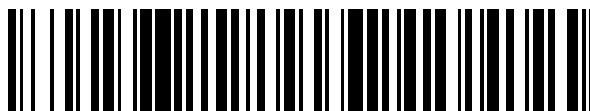


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 373**

51 Int. Cl.:

C07H 15/24 (2006.01)

C07J 17/00 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.05.2015 PCT/US2015/029163**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2015 WO15171555**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.05.2015 E 15789509 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.07.2019 EP 3140314**

54 Título: **Un edulcorante no calórico**

30 Prioridad:

05.05.2014 US 201414269435

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

25.03.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MAO, GUOHONG;
CHATURVEDULA, VENKATA SAI PRAKASH y
YU, XIAODAN**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 750 373 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

Un edulcorante no calórico

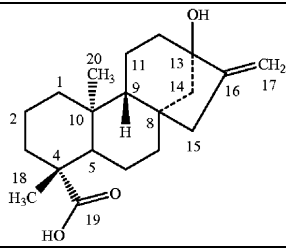
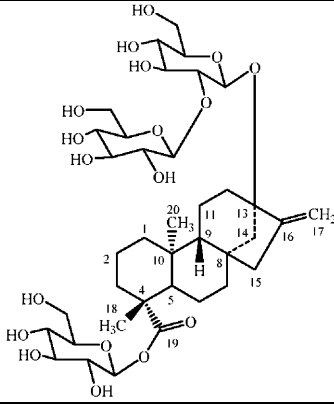
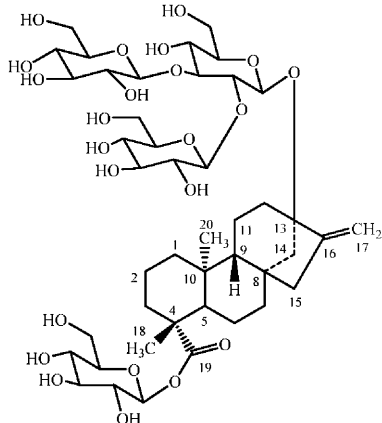
5 Antecedentes de la descripción

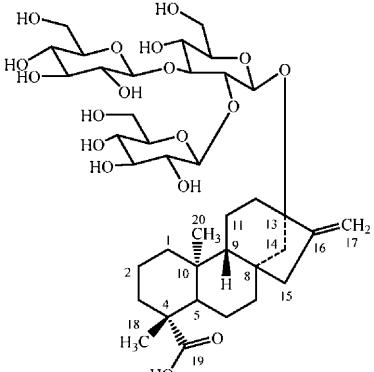
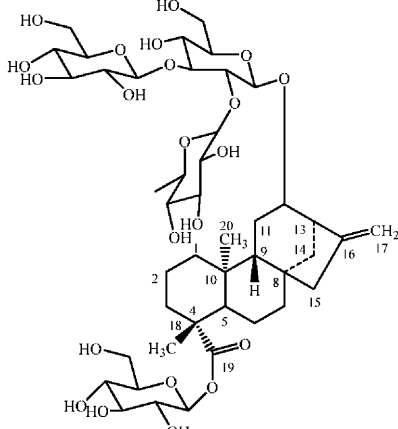
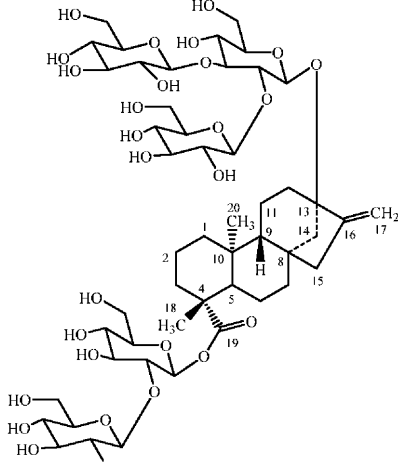
La presente descripción se refiere, generalmente, a edulcorantes naturales. Más particularmente, la presente invención se refiere a un edulcorante no calórico, designado en la presente descripción como rebaudiósido D2, y métodos para sintetizar el edulcorante no calórico.

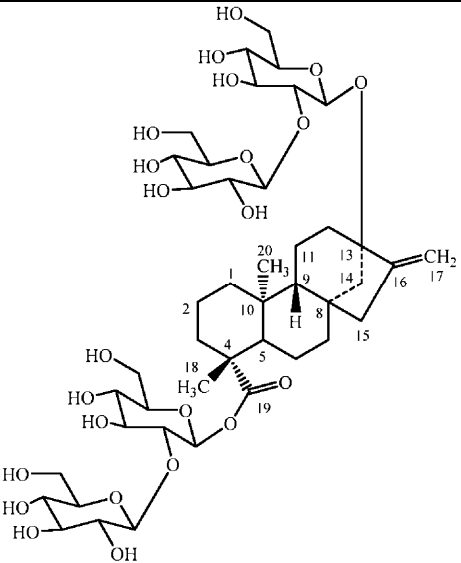
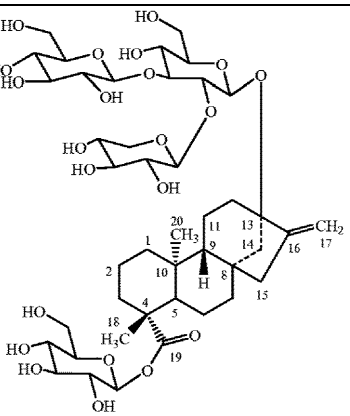
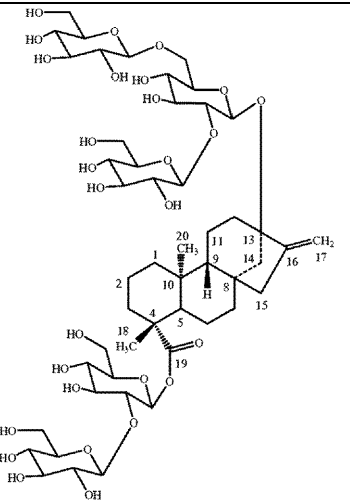
10 Cabe señalar que la designación rebaudiósido D2 se aplica en las patentes WO2014/193934 y WO2014/193888 (ambas técnicas anteriores solo bajo el artículo 54(3) CPE) con respecto a un glucósido de esteviol diferente, un isómero de rebaudiósido D diferente derivado de rebaudiósido A.

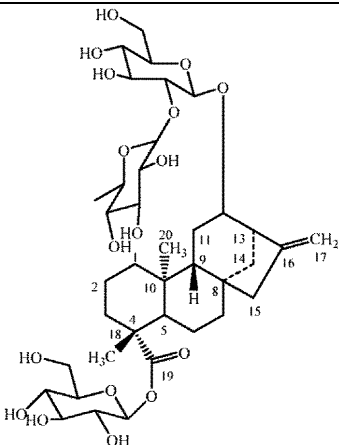
15 Los glucósidos de esteviol incluyen productos naturales aislados de hojas de *Stevia rebaudiana*. Los glucósidos de esteviol se usan ampliamente como edulcorantes de alta intensidad, bajos en calorías, y son significativamente más dulces que la sacarosa. Los glucósidos de esteviol de origen natural comparten la misma estructura básica del esteviol, pero difieren en el contenido de residuos de carbohidrato (p. ej., glucosa, ramnosa y residuos de xilosa) en las posiciones C13 y C19. Los glucósidos de esteviol con estructuras conocidas incluyen, esteviol, esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F y dulcósido A (véase, p. ej., Tabla 1).

Tabla 1. Glucósidos de esteviol

Nombre	Estructura	Fórmula molecular	Peso molecular
Esteviol		$C_{20}H_{30}O_3$	318
Esteviósido		$C_{38}H_{60}O_{18}$	804
Rebaudiósido A		$C_{44}H_{70}O_{23}$	966

<p>Rebaudiósido B</p>		<p>$C_{38}H_{60}O_{18}$</p>	<p>804</p>
<p>Rebaudiósido C</p>		<p>$C_{44}H_{70}O_{22}$</p>	<p>950</p>
<p>Rebaudiósido D</p>		<p>$C_{50}H_{80}O_{28}$</p>	<p>1128</p>

<p>Rebaudiósido E</p>	 <p>The structure shows a central saponin aglycone with a methyl group at C-10 and a vinyl group at C-16. It is linked via an ester bond at C-19 to a chain of three glucose units. The top two glucose units are linked to each other and to the aglycone, while the bottom unit is a terminal glucose.</p>	<p>$C_{44}H_{70}O_{23}$</p>	<p>966</p>
<p>Rebaudiósido F</p>	 <p>The structure is identical to Rebaudioside E, showing the same aglycone and a chain of three glucose units linked at C-19.</p>	<p>$C_{43}H_{68}O_{22}$</p>	<p>936</p>
<p>Rebaudiósido D2 como se reivindica ahora</p>	 <p>The structure is identical to Rebaudioside E, showing the same aglycone and a chain of three glucose units linked at C-19.</p>	<p>$C_{50}H_{80}O_{28}$</p>	<p>1128</p>

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

5 En función del peso en seco, el esteviósido, el rebaudiósido A, el rebaudiósido C y el dulcósido A, representan el 9,1 %, 3,8 %, 0,6 % y 0,3 % del peso total de los glucósidos de esteviol en las hojas, respectivamente, mientras que los otros glucósidos de esteviol están presentes en cantidades mucho menores. Los extractos de la planta *Stevia rebaudiana* se encuentran comercialmente disponibles, que normalmente contienen esteviósido y rebaudiósido A como compuestos principales. Por lo general, los otros glucósidos de esteviol están presentes en el extracto de estevia como componentes secundarios. Por ejemplo, la cantidad de rebaudiósido A en preparados comerciales puede variar de aproximadamente un 20 % a más de un 90 % del contenido total de glucósidos de esteviol, mientras que la cantidad de rebaudiósido B puede constituir aproximadamente 1 % - 2 %, la cantidad de rebaudiósido C pueden constituir aproximadamente 7 % - 15 %, y la cantidad de rebaudiósido D puede ser de aproximadamente 2 % del total de glucósidos de esteviol.

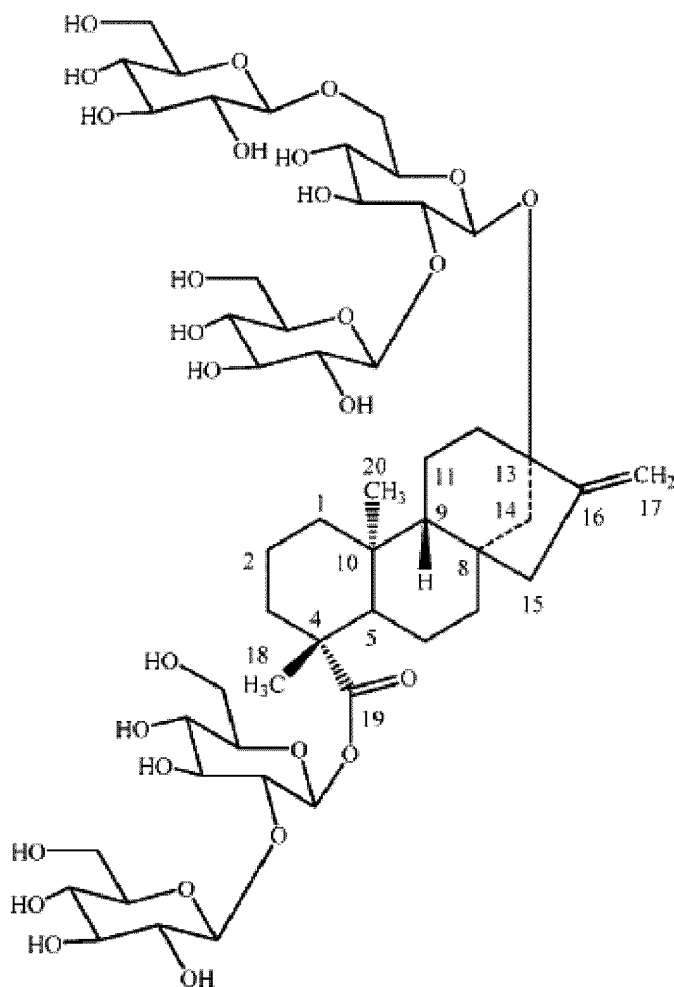
15 Los glucósidos de esteviol difieren entre sí no solo por su estructura molecular, sino también por sus propiedades de sabor. Por ejemplo, diferentes glucósidos de esteviol tienen diferentes grados de dulzor y regusto. El esteviósido, por ejemplo, es de 100 a 150 veces más dulce que la sacarosa, pero deja un regusto amargo. El rebaudiósido A y el rebaudiósido E, por ejemplo, son de 250 a 450 veces más dulces que la sacarosa y dejan menos regusto que el esteviósido. El rebaudiósido C es de 40 a 60 veces más dulce que la sacarosa. El dulcósido A es alrededor de 30 veces más dulce que la sacarosa.

20 La mayoría de los glucósidos de esteviol se forman mediante varias reacciones de glucosilación de esteviol, que se catalizan habitualmente por medio de UDP-glucosiltransferasa (UGTs) mediante el uso de uridina 5'-difosfoglucosa (UDP-glucosa) como donante de la fracción de azúcar. Las UGT en las plantas constituyen un grupo muy diverso de enzimas que transfieren un residuo de glucosa de UDP-glucosa al esteviol. Por ejemplo, la glucosilación del C-3' del C-13-O-glucosa de esteviósido produce rebaudiósido A; y la glucosilación del C-2' del 19-O-glucosa del esteviósido produce rebaudiósido E. Más glucosilación de rebaudiósido A (en C-19-O-glucosa) o rebaudiósido E (en C-13-O-glucosa) produce rebaudiósido D (FIG. 1).

30 Cada vez se presta más atención a edulcorantes alternativos debido a la concienciación sobre las muchas enfermedades asociadas al consumo de alimentos y bebidas ricas en azúcar. Aunque hay disponibles edulcorantes artificiales, muchos edulcorantes artificiales como la dulcina, el ciclamato de sodio y la sacarina se han prohibido o restringido en algunos países debido a preocupaciones sobre su seguridad. Por lo tanto, los edulcorantes no calóricos de origen natural se están volviendo cada vez más populares. Uno de los obstáculos principales para el uso amplio de edulcorantes de estevia es sus atributos de sabor no deseables. Por tanto, existe la necesidad de desarrollar edulcorantes y métodos alternativos para su producción, que proporcionen la mejor combinación de poder edulcorante y perfil aromático.

35 Resumen de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un rebaudiósido sintético (rebaudiósido D2) que consiste en una estructura química:



Método de producción de rebaudiósido D2 de rebaudiósido E. En otro aspecto, el presente proporciona un método para preparar rebaudiósido D2 para usar como edulcorante de rebaudiósido E. El método comprende preparar una mezcla de reacción que comprende (i) rebaudiósido E; (ii) uno o más sustratos seleccionados del grupo, que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP) y glucosa de uridina difosfato (UDP-glucosa); y (iii) uno de: (a) una uridina difosfo glucosiltransferasa (UDP-glucosil transferasa) (b) una uridina difosfo glucosil transferasa y una sacarosa sintasa añadidas por separado al medio de reacción y (c) una enzima de fusión UDP-glucosil transferasa que comprende un dominio de uridina difosfo glucosiltransferasa acoplado a un dominio de sacarosa sintasa; incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir rebaudiósido D2, en donde una glucosa se acopla de manera covalente al rebaudiósido E para producir rebaudiósido D2 y obtener rebaudiósido D2 para uso como edulcorante, en donde la UDP-glucosil transferasa, o el dominio de UDP-glucosiltransferasa empleado, es un EUGT11 UDP-glucosiltransferasa que tiene la secuencia de aminoácidos de sec. ident. núm.: 1.

Método de producción de rebaudiósido E y rebaudiósido D2 de esteviósido. En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar rebaudiósido D2 para uso como edulcorante de esteviósido. El método comprende la preparación de una mezcla de reacción que comprende (i) esteviósido; (ii) uno o más sustratos seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, uridina, difosfato (UDP) y uridina difosfato-glucosa (UDP-glucosa) y (iii) uno de: (a) una uridina difosfo glucosiltransferasa (UDP-glucosil transferasa) (b) una uridina difosfo glucosiltransferasa y una sacarosa sintasa añadidas por separado a la mezcla de reacción y (c) una enzima de fusión UDP-glucosiltransferasa que comprende un dominio de uridina difosfo glucosiltransferasa acoplada a un dominio de sacarosa sintasa; incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir rebaudiósido D2, en donde una glucosa se acopla de manera covalente al esteviósido para producir el producto intermedio rebaudiósido E y en donde una glucosa se acopla de manera covalente al producto intermedio rebaudiósido E para producir rebaudiósido D2 y obtener rebaudiósido D2 para uso como edulcorante. De nuevo, la UDP-glucosiltransferasa o el dominio UDP-glucosiltransferasa empleado es un EUGT11 UDP-glucosiltransferasa que tiene la secuencia de aminoácidos de sec. ident. núm.: 1.

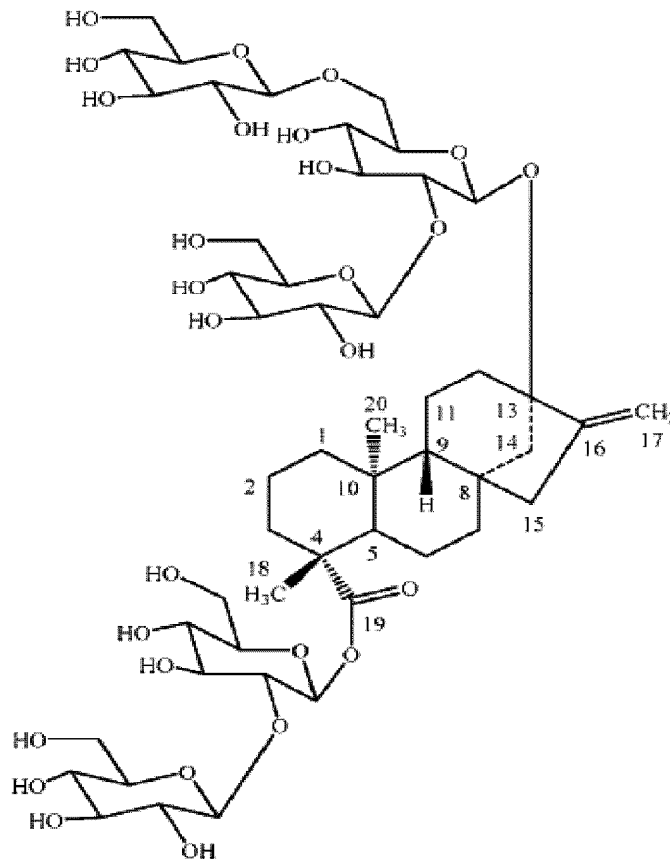
La enzima de fusión UDP-glucosiltransferasa así empleada se denomina en la presente descripción "EUS". La enzima de fusión UDP-glucosiltransferasa demuestra actividades enzimáticas de enlace glucosídico 1,2- β y de enlace glucosídico 1,6- β , así como actividad de sacarosa sintasa.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un producto consumible por vía oral que comprende una cantidad de rebaudiósido D2 seleccionado de un producto de bebida o de otro producto consumible.

5 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un producto de bebida que comprende una cantidad de edulcorante de rebaudiósido D2. El rebaudiósido D2 puede estar presente en el producto de bebida en una concentración de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm. En algunas realizaciones, concentraciones bajas de rebaudiósido D2, p. ej., menores de 100 ppm, tienen un dulzor equivalente a las soluciones de sacarosa que tienen concentraciones de entre 10.000 ppm y 30.000 ppm.

10 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un producto consumible que comprende una cantidad de edulcorante de rebaudiósido D2. El rebaudiósido D2 puede estar presente en el producto consumible en una concentración de entre aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm. En algunas realizaciones, concentraciones bajas de rebaudiósido D2, p. ej., menores de 100 ppm, tienen un dulzor equivalente a las soluciones de sacarosa que tienen concentraciones de entre 10.000 ppm y 30.000 ppm.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un edulcorante que consiste en una estructura química:



20 En determinadas realizaciones, que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el rebaudiósido D2 es el único edulcorante, y el producto tiene una intensidad de dulzor equivalente de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 4 % (p/v-%) de solución de sacarosa. En determinadas realizaciones, que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el producto consumible por vía oral incluye además un edulcorante adicional, donde el producto tiene una intensidad de dulzor equivalente de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 10 % (p/v-%) de solución de sacarosa. En determinadas realizaciones, que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, cada ingrediente edulcorante en el producto es un edulcorante de alta intensidad. En determinadas realizaciones, que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, cada ingrediente edulcorante en el producto es un edulcorante natural de alta intensidad. En determinadas realizaciones, que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el edulcorante adicional contiene uno o más edulcorantes seleccionados de extracto de estevia, un glucósido de estevia, esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, dulcósido A, rubusosido, esteviolbiosido, sacarosa, jarabe de maíz con elevado contenido de fructosa, fructosa, glucosa, xilosa, arabinosa, ramnosa, eritritol, xilitol, manitol, sorbitol, inositol, AceK, aspartamo, neotamo, sucralosa, sacarina, dihidrochalcona naringina (NarDHC), neohesperidina dihidrochalcona (NDHC),

rubusosido, mogrósido IV, siamenósido I, mogrósido V, monatín, taumatina, monelina, brazeína, L-alanina, glicina, Lo Han Guo, hernandulcina, filodulcina, trilobtain y combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el producto de bebida y producto consumible incluye además uno o más aditivos seleccionados de un hidrato de carbono, un poliol, un aminoácido o sal del mismo, un poli-aminoácido o sal del mismo, un ácido de azúcar o sal del mismo, un nucleótido, un ácido orgánico, un ácido inorgánico, una sal orgánica, una sal de un ácido orgánico, una sal de base orgánica, una sal inorgánica, un compuesto amargo, un aromatizante, un ingrediente saborizante, un compuesto astringente, una proteína, un hidrolizado de proteína, un tensioactivo, un emulsionante, un flavonoide, un alcohol, un polímero y combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el rebaudiósido D2 tiene una pureza de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 100 % en peso antes de que se añada al producto. En determinadas realizaciones, que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el rebaudiósido D2 en el producto es un rebaudiósido D2 polimorfo o un rebaudiósido D2 amorfo. En determinadas realizaciones, que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el rebaudiósido D2 en el producto es un estereoisómero de rebaudiósido D2.

Otros aspectos de la presente descripción se refieren a un método de preparación de un producto de bebida y un producto consumible que incluye el rebaudiósido D2 purificado en el producto o en los ingredientes para fabricar el producto de bebida y el producto consumible, donde el rebaudiósido D2 está presente en el producto en una concentración de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm. Otros aspectos de la presente descripción se refieren a un método para aumentar el dulzor de un producto de bebida y un producto consumible, añadiendo de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm de rebaudiósido D2 purificado al producto de bebida y al producto consumible, donde el rebaudiósido D2 añadido potencia el dulzor del producto de bebida y el producto consumible, en comparación con un producto de bebida correspondiente y un producto consumible que carezcan del rebaudiósido D2 purificado.

En determinadas realizaciones, que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el rebaudiósido D2 es el único edulcorante, y el producto tiene una intensidad de dulzor equivalente de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 4 % (p/v-%) de solución de sacarosa. En determinadas realizaciones, que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el método además incluye añadir un edulcorante adicional, donde el producto tiene una intensidad de dulzor equivalente de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 10 % (p/v-%) de solución de sacarosa.

Otros aspectos de la presente descripción se refieren a un método para preparar un producto de bebida edulcorado o un producto consumible edulcorado mediante: a) proporcionar un producto de bebida o un producto consumible que contengan uno o más edulcorantes; y b) añadir de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm de rebaudiósido D2 purificado al producto de bebida o al producto consumible.

En determinadas realizaciones, que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el método incluye además añadir uno o más aditivos al producto de bebida o al producto consumible. En determinadas realizaciones, que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el producto consumible por vía oral además contiene uno o más aditivos. En determinadas realizaciones, que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, se seleccionan uno o más aditivos de un hidrato de carbono, un poliol, un aminoácido o sal del mismo, un poli-aminoácido o sal del mismo, un ácido de azúcar o sal del mismo, un nucleótido, un ácido orgánico, un ácido inorgánico, una sal orgánica, una sal de un ácido orgánico, una sal de base orgánica, una sal inorgánica, un compuesto amargo, un aromatizante, un ingrediente saborizante, un compuesto astringente, una proteína, un hidrolizado de proteína, un tensioactivo, un emulsionante, un flavonoide, un alcohol, un polímero y combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, cada ingrediente edulcorante en el producto es un edulcorante de alta intensidad. En determinadas realizaciones, que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, cada ingrediente edulcorante en el producto es un edulcorante natural de alta intensidad. En determinadas realizaciones, que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el edulcorante se selecciona de extracto de estevia, un glucósido de estevioliol, esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, dulcósido A, rubusosido, esteviolbiosido, sacarosa, jarabe de maíz con elevado contenido de fructosa, fructosa, glucosa, xilosa, arabinosa, ramnosa, eritritol, xilitol, manitol, sorbitol, inositol, AceK, aspartamo, neotamo, sucralosa, sacarina, dihidrochalcona naringina (NarDHC), neohesperidina dihidrochalcona (NDHC), rubusosido, mogrósido IV, siamenósido I, mogrósido V, monatín, taumatina, monelina, brazeína, L-alanina, glicina, Lo Han Guo, hernandulcina, filodulcina, trilobtain y combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el rebaudiósido D2 tiene una pureza de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 100 % en peso antes de que se añada al producto. En determinadas realizaciones, que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el rebaudiósido D2 en el producto es un rebaudiósido D2 polimorfo o un rebaudiósido D2 amorfo.

Breve descripción de los dibujos

La descripción se comprenderá mejor, y las características, aspectos y ventajas diferentes a las expuestas anteriormente serán evidentes, cuando se considere la siguiente descripción detallada de la misma. Esta descripción detallada hace referencia a los siguientes dibujos, en donde:

Las FIGS. 1A-1C son esquemas que ilustran las vías de biosíntesis de los glucósidos de esteviol de esteviósido.

Las FIGS. 2A y 2B muestran el análisis de SDS-PAGE de la enzima UDP-glucosiltransferasa recombinante purificada (EUGT11) y la enzima de fusión UDP-glucosiltransferasa recombinante purificada (EUS), como se describe en el Ejemplo 1.

Las FIGS. 3A-3G son gráficos que muestran los tiempos de retención de HPLC de esteviósido ("Ste"), rebaudiósido A ("Reb A") y rebaudiósido D ("Reb D") estándares (FIG. 3A); el rebaudiósido D producido enzimáticamente por EUS a las 14 horas (FIG. 3B); el rebaudiósido D producido enzimáticamente por EUGT11 a las 14 horas (FIG. 3C); el rebaudiósido D producido enzimáticamente por el sistema de acoplamiento de UGT-SUS (EUGT11-AtSUS1) a las 14 horas (FIG. 3D); el rebaudiósido D producido enzimáticamente por EUS a las 24 horas (FIG. 3E); el rebaudiósido D producido enzimáticamente por EUGT11 a las 24 horas (FIG. 3F); y el rebaudiósido D producido enzimáticamente por el sistema de acoplamiento de UGT-SUS (EUGT11-AtSUS1) a las 24 horas (FIG. 3G), como se describe en el Ejemplo 2.

Las FIGS. 4A-4G son gráficos que muestran los tiempos de retención de HPLC de esteviósido ("Ste"), rebaudiósido A ("Reb A") y rebaudiósido D ("Reb D") estándares (FIG. 4A); el rebaudiósido D ("Reb D2") producido enzimáticamente por EUS a las 14 horas (FIG. 4B); el rebaudiósido E ("Reb E") producido enzimáticamente por EUGT11 a las 14 horas (FIG. 4C); el rebaudiósido D2 producido enzimáticamente por el sistema de acoplamiento de UGT-SUS (EUGT11-AtSUS1) a las 14 horas (FIG. 4D); el rebaudiósido D2 ("Reb D2") producido enzimáticamente por EUS a las 24 horas (FIG. 4E); el rebaudiósido E ("Reb E") producido enzimáticamente por EUGT11 a las 24 horas (FIG. 4F); y el rebaudiósido D2 producido enzimáticamente por el sistema de acoplamiento UGT-SUS (EUGT11-AtSUS1) a las 24 horas (FIG. 4G), como se describe en el Ejemplo 3.

Las FIGS. 5A-5J son gráficos que muestran los tiempos de retención de HPLC de rebaudiósido D ("Reb-D") estándar (FIG. 5A); el rebaudiósido E ("Reb-E") estándar (FIG. 5B); el rebaudiósido D2 ("Reb D2") producido enzimáticamente por EUGT11 a las 12 horas (FIG. 5C); el sistema de acoplamiento UGT-SUS (EUGT11-SUS1) a las 12 horas (FIG. 5D) y EUS a las 12 horas (FIG. 5E); el rebaudiósido D ("Reb D") producido enzimáticamente por el sistema de acoplamiento de UGT76G1-AtSUS 1 a las 12 horas (FIG. 5F); el rebaudiósido D2 producido enzimáticamente por EUGT11 a las 24 horas (FIG. 5G); el rebaudiósido D2 producido enzimáticamente por medio del sistema de acoplamiento de UGT-SUS (EUGT11-SUS1) a las 24 horas (FIG. 5H); el rebaudiósido D2 producido enzimáticamente por EUS a las 24 horas (FIG. 5I); y el rebaudiósido D producido enzimáticamente por un sistema de acoplamiento de UGT7G1-AtSUS1 a las 24 horas (FIG. 5J), como se describe en el Ejemplo 4.

Las FIGS. 6A-6B muestran las estructuras químicas de rebaudiósido D2 y rebaudiósido E, como se describe en el Ejemplo 5.

La FIG. 7 es una estructura química de rebaudiósido D2 que ilustra las correlaciones clave TOCSY y HMBC, como se describe en el Ejemplo 5.

Las FIGS. 8A-8C muestran las estructuras químicas de rebaudiósido D2, rebaudiósido E y rebaudiósido D, como se describe en el Ejemplo 5.

Descripción detallada

Salvo que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que entendería normalmente el experto en la técnica a la que pertenece la descripción. Aunque cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción se pueden usar en la práctica o en ensayos de la presente descripción, los métodos y materiales preferidos se describen a continuación.

El término "complementario" se usa, según su significado normal y habitual, como entendería una persona con experiencia en la técnica, y se utiliza sin limitarse a describir la relación entre bases de nucleótidos que son capaces de hibridarse entre sí. Por ejemplo, sobre el ADN, la adenosina es complementaria a la timina, y la citosina es complementaria a la guanina. Por consiguiente, la tecnología tratada también incluye fragmentos de ácido nucleico aislados que son complementarios a las secuencias completas, como se indican en la lista de secuencias, así como las secuencias de ácido nucleico prácticamente similares.

Los términos "ácido nucleico" y "nucleótidos" se usan según sus significados respectivos normales y habituales como entendería una persona con experiencia en la técnica, y se utilizan sin limitarse a referirse a desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y polímeros de los mismos en forma monocatenaria o bicatenaria. Salvo que estén específicamente

limitados, el término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales que tienen propiedades de enlace similares como el ácido nucleico de referencia y se metabolizan de manera similar a los nucleótidos presentes de forma natural. Salvo que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente variantes modificadas conservadoramente o degeneradas (p. ej., sustituciones de codón degenerado) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada.

El término “aislado” se usa, según su significado común y habitual, como entendería una persona con experiencia en la técnica, y cuando se utiliza en el contexto de un ácido nucleico aislado o un polipéptido aislado, se usa sin limitación para referirse a un ácido nucleico o polipéptido que, por la mano del hombre, existe aparte de su entorno original y por tanto no es un producto de la naturaleza. Un ácido nucleico aislado o polipéptido puede existir en una forma purificada o puede existir en un ambiente no original, como, por ejemplo, en una célula huésped transgénica.

Los términos “incubar” e “incubación” como se usan en la presente descripción se refieren a un proceso de mezcla de dos o más productos químicos o biológicos (como un compuesto químico y una enzima) y les permite interactuar bajo condiciones favorables para producir una composición de glucósido de esteviol.

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

Los términos “polipéptido”, “proteína” y “péptido” se usan según sus significados respectivos comunes y habituales como entendería una persona con experiencia en la técnica; los tres términos a veces se usan indistintamente, y se usan sin limitación para referirse a un polímero de aminoácidos o análogos de aminoácidos, independientemente de su tamaño o función. Aunque “proteína” se utiliza a menudo en referencia a polipéptidos relativamente grandes, y “péptido” se utiliza a menudo en referencia a polipéptidos pequeños, el uso de estos términos en la técnica se superpone y varía. El término “polipéptido” como se usa en la presente descripción se refiere a péptidos, polipéptidos y proteínas, salvo que se indique lo contrario. Los términos “proteína”, “polipéptido” y “péptido” se usan indistintamente en la presente descripción cuando se refieren a un producto polinucleótido. Así, los polipéptidos ilustrativos incluyen productos de polinucleótidos, proteínas de origen natural, homólogos, ortólogos, parálogos, fragmentos y otros equivalentes, variantes y análogos de los anteriores.

Los términos “fragmento de polipéptido” y “fragmento”, cuando se usan en referencia a un polipéptido de referencia, se utilizan de acuerdo a sus significados comunes y habituales para una persona con experiencia en la técnica, y se utilizan sin limitarse a hacer referencia a un polipéptido en el que los residuos de aminoácidos se eliminan en comparación con el polipéptido de referencia en sí, pero donde la secuencia de aminoácidos restante suele ser idéntica a las posiciones correspondientes en el polipéptido de referencia. Tales deleciones pueden ocurrir en el amino-terminal o el carboxi-terminal del polipéptido de referencia, o alternativamente ambos.

El término “fragmento funcional” de un polipéptido o proteína se refiere a un fragmento de péptido que es una parte del polipéptido o proteína de longitud completa y tiene sustancialmente la misma actividad biológica, o lleva a cabo sustancialmente la misma función que el polipéptido o proteína de longitud completa (p. ej., llevando a cabo la misma reacción enzimática).

Los términos “polipéptido variante”, “secuencia de aminoácidos modificada” o “polipéptido modificado”, que se usan indistintamente, se refieren a una secuencia de aminoácidos que es diferente del polipéptido de referencia en uno o más aminoácidos, p. ej., en una o más sustituciones, deleciones y/o adiciones de aminoácidos. En un aspecto, una variante es una “variante funcional” que retiene toda o parte de la capacidad del polipéptido de referencia.

El término “variante funcional” incluye además variantes sustituidas conservadoramente. El término “variante sustituida conservadoramente” se refiere a un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de un péptido de referencia en una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos, y mantiene parte o la totalidad de la actividad del péptido de referencia. Una “sustitución conservadora de aminoácidos” es una sustitución de un residuo de aminoácidos por un residuo con una funcionalidad similar. Los ejemplos de sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un residuo no polar (hidrófobo), como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro; la sustitución de un residuo cargado o polar (hidrófilo) por otro como entre arginina y lisina, entre glutamina y asparagina, entre treonina y serina; la sustitución de un residuo básico como lisina o arginina por otro; o la sustitución de un residuo ácido, como ácido aspártico o ácido glutámico por otro; o la sustitución de un residuo aromático, como fenilalanina, tirosina o triptófano por otro. Se espera que dichas sustituciones tengan poco, o ningún efecto, sobre el peso molecular aparente o el punto isoelectrico de la proteína o polipéptido. La expresión “variante sustituida conservadoramente” también incluye péptidos, en donde un residuo se sustituye por un residuo químicamente derivado, siempre que el péptido resultante mantenga parte o la totalidad de la actividad del péptido de referencia descrito en la presente descripción.

El término “variante”, en relación con los polipéptidos de la tecnología tratada, incluye además un polipéptido funcionalmente activo que tiene una secuencia de aminoácidos de al menos un 75 %, al menos un 76 %, al

menos un 77 %, al menos un 78 %, al menos un 79 %, al menos un 80 %, al menos un 81 %, al menos un 82 %, al menos un 83 %, al menos un 84 %, al menos un 85 %, al menos un 86 %, al menos un 87 %, al menos un 88 %, al menos un 89 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, e incluso un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de referencia.

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

El “porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos” con respecto a la variante de secuencias de polipéptidos de la tecnología relevante, se refiere al porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia candidata que sean idénticos a los residuos de aminoácidos de un polipéptido de referencia (como, por ejemplo, sec. con núm. de ident.: 6), después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna de las sustituciones conservadoras como parte de la identidad de secuencia.

El alineamiento para fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos, se puede lograr de diversas maneras que estén dentro de la experiencia en la técnica, por ejemplo, mediante el uso de programas informáticos disponibles públicamente, como BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la técnica pueden determinar parámetros apropiados para medir la alineación, que incluyen cualquier algoritmo necesario para lograr la alineación máxima sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Por ejemplo, el % de identidad de secuencia de aminoácidos se puede determinar empleando el programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2. El programa de comparación de secuencias NCBI-BLAST2 se puede descargar de ncbi.nlm.nih.gov. El NCBI BLAST2 usa diversos parámetros de búsqueda, en donde todos los parámetros de búsqueda se establecen en valores predeterminados que incluyen, por ejemplo, desenmascarar sí, cadena = todos, casos esperados 10, longitud mínima de complejidad baja = 15/5, valor-e de múltiples pasos = 0,01, constante para múltiples pasos = 25, disminución para alineación final con espacios = 25 y matriz de puntuación = BLOSUM62. En situaciones donde se emplea NCBI-BLAST2 para las comparaciones de la secuencia de aminoácidos, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de una secuencia A de aminoácidos determinada, con, o contra, una secuencia B de aminoácidos determinada (que puede alternativamente denominarse una secuencia A de aminoácidos determinada que tiene o comprende un % de identidad de una secuencia de aminoácidos, con, o contra, una secuencia B de aminoácidos determinada) se calcula de la siguiente manera: 100 veces la fracción X/Y, donde X es el número de residuos de aminoácidos considerados como coincidencias idénticas por el programa de alineamiento de secuencias NCBI-BLAST2 en ese alineamiento del programa de A y B, y donde Y es el número total de residuos de aminoácidos en B. Se observará que cuando la longitud de una secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de la secuencia de aminoácidos de B a A.

En este sentido, las técnicas para determinar la “similitud” de las secuencias de aminoácidos son bien conocidas en la técnica. En general, la “similitud” se refiere a la comparación exacta aminoácido a aminoácido de dos o más polipéptidos en el lugar apropiado, donde los aminoácidos son idénticos o poseen propiedades químicas y/o físicas similares como carga o hidrofobicidad. El denominado “porcentaje de similitud” puede determinarse entre las secuencias de polipéptidos comparadas. Las técnicas para determinar la identidad de secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos son bien conocidas en la técnica, e incluyen la determinación de la secuencia de nucleótidos del ARNm para ese gen (normalmente mediante un producto intermedio de ADNc) y determinar la secuencia de aminoácidos codificada en ella, y comparar esta con una segunda secuencia de aminoácidos. En general, “identidad” se refiere a una correspondencia exacta de nucleótido a nucleótido, o aminoácido a aminoácido, de dos secuencias de polinucleótidos o polipéptidos, respectivamente. Pueden compararse dos o más secuencias de polinucleótidos determinando su “porcentaje de identidad”, como pueden ser dos o más secuencias de aminoácidos. Los programas disponibles en el paquete Wisconsin Sequence Analysis, versión 8 (disponible de Genetics Computer Group, Madison, Wis.), por ejemplo, el programa GAP, son capaces de calcular tanto la identidad entre dos polinucleótidos, como la identidad y similitud entre dos secuencias de polipéptidos, respectivamente. Los expertos en la técnica conocen otros programas para calcular la identidad o similitud entre secuencias.

Una posición de aminoácido “correspondiente a” una posición de referencia, se refiere a una posición que está alineada con una secuencia de referencia, como se identifica mediante alineación de las secuencias de aminoácidos. Dichas alineaciones pueden hacerse a mano o utilizando programas de alineamiento de secuencias muy conocidos, como ClustalW2, Blast 2, etc.

Salvo que se indique lo contrario, el porcentaje de identidad de dos secuencias de polipéptidos o de polinucleótidos se refiere al porcentaje de residuos de aminoácidos o nucleótidos idénticos a lo largo de toda la longitud más corta de dos secuencias.

5 La “secuencia codificante” se usa según su significado normal y habitual, como entendería una persona con experiencia en la técnica, y se utiliza sin limitación para referirse a la secuencia de ADN que codifica una secuencia específica de aminoácidos.

10 “Secuencias reguladoras adecuadas” se usa conforme a su significado común y habitual, como entendería una persona con experiencia en la técnica, y se utiliza sin limitación para referirse a secuencias de nucleótidos situadas corriente arriba (secuencias no codificantes 5'), dentro, o corriente abajo (secuencias no codificantes 3') de una secuencia codificante, y que influyen en la transcripción, procesamiento o estabilidad del ARN, o la traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias reguladoras pueden incluir promotores, secuencias líderes de traducción, intrones y secuencias de reconocimiento de poliadenilación.

15 “Promotor” se usa según su significado común y habitual, como entendería una persona con experiencia en la técnica, y se utiliza sin limitación para referirse a una secuencia de ADN capaz de controlar la expresión de una secuencia codificante o ARN funcional. En general, una secuencia codificante está situada 3' a una secuencia del promotor. Los promotores pueden derivarse en su totalidad de un gen nativo, o pueden estar formados por elementos diferentes derivados de promotores distintos que se encuentran en la naturaleza, o incluso comprender segmentos de ADN sintéticos. Los expertos en la técnica entienden que los distintos promotores pueden dirigir la expresión de un gen en diferentes tipos de células, o en diferentes etapas de desarrollo, o en respuesta a condiciones medioambientales diferentes. Los promotores, que causan la expresión de un gen en la mayoría de los tipos de células la mayoría de las veces, se denominan normalmente “promotores constitutivos”. Además, se reconoce que dado que en la mayoría de los casos los límites exactos de las secuencias reguladoras no se han definido totalmente, los fragmentos de ADN de diferentes longitudes pueden tener una actividad promotora idéntica.

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

35 El término “expresión” como se usa en la presente descripción, se usa según su significado común y habitual, como entendería una persona con experiencia en la técnica, y se utiliza sin limitación para referirse a la transcripción y acumulación estable de sentido (ARNm) o ARN antisentido derivado del fragmento de ácido nucleico de la tecnología tratada. La “sobrexpresión” consiste en la producción de un producto génico en organismos transgénicos o recombinantes que supera los niveles de producción en organismos normales o no transformados.

40 El término “transformación” se usa según su significado normal y habitual como entendería una persona con experiencia en la técnica, y se utiliza sin limitación para describir la transferencia de un polinucleótido a una célula objetivo. El polinucleótido transferido puede incorporarse al genoma o ADN cromosómico de una célula objetivo, produciendo una herencia genéticamente estable, o puede replicarse independientemente del cromosoma huésped. Los organismos huésped que contienen los fragmentos de ácido nucleico transformado se denominan organismos “transgénicos” o “recombinantes” o “transformados”.

45 Los términos “transformados”, “transgénicos” y “recombinantes”, cuando se usan en la presente descripción en relación con las células huésped, se usan según sus significados normales y habituales, como entendería una persona con experiencia en la técnica, y se usan sin limitación para referirse a una célula de un organismo huésped, como una célula de una planta o microbiana, en la que se ha introducido una molécula de ácido nucleico heteróloga. La molécula de ácido nucleico se puede integrar de manera estable en el genoma de la célula huésped o la molécula de ácido nucleico puede estar presente como molécula extracromosómica. Esta molécula extracromosómica puede ser auto-replicante. Se entiende que las células, tejidos o sujetos transformados no solo abarcan el producto final de un proceso de transformación, sino también la progenie transgénica de los mismos.

50 Los términos “recombinante”, “heterólogo” y “exógeno”, cuando se usan en la presente descripción, en relación con polinucleótidos, se utilizan de acuerdo a sus significados normales y habituales que entendería una persona con experiencia en la técnica, y se utilizan sin limitación para referirse a un polinucleótido (p. ej., una secuencia de ADN o un gen) que se origina de una fuente ajena a la célula huésped particular o, si es de la misma fuente, está modificada con respecto a su forma original. Así, un gen heterólogo en una célula huésped incluye un gen que es endógeno a la célula huésped específica pero ha sido modificado mediante, por ejemplo, el uso de mutagénesis dirigida al sitio, u otras técnicas recombinantes. Los términos incluyen, además, múltiples copias de origen no natural de una secuencia de ADN de origen natural. Por lo tanto, los términos se refieren a un segmento de ADN que es ajeno o heterólogo a la célula, u homólogo a la célula pero en una posición o forma dentro de la célula huésped en la que el elemento no se encuentra normalmente.

65

De forma similar, los términos “recombinante”, “heterólogo” y “exógeno”, cuando se usan en la presente descripción en conexión con una secuencia de polipéptidos o aminoácidos, significan una secuencia de polipéptidos o aminoácidos que se originan de una fuente ajena a la célula huésped específica o, si es de la misma fuente, se modifica de su forma original. Por lo tanto, los segmentos de ADN recombinante pueden expresarse en una célula huésped para producir un polipéptido recombinante.

Los términos “plásmido”, “vector” y “casete”, según sus significados comunes y habituales como entendería una persona con experiencia en la técnica, y se utilizan sin limitación para referirse a un elemento cromosómico adicional, que con frecuencia lleva los genes que no forman parte del metabolismo central de la célula y, normalmente en forma de moléculas circulares de ADN bicatenario. Tales elementos pueden ser secuencias que se replican de forma autónoma, secuencias de integración de genoma, secuencias de fago o nucleótidos, lineares o circulares, de un ADN o ARN monocatenario o bicatenario, derivados de cualquier fuente, en la cual un número de secuencias de nucleótidos se han unido o recombinado en una construcción única que es capaz de introducir un fragmento promotor y una secuencia de ADN para un producto génico seleccionado junto con una secuencia 3’ no traducida apropiada en una célula. “Casete de transformación” se refiere a un vector específico que contiene un gen extraño y que tiene elementos, además del gen extraño, que facilitan la transformación de una célula huésped particular. “Casete de expresión” se refiere a un vector que contiene un gen extraño y que tiene elementos, además del gen extraño, que permitan una mayor expresión de ese gen en un sistema extraño.

Las técnicas estándar de ADN recombinante y de clonación molecular utilizadas en la presente descripción son bien conocidas en la técnica, y se describen, por ejemplo, por Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed.; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N.Y., 1989 (en adelante “Maniatis”); y por Silhavy, T. J., Bannan, M. L. and Enquist, L. W. *Experiments with Gene Fusions*; Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, N.Y., 1984; y por Ausubel, F. M. y cols., *In Current Protocols in Molecular Biology*, publicado por Greene Publishing y Wiley-Interscience, 1987; la totalidad de cada uno de las cuales se incorporan de esta manera, como referencia en la presente descripción, en la medida en que sean compatibles.

Como se usa en la presente descripción, “sintética” o “sintetizada orgánicamente” o “sintetizada químicamente” o “sintetizar orgánicamente” o “sintetizar químicamente” o “síntesis orgánica” o “síntesis química” se utilizan para referirse a la preparación de los compuestos a través de una serie de reacciones químicas; esto no incluye extraer el compuesto, por ejemplo, de una fuente natural.

El término “producto consumible por vía oral” como se usa en la presente descripción se refiere a cualquier bebida, producto alimenticio, suplemento alimenticio, nutracéutico, composición farmacéutica, composición higiénica dental y producto cosmético que entren en contacto con la boca del ser humano o animal, incluidas las sustancias que se ingieren, y posteriormente se expulsan de la boca, y sustancias que se beben, comen, traguen o ingieran de cualquier otra manera; y que sean seguros para el consumo humano o animal cuando se usen en un intervalo de concentración generalmente aceptable.

El término “producto alimenticio” como se usa en la presente descripción se refiere a frutas, verduras, zumos, productos cárnicos, como jamón, tocino y salchicha; productos de huevo, concentrados de frutas, gelatinas y productos similares a la gelatina, como mermeladas, jaleas, conservas y similares; productos lácteos, como helado, crema agria, yogur y sorbete; glaseados, siropes, incluida la melaza; productos de maíz, trigo, centeno, soja, avena, arroz y cebada, productos de cereales, carnes de nuez y productos de nuez, tartas, galletas, dulces como caramelos, gominolas, caramelos con sabor a fruta, y chocolates, chicles, pastillas de menta, cremas, glaseados, helados, tartas y panes. “Producto alimenticio” también se refiere a condimentos como hierbas, especias y aderezos, potenciadores de sabor, como glutamato monosódico. “Producto alimenticio” también se refiere a productos envasados preparados, tales como edulcorantes dietéticos, edulcorantes líquidos, saborizantes de mesa, mezclas de sabores granulados que al reconstituirse con agua producen bebidas no carbonatadas, mezclas para pudín instantáneo, café instantáneo y té, blanqueadores de café, mezclas de leche malteada, alimentos para mascotas, piensos para ganado, tabaco, y materiales para aplicaciones de horneado, como mezclas de levadura para la elaboración de panes, galletas, pasteles, tortitas, donuts y similares. “Producto alimentario” se refiere también a alimentos y bebidas bajas en calorías que contienen poco o nada de sacarosa.

Como se usa en la presente descripción, el término “estereoisómero” es un término general para todos los isómeros de moléculas individuales que difieren solo en la orientación de sus átomos en el espacio. “Estereoisómero” incluye enantiómeros e isómeros de compuestos con más de un centro quiral que no son imágenes especulares uno del otro (diastereómeros).

Como se usa en la presente descripción, el término “rebaudiósido D2 amorfo” se refiere a una forma sólida no cristalina de rebaudiósido D2.

Como se usa en la presente descripción, el término “intensidad de dulzor” se refiere a la fuerza relativa del dulzor como lo observa o experimenta una persona, p. ej., un ser humano, o un grado o cantidad de dulzor detectado por un degustador, por ejemplo en una escala Brix.

Como se usa en la presente descripción, el término “potenciación del dulzor” se refiere al efecto de rebaudiósido D2 en el aumento, incremento, intensificación, magnificación y/o potenciación de la percepción sensorial de una o más características de dulzor de un producto de bebida o un producto consumible de la presente descripción, sin cambiar la naturaleza o calidad de la misma, en comparación con un producto consumible por vía oral correspondiente que no contiene rebaudiósido D2.

Como se usa en la presente descripción, el término “sabor(es) desagradable(s)” se refiere a una cantidad o grado de sabor que característicamente, o normalmente, no se encuentra en un producto de bebida o un producto consumible de la presente descripción. Por ejemplo, un sabor desagradable es un sabor no deseable de un producto consumible edulcorado para los consumidores, como, un sabor amargo, sabor de tipo regaliz, un sabor metálico, un sabor repugnante, un sabor astringente, un comienzo retardado del dulzor, un gusto dulce persistente y similares, entre otros.

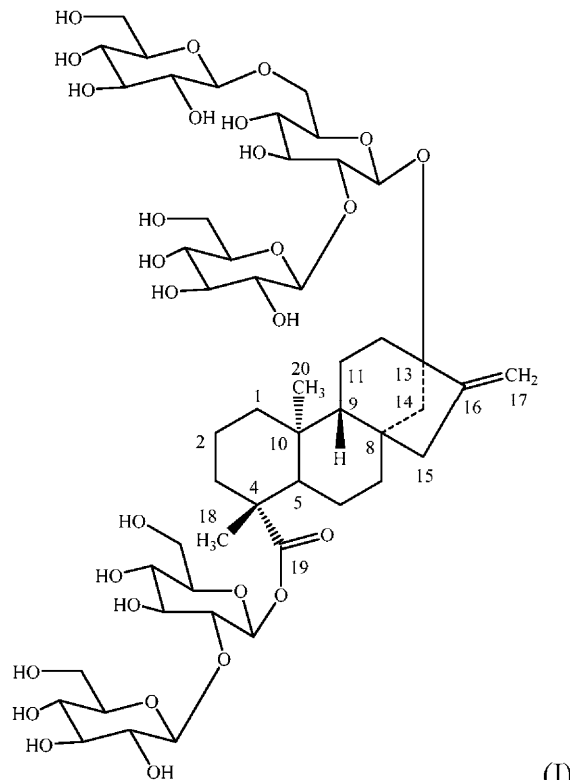
Como se usa en la presente descripción, el término “p/v-%” se refiere al peso de un compuesto, como un azúcar (en gramos) por cada 100 ml de un líquido de producto consumible por vía oral de la presente descripción que contiene dicho compuesto. En la presente descripción, el término “p/p-%” se refiere al peso de un compuesto, como un azúcar, (en gramos) por cada gramo de producto consumible por vía oral de la presente descripción que contienen dicho compuesto.

Como se usa en la presente descripción, el término “ppm” se refiere a una parte(s) por millón en peso, por ejemplo, el peso de un compuesto, como rebaudiósido D2 (en miligramos) por kilogramo de un producto consumible por vía oral de la presente descripción que contenga dicho compuesto (es decir, mg/kg) o el peso de un compuesto, como rebaudiósido D2 (en miligramos) por litro de un producto consumible por vía oral de la presente descripción que contenga dicho compuesto (es decir, mg/l); o por volumen, por ejemplo el volumen de un compuesto, como rebaudiósido D2 (en mililitros) por litro de un producto consumible por vía oral de la presente descripción que contiene dicho compuesto (es decir, ml/l).

De acuerdo con la presente descripción, se describe un edulcorante no calórico y métodos para sintetizar el edulcorante no calórico. Además, de acuerdo con la presente descripción se describe una enzima y métodos para usar la enzima para preparar el edulcorante no calórico.

Edulcorante no calórico sintético: Rebaudiósido D2 sintético

En un aspecto, la presente descripción se refiere a un edulcorante no calórico sintético. El edulcorante no calórico sintético es un glucósido de esteviol de tipo rebaudiósido sintético, y se denomina “rebaudiósido D2”. Como se ilustra en la estructura química (I) a continuación, el rebaudiósido D2 (“Reb D2”) es un esteviol que tiene cinco residuos glucosídicos similares a los cinco residuos glucosídicos del glucósido de esteviol, rebaudiósido D.



El rebaudiósido D2 tiene la fórmula molecular $C_{50}H_{80}O_{28}$ y la denominación IUPAC, 13-[(2-O-β-D-glucopiranosil-6-O-β-D-glucopiranosil-6-D-glucopiranosil)oxi] *ent*-kaur-16-en-19-oico ácido-(2-O-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil) éster.

5 Como se ilustra en las estructuras químicas para el rebaudiósido D2, el rebaudiósido E y el rebaudiósido D, el rebaudiósido D2 y el rebaudiósido D tienen cinco unidades de β-D-glucosilo conectadas a la aglicona esteviol en la estructura, mientras que el rebaudiósido E contiene cuatro residuos glucosídicos-D (véase, p. ej., Tabla 1 y FIG. 8). El rebaudiósido D2 sintetizado incluye dos unidades de residuos glucosídicos en la posición C19 y tres unidades de residuos glucosídicos en la posición C13 de esteviol. En comparación, el rebaudiósido D también incluye cinco residuos glucosídicos; dos unidades de residuos glucosídicos en la posición C19 y tres residuos glucosídicos en la posición C13 de la aglicona esteviol. El quinto residuo glucosídico (“azúcar V”) de rebaudiósido D2 está situado en C-6’ del C13 O-glucosa de Reb E por un enlace 1,6 β glucosídico, mientras que el quinto residuo glucosídico (“azúcar V”) de rebaudiósido D está situado en el C-3’ del C13 O-glucosa de Reb E por un enlace 1,3 β glucosídico (véase, FIG. 8). Sin embargo, el rebaudiósido E incluye dos unidades de residuos en la posición C19 y dos residuos glucosídicos en la posición C13. Sin estar limitados por la teoría, se cree que los glucósidos de esteviol que tienen 5 residuos glucosídicos (rebaudiósido D) y 4 residuos glucosídicos (rebaudiósido A y rebaudiósido E) tienen una calidad de sabor significativamente mejor que los glucósidos de esteviol que tienen menos residuos glucosídicos (esteviósido y rubusosido).

Métodos de producción de rebaudiósido D2

20 En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un método para sintetizar rebaudiósido D2 de rebaudiósido E. En una realización, el método incluye preparar una mezcla de reacción que incluye rebaudiósido E; un sustrato seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP) y glucosa de uridina difosfato (UDP-glucosa); y una UDP-glucosiltransferasa seleccionada de una enzima de fusión uridina difosfo glucosiltransferasa y una enzima de fusión UDP-glucosiltransferasa (EUS) que comprende un dominio de uridina difosfo (UDP) glucosiltransferasa acoplado a un dominio de sacarosa sintasa; e incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido D2, en donde una glucosa está unida en forma covalente a rebaudiósido E para producir rebaudiósido D2.

30 Una uridina difosfo (UDP) glucosiltransferasa particular adecuada puede ser, por ejemplo, EUGT11 (como se describe en el documento WO 2013022989). EUGT11 es una glucosil transferasa dependiente uridina 5'-difosfato (“UGT”) que tiene actividad de 1,2-19-O-glucosa y 1,2-13-O-glucosa de glucosilación. EUGT11 es conocido para catalizar la producción de esteviósido a rebaudiósido E y rebaudiósido A a rebaudiósido D. De forma sorprendente e inesperada, sin embargo, se ha descubierto que la uridina difosfo (UDP) glucosiltransferasa puede utilizarse *in vitro* para convertir rebaudiósido E en rebaudiósido D2.

35 Una uridina difosfo glucosiltransferasa adecuada puede ser, por ejemplo, una *Oryza sativa* uridina difosfo glucosiltransferasa EUGT11. Una uridina difosfo glucosiltransferasa particularmente adecuada tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 1.

40 El método puede incluir además añadir una sacarosa sintasa a la mezcla de reacción que contiene la uridina difosfo (UDP) glucosil transferasa. La incorporación de la sacarosa sintasa a la mezcla de reacción que incluye un uridina difosfo glucosiltransferasa crea un “sistema de acoplamiento UGT-SUS”. En el sistema de acoplamiento UGT-SUS, la UDP-glucosa puede regenerarse a partir de UDP y sacarosa, lo que permite la omisión de la incorporación de UDP-glucosa adicional a la mezcla de reacción o mediante el uso de UDP en la mezcla de reacción.

45 Los dominios de sacarosa sintasa adecuados pueden ser, por ejemplo, una sacarosa sintasa 1 de *Arabidopsis*; una sacarosa sintasa 3 de *Arabidopsis* y una sacarosa sintasa de *Vigna radiate*. Un dominio de sacarosa sintasa particularmente adecuado puede ser, por ejemplo, una sacarosa sintasa 1 de *Arabidopsis*. Una sacarosa sintasa 1 de *Arabidopsis* particularmente adecuada es una sacarosa sintasa 1 de *Arabidopsis thaliana* (AtSUS1). Una sacarosa sintasa 1 puede ser, por ejemplo, una sacarosa sintasa 1 que tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 3.

50 En otra realización, la UDP-glucosiltransferasa puede ser una enzima de fusión de UDP-glucosiltransferasa (también denominada en la presente descripción “EUS”) que incluye un dominio de uridina difosfo glucosiltransferasa acoplado a un dominio de sacarosa sintasa. A continuación se describe más detalladamente una enzima de fusión UDP-glucosil transferasa.

55 En la reacción, la UDP-glucosiltransferasa (por ejemplo, EUGT11 y EUS) tiene una actividad de glucosilación de 1,6-13 O glucosa y, en una realización, puede transferir una molécula de glucosa a rebaudiósido E para formar rebaudiósido D2. La UDP-glucosiltransferasa (por ejemplo, EUGT11 y EUS) tiene también actividad de 1,2-19 O-glucosa y de glucosilación de 1,2-13-O-glucosa. En otra realización, la UDP-glucosiltransferasa puede transferir una molécula de glucosa a esteviósido para formar rebaudiósido E y puede, además, transferir una molécula de glucosa a rebaudiósido A para formar rebaudiósido D. Además, la enzima de fusión EUS tiene actividad de sacarosa sintasa y, por lo tanto, puede regenerar UDP-glucosa de UDP y sacarosa.

65 Una realización especialmente adecuada se dirige a un método para producir rebaudiósido D2 de rebaudiósido E usando un sistema de acoplamiento de UGT-SUS. El método incluye preparar una mezcla de reacción que incluye rebaudiósido E; sacarosa; uridina difosfato (UDP); una uridina difosfo glucosil transferasa; y una sacarosa

sintasa; e incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido D2, en donde una glucosa está unida en forma covalente a rebaudiósido E para producir rebaudiósido D2.

5 Las UDP-glucosil transferasas adecuadas para usar en el método de esta realización es la misma que se describió anteriormente. Las sacarosas sintasas adecuadas para usar en el método de esta realización es la misma que se describió anteriormente.

10 Otra realización especialmente adecuada se dirige a un método para producir rebaudiósido D2 de rebaudiósido E usando una enzima de fusión UDP-glucosiltransferasa que incluye un dominio de uridina difosfo glucosiltransferasa acoplado a un dominio de sacarosa sintasa. El método incluye preparar una mezcla de reacción que incluye rebaudiósido E; sacarosa; uridina difosfato (UDP); y una enzima de fusión UDP-glucosiltransferasa que comprende un dominio de uridina difosfo glucosiltransferasa acoplado a un dominio de sacarosa sintasa; e incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido D2, en donde una glucosa está unida en forma covalente a rebaudiósido E para producir rebaudiósido D2.

15 A continuación se describe más detalladamente una enzima de fusión UDP-glucosiltransferasa especialmente adecuada.

20 En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un método para sintetizar rebaudiósido D2 de esteviósido. El método para sintetizar rebaudiósido D2 de esteviósido incluye preparar una mezcla de reacción que incluya esteviósido; un sustrato seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP) y glucosa de uridina difosfato (UDP-glucosa); y una UDP-glucosiltransferasa seleccionada del grupo formado por uridina difosfo glucosiltransferasa y una enzima de fusión UDP-glucosiltransferasa que incluya un dominio de uridina difosfo glucosiltransferasa acoplado a un dominio de sacarosa sintasa; e incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido D2, en donde una glucosa se acopla de manera covalente al esteviósido para producir un producto intermedio de rebaudiósido E y en donde una glucosa se acopla de manera covalente al producto intermedio de rebaudiósido E para producir rebaudiósido D2.

25 Inicialmente, la UDP-glucosil transferasa, para usar en el método de esta realización, es la misma que se describió anteriormente. Como se ha descrito anteriormente, el método puede incluir además añadir un sacarosa sintasa a la mezcla de reacción que contiene la uridina difosfo glucosiltransferasa para crear un sistema de acoplamiento UGT-SUS.

30 Una realización especialmente adecuada se dirige a un método para producir rebaudiósido D2 de esteviósido utilizando un sistema de acoplamiento de UGT-SUS. El método incluye preparar una mezcla de reacción que incluya esteviósido; sacarosa; uridina difosfato (UDP); una uridina difosfo glucosil transferasa; y una sacarosa sintasa; e incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido D2, en donde una glucosa se acopla de manera covalente al esteviósido para producir un producto intermedio de rebaudiósido E, y en donde una glucosa se acopla de manera covalente al producto intermedio de rebaudiósido E para producir el rebaudiósido D2.

35 Las UDP-glucosil transferasas adecuadas para usar en el método de esta realización es la misma que se describió anteriormente. Las sacarosas sintasas adecuadas para usar en el método de esta realización es la misma que se describió anteriormente.

40 Otra realización especialmente adecuada se dirige a un método para producir rebaudiósido D2 de esteviósido utilizando una enzima de fusión de UDP-glucosiltransferasa que incluya un dominio de uridina difosfo glucosiltransferasa acoplado a un dominio sacarosa sintasa. El método incluye preparar una mezcla de reacción que incluya esteviósido; un sustrato seleccionado del grupo que consiste en sacarosa; uridina difosfato (UDP); y una enzima de fusión UDP-glucosiltransferasa que comprende un dominio de uridina difosfo glucosiltransferasa acoplado a un dominio de sacarosa sintasa; e incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido D2, en donde una glucosa se acopla de manera covalente al esteviósido para producir un producto intermedio de rebaudiósido E, y en donde una glucosa se acopla de manera covalente al producto intermedio de rebaudiósido E para producir el rebaudiósido D2.

45 A continuación se describe más detalladamente una enzima de fusión UDP-glucosiltransferasa especialmente adecuada.

50 Enzima de fusión de UDP-glucosil transferasa

55 En otro aspecto, la presente descripción se dirige a una enzima de fusión de UDP-glucosiltransferasa (también denominada en la presente memoria "EUS"). En particular, la enzima de fusión UDP-glucosiltransferasa incluye un dominio de uridina difosfo glucosiltransferasa acoplado a un dominio de sacarosa sintasa. La enzima de fusión EUS tiene una actividad de glucosilación de 1,2-19 O-glucosa. De forma sorprendente e inesperada, la enzima de fusión EUS tiene también actividad de glucosilación de 1,6-13 O-glucosa que puede transferir una molécula de glucosa a rebaudiósido E para formar rebaudiósido D2. Además, la enzima de fusión EUS tiene actividad de sacarosa sintasa y, por lo tanto, puede regenerar UDP-glucosa de UDP y sacarosa.

60 La enzima de fusión UDP-glucosiltransferasa puede tener una secuencia de polipéptidos con al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % e

incluso un 100 % idéntica a la secuencia de ácido nucleico definida en sec. con núm. de ident.: 5. Apropriadamente, la secuencia de ácido nucleico de la enzima de fusión UDP-glucosiltransferasa tiene una identidad de al menos un 80 % con la sec. con núm. de ident.: 5. Más apropiadamente, la secuencia de ácido nucleico de la enzima de fusión UDP-glucosiltransferasa tiene al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, e incluso de 100 % de identidad de la secuencia de aminoácidos definida en sec. con núm. de ident.: 5.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un ácido nucleico aislado que tiene una secuencia de nucleótidos que codifica la enzima de fusión UDP-glucosiltransferasa descrita en la presente descripción. Por ejemplo, el ácido nucleico aislado puede incluir una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la enzima de fusión de UDP-glucosiltransferasa que tiene una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, e incluso un 100 % de homología de secuencia con la secuencia de ácido nucleico definida en sec. con núm. de ident.: 6. Apropriadamente, el ácido nucleico aislado incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la enzima de fusión de UDP-glucosiltransferasa que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % de la identidad de la secuencia con la secuencia de aminoácidos definida en sec. con núm. de ident.: 5. Más apropiadamente, el ácido nucleico aislado incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la enzima fusión de UDP-glucosiltransferasa que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, e incluso un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos definida en sec. con núm. de ident.: 5. El ácido nucleico aislado por tanto incluye las secuencias de nucleótidos que codifican los fragmentos funcionales de sec. con núm. de ident.: 5, variantes funcionales de la sec. con núm. de ident.: 5, u otros polipéptidos homólogos que tienen, por ejemplo, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, e incluso de 100 % de identidad de secuencia con la sec. con núm. de ident.: 5. Como conocen los expertos en la técnica, la secuencia de ácido nucleico que codifica la UDP-glucosiltransferasa puede optimizarse por codones para la expresión en un organismo huésped adecuado, como, por ejemplo, bacterias y levaduras.

Un dominio de uridina difosfo glucosiltransferasa adecuado puede ser una uridina difosfo glucosiltransferasa de *Oryza sativa* EUGT11 (número de registro de GenBank AC133334). Una uridina difosfo glucosiltransferasa EUGT11 particular adecuada puede ser, por ejemplo, el dominio de uridina difosfo glucosil tranferasa EUGT11 que tiene una secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 1.

Los dominios de sacarosa sintasa adecuados pueden ser, por ejemplo, una sacarosa sintasa 1 de *Arabidopsis*; una sacarosa sintasa 3 de *Arabidopsis* y una sacarosa sintasa de *Vigna radiate*. Un dominio de sacarosa sintasa particularmente adecuado puede ser, por ejemplo, una sacarosa sintasa 1 de *Arabidopsis*. Una sacarosa sintasa 1 de *Arabidopsis* particularmente adecuada es una sacarosa sintasa 1 de *Arabidopsis thaliana* (AtSUS1). Un dominio de sacarosa sintasa 1 particularmente adecuado puede ser, por ejemplo, una sacarosa sintasa 1 que tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 3.

La sacarosa sintasa cataliza la reacción química entre la NDP-glucosa y la D-fructosa para producir NDP y sacarosa. La sacarosa sintasa es una glucosil transferasa. El nombre sistemático de esta clase de enzima es NDP-glucosa-D-fructosa 2-alfa-D-glucosil transferasa. Otros nombres de uso común incluyen UDP glucosa-fructosa glucosil transferasa, sacarosa sintasa, sacarosa-UDP glucosil transferasa, sacarosa-uridina difosfato glucosiltransferasa y uridina difosfoglucosa-fructosa glucosil transferasa.

Productos consumibles por vía oral

En otro aspecto, la presente invención está dirigida a un producto consumible por vía oral que comprende una cantidad edulcorante de rebaudiósido D2, seleccionado del grupo que consiste en un producto de bebida y un producto consumible.

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

El producto consumible por vía oral puede tener de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm de rebaudiósido D2.

El rebaudiósido D2 puede ser el único edulcorante del producto consumible por vía oral.

El producto consumible por vía oral también puede tener al menos un edulcorante adicional. El al menos un edulcorante adicional puede ser un edulcorante natural de alta intensidad, por ejemplo. El edulcorante se selecciona de un extracto de estevia, un glucósido de esteviol, esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, dulcósido A, rubusosido, esteviobiosido, sacarosa, jarabe de maíz con elevado contenido de fructosa, fructosa, glucosa, xilosa, arabinosa, ramnosa, eritritol, xilitol, manitol, sorbitol,

inositol, AceK, aspartamo, neotamo, sucralosa, sacarina, dihidrochalcona naringina (NarDHC), neohesperidina dihidrochalcona (NDHC), rubusosido, mogrósido IV, siamenósido I, mogrósido V, monatín, taumatina, monelina, brazeína, L-alanina, glicina, Lo Han Guo, hernandulcina, filodulcina, trilobtain, y combinaciones de los mismos.

5 El producto consumible por vía oral también puede tener al menos un aditivo. El aditivo puede ser, por ejemplo, un hidrato de carbono, un poliol, un aminoácido o sal del mismo, un poli-aminoácido o sal del mismo, un ácido de azúcar o sal del mismo, un nucleótido, un ácido orgánico, un ácido inorgánico, una sal orgánica, una sal de un ácido orgánico, una sal de base orgánica, una sal inorgánica, un compuesto amargo, un aromatizante, un ingrediente saborizante, un compuesto astringente, una proteína, un hidrolizado de proteína, un tensioactivo, un emulsionante, un flavonoide, un alcohol, un polímero y combinaciones de los mismos.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un producto de bebida que comprende una cantidad de edulcorante de rebaudiósido D2.

15 El producto de bebida puede ser, por ejemplo, un producto de bebida carbonatada y un producto de bebida no carbonatada. El producto de bebida también puede ser, por ejemplo, un refresco, una bebida gaseosa, una bebida congelada; una bebida preparada; una bebida congelada lista para beber, café, té, una bebida diaria, un refresco en polvo, un concentrado líquido, agua saborizada, agua enriquecida, zumo de fruta, una bebida enriquecida con zumo de fruta, una bebida deportiva y una bebida energética.

20 En algunas realizaciones, un producto de bebida de la presente descripción puede incluir uno o más ingredientes de bebida como, por ejemplo, acidulantes, zumos de fruta y/o zumos vegetales, pulpa, etc., saborizantes, colorantes, conservantes, vitaminas, minerales, electrolitos, eritritol, tagatosa, glicerina y dióxido de carbono. Estos productos de bebida pueden proveerse en cualquier forma adecuada, como un concentrado de bebida y una bebida carbonatada, bebida lista para beber.

En determinadas realizaciones, los productos de bebida de la presente descripción pueden tener cualquiera de numerosas formulaciones o composiciones específicas diferentes. La formulación de un producto de bebida de la presente descripción puede variar hasta cierto punto, dependiendo de factores como el segmento de mercado destino del producto, sus características nutricionales deseadas, perfil de sabor y similares. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, puede ser, generalmente, una opción para añadir ingredientes adicionales a la formulación de un producto de bebida en particular. Por ejemplo, pueden añadirse edulcorantes adicionales (es decir, más y/u otros), aromatizantes, electrolitos, vitaminas, zumos de fruta u otros productos de fruta, tastents, agentes enmascarantes y similares, potenciadores del sabor, y/o de forma típica la carbonatación puede añadirse a cualquier de tales formulaciones para variar el sabor, sensación en boca, características nutricionales, etc. En las realizaciones, el producto de bebida puede ser un bebida de cola que contenga agua, aproximadamente entre 5 ppm y aproximadamente 100 ppm de rebaudiósido D2, un acidulante, y saborizante. Los saborizantes ilustrativos pueden ser, por ejemplo, saborizantes de cola, saborizantes cítricos y saborizantes de especias. En algunas realizaciones, la carbonatación en forma de dióxido de carbono puede añadirse para la efervescencia. En otras realizaciones, pueden añadirse conservantes, dependiendo de los otros ingredientes, técnica de producción, vida útil deseada, etc. En determinadas realizaciones, se puede añadir cafeína. En algunas realizaciones, el producto de bebida puede ser una bebida carbonatada con sabor a cola, típicamente, que contiene agua carbonatada, edulcorante, extracto de nuez de cola y/u otro saborizante, colorantes de caramelo, uno o más ácidos y, opcionalmente, otros ingredientes.

Las cantidades adecuadas de rebaudiósido D2 presentes en el producto de bebida pueden ser, por ejemplo, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm. En algunas realizaciones, concentraciones bajas de rebaudiósido D2, por ejemplo, menos de 100 ppm, y tiene un dulzor equivalente a las soluciones de sacarosa que tienen concentraciones de entre 10.000 ppm y 30.000 ppm. La concentración final que oscila de entre aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 95 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 90 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 85 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 80 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 75 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 70 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 65 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 60 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 55 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 50 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 45 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 40 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 35 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 30 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 25 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 20 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 15 ppm, o de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 10 ppm. De forma alternativa, el rebaudiósido D2 puede estar presente en los productos de bebida de la presente descripción en una concentración final que oscila entre de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 15 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 25 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 30 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 35 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 45 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 55 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 60 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 65 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 70 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente

75 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 80 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 85 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 90 ppm a aproximadamente 100 ppm, o de aproximadamente 95 ppm a aproximadamente 100 ppm.

5 En otro aspecto, la presente descripción se dirige a un consumible que comprende una cantidad de edulcorante de rebaudiósido D2. Un producto consumible por vía oral puede ser, por ejemplo, un producto alimenticio, un nutracéutico, un producto farmacéutico, un suplemento dietético, una composición higiénica dental, una composición de gel comestible, un producto cosmético y un saborizante de mesa.

10 Como se usa en la presente descripción, “suplemento(s) dietético(s)” se refiere a compuestos previstos para suplementar la dieta y proporcionar nutrientes, tales como vitaminas, minerales, fibra, ácidos grasos, aminoácidos, etc. que puedan no estar presentes o no puedan consumirse en cantidades suficientes en una dieta. Puede utilizarse cualquier suplemento alimenticio adecuado conocido en la técnica. Ejemplos de suplementos dietéticos apropiados pueden ser, por ejemplo, nutrientes, vitaminas, minerales, fibras, ácidos grasos, hierbas, productos botánicos, aminoácidos y metabolitos.

15 Como se usa en la presente descripción, “nutracéutico(s)” se refiere a compuestos, que incluyen cualquier alimento o parte de un alimento que pueda proporcionar beneficios medicinales o para la salud (p. ej., fatiga, insomnio, efectos del envejecimiento, pérdida de memoria, trastornos del estado de ánimo, enfermedad cardiovascular y altos niveles de colesterol en la sangre, diabetes, osteoporosis, inflamación, trastornos autoinmunitarios, etc.). Se puede usar cualquier nutracéutico adecuado conocido en la técnica. En algunas realizaciones, los nutracéuticos pueden usarse como suplementos para alimentos y bebidas y como formulaciones farmacéuticas para aplicaciones enterales o parenterales que pueden ser formulaciones sólidas, como cápsulas o pastillas, o formulaciones líquidas, como soluciones o suspensiones.

20 En algunas realizaciones, los suplementos dietéticos y nutracéuticos pueden contener además hidrocoloides protectores (como gomas, proteínas, almidones modificados), aglutinantes, agentes filmógenos, agentes/materiales encapsulantes, materiales de la pared/envoltura, compuestos de matriz, recubrimientos, emulsionantes, agentes tensioactivos, agentes solubilizantes (aceites, grasas, ceras, lecitinas, etc.), adsorbentes, vehículos, rellenos, co-compuestos, agentes dispersantes, agentes humectantes, mejoradores del proceso (disolventes), fluidificantes, agentes enmascarantes del sabor, agentes densificantes, agentes gelificantes, agentes formadores de gel, antioxidantes y agentes antimicrobianos.

25 Como se usa en la presente descripción, un “gel” se refiere a un sistema coloidal en el que una red de partículas abarca el volumen de un medio líquido. Aunque los geles principalmente están compuestos de líquidos y, por lo tanto, presentan densidades similares a los líquidos, los geles tienen la coherencia estructural de los sólidos, debido a la red de partículas que abarca el medio líquido. Por esta razón, los geles generalmente parecen ser materiales sólidos de tipo gelatina. Los geles pueden usarse en una variedad de aplicaciones. Por ejemplo, los geles pueden utilizarse en alimentos, pinturas y adhesivos. Los geles que se pueden comer reciben el nombre de “composiciones de gel comestibles”. Las composiciones de gel comestibles, por lo general, se consumen como aperitivos, como postres, como parte de alimentos básicos, o junto con alimentos básicos. Los ejemplos de composiciones de gel comestibles adecuados pueden ser, por ejemplo, postres de gel, pudíns, mermeladas, jaleas, pastas, bizcochos de frutas y crema, gelatinas, nubes, gominolas y similares. En algunas realizaciones, las mezclas de gel comestibles, generalmente, son sólidos en polvo o granulados a los que se puede añadir un líquido para formar una composición de gel comestible. Los ejemplos de líquidos adecuados pueden ser, por ejemplo, agua, líquidos lácteos, líquidos de análogos de lácteos, zumos, alcohol, bebidas alcohólicas, y combinaciones de estos. Los ejemplos de líquidos lácteos adecuados pueden ser, por ejemplo, leche, leche fermentada, crema, suero de leche, y mezclas de éstos. Los ejemplos de líquidos análogos de lácteos adecuados pueden ser, por ejemplo, leche de soja y blanqueadores no lácteos de café.

35 Como se usa en la presente descripción, el término “ingrediente gelificante” se refiere a cualquier material que pueda formar un sistema coloidal dentro de un medio líquido. Los ejemplos de ingredientes gelificantes adecuados pueden ser, por ejemplo, gelatina, alginato, carragenina, goma, pectina, konjac, agar, ácido alimentario, cuajo, almidón, derivados de almidón y combinaciones de los mismos. Es bien conocido en la técnica que la cantidad de ingrediente gelificante utilizada en una mezcla de gel comestible, o una composición de gel comestible, puede variar considerablemente dependiendo de un número de factores, tales como, por ejemplo, el ingrediente gelificante particular utilizado, la base de líquido particular utilizada y las propiedades deseadas del gel.

40 Las mezclas de gel y las composiciones de gel de la presente descripción pueden prepararse por cualquier método adecuado conocido en la técnica. En algunas realizaciones, las mezclas comestibles de gel, y las composiciones comestibles de gel de la presente descripción, se pueden preparar con otros ingredientes, además de rebaudiósido D2 y el agente gelificante. Ejemplos de otros ingredientes adecuados pueden ser, por ejemplo, un ácido alimentario, una sal de un ácido alimentario, un sistema tamponador, un espesante, un agente secuestrante, un agente de reticulación, uno o más sabores, uno o más colores, y combinaciones de los mismos.

45 Se puede utilizar cualquier composición farmacéutica adecuada conocida en la técnica. En determinadas realizaciones, una composición farmacéutica de la presente descripción puede contener de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm de rebaudiósido D2, y uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden usarse para formular fármacos que

contengan uno o más principios activos que ejerzan un efecto biológico. Por tanto, en algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden contener uno o más principios activos que ejerzan un efecto biológico. Los principios activos adecuados son bien conocidos en la técnica (p. ej., The Physician's Desk Reference). Dichas composiciones se pueden preparar según procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., EE. UU.

El rebaudiósido D2 se puede utilizar con cualquier composición dental y de higiene oral adecuada conocida en la técnica. Ejemplos de composiciones para la higiene bucodental adecuadas pueden ser, por ejemplo, pastas dentales, pulidores dentales, hilo dental, enjuagues bucales, colutorios, dentífricos, esprays bucales, refrescantes bucales, enjuagues contra la placa, analgésicos dentales y similares.

Las cantidades adecuadas de rebaudiósido D2 presentes en el consumible pueden ser, por ejemplo, de aproximadamente 5 partes por millón (ppm) a aproximadamente 100 partes por millón (ppm). En algunas realizaciones, concentraciones bajas de rebaudiósido D2, por ejemplo, menores de 100 ppm, tiene un dulzor equivalente a la solución de sacarosa que tiene concentraciones de entre 10.000 ppm a 30.000 ppm. La concentración final que oscila de entre aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 95 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 90 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 85 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 80 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 75 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 70 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 65 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 60 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 55 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 50 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 45 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 40 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 35 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 30 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 25 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 20 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 15 ppm, o de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 10 ppm. De forma alternativa, el rebaudiósido D2 puede estar presente en productos de consumo de la presente descripción en una concentración final que oscila de entre aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 15 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 25 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 30 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 35 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 45 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 55 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 60 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 65 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 70 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 75 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 80 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 85 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 90 ppm a aproximadamente 100 ppm, o de aproximadamente 95 ppm a aproximadamente 100 ppm.

En determinadas realizaciones, entre aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm de rebaudiósido D2 está presente en las composiciones de productos alimenticios. Como se usa en la presente descripción, "composición o composiciones de producto alimenticio" se refiere a cualquier materia sólida o líquida ingerible que pueda, pero no necesariamente, tener un valor nutricional y estar prevista para consumo humano y animal.

Los ejemplos de composiciones de productos alimenticios adecuados pueden ser, por ejemplo, composiciones de repostería, tales como caramelos, caramelos de menta, caramelos con sabor a fruta, productos de cacao, chocolates y similares; condimentos, tales como ketchup, mostaza, mayonesa y similares; chicles; composiciones de cereales; productos horneados, tales como panes, tartas, pasteles, galletas y similares; productos lácteos, tales como leche, queso, nata, helado, crema agria, yogur, sorbete y similares; composiciones de edulcorantes de mesa; sopas; estofados; alimentos preparados; carnes, tales como jamón, tocino, salchichas, cecina y similares; gelatinas y productos similares a la gelatina, como mermeladas, jaleas, conservas y similares; frutas; verduras; productos de huevo; glaseados; siropes, incluida la melaza; aperitivos; carnes de nuez y productos de nuez; y pienso animal.

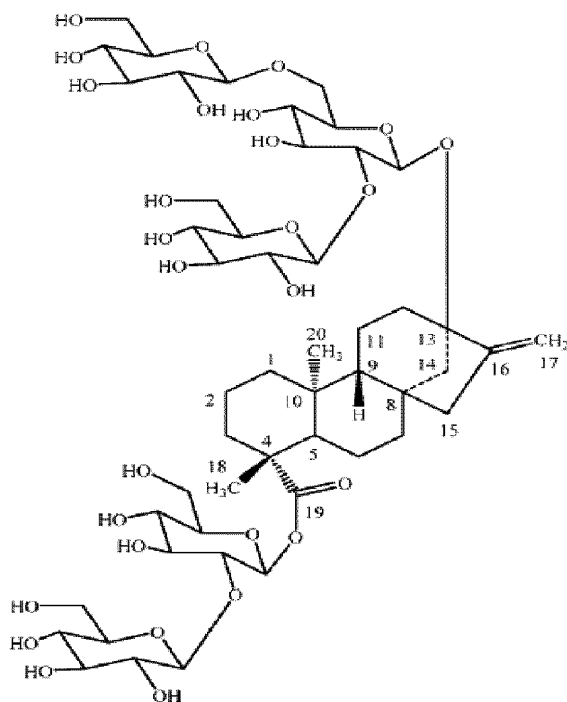
Las composiciones de productos alimenticios también pueden ser hierbas, especias y condimentos, sabores naturales y sintéticos, y potenciadores del sabor, como el glutamato monosódico. En algunas realizaciones, las composiciones de productos alimenticios pueden ser, por ejemplo, productos envasados preparados, tal como edulcorantes dietéticos, edulcorantes líquidos, mezclas de saborizantes granulados, alimentos para mascotas, alimento para ganado, tabaco, y materiales para aplicaciones de horneado, como mezclas con levadura en polvo para la preparación de panes, galletas, tartas, tortitas, donuts y similares. En otras realizaciones, las composiciones de productos alimenticios también pueden ser alimentos y bebidas de dieta y bajas en calorías que contienen poca o nada de sacarosa.

En determinadas realizaciones, que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el rebaudiósido D2 es el único edulcorante, y el producto tiene una intensidad de dulzor equivalente de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 4 % (p/v-%) de solución de sacarosa. En determinadas realizaciones, que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, los productos consumibles y los productos de bebida pueden incluir, además, un edulcorante adicional, donde el producto tiene una intensidad de dulzor equivalente de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 10 % (p/v-%) de solución de sacarosa. En determinadas realizaciones, que pueden combinarse con

cualquiera de las realizaciones anteriores, cada ingrediente edulcorante en el producto es un edulcorante de alta intensidad. En determinadas realizaciones, que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, cada ingrediente edulcorante en el producto es un edulcorante natural de alta intensidad. En determinadas realizaciones, que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el edulcorante adicional contiene uno o más edulcorantes seleccionados de extracto de estevia, un glucósido de estevia, esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido F, dulcósido A, rubusosido, esteviolbiosido, sacarosa, jarabe de maíz con elevado contenido de fructosa, fructosa, glucosa, xilosa, arabinosa, ramnosa, eritritol, xilitol, manitol, sorbitol, inositol, AceK, aspartamo, neotamo, sucralosa, sacarina, dihidrochalcona naringina (NarDHC), neohesperidina dihidrochalcona (NDHC), rubusosido, mogrósido IV, siamenósido I, mogrósido V, monatín, taumatina, monelina, brazeína, L-alanina, glicina, Lo Han Guo, hernandulcina, filodulcina, trilobtain y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el producto de bebida y producto consumible incluye además uno o más aditivos seleccionados de un hidrato de carbono, un poliol, un aminoácido o sal del mismo, un poli-aminoácido o sal del mismo, un ácido de azúcar o sal del mismo, un nucleótido, un ácido orgánico, un ácido inorgánico, una sal orgánica, una sal de un ácido orgánico, una sal de base orgánica, una sal inorgánica, un compuesto amargo, un aromatizante, un ingrediente saborizante, un compuesto astringente, una proteína, un hidrolizado de proteína, un tensioactivo, un emulsionante, un flavonoide, un alcohol, un polímero y combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, que pueden combinarse con cualquiera de las realizaciones anteriores, el rebaudiósido D2 tiene una pureza de aproximadamente un 50 % a aproximadamente un 100 % en peso antes de que se añada al producto.

20 Edulcorante

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un edulcorante que consiste en una estructura química:



25 El edulcorante puede incluir además al menos uno de un rellenedor, un espesante y un antiapelmazante. Los rellenedores, espesantes y antiapelmazantes adecuados son conocidos en la técnica.

30 En determinadas realizaciones, el edulcorante rebaudiósido D2 puede incluirse y/o añadirse a una concentración final que es suficiente para endulzar y/o mejorar el dulzor de los productos consumibles y productos de bebida. La "concentración final" de rebaudiósido D2 se refiere a la concentración de rebaudiósido D2 presente en los productos consumibles y productos de bebida finales (es decir, después de que se añadan todos los ingredientes y/o compuestos para producir los productos consumibles y productos de bebida). En consecuencia, en otras realizaciones, el rebaudiósido D2 se incluye y/o se añade a un compuesto o ingrediente que se usa para preparar los productos consumibles y productos de bebida. El rebaudiósido D2 puede estar presente en un único compuesto o ingrediente, o en múltiples compuestos e ingredientes. En otros modos de realización, rebaudiósido D2 está incluido o se añade a los productos consumibles y productos de bebida. En determinadas realizaciones preferidas, el rebaudiósido D2 se incluye o se añade a una concentración final que oscila de entre aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 95 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 90 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 85 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 80 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 75 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 70 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 65 ppm, de

aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 60 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 55 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 50 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 45 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 40 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 35 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 30 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 25 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 20 ppm, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 15 ppm, o de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 10 ppm. De forma alternativa, el rebaudiósido D2 se incluye y/o se añade a una concentración final que oscila de entre aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 15 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 25 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 30 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 35 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 45 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 55 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 60 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 65 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 70 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 75 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 80 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 85 ppm a aproximadamente 100 ppm, de aproximadamente 90 ppm a aproximadamente 100 ppm, o de aproximadamente 95 ppm a aproximadamente 100 ppm. Por ejemplo, el rebaudiósido D2 puede incluirse y/o añadirse a una concentración final de aproximadamente 5 ppm, aproximadamente 10 ppm, aproximadamente 15 ppm, aproximadamente 20 ppm, aproximadamente 25 ppm, aproximadamente 30 ppm, aproximadamente 35 ppm, aproximadamente 40 ppm, aproximadamente 45 ppm, aproximadamente 50 ppm, aproximadamente 55 ppm, aproximadamente 60 ppm, aproximadamente 65 ppm, aproximadamente 70 ppm, aproximadamente 75 ppm, aproximadamente 80 ppm, aproximadamente 85 ppm, aproximadamente 90 ppm, aproximadamente 95 ppm, o aproximadamente 100 ppm, incluido cualquier intervalo entre estos valores.

En determinadas realizaciones, el rebaudiósido D2 es el único edulcorante incluido y/o añadido a los productos consumibles y los productos de bebida. En tales realizaciones, los productos consumibles y los productos de bebida tienen una intensidad de dulzor equivalente de aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 4 % (p/v-%) de solución de sacarosa, aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 3 % (p/v-%) de solución de sacarosa, o aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 2 % (p/v-%) de solución de sacarosa. Alternativamente, los productos consumibles y los productos de bebida tienen una intensidad de dulzor equivalente a aproximadamente un 1 % a aproximadamente un 4 % (p/v-%) de solución de sacarosa, aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 4 % (p/v-%) de solución de sacarosa, o aproximadamente un 3 % a aproximadamente un 4 % (p/v-%) de solución de sacarosa, o aproximadamente un 4 %. Por ejemplo, los productos consumibles y los productos de bebida pueden tener una intensidad de dulzor equivalente a aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, o aproximadamente 4 % (p/v-%) de solución de sacarosa, que incluye cualquier intervalo entre estos valores.

Los productos consumibles y los productos de bebida de la presente descripción pueden incluir una mezcla de rebaudiósido D2 y uno o más edulcorantes de la presente descripción en una relación suficiente para conseguir una intensidad de dulzor deseable, característica nutricional, perfil de sabor, sensación en boca u otro factor organoléptico.

La descripción se comprenderá con mayor facilidad considerando los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

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

Específicamente, los ADNc se optimizaron con codones para la expresión de *E. coli* (Genscript, Piscataway, NJ). El ADN sintetizado se clonó en un vector de expresión bacteriano pETite N-His SUMO Kan Vector (Lucigen). Para la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima de fusión UDP-glucosiltransferasa (EUS) (véase, la sec. con núm. de ident.: 6), un enlace GSG (codificado por la secuencia de nucleótidos: gggtctggt) se insertó en marco entre una secuencia de nucleótida que codifica el dominio *Oryza sativa* uridina difosfo glucosiltransferasa (EUGT11) (véase, la sec. con núm. de ident.: 2) y la secuencia de nucleótida que codifica el dominio *A. thaliana* sacarosa sintasa 1 (AtSUS1) (véase, la sec. con núm. de ident.: 4). En la Tabla 2 se resume la proteína y los números de identificador de secuencia.

Tabla 2. Números de identificación de secuencia.

Nombre	Sec. con núm. de ident.	Descripción
EUGT11	Sec. con núm. de ident.:1	Aminoácido
EUGT11	Sec. con núm. de ident.:2	Ácido nucleico
AtSUS1	Sec. con núm. de ident.:3	Aminoácido
AtSUS1	Sec. con núm. de ident.:4	Ácido nucleico
Enzima de fusión EUS	Sec. con núm. de ident.:5	Aminoácido
Enzima de fusión EUS	Sec. con núm. de ident.:6	Ácido nucleico

Cada constructo de expresión se transformó en *E. coli* BL21 (DE3), que posteriormente se cultivó en un medio LB que contenía 50 µg/ml de kanamicina a 37 °C hasta alcanzar un OD₆₀₀ de 0,8-1,0. La expresión de las proteínas se indujo por adición de isopropilo β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM y el cultivo además se cultivó durante 22 h a 16 °C. Las células se cosecharon por centrifugación (3.000 xg; 10 min; 4 °C). Los gránulos celulares se recogieron y se usaron inmediatamente o se guardaron a -80 °C.

Los gránulos celulares se volvieron a suspender en tampón de lisis (tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 7,2, 25 µg/ml de lisozima, 5 µg/ml de DNasa I, imidazol 20 mM, NaCl 500 mM, glicerol al 10 %, y TRITON al 0,4 % X-100). Se rompieron las células por ultrasonido a 4 °C, y los residuos celulares se clarificaron por centrifugado (18.000 xg; 30 min). El sobrenadante se cargó a una equilibrada (tampón de equilibrio: tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 7,2, imidazol 20 mM, NaCl 500 mM, glicerol al 10 %) Ni-NTA (Qiagen) columna de afinidad. Después de cargar la muestra de proteína, la columna se lavó con tampón de equilibrado para eliminar proteínas contaminantes no unidas. Los polipéptidos recombinantes UGT etiquetados con His se eluyeron mediante tampón de equilibrado que contenía imidazol 250 mM. Tras la purificación, la proteína recombinante EUGT11 (banda 62 kD indicada por la flecha en la FIG. 2A) y la enzima de fusión EUS (banda 115 kD indicada por la flecha en la FIG. 2B) se analizaron mediante SDS-PAGE. Los estándares de peso molecular se indican a la izquierda de cada imagen de gel SDS.

Ejemplo 2

En este ejemplo, la proteína recombinante EUGT11 y la enzima de fusión EUS recombinante se ensayaron para la actividad de glucosilación de 1,2-19 O-glucosa utilizando rebaudiósido A como sustrato de glucósido de esteviol.

Los polipéptidos recombinantes (10 µg) se analizaron en un sistema de reacción *in vitro* de 200 µl. El sistema de reacción contenía tampón fosfato de potasio 50 mM, pH 7,2, MgCl₂ 3 mM, 1 mg/ml de sustrato de glucósido de esteviol y UDP-glucosa 1 mM. La reacción se lleva a cabo a 30 °C y se termina añadiendo 200 µl de 1-butanol. Las muestras se extrajeron tres veces con 200 µl de 1-butanol. La fracción combinada se secó y se disolvió en 70 µl de metanol al 80 % para un análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Se utilizó rebaudiósido A (pureza del 99 %) como sustrato. Se obtuvo rebaudiósido A se obtuvo de Blue California (Rancho Santa Margarita, CA). Se llevaron a cabo reacciones *in vitro* durante 14 horas y 24 horas. La FIG. 3A muestra el pico para rebaudiósido D (etiquetado “Reb D”) para comparación.

La reacción de glucosilación catalizada por UGT se acopló a una reacción de generación de UDP-glucosa (referida en la presente descripción como “sistema de acoplamiento UGT-SUS”) catalizados por una sacarosa sintasa (p. ej., AtSUS1). Específicamente, la secuencia de la sacarosa sintasa I de *Arabidopsis thaliana* (AtSUS1) (Bieniawska y cols., Plant J. 2007, 49: 810-828) se sintetizó y se insertó en un vector de expresión bacteriana. La proteína recombinante AtSUS 1 se expresó y se purificó mediante cromatografía de afinidad. La proteína AtSUS 1 se añadió a la proteína EUGT11 para formar una mezcla de reacción *in vitro* denominada en la presente descripción como el sistema de acoplamiento EUGT11-AtSUS1. En el sistema de acoplamiento resultante UGT-SUS (p. ej., EUGT11-AtSUS1) se generó UDP-glucosa de sacarosa y UDP, de tal forma que se omitió la adición de una UDP-glucosa adicional.

El análisis por HPLC se llevó a cabo usando un sistema Dionex UPLC ultimate 3000 (Sunnyvale, CA), que incluye una bomba cuaternaria, un compartimiento de columna controlada por temperatura, un automuestreador y un detector de absorbancia UV. Se utilizó un Phenomenex Luna NH2 con columna de protección, de 150 mm x 3,0 mm, 3 µm (100 A) para caracterizar los glucósidos de esteviol. Se usó acetonitrilo al 72 % en agua para la elución isocrática en análisis por HPCL.

Como se muestra en la FIG. 3, EUS y EUGT11 se transfirió una fracción de azúcar a rebaudiósido A para producir rebaudiósido D en todas las condiciones de reacción. El rebaudiósido A se convirtió totalmente en rebaudiósido D mediante la enzima de fusión EUS (FIGS. 3B y 3E) y el sistema de reacción de acoplamiento UGT-SUS (es decir, EUGT11-AtSUS1) (FIGS. 5D y 5G) a tiempos de incubación de 14 horas y 24 horas. Sin embargo, el rebaudiósido A solo se convirtió parcialmente en rebaudiósido D a las 14 horas (FIG. 3C) y a las 24 horas (FIG. 3F) por la enzima EUGT11 solo. Además, la misma cantidad de molécula de EUS presentaba una mayor cantidad de actividad enzimática que la EUGT11 y convirtió todo el rebaudiósido A en rebaudiósido D a tiempos de incubación de 14 horas (FIG. 3B) y 24 horas (FIG. 3E). Estos resultados demuestran que la reacción del sistema de acoplamiento UGT-SUS (es decir, EUGT11-AtSUS 1) se podía conseguir usando la enzima de fusión EUS. De forma adicional, estos resultados demostraron que EUGT 11 mostraba una actividad de glucosilación de 1,2-19 O-glucosa para producir rebaudiósido D de rebaudiósido A (FIGS. 3C y 3F) y que AtSUS1 mejoró la eficiencia de la conversión por la EUGT11 en el sistema de acoplamiento UGT-SUS (FIGS. 3B, 3D, 3E y 3G). La FIG. 3A muestra picos para esteviósido (etiquetado “Ste”), rebaudiósido A (etiquetado “Reb A”) y rebaudiósido D (etiquetado “Reb D”) para comparación.

Ejemplo 3

En este ejemplo, EUGT11 y EUS se ensayaron para la actividad de glucosilación de 1,2-19 O-glucosa utilizando esteviósido como el sustrato de glucósido de esteviol a tiempos de incubación de 14 horas y 24 horas, como se describe en el Ejemplo 2.

Además de la conversión de rebaudiósido A a rebaudiósido D por EUGT 11, como se describe en el Ejemplo 2 anterior, EUGT11 también convirtió el esteviósido en rebaudiósido E (etiquetado “Reb E” en la FIG. 4). Sorprendentemente, un compuesto inesperado, rebaudiósido D2 (etiquetado como “Reb D2” en la FIG. 4), que tiene un tiempo de retención de HPLC de aproximadamente 7,28 minutos, se produjo tanto por EUGT11 como por EUS en todas las reacciones. Cuando se añadió AtSUS 1, se añadió a la mezcla de reacción de EUGT11 para crear el sistema de acoplamiento UGT-SUS (FIGS. 4D y 4G) y cuando se utilizó EUS (FIGS. 4B y 4E), se produjo más rebaudiósido D2. Junto con el aumento de la producción de rebaudiósido D2, el rebaudiósido E (etiquetado “Reb E” en las FIGS. 4C y 4F) que se produjo, se consumió durante la producción del rebaudiósido D2. Estos resultados indican que EUGT11 puede catalizar la reacción para producir un rebaudiósido (rebaudiósido D2) de rebaudiósido E. La FIG. 4A muestra picos para esteviósido (etiquetado “Ste”), rebaudiósido A (etiquetado “Reb A”) y rebaudiósido D (etiquetado “Reb D”) para comparación.

Ejemplo 4

En este ejemplo, para confirmar la conversión de rebaudiósido E a rebaudiósido D2 *in vitro*, se ensayaron EUGT11 y EUS usando rebaudiósido E como sustrato de glucósido de esteviol como se describe en el Ejemplo 2.

Por comparación, las actividades enzimáticas de otra UGT (UGT76G1) también se ensayaron. La UGT76G1, de estevia, se ha identificado como una enzima que transfiere un residuo de azúcar a C-3' del C13 O-glucosa de esteviósido para formar rebaudiósido A. Como se muestra en las FIGS. 5F y 5J, cuando se usó UGT76G1 en el sistema de acoplamiento de UGT-SUS, se transfirió un residuo de azúcar al C-3' del C13 O-glucosa de rebaudiósido E para formar rebaudiósido D. Las FIGS. 5A y 5B muestran rebaudiósido D (“Reb D”) purificado y rebaudiósido E (“Reb-E”) para comparación.

Como se ha descrito en el Ejemplo 3 anteriormente, y se muestra en las FIGS. 5C y 5G. EUGT11 solo podría transferir una molécula de glucosa a rebaudiósido E para formar un rebaudiósido (denominado en la presente descripción “rebaudiósido D2” y etiquetado como “Reb D2” en las FIGS. 5C y 5G) que es distinto de los rebaudiósidos D y E (comparar los picos en las FIGS. 5A y 5B, respectivamente). EUGT11 en el sistema de acoplamiento UGT-SUS (FIGS. 5D y 5H) y EUS (FIGS. 5E y 5I) mejoraron la conversión de rebaudiósido E a rebaudiósido D2.

Estos resultados demuestran que EUGT11 es una UGT con actividad de glucosilación de 1,2-19 O-glucosa para producir glucósidos de esteviol relacionados. EUGT11 puede catalizar la reacción para producir Reb-E de esteviósido como sustrato y Reb D de Reb A como sustrato. Sorprendentemente, se sintetizó inesperadamente un compuesto (Reb D2) en la reacción *in vitro* con esteviósido como sustrato. Otros experimentos confirmaron que Reb D2 se sintetizó directamente a partir de Reb E. Según la estructura de Reb D2 en la reacción *in vitro*, EUGT11 transfirió una D-glucosa al C-6' de C13 O-glucosa de Reb E para generar un enlace 1,6-β-glucosídico.

Ejemplo 5

En este ejemplo, el rebaudiósido (rebaudiósido D2) se purificó a partir de una reacción *in vitro* ampliada y se preparó para análisis por cromatografía líquida/espectrometría de masas (LC/MS) y de resonancia magnética nuclear (RMN).

El rebaudiósido (rebaudiósido D2) se purificó a partir de una reacción *in vitro* ampliada. La reacción *in vitro* se monitorizó mediante análisis por HPLC. En el momento deseado, el compuesto Reb D2 se purificó mediante columna y se concentró mediante secado al vacío. El Reb D2 purificado era polvo blanco con una pureza del 95 %. El compuesto Reb D2 recogido se usó para análisis por espectro de masas de alta resolución (HRMS). Los datos del HRMS se generaron con un instrumento LTQ Orbitrap Discovery HRMS, con su resolución fijada a 30 K y los datos se escanearon de m/z 150 a 1500 en modo de electropulverización de ion positivo. La tensión de la aguja se ajustó a 4 kV; las condiciones de la otra fuente fueron el gas de protección = 25, gas auxiliar = 0, gas de barrido = 5 (todos los flujos de gas en unidades arbitrarias), tensión capilar = 30 V, temperatura capilar = 300 °C, y tensión de la lente del tubo = 75. La muestra se diluyó con 2:2:1 de acetonitrilo: metanol: agua (lo mismo que el eluyente de infusión) y se inyectaron 50 microlitros de muestra. Se obtuvieron espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) usando un instrumento Bruker Advance DRX 500 MHz o un instrumento Varian INOVA 600 MHz utilizando secuencias de impulsos estándar. Los espectros de RMN 1D (^1H y ^{13}C) y 2D (TOCSY, HMQC y HMBC) se llevaron a cabo en piridina- d_5 (también conocida como $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).

La fórmula molecular de Reb D2 se dedujo que era $\text{C}_{50}\text{H}_{80}\text{O}_{28}$ sobre la base de su espectro de masas de alta resolución positivo (HRMS) que mostró iones aductos correspondientes a $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ y $[\text{M} + \text{Na}]^+$ en m/z 1146,5169 y 1151,4721, respectivamente; esta composición está apoyada por los datos del espectro de ^{13}C RMN. Los datos del espectro de ^1H RMN de Reb D2 mostraron la presencia de dos singuletes de metilo a δ 1,10 y 1,44, dos protones olefínicos como singuletes a δ 5,09 y 5,72 de un doble enlace exocíclico, nueve protones sp^3 metileno y sp^3 metino entre δ 0,74-2,80, que es característica de los diterpenoides *ent*-kaurano del género *Estevia*.

El esqueleto básico de los diterpenoides *ent*-kaurano estaba avalado por los estudios de TOCSY que mostraron correlaciones fundamentales: H-1/H-2; H-2/H-3; H-5/H-6; H-6/H-7; H-9/H-11; H-11/H-12. El espectro de ^1H RMN de Reb D2 también mostró la presencia de protones anoméricos que resuenan a δ 5,04, 5,10, 5,21, 5,48 y 6,30;

5 sugiriendo cinco unidades de azúcar en su estructura. La hidrólisis ácida de Reb D2 con H₂SO₄ al 5 % dio como resultado D-glucosa, que se identificó por comparación directa con una muestra auténtica por TLC. Las grandes constantes de acoplamiento observadas para las cinco protones anoméricos de las fracciones de glucosa a δ 5,04 (d, $J = 7,5$ Hz), 5,10 (d, $J = 7,4$ Hz), 5,21 (d, $J = 7,9$ Hz), 5,48 (d, $J = 7,9$ Hz) y 6,30 (d, $J = 7,9$ Hz), sugirieron su orientación- β como se ha documentado con otros glucósidos de esteviol. Los valores de RMN de ¹H ¹³C para Reb D2 se asignaron sobre la base de los datos de TOCSY, HMQC y HMBC, y se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Valores de RMN de ¹H y ¹³C de Reb D2 y Reb E.

Posición	Reb D2 (1)		Reb E(2)	
	¹ H RMN	¹³ C RMN	¹ H RMN	¹³ C RMN
1	0,74 t (12,8), 1,67 m	41,2	0,73 t (13,3), 1,68 m	41
2	1,48 m, 2,12 m	20,6	1,46 m, 2,13 m	20,6
3	1,13 m, 2,80 d (12,8)	38,4	1,12 m, 2,78 d (12,8)	38,2
4	--	44,9	--	44,8
5	0,98 d (11,8)	58,1	0,97 d (11,8)	38,2
6	1,87 m, 2,10 m	22,6	1,85 m, 2,09 m	22,6
7	1,28 m, 1,64 m	42,2	1,27 m, 1,63 m	42,1
8	--	43,3	--	43
9	0,88 d, (7,5)	54,5	0,88 br s	54,5
10	--	40,3	--	40,2
11	1,66 m	21,2	1,65 m	21,1
12	1,91 m, 2,22 m	38,2	1,96 m, 2,16 m	37,8
13	--	86,8	--	86,6
14	1,69 d, (11,4), 2,49 d, (11,0)	44,9	1,74 d, (11,4), 2,54 d, (11,0)	44,8
15	2,04 m, 2,16 m	48,6	2,04 m, 2,12 m	48,5
16	--	155	--	154,9
17	5,09 s, 5,72 s	105,4	5,09 s, 5,76 s	105,4
18	1,44 s	29,9	1,43 s	29,8
19	--	176,3	--	176,2
20	1,10 s	17,3	1,10 s	17,2
1'	6,30 d (7,9)	93,9	6,30 d (7,9)	93,9
2'	4,38 m	81,5	4,38 m	81,7
3'	4,27 m	78,5	4,26 m	78,4
4'	4,24 m	72	4,22 m	72,1
5'	3,94 m	79,6	3,92 m	79,5
6'	4,33 m, 4,43 m	62,7	4,33 m, 4,43 m	62,6
1''	5,10 d (7,4)	98,3	5,16 d (7,5)	98,4
2''	4,18 m	84,8	4,17 m	84,9
3''	4,29 m	78,6	4,32 m	78,5
4''	4,20 m	71,3	4,22 m	71,8
5''	3,78 m	78,5	3,72 m	78,2
6''	4,32 m, 4,57 m	69,8	4,26 m, 4,35 m	62,9
1'''	5,21 d (7,9)	107,2	5,32 d (7,5)	107,2
2'''	4,14 t (8,4)	77,6	4,15 t (8,4)	77,7
3'''	4,25 m	78,7	4,26 m	78,6
4'''	4,34 m	72,4	4,36 m	72,3
5'''	3,94 m	79,1	3,96 m	79
6'''	4,43 m, 4,53 m	63,3	4,46 m, 4,56 m	63,2
1''''	5,48 d (7,9)	106,2	5,48 d (7,9)	106,2
2''''	4,04 t (7,9)	76,8	4,06 t (7,9)	76,8
3''''	4,22 m	78,8	4,25 m	78,7
4''''	4,32 m	71,2	4,31 m	71,2
5''''	3,99 m	79,1	4,02 m	79,1
6''''	4,38 m, 4,55 m	63,5	4,42 m, 4,54 m	63,4

1 ^{""}	5,04 d (7,5)	105,9		
2 ^{""}	4,02 m	77		
3 ^{""}	4,21 m	78,6		
4 ^{""}	4,25 m	72,2		
5 ^{""}	3,96 m	79,1		
6 ^{""}	4,34 m, 4,48 m	63,3		

Sobre la base de los amplios datos de 1D (¹H y ¹³C), 2D RMN (TOCSY, HMQC y HMBC) y de espectro de masas de alta resolución (HRMS), se identificó la estructura de Reb D2 y se comparó con la estructura de rebaudiósido E (véase, FIG. 6).

5

Sobre la base de los resultados de los datos de espectros de RMN y los experimentos de hidrólisis de Reb D2 se llegó a la conclusión de que había cinco unidades de β-D-glucosilo en su estructura conectadas a la aglicona esteviol. Una estrecha comparación de los valores de ¹H y ¹³C RMN de Reb D2 con rebaudiósido E (véase, Tabla 2) sugería la presencia de una fracción de aglicona esteviol con una unidad de 2-O-β-D-glucobiosil en la posición C13 en la forma de un enlace tipo éter y otra unidad de 2-O-β-D-glucobiosil en la posición C19 en forma de un enlace de tipo éster, dejando la asignación de la unidad adicional de β-D-glucosilo. Además, con los datos del espectro de ¹³C RMN de Reb D2 que mostró que uno de los cinco carbonos de oximetina de fracciones de azúcar aparecía campo abajo a δ 69,8, sugería la colocación de la unidad adicional de β-D-glucosilo en esta posición. Los datos del espectro de protones y de carbono idénticos para los dos azúcares I y IV en Reb D2 y Reb E sugerían la colocación de la unidad adicional de β-D-glucosil en la posición-6 del azúcar II o del azúcar III. El desplazamiento campo abajo de los desplazamientos químicos ¹H y ¹³C en la posición-6 del azúcar II de la fracción de β-D-glucosil sugería que la unidad adicional de β-D-glucosil estaba unida a esta posición. La estructura fue apoyada además por las correlaciones claves TOCSY y HMBC, como se muestra en la FIG. 7.

10

15

20

Basándose en los resultados de RMN y de espectro de masas, así como los estudios de hidrólisis, la estructura de Reb D2 producida por la conversión enzimática de rebaudiósido E se dedujo como 13-[(2-O-β-D-glucopiranosil-6-O-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil)oxi] *ent*-kaur-16-en-19-oico ácido-(2-O-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil) éster.

25

13-[(2-O-β-D-glucopiranosil-6-O-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil)oxi] *ent*-kaur-16-en-19-oico ácido-(2-O-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil) éster (Reb D2). Polvo blanco; Datos espectroscópicos de ¹H-RMN (600 MHz, C₅D₅N, δ ppm) y ¹³C-RMN (150 MHz, C₅D₅N, δ ppm), véase la Tabla 2; HRMS (M+NH₄)⁺ *m/z* 1146,5169 (calculado para C₅₀H₈₄O₂₈N: 1146,5180), (M+Na)⁺ *m/z* 1151,4721 (calculado para C₅₀H₈₀O₂₈Na: 1151,4734).

30

A una solución de Reb D2 (5 mg) en MeOH (10 ml) se añadieron 3 ml de H₂SO₄ al 5 % y la mezcla se sometió a reflujo durante 24 horas. Después, la mezcla de reacción se neutralizó con carbonato de sodio saturado, y se extrajo con acetato de etilo (EtOAc) (2 x 25 ml) para obtener una fracción acuosa que contuviera azúcares y una fracción de EtOAc que contuviera la parte de aglicona. La fase acuosa se concentró y en comparación con azúcares estándar utilizando los sistemas de TLC EtOAc/*n*-butanol/agua (2:7:1) y CH₂Cl₂/MeOH/agua (10:6:1); el azúcar se identificó como D-glucosa.

35

La estructura de Reb D2 se confirmó como 13-[(2-O-β-D-glucopiranosil-6-O-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil)oxi] *ent*-kaur-16-en-19-oico ácido-(2-O-β-D-glucopiranosil-β-D-glucopiranosil) éster sobre la base de amplias 1D (¹H y ¹³C), y 2D RMN (TOCSY, HMQC y HMBC), así como los datos de espectros de masas de alta resolución y estudios de hidrólisis.

Ejemplo 6

40

En este ejemplo, la estructura del rebaudiósido (rebaudiosida D2) se comparó con Reb E y Reb D.

45

De acuerdo con la base de datos de glicósidos de esteviol, solo Reb-D contiene cinco unidades de glucosilo β D en su estructura conectadas al glucósido de esteviol, dos residuos glucosídicos en la posición C19 y tres residuos glicosídicos en la posición C13 del aglicón de esteviol. La UGT76G1 de estevia se ha identificado como una enzima que transfiere un residuo de azúcar a C-3' del C13 O-glucosa de Reb E para formar un rebaudiósido D (véase, FIGS. 5F y 5J). El Reb D2 es un glucósido de esteviol que también contiene cinco residuos de glucósidos D con diferente comparación de estructura a rebaudiósido D (véase, FIG. 8). El quinto residuo glucosídico ("azúcar V") de rebaudiósido D2 está situado en C- 6 ' del C13-O glucosa de Reb E por un enlace 1, 6 β glicosídico, mientras que el quinto residuo glucosídico ("azúcar V") de rebaudiósido D está situado en el C-3' del C13 O-glucosa de Reb E por un enlace 1,3 glucosídico β (véase, FIG. 8). Como se describe en la presente memoria, tanto EUGT 11 como EUG pueden convertir Reb D2 directamente *in vitro*.

50

Ejemplo 7

55

En este ejemplo, se realizó una prueba de sabores de Reb D2.

La evaluación sensorial de Reb D2 se realizó utilizando sacarosa como control. La muestra de sacarosa comprada a Sigma Aldrich y muestras de referencia preparadas a tres diferentes concentraciones de 1,0 %, 3,0 % y 6,0 % de sacarosa en agua embotellada (w/v) a temperatura ambiente. El glucósido de esteviol Reb D1 a 300 ppm y 600 ppm

para la evaluación sensorial se prepara añadiendo la masa correspondiente a 1000 ml de agua embotellada. La mezcla se agitó a temperatura ambiente y la muestra de glucósidos de esteviol se evaluó entonces frente a varias muestras de sacarosa de control al 1,0 %, 3,0 % y 6,0 % por un grupo de nueve voluntarios.

- 5 Los resultados a ciegas mostraron resultados uniformes en la mayoría de nueve voluntarios a dos concentraciones diferentes (300 ppm y 600 ppm) de Reb D2; los promedios de equivalencia de dulzor (ED) de % global fueron aproximadamente 2,4 y 5,4, respectivamente. El resultado indica que rebaudiósido D2 es de aproximadamente 80-90 veces más dulce que la sacarosa.

10 Ejemplo 8

En este ejemplo, la solubilidad de Reb D2 se comparó con Reb D.

- 15 Se añadieron al agua Reb D2 y Reb D para preparar soluciones con 0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 5 mM y 10 mM de Reb D2 y Reb D. El polvo de Reb D2 se disolvió totalmente en agua inmediatamente; no obstante, solo 0,25 mM de Reb D se disolvió totalmente en agua. De forma adicional, las soluciones de Reb D a concentraciones de 0,5 mM, 1 mM, 1,5 mM, 2 mM, 5 mM y 10 mM no se disolvieron cuando se calentaron a 30 °C durante 72 horas.

Estos resultados demuestran que Reb D2 presenta una mayor solubilidad en agua que Reb D.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Conagen, Inc.
Mao, Guohong
Chaturvedula, Venkata Sai Prakash
Yu, Oiver

<120> UN EDULCORANTE NO CALÓRICO

<130> 32559-11

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 462
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 750 373 T3

Asp Arg Arg Leu Glu Arg Ala Glu Thr Glu Ser Pro Ala Ala Ala Gly
 165 170 175
 Gln Gly Arg Pro Ala Ala Ala Pro Thr Phe Glu Val Ala Arg Met Lys
 180 185 190
 Leu Ile Arg Thr Lys Gly Ser Ser Gly Met Ser Leu Ala Glu Arg Phe
 195 200 205
 Ser Leu Thr Leu Ser Arg Ser Ser Leu Val Val Gly Arg Ser Cys Val
 210 215 220
 Glu Phe Glu Pro Glu Thr Val Pro Leu Leu Ser Thr Leu Arg Gly Lys
 225 230 235
 Pro Ile Thr Phe Leu Gly Leu Met Pro Pro Leu His Glu Gly Arg Arg
 245 250 255
 Glu Asp Gly Glu Asp Ala Thr Val Arg Trp Leu Asp Ala Gln Pro Ala
 260 265 270
 Lys Ser Val Val Tyr Val Ala Leu Gly Ser Glu Val Pro Leu Gly Val
 275 280 285
 Glu Lys Val His Glu Leu Ala Leu Gly Leu Glu Leu Ala Gly Thr Arg
 290 295 300
 Phe Leu Trp Ala Leu Arg Lys Pro Thr Gly Val Ser Asp Ala Asp Leu
 305 310 315 320
 Leu Pro Ala Gly Phe Glu Glu Arg Thr Arg Gly Arg Gly Val Val Ala
 325 330 335
 Thr Arg Trp Val Pro Gln Met Ser Ile Leu Ala His Ala Ala Val Gly
 340 345 350
 Ala Phe Leu Thr His Cys Gly Trp Asn Ser Thr Ile Glu Gly Leu Met
 355 360 365
 Phe Gly His Pro Leu Ile Met Leu Pro Ile Phe Gly Asp Gln Gly Pro
 370 375 380
 Asn Ala Arg Leu Ile Glu Ala Lys Asn Ala Gly Leu Gln Val Ala Arg
 385 390 395 400
 Asn Asp Gly Asp Gly Ser Phe Asp Arg Glu Gly Val Ala Ala Ala Ile

ES 2 750 373 T3

aacgatggcg acggttcttt cgaccgtgag ggtgtggctg cggccattcg cgcagtggct 1260
 gttgaagaag aatcatcgaa agtttttcag gcgaaagcca aaaaactgca agaaatcgtc 1320
 gcggatatgg cctgccacga acgctacatt gatggtttca ttcagcaact gcgctcctac 1380
 aaagactaa 1389

<210> 3
 <211> 808
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 3

Met Ala Asn Ala Glu Arg Met Ile Thr Arg Val His Ser Gln Arg Glu
 1 5 10 15
 Arg Leu Asn Glu Thr Leu Val Ser Glu Arg Asn Glu Val Leu Ala Leu
 20 25 30
 Leu Ser Arg Val Glu Ala Lys Gly Lys Gly Ile Leu Gln Gln Asn Gln
 35 40 45
 Ile Ile Ala Glu Phe Glu Ala Leu Pro Glu Gln Thr Arg Lys Lys Leu
 50 55 60
 Glu Gly Gly Pro Phe Phe Asp Leu Leu Lys Ser Thr Gln Glu Ala Ile
 65 70 75 80
 Val Leu Pro Pro Trp Val Ala Leu Ala Val Arg Pro Arg Pro Gly Val
 85 90 95
 Trp Glu Tyr Leu Arg Val Asn Leu His Ala Leu Val Val Glu Glu Leu
 100 105 110
 Gln Pro Ala Glu Phe Leu His Phe Lys Glu Glu Leu Val Asp Gly Val
 115 120 125
 Lys Asn Gly Asn Phe Thr Leu Glu Leu Asp Phe Glu Pro Phe Asn Ala
 130 135 140
 Ser Ile Pro Arg Pro Thr Leu His Lys Tyr Ile Gly Asn Gly Val Asp
 145 150 155 160
 Phe Leu Asn Arg His Leu Ser Ala Lys Leu Phe His Asp Lys Glu Ser
 165 170 175

ES 2 750 373 T3

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

ES 2 750 373 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Tyr Glu Ala Phe Gly Leu Thr Val Val Glu Ala Met Thr Cys Gly

ES 2 750 373 T3

cagaacctca acactctgca acacaccttg aggaaagcag aagagtatct agcagagcct 660
 aagtccgaaa cactgtatga agagtttgag gccaaagttg aggagattgg tcttgagagg 720
 ggatggggag acaatgcaga gcgtgtcctt gacatgatac gtcttctttt ggaccttctt 780
 gaggcgcctg atccttgca tcttgagact tttcttgaa gagtaccat ggtgttcaac 840
 gttgtgatcc tctctccaca tggttacttt gctcaggaca atgttcttgg ttaccctgac 900
 actggtggac aggttgttta cattcttgat caagttcgtg ctctggagat agagatgctt 960
 caacgtatta agcaacaagg actcaacatt aaaccaagga ttctcattct aactcgactt 1020
 ctacctgatg cggtaggaac tacatgcggt gaacgtctcg agagagttta tgattctgag 1080
 tactgtgata ttcttctgtt gcccttcaga acagagaagg gtattgttcg caaatggatc 1140
 tcaaggttcg aagtctggcc atatctagag acttacaccg aggatgctgc ggttgagcta 1200
 tcgaaagaat tgaatggcaa gcctgacctt atcattggta actacagtga tggaaatctt 1260
 gttgcttctt tattggctca caaacttggg gtcactcagt gtaccattgc tcatgctctt 1320
 gagaaaacaa agtaccgga ttctgatatc tactggaaga agcttgacga caagtaccat 1380
 ttctcatgcc agttcactgc ggatattttc gcaatgaacc aactgattt catcatcact 1440
 agtactttcc aagaaattgc tggagcaaa gaaactgttg ggcagtatga aagccacaca 1500
 gcctttactc ttcccggatt gtatcgagtt gttcacggga ttgatgtggt tgatcccaag 1560
 ttcaacattg tctctcttgg tgctgatatg agcatctact tcccttacac agaggagaag 1620
 cgtagattga ctaagttcca ctctgagatc gaggagctcc tctacagcga tgttgagaac 1680
 aaagagcact tatgtgtgct caaggacaag aagaagccga ttctcttcac aatggctagg 1740
 cttgatcgtg tcaagaactt gtcaggctt gttgagtgg acggaagaa caccgcttg 1800
 cgtgagctag ctaacttggg tgttgttggg ggagacagga ggaaagagtc aaaggacaat 1860
 gaagagaaag cagagatgaa gaaaatgtat gatctcattg aggaatacaa gctaaacggt 1920
 cagttcaggt ggatctcctc tcagatggac cgggtaagga acggtgagct gtaccggtac 1980
 atctgtgaca ccaaggtgc ttttgtccaa cctgcattat atgaagcctt tgggttaact 2040
 gttgtggagg ctatgacttg tggtttaccg actttcgcca cttgcaaagg tggccagct 2100
 gagatcattg tgcacggtaa atcgggtttc cacattgacc cttaccatgg tgatcaggct 2160
 gctgatactc ttgctgattt cttaccaag tgtaaggagg atccatctca ctgggatgag 2220
 atctcaaaag gagggcttca gaggattgag gagaaataca cttggcaaat ctattcacag 2280
 aggctcttga cattgactgg tgtgtatgga ttctggaagc atgtctcgaa ccttgaccgt 2340
 cttgaggctc gccgttacct tgaatgttc tatgcattga agtatcgccc attggctcag 2400
 gctgttctc ttgcacaaga tgattga 2427

ES 2 750 373 T3

<210> 5
 <211> 1272
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Sintético

<400> 5

Met Asp Ser Gly Tyr Ser Ser Ser Tyr Ala Ala Ala Ala Gly Met His
 1 5 10 15
 Val Val Ile Cys Pro Trp Leu Ala Phe Gly His Leu Leu Pro Cys Leu
 20 25 30
 Asp Leu Ala Gln Arg Leu Ala Ser Arg Gly His Arg Val Ser Phe Val
 35 40 45
 Ser Thr Pro Arg Asn Ile Ser Arg Leu Pro Pro Val Arg Pro Ala Leu
 50 55 60
 Ala Pro Leu Val Ala Phe Val Ala Leu Pro Leu Pro Arg Val Glu Gly
 65 70 75 80
 Leu Pro Asp Gly Ala Glu Ser Thr Asn Asp Val Pro His Asp Arg Pro
 85 90 95
 Asp Met Val Glu Leu His Arg Arg Ala Phe Asp Gly Leu Ala Ala Pro
 100 105 110
 Phe Ser Glu Phe Leu Gly Thr Ala Cys Ala Asp Trp Val Ile Val Asp
 115 120 125
 Val Phe His His Trp Ala Ala Ala Ala Ala Leu Glu His Lys Val Pro
 130 135 140
 Cys Ala Met Met Leu Leu Gly Ser Ala His Met Ile Ala Ser Ile Ala
 145 150 155 160
 Asp Arg Arg Leu Glu Arg Ala Glu Thr Glu Ser Pro Ala Ala Ala Gly
 165 170 175
 Gln Gly Arg Pro Ala Ala Ala Pro Thr Phe Glu Val Ala Arg Met Lys
 180 185 190
 Leu Ile Arg Thr Lys Gly Ser Ser Gly Met Ser Leu Ala Glu Arg Phe
 195 200 205

ES 2 750 373 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 750 373 T3

Gly Ala Asn Ala Glu Arg Met Ile Thr Arg Val His Ser Gln Arg Glu
465 470 475 480

Arg Leu Asn Glu Thr Leu Val Ser Glu Arg Asn Glu Val Leu Ala Leu
485 490 495

Leu Ser Arg Val Glu Ala Lys Gly Lys Gly Ile Leu Gln Gln Asn Gln
500 505 510

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

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

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

Trp Glu Tyr Leu Arg Val Asn Leu His Ala Leu Val Val Glu Glu Leu
565 570 575

Gln Pro Ala Glu Phe Leu His Phe Lys Glu Glu Leu Val Asp Gly Val
580 585 590

Lys Asn Gly Asn Phe Thr Leu Glu Leu Asp Phe Glu Pro Phe Asn Ala
595 600 605

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

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

Leu Leu Pro Leu Leu Lys Phe Leu Arg Leu His Ser His Gln Gly Lys
645 650 655

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

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

Leu Tyr Glu Glu Phe Glu Ala Lys Phe Glu Glu Ile Gly Leu Glu Arg
690 695 700

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

ES 2 750 373 T3

Leu Asp Leu Leu Glu Ala Pro Asp Pro Cys Thr Leu Glu Thr Phe Leu
 725 730 735
 Gly Arg Val Pro Met Val Phe Asn Val Val Ile Leu Ser Pro His Gly
 740 745 750
 Tyr Phe Ala Gln Asp Asn Val Leu Gly Tyr Pro Asp Thr Gly Gly Gln
 755 760 765
 Val Val Tyr Ile Leu Asp Gln Val Arg Ala Leu Glu Ile Glu Met Leu
 770 775 780
 Gln Arg Ile Lys Gln Gln Gly Leu Asn Ile Lys Pro Arg Ile Leu Ile
 785 790 795 800
 Leu Thr Arg Leu Leu Pro Asp Ala Val Gly Thr Thr Cys Gly Glu Arg
 805 810 815
 Leu Glu Arg Val Tyr Asp Ser Glu Tyr Cys Asp Ile Leu Arg Val Pro
 820 825 830
 Phe Arg Thr Glu Lys Gly Ile Val Arg Lys Trp Ile Ser Arg Phe Glu
 835 840 845
 Val Trp Pro Tyr Leu Glu Thr Tyr Thr Glu Asp Ala Ala Val Glu Leu
 850 855 860
 Ser Lys Glu Leu Asn Gly Lys Pro Asp Leu Ile Ile Gly Asn Tyr Ser
 865 870 875 880
 Asp Gly Asn Leu Val Ala Ser Leu Leu Ala His Lys Leu Gly Val Thr
 885 890 895
 Gln Cys Thr Ile Ala His Ala Leu Glu Lys Thr Lys Tyr Pro Asp Ser
 900 905 910
 Asp Ile Tyr Trp Lys Lys Leu Asp Asp Lys Tyr His Phe Ser Cys Gln
 915 920 925
 Phe Thr Ala Asp Ile Phe Ala Met Asn His Thr Asp Phe Ile Ile Thr
 930 935 940
 Ser Thr Phe Gln Glu Ile Ala Gly Ser Lys Glu Thr Val Gly Gln Tyr
 945 950 955 960
 Glu Ser His Thr Ala Phe Thr Leu Pro Gly Leu Tyr Arg Val Val His

ES 2 750 373 T3

			965					970						975	
Gly	Ile	Asp	Val	Phe	Asp	Pro	Lys	Phe	Asn	Ile	Val	Ser	Pro	Gly	Ala
			980					985					990		
Asp	Met	Ser	Ile	Tyr	Phe	Pro	Tyr	Thr	Glu	Glu	Lys	Arg	Arg	Leu	Thr
		995					1000					1005			
Lys	Phe	His	Ser	Glu	Ile	Glu	Glu	Leu	Leu	Tyr	Ser	Asp	Val	Glu	
	1010					1015					1020				
Asn	Lys	Glu	His	Leu	Cys	Val	Leu	Lys	Asp	Lys	Lys	Lys	Pro	Ile	
	1025					1030					1035				
Leu	Phe	Thr	Met	Ala	Arg	Leu	Asp	Arg	Val	Lys	Asn	Leu	Ser	Gly	
	1040					1045					1050				
Leu	Val	Glu	Trp	Tyr	Gly	Lys	Asn	Thr	Arg	Leu	Arg	Glu	Leu	Ala	
	1055					1060					1065				
Asn	Leu	Val	Val	Val	Gly	Gly	Asp	Arg	Arg	Lys	Glu	Ser	Lys	Asp	
	1070					1075					1080				
Asn	Glu	Glu	Lys	Ala	Glu	Met	Lys	Lys	Met	Tyr	Asp	Leu	Ile	Glu	
	1085					1090					1095				
Glu	Tyr	Lys	Leu	Asn	Gly	Gln	Phe	Arg	Trp	Ile	Ser	Ser	Gln	Met	
	1100					1105					1110				
Asp	Arg	Val	Arg	Asn	Gly	Glu	Leu	Tyr	Arg	Tyr	Ile	Cys	Asp	Thr	
	1115					1120					1125				
Lys	Gly	Ala	Phe	Val	Gln	Pro	Ala	Leu	Tyr	Glu	Ala	Phe	Gly	Leu	
	1130					1135					1140				
Thr	Val	Val	Glu	Ala	Met	Thr	Cys	Gly	Leu	Pro	Thr	Phe	Ala	Thr	
	1145					1150					1155				
Cys	Lys	Gly	Gly	Pro	Ala	Glu	Ile	Ile	Val	His	Gly	Lys	Ser	Gly	
	1160					1165					1170				
Phe	His	Ile	Asp	Pro	Tyr	His	Gly	Asp	Gln	Ala	Ala	Asp	Thr	Leu	
	1175					1180					1185				
Ala	Asp	Phe	Phe	Thr	Lys	Cys	Lys	Glu	Asp	Pro	Ser	His	Trp	Asp	
	1190					1195					1200				

ES 2 750 373 T3

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

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

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

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

Gln Ala Val Pro Leu Ala Gln Asp Asp
 1265 1270

- <210> 6
- <211> 3819
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Sintético

<400> 6
 atggattcgg gttactcttc ctccatgcg gcggctgcgg gtatgcacgt tgttatctgt 60
 ccgtggctgg cttttggtca cctgctgccg tgcctggatc tggcacagcg tctggcttca 120
 cgcgccatc gtgtcagctt cgtgtctacc ccgcgcaata ttcgctct gccgccggtt 180
 cgtccggcac tggctccgct ggttgcatth gtcgctctgc cgctgccgcg cgtggaaggt 240
 ctgccggatg gtgcggaaag taccaacgac gtgccgcatg atcgcccgga catggttgaa 300
 ctgcaccgtc gtgcattcga tggctctggca gcaccgtttt ccgaatttct gggtagcggcg 360
 tgcgccgatt gggtagctgt tgacgtcttt catcactggg cggcggcggc ggcgctggaa 420
 cataaagttc cgtgtgcaat gatgctgctg ggctcagctc acatgattgc gtcgatcgca 480
 gaccgtcgcc tggaacgtgc agaaaccgaa agtccggctg cggccggcca gggtagccccg 540
 gcagctgcgc cgaccttcga agtgcccgc atgaaactga ttcgtacgaa aggcagctct 600
 ggtatgagcc tggcagaacg ctttagtctg accctgtccc gtagttccct ggtggttggg 660
 cgcagttgcg ttgaatttga accgaaacc gtcccgtgc tgtccacgct gcgtggtaaa 720
 ccgatcacct ttctgggtct gatgccgccc ctgcatgaag gccgtcgca agatggtgaa 780
 gacgcaacgg tgcgttggct ggatgcacag ccggctaaaa gcgtcgtgta tgtcgccctg 840
 ggctctgaag tgccgctggg tgtggaaaaa gttcacgaac tggcactggg cctggaactg 900
 gctggcaccg gcttctctgt ggcactgctg aaaccgacgg gtgtgagcga tgcggacctg 960
 ctgccggccc gttttgaaga acgtaccgccc ggccgtgggt ttgtcgcaac gcgttgggtc 1020

ES 2 750 373 T3

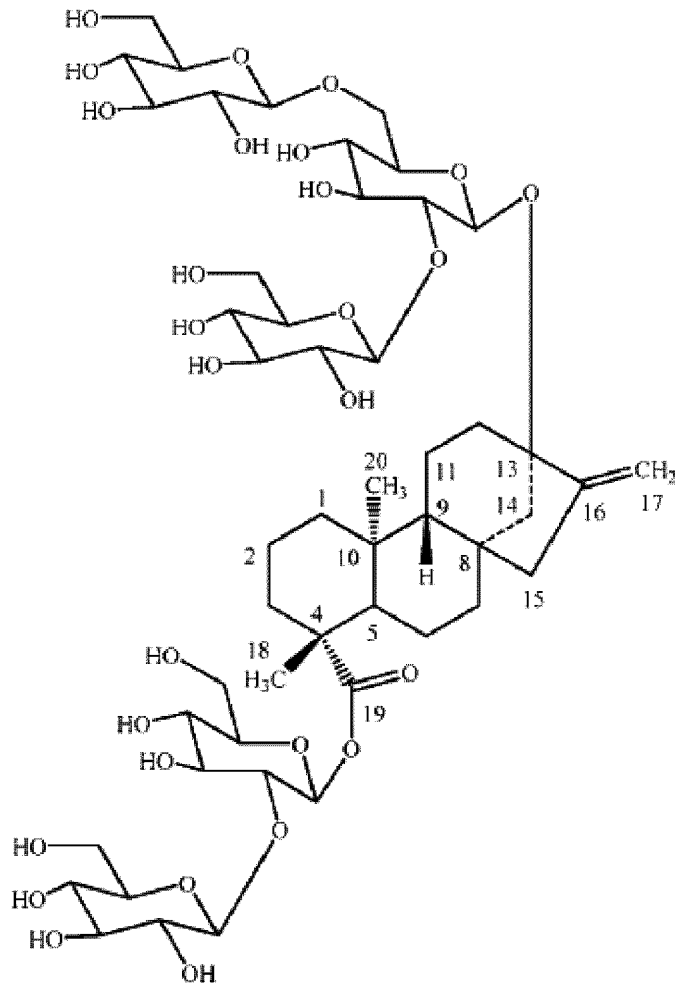
ccgcaaatga gcattctggc gcatgccgca gtgggcgcct ttctgacca ctgtggttgg 1080
 aacagcacga tcgaaggcct gatgtttggt caccgctga ttatgctgcc gatcttcggc 1140
 gatcagggtc cgaacgcacg tctgattgaa gcgaaaaatg ccggcctgca agttgcgcgc 1200
 aacgatggcg acggttcttt cgaccgtgag ggtgtggctg cggccattcg cgcagtggct 1260
 gttgaagaag aatcatcgaa agtttttcag gcgaaagcca aaaaactgca agaaatcgtc 1320
 gcggatatgg cctgccacga acgctacatt gatggtttca ttcagcaact gcgctcctac 1380
 aaagacggtt ctggtgcaaa cgctgaacgt atgataacgc gcgtccacag ccaacgtgag 1440
 cgtttgaacg aaacgcttgt ttctgagaga aacgaagtcc ttgccttgct ttccagggtt 1500
 gaagccaaag gtaaaggat tttacaacaa aaccagatca ttgctgaatt cgaagctttg 1560
 cctgaacaaa cccggaagaa acttgaaggt ggtcctttct ttgaccttct caaatccact 1620
 caggaagcaa ttgtgttgcc accatggggt gctctagctg tgaggccaag gcctggtggt 1680
 tgggaatact tacgagtcaa tctccatgct cttgtcgttg aagaactcca acctgctgag 1740
 tttcttcatt tcaaggaaga actcgttgat ggagttaaga atggtaatth cactcttgag 1800
 cttgatttcg agccattcaa tgctctatc cctcgtccaa cactccacaa atacattgga 1860
 aatggtggtg acttccttaa ccgtcattta tcggctaagc tcttccatga caaggagagt 1920
 ttgcttccat tgcttaagtt ccttcgtctt cacagccacc agggcaagaa cctgatggtg 1980
 agcgagaaga ttcagaacct caacactctg caacacacct tgaggaaagc agaagagtat 2040
 ctagcagagc ttaagtccga aacactgtat gaagagtttg aggccaaagt tgaggagatt 2100
 ggtcttgaga ggggatgggg agacaatgca gagcgtgtcc ttgacatgat acgtcttctt 2160
 ttggaccttc ttgaggcgcc tgatccttgc actcttgaga cttttcttgg aagagtacca 2220
 atggtgttca acgttgtgat cctctctcca catggttact ttgctcagga caatgttctt 2280
 ggttaccctg acactggtgg acaggttgtt tacattcttg atcaagttcg tgctctggag 2340
 atagagatgc ttcaacgtat taagcaacaa ggactcaaca ttaaaccaag gattctcatt 2400
 ctaactcgac ttctacctga tgcggtagga actacatgcg gtgaacgtct cgagagagtt 2460
 tatgattctg agtactgtga tattcttcgt gtgcccttca gaacagagaa gggatttgtt 2520
 cgcaaatgga tctcaagggt cgaagtctgg ccatatctag agacttacac cgaggatgct 2580
 gcggttgagc tatcgaaaga attgaaatggc aagcctgacc ttatcattgg taactacagt 2640
 gatggaaatc ttgttgcttc tttattggct cacaaaactg gtgtcactca gtgtaccatt 2700
 gctcatgctc ttgagaaaac aaagtacccg gattctgata tctactggaa gaagcttgac 2760
 gacaagtacc atttctcatg ccagttcact gcggatattt tcgcaatgaa ccacactgat 2820
 ttcacatca ctagtacttt ccaagaaatt gctggaagca aagaaactgt tgggcagtat 2880
 gaaagccaca cagcctttac tcttcccgga ttgtatcgag ttgttcacgg gattgatgtg 2940

ES 2 750 373 T3

tttgatccca agttcaacat tgtctctcct ggtgctgata tgagcatcta cttcccttac	3000
acagaggaga agcgtagatt gactaagttc cactctgaga tgcaggagct cctctacagc	3060
gatgttgaga acaaagagca cttatgtgtg ctcaaggaca agaagaagcc gattctcttc	3120
acaatggcta ggcttgatcg tgtcaagaac ttgtcaggtc ttgttgagtg gtacgggaag	3180
aacacccgct tgcgtgagct agctaacttg gtigtgtgtg gaggagacag gaggaaagag	3240
tcaaaggaca atgaagagaa agcagagatg aagaaaatgt atgatctcat tgaggaatac	3300
aagctaaacg gtcagttcag gtggatctcc tctcagatgg accgggtaag gaacggtgag	3360
ctgtaccggt acatctgtga caccaagggt gcttttgtcc aacctgcatt atatgaagcc	3420
tttgggttaa ctgttggtga ggctatgact tgtggtttac cgactttcgc cacttgcaaa	3480
ggtggtccag ctgagatcat tgtgcacggt aaatcgggtt tccacattga cccttaccat	3540
ggtgatcagg ctgctgatac tcttgctgat ttcttcacca agtgaagga ggatccatct	3600
cactgggatg agatctcaaa aggagggtt cagaggattg aggagaaata cacttgcaa	3660
atctattcac agaggctctt gacattgact ggtgtgtatg gattctggaa gcatgtctcg	3720
aaccttgacc gtcttgaggc tcgccgttac cttgaaatgt tctatgcatt gaagtatcgc	3780
ccattggctc aggctgttcc tcttgcaaa gatgattga	3819

REIVINDICACIONES

1. Un rebaudiósido sintético de fórmula (I):



5

2. Un método para preparar el rebaudiósido como se reivindica en la reivindicación 1 para su uso como edulcorante, comprendiendo el método:

10

(I) preparar una mezcla de reacción que comprenda:

(i) rebaudiósido E;

(ii) uno o más sustratos seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, uridina difosfato (UDP) y glucosa de uridina difosfato (UDP-glucosa); y

(iii) uno de:

15

(a) una UDP glucosiltransferasa,

(b) una UDP-glucosiltransferasa y una sacarosa sintasa añadidas por separado a la mezcla de reacción y

(c) una enzima de fusión UDP-glucosiltransferasa que comprende un dominio UDP-glucosiltransferasa acoplado a un dominio de sacarosa sintasa;

20

(II) incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido deseado, en donde una glucosa está unida en forma covalente al rebaudiosida E para producir el rebaudiósido de fórmula (I) y

25

(III) obtener el rebaudiósido de fórmula (I) para usar como edulcorante,

en donde dicho de UDP-glucosiltransferasa o UDP-glucosiltransferasa es un dominio EUGT 11 de UDP-glucosiltransferasa que tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 1.

30

3. Un método para preparar el rebaudiósido como se reivindica en la reivindicación 1 para su uso como edulcorante, comprendiendo el método:

(I) preparar una mezcla de reacción que comprenda:

(i) estevióside;

(ii) uno o más sustratos seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, UDP y UDP-glucosa; y

(iii) uno de:

(a) una UDP-glucosil transferasa,

(b) una UDP-glucosiltransferasa y una sacarosa sintasa añadidas por separado a la mezcla de reacción y

(c) una enzima de fusión UDP-glucosiltransferasa que comprende un dominio UDP-glucosiltransferasa acoplado a un dominio de sacarosa sintasa;

(II) incubar la mezcla de reacción durante un tiempo suficiente para producir el rebaudiósido deseado, en donde una glucosa se acopla de manera covalente al estevióside para producir un producto intermedio de rebaudiósido E y en donde una glucosa se acopla al producto intermedio de rebaudiósido E para producir el rebaudiósido de fórmula (I) y

(III) la obtención de rebaudiósido de fórmula (I) para uso como edulcorante,

en donde dicho UDP-glucosiltransferasa o dominio UDP-glucosiltransferasa es una EUGT11 UDP-glucosiltransferasa que tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 1.

4. Se reivindica un método en la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde la sacarosa sintasa o el dominio de la sacarosa sintasa se selecciona del grupo que consiste en una sacarosa sintasa I de *Arabidopsis*, una sacarosa sintasa 3 de *Arabidopsis* y una sacarosa sintasa de *Vigna radiata*.

5. Un método según la reivindicación 4, en donde la sacarosa sintasa o el dominio de sacarosa sintasa es una sacarosa sintasa I de *Arabidopsis thaliana*.

6. Un método según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en donde se emplea la enzima de fusión UDP-glucosiltransferasa que comprende un dominio de UDP-glucosiltransferasa acoplado a un dominio de sacarosa sintasa.

7. Un método según la reivindicación 6, en donde la enzima de fusión UDP-glucosiltransferasa comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad de la secuencia de sec. con núm. de ident.: 5.

8. Un método según la reivindicación 6, en donde el dominio de sacarosa sintasa es un dominio de sacarosa I de *Arabidopsis thaliana* que consiste en la secuencia de ácido nucleico de sec. con núm. de ident.: 3.

9. Un método según la reivindicación 7 en donde la enzima de fusión UDP-glucosiltransferasa tiene la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.: 5.

10. Un producto consumible por vía oral que comprenda una cantidad de edulcorante de rebaudiósido de fórmula (I) según la reivindicación 1 seleccionado de un producto de bebida o de otro producto consumible.

11. Un producto consumible por vía oral según la reivindicación 10 que comprende desde aproximadamente 5 ppm a 100 ppm de dicho rebaudiósido.

12. Un producto consumible por vía oral según la reivindicación 10 o la reivindicación 11 en donde el rebaudiósido A de fórmula (I) es el único edulcorante.

13. Un producto consumible por vía oral según la reivindicación 10 o la reivindicación 12 que tiene una intensidad de dulzor equivalente a aproximadamente 1 % (p/v-%) a 4 % (p/v-%) de solución de sacarosa.

14. Un producto consumible por vía oral según la reivindicación 10 que comprende además al menos un edulcorante adicional.

15. Un producto consumible por vía oral según la reivindicación 14, en donde al menos un edulcorante adicional se selecciona del grupo formado por extracto de estevia, un glucósido de esteviol, estevióside, rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, dulcósido A, rubusosido, esteviolbiosido, sacarosa, jarabe de maíz con elevado contenido de fructosa, fructosa, glucosa, xilosa, arabinosa, ramnosa, eritritol, xilitol, manitol, sorbitol, inositol, AceK, aspartamo, neotamo, sucralosa, sacarina, dihidrochalcona naringina (NarDHC), neohesperidina dihidrochalcona (NDHC), mogrósido IV, siamenósido I, mogrósido V, monatín, taumatina, monelina, brazeína, L-alanina, glicina, Lo Han Guo, hernandulcina, filodulcina, trilobtain, y combinaciones de los mismos.

16. Un producto consumible por vía oral según la reivindicación 10 que comprende al menos un aditivo seleccionado del grupo formado por un hidrato de carbono, un poliol, un aminoácido o sal del mismo, un poli-aminoácido o sal del mismo, un ácido de azúcar o sal del mismo, un nucleótido, un ácido orgánico, un ácido inorgánico, una sal orgánica, una sal de un ácido orgánico, una sal de base orgánica, una sal inorgánica, un compuesto amargo, un aromatizante, un ingrediente saborizante, un compuesto astringente, una proteína, un hidrolizado de proteína, un tensioactivo, un emulsionante, un flavonoide, un alcohol, un polímero, y combinaciones de los mismos.
- 5
17. Un producto consumible por vía oral según la reivindicación 10 seleccionado del grupo que consiste en un producto alimenticio, un nutracéutico, un producto farmacéutico, un suplemento dietético, una composición higiénica dental, una composición de gel comestible, un producto cosmético y un saborizante de mesa.
- 10
18. Un rebaudiósido sintético de fórmula (I) según la reivindicación 1 para uso como edulcorante.
- 15
19. Una composición edulcorante que comprende el rebaudiósido de fórmula (I) según la reivindicación 1 y al menos uno de un rellenedor, un espesante y un antiapelmazante.

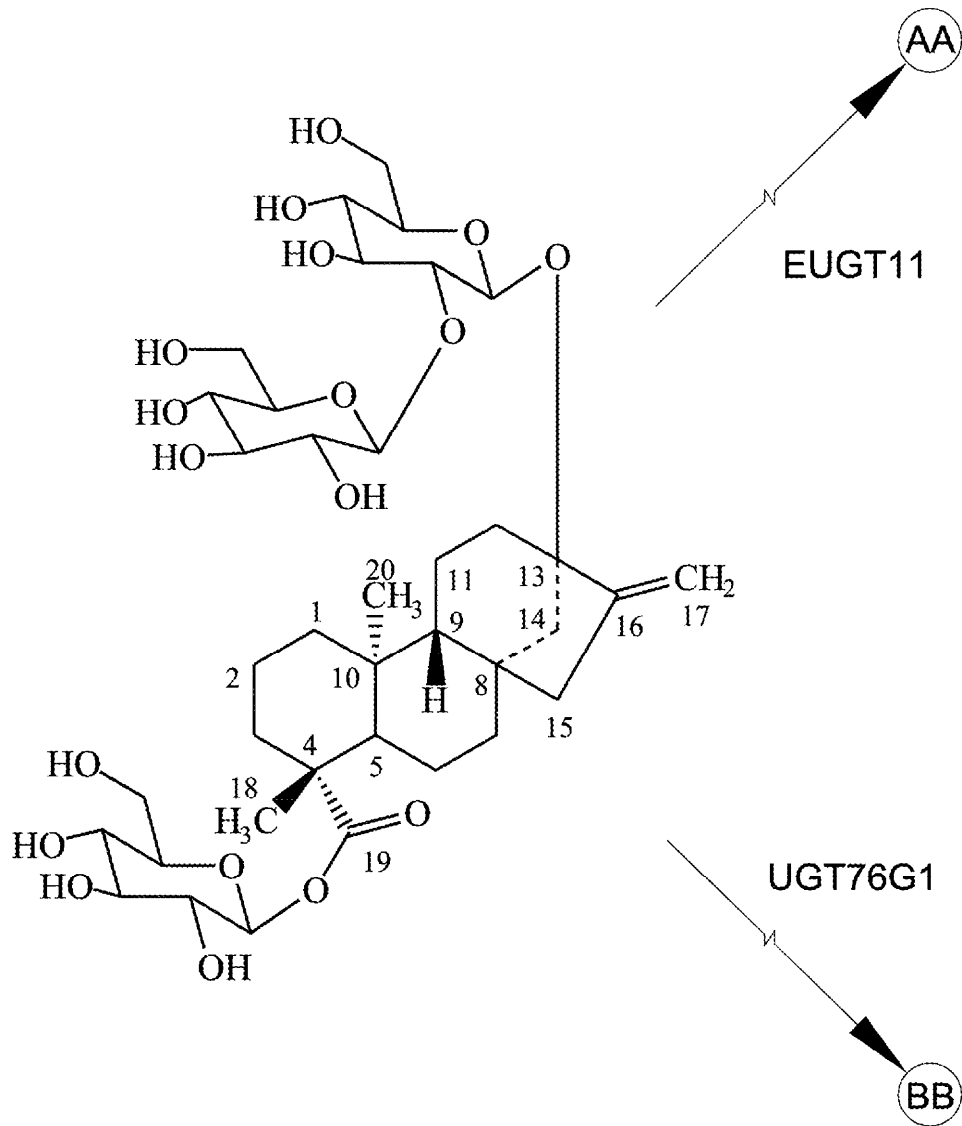


FIG. 1A

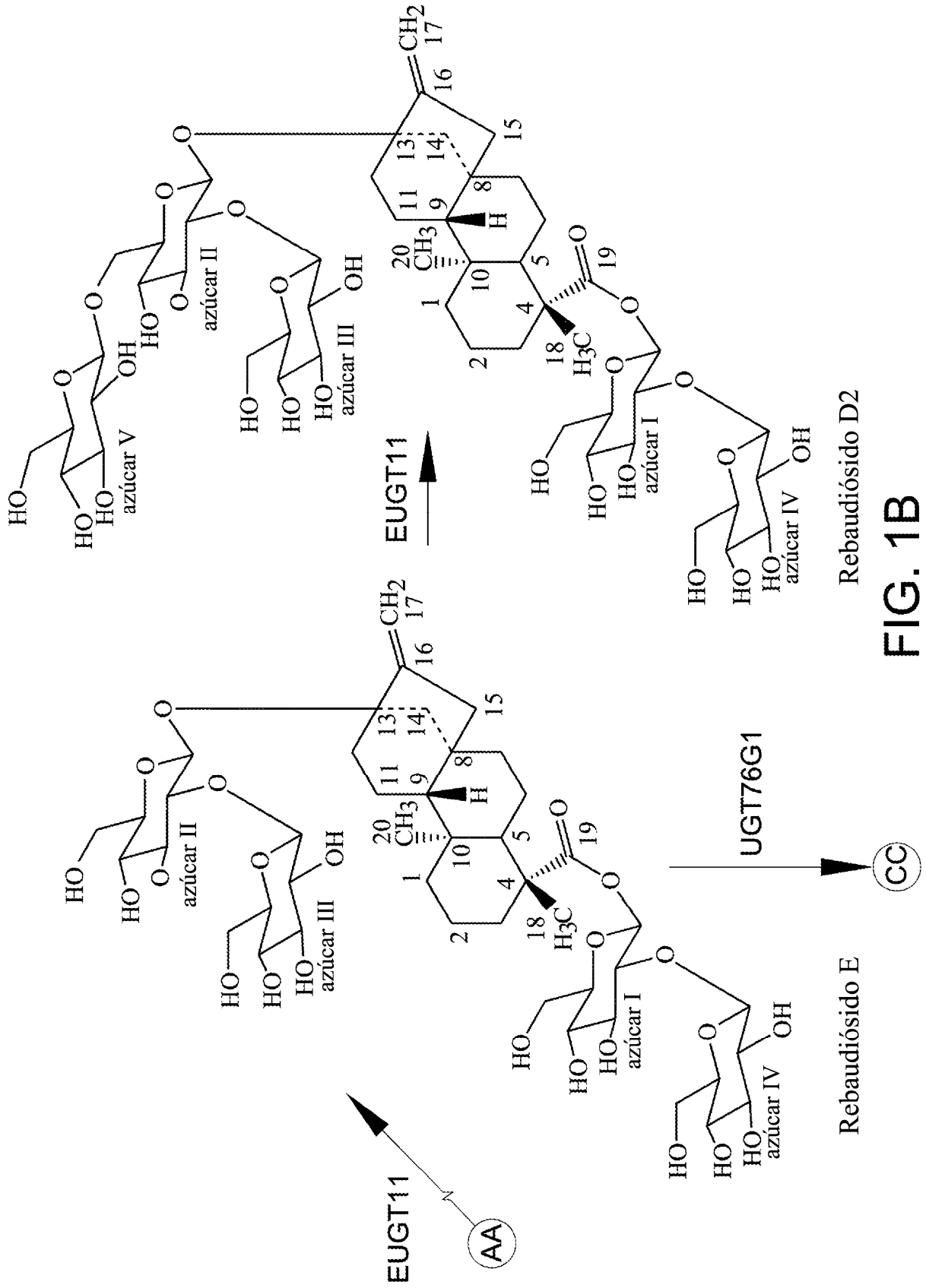
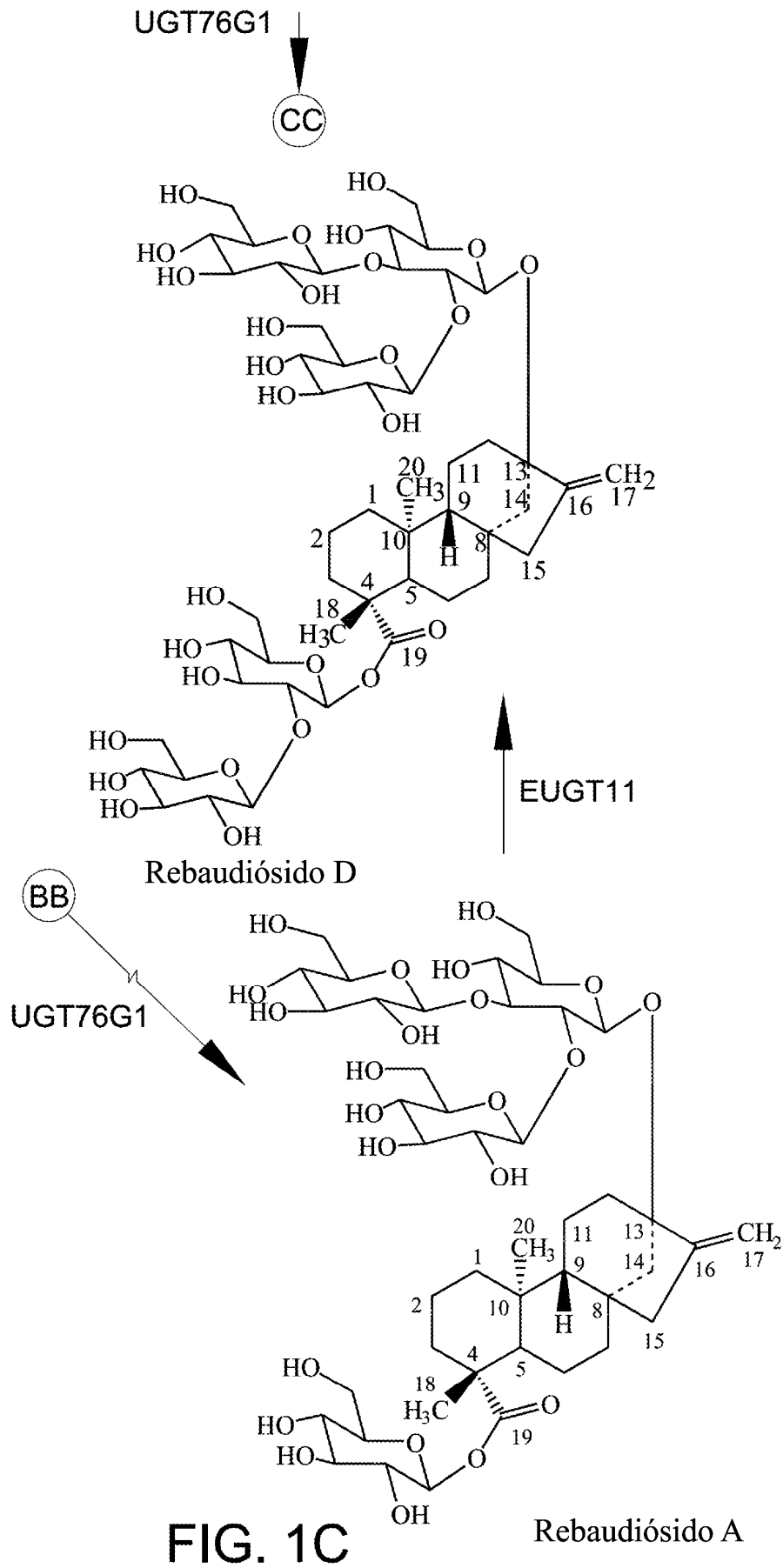


FIG. 1B



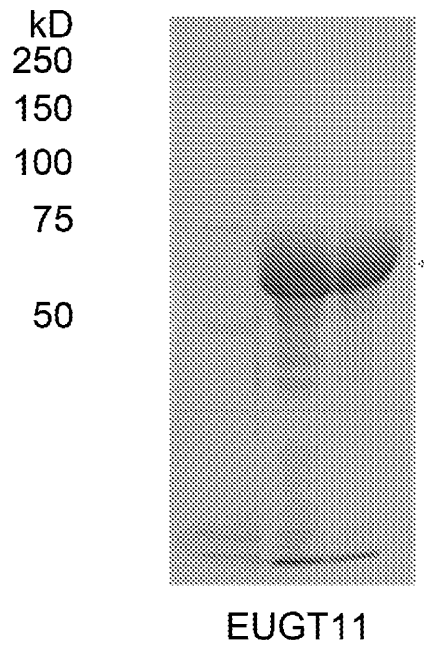


FIG. 2A

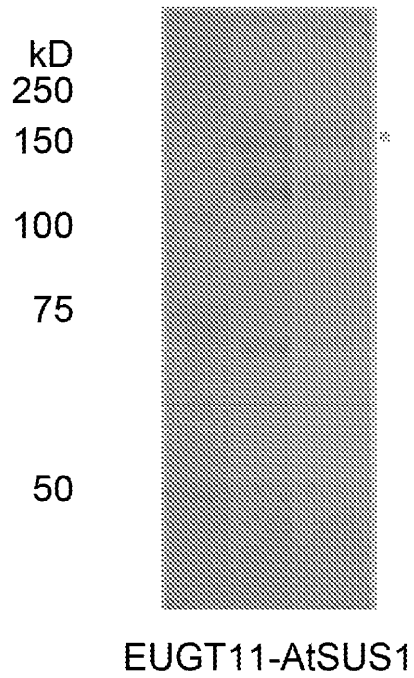


FIG. 2B

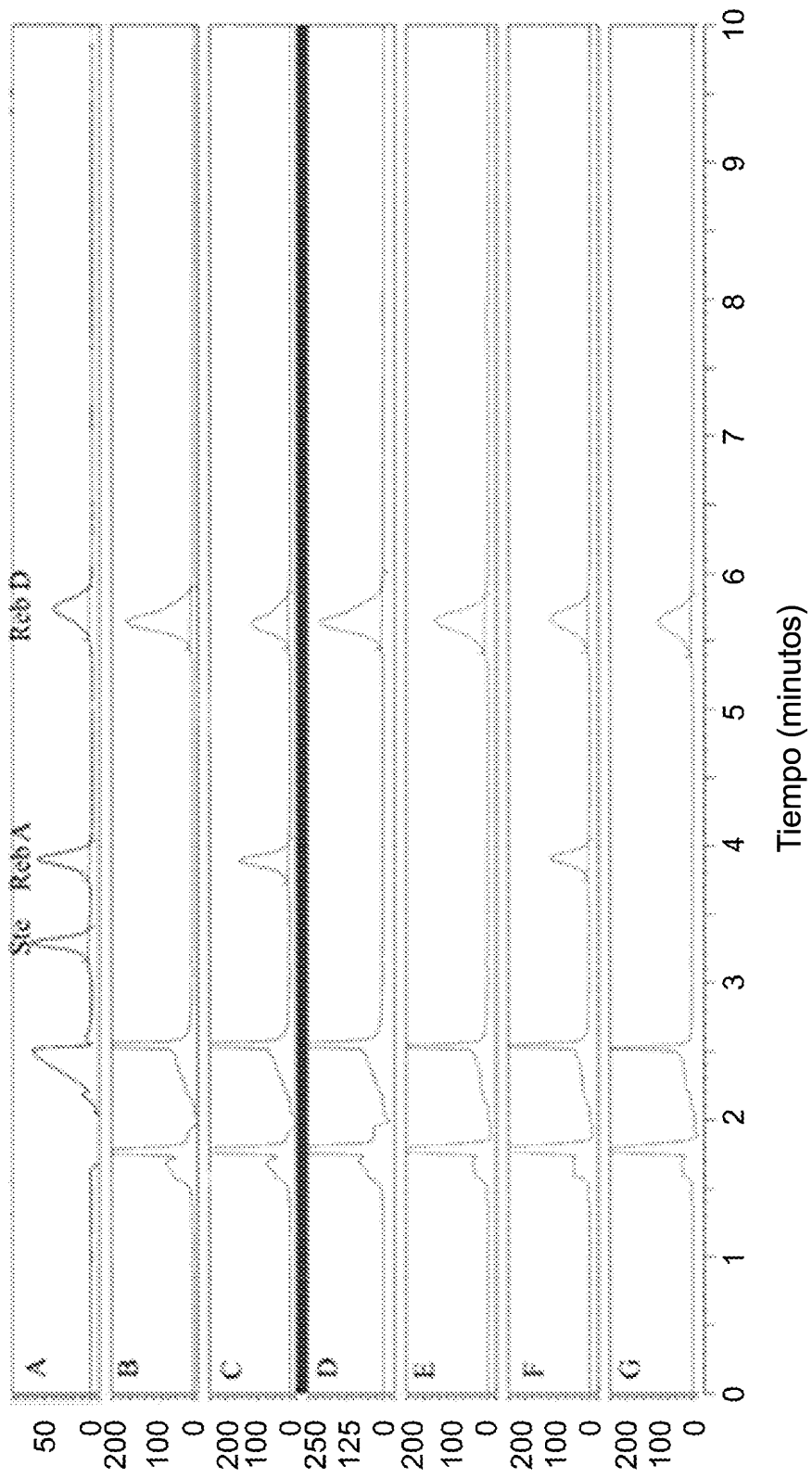


FIG. 3

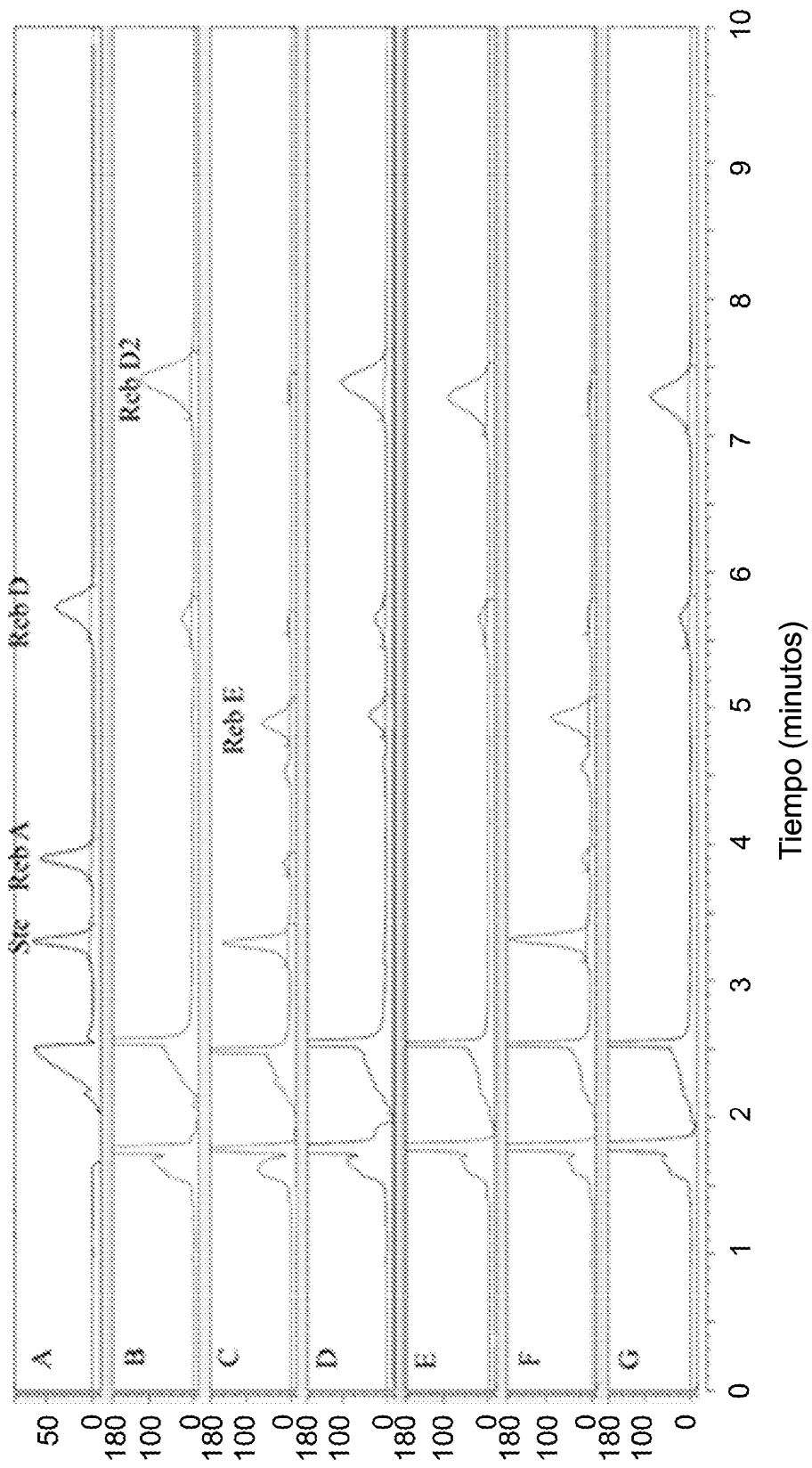


FIG. 4

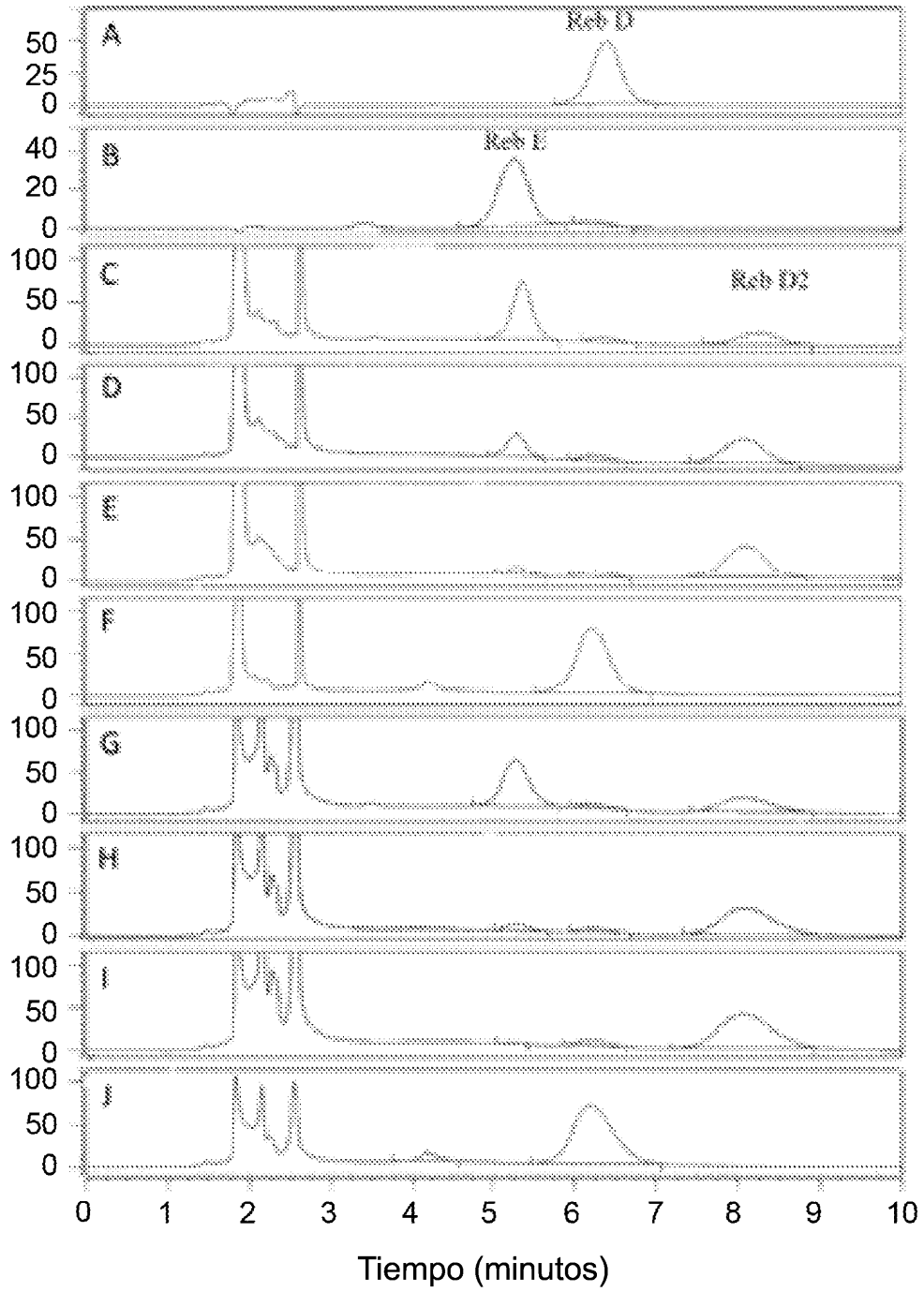


FIG. 5

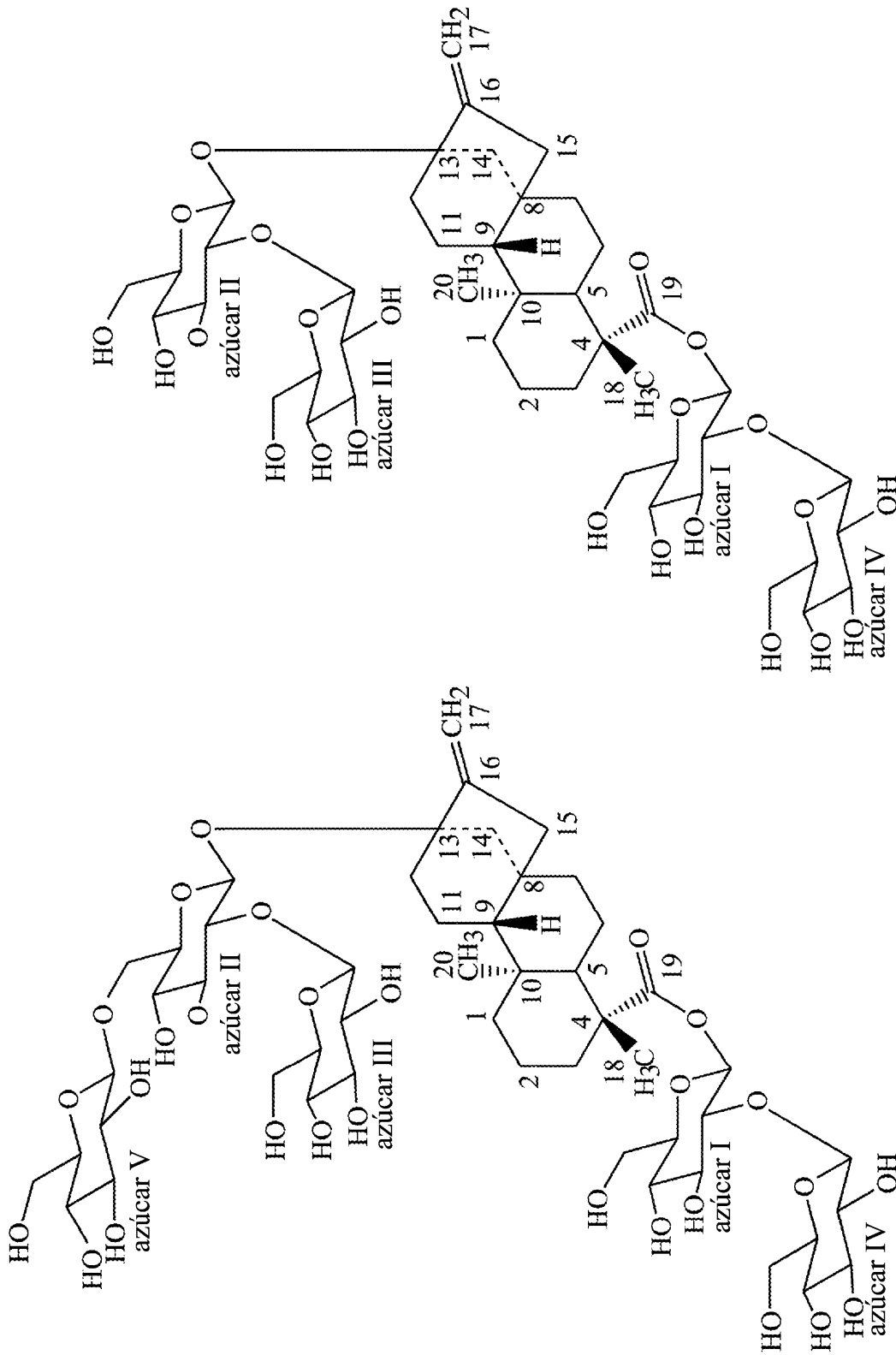


FIG. 6A

FIG. 6B

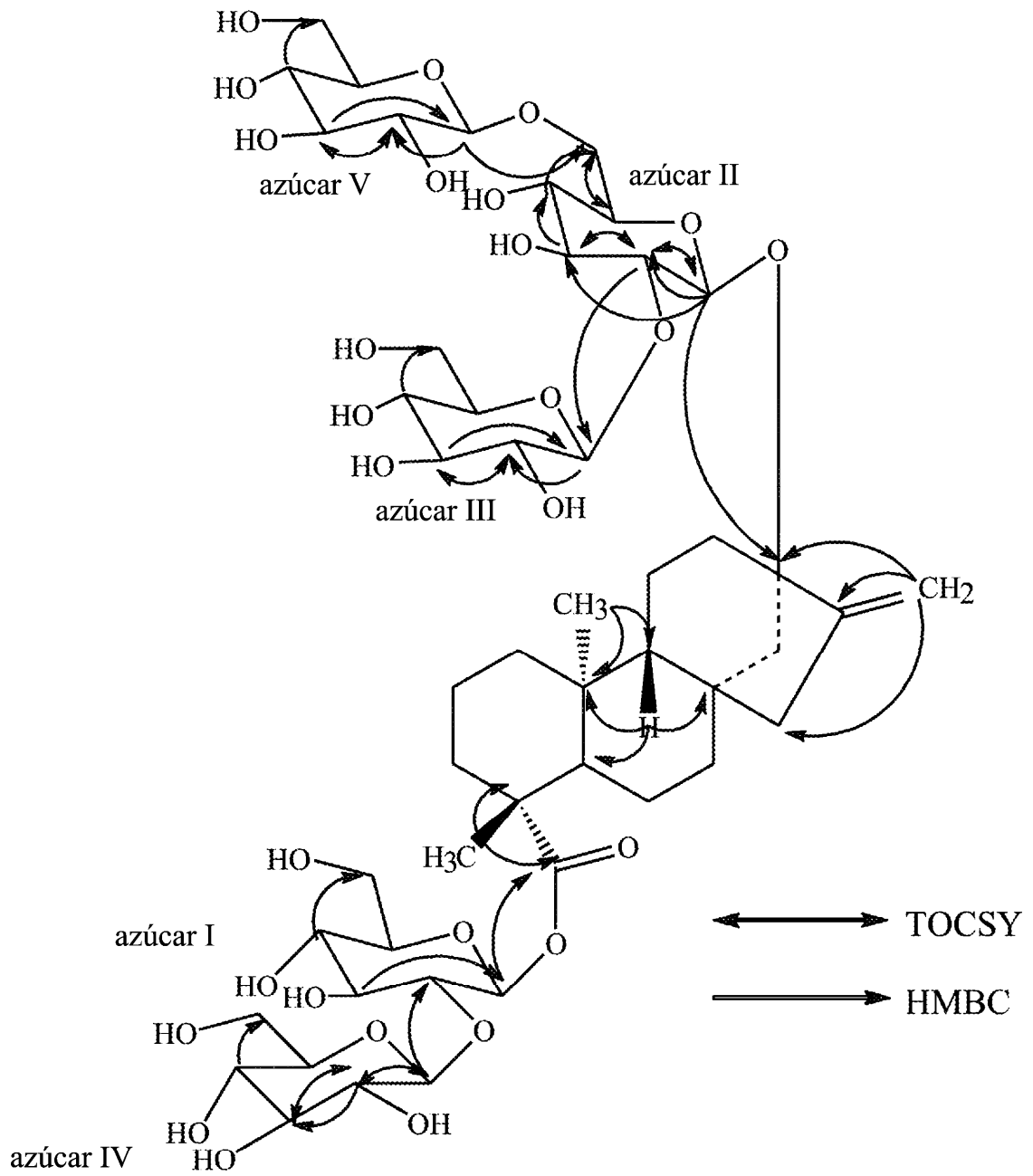
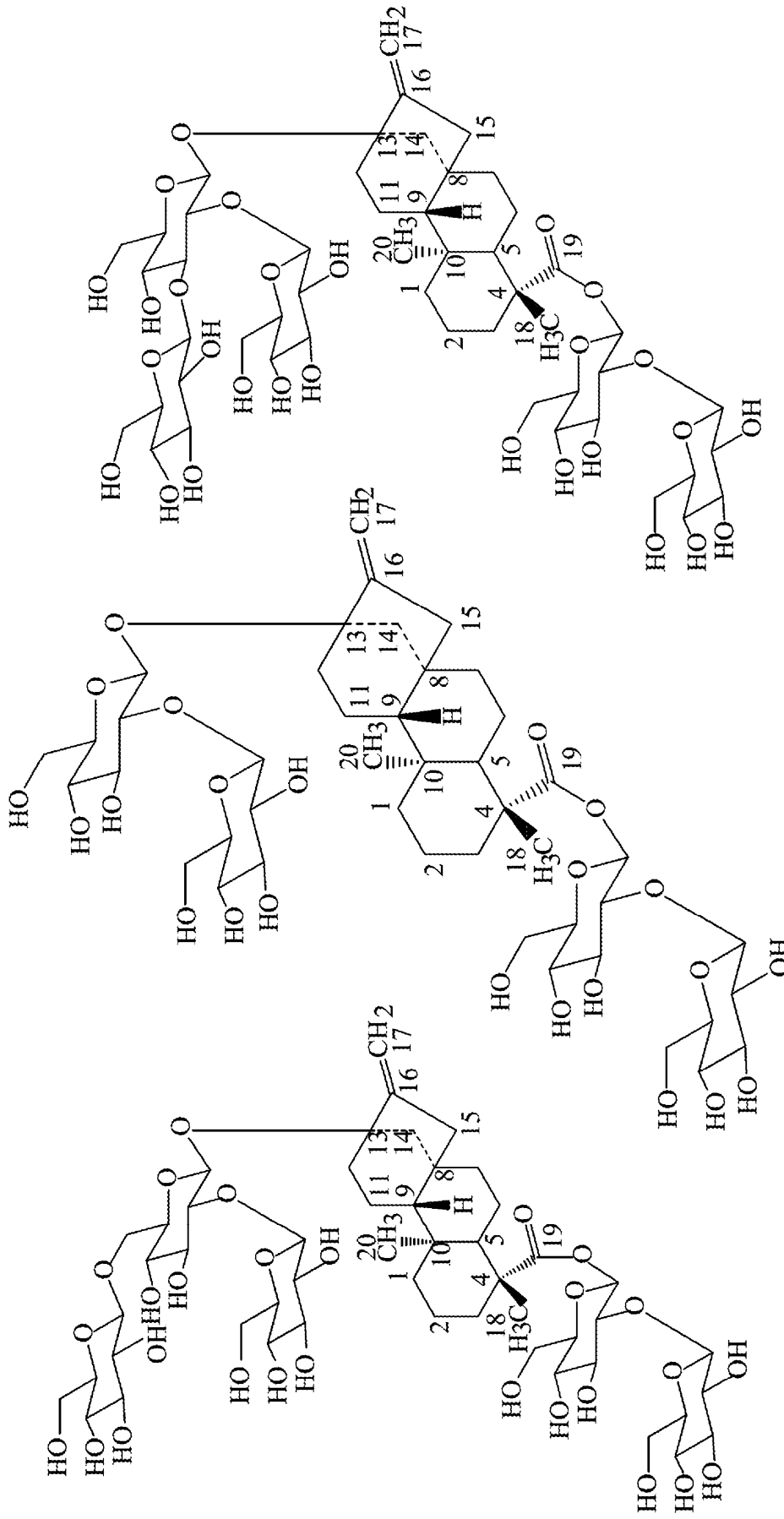


FIG. 7



Rebaudiósido D

Rebaudiósido E

Rebaudiósido D2

FIG. 8C

FIG. 8B

FIG. 8A