

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 654**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09	(2006.01) C12P 15/00	(2006.01)
A01H 5/00		(2008.01)
C12N 1/15		(2006.01)
C12N 1/19		(2006.01)
C12N 1/21		(2006.01)
C12N 5/10		(2006.01)
C12N 9/10		(2006.01)
C12P 19/18		(2006.01)
C12P 19/56		(2006.01)
C12N 15/82		(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2013 PCT/JP2013/065518**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13180306**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2013 E 13797812 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 2862927**

54 Título: **Esteviol glucosiltransferasa y gen que codifica la misma**

30 Prioridad:

30.05.2012 JP 2012123349

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

19.03.2019

73 Titular/es:

**SUNTORY HOLDINGS LIMITED (100.0%)
1-40 Dojimahama 2-chome, Kita-ku
Osaka-shi, Osaka 530-8203, JP**

72 Inventor/es:

ONO, EIICHIRO

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 704 654 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

Esteviol glucosiltransferasa y gen que codifica la misma

5 La presente divulgación se refiere a una proteína que tiene actividad de síntesis de glucósidos de esteviol y a un polinucleótido que codifica la misma, un método para producir un glucósido de esteviol por medio de esta proteína, un transformante que expresa mucho la esteviol glucosiltransferasa, así como un glucósido de esteviol producido por el método anteriormente mencionado y el uso del mismo.

10 Las hojas de estevia, que pertenece a la familia Asteraceae (*Stevia rebaudiana*) contienen un metabolito secundario llamado esteviol, un tipo de diterpenoide, y los glucósidos de esteviol se usan como edulcorantes sin calorías en las industrias alimentarias porque son aproximadamente 300 veces más dulces que el azúcar de mesa. La obesidad ha crecido internacionalmente como un problema social grave, y la demanda para edulcorantes sin calorías ha aumentado día a día también en términos de fomento de la salud y reducción de los costes médicos. Aunque el aspartamo, un derivado de aminoácido artificialmente sintetizado, y el acesulfamo de potasio se usan ahora como edulcorantes artificiales, se espera que los edulcorantes sin calorías naturales como los glucósidos de esteviol sean más seguros y más probable que ganen la aceptación del público.

20 Como resultado de la modificación con azúcar, el glucósido de estevia se convierte por último en un glucósido con cuatro moléculas de azúcar, que se llama rebaudiósido A (Figura 1). El esteviósido, un glucósido trisacárido de esteviol que sirve como precursor del rebaudiósido A, está en la cantidad más alta; y, por tanto, el rebaudiósido A y esteviósido son las sustancias principales responsables para el dulzor de la estevia. Además de estos, se sabe que están presentes otros glucósidos que parecen ser intermedios de reacción y análogos con diferentes tipos de azúcares.

25 El gen de la enzima que produce la biosíntesis de rebaudiósido A se ha aislado mediante análisis de marcador de secuencia expresada (EST) de estevia (documentos no de patente 1 y 2, documento de patente 1). El esteviol se genera cuando el ácido ent-kaurenoico, que es un precursor del diterpenoide giberelina que sirve como una hormona vegetal, se hidroxila en la posición 13 por la acción de la ácido ent-kaurenoico 13-hidroxilasa (EK13H), que es una enzima citocromo P450 (Figura 2) (documento no de patente 3, documento de patente 1). El esteviol se glucosila primero (monoglucosilado) en el grupo hidroxilo de la posición 13 por la acción de UGT85C2 para generar de esta manera esteviolmonósido. El esteviolmonósido se glucosila adicionalmente en la posición 2 de la glucosa en posición 13 para generar de esta manera un glucósido disacárido de esteviol, llamado esteviolbiósido, o se glucosila adicionalmente en el grupo carboxilo de la posición 19 para generar de esta manera un diglucósido de esteviol, llamado rubusósido. Cuando el esteviolbiósido y rubusósido así generados se glucosilan adicionalmente, se generarían glucósidos de esteviol incluyendo esteviósido y rebaudiósido A. Los genes de enzimas que se sabe están implicados en la generación de glucósidos de esteviol son UGT74G1 y UGT76G1.

40 Se sabe que UGT74G1 cataliza la glucosilación en la posición 19 del esteviolmonósido (documento no de patente 1). UGT74G1 también produce la glucosilación de esteviolbiósido para generar de esta manera esteviósido, un triglucósido de esteviol. Este esteviósido es el mayor en contenido en hojas de estevia y se sabe que es aproximadamente de 250 a 300 veces más dulce que el azúcar de mesa. Este esteviósido se glucosila adicionalmente por la acción de UGT76G1 para generar rebaudiósido A, un tetraglucósido de esteviol, que se considera que es el más dulce (de 350 a 450 veces más dulce que el azúcar de mesa) y que tiene una buena calidad de sabor.

45 Se ha descrito que los glucósidos de esteviol mejoran su calidad de sabor y niveles de dulzor, particularmente tras la adición de un azúcar ramificado a la glucosa en la posición 13 (documento no de patente 4, documento de patente 2). Por tanto, las glucosiltransferasas que catalizan estas reacciones serían enzimas importantes responsables para determinar las propiedades de dulzor de la estevia.

50 Estudios previos (documento no de patente 2) han descrito varios tipos de glucosiltransferasas (UGT) como resultado de análisis de EST en hojas de estevia, pero la actividad enzimática detallada no se ha examinado por completo para todas estas enzimas.

55 Documentos del estado de la técnica.

Documentos de patente

Documento de patente 1: EP 1 897 951 B1

Documento de patente 2: JP -255372 A

60 Documentos no de patente

Documento no de patente 1: Brandle y Telmer (2007) Phytochemistry 68, 1855-1863

Documento no de patente 2: Richman et al (2005) Plant J. 41, 56-67

65 Documento no de patente 3: Mizutani y Ohta (2010) Annu. Rev. Plant Biol. 61, 291-315

Documento no de patente 4: Kasai et al (1981) Journal of the Chemical Society of Japan 5, 726-735

Como resultado de esfuerzos exhaustivos e intensos, los inventores de la presente invención han tenido éxito en identificar una enzima que cataliza la reacción de adición de azúcar a la glucosa en la posición 13 de un glucósido de esteviol en estevia, así como una secuencia génica que codifica esta enzima.

La presente invención se refiere a las formas de realización como se definen en las reivindicaciones. La presente invención se refiere a los siguientes puntos.

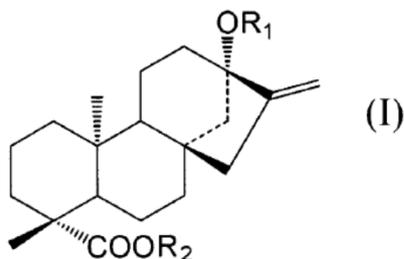
[1] Una proteína de cualquiera seleccionada del grupo que consiste en (a) a (c) mostradas a continuación:

(a) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2;

(b) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos con delección, sustitución, inserción y/o adición de 1 a 4 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 y que tiene la actividad para añadir una molécula(s) de azúcar a -OR₁ en la posición 13 y -COOR₂ en la posición 19 de un compuesto representado por la siguiente fórmula (I); y

(c) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que comparte una identidad de secuencia del 99% o más con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 y que tiene la actividad para añadir una molécula(s) de azúcar a -OR₁ en la posición 13 y -COOR₂ en la posición 19 de un compuesto representado por la siguiente fórmula (I)

[Fórmula 1]



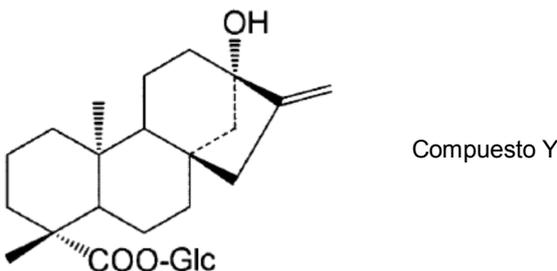
(en donde R₁ representa H, un monómero de glucosa o un dímero de glucosa, y R₂ representa H o un monómero de glucosa).

[2] La proteína según el anterior [punto 1], en donde la molécula de azúcar es una hexosa.

[3] La proteína según el anterior [punto 1], en donde la molécula de azúcar se selecciona del grupo que consiste en glucosa, manosa y galactosa.

[4] La proteína según el anterior [punto 1], en donde el compuesto es esteviol, esteviolmonósido, esteviolbiósido, rubusósido o el compuesto Y.

[Fórmula 2]



[5] Un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en (a) a (d) mostrados a continuación:

(a) un polinucleótido que contiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1;

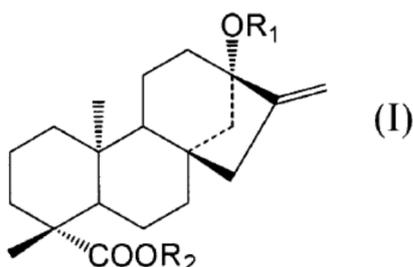
(b) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2;

(c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos con delección, sustitución, inserción y/o adición de 1 a 4 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 y que tiene la actividad para añadir una molécula(s) de azúcar a -OR₁ en la posición 13 y -COOR₂ en la posición 19 de un compuesto representado por la siguiente fórmula (I); y

(d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que comparte una identidad de secuencia del 99% o más con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 y que tiene la actividad para añadir una molécula(s) de azúcar a -OR₁ en la posición 13 y -COOR₂ en la posición 19 de un compuesto representado por la siguiente fórmula (I)

5

[Fórmula 3]



10 (en donde R₁ representa H, un monómero de glucosa o un dímero de glucosa, y R₂ representa H o un monómero de glucosa)

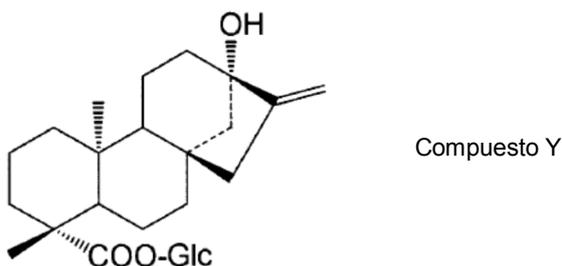
[6] El polinucleótido según el anterior [punto 5], en donde la molécula de azúcar es una hexosa.

15 [7] El polinucleótido según el anterior [punto 5], en donde la molécula de azúcar se selecciona del grupo que consiste en glucosa, manosa y galactosa.

[8] El polinucleótido según el anterior [punto 5], en donde el compuesto es esteviol, esteviolmonósido, esteviolbiósido, rubusósido o el compuesto Y.

20

[Fórmula 4]



[9] Un transformante no humano transformado con el polinucleótido según [5] anterior.

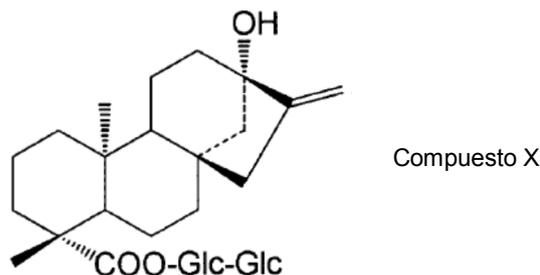
25

[10] El transformante según el anterior [punto 9], en donde el polinucleótido se inserta en un vector de expresión.

[11] El transformante según el anterior [punto 9], que es una planta.

30 [12] Un extracto del transformante según el anterior [punto 9], que comprende un glucósido de esteviol que está producido por el transformante, en donde el glucósido de esteviol es el compuesto X

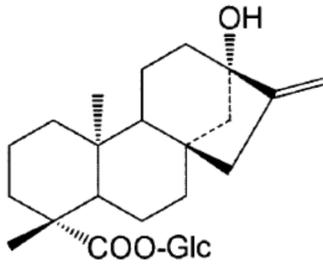
[Fórmula 26]



35

el compuesto Y

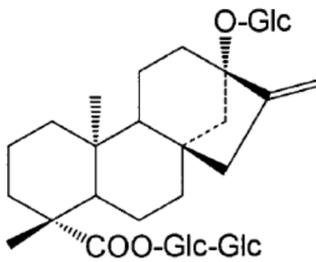
[Fórmula 31]



Compuesto Y

5 o el compuesto Z

[Fórmula 32]



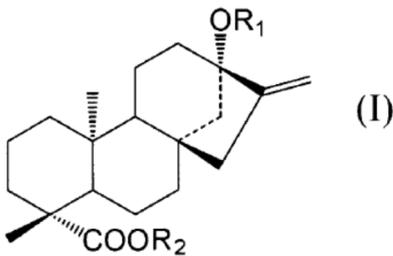
Compuesto Z

10 [13] Un alimento, una preparación farmacéutica o una materia prima industrial, que comprende el extracto según el [punto 12] anterior.

[14] Un método para producir una proteína, que comprende cultivar el transformante no humano según el [punto 9] anterior, en donde la proteína tiene la actividad para añadir una molécula(s) de azúcar a -OR₁ en la posición 13 y -COOR₂ en la posición 19 de un compuesto representado por la siguiente fórmula (I)

15

[Fórmula 5]

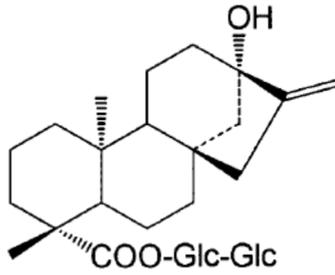


20 (en donde R₁ representa H, un monómero de glucosa o un dímero de glucosa, y R₂ representa H o un monómero de glucosa).

25 [15] Un método para producir un glucósido de esteviol, que comprende usar el transformante no humano según el [punto 9] anterior.

[16] El método según el anterior [punto 15], en donde el glucósido de esteviol es esteviomonósido, esteviolbíosido, estevióside, rubusósido, el compuesto X

30 [Fórmula 6]

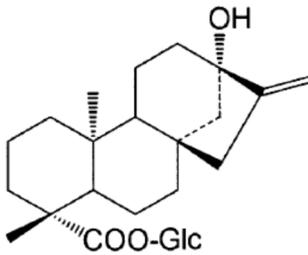


Compuesto X

el compuesto Y

[Fórmula 7]

5

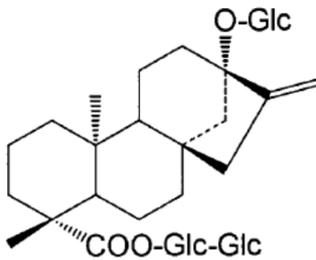


Compuesto Y

el compuesto Z

[Fórmula 8]

10



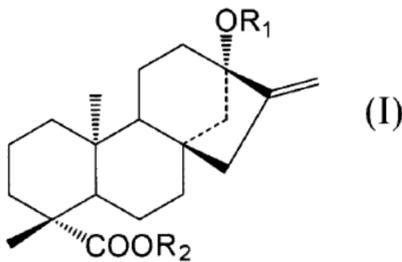
Compuesto Z

o cualquier combinación de los mismos.

[17] Un método para producir un glucósido de esteviol, que comprende la etapa de hacer reaccionar la proteína según el anterior [punto 1], un UDP-azúcar y un compuesto representado por la siguiente fórmula (I)

15

[Fórmula 9]



20

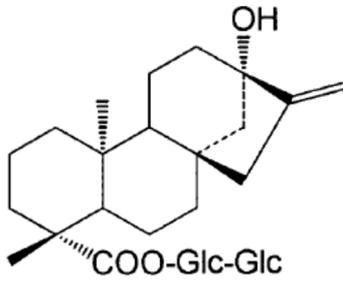
(en donde R₁ representa H, un monómero de glucosa o un dímero de glucosa, y R₂ representa H o un monómero de glucosa).

[18] El método según el anterior [punto 17], en donde el azúcar en el UDP-azúcar es glucosa.

25

[19] El método según el anterior [punto 17], en donde el glucósido de esteviol es esteviomonósido, esteviolbíosido, estevióside, rubusósido, el compuesto X

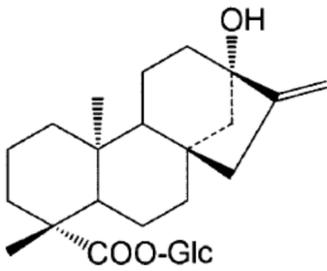
[Fórmula 10]



Compuesto X

5 el compuesto Y

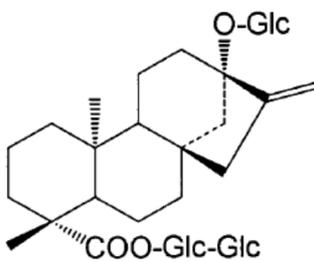
[Fórmula 11]



Compuesto Y

10 el compuesto Z

[Fórmula 12]



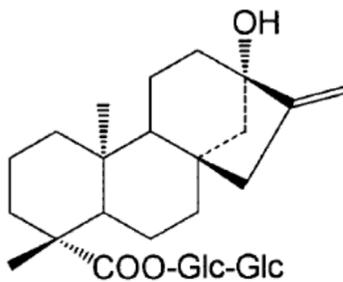
Compuesto Z

15 o cualquier combinación de los mismos.

[20] Un glucósido de esteviol, en donde el glucósido de esteviol es el compuesto X

[Fórmula 26]

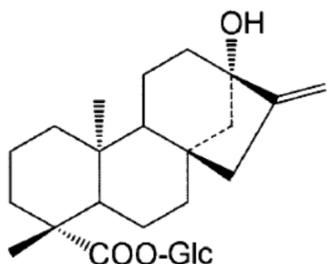
20



Compuesto X

el compuesto Y

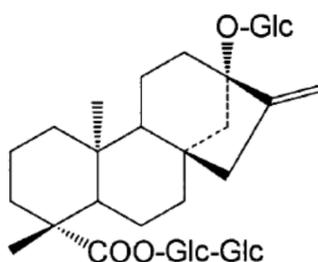
[Fórmula 31]



Compuesto Y

o el compuesto Z

5 [Fórmula 32]



Compuesto Z

10 La proteína proporcionada en el presente documento y el polinucleótido que codifica la misma se pueden usar para la producción eficaz de glucósidos de esteviol (por ejemplo, esteviolmonósido, esteviolbiósido, esteviósido, rubusósido, compuesto X, compuesto Y, compuesto Z). Además, los transformantes proporcionados en el presente documento son ricos en glucósidos de esteviol (por ejemplo, esteviolmonósido, esteviolbiósido, esteviósido, rubusósido, compuesto X, compuesto Y, compuesto Z), y por tanto los glucósidos de esteviol (por ejemplo, esteviolmonósido, esteviolbiósido, esteviósido, rubusósido, compuesto X, compuesto Y, compuesto Z) se pueden extraer de forma eficaz y purificar de estos transformantes.

15 La figura 1 muestra los nombres y estructuras de los miembros de glucósidos de esteviol. En la figura 1, "Glc" indica glucosa. Asimismo, "Glc-Glc($\beta 2 \rightarrow 1$)" indica que "Glc-Glc" están unidas entre sí a través de un enlace glucosídico $\beta 2,1$, mientras que "Glc-Glc($\beta 3 \rightarrow 1$)" indica que "Glc-Glc" están unidas entre sí a través de un enlace glucosídico $\beta 3,1$.

20 La figura 2 muestra rutas biosintéticas putativas de los glucósidos de esteviol.

25 La figura 3 muestra los resultados de SDS-PAGE obtenidos para la proteína homóloga 1 de UGT73E1 expresada en *E. coli*. El panel A muestra una imagen teñida con CBB obtenida para la fracción del precipitado, mientras que el panel B muestra una imagen teñida con CBB obtenida para la fracción eluida con una solución de imidazol. Los asteriscos representan cada uno una proteína recombinante expresada.

La figura 4 muestra la actividad enzimática de la proteína homóloga 1 de UGT73E1. En la figura 4, "Glc" indica glucosa.

30 La figura 5 muestra un cromatograma obtenido para estándares de referencia de esteviol y glucósidos del mismo.

La figura 6 muestra las rutas de reacción catalizadas por la proteína homóloga 1 de UGT73E1. En la figura 6, "UGT73E1HP1" indica proteína homóloga 1 de UGT73E1.

35 La presente invención se describirá con más detalle a continuación.

40 Los inventores de la presente invención han dilucidado, antes que otros, que la proteína homóloga 1 de UGT73E1 derivada de estevia es una proteína enzima responsable para la reacción de adición de azúcar en glucósidos de esteviol para el grupo hidroxilo de la posición 13 y la glucosa unida al grupo hidroxilo en la posición 13, así como para el grupo carboxilo de la posición 19 y la glucosa unida al grupo carboxilo de la posición 19.

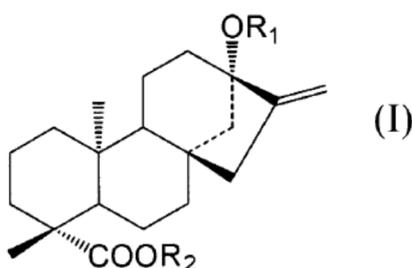
45 La secuencia CDS y secuencia de aminoácidos deducida de la proteína homóloga 1 de UGT73E1 se muestran en SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente. El polinucleótido y la enzima anteriores se pueden obtener por procedimientos descritos posteriormente en la sección de ejemplos, procedimientos de ingeniería genética conocidos, procedimientos sintéticos conocidos, etc.

1. Esteviol glucosiltransferasa

La presente divulgación proporciona una proteína de cualquiera seleccionada del grupo que consiste en (a) a (c) mostradas a continuación (de aquí en adelante denominada "la proteína de la presente divulgación"):

- 5 (a) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2;
 (b) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos con delección, sustitución, inserción y/o adición de 1 a 7 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 y que tiene la actividad para añadir una molécula(s) de azúcar a -OR₁ en la posición 13 y -COOR₂ en la posición 19 de un compuesto representado por la siguiente fórmula (I); y
 10 (c) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que comparte una identidad de secuencia del 99% o más con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 y que tiene la actividad para añadir una molécula(s) de azúcar a -OR₁ en la posición 13 y -COOR₂ en la posición 19 de un compuesto representado por la siguiente fórmula (I)

15 [Fórmula 13]



20 (en donde R₁ representa H, un monómero de glucosa o un dímero de glucosa, y R₂ representa H o un monómero de glucosa).

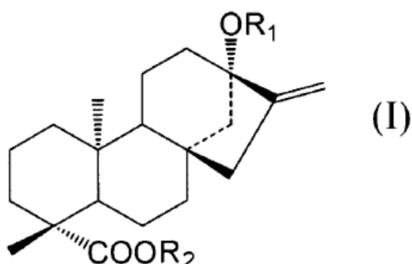
La anterior proteína (b) o (c) es típicamente un mutante del polipéptido natural mostrado en SEQ ID NO: 2, aunque otros ejemplos incluyen los que se pueden obtener de forma artificial por mutagénesis dirigida como se describe en "Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001," "Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997," "Nuc. Acids. Res., 10, 6487 (1982)," "Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)," "Gene, 34, 315 (1985)," "Nuc. Acids. Res., 13, 4431 (1985)," "Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)," etc.

Como se usa en el presente documento, la expresión "proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos con delección, sustitución, inserción y/o adición de 1 a 7 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 y que tiene la actividad para añadir una molécula(s) de azúcar a -OR₁ en la posición 13 y -COOR₂ en la posición 19 de un compuesto representado por la siguiente fórmula (I)" se pretende que incluya proteínas que consisten en una secuencia de aminoácidos con delección, sustitución, inserción y/o adición de, por ejemplo, 1 a 7 residuos de aminoácidos, de 1 a 6 residuos de aminoácidos, de 1 a 5 residuos de aminoácidos, de 1 a 4 residuos de aminoácidos, de 1 a 3 residuos de aminoácidos, de 1 a 2 residuos de aminoácidos o un único residuo de aminoácido en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 y que tienen la actividad para añadir una molécula(s) de azúcar a -OR₁ en la posición 13 y -COOR₂ en la posición 19 de un compuesto representado por la siguiente fórmula (I). En general, un número menor es más preferido para la anterior delección, sustitución, inserción y/o adición de residuos de aminoácidos.

Además, los ejemplos de tales proteínas incluyen las que tienen una secuencia de aminoácidos que comparte una identidad de secuencia del 99% o más, del 99,1% o más, del 99,2% o más, del 99,3% o más, del 99,4% o más, del 99,5% o más, del 99,6% o más, del 99,7% o más, del 99,8% o más, o del 99,9% o más con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 y que tienen la actividad para añadir una molécula(s) de azúcar a -OR₁ en la posición 13 y -COOR₂ en la posición 19 de un compuesto representado por la siguiente fórmula (I). En general, un valor mayor es más preferido para la identidad de secuencia anterior.

En el contexto de la presente divulgación, la expresión "actividad para añadir una molécula(s) de azúcar a -OR₁ en la posición 13 y -COOR₂ en la posición 19 de un compuesto representado por la siguiente fórmula (I)" se pretende que signifique la capacidad de producir adición de azúcar a -OR₁ en la posición 13 y -COOR₂ en la posición 19 de un compuesto representado por la siguiente fórmula (I).

[Fórmula 14]



En la fórmula (I), R₁ representa H, un monómero de glucosa (-Glc) o un dímero de glucosa (-Glc-Glc), y R₂ representa H o un monómero de glucosa (-Glc). Preferiblemente, R₂ es H cuando R₁ es un dímero de glucosa. En el dímero de glucosa, las glucosas están preferiblemente unidas entre sí a través de enlace glucosídico β2,1. Además, las moléculas de azúcar que se van a añadir por la acción de la proteína de la presente divulgación a -OR₁ en la posición 13 y -COOR₂ en la posición 19 de un compuesto representado por la fórmula (I) se añaden cada una preferiblemente a través de un enlace glucosídico β2,1 en ambos casos donde R₁ es un monómero de glucosa o un dímero de glucosa y donde R₂ es un monómero de glucosa.

Un compuesto preferido de fórmula (I) es esteviol, esteviolmonósido, esteviolbiósido, rubusósido o el compuesto Y.

No hay limitación particular sobre las moléculas de azúcar que se van a añadir por la acción de la proteína de la presente divulgación a -OR₁ en la posición 13 y -COOR₂ en la posición 19 de un compuesto representado por la fórmula (I), aunque pueden ser moléculas de azúcar compuestas de una o más pentosas, hexosas o cualquier combinación de las mismas. Los ejemplos de pentosas y hexosas son como se ha descrito anteriormente. La molécula de azúcar anterior es preferiblemente una hexosa, y más preferiblemente una hexosa seleccionada del grupo que consiste en glucosa, manosa y galactosa. La molécula de azúcar anterior es lo más preferiblemente glucosa.

La actividad para añadir una molécula(s) de azúcar a -OR₁ en la posición 13 y -COOR₂ en la posición 19 de un compuesto representado por la fórmula (I) se puede verificar como sigue: después de incubación a una temperatura de 20°C a 40°C durante 10 minutos a 2 horas en un tampón neutro de pH 6,0 a 8,0 (por ejemplo, tampón fosfato de sodio o tampón fosfato de potasio) que contiene una proteína de prueba en una cantidad de 1 a 500 ng (preferiblemente de 50 a 200 ng, lo más preferiblemente, 100 ng), un UDP-azúcar (por ejemplo UDP-glucosa) de 1 a 1000 μM (preferiblemente de 100 a 700 μM, lo más preferiblemente 500 μM) y un compuesto sustrato (es decir, un compuesto de fórmula (I)) de 1 a 500 μM (preferiblemente de 100 a 500 μM, lo más preferiblemente 250 μM), el compuesto sustrato anterior se purifica y analiza por procedimientos conocidos tal como análisis por LC-MS (cromatografía líquida-espectrometría de masas), etc.

Si un compuesto que tiene una molécula(s) de azúcar añadida(s) a -OR₁ en la posición 13 y -COOR₂ en la posición 19 de un compuesto representado por la fórmula (I) se detecta como resultado de análisis por LC-MS, se puede considerar que la proteína de prueba anterior como que tiene la actividad para añadir una molécula(s) de azúcar a -OR₁ en la posición 13 y -COOR₂ en la posición 19 de un compuesto representado por la fórmula (I).

La reacción de adición de azúcar anterior normalmente se completa en aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 12 horas.

La delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o varios residuos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína de la presente divulgación se pretende que signifique que la delección, sustitución, inserción y/o adición de uno o varios residuos de aminoácidos se produce en una cualquiera o más posiciones en la misma secuencia, y se pueden producir dos o más de delección, sustitución, inserción y/o adición al mismo tiempo.

Los ejemplos de residuos de aminoácidos intercambiables se muestran a continuación. Los residuos de aminoácidos incluidos en el mismo grupo son intercambiables entre sí. Grupo A: leucina, isoleucina, norleucina, valina, norvalina, alanina, ácido 2-aminobutanoico, metionina, o-metilserina, t-butilglicina, t-butilalanina, ciclohexilalanina; Grupo B: ácido aspártico, ácido glutámico, ácido isoaspártico, ácido isoglutámico, ácido 2-aminoadípico, ácido 2-aminosubérico; Grupo C: asparragina, glutamina; Grupo D: lisina, arginina, ornitina, ácido 2,4-diaminobutanoico, ácido 2,3-diaminopropiónico; Grupo E: prolina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina; Grupo F: serina, treonina, homoserina; Grupo G: fenilalanina, tirosina.

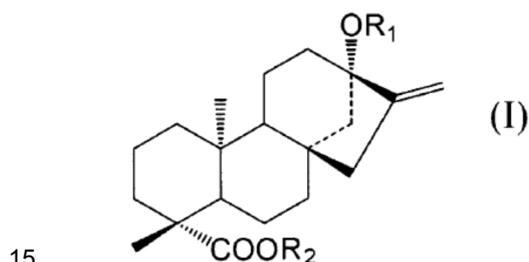
Aunque la proteína de la presente divulgación se puede obtener al ser expresada a partir de un polinucleótido que la codifica (véase, "el polinucleótido de la presente divulgación" descrito posteriormente) en células huéspedes apropiadas, también se puede preparar por métodos de síntesis química tal como el método Fmoc (método del fluorenilmetiloxycarbonilo), y método tBoc (método de t-butiloxycarbonilo). Alternativamente, la proteína de la presente divulgación también se puede sintetizar químicamente con sintetizadores de péptidos comercialmente disponibles de Advanced Automation Peptide Protein Technologies, Perkin Elmer, Protein Technologies, PerSeptive, Applied Biosystems, SHIMADZU, etc.

2. Método para producir un glucósido de esteviol

5 La presente divulgación permite la producción de glucósidos de esteviol con facilidad y en grandes cantidades por medio de la actividad de la proteína para añadir una molécula(s) de azúcar a $-OR_1$ en la posición 13 y $-COOR_2$ en la posición 19 de un compuesto representado por la fórmula (I).

10 En otra forma de realización, la presente divulgación, por tanto, proporciona un primer método para producir un glucósido de esteviol, que comprende la etapa de hacer reaccionar la proteína de la presente divulgación, un UDP-azúcar y un compuesto representado por la siguiente fórmula (I) para añadir de esta manera una molécula(s) de azúcar a $-OR_1$ en la posición 13 y $-COOR_2$ en la posición 19 de un compuesto representado por la fórmula (I).

[Fórmula 15]



R_1 y R_2 en la fórmula (I) son como se han definido anteriormente. Un compuesto preferido de fórmula (I) es esteviol, esteviolmonósido, esteviolbiósido, rubusósido o el compuesto Y.

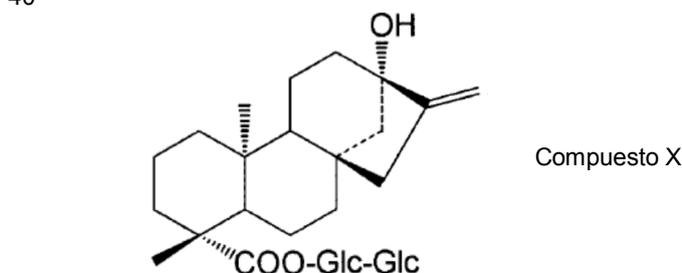
20 Como se usa en el presente documento, el término "UDP-azúcar" se refiere a un azúcar conjugado con uridina difosfato (UDP). Los ejemplos preferidos de la fracción azúcar de un UDP-azúcar incluyen azúcares compuestos de una o más pentosas, hexosas o cualquier combinación de las mismas. Los ejemplos de pentosas y hexosas son como se han decretado anteriormente. El UDP-azúcar es preferiblemente una UDP-hexosa, y más preferiblemente una hexosa seleccionada del grupo que consiste en glucosa, manosa y galactosa. El UDP-azúcar anterior es lo más preferiblemente UDP-glucosa.

25 El primer método para producir un glucósido de esteviol según la presente divulgación comprende la etapa de hacer reaccionar la proteína de la presente divulgación, un UDP-azúcar y un compuesto representado por la fórmula (I) para añadir de esta manera una molécula(s) de azúcar a $-OR_1$ en la posición 13 y $-COOR_2$ en la posición 19 de un compuesto representado por la fórmula (I). El primer método de la presente divulgación puede comprender además la etapa de purificar el glucósido de esteviol generado en la etapa anterior.

30 Los ejemplos de un glucósido de esteviol producido por el primer método incluyen, pero no están limitados a esteviolmonósido, esteviolbiósido, rubusósido, el compuesto X, el compuesto Y, el compuesto Z o cualquier combinación de los mismos.

35 La estructura del compuesto X es como se muestra a continuación.

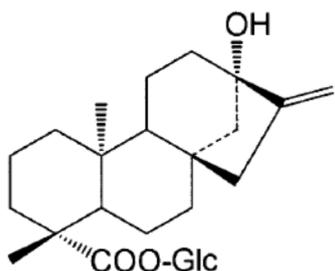
[Fórmula 16]



La estructura del compuesto Y es como se muestra a continuación

[Fórmula 17]

45

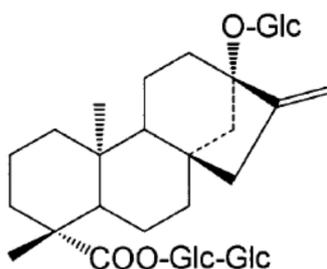


Compuesto Y

La estructura del compuesto Z es como se muestra a continuación

[Fórmula 18]

5



Compuesto Z

Los glucósidos de esteviol generados se pueden purificar por técnicas conocidas tal como extracción con un solvente apropiado (un solvente acuoso tal como agua o un solvente orgánico tal como alcohol, éter o acetona), un gradiente entre un solvente orgánico (por ejemplo, acetato de etilo) y agua, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía de gases, espectrometría de masas de tiempo de vuelo (TOF-MS), cromatografía líquida de ultra (alto) rendimiento (UPLC), etc.

10

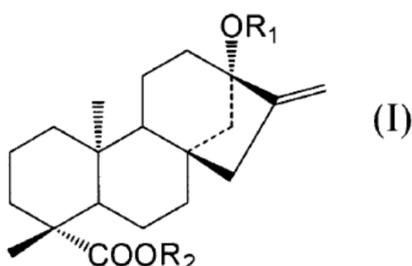
3. Transformante no humano rico en glucósidos de esteviol

Los glucósidos de esteviol también se pueden producir usando la proteína de la presente divulgación en células tal como esas de bacterias (por ejemplo, *E. coli* o levadura), plantas, insectos, mamíferos no humanos, etc. Esto es debido a que la proteína de la presente divulgación es una enzima derivada de estevia o un mutante de la misma y, por tanto, se espera que tenga alta actividad incluso en el medio intracelular. En este caso, un polinucleótido que codifica la proteína de la presente divulgación (véase “el polinucleótido de la presente divulgación” descrito posteriormente) se puede introducir en células huéspedes derivadas de bacterias, plantas, insectos, mamíferos no humanos o similares para producir expresión de la proteína de la presente divulgación, seguido por hacer reaccionar la proteína de la presente divulgación con UDP-azúcares y compuestos representados por la fórmula (I) presentes en las células anteriores para producir glucósidos de esteviol.

20

[Fórmula 19]

25



(I)

A continuación, la presente divulgación proporciona un transformante no humano transformado con un polinucleótido de cualquiera seleccionado del grupo que consiste en (a) a (d) mostrado a continuación (de aquí en adelante denominado “el polinucleótido de la presente divulgación”) (tal transformante se denomina de aquí en adelante “el transformante de la presente divulgación”):

30

- (a) un polinucleótido que contiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1;
- (b) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2;

35

2;

(c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos con delección, sustitución, inserción y/o adición de 1 a 7 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 y que tiene la actividad para añadir una molécula(s) de azúcar a -OR₁ en la posición 13 y -COOR₂ en la posición 19 de un compuesto representado por la siguiente fórmula (I); y

5 (d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que comparte una identidad de secuencia del 99% o más con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 y que tiene la actividad para añadir una molécula(s) de azúcar a -OR₁ en la posición 13 y -COOR₂ en la posición 19 de un compuesto representado por la siguiente fórmula (I).

10 La definición y ejemplos detallados de fórmula (I) son como ya se han descrito anteriormente. Asimismo, la definición y ejemplos detallados de las moléculas de azúcar que se van a añadir a -OR₁ en la posición 13 y -COOR₂ en la posición 19 de un compuesto representado por la fórmula (I) son como se han descrito anteriormente.

15 Como se usa en el presente documento, el término "polinucleótido" se pretende que signifique ADN o ARN.

Se debe indicar que la identidad de secuencia de secuencias de aminoácidos o secuencias de nucleótidos se pueden determinar usando FASTA (Science 227 (4693): 1435-1441, (1985)) o el algoritmo de Karlin y Altschul, BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 872264-2268, 1990; Proc Natl Acad Sci USA 90: 5873, 1993). Basados en el algoritmo BLAST, se han desarrollado programas llamados blastn, blastx, blastp, tblastn y tblastx (Altschul SF, et al: J Mol Biol 215: 403, 1990). Si se usa blastn para análisis de la secuencia de nucleótidos, los parámetros se pueden ajustar a, por ejemplo, puntuación = 100 y longitud de palabra = 12. Asimismo, si se usa blastp para análisis de secuencias de aminoácidos, los parámetros se pueden ajustar a, por ejemplo, puntuación = 50 y longitud de palabra = 3. Si se usan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden usar en cada programa los parámetros por defecto.

25 Los polinucleótidos anteriores según la presente divulgación se pueden obtener por procedimientos de ingeniería genética conocidos o procedimientos de síntesis conocidos.

30 El polinucleótido de la presente divulgación preferiblemente se introduce en un huésped en un estado de estar insertado en un vector de expresión apropiado.

Un vector de expresión apropiado en general está configurado para que comprenda:

35 (i) un promotor transcribible en células huésped;
 (ii) el polinucleótido de la presente divulgación ligado al promotor; y
 (iii) un casete de expresión que comprende, como elementos constituyentes, señales que funcionan en las células huésped para la terminación de la transcripción y poliadenilación de una molécula de ARN.

40 Tal vector de expresión se puede preparar de cualquier forma, por ejemplo, por técnicas que usan plásmidos, fagos o cósmidos, etc.

45 El tipo real de vector no está limitado en modo alguno, y cualquier vector expresable en células huéspedes se puede seleccionar como apropiado. Es decir, una secuencia promotora se puede seleccionar como apropiada para el tipo de células huéspedes para asegurar la expresión del polinucleótido de la presente divulgación, y este promotor y el polinucleótido de la presente divulgación se pueden integrar después en varios plásmidos o similares para uso como vectores de expresión.

50 El vector de expresión de la presente divulgación contiene una región(es) de control de la expresión (por ejemplo, promotor, terminador y/o un origen de replicación), dependiendo del tipo de huésped en el que se va a introducir el vector de expresión. Los promotores para uso en vectores de expresión bacterianos pueden ser promotores comúnmente usados (por ejemplo, promotor trc, promotor tac, promotor lac). Asimismo, los promotores para uso en levaduras incluyen, por ejemplo, promotor de la gliceraldehído trifosfato deshidrogenasa, promotor PH05 y demás, mientras que los promotores para uso en hongos filamentosos incluyen, por ejemplo, amilasa, trpC y demás. Además, los ejemplos de promotores usados para expresar un gen deseado en células vegetales incluyen el promotor del ARN de 35S del virus del mosaico de la coliflor, el promotor del gen rd29A, el promotor de rbcS, y el promotor de mac-1 que está configurado para tener una secuencia potenciadora del anterior promotor del ARN de 35S del virus del mosaico de la coliflor en el lado 5' de la secuencia del promotor de manopina sintasa derivada de *Agrobacterium*. Los ejemplos de promotores para uso en huéspedes de células animales incluyen promotores víricos (por ejemplo, promotor temprano del SV40, promotor tardío del SV40) y demás.

60 El vector de expresión preferiblemente comprende al menos un marcador de selección. Para este fin, están disponibles para uso marcadores auxotróficos (ura5, niaD), marcadores de resistencia a fármacos (higromicina, zeocina), gen de resistencia a geneticina (G418r), gen de resistencia a cobre (CUP1) (Marin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 81, p. 337, 1984), genes de resistencia a cerulenina (fas2m, PDR4) (Junji Inokoshi et al., Biochemistry, vol. 64, p. 660, 1992; Hussain et al., Gene, vol. 101, p. 149, 1991) y demás.

65

Aunque el transformante de la presente divulgación se puede preparar (producir) de cualquier forma, un vector de expresión que comprende el polinucleótido de la presente divulgación se puede introducir en un huésped para transformar el huésped, a modo de ejemplo.

5 Se espera que el transformante de la presente divulgación contenga glucósidos de esteviol en alto contenido. Las células huéspedes usadas para la transformación pueden ser de cualquier tipo, y varios tipos de células conocidos se pueden usar preferiblemente. Los ejemplos de células huéspedes incluyen bacterias tal como *E. coli*, levadura (levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*, levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*), células vegetales, células animales no humanas y demás.

10 Las células huéspedes preferidas son las capaces de producir un compuesto representado por la fórmula (I). En el contexto de la presente divulgación, las células huéspedes no están limitadas a las inherentemente capaces de producir un compuesto representado por la fórmula (I), y también pueden ser, por ejemplo, esas que se han modificado de forma recombinante con un gen conocido para poder producir un compuesto representado por la fórmula (I).

15 Los ejemplos conocidos de un gen que codifica una enzima que contribuye a la síntesis de un compuesto representado por la fórmula (I) incluyen, pero no están limitados a, EK13H, UGT74G1 y UGT76G1 (documento no de patente 2).

20 En casos donde las células huéspedes no pueden producir un compuesto representado por la fórmula (I), estas células huéspedes se transforman con el gen de la presente divulgación y el sistema de cultivo del transformante resultante se suplementa con, como sustrato, un compuesto de fórmula (I) o un extracto vegetal que contiene este compuesto, por lo cual se pueden producir glucósidos de esteviol sin la necesidad de introducir un gen que codifica una enzima que contribuye a la síntesis de un compuesto representado por la fórmula (I).

25 Los medios y condiciones de cultivo apropiados para las células huéspedes anteriores se conocen bien en la técnica. Además, el organismo que se va a transformar puede ser de cualquier tipo, y los ejemplos incluyen varios tipos de microorganismos o plantas o animales no humanos como se ha enumerado anteriormente para las células huéspedes.

30 Para la transformación de células huéspedes, se pueden usar técnicas comúnmente usadas. Por ejemplo, la transformación se puede lograr mediante, pero no está limitada a, electroporación (Mackenzie, D. A. et al., Appl. Environ. Microbiol., vol. 66, p. 4655-4661, 2000), método de administración de partículas (descrito en el documento JP 2005-287403 A), método de esferoplastos (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 75, p. 1929, 1978), método de acetato de litio (J. Bacteriology, vol. 153, p. 163, 1983), y otros métodos como se describe en Methods in yeast genetics, 2000 Edición: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual.

35 Además, respecto a procedimientos estándar de biología molecular, se puede hacer referencia a "Sambrook & Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001," "Methods in Yeast Genetics, A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)," etc.

40 Tras cultivar el transformante así obtenido, se pueden acumular glucósidos de esteviol en el transformante. Como se ha descrito anteriormente, el sistema de cultivo del transformante se puede suplementar con, como sustrato, un compuesto de fórmula (I) o un extracto vegetal que contiene este compuesto para facilitar de esta manera la producción de glucósidos de esteviol. Los glucósidos de esteviol acumulados se pueden extraer y purificar para obtener de esta manera los glucósidos de esteviol deseados.

45 Por tanto, la presente divulgación proporciona un segundo método para producir un glucósido de esteviol, que comprende usar el transformante de la presente divulgación. El medio y las condiciones de cultivo apropiados se conocen bien en la técnica. Además, cómo extraer y purificar glucósidos de esteviol es como ya se ha descrito anteriormente.

50 Aunque los glucósidos de esteviol no están limitados en modo alguno, se prefieren los que se pueden seleccionar del grupo que consiste en esteviolmonósido, esteviolbiósido, esteviósido, rubusósido, compuesto X, compuesto Y, compuesto Z y combinaciones de los mismos.

55 En una forma de realización de la presente divulgación, el transformante puede ser un transformante vegetal. El transformante vegetal según esta forma de realización se puede obtener introduciendo un vector recombinante que comprende el polinucleótido de la presente divulgación en una planta de modo que un polipéptido codificado por este polinucleótido se pueda expresar.

60 En casos donde se usa un vector de expresión recombinante, cualquier vector de expresión recombinante se puede usar para la transformación de una planta entera siempre que sea un vector que permita que el polinucleótido de la presente divulgación se exprese en la planta. Los ejemplos de tal vector incluyen los que tienen un promotor que dirige la expresión constitutiva de un polinucleótido deseado en células vegetales o los que tienen un promotor cuya activación se induce por estimulación externa.

65

Los ejemplos de un promotor que dirige expresión constitutiva de un polinucleótido deseado en células vegetales incluyen el promotor del ARN de 35S del virus del mosaico de la coliflor, el promotor del gen rd29A, el promotor de rbcS, el promotor de mac-1, etc.

- 5 Los ejemplos de un promotor cuya activación se induce por estimulación externa incluyen el promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV), el promotor de respuesta a tetraciclina, el promotor de metalotioneína y el promotor de la proteína de choque térmico, etc.

10 La planta que se va a transformar en la presente divulgación se pretende que signifique cualquiera de una planta entera, un órgano de planta (por ejemplo, hoja, pétalo, tallo, raíz, semilla), un tejido de planta (por ejemplo, epidermis, floema, parénquima, xilema, haz vascular, tejido en empalizada, parénquima esponjoso) o una célula vegetal cultivada, o alternativamente, varias formas de células vegetales (por ejemplo, células cultivadas en suspensión), un protoplasto, una sección de hoja, un callo y demás. La planta usada para la transformación puede ser de cualquier tipo, que pertenezca o bien a las monocotiledóneas o a las dicotiledóneas.

15 Para la transferencia de genes en plantas, se pueden usar técnicas de transformación que conocen los expertos en la materia (por ejemplo, método mediado por *Agrobacterium*, método de bombardeo génico, método mediado por PEG, electroporación). Por ejemplo, el método mediado por *Agrobacterium* y la transferencia génica directa son bien conocidos. En el caso de usar el método mediado por *Agrobacterium*, el vector de expresión vegetal construido se puede introducir en una cepa de *Agrobacterium* apropiada (por ejemplo, *Agrobacterium tumefaciens*) y esta cepa se puede infectar después en una sección de hoja cultivada en condiciones estériles, por ejemplo, según el método de disco de hoja (Hirofumi Miyauchi, *Manuals for Plant Genetic Engineering* (1990) páginas 27-31, Kodansha Scientific Ltd., Tokio) para obtener de esta manera una planta transgénica. Alternativamente, es posible usar el método de Nagel et al. (*Micriobiol. Lett.*, 67: 325 (1990)). En este método, por ejemplo, un vector de expresión se introduce primero en *Agrobacterium*, y el *Agrobacterium* transformado se introduce después en células vegetales o tejidos vegetales como se describe en *Plant Molecular Biology Manual* (Gelvin, S.B. et al., Academic Press Publishers). Como se usa en el presente documento, el término "tejido vegetal" también incluye un callo obtenible cultivando células vegetales. En casos donde el método mediado por *Agrobacterium* se usa para la transformación, se puede usar un vector binario (por ejemplo, pBI121 o pPZP202).

20 Asimismo, técnicas conocidas para la transferencia de genes directa en células vegetales o tejidos vegetales son electroporación y método de bombardeo de partículas. En el caso de usar un bombardeo de partículas, se pueden usar directamente una planta entera, un órgano vegetal o un tejido vegetal, o se pueden preparar secciones de las mismas antes del uso, o se pueden preparar y usar protoplastos. Las muestras así preparadas se pueden tratar usando un dispositivo de transferencia génica (por ejemplo, PDS-1000 (BIO-RAD)). Aunque las condiciones de tratamiento variarán dependiendo del tipo de planta o muestra, el tratamiento en general se realiza a una presión de aproximadamente 450 a 2000 psi y a una distancia de aproximadamente 4 a 12 cm.

25 Las células transformadas o tejidos vegetales se seleccionan primero por resistencia a fármacos tal como resistencia a higromicina, y después se regeneran en plantas enteras de una manera estándar. La regeneración a partir de células transformadas en plantas enteras se puede lograr por técnicas que conocen los expertos en la materia como apropiadas para el tipo de células vegetales.

30 En casos donde se usan células vegetales cultivadas como huésped, la transformación se puede lograr introduciendo un vector recombinante en las células cultivadas con un cañón de genes o por electroporación, etc. Los callos, brotes, raíces pilosas y similares obtenidos como resultado de la transformación se pueden usar directamente para cultivo celular, cultivo de tejidos o cultivo de órganos, y también se pueden regenerar a plantas enteras usando procedimientos convencionalmente conocidos para cultivo de tejido vegetal, por ejemplo, administrando una concentración apropiada de una hormona vegetal (por ejemplo, auxina, citoquinina, giberelina, ácido abscísico, etileno, brasinolida).

35 La confirmación de si el polinucleótido de la presente divulgación se ha introducido o no en una planta se puede lograr por PCR, hibridación de tipo Southern, hibridación de tipo Northern, etc. Por ejemplo, se prepara ADN de una planta transgénica y se diseñan cebadores específicos de ADN para PCR. La PCR se puede realizar en las mismas condiciones usadas para la preparación del plásmido anterior. A continuación, los productos de amplificación se pueden someter a, por ejemplo, electroforesis en gel de agarosa, electroforesis en gel de poliacrilamida o electroforesis capilar seguido por tinción con bromuro de etidio, solución BYBR Green, etc. Si los productos de amplificación se detectan como una única banda, se puede confirmar que la planta ha sido transformada. Alternativamente, se pueden usar cebadores que se han marcado con un colorante fluorescente o similar en PCR para detectar de esta manera productos de amplificación. Además, también es posible usar técnicas en las que los productos de amplificación se unen sobre una fase sólida (por ejemplo, una microplaca) y se confirma por fluorescencia o reacción enzimática, etc.

40 Una vez que se ha obtenido una planta transgénica entera cuyo genoma porta el polinucleótido de la presente divulgación, se pueden obtener plantas progenie por reproducción sexual o asexual de la planta entera. Además, de tal planta entera o plantas progenie de la misma o clones de las mismas, por ejemplo, se pueden obtener semillas, frutos, esquejes, tubérculos, raíces tuberosas, portainjertos, callos, protoplastos o similares y usar para alcanzar producción en masa de la planta entera. Por tanto, la presente divulgación también abarca una planta entera en la que

el polinucleótido de la presente divulgación se ha introducido en una forma expresable, o plantas progenie de la planta entera que tienen las mismas propiedades que la planta entera, o tejidos derivados de la planta entera y plantas progenie de la misma.

5 Además, ya se han descrito técnicas de transformación para varias plantas. Las plantas transgénicas según la presente divulgación incluyen plantas de la familia Solanaceae (por ejemplo, berenjena, tomate, pimiento picante, patata, tabaco, estramonio, planta de la linterna china, petunia, calibrachoa, nierembergia), plantas de la familia Leguminosae (por ejemplo, soja, haba azuki, cacahuete, alubia, habas, loto corniculado), plantas de la familia Rosaceae (por ejemplo, fresa, albaricoque japonés, cerezo, rosa, arándano, mora, arándano, casis, frambuesa, té dulce chino), plantas de la familia Caryophyllaceae (por ejemplo, clavel, gypsophila), plantas de la familia Asteraceae (por ejemplo, crisantemo, gerbera, girasol, margarita, estevia), plantas de la familia Orchidaceae (por ejemplo, orquídea), plantas de la familia Primulaceae (por ejemplo, ciclamen), plantas de la familia Gentianaceae (por ejemplo, Eustoma russellianum, genciana), plantas de la familia Iridaceae (por ejemplo, fresia, iris, gladiolo), plantas de la familia Scrophulariaceae (por ejemplo, boca de dragón, torenia), uñas de gato (kalanchoe), plantas de la familia Liliaceae (por ejemplo, lirio, tulipán), plantas de la familia Convolvulaceae (por ejemplo, campanilla, campanilla con hojas de hiedra, campanilla tropical americana, boniato, fin del amor, evolvulus), plantas de la familia Hydrangeaceae (por ejemplo, hortensia, deutzia), plantas de la familia Cucurbitaceae (por ejemplo, calabaza de peregrino), plantas de la familia Geraniaceae (por ejemplo, pelargonium, geranio), plantas de la familia Oleaceae (por ejemplo forsitia), plantas de la familia Vitaceae (por ejemplo, uva), plantas de la familia Theaceae (por ejemplo, camelia, planta de té), plantas de la familia Gramineae (por ejemplo, arroz, cebada, trigo, avena, centeno, maíz, mijo menor, mijo japonés, kaoliang, caña de azúcar, bambú, avena silvestre, mijo de dedo, sorgo, arroz silvestre de Manchuria, lágrimas de Job, hierba de los prados), plantas de la familia Moraceae (por ejemplo, morera, lúpulo, morera del papel, árbol del caucho, cannabis), plantas de la familia Rubiaceae (por ejemplo, árbol del café, gardenia), plantas de la familia Fagaceae (por ejemplo, roble, haya, roble de Daimyo), plantas de la familia Pedaliaceae (por ejemplo, sésamo), plantas de la familia Rutaceae (por ejemplo, naranja amarga, Citrus junos, unshu mikan, árbol de shansho), plantas de la familia Brassicaceae (por ejemplo, lombarda, col ornamental, rábano japonés, bolsa del pastor blanca, colza china, repollo, brócoli, coliflor), y plantas de la familia Lamiaceae (por ejemplo, salvia, perilla, lavanda, esculetaria). Como ejemplos particularmente preferidos como plantas que se van a transformar, las que se sabe que biosintetizan varios glucósidos empezando de esteviol como una aglucona se desean para uso, y los ejemplos de tales plantas incluyen estevia y té dulce chino (Rubus suavissimus), etc.

35 Cuando un sustrato apropiado está presente de forma endógena o se añade externamente, la planta entera transformada con el polinucleótido de la presente divulgación (de aquí en adelante denominada "la planta de la presente divulgación" o "la planta entera de la presente divulgación") es capaz de producir glucósidos de esteviol en mayores cantidades que su homólogo de tipo salvaje.

La planta de la presente divulgación se puede obtener fácilmente como una planta entera perfecta haciéndola crecer de una semilla, un esqueje, un bulbo o similar de la planta de la presente divulgación.

40 Por tanto, la planta de la presente divulgación abarca una planta entera, un órgano vegetal (por ejemplo, hoja, pétalo, tallo, raíz, semilla, bulbo), un tejido vegetal (por ejemplo, epidermis, floema, parénquima, xilema, haz vascular, tejido en empalizada, parénquima esponjoso) o una célula vegetal cultivada, o alternativamente, varias formas de células vegetales (por ejemplo, células cultivadas en suspensión), un protoplasto, una sección de hoja, un callo y demás.

45 4. Extracto de transformante y uso del mismo

En otra forma de realización, la presente divulgación también proporciona un extracto del transformante anterior. Cuando un sustrato apropiado está presente de forma endógena o se añade externamente, el transformante de la presente divulgación es rico en glucósidos de esteviol comparado con su homólogo de tipo salvaje; y por tanto se considera que un extracto del transformante contiene glucósidos de esteviol en altas concentraciones.

55 Tal extracto del transformante de la presente divulgación se puede obtener como sigue: el transformante se homogeniza con, por ejemplo, bolas de vidrio, un homogenizador o un sonicador y el homogenizado resultante se centrifuga para recoger el sobrenadante. Además, también se puede proporcionar una etapa adicional de extracción según los procedimientos de extracción para glucósidos de esteviol como se ha mencionado anteriormente.

El extracto del transformante de la presente divulgación se puede suministrar para uso en, por ejemplo, la producción de alimentos, preparaciones farmacéuticas y/o materias primas industriales según práctica estándar.

60 En otra forma de realización, la presente divulgación también proporciona un alimento, una preparación farmacéutica y/o una materia prima industrial (por ejemplo, materias primas para alimentos), cada uno contiene el extracto del transformante de la presente divulgación. Tal alimento, preparación farmacéutica y/o materia prima industrial, que contiene cada uno el extracto del transformante de la presente divulgación, se puede preparar de una manera estándar. De esta manera, tal alimento, preparación farmacéutica y/o materia prima industrial, que cada uno contiene el extracto del transformante de la presente divulgación, contiene glucósidos de esteviol generados usando el transformante de la presente divulgación.

La preparación (composición) farmacéutica de la presente divulgación puede estar en cualquier forma farmacéutica, tal como solución, pasta, gel, sólido, polvo y otras formas farmacéuticas. Además, la composición farmacéutica de la presente divulgación se puede usar en preparaciones externas para la piel (por ejemplo, aceite, loción, crema, emulsión, gel, champú, acondicionador capilar, esmalte de uñas, base de maquillaje, pintalabios, polvo facial, mascarilla facial, pomada, polvo, dentífrico, aerosol, espuma limpiadora), así como preparaciones de baño, promotores del crecimiento del pelo, esencias para la piel, agentes de protección solar y demás.

La composición farmacéutica de la presente divulgación puede comprender además ingredientes farmacéuticamente activos adicionales (por ejemplo, ingrediente antiinflamatorio) o ingredientes auxiliares (por ejemplo, ingrediente lubricante, ingrediente portador) cuando se requiera.

Los ejemplos del alimento de la presente divulgación incluyen alimentos suplementarios nutricionales, alimentos sanos, alimentos funcionales, alimentos para niños, alimentos geriátricos y demás. El término "alimento" o "producto alimenticio" se usa en el presente documento como un nombre genérico para materiales comestibles en forma de sólidos, líquidos o mezclas de los mismos.

El término "alimentos suplementarios nutricionales" se refiere a productos alimenticios enriquecidos con ingredientes nutricionales específicos. El término "alimentos sanos" se refiere a productos alimenticios que son saludables o buenos para la salud, y abarca alimentos suplementarios nutricionales, alimentos naturales y alimentos dietéticos. El término "alimentos funcionales" se refiere a productos alimenticios para reponer ingredientes nutricionales que ayudan a las funciones de control del cuerpo. Los alimentos funcionales son sinónimos de alimentos para uso saludable especificado. El término "alimentos para niños" se refiere a productos alimenticios dados a niños de hasta 6 años de edad. El término "alimentos geriátricos" se refiere a productos alimenticios tratados para facilitar la digestión y absorción cuando se comparan con alimentos sin tratar.

En el alimento de la presente divulgación, un glucósido de esteviol sin calorías se usa como un edulcorante. Por esta razón, el alimento de la presente divulgación es bajo en calorías y tiene la ventaja de contribuir al fomento de la salud o mantenimiento de la salud.

Estos alimentos y productos alimenticios pueden estar en forma de alimentos agrícolas incluyendo productos de panadería, fideos, pasta, arroz cocido, dulces (por ejemplo, tarta, helado, polos, donuts, pasteles, golosinas, chicles, gominolas, caramelos blandos, así como dulces japoneses tal como dumplings de arroz (dango) y bollos de pasta de judías dulce (manju)), tofu y productos procesados de los mismos; alimentos fermentados incluyendo vino de arroz japonés (sake), licor medicinal, vino de cocinar dulce (mirin), vinagre, salsa de soja y miso (pasta de judías); productos alimenticios de ganado incluyendo yogur, jamón, beicon y salchicha; productos del mar incluyendo pastel de pescado (kamaboko), pastel de pescado frito (ageten) y pastel de pescado hinchado (hanpen); así como bebidas de frutas, refrescos, bebidas deportivas, bebidas alcohólicas, té o potenciadores de sabor.

5. Método de cribado para una planta rica en glucósidos de esteviol

La presente divulgación proporciona un método de cribado para una planta rica en glucósidos de esteviol. Más específicamente, el método anterior comprende las etapas (1) a (3) mostradas a continuación:

- (1) la etapa de extraer ARNm de una planta de prueba;
- (2) la etapa de permitir la hibridación entre el ARNm anterior o el ADNc preparado a partir del ARNm anterior y un polinucleótido que es hibridable en condiciones muy rigurosas con un polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria al polinucleótido de la presente divulgación; y
- (3) la etapa de detectar la hibridación anterior.

La anterior etapa (1) se puede lograr extrayendo el ARNm de una planta de prueba. Aunque el ARNm se puede extraer de cualquier sitio de la planta de prueba, los pétalos son preferidos. Una vez que el ARNm se ha extraído, se puede preparar ADNc a partir del ARNm mediante transcripción inversa.

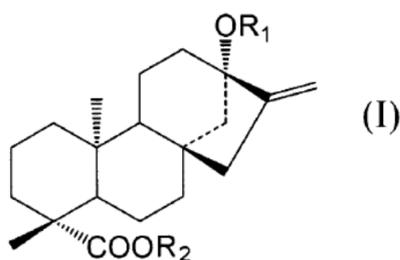
La anterior etapa (2) se puede lograr como sigue: un polinucleótido u oligonucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria al polinucleótido de la presente divulgación se usa como sonda o cebador y se deja hibridar con el ARNm extraído anteriormente en condiciones muy rigurosas. Como se usa en el presente documento, el término "condiciones muy rigurosas" se refiere a, por ejemplo, pero no está limitado a, las siguientes condiciones: (1) SSC 5x, solución de Denhardt 5x, SDS al 0,5%, formamida al 50%, 50°C; (2) SSC 2x, SDS al 0,1%, 60°C; (3) SSC 0,2x, SDS al 0,1%, 62°C; o (4) SSC 0,2x, SDS al 0,1%, 65°C. En estas condiciones, se puede esperar que el ADN que tiene una mayor identidad de secuencia se obtiene de forma eficaz a una mayor temperatura. Sin embargo, la rigurosidad de la hibridación estaría afectada por una pluralidad de factores, incluyendo la temperatura, concentración de la sonda, longitud de la sonda, fuerza iónica, tiempo de reacción, concentración de sal y demás. Los expertos en la materia serían capaces de alcanzar la misma rigurosidad seleccionando estos factores según sea apropiado.

Tal polinucleótido u oligonucleótido tiene una longitud de preferiblemente 5 a 500 pb, más preferiblemente de 10 a 200 pb, e incluso más preferiblemente de 10 a 100 pb. El polinucleótido u oligonucleótido se puede sintetizar fácilmente con varios sintetizadores automáticos (por ejemplo, AKTA oligopilot plus 10/100 (GE Healthcare)), o alternativamente, su síntesis se puede encomendar a un tercer partido (por ejemplo, Promega o Takara), etc.

Cuando el polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria al polinucleótido de la presente divulgación se usa como una sonda en la etapa (2), la etapa (3) se puede lograr por técnicas comúnmente usadas para la detección de hibridación, tal como transferencia de tipo Southern, transferencia de tipo Northern (Sambrook, Fritsch y Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2ª Edición (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press), micromatrices (Affymetrix; véanse las patentes en los Estados Unidos Nos. 6.045.996, 5.925.525 y 5.858.659), TaqMan PCR (Sambrook, Fritsch y Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2ª Edición (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press), o hibridación fluorescente *in situ* (FISH) (Sieben V. J. et al., (2007-06). IET Nanobiotechnology 1 (3): 27-35). Por otra parte, cuando el polinucleótido que consiste en una secuencia de nucleótidos complementaria al polinucleótido de la presente divulgación se usa como un cebador en la etapa (2), la etapa (3) se puede lograr por amplificación por PCR y el posterior análisis de los productos de amplificación resultantes por electroforesis o secuenciación (Sambrook, Fritsch y Maniatis, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2ª Edición (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press), etc., para detectar la hibridación.

Una planta entera en la que la hibridación se detectaba con más frecuencia se puede considerar como que expresa niveles más altos de una proteína que tiene la actividad para añadir una molécula(s) de azúcar a -OR₁ en la posición 13 y -COOR₂ en la posición 19 de un compuesto representado por la siguiente fórmula (I) que otras plantas enteras, y por tanto se predice que tal planta entera sea rica en glucósidos de esteviol.

[Fórmula 20]



Ejemplos

La presente divulgación se describirá ahora en más detalle por medio de los siguientes ejemplos.

[Ejemplo 1] Aislamiento de un gen candidato para esteviolbíosido glucosiltransferasa

Para obtener un gen muy homólogo a UGT73E1 (AY345979) que se ha descrito que no tiene actividad de glucosilación sobre glucósidos de esteviol en estudios previos (documento no de patente 2), se usó ADNc preparado de hojas de estevia como molde en PCR con el siguiente conjunto de cebadores (SEQ ID NO: 3 y 4).

El ADNc de la hoja de estevia se obtuvo como sigue: se extrajo ARN total de hojas de estevia con un kit RNeasy Plant Mini (QIAGEN) y 0,5 µg del ARN total se sometieron después a reacción de transcripción inversa (RT) con cebadores aleatorios oligo-dT.

CACC-NdeI-SrUGT73E1 -Fw:

5'-CACCCATATGTCGCCAAAAATGGTGGCACCA-3' (SEQ ID NO: 3)

BamHI-SrUGT73E1-Rv:

5'-GGATCCCTAATGTGGTGCTCTAACTGTTTCAGTCACAT-3' (SEQ ID NO: 4)

Se preparó una solución de reacción de PCR (50 µl) para que consistiera en ADNc derivado de hojas de estevia (1 µl), tampón ExTaq 1x (TaKaRaBio), dNTPs 0,2 mM, cebadores (0,4 pmol/µl cada uno) y polimerasa ExTaq (2,5 U). La reacción de PCR se logró mediante incubación de 94°C durante 3 minutos y la posterior amplificación en la que reacciones a 94°C durante 1 minuto, a 50°C durante 1 minuto y a 72°C durante dos minutos se repitieron durante 30 ciclos en total. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% y se tiñeron con bromuro de etidio, produciendo de esta manera una banda amplificada en un tamaño de aproximadamente 1,5 kb predicha de cada molde de ADN.

Este producto de PCR se subclonó en el vector pENTR-TOPO Directional (Invitrogen) según el método recomendado por el fabricante. El clon se secuenció por desplazamiento del cebador con cebadores oligonucleotídicos sintéticos usando un secuenciador de ADN modelo 3100 (Applied Biosystems).

- 5 Como resultado del análisis de secuencia del ADNc clonado (designado como “proteína homóloga 1 de UGT73E1”), mostró una identidad de secuencia del 98% a nivel de ADN (una diferencia de 16 bases) y una identidad de secuencia del 98% a nivel de aminoácidos (una diferencia de 8 aminoácidos) (secuencia CDS: SEQ ID NO: 1, secuencia de aminoácidos: SEQ ID NO: 2) relativa al UGT73E1 descrito.

10 [Ejemplo 2] Construcción de un vector de expresión

Se cortó un fragmento ORF de aproximadamente 1,5 kb de la proteína homóloga 1 de UGT73E1 por medio de los sitios de enzimas de restricción NdeI y BamHI (las partes subrayadas en SEQ ID NO: 3 y 4) añadidos a los cebadores y después se ligó a los sitios NdeI y BamHI de un vector de expresión de *E. coli*, pET15b (Novagen), para obtener de esta manera un vector de expresión de *E. coli* para este gen de enzima. Este vector se diseñó para portar el marco abierto de lectura del gen de la proteína homóloga 1 de UGT73E1 en el mismo marco de lectura con una etiqueta de His localizada antes del sitio NdeI de este vector para expresar una proteína quimérica fusionada entre la proteína homóloga 1 de UGT73E1 y la etiqueta de His.

20 [Ejemplo 3] Expresión y purificación de la proteína recombinante

Para aclarar las funciones bioquímicas de esta enzima, se dejó que esta enzima se expresara en células de *E. coli*. Se usó el plásmido de expresión en *E. coli* de la proteína homóloga 1 de UGT73E1 obtenido anteriormente para transformar la cepa de *E. coli* BL21(DE3) de una manera estándar. El transformante resultante se cultivó durante la noche a 37°C en condiciones de agitación en 4 ml de un medio LB (triptona peptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 1 g/l) que contenía ampicilina 50 µg/ml. Después de alcanzar la fase de reposo, la solución cultivada (4 ml) se inoculó en un medio de la misma composición (80 ml) y se cultivó a 37°C en condiciones de agitación. En el momento en el que la turbidez celular (DO600) alcanzó aproximadamente 0,5, se añadió IPTG a una concentración final de 0,5 mM, seguido por cultivar a 18°C durante 20 horas en condiciones de agitación.

Las siguientes manipulaciones se realizaron todas a 4°C. El transformante cultivado se recogió por centrifugación (5.000×g, 10 min) y después se añadió a y se resuspendió en tampón S [tampón HEPES 20 mM (pH 7,5), imidazol 20 mM, β-mercaptoetanol 14 mM] a 1 mg/célula. Posteriormente, la suspensión se homogenizó por ultrasonificación (15 segundos, repetido 8 veces) y después se centrifugó (15.000×g, 15 min). El sobrenadante resultante se recogió como una solución de enzima cruda. La solución de enzima cruda se cargó en una columna His SpinTrap (GE Healthcare) que se había equilibrado con tampón S, seguido por centrifugación (70×g, 30 seg). Después de lavar con el tampón, las proteínas unidas a la columna se eluyeron por etapas con 5 ml cada uno de tampón S que contenía imidazol 100 mM y 500 mM. Cada fracción de elución se sometió a sustitución de tampón con tampón HEPES 20 mM (pH 7,5), β-mercaptoetanol 14 mM a través de una unidad Microcon YM-30 (Amicon) (aumento de diálisis: x1000).

Como resultado de la separación por SDS-PAGE y la posterior tinción con CBB en la fracción eluida con imidazol 200 mM, se confirmó una proteína a aproximadamente 50 kDa (indicada con un asterisco en la figura 3), que es el peso molecular putativo para la proteína quimérica proteína homóloga 1 de UGT73E1 fusionada a etiqueta de His. Esta fracción se usó para análisis enzimático. Se debe indicar que en la figura 3, el panel A muestra una imagen teñida con CBB obtenida para la fracción del precipitado, mientras que el panel B muestra una imagen teñida con CBB para la fracción eluida con la solución de imidazol.

[Ejemplo 4] Medida de la actividad enzimática de la proteína homóloga 1 de UGT73E1

50 Las condiciones estándar de la reacción enzimática son como sigue. Se preparó una solución de reacción (UDP-glucosa 2 mM, sustrato aceptor de azúcar (esteviol) 0,1 mM, tampón fosfato de potasio 100 mM (pH 7,0), solución de enzima proteína homóloga 1 de UGT73E1 purificada 25 µl) en un volumen de 50 µl con agua destilada y se hizo reaccionar a 30°C durante 1 hora. La solución de reacción enzimática (5 µl) se analizó por LC-MS en las siguientes condiciones.

55 Condiciones de LC

Columna: Waters Sunfire C18 3,5 µm (2,0 mm D.I. × 20 mm)

Fase móvil: A: agua MiliQ (+ ácido fórmico al 0,05%), B: MeCN

60 Gradiente: gradiente de concentración lineal de B desde el 15% al 55% a lo largo de 20 minutos

Velocidad de flujo: 0,2 ml por minuto

Horno de columna: 40°C

65 Condiciones de MS

ESI (modo negativo)

Seguimiento de ion seleccionado: m/z 317, 479, 641, 687, 803 y 849

Como resultado de la reacción entre la proteína homóloga 1 de UGT73E1 y esteviol, se encontraron cuatro tipos de productos de nuevo en la solución de reacción entre la proteína homóloga 1 de UGT73E1 y esteviol (pico A) (Figura 4: panel 1). Entre ellos, el pico E y el pico B se identificaron que eran rubusósido y esteviolmonósido, respectivamente, basado en comparación con los tiempos de retención de sus estándares de referencia (Figura 5).

Por otra parte, con respecto a los dos picos restantes, basado en sus cromatogramas de MS, se identificó que el compuesto Y era un monoglucósido y se identificó que el compuesto X era un diglucósido. El tiempo de retención del compuesto Y no estaba de acuerdo con el estándar de referencia esteviolmonósido, sugiriendo por tanto que el compuesto Y era un monoglucósido en el que el grupo carboxilo en la posición 19 del esteviol estaba monoglucosilado (Figura 6). Asimismo, el tiempo de retención del compuesto X no estaba de acuerdo con el de esteviolbiósido o rubusósido, siendo cada uno un diglucósido de esteviol, por tanto, sugiriendo fuertemente que el grupo carboxilo en la posición 19 estaba glucosilado (Figura 6). Cuando la proteína homóloga 1 de UGT73E1 y UGT85C2 se hicieron reaccionar simultáneamente con esteviol (pico A), los picos del compuesto Y y el compuesto X se redujeron ambos significativamente (Figura 4: panel 2). Esto sería debido a que estas dos enzimas están en una relación competitiva donde esteviol se usa en común como sustrato, y por tanto esteviol (pico A) era rápidamente convertido a esteviolmonósido (pico B) por la acción de UGT85C2.

Además, tras la reacción entre la proteína homóloga 1 de UGT73E1 y rubusósido (pico E), el compuesto Z que parece ser un triglucósido de esteviol se generó de nuevo (Figura 4: panel 3). El tiempo de retención del compuesto Z no estaba de acuerdo con los de esteviósido y rebaudiósido B (picos F y D), siendo cada uno un triglucósido de esteviol, lo que sugiere por tanto que la glucosa en la posición 19 de rubusósido era glucosilada adicionalmente (Figura 6).

Tras la reacción entre la proteína homóloga 1 de UGT73E1 y esteviolmonósido (pico B), dos picos (pico E y pico F) se obtuvieron de nuevo (Figura 4: panel 4). Basado en sus tiempos de retención, se identificó que el pico E era rubusósido y se identificó que el pico F era esteviósido. Además, tras la reacción entre la proteína homóloga 1 de UGT73E1 y esteviolbiósido (pico C), también se detectó un producto que parece ser esteviósido (pico F) (Figura 4: panel 5).

A la luz de estos resultados, la proteína homóloga 1 de UGT73E1 produce glucosilación en el grupo hidroxilo de la posición 13 de esteviol para generar esteviolmonósido, y produce glucosilación adicional en la glucosa en la posición 13 de esteviolmonósido para generar esteviolbiósido, y produce glucosilación adicional en el grupo carboxilo de la posición 19 de esteviolbiósido para generar esteviósido. Como se ha mostrado anteriormente, se encontró que la proteína homóloga 1 de UGT73E1 tiene actividad de glucosilación en la posición 19 de esteviolmonósido para generar rubusósido. Sin embargo, no se puede encontrar un pico de esteviósido significativo en la solución de reacción entre rubusósido y la proteína homóloga 1 de UGT73E1, lo que sugiere por tanto que esteviósido, un producto de reacción de la proteína homóloga 1 de UGT73E1, se genera a través de esteviolbiósido (Figura 6).

Aplicabilidad industrial

En vista de lo anterior, se encontró que la proteína homóloga 1 de UGT73E1 era una enzima de glucosilación multifuncional capaz de reaccionar con esteviol y varios glucósidos del mismo (Figura 6). Se encontró que esta enzima era específica para diferentes posiciones porque glucosilaba esteviol en el grupo hidroxilo de la posición 13, además en el grupo carboxilo de la posición 19 y además en la glucosa de la posición 19. Con el uso de esta enzima, se pueden producir glucósidos de esteviol conocidos mediante un método novedoso. Además, también se pueden producir glucósidos de esteviol estructuralmente novedosos.

Lista de secuencias texto libre

SEQ ID NO: 3: ADN sintético
SEQ ID NO: 4: ADN sintético

Lista de secuencias

<110> SUNTORY HOLDINGS LIMITED

<120> Esteviol glucosiltransferasa y gen de la misma

<130> PCT13-0022

<150> JP 2012-123349

<151> 30-05-2012

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.5

ES 2 704 654 T3

<210> 1
 <211> 1488
 <212> ADN
 5 <213> Stevia rebaudiana

 <220>
 <221> CDS
 <222> (1) ... (1488)
 10
 <400> 1
 atg tcg cca aaa atg gtg gca cca cca acc aac ctt cat ttt gtt ttg 48
 Met Ser Pro Lys Met Val Ala Pro Pro Thr Asn Leu His Phe Val Leu
 1 5 10 15

 ttt cct ctt atg gct caa ggc cat ctg gta ccc atg gtc gac atc gct 96
 Phe Pro Leu Met Ala Gln Gly His Leu Val Pro Met Val Asp Ile Ala
 20 25 30

 cga atc tta gcc caa cgt ggt gca acg gtc acc ata atc acc aca ccc 144
 Arg Ile Leu Ala Gln Arg Gly Ala Thr Val Thr Ile Ile Thr Thr Pro
 35 40 45

 tac gat gcc aac cgg gtc aga ccg gtt atc tcc cga gcc atc gcg acc 192
 Tyr Asp Ala Asn Arg Val Arg Pro Val Ile Ser Arg Ala Ile Ala Thr
 50 55 60

 aat ctc aag atc cag cta ctc gaa ctc caa ctg cgg tca acc gaa gcc 240
 Asn Leu Lys Ile Gln Leu Leu Glu Leu Gln Leu Arg Ser Thr Glu Ala
 65 70 75 80

 ggt tta ccc gaa ggg tgc gaa agc ttc gac caa ctt ccg tca ttc gag 288
 Gly Leu Pro Glu Gly Cys Glu Ser Phe Asp Gln Leu Pro Ser Phe Glu
 85 90 95

ES 2 704 654 T3

tac tgg aaa aat att tca acc gct atc cat ttg tta caa caa ccc gct	336
Tyr Trp Lys Asn Ile Ser Thr Ala Ile His Leu Leu Gln Gln Pro Ala	
100 105 110	
gaa gat ttg ctc cga gaa ctt tca cca cca ccc gat tgc atc ata tcg	384
Glu Asp Leu Leu Arg Glu Leu Ser Pro Pro Pro Asp Cys Ile Ile Ser	
115 120 125	
gac ttt tgg ttc ccg tgg acc acc gat gtg gct cga cgg tta aac atc	432
Asp Phe Trp Phe Pro Trp Thr Thr Asp Val Ala Arg Arg Leu Asn Ile	
130 135 140	
ccc cgg ctc gtg ttc aac gga aag ggc tgc ttt tat ccc ttg tgc atg	480
Pro Arg Leu Val Phe Asn Gly Lys Gly Cys Phe Tyr Pro Leu Cys Met	
145 150 155 160	
cat gtt gcg atc act tcc aac att ttg gga gag aat gaa ccg gtc agt	528
His Val Ala Ile Thr Ser Asn Ile Leu Gly Glu Asn Glu Pro Val Ser	
165 170 175	
agt aat acc gag cgc gtt gtg cig ccc ggt tta cct gac cgg atc gaa	576
Ser Asn Thr Glu Arg Val Val Leu Pro Gly Leu Pro Asp Arg Ile Glu	
180 185 190	
gtc act aaa ctt cag atc ctc ggt tcg tcg aga cca gcc aac gta gac	624
Val Thr Lys Leu Gln Ile Leu Gly Ser Ser Arg Pro Ala Asn Val Asp	
195 200 205	
gaa atg ggc tcg tgg ctt cga gcc gta gaa gcc gag aaa gct tca ttc	672
Glu Met Gly Ser Trp Leu Arg Ala Val Glu Ala Glu Lys Ala Ser Phe	
210 215 220	
ggg ata gtg gtt aat act ttc gaa gag ctt gaa ccg gag tac gtt gaa	720
Gly Ile Val Val Asn Thr Phe Glu Glu Leu Glu Pro Glu Tyr Val Glu	
225 230 235 240	
gaa tac aaa acg gtt aaa gat aag aag atg tgg tgt atc ggc ccg gtt	768
Glu Tyr Lys Thr Val Lys Asp Lys Lys Met Trp Cys Ile Gly Pro Val	
245 250 255	
tcg tta tgc aac aaa acc ggg ccg gat tta gcc gag cga gga aac aag	816
Ser Leu Cys Asn Lys Thr Gly Pro Asp Leu Ala Glu Arg Gly Asn Lys	
260 265 270	
gct gca ata acc gaa cac aac tgc tta aaa tgg ctc gat gag aga aaa	864
Ala Ala Ile Thr Glu His Asn Cys Leu Lys Trp Leu Asp Glu Arg Lys	
275 280 285	

ES 2 704 654 T3

ctg ggg tcc gtg tta tac gtt tgt tta ggt agc ctt gca cgc att tct Leu Gly Ser Val Leu Tyr Val Cys Leu Gly Ser Leu Ala Arg Ile Ser 290 295 300	912
acc gca caa gca atc gag ctc ggg tta gga ctc gag tcc ata aac cga Thr Ala Gln Ala Ile Glu Leu Gly Leu Gly Leu Glu Ser Ile Asn Arg 305 310 315 320	960
ccc ttt ata tgg tgc gta aga aac gaa acc gat gag ctc aaa aca tgg Pro Phe Ile Trp Cys Val Arg Asn Glu Thr Asp Glu Leu Lys Thr Trp 325 330 335	1008
ttt ttg gat ggg ttt gaa gaa agg gtt aga gat cgc ggg ttg atc gtt Phe Leu Asp Gly Phe Glu Glu Arg Val Arg Asp Arg Gly Leu Ile Val 340 345 350	1056
cat ggt tgg gcg cca cag gtt ttg ata ctg tcg cac cca acc att ggc His Gly Trp Ala Pro Gln Val Leu Ile Leu Ser His Pro Thr Ile Gly 355 360 365	1104
ggt ttc ttg acc cat tgc ggt tgg aac tcg act att gaa tcg att acc Gly Phe Leu Thr His Cys Gly Trp Asn Ser Thr Ile Glu Ser Ile Thr 370 375 380	1152
gcg ggt gtt cca atg atc acg tgg ccg ttt ttt gcg gac cag ttt ttg Ala Gly Val Pro Met Ile Thr Trp Pro Phe Phe Ala Asp Gln Phe Leu 385 390 395 400	1200
aat gaa gct ttt ata gtt gaa gtt ttg aag att gga gtt agg att ggt Asn Glu Ala Phe Ile Val Glu Val Leu Lys Ile Gly Val Arg Ile Gly 405 410 415	1248
ggt gag aga gct tgt tcg ttt ggg gaa gaa gat aag gtt gga gtg ttg Val Glu Arg Ala Cys Ser Phe Gly Glu Glu Asp Lys Val Gly Val Leu 420 425 430	1296
gtg aag aag gag gat gtg aaa aag gct gtt gaa tgc ttg atg gat gaa Val Lys Lys Glu Asp Val Lys Lys Ala Val Glu Cys Leu Met Asp Glu 435 440 445	1344
gat gaa gat ggt gat cag aga aga aag agg gtg att gag ctt gca aaa Asp Glu Asp Gly Asp Gln Arg Arg Lys Arg Val Ile Glu Leu Ala Lys 450 455 460	1392
atg gcg aag att gca atg gcg gaa ggt gga tct tct tat gaa aat gta Met Ala Lys Ile Ala Met Ala Glu Gly Gly Ser Ser Tyr Glu Asn Val 465 470 475 480	1440
tcg tcg ttg att cga gat gtg act gaa aca gtt aga gca cca cat tag	1488

ES 2 704 654 T3

Ser Ser Leu Ile Arg Asp Val Thr Glu Thr Val Arg Ala Pro His
 485 490 495

<210> 2
 <211> 495
 <212> PRT
 <213> Stevia rebaudiana

5

<400> 2
 Met Ser Pro Lys Met Val Ala Pro Pro Thr Asn Leu His Phe Val Leu
 1 5 10 15

Phe Pro Leu Met Ala Gln Gly His Leu Val Pro Met Val Asp Ile Ala
 20 25 30

Arg Ile Leu Ala Gln Arg Gly Ala Thr Val Thr Ile Ile Thr Thr Pro
 35 40 45

Tyr Asp Ala Asn Arg Val Arg Pro Val Ile Ser Arg Ala Ile Ala Thr
 50 55 60

Asn Leu Lys Ile Gln Leu Leu Glu Leu Gln Leu Arg Ser Thr Glu Ala
 65 70 75 80

Gly Leu Pro Glu Gly Cys Glu Ser Phe Asp Gln Leu Pro Ser Phe Glu
 85 90 95

Tyr Trp Lys Asn Ile Ser Thr Ala Ile His Leu Leu Gln Gln Pro Ala
 100 105 110

Glu Asp Leu Leu Arg Glu Leu Ser Pro Pro Pro Asp Cys Ile Ile Ser
 115 120 125

Asp Phe Trp Phe Pro Trp Thr Thr Asp Val Ala Arg Arg Leu Asn Ile
 130 135 140

Pro Arg Leu Val Phe Asn Gly Lys Gly Cys Phe Tyr Pro Leu Cys Met
 145 150 155 160

ES 2 704 654 T3

His Val Ala Ile Thr Ser Asn Ile Leu Gly Glu Asn Glu Pro Val Ser
 165 170 175

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

Val Thr Lys Leu Gln Ile Leu Gly Ser Ser Arg Pro Ala Asn Val Asp
 195 200 205

Glu Met Gly Ser Trp Leu Arg Ala Val Glu Ala Glu Lys Ala Ser Phe
 210 215 220

Gly Ile Val Val Asn Thr Phe Glu Glu Leu Glu Pro Glu Tyr Val Glu
 225 230 235 240

Glu Tyr Lys Thr Val Lys Asp Lys Lys Met Trp Cys Ile Gly Pro Val
 245 250 255

Ser Leu Cys Asn Lys Thr Gly Pro Asp Leu Ala Glu Arg Gly Asn Lys
 260 265 270

Ala Ala Ile Thr Glu His Asn Cys Leu Lys Trp Leu Asp Glu Arg Lys
 275 280 285

Leu Gly Ser Val Leu Tyr Val Cys Leu Gly Ser Leu Ala Arg Ile Ser
 290 295 300

Thr Ala Gln Ala Ile Glu Leu Gly Leu Gly Leu Glu Ser Ile Asn Arg
 305 310 315 320

Pro Phe Ile Trp Cys Val Arg Asn Glu Thr Asp Glu Leu Lys Thr Trp
 325 330 335

Phe Leu Asp Gly Phe Glu Glu Arg Val Arg Asp Arg Gly Leu Ile Val
 340 345 350

ES 2 704 654 T3

His Gly Trp Ala Pro Gln Val Leu Ile Leu Ser His Pro Thr Ile Gly
 355 360 365

Gly Phe Leu Thr His Cys Gly Trp Asn Ser Thr Ile Glu Ser Ile Thr
 370 375 380

Ala Gly Val Pro Met Ile Thr Trp Pro Phe Phe Ala Asp Gln Phe Leu
 385 390 395 400

Asn Glu Ala Phe Ile Val Glu Val Leu Lys Ile Gly Val Arg Ile Gly
 405 410 415

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

Val Lys Lys Glu Asp Val Lys Lys Ala Val Glu Cys Leu Met Asp Glu
 435 440 445

Asp Glu Asp Gly Asp Gln Arg Arg Lys Arg Val Ile Glu Leu Ala Lys
 450 455 460

Met Ala Lys Ile Ala Met Ala Glu Gly Gly Ser Ser Tyr Glu Asn Val
 465 470 475 480

Ser Ser Leu Ile Arg Asp Val Thr Glu Thr Val Arg Ala Pro His
 485 490 495

<210> 3
 <211> 31
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> ADN sintético

10 <400> 3
 cacccatgatg tcgccaaaaa tgggtggcacc a

31

15 <210> 4
 <211> 38
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> ADN sintético

<400> 4

ggatccctaa tgggtgctc taactgttc agtcacat

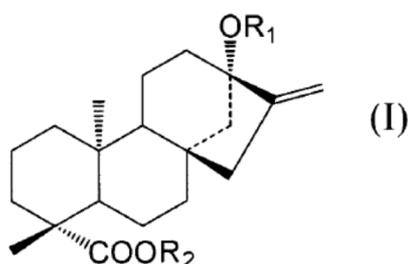
38

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de cualquiera seleccionada del grupo que consiste en (a) a (c) mostradas a continuación:

- 5 (a) una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2;
 (b) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos con delección, sustitución, inserción y/o adición de 1 a 4 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 y que tiene la actividad para añadir una molécula(s) de azúcar a -OR₁ en la posición 13 y -COOR₂ en la posición 19 de un compuesto representado por la siguiente fórmula (I); y
 10 (c) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que comparte una identidad de secuencia del 99% o más con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 y que tiene la actividad para añadir una molécula(s) de azúcar a -OR₁ en la posición 13 y -COOR₂ en la posición 19 de un compuesto representado por la siguiente fórmula (I)

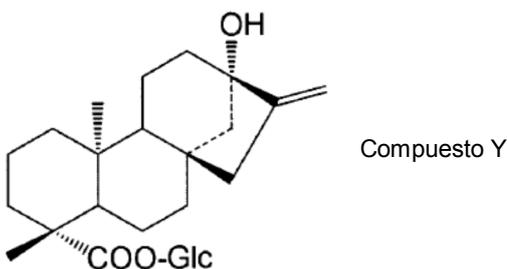
15 [Fórmula 21]



20 (en donde R₁ representa H, un monómero de glucosa o un dímero de glucosa, y R₂ representa H o un monómero de glucosa).

2. La proteína según la reivindicación 1, en donde la molécula de azúcar es una hexosa.
 3. La proteína según la reivindicación 1, en donde la molécula de azúcar se selecciona del grupo que consiste en glucosa, manosa y galactosa.
 25 4. La proteína según la reivindicación 1, en donde el compuesto es esteviol, esteviolmonósido, esteviolbíosido, rubusósido o el compuesto Y

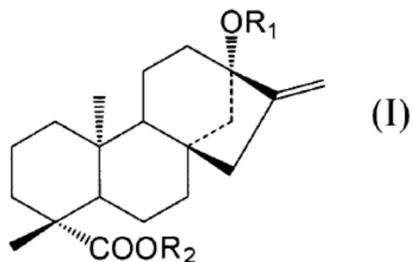
30 [Fórmula 22]



5. Un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en (a) a (d) mostrados a continuación:

- 35 (a) un polinucleótido que contiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 1;
 (b) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2;
 (c) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos con delección, sustitución, inserción y/o adición de 1 a 4 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 y que tiene la actividad para añadir una molécula(s) de azúcar a -OR₁ en la posición 13 y -COOR₂ en la posición 19 de un compuesto representado por la siguiente fórmula (I); y
 40 (d) un polinucleótido que codifica una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos que comparte una identidad de secuencia del 99% o más con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2 y que tiene la actividad para añadir una molécula(s) de azúcar a -OR₁ en la posición 13 y -COOR₂ en la posición 19 de un compuesto representado por la siguiente fórmula (I)
- 45

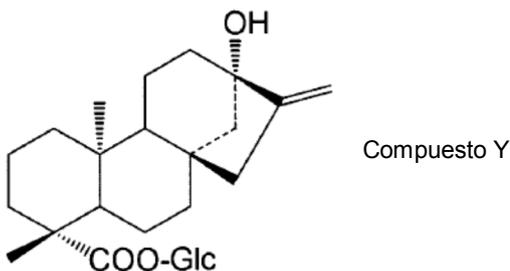
[Fórmula 23]



- 5 (en donde R₁ representa H, un monómero de glucosa o un dímero de glucosa, y R₂ representa H o un monómero de glucosa)
6. El polinucleótido según la reivindicación 5, en donde la molécula de azúcar es una hexosa.
- 10 7. El polinucleótido según la reivindicación 5, en donde la molécula de azúcar se selecciona del grupo que consiste en glucosa, manosa y galactosa.
8. El polinucleótido según la reivindicación 5, en donde el compuesto es esteviol, esteviolmonósido, esteviolbiósido, rubusósido o el compuesto Y

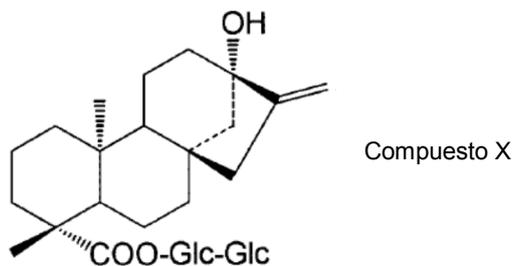
15

[Fórmula 24]



9. Un transformante no humano transformado con el polinucleótido según la reivindicación 5.
- 20 10. El transformante según la reivindicación 9, en donde el polinucleótido se inserta en un vector de expresión.
11. El transformante según la reivindicación 9, que es una planta.
- 25 12. Un extracto del transformante según la reivindicación 9, que comprende un glucósido de esteviol que está producido por el transformante, en donde el glucósido de esteviol es el compuesto X

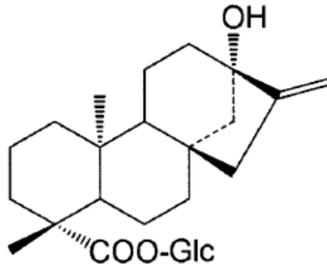
[Fórmula 26]



30

el compuesto Y

[Fórmula 31]

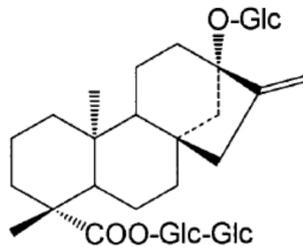


Compuesto Y

o el compuesto Z

[Fórmula 32]

5

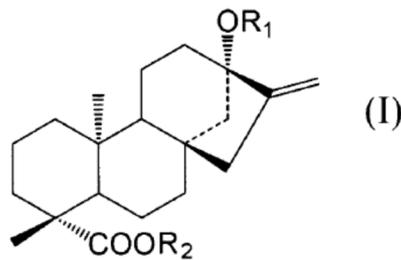


Compuesto Z

13. Un alimento, una preparación farmacéutica o una materia prima industrial, que comprende el extracto según la reivindicación 12.
14. Un método para producir una proteína, que comprende cultivar el transformante no humano según la reivindicación 9, en donde la proteína tiene la actividad para añadir una molécula(s) de azúcar a -OR₁ en la posición 13 y -COOR₂ en la posición 19 de un compuesto representado por la siguiente fórmula (I)

15

[Fórmula 25]



(I)

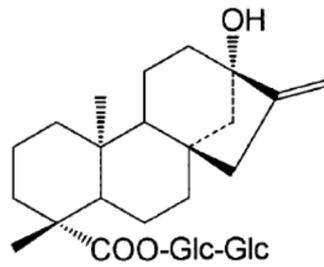
20 (en donde R₁ representa H, un monómero de glucosa o un dímero de glucosa, y R₂ representa H o un monómero de glucosa)

15. Un método para producir un glucósido de esteviol, que comprende usar el transformante no humano según la reivindicación 9.
16. El método según la reivindicación 15, en donde el glucósido de esteviol es esteviolmonósido, esteviolbiósido, esteviósido, rubusósido, compuesto X

25

[Fórmula 26]

30

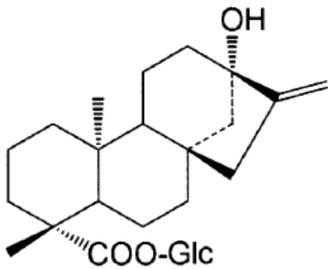


Compuesto X

compuesto Y

[Fórmula 27]

5

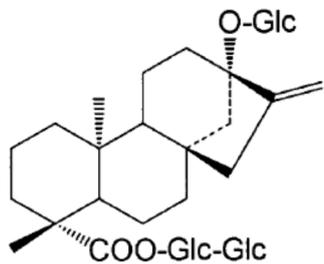


Compuesto Y

compuesto Z

[Fórmula 28]

10



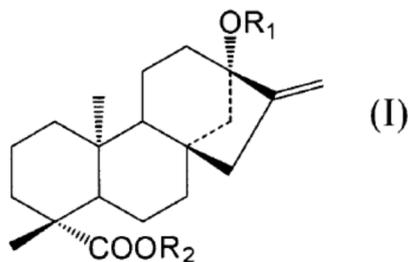
Compuesto Z

o cualquier combinación de los mismos.

17. Un método para producir un glucósido de esteviol, que comprende la etapa de hacer reaccionar la proteína según la reivindicación 1, un UDP-azúcar y un compuesto representado por la siguiente fórmula (I)

15

[Fórmula 29]



(I)

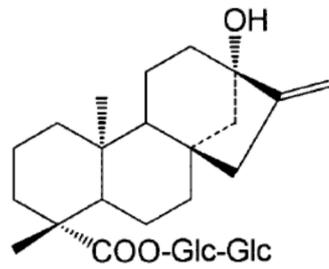
20

(en donde R₁ representa H, un monómero de glucosa o un dímero de glucosa, y R₂ representa H o un monómero de glucosa).

18. El método según la reivindicación 17, en donde el azúcar en el UDP-azúcar es glucosa.
19. El método según la reivindicación 17, en donde el glucósido de esteviol es esteviolmonósido, esteviolbiósido, esteviósido, rubusósido, compuesto X

25

[Fórmula 30]

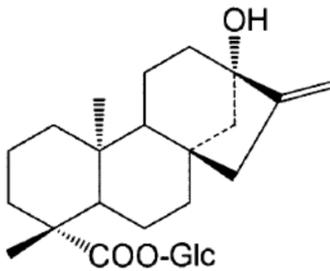


Compuesto X

5

compuesto Y

[Fórmula 31]

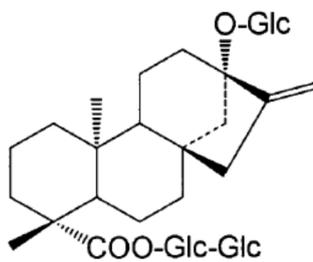


Compuesto Y

10

compuesto Z

[Fórmula 32]



Compuesto Z

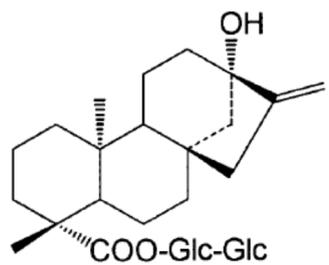
15

o cualquier combinación de los mismos

20. Un glucósido de esteviol, en donde el glucósido de esteviol es el compuesto X

20

[Fórmula 26]

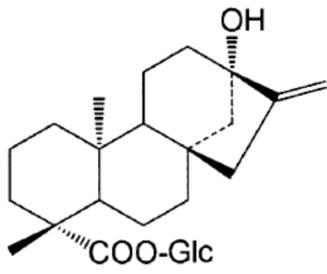


Compuesto X

el compuesto Y

25

[Fórmula 31]

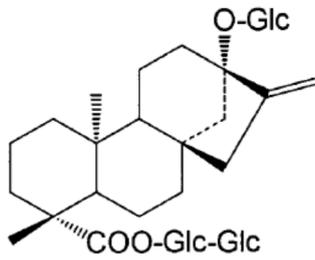


Compuesto Y

o el compuesto Z

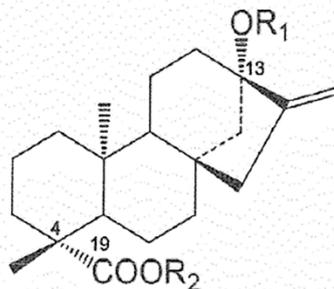
[Fórmula 32]

5



Compuesto Z

Figura 1



Nombre	R ₁	R ₂
Esteviol	H	H
Esteviolmonósido	Glc	H
Esteviolbiósido	Glc-Glc(β2→1)	H
Dulcósido A	Glc-Rha(β2→1)	H
Rubusósido	Glc	Glc
Esteviósido	Glc-Glc(β2→1)	Glc
Rebaudiósido A	Glc-Glc(β2→1) Glc(β3→1)	Glc
Rebaudiósido B	Glc-Glc(β2→1) Glc(β3→1)	H
Rebaudiósido C (Dulcósido B)	Glc-Rha(β2→1) Glc(β3→1)	Glc
Rebaudiósido D	Glc-Glc(β2→1) Glc(β3→1)	Glc-Glc(β2→1)
Rebaudiósido E	Glc-Glc(β2→1)	Glc-Glc(β2→1)
Rebaudiósido F	Glc-Xyl(β2→1) Glc(β3→1)	Glc

Figura 2

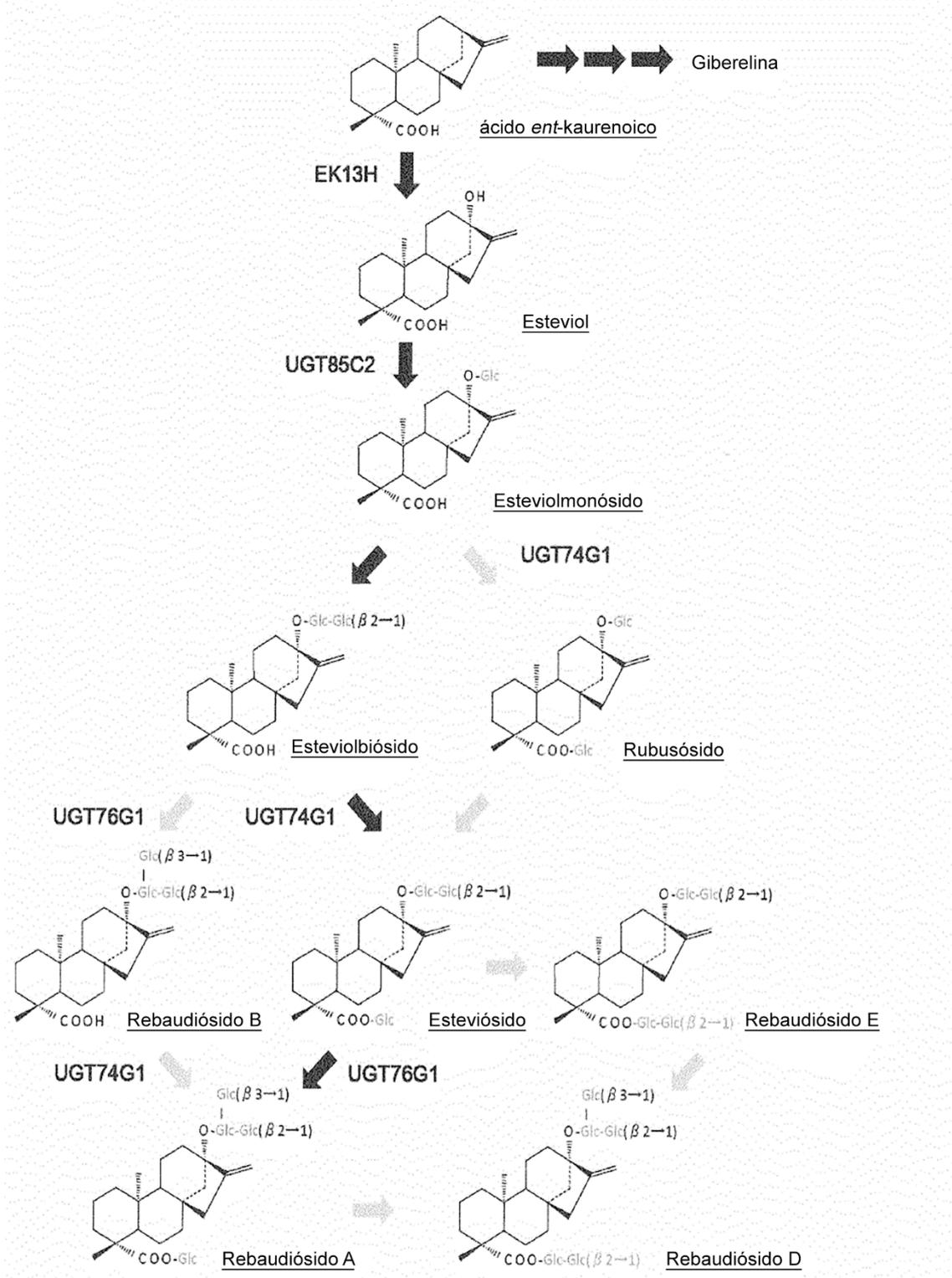


Figura 3

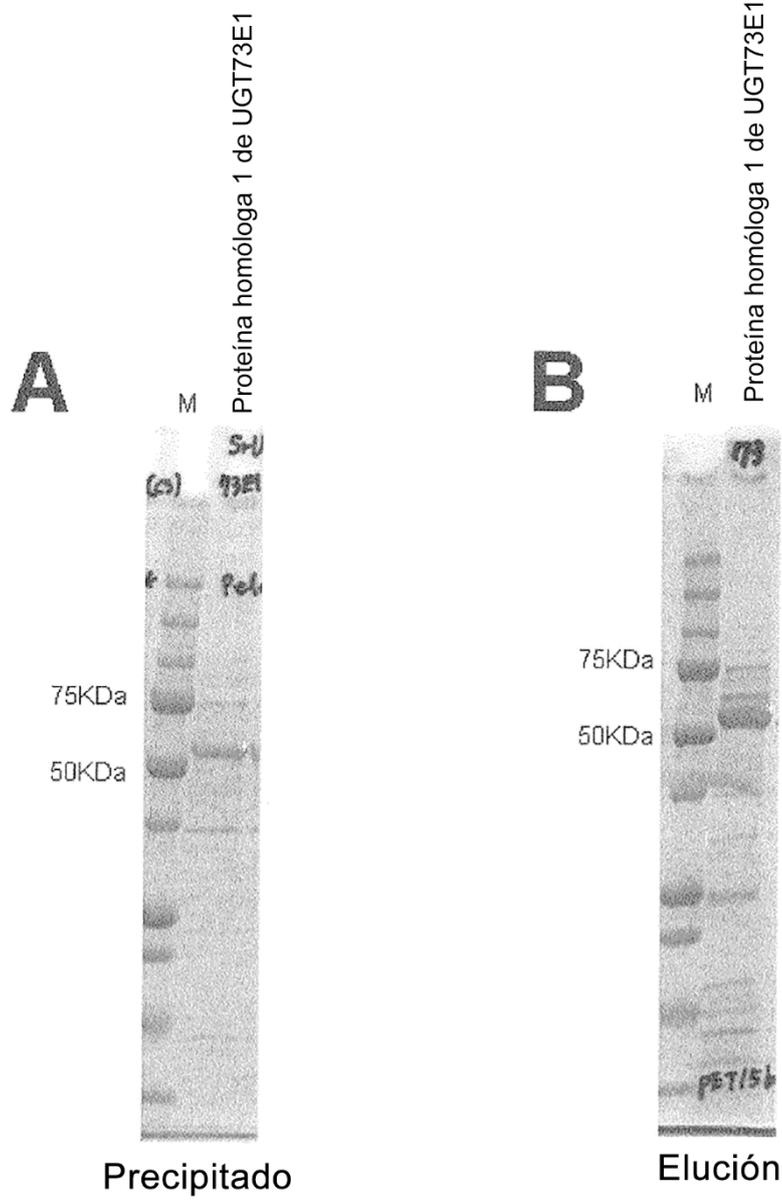


Figura 4

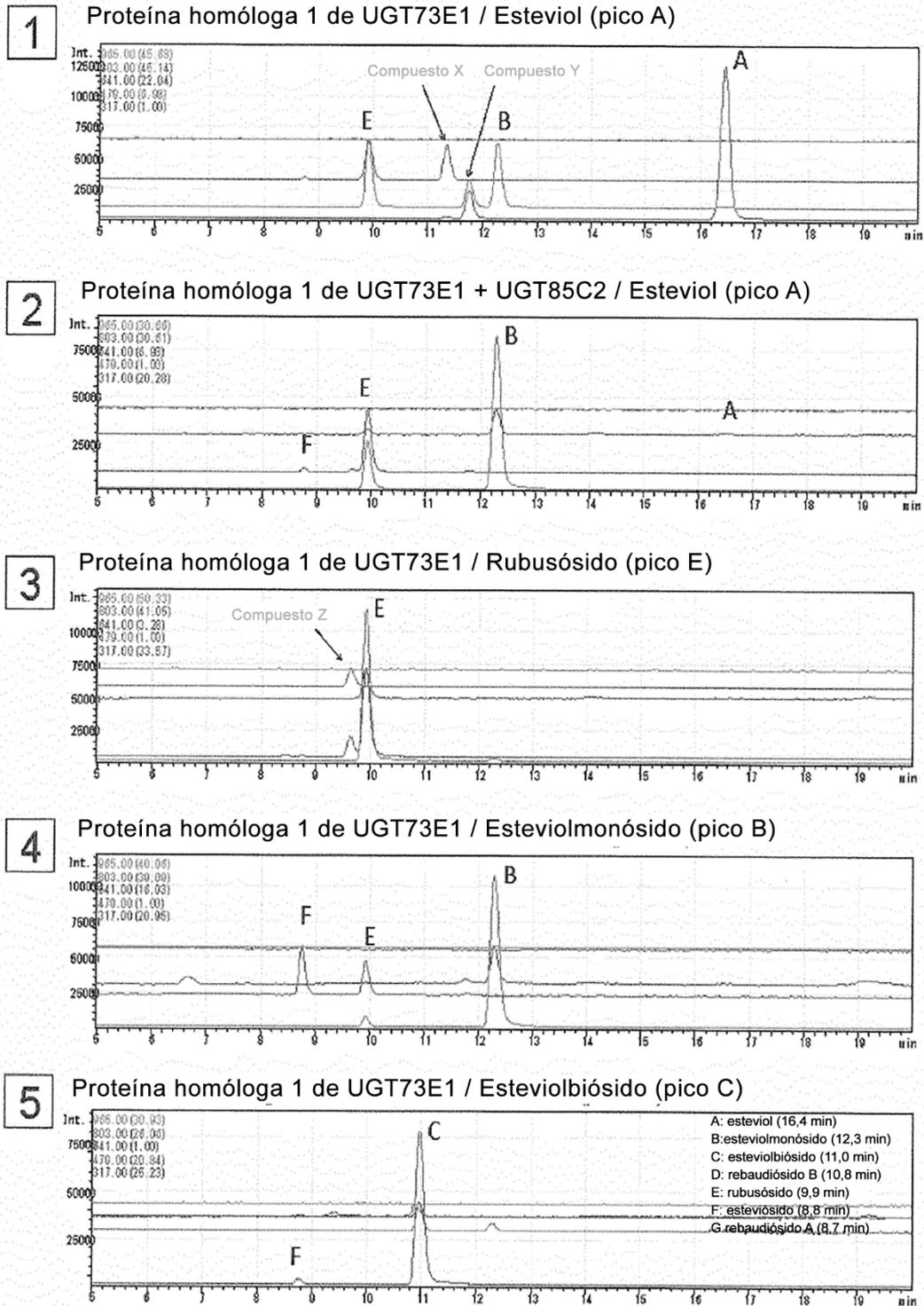


Figura 5

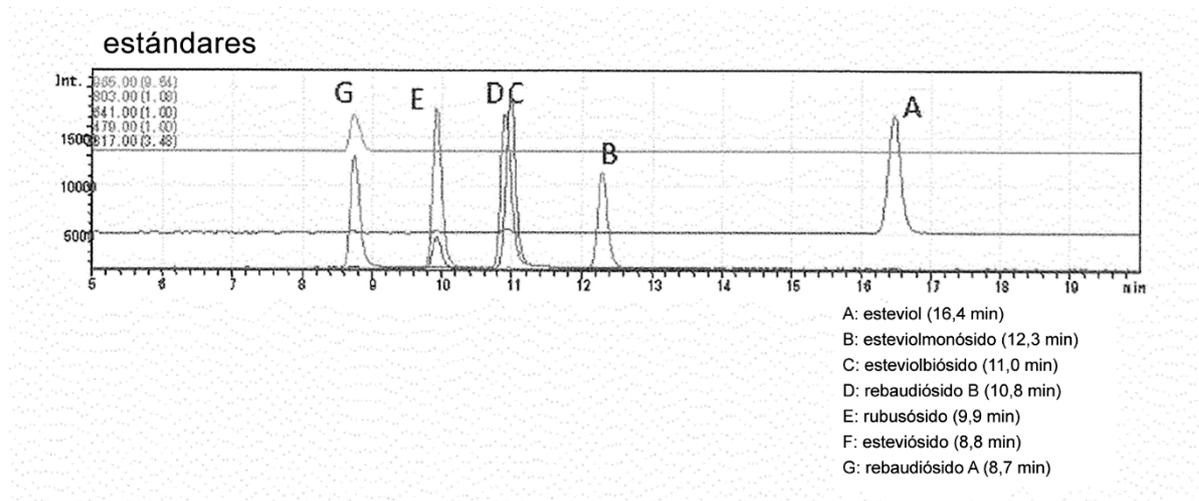


Figura 6

