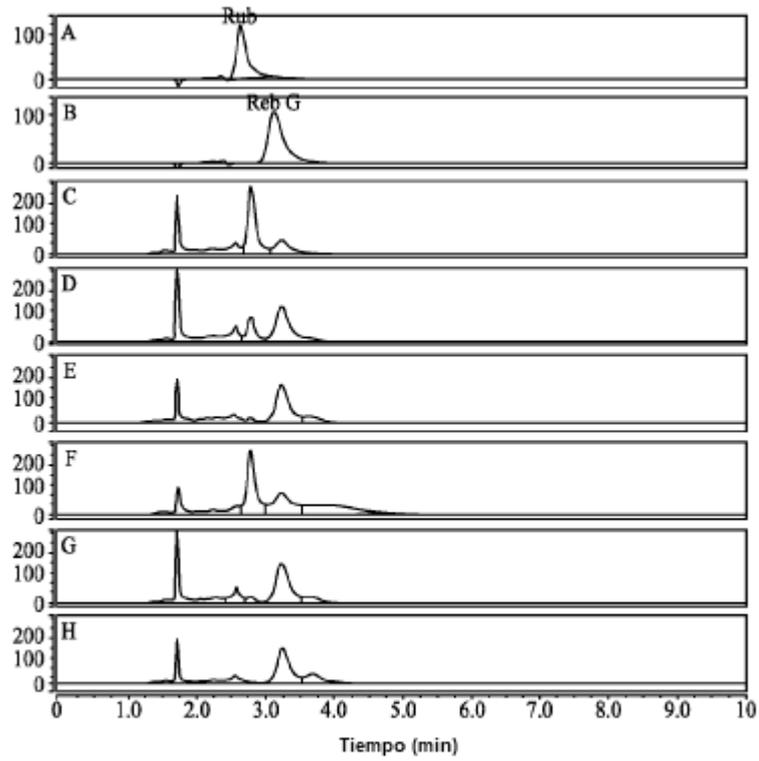


FIG. 8

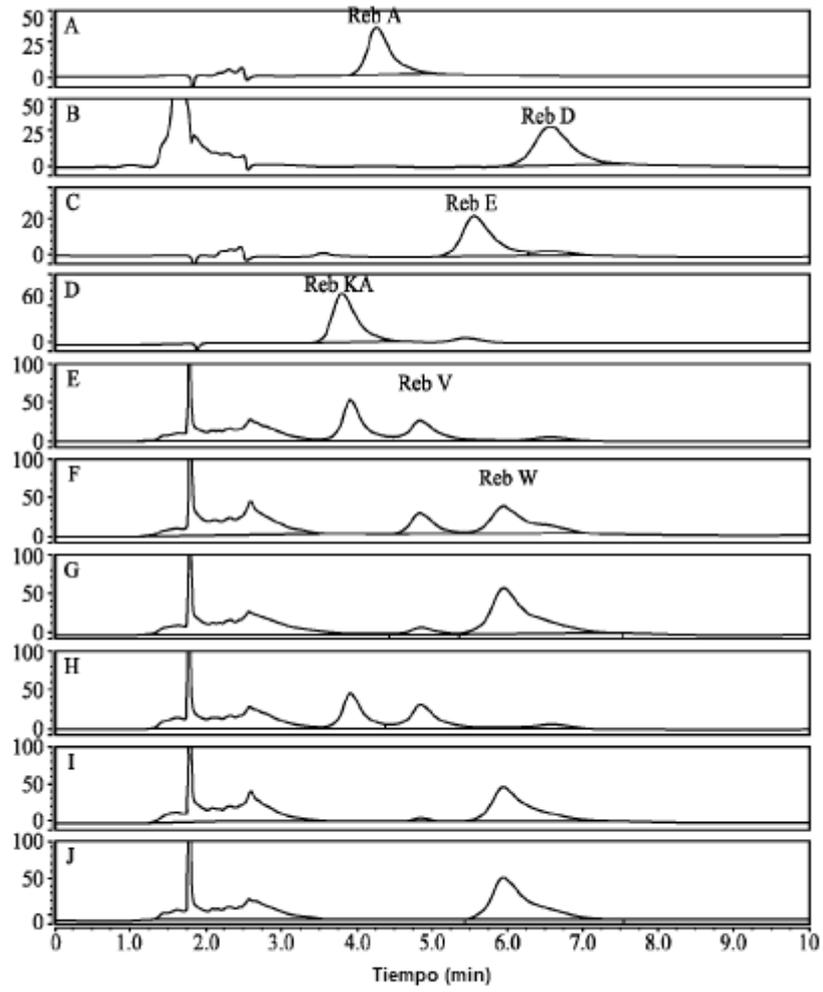


FIG. 9

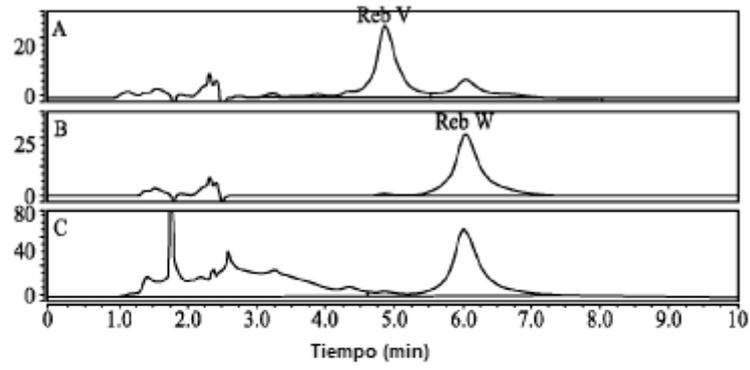


FIG. 10

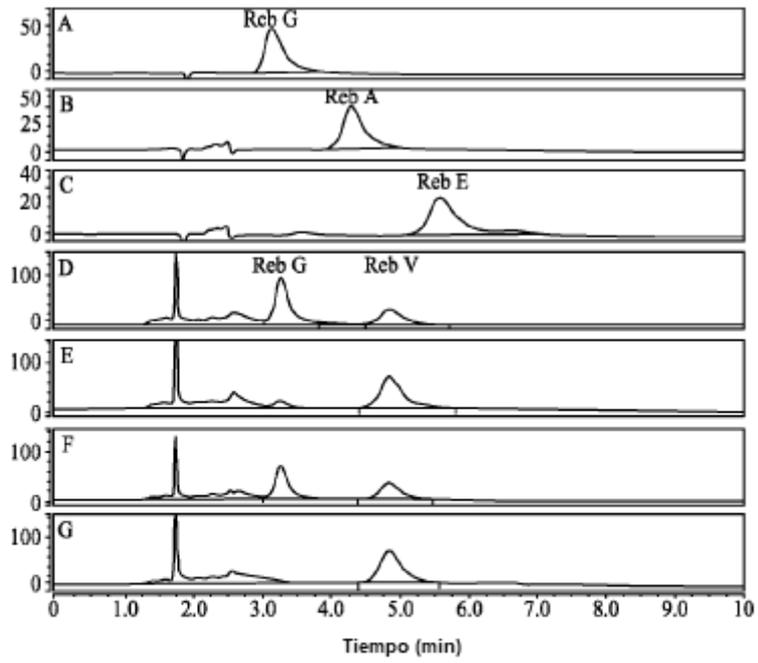


FIG. 11

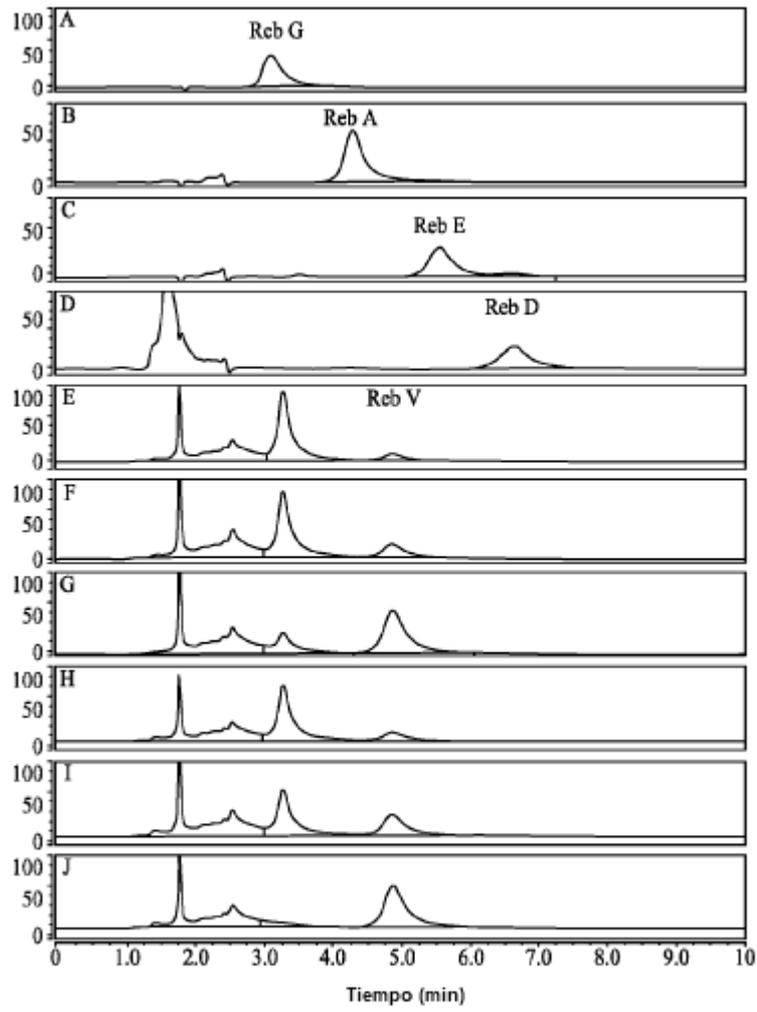


FIG. 12

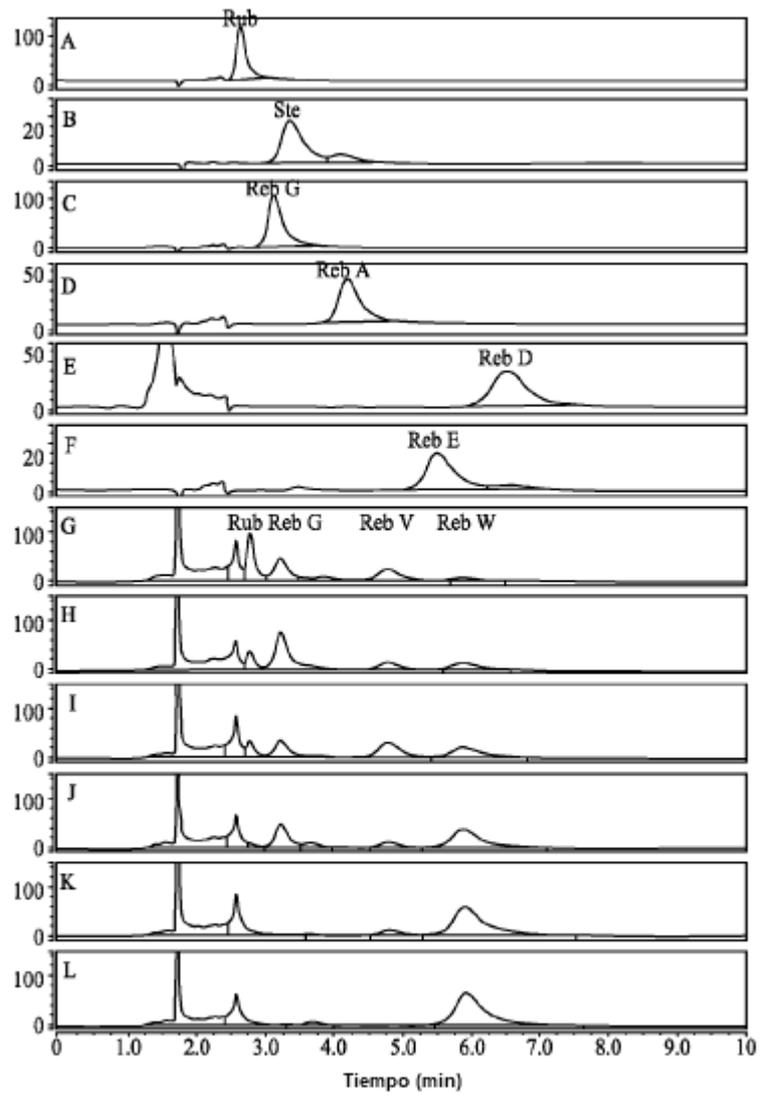


FIG. 13

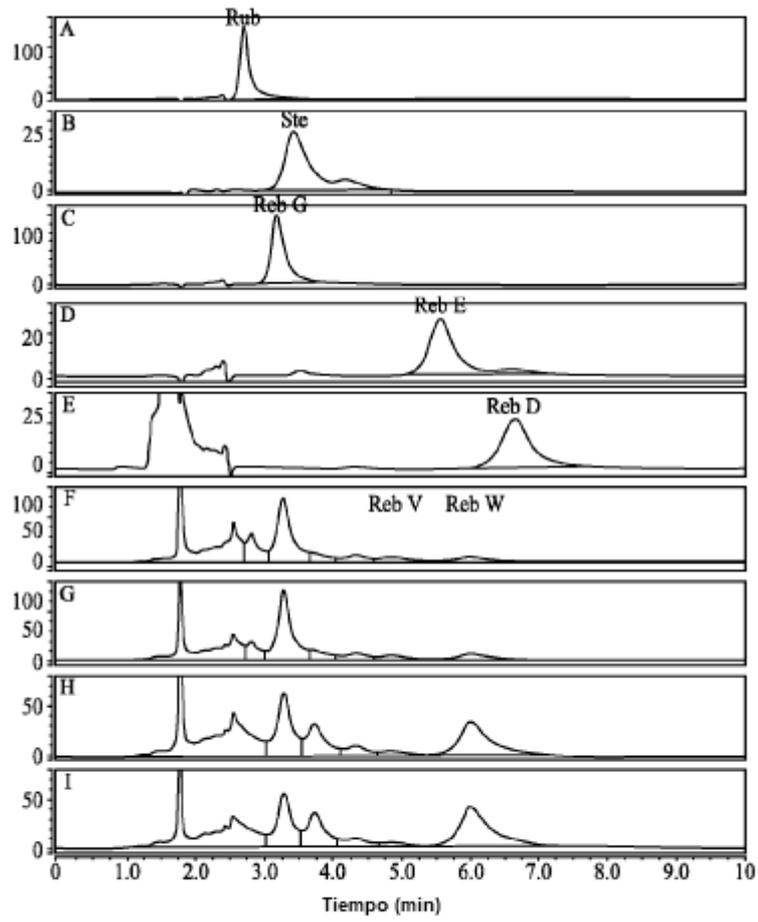


FIG. 14

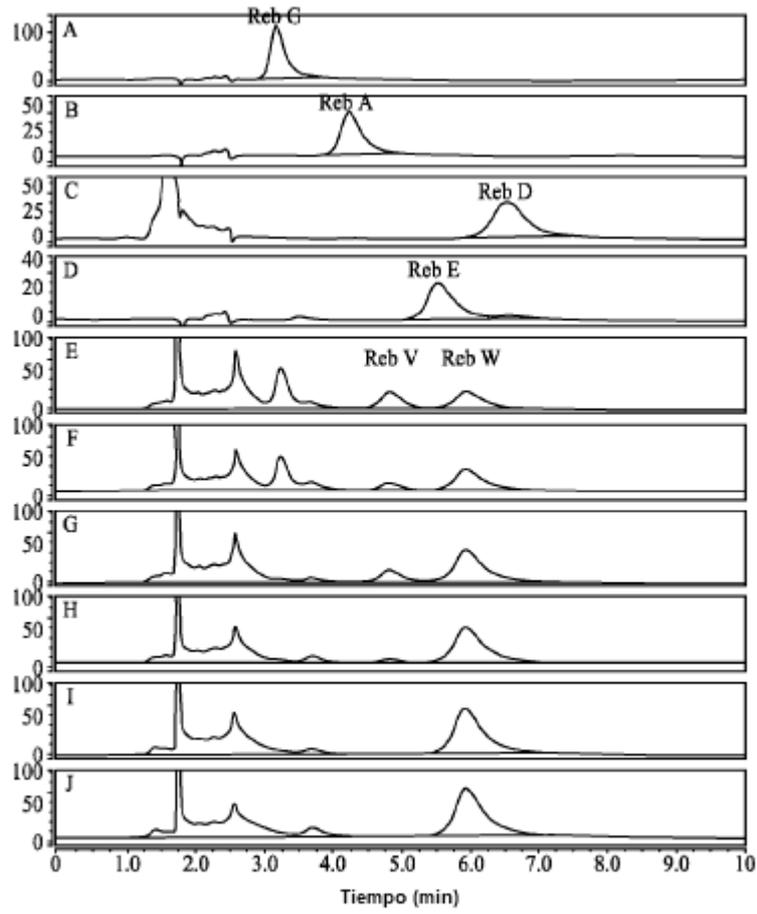


FIG. 15

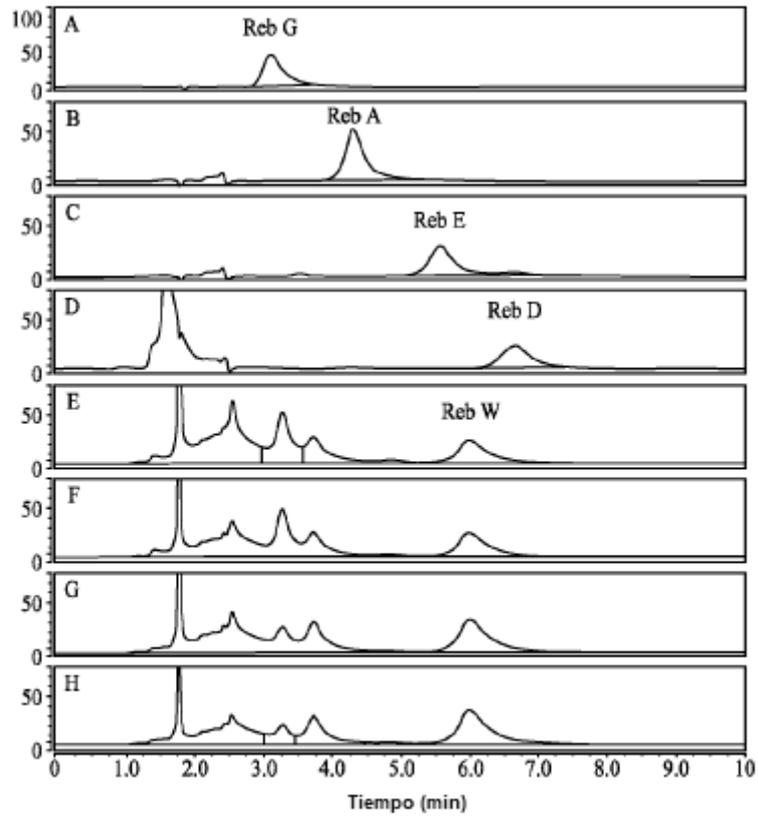


FIG. 16

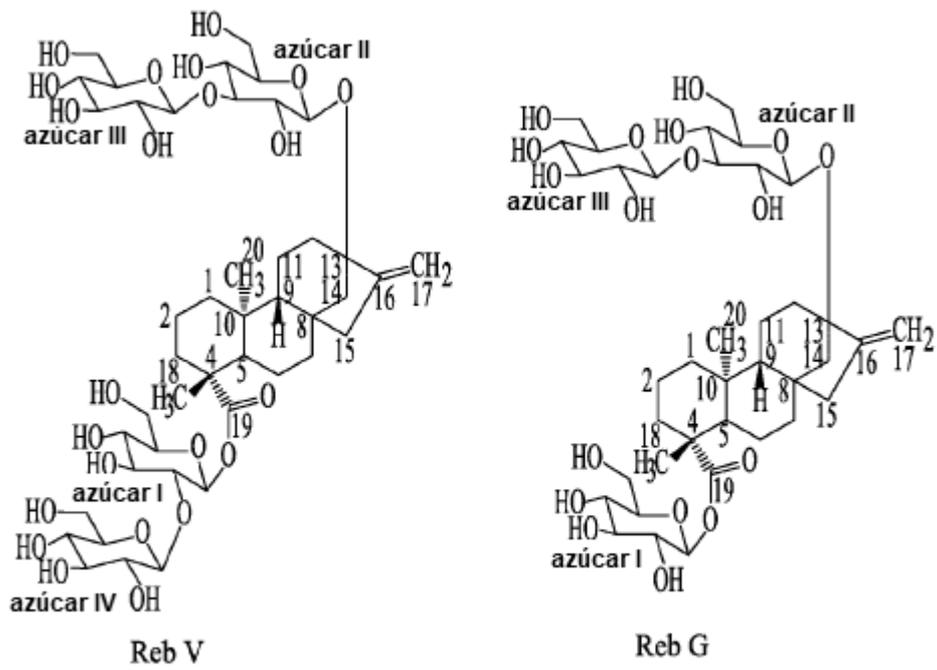


FIG. 17

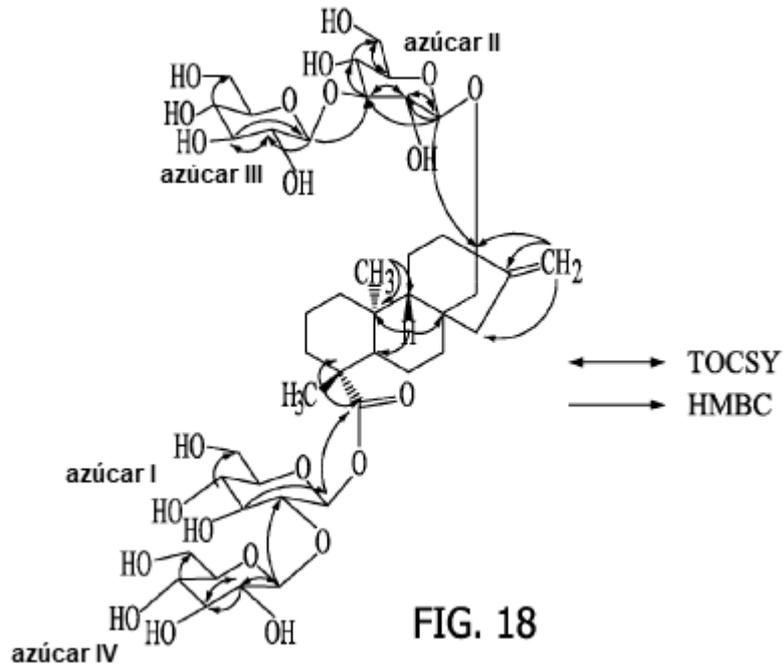


FIG. 18

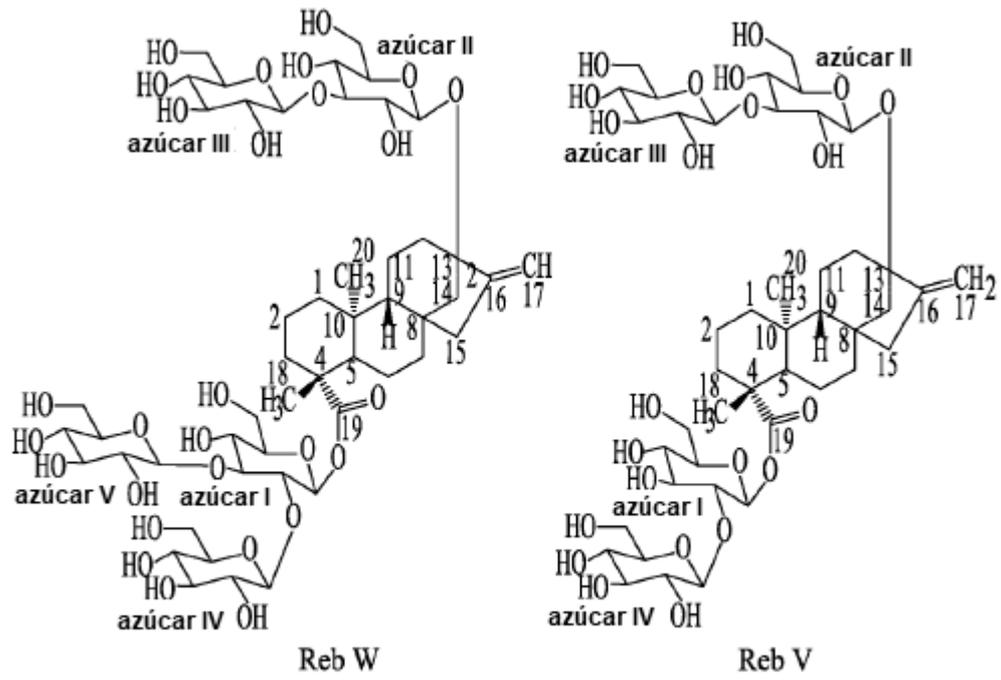
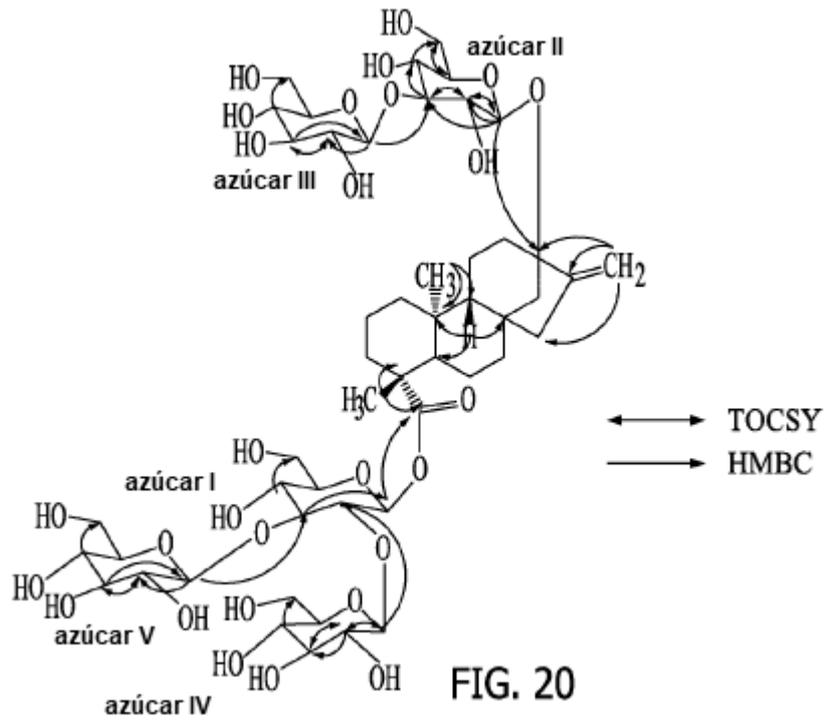


FIG. 19



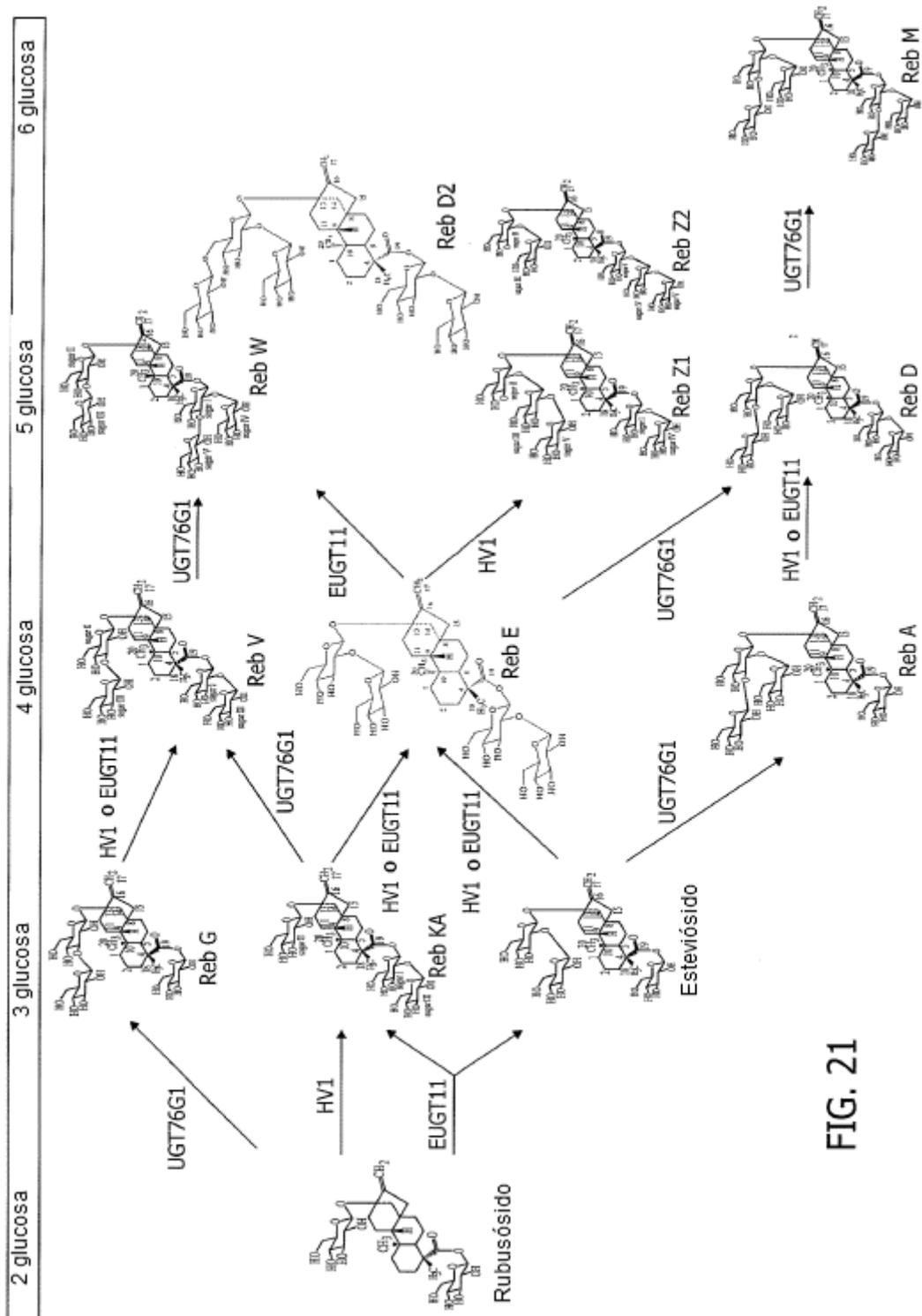


FIG. 21

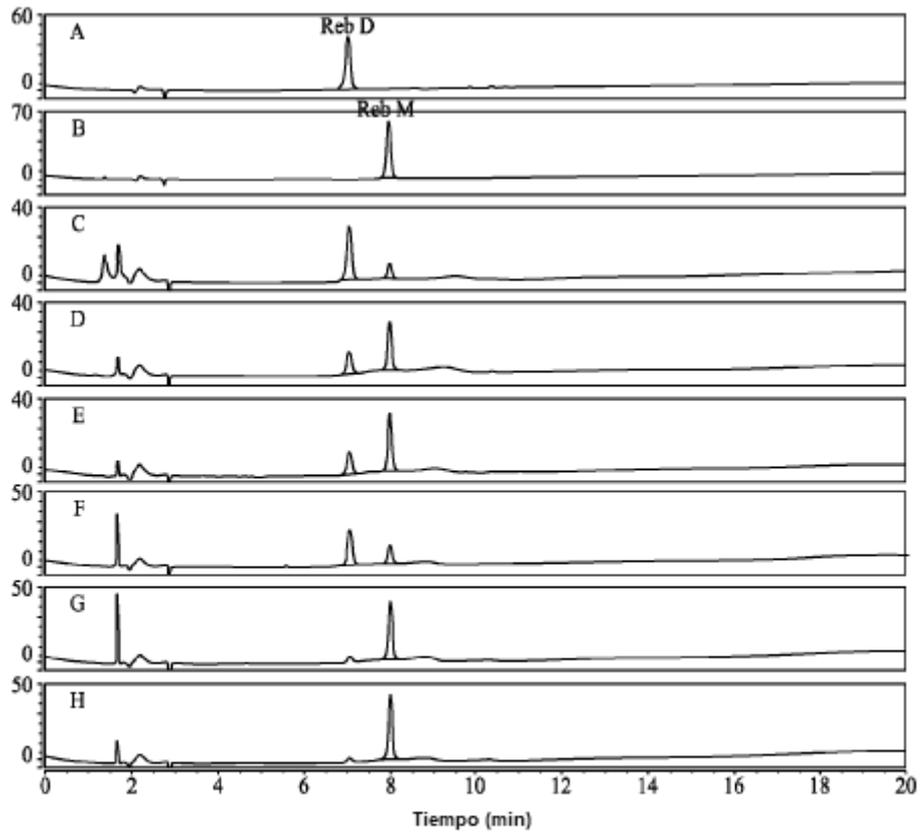


FIG. 22

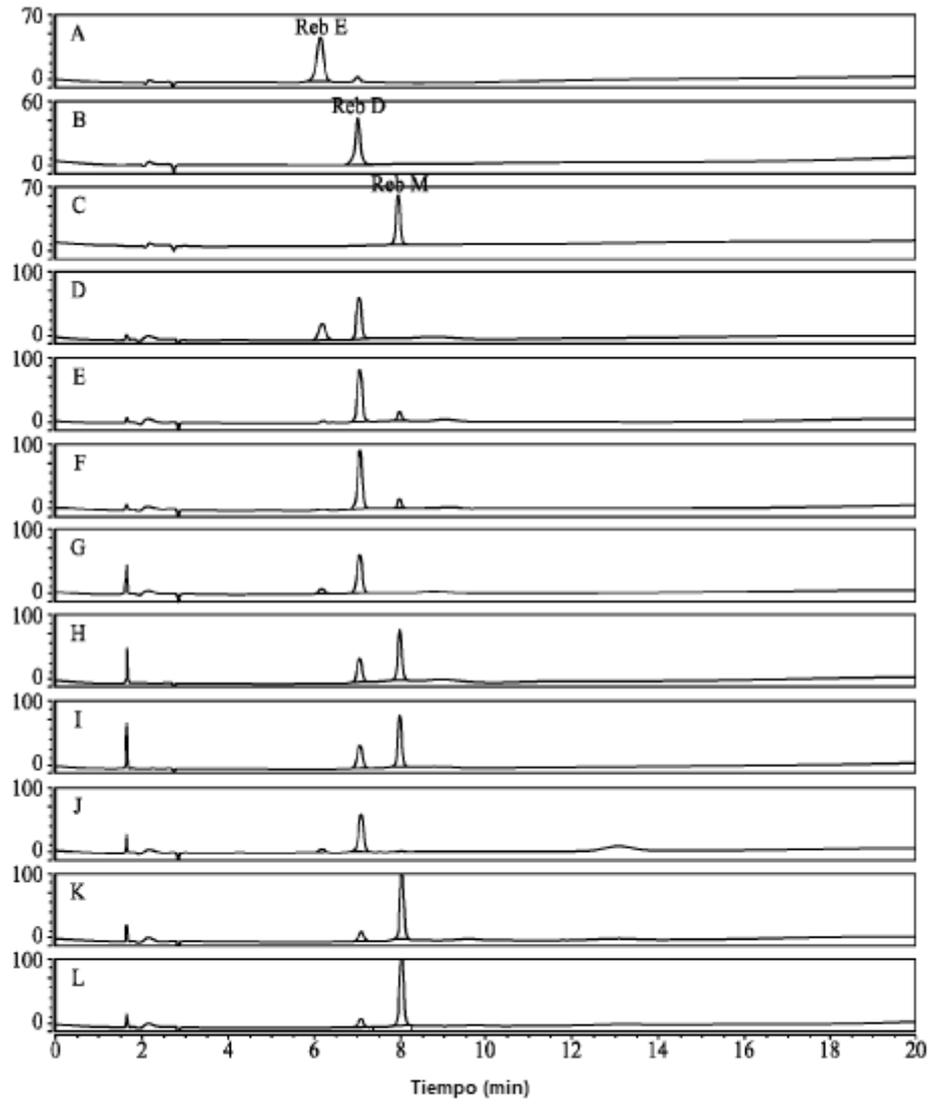


FIG. 23

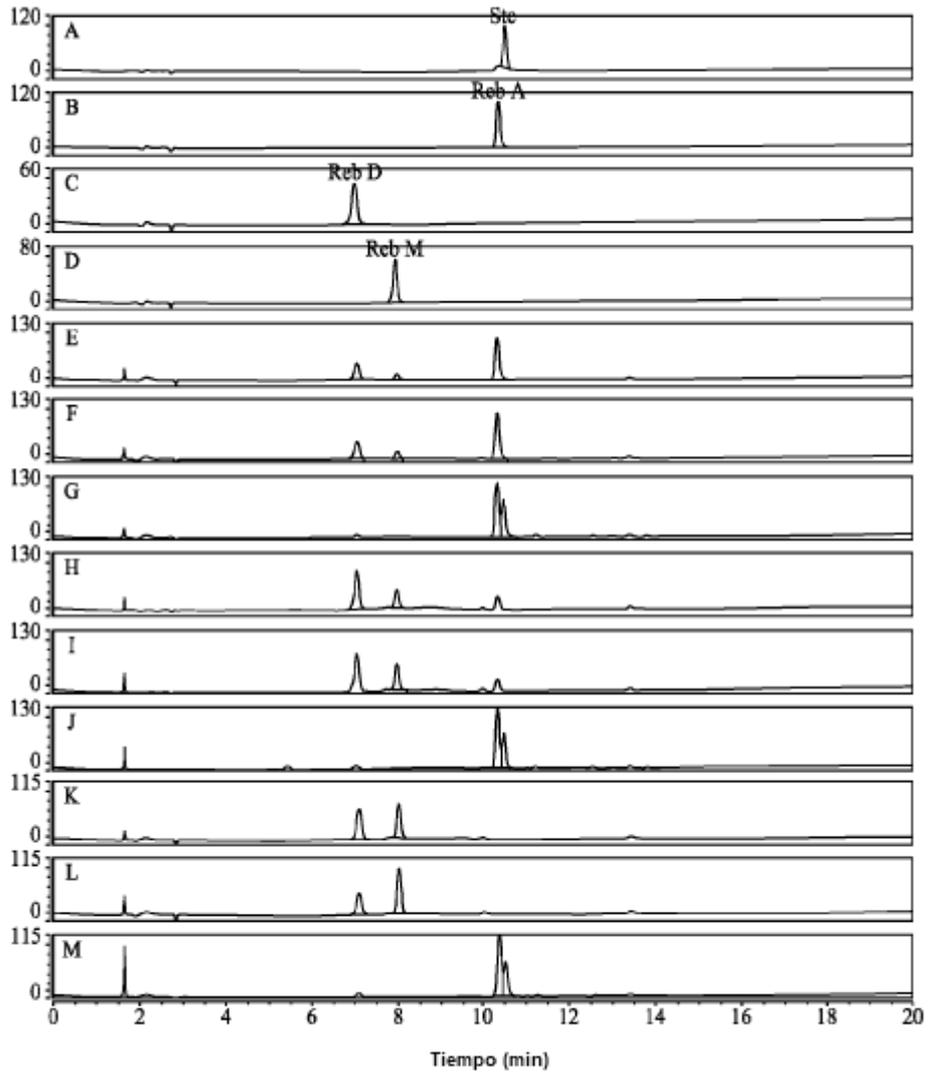


FIG. 24

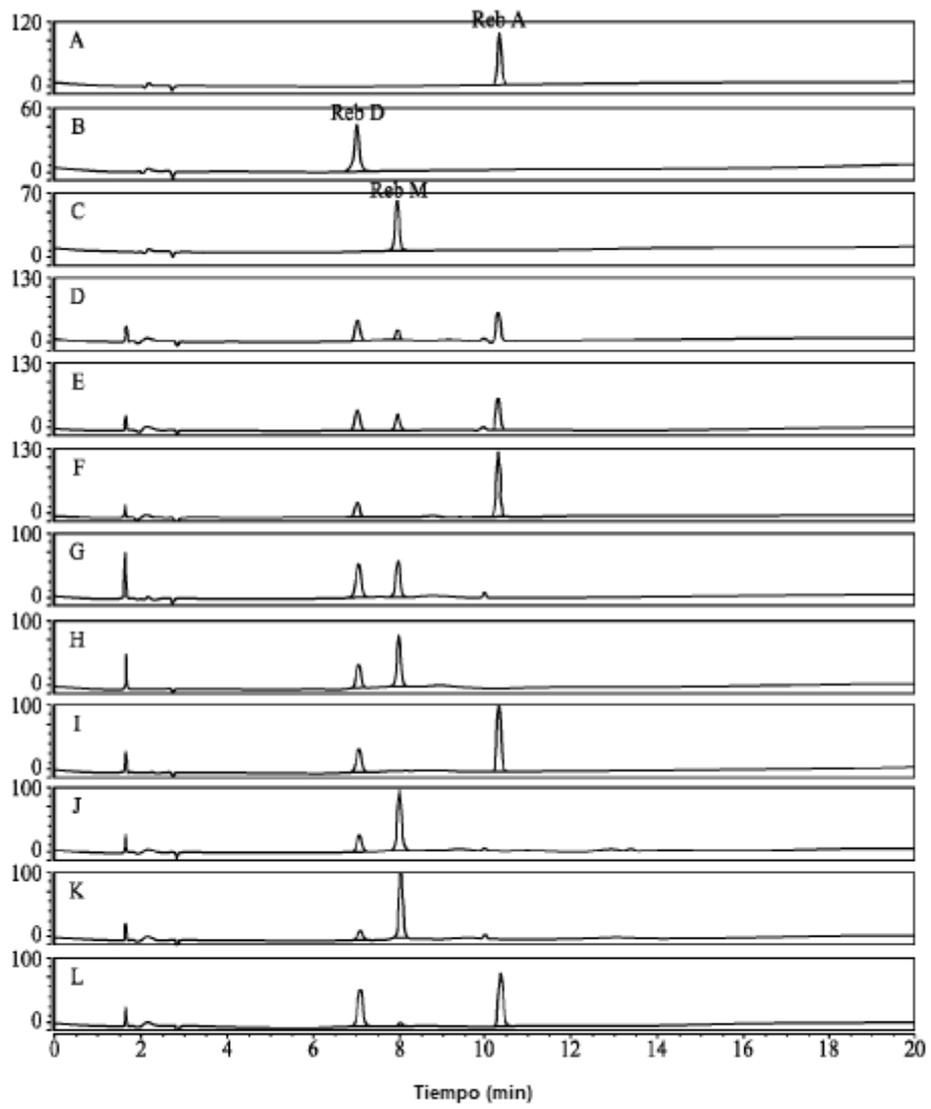


FIG. 25

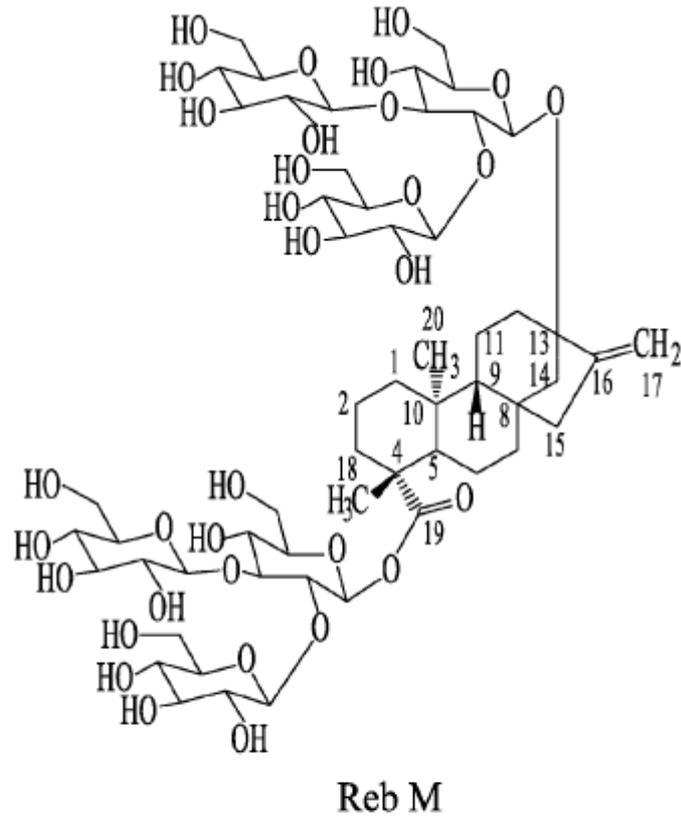


FIG. 26

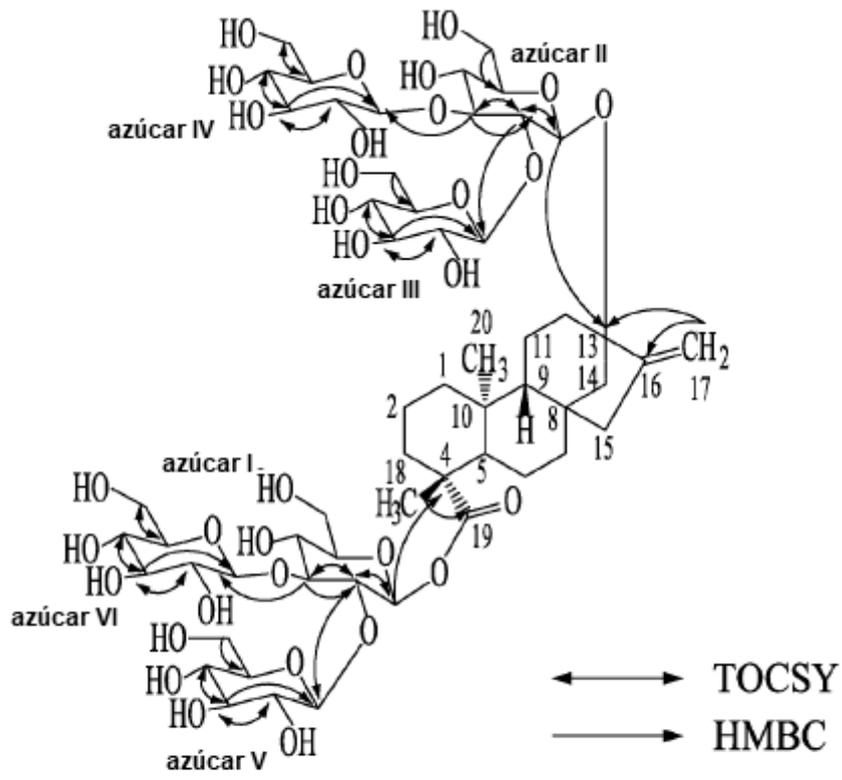


FIG. 27