

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 014**

51 Int. Cl.:

C12P 19/18 (2006.01)

C12P 19/56 (2006.01)

C07H 1/00 (2006.01)

C07H 15/256 (2006.01)

A23L 2/60 (2006.01)

A23L 27/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.08.2015 PCT/US2015/045906**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.02.2016 WO16028899**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.08.2015 E 15833561 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020 EP 3183349**

54 Título: **Método para preparar rebaudiósido I**

30 Prioridad:

19.08.2014 US 201462039344 P

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

10.02.2021

73 Titular/es:

**PURECIRCLE SDN BHD (100.0%)
PT 23419 Lengkok Teknologi Techpark, Enstek
71760 Bandar Enstek, Negeri Sembilan, MY**

72 Inventor/es:

**PRAKASH, INDRA;
BUNDERS, CYNTHIA;
MARKOSYAN, AVETIK MARKOSYAN;
JARRIN, CYRILLE y
TER HALLE, ROBERT**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 805 014 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para preparar rebaudiósido I

5 Referencia cruzada a aplicaciones relacionadas

Campo técnico

La presente invención se refiere a un proceso biocatalítico para preparar rebaudiósido I.

10 Antecedentes de la invención

15 Los edulcorantes de alta intensidad poseen un nivel de dulzor que es muchas veces mayor que el nivel de dulzor de la sacarosa. Son esencialmente no calóricos y se usan comúnmente en dietas y productos bajos en calorías, incluidos alimentos y bebidas. Los edulcorantes de alta intensidad no provocan una respuesta glucémica, lo que los hace adecuados para su uso en productos destinados a los diabéticos y otros interesados en controlar la ingesta de carbohidratos.

20 Los glucósidos de esteviol son una clase de compuestos que se encuentran en las hojas de estevia rebaudiana Bertoni, un arbusto perenne de la familia Asteraceae (Compositae) nativa de ciertas regiones de América del Sur. Se caracterizan estructuralmente por una base única, esteviol, que se diferencia por la presencia de residuos de carbohidratos en las posiciones C13 y C19. Se acumulan en las hojas de estevia, componiendo aproximadamente 10 %-20 % del peso seco total. Sobre una base de peso seco, los cuatro glucósidos principales encontrados en las hojas de estevia típicamente incluyen esteviósido (9.1 %), rebaudiósido A (3.8 %), rebaudiósido C (0.6-1.0 %) y dulcósido A (0.3 %).

25 El documento WO2010/03911 de Morita Kagaku Kogyo Co., Ltd. revela que el rebaudiósido I se encuentra en pequeñas cantidades en las hojas de ciertas variedades de estevia rebaudiana Bertoni. El documento WO2010/03911 no describe ninguna propiedad sensorial del rebaudiósido I aislado ni ninguna composición que contenga altas concentraciones de rebaudiósido I.

30 Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad de métodos simples, eficientes y económicos para preparar y purificar el rebaudiósido I, particularmente cuando tales métodos son útiles a escala comercial.

35 Resumen de la invención

La presente invención proporciona un proceso biocatalítico para preparar una composición de rebaudiósido I que comprende poner en contacto una composición de partida que comprende rebaudiósido A con un biocatalizador capaz de convertir el rebaudiósido A en rebaudiósido I,

40 en donde el biocatalizador es una UDP-glicosiltransferasa (UGT) que es una variante UGT76G1 seleccionada del grupo que consiste en UGT76G1-R1-F12, UGT76G1-R2-B9 y UGT76G1-R3-G3.

45 El biocatalizador se puede proporcionar en cualquier forma, tal como, por ejemplo, una forma pura, un lisado crudo o una suspensión celular entera. En una realización alternativa, el biocatalizador se proporciona en un microorganismo.

50 La composición de partida puede ser rebaudiósido A en forma pura, una mezcla de glucósido de esteviol o extracto de estevia. En una realización, la composición de partida es una mezcla de glucósido de esteviol o extracto de estevia que contiene al menos aproximadamente 1 % de rebaudiósido A en peso. En otra realización, la mezcla de glucósidos de esteviol o extracto de estevia contiene al menos aproximadamente 50 % de rebaudiósido A en peso.

55 El método de la presente invención proporciona una composición de rebaudiósido I que contiene al menos aproximadamente 1 % de rebaudiósido I en peso.

60 El método se lleva a cabo típicamente en un medio. Por consiguiente, el método puede comprender además separar la composición de rebaudiósido I del medio para proporcionar una composición de rebaudiósido I separada. El método también puede comprender además una etapa de purificación en donde la composición de rebaudiósido I separada se purifica para proporcionar una composición de rebaudiósido I altamente purificada que comprende al menos aproximadamente 80 % de rebaudiósido I en peso. En una realización, la composición de rebaudiósido I separada se purifica para proporcionar un rebaudiósido I puro, es decir, >99 % en peso.

65 La presente invención proporciona además un método para preparar una composición de rebaudiósido I altamente purificada, que comprende:

5 a. poner en contacto una composición de partida que comprende rebaudiósido A con una variante UGT76G1 seleccionada del grupo que consiste en UGT76G1-R1-F12, UGT76G1-R2-B9 y UGT76G1-R3-G3, y UDP-glucosa para formar una composición que comprende rebaudiósido I, y opcionalmente concomitantemente reciclar UDP-glucosa al proporcionar sacarosa sintasa y sacarosa,

b. separación del rebaudiósido I para formar una composición del rebaudiósido I separada, y

10 c. purificar la composición de rebaudiósido I separada para proporcionar una composición de rebaudiósido I altamente purificada, en donde el rebaudiósido I altamente purificado comprende más de aproximadamente 80 % de rebaudiósido I en peso.

En una realización, el método comprende adicionalmente:

15 a. poner en contacto una composición que comprende esteviósido con UGT76G1 y UDP-glucosa para proporcionar una composición que comprende rebaudiósido A, y

b. separación del rebaudiósido A.

En otra realización, el método comprende adicionalmente:

20 a. poner en contacto una composición que comprende rubusósido con UGT91D2, o una variante del mismo que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 75 % o más, y UDP-glucosa para proporcionar una composición que comprende esteviósido, y

25 b. separación de esteviósido

También se describe un rebaudiósido puro I.

30 Se divulgan adicionalmente composiciones que comprenden rebaudiósido I. Por ejemplo, es una composición que comprende rebaudiósido I en una cantidad de aproximadamente 1 % a aproximadamente 99 % en peso. En otro ejemplo, es una composición de rebaudiósido A altamente purificada que comprende al menos aproximadamente al menos aproximadamente 80 % de rebaudiósido I en peso.

35 Se divulgan adicionalmente métodos de uso de rebaudiósido I como edulcorante, potenciador del sabor o potenciador del dulzor.

Se divulgan también composiciones edulcorantes, composiciones potenciadoras del sabor y composiciones potenciadoras del dulzor que comprenden rebaudiósido I.

40 También se divulgan consumibles que comprenden rebaudiósido I y composiciones que comprenden rebaudiósido I. Los consumibles de ejemplo incluyen composiciones farmacéuticas, mezclas o composiciones de gel comestible, composiciones dentales, dulces, composiciones de condimentos, composiciones de goma de mascar, composiciones de cereales, productos horneados, productos lácteos, composiciones edulcorantes de mesa, bebidas o productos de bebidas.

45 Breve descripción de los dibujos

50 Los dibujos adjuntos se incluyen para proporcionar una comprensión adicional de la invención. Los dibujos ilustran realizaciones de la invención y, junto con la descripción, sirven para explicar los principios de las realizaciones de la invención.

La Figura 1 muestra la producción biocatalítica de rebaudiósido I.

55 La Figura 2 muestra la producción biocatalítica de rebaudiósido A a partir de esteviósido usando la enzima UGT76G1 y el reciclaje concomitante de UDP a UDP glucosa a través de sacarosa sintasa.

La Figura 3 muestra la transformación catalizada por UGT76G1 de esteviósido a rebaudiósido A.

60 La Figura 4 muestra el perfil de reacción de la transformación catalizada por UGT76G1-R1-F12 del rebaudiósido A al rebaudiósido I.

La Figura 5 muestra la actividad de mutantes UGT para la conversión de rebaudiósido A en rebaudiósido I.

65 La Figura 6 muestra el trazo en HPLC de rebaudiósido I antes de la purificación.

La Figura 7 muestra los atributos sensoriales de rebaudiósido I a rebaudiósido M a 400 ppm en agua a 4°C.

Descripción detallada

Métodos para preparar rebaudiósido I

5 La presente invención proporciona un proceso biocatalítico para preparar una composición de rebaudiósido I poniendo en contacto una composición de partida que comprende rebaudiósido A con un biocatalizador capaz de convertir el rebaudiósido A en rebaudiósido I. La composición de rebaudiósido I puede procesarse opcionalmente para proporcionar un rebaudiósido altamente purificado I o incluso rebaudiósido I puro.

10 Como se usa en el presente documento, "composición de partida" se refiere a cualquier composición que contiene rebaudiósido A. Generalmente, la composición de partida es una solución acuosa.

15 La composición de partida puede ser rebaudiósido A purificado, una mezcla de glucósido de esteviol o un extracto de estevia. Las mezclas de esteviolglucósidos y los extractos de estevia que contenían rebaudiósido A, así como el rebaudiósido A altamente purificado, están disponibles comercialmente de diversos proveedores o pueden prepararse fácilmente mediante procesos proporcionados en la literatura. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 8,791,253 de The Coca-Cola Company proporciona métodos para obtener rebaudiósido A que tiene una pureza superior al 95 %.

20 En una realización, la composición de partida es rebaudiósido A purificado, es decir, >99 % en peso.

25 En otra realización, la composición de partida es una mezcla de glucósidos de esteviol. La identidad de la mezcla de glucósidos de esteviol no está particularmente limitada y puede contener glucósidos de esteviol de origen natural, por ejemplo, esteviolmonósido, esteviolbiósido, rubusósido, dulcósido B, dulcósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido G, esteviósido, rebaudiósido C, rebaudiósido F, rebaudiósido A, rebaudiósido I, rebaudiósido E, rebaudiósido H, rebaudiósido L, rebaudiósido K, rebaudiósido J, rebaudiósido M, rebaudiósido M2, rebaudiósido D, rebaudiósido D2, rebaudiósido N, rebaudiósido O; glucósidos de esteviol sintéticos, por ejemplo, glucósidos de esteviol enzimáticamente glucosilados y combinaciones de los mismos.

30 En algunas realizaciones, la composición de partida es una mezcla de glucósidos de esteviol o extracto de estevia que contiene rebaudiósido A en una cantidad de aproximadamente 1 % o más en peso, tal como, por ejemplo, aproximadamente 20 % o más, aproximadamente 30 % o mayor, aproximadamente 40 % o mayor, aproximadamente 50 % o mayor, aproximadamente 60 % o mayor, aproximadamente 70 % o mayor, aproximadamente 80 % o mayor o aproximadamente 90 % o mayor.

35 En una realización particular, la composición de partida es una mezcla de glucósidos de esteviol o el extracto de estevia contiene rebaudiósido A en una cantidad de aproximadamente 50 % o más en peso.

40 En otra realización particular, la composición de partida es una mezcla de glucósidos de esteviol o el extracto de estevia contiene rebaudiósido A en una cantidad de aproximadamente 80 % o más en peso.

45 En aún otra realización particular, la composición de partida es una mezcla de glucósidos de esteviol o el extracto de estevia contiene rebaudiósido A en una cantidad de aproximadamente 90 % o más en peso.

50 En otra realización particular más, la composición de partida es una mezcla de glucósidos de esteviol o el extracto de estevia contiene rebaudiósido A en una cantidad de aproximadamente el 95 % o más en peso, tal como, por ejemplo, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 %.

55 En particular, la composición de partida puede contener cierta cantidad de rebaudiósido I. Por ejemplo, la composición de partida es un extracto de estevia o una mezcla de glucósidos de esteviol. El contacto del biocatalizador con la composición de partida produce una composición de rebaudiósido I que contiene una mayor cantidad de rebaudiósido I en comparación con la cantidad de rebaudiósido I presente, si la hay, en la composición de partida. El aumento del rebaudiósido I se atribuye a la acción del biocatalizador.

60 En una realización particular, la cantidad de rebaudiósido I en la composición de rebaudiósido, es decir, la composición resultante del método de la presente invención, es aproximadamente 0.5, aproximadamente 1, aproximadamente 3, aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45, aproximadamente 50, aproximadamente 55, aproximadamente 60 o aproximadamente 65, aproximadamente 70 o aproximadamente 75 % o más que la cantidad de rebaudiósido I presente en la composición de partida.

65 La composición de partida se pone en contacto con el biocatalizador en un medio acuoso que comprende agua y, por ejemplo, diversos componentes seleccionados entre los que incluyen fuentes de carbono, fuentes de energía, fuentes de nitrógeno, microelementos, vitaminas, nucleósidos, fosfatos de nucleósidos, difosfatos de nucleósidos, trifosfatos de nucleósidos, sales orgánicas e inorgánicas, ácidos orgánicos y minerales, bases, etc. Las fuentes de

carbono incluyen glicerol, glucosa, dióxido de carbono, carbonatos, bicarbonatos. Las fuentes de nitrógeno pueden incluir nitratos, nitritos, aminoácidos, péptidos, peptonas o proteínas.

5 En una realización particular, el medio comprende regulador. Los reguladores adecuados incluyen, pero sin limitación, regulador PIPES, regulador acetato y regulador fosfato. En una realización particular, el medio comprende regulador fosfato.

10 En una realización, el medio también puede incluir un disolvente orgánico, por ejemplo, metanol, etanol, propanol y similares.

15 Como se usa en el presente documento, "biocatalizador" se refiere a una enzima capaz de convertir el rebaudiósido A en rebaudiósido I. La enzima puede ser natural o una proteína recombinante. Se usa al menos un biocatalizador para el presente método de conversión de rebaudiósido A en rebaudiósido I. Sin embargo, se pueden usar múltiples biocatalizadores, según sea necesario. Por consiguiente, en algunas realizaciones, se utilizan dos o más biocatalizadores, tales como, por ejemplo, tres o más biocatalizadores, cuatro o más biocatalizadores o cinco o más biocatalizadores.

20 El biocatalizador se puede proporcionar en forma de una suspensión celular entera, un lisado crudo, purificado o una combinación de los mismos. En una realización, el biocatalizador se proporciona en forma purificada, es decir, como una enzima purificada. En otra realización, el biocatalizador se proporciona en forma de un lisado crudo. En otra realización más, el biocatalizador se proporciona en forma de una suspensión celular entera.

25 En otra realización, el biocatalizador se proporciona en forma de una o más células, es decir, los biocatalizadores están asociados con una(s) célula(s). El biocatalizador puede ubicarse en la superficie de la célula, dentro de la célula, o tanto en la superficie de la célula como dentro de la célula.

30 En otra realización, el biocatalizador se proporciona en forma de un microorganismo, es decir, los biocatalizadores están asociados con un microorganismo. El microorganismo puede ser cualquier microorganismo que posea el (los) biocatalizador(es)/enzima(s) necesarios para convertir el rebaudiósido A en rebaudiósido I. Los microorganismos adecuados incluyen, entre otros, *E. coli*, *Saccharomyces sp.*, *Aspergillus sp.*, *Pichia sp.*, *Bacillus sp.*, *Yarrowia sp.* etc.

35 En una realización, el microorganismo está libre (es decir, no inmovilizado) cuando se pone en contacto con la composición de partida.

40 En otra realización, el microorganismo se inmoviliza cuando se pone en contacto con la composición de partida. Por ejemplo, el microorganismo puede inmovilizarse en un soporte sólido hecho de materiales inorgánicos u orgánicos. Ejemplos no limitantes de soportes sólidos adecuados para inmovilizar el microorganismo incluyen celulosa o vidrio derivado, cerámica, óxidos metálicos o membranas. El microorganismo se puede inmovilizar en el soporte sólido, por ejemplo, mediante unión covalente, adsorción, entrecruzamiento, atrapamiento o encapsulación.

En aún otra realización, el biocatalizador es secretado por el microorganismo en el medio de reacción.

45 Los biocatalizadores para convertir el rebaudiósido A en rebaudiósido I son UDP-glicosiltransferasas (UGT), que son UGT76G1-R1-F12, UGT76G1-R2-B9, UGT76G1-R3-G3.

Se divulga una enzima de biosíntesis de esteviol, por ejemplo, una enzima de la ruta del mevalonato (MVA).

50 También se describe una enzima de biosíntesis de esteviol, por ejemplo, una enzima de la ruta 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato no mevalonato (MEP/DOXP).

55 Se divulga adicionalmente una enzima de biosíntesis de esteviol seleccionada del grupo que consiste en geranilgeranil difosfato sintasa, copalil difosfato sintasa, kaureno sintasa, kaureno oxidasa, ácido kaurenoico 13-hidroxisilasa (KAH), esteviol sintetasa, desoxixilulosa 5-fosfato sintasa (DXS), D-1-desoxixilulosa-5-fosfato reductoisomerasa (DXR), 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa (CMS), 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol quinasa (CMK), 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa (MCS), 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol quinasa (CMK), 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol 2,4-ciclodifosfato sintasa (MCS), 1-hidroxi-2-metil-2(E)-butenil 4-difosfato sintasa (HDS), 1-hidroxi-2-metil-2(E)-butenil 4-difosfato reductasa (HDR), acetoacetil-CoA tiolasa, HMG-CoA reductasa truncada, mevalonato quinasa, fosfomevalonato quinasa, mevalonato pirofosfato descarboxilasa y citocromo P450 reductasa.

60 El biocatalizador utilizado en el método de la invención es una UGT capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido A para proporcionar el rebaudiósido I, a saber, UGT76G1-R1-F12, UGT76G1-R2-B9 y UGT76G1-R3-G3.

65

ES 2 805 014 T3

Se divulga adicionalmente una UGT seleccionada de la siguiente lista de números de identificación GenInfo, por ejemplo, del grupo presentado en la Tabla 1, o el grupo presentado en la Tabla 2.

397567	30680413	115480946	147798902	218193594	225443294
454245	32816174	116310259	147811764	218193942	225444853
1359905	32816178	116310985	147827151	219885307	225449296
1685003	34393978	116788066	147836230	222615927	225449700
1685005	37993665	116788606	147839909	222619587	225454338
2191136	37993671	116789315	147846163	222623142	225454340
2501497	37993675	119394507	147855977	222625633	225454342
2911049	39104603	119640480	148905778	222625635	225454473
4218003	41469414	122209731	148905999	222636620	225454475
4314356	41469452	125526997	148906835	222636621	225458362
13492674	42566366	125534279	148907340	222636628	225461551
13492676	42570280	125534461	148908935	222636629	225461556
15217773	42572855	125540090	148909182	224053242	225461558
15217796	44890129	125541516	148909920	224053386	225469538
15223396	46806235	125545408	148910082	224055535	225469540
15223589	50284482	125547340	148910154	224056138	226316457
15227766	51090402	125547520	148910612	224056160	226492603
15230017	51090594	125554547	148910769	224067918	226494221
15231757	52839682	125557592	156138791	224072747	226495389
15234056	56550539	125557593	156138797	224080189	226495945
15234195	62734263	125557608	156138799	224091845	226502400
15234196	62857204	125559566	156138803	224094703	226507980
15238503	62857206	125563266	165972256	224100653	226531147
15239523	62857210	125571055	168016721	224100657	226532094
15239525	62857212	125579728	171674071	224101569	238477377
15239543	75265643	125588307	171906258	224103105	240254512
15239937	75285934	125589492	183013901	224103633	242032615
15240305	75288884	125599469	183013903	224103637	242032621
15240534	77550661	125601477	186478321	224109218	242038423
15982889	77556148	126635837	187373030	224114583	242043290
18086351	82791223	126635845	187373042	224116284	242044836
18418378	83778990	126635847	190692175	224120552	242051252
18418380	89953335	126635863	194701936	224121288	242056217
18418382	110741436	126635867	195620060	224121296	242056219
19743740	110743955	126635883	209954691	224121300	242056663
19911201	115438196	126635887	209954719	224130358	242059339
20149064	115438785	133874210	209954725	224140703	242059341
20260654	115441237	133874212	209954733	224143404	242060922
21435782	115454819	145358033	210063105	224143406	242067411

ES 2 805 014 T3

(continuación)

21553613	115456047	147772508	210063107	224144306	242067413
21593514	115457492	147776893	212275846	224285244	242076258
22759895	115459312	147776894	216296854	225431707	242076396
23955910	115464719	147776895	217074506	225435532	242084750
26452040	115471069	147786916	218185693	225436321	242091005
28393204	115471071	147798900	218187075	225440041	242095206
30679796	115474009	147798901	218189427	225441116	242345159
242345161	297724601	326492035	356523945	357140904	359486938
255536859	297725463	326493430	356523957	357165849	359487055
255538228	297728331	326500410	356523959	357165852	359488135
255541676	297738632	326506816	356523961	357168415	359488708
255547075	297745347	326507826	356523963	357437837	359493630
255552620	297745348	326508394	356524387	357442755	359493632
255552622	297795735	326509445	356524403	357442757	359493634
255555343	297796253	326511261	356527181	357445729	359493636
255555361	297796257	326511866	356533209	357445731	359493815
255555363	297796261	326512412	356533852	357445733	359495856
255555365	297797587	326517673	356534718	357446799	359495858
255555369	297798502	326518800	356535480	357446805	359495869
255555373	297799226	326521124	356542996	357452779	359495871
255555377	297805988	326525567	356543136	357452781	359497638
255556812	297807499	326525957	356543932	357452783	359807261
255556818	297809125	326526607	356549841	357452787	374256637
255563008	297809127	326527141	356549843	357452789	377655465
255564074	297811403	326530093	356554358	357452791	378405177
255564531	297820040	326534036	356554360	357452797	378829085
255572878	297821483	326534312	356558606	357452799	387135070
255577901	297825217	332071132	356560333	357470367	387135072
255583249	297832276	339715876	356560599	357472193	387135078
255583253	297832280	342306012	356560749	357472195	387135092
255583255	297832518	342306016	356566018	357474295	387135094
255585664	297832520	343457675	356566169	357474493	387135098
255585666	297840825	343457677	356566173	357474497	387135100
255634688	297840827	350534960	356567761	357474499	387135134
255644801	297847402	356498085	356574704	357490035	387135136
255645821	297849372	356499771	356576401	357493567	387135174
255647456	300078590	356499777	356577660	357497139	387135176
255648275	300669727	356499779	357114993	357497581	387135184
260279126	302142947	356501328	357115447	357497671	387135186
260279128	302142948	356502523	357115451	357500579	387135188
261343326	302142950	356503180	357115453	357504663	387135190

ES 2 805 014 T3

(continuación)

283132367	302142951	356503184	357116080	357504691	387135192
283362112	302765302	356503295	357116928	357504699	387135194
289188052	302796334	356504436	357117461	357504707	387135282
295841350	302811470	356504523	357117463	357505859	387135284
296088529	302821107	356504765	357117829	357510851	387135294
296090415	302821679	356511113	357117839	357516975	387135298
296090524	319759260	356515120	357125059	359477003	387135300
296090526	319759266	356517088	357126015	359477998	387135302
297599503	320148814	356520732	357134488	359478043	387135304
297601531	326489963	356522586	357135657	359478286	387135312
297611791	326490273	356522588	357138503	359484299	387135314
297722841	326491131	356522590	357139683	359486936	387135316
387135318	449440433	460376293	460413408	462423864	475546199
387135320	449445896	460378310	460416351	470101924	475556485
387135322	449446454	460380744	462394387	470102280	475559699
387135324	449447657	460381726	462394433	470102858	475578293
387135326	449449002	460382093	462394557	470104211	475591753
387135328	449449004	460382095	462395646	470104264	475593742
388493506	449449006	460382754	462395678	470104266	475612072
388495496	449451379	460384935	462396388	470106317	475622476
388498446	449451589	460384937	462396389	470106357	475622507
388499220	449451591	460385076	462396419	470115448	475623787
388502176	449451593	460385872	462396542	470130404	482550481
388517521	449453712	460386018	462397507	470131550	482550499
388519407	449453714	460389217	462399998	470136482	482550740
388521413	449453716	460394872	462400798	470136484	482550999
388827901	449453732	460396139	462401217	470136488	482552352
388827903	449457075	460397862	462402118	470136492	482554970
388827907	449467555	460397864	462402237	470137933	482555336
388827909	449468742	460398541	462402284	470137937	482555478
388827913	449495638	460403139	462402416	470140422	482556454
393887637	449495736	460403141	462404228	470140426	482557289
393887646	449499880	460403143	462406358	470140908	482558462
393887649	449502786	460403145	462408262	470141232	482558508
393990627	449503471	460405998	462409325	470142008	482558547
397746860	449503473	460407578	462409359	470142010	482561055
397789318	449515857	460407590	462409777	470142012	482561555
413924864	449518643	460409128	462411467	470143607	482562795
414590349	449519559	460409134	462414311	470143939	482562850
414590661	449522783	460409136	462414416	470145404	482565074
414591157	449524530	460409459	462414476	473923244	482566269

ES 2 805 014 T3

(continuación)

414879558	449524591	460409461	462415526	474114354	482566296
414879559	449528823	460409463	462415603	474143634	482566307
414879560	449528825	460409465	462415731	474202268	482568689
414888074	449534021	460409467	462416307	474299266	482570049
431812559	460365546	460410124	462416920	474363119	482570572
449432064	460366882	460410126	462416922	474366157	482575121
449432066	460369823	460410128	462416923	474429346	
449433069	460369829	460410130	462416924	475432777	
449436944	460369831	460410132	462417401	475473002	
449438665	460369833	460410134	462419769	475489790	
449438667	460370755	460410213	462420317	475511330	
449440431	460374714	460411200	462423366	475516200	

Tabla 1

Número GI	Acceso	Origen
190692175	ACE87855.1	<i>Stevia rebaudiana</i>
41469452	AAS07253.1	<i>Oryza sativa</i>
62857204	BAD95881.1	<i>Ipomoea nil</i>
62857206	BAD95882.1	<i>Ipomoea purpurea</i>
56550539	BAD77944.1	<i>Bellis perennis</i>
115454819	NP_001051010.1	Grupo <i>Oryza sativa Japonica</i>
115459312	NP_001053256.1	Grupo <i>Oryza sativa Japonica</i>
115471069	NP_001059133.1	Grupo <i>Oryza sativa Japonica</i>
115471071	NP_001059134.1	Grupo <i>Oryza sativa Japonica</i>
116310985	CAH67920.1	Grupo <i>Oryza sativa Indica</i>
116788066	ABK24743.1	<i>Picea sitchensis</i>
122209731	Q2V6J9.1	<i>Fragaria x ananassa</i>
125534461	EAY81009.1	Grupo <i>Oryza sativa Indica</i>
125559566	EAZ05102.1	Grupo <i>Oryza sativa Indica</i>
125588307	EAZ28971.1	Grupo <i>Oriza sativa Japonica</i>
148907340	ABR16806.1	<i>Picea sitchensis</i>
148910082	ABR18123.1	<i>Picea sitchensis</i>
148910612	ABR18376.1	<i>Picea sitchensis</i>
15234195	NP_194486.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
15239523	NP_200210.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
15239937	NP_196793.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
1685005	AAB36653.1	<i>Nicotiana tabacum</i>
183013903	ACC38471.1	<i>Medicago truncatula</i>
186478321	NP_172511.3	<i>Arabidopsis thaliana</i>

ES 2 805 014 T3

(continuación)

Número GI	Acceso	Origen
187373030	ACD03249.1	<i>Avena strigosa</i>
194701936	ACF85052.1	<i>Zea mays</i>
19743740	AAL92461.1	<i>Solanum lycopersicum</i>
212275846	NP_001131009.1	<i>Zea mays</i>
222619587	EEE55719.1	<i>Grupo Oryza sativa Japonica</i>
224055535	XP_002298527.1	<i>Populus trichocarpa</i>
224101569	XP_002334266.1	<i>Populus trichocarpa</i>
224120552	XP_002318358.1	<i>Populus trichocarpa</i>
224121288	XP_002330790.1	<i>Populus trichocarpa</i>
225444853	XP_002281094	<i>Vitis vinifera</i>
225454342	XP_002275850.1	<i>Vitis vinifera</i>
225454475	XP_002280923.1	<i>Vitis vinifera</i>
225461556	XP_002285222	<i>Vitis vinifera</i>
225469540	XP_002270294.1	<i>Vitis vinifera</i>
226495389	NP_001148083.1	<i>Zea mays</i>
226502400	NP_001147674.1	<i>Zea mays</i>
238477377	ACR43489.1	<i>Triticum aestivum</i>
240254512	NP_565540.4	<i>Arabidopsis thaliana</i>
2501497	Q43716.1	<i>Petunia x hybrida</i>
255555369	XP_002518721.1	<i>Ricinus communis</i>
26452040	BAC43110.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
296088529	CBI37520.3	<i>Vitis vinifera</i>
297611791	NP_001067852.2	<i>Grupo Oryza sativa Japonica</i>
297795735	XP_002865752.1	<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>
297798502	XP_002867135.1	<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>
297820040	XP_002877903.1	<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>
297832276	XP_002884020.1	<i>Arabidopsis lyrata subsp. lyrata</i>
302821107	XP_002992218.1	<i>Selaginella moellendorffii</i>
30680413	NP_179446.2	<i>Arabidopsis thaliana</i>
319759266	ADV71369.1	<i>Pueraria montana var. lobata</i>
326507826	BAJ86656.1	<i>Hordeum vulgare subsp. Vulgare</i>
343457675	AEM37036.1	<i>Brassica rapa subsp. oleifera</i>
350534960	NP_001234680.1	<i>Solanum lycopersicum</i>
356501328	XP_003519477.1	<i>Glycine max</i>
356522586	XP_003529927.1	<i>Glycine max</i>
356535480	XP_003536273.1	<i>Glycine max</i>

ES 2 805 014 T3

(continuación)

Número GI	Acceso	Origen
357445733	XP_003593144.1	<i>Medicago truncatula</i>
357452783	XP_003596668.1	<i>Medicago truncatula</i>
357474493	XP_003607531.1	<i>Medicago truncatula</i>
357500579	XP_003620578.1	<i>Medicago truncatula</i>
357504691	XP_003622634.1	<i>Medicago truncatula</i>
359477998	XP_003632051.1	<i>Vitis vinifera</i>
359487055	XP_002271587	<i>Vitis vinifera</i>
359495869	XP_003635104.1	<i>Vitis vinifera</i>
387135134	AFJ52948.1	<i>Linum usitatissimum</i>
387135176	AFJ52969.1	<i>Linum usitatissimum</i>
387135192	AFJ52977.1	<i>Linum usitatissimum</i>
387135282	AFJ53022.1	<i>Linum usitatissimum</i>
387135302	AFJ53032.1	<i>Linum usitatissimum</i>
387135312	AFJ53037.1	<i>Linum usitatissimum</i>
388519407	AFK47765.1	<i>Medicago truncatula</i>
393887646	AFN26668.1	<i>Barbarea vulgaris subsp. arcuata</i>
414888074	DAA64088.1	<i>Zea mays</i>
42572855	NP_974524.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>
449440433	XP_004137989.1	<i>Cucumis sativus</i>
449446454	XP_004140986.1	<i>Cucumis sativus</i>
449449004	XP_004142255.1	<i>Cucumis sativus</i>
449451593	XP_004143546.1	<i>Cucumis sativus</i>
449515857	XP_004164964.1	<i>Cucumis sativus</i>
460382095	XP_004236775.1	<i>Solanum lycopersicum</i>
460409128	XP_004249992.1	<i>Solanum lycopersicum</i>
460409461	XP_004250157.1	<i>Solanum lycopersicum</i>
460409465	XP_004250159.1	<i>Solanum lycopersicum</i>
462396388	EMJ02187.1	<i>Prunus persica</i>
462402118	EMJ07675.1	<i>Prunus persica</i>
462409359	EMJ14693.1	<i>Prunus persica</i>
462416923	EMJ21660.1	<i>Prunus persica</i>
46806235	BAD17459.1	<i>Grupo Oryza Japonica sativa</i>
470104266	XP_004288529.1	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>
470142008	XP_004306714.1	<i>Fragaria vesca subsp. vesca</i>
475432777	EMT01232.1	<i>Aegilops tauschii</i>
51090402	BAD35324.1	<i>Grupo Oryza sativa Japonica</i>

Tabla 2

Número GI	Adhesión	Origen	Referencia interna
460409128	XP.004249992.1	<i>Solanum lycopersicum</i>	UGTSL
460386018	XP.004238697.1	<i>Solanum lycopersicum</i>	-
460409134	XP.004249995.1	<i>Solanum lycopersicum</i>	-
460410132	XP.004250485.1	<i>Solanum lycopersicum</i>	UGTSL2
460410130	XP.004250484.1	<i>Solanum lycopersicum</i>	-
460410128	XP.004250483.1	<i>Solanum lycopersicum</i>	-
460378310	XP.004234916.1	<i>Solanum lycopersicum</i>	-
209954733	BAG80557.1	<i>Lycium barbarum</i>	UGTLB
209954725	BAG80553.1	<i>Lycium barbarum</i>	-

5 Se divulga una variante UGT76G1 que contiene una o más mutaciones puntuales que mejoran la conversión del rebaudiósido A al rebaudiósido I al menos aproximadamente un 5 % en comparación con el uso del UGT76G1 no mutado en las mismas condiciones (en donde los resultados se normalizan). También Se divulga una variante UGT76G1 que contiene una o más mutaciones puntuales que mejoran la conversión del rebaudiósido D al rebaudiósido M al menos aproximadamente un 5 % en comparación con el uso del UGT76G1 no mutado en las mismas condiciones (en donde los resultados se normalizan).

10 Se divulga una variante UGT76G1 purificada, es decir, una UGT76G1 proporcionada en forma de una enzima purificada. Por ejemplo, es una variante UGT76G1 proporcionada en forma de un lisado crudo. En otro ejemplo, es una variante UGT76G1 proporcionada en forma de una suspensión celular entera.

15 Un biocatalizador usado en el método de la invención es UGT76G1-R1-F12. En una realización particular, el biocatalizador es UGT76G1-R1-F12 proporcionado en forma de una enzima purificada. En otra realización particular, el biocatalizador es UGT76G1-R1-F12 proporcionado en forma de un lisado crudo. En otra realización particular más, el biocatalizador es UGT76G1-R1-F12 proporcionado en forma de una suspensión celular entera.

20 Otro biocatalizador utilizado en el método de la invención es UGT76G1-R2-B9. En una realización particular, el biocatalizador es UGT76G1-R2-B9 purificado, es decir, UGT76G1-R2-B9 proporcionado en forma de una enzima purificada. En otra realización particular, el biocatalizador es UGT76G1-R2-B9 proporcionado en forma de un lisado. En otra realización particular más, el biocatalizador es UGT76G1-R2-B9 proporcionado en forma de una suspensión celular entera.

25 Otro biocatalizador utilizado en el método de la invención es UGT76G1-R3-G3. En una realización particular, el biocatalizador es UGT76G1-R3-G3 purificado, es decir, UGT76G1-R3-G3 proporcionado en forma de una enzima purificada. En otra realización particular, el biocatalizador es UGT76G1-R3-G3 proporcionado en forma de un lisado crudo. En otra realización particular más, el biocatalizador es UGT76G1-R3-G3 proporcionado en forma de una suspensión celular entera.

30 La utilización de una de estas variantes de UGT76G1 como biocatalizador en el método de la presente invención da como resultado una mayor conversión de rebaudiósido A a rebaudiósido I de al menos aproximadamente 5 % en comparación con el uso del UGT76G1 no mutado en las mismas condiciones (en donde los resultados están normalizados). En realizaciones preferidas, la conversión se incrementa de aproximadamente 5 % a aproximadamente 1.000.000 %, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 100.000 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 10.000 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 1.000 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 500 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 250 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 100 %, de aproximadamente 50 %, de aproximadamente 20 % a aproximadamente 50 %, de aproximadamente 30 % a aproximadamente 50 % o aproximadamente 40 % a aproximadamente 50 %.

35 Opcionalmente, los métodos de la presente invención comprenden además reciclar UDP para proporcionar UDP-glucosa. En consecuencia, los métodos comprenden el reciclaje concomitante de UDP al proporcionar un catalizador de reciclaje, es decir, un catalizador capaz de sobreproducción de UDP-glucosa, y un sustrato de reciclaje, de modo que la conversión de rebaudiósido A en rebaudiósido I se lleve a cabo utilizando cantidades catalíticas de UDP-glucosiltransferasa y UDP-glucosa (figura 2).

45

En una realización, el catalizador de reciclaje de UDP-glucosa es sacarosa sintasa y el sustrato de reciclaje es sacarosa.

5 En una realización particular, el método de la presente invención proporciona una composición de rebaudiósido I que comprende rebaudiósido I en una cantidad de aproximadamente 1 % o más en peso, tal como, por ejemplo, aproximadamente 5 % o más, aproximadamente 10 % o más, aproximadamente 20 % o más, aproximadamente 30 % o más, aproximadamente 40 % o más, aproximadamente 50 % o más, aproximadamente 60 % o más, aproximadamente 70 % o más, aproximadamente 80 % o más o aproximadamente 90 % o más en peso.

10 En una realización particular, el método proporciona una composición que comprende rebaudiósido I en una cantidad de aproximadamente 50 % o más en peso.

En otra realización particular, el método proporciona una composición que comprende rebaudiósido I en una cantidad de aproximadamente 80 % o más en peso.

15 En aún otra realización particular, el método proporciona una composición que comprende rebaudiósido I en una cantidad de aproximadamente 90 % o más en peso.

20 En aún otra realización particular, el método proporciona una composición que comprende rebaudiósido I en una cantidad de aproximadamente 95 % o más en peso, tal como, por ejemplo, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % por peso.

25 Opcionalmente, el método de la presente invención comprende adicionalmente separar el rebaudiósido I del medio. Se puede usar cualquier método de separación de método adecuado, tal como, por ejemplo, lisis, cristalización, separación por membranas, centrifugación, extracción (fase líquida o sólida), separación cromatográfica, HPLC (preparativa o analítica) o una combinación de tales métodos. En una realización particular, el aislamiento se puede lograr por lisis y centrifugación.

30 En una realización, el rebaudiósido I se elimina continuamente del medio mientras progresa la conversión. En otra realización, el rebaudiósido I se separa, y opcionalmente se purifica, del medio después de la finalización de la reacción.

35 La separación del medio puede dar como resultado composiciones que tienen un contenido de rebaudiósido I más bajo que el deseado y/o la composición puede contener componentes adicionales, por ejemplo, glucósidos de esteviol no deseables (en identidad o contenido) y/o productos de reacción residuales. Por consiguiente, la composición puede purificarse adicionalmente para proporcionar una composición de rebaudiósido I altamente purificada. El término "altamente purificado", como se usa en el presente documento, se refiere a una composición que tiene más del 80 % en peso de rebaudiósido I en seco. En una realización, la composición de rebaudiósido I altamente purificada contiene más de aproximadamente 90 % de rebaudiósido I en peso, tal como, por ejemplo, más de aproximadamente 91 %, más de aproximadamente 92 %, más de aproximadamente 93 %, más de aproximadamente 94 %, mayor que aproximadamente 95 %, mayor que aproximadamente 96 %, mayor que aproximadamente 97 %, mayor que aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % por rebaudiósido I en peso. En realizaciones de ejemplo, la composición puede purificarse adicionalmente para proporcionar un rebaudiósido I puro, es decir, >99 % en peso de rebaudiósido I sobre una base seca.

45 La purificación puede verse afectada por cualquier medio conocido por un experto en la técnica, que incluye, pero no se limita a, cristalización, separación por membranas, centrifugación, extracción (fase líquida o sólida), separación cromatográfica, HPLC (preparativa o analítica) o una combinación de tales métodos. En una realización particular, se usa HPLC para purificar el rebaudiósido I. En una realización más particular, se usa HPLC semipreparativa para purificar el rebaudiósido I.

50 En una realización más particular, la presente invención proporciona un método para preparar una composición de rebaudiósido I, que comprende (a) poner en contacto una composición de partida que comprende rebaudiósido A con una variante UGT76G1 seleccionada del grupo que consiste en UGT76G1-R1-F12, UGT76G1-R2-B9 y UGT76G1-R3-G3 y UDP-glucosa para formar una composición que comprende rebaudiósido I y (b) separar el rebaudiósido I para proporcionar una composición de rebaudiósido I separada. Opcionalmente, el método comprende el reciclaje concomitante de UDP-glucosa al proporcionar sacarosa sintasa y sacarosa en (a).

60 En otra realización más particular, la presente invención proporciona un método para preparar una composición de rebaudiósido I, que comprende (a) poner en contacto un medio que contiene una composición de partida que comprende rebaudiósido A con una variante UGT76G1 seleccionada del grupo que consiste en UGT76G1-R1- F12, UGT76G1-R2-B9 y UGT76G1-R3-G3 y UDP-glucosa para formar una composición que comprende el rebaudiósido I y (b) separar el rebaudiósido I del medio para proporcionar una composición de rebaudiósido I separada. Opcionalmente, el método comprende el reciclaje concomitante de UDP-glucosa al proporcionar sacarosa sintasa y sacarosa en (a).

65

5 En una realización aún más particular, la presente invención proporciona un método para preparar una composición de rebaudiósido I, que comprende (a) poner en contacto una composición de partida que comprende rebaudiósido A con una variante UGT76G1 seleccionada del grupo que consiste en UGT76G1-R1-F12, UGT76G1-R2-B9, y UGT76G1-R3-G3 y UDP-glucosa para formar una composición que comprende rebaudiósido I, (b) separar el rebaudiósido I para proporcionar una composición del rebaudiósido I separada y (c) purificar la composición del rebaudiósido I separada para proporcionar una composición de rebaudiósido I altamente purificada. Opcionalmente, el método comprende el reciclaje concomitante de UDP-glucosa al proporcionar sacarosa sintasa y sacarosa en (a).

10 En otra realización más particular, la presente invención proporciona un método para preparar una composición de rebaudiósido I, que comprende (a) poner en contacto un medio que contiene una composición de partida que comprende rebaudiósido A con una variante UGT76G1 seleccionada del grupo que consiste en UGT76G1-R1- F12, UGT76G1-R2-B9 y UGT76G1-R3-G3 y UDP-glucosa para formar una composición que comprende el rebaudiósido I, (b) separar el rebaudiósido I del medio para proporcionar una composición de rebaudiósido I separada y (c) purificar el rebaudiósido separado composición I para proporcionar una composición de rebaudiósido I altamente purificada. Opcionalmente, el método comprende el reciclaje concomitante de UDP-glucosa al proporcionar sacarosa sintasa y sacarosa en (a).

20 En aún otra realización particular, la presente invención proporciona un método para preparar una composición de rebaudiósido I, que comprende (a) poner en contacto una composición de partida que comprende rebaudiósido A con una variante UGT76G1 seleccionada del grupo que consiste en UGT76G1-R1-F12, UGT76G1-R2-B9 y UGT76G1-R3-G3 y UDP-glucosa para formar una composición que comprende rebaudiósido I y (b) purificar la composición que comprende rebaudiósido I para proporcionar una composición de rebaudiósido I altamente purificada. Opcionalmente, el método comprende el reciclaje concomitante de UDP-glucosa al proporcionar sacarosa sintasa y sacarosa en (a).

25 En aún otra realización particular, la presente invención proporciona un método para preparar una composición de rebaudiósido I, que comprende (a) poner en contacto un medio que contiene una composición de partida que comprende rebaudiósido A con una variante UGT76G1 seleccionada del grupo que consiste en UGT76G1-R1- F12, UGT76G1-R2-B9 y UGT76G1-R3-G3 y UDP-glucosa para formar una composición que comprende rebaudiósido I y (b) purificar la composición que comprende rebaudiósido I para proporcionar una composición de rebaudiósido I altamente purificada. Opcionalmente, el método comprende el reciclaje concomitante de UDP-glucosa al proporcionar sacarosa sintasa y sacarosa en (a).

35 La fermentación también se puede usar para la síntesis de novo de rebaudiósido I. Por ejemplo, un método para producir una composición de rebaudiósido I, que comprende (a) poner en contacto glucosa con un microorganismo que contiene al menos una enzima capaz de convertir glucosa en rebaudiósido I para proporcionar una composición de rebaudiósido I, y (b) separar el rebaudiósido I para proporcionar una composición de rebaudiósido I separada. Opcionalmente, el método comprende adicionalmente purificar el rebaudiósido I para proporcionar un rebaudiósido altamente I purificado.

40 La fermentación y los pasos biocatalíticos pueden usarse secuencialmente. Por ejemplo, la fermentación de una composición que comprende glucosa con un microorganismo que contiene al menos una enzima capaz de convertir glucosa en un glucósido de esteviol objetivo, por ejemplo, el rebaudiósido A se puede realizar primero. El glucósido de esteviol objetivo, por ejemplo, el rebaudiósido A (que ahora se convierte en el material de partida para los fines de la siguiente bioconversión), puede ponerse en contacto con un biocatalizador capaz de convertirlo en el siguiente glucósido de esteviol objetivo, por ejemplo, rebaudiósido I.

45 Entre cada conversión, el glucósido de esteviol objetivo puede separarse opcionalmente del medio antes de entrar en contacto con el siguiente biocatalizador.

50 En una realización, el rebaudiósido A de la composición de partida para el presente método se prepara poniendo en contacto el esteviósido con una enzima capaz de convertir el esteviósido en rebaudiósido A. En una realización particular, la enzima es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadirse a al menos una unidad de glucosa para producir el rebaudiósido A. La UDP-glucosiltransferasa puede ser, por ejemplo, UGT76G1.

55 En una realización más particular, la presente invención proporciona un método para preparar una composición de rebaudiósido I, que comprende (a) poner en contacto una composición que comprende esteviósido con UGT76G1 y UDP-glucosa para proporcionar una composición que comprende rebaudiósido A, (b) separar el rebaudiósido A, (c) poner en contacto una composición que comprende rebaudiósido A con una variante UGT76G1 seleccionada del grupo que consiste en UGT76G1-R1-F12, UGT76G1-R2-B9 y UGT76G1-R3-G3 y UDP-glucosa para proporcionar una composición que comprende rebaudiósido I y (d) separar el rebaudiósido I para proporcionar una composición de rebaudiósido I separada. El método puede comprender además purificar la composición de rebaudiósido I separada para proporcionar una composición de rebaudiósido I altamente purificada. Opcionalmente, el método comprende el reciclaje concomitante de UDP-glucosa en uno o ambos pasos de contacto proporcionando sacarosa sintasa y sacarosa.

En otra realización más particular, la presente invención proporciona un método para preparar una composición de rebaudiósido I, que comprende (a) poner en contacto un medio que contiene una composición que comprende esteviósido con UGT76G1 y UDP-glucosa para proporcionar una composición que comprende rebaudiósido A, (b) separando el rebaudiósido A del medio, (c) poniendo en contacto un medio que contiene una composición que comprende rebaudiósido A con una variante UGT76G1 seleccionada del grupo que consiste en UGT76G1-R1-F12, UGT76G1-R2-B9 y UGT76G1-R3-G3 y UDP-glucosa para proporcionar una composición que comprende rebaudiósido I y (d) separar el rebaudiósido I del medio para proporcionar una composición de rebaudiósido I separada. El método puede comprender además purificar la composición de rebaudiósido I separada para proporcionar una composición de rebaudiósido I altamente purificada. Opcionalmente, el método comprende el reciclaje concomitante de UDP-glucosa en uno o ambos pasos de contacto proporcionando sacarosa sintasa y sacarosa.

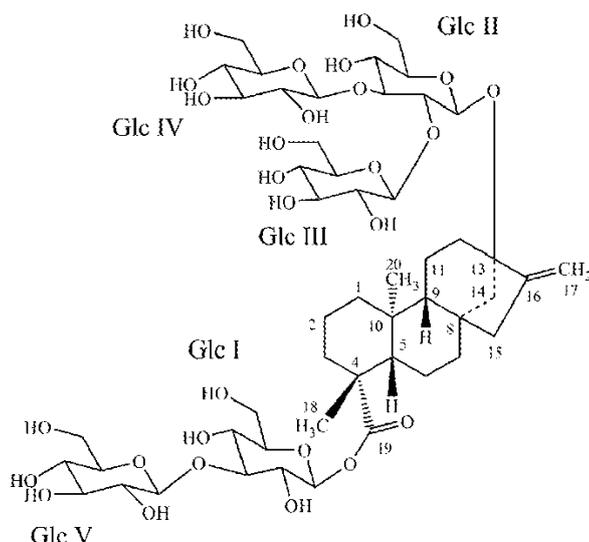
En una realización, el esteviósido se prepara poniendo en contacto el rubusósido con una enzima capaz de convertir el rubusósido en esteviósido. En una realización particular, la enzima es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de agregar al menos una unidad de glucosa al rubusósido, produciendo así esteviósido. La UDP-glucosiltransferasa puede ser, por ejemplo, UGT91D2 o variantes de la misma que tienen una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente el 75 % o más. Las variantes de ejemplo de UGT91D2 incluyen, entre otras, UGTSL y UGTSL2.

En una realización más particular, la presente invención proporciona un método para preparar una composición de rebaudiósido I, que comprende (a) poner en contacto una composición que comprende rubusósido con UGT91D2, o una variante del mismo que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente 75 % o más, y UDP-glucosa para proporcionar una composición que comprende esteviósido, (b) separar esteviósido, (c) poner en contacto una composición que comprende esteviósido con UGT76G1 y UDP-glucosa para proporcionar una composición que comprende rebaudiósido A, (d) separar rebaudiósido A, (e) ponerse en contacto con una composición que comprende rebaudiósido A con una variante UGT76G1 seleccionada del grupo que consiste en UGT76G1-R1-F12, UGT76G1-R2-B9 y UGT76G1-R3-G3 y UDP-glucosa para proporcionar una composición que comprende rebaudiósido I y (f) separación de rebaudiósido I para proporcionar una composición separada de rebaudiósido I. El método puede comprender además purificar la composición de rebaudiósido I separada para proporcionar una composición de rebaudiósido I altamente purificada. Opcionalmente, el método comprende el reciclaje concomitante de UDP-glucosa en cualquiera o en todos los pasos de contacto proporcionando sacarosa sintasa y sacarosa. Las variantes de ejemplo de UGT91D2 incluyen, entre otras, UGTSL y UGTSL2.

En otra realización más particular, la presente invención proporciona un método para preparar una composición de rebaudiósido I, que comprende (a) poner en contacto un medio que contiene una composición que comprende rubusósido con UGT91D2, o una variante del mismo que tiene una secuencia de aminoácidos de aproximadamente 75 % o más identidad y UDP-glucosa para proporcionar una composición que comprende esteviósido, (b) separar el esteviósido del medio, (c) poner en contacto un medio que contiene una composición que comprende esteviósido con UGT76G1 y UDP-glucosa para proporcionar una composición que comprende rebaudiósido A, (d) separar el rebaudiósido A del medio, (e) poner en contacto un medio que contiene una composición que comprende el rebaudiósido A con una variante UGT76G1 seleccionada del grupo que consiste en UGT76G1-R1-F12, UGT76G1-R2-B9 y UGT76G1-R3-G3 y UDP-glucosa para proporcionar una composición que comprende rebaudiósido I y (f) separando el rebaudiósido I del medio. El método puede comprender además purificar la composición de rebaudiósido I separada para proporcionar un rebaudiósido I altamente purificado. Opcionalmente, el método comprende el reciclaje concomitante de UDP-glucosa en cualquiera o en todas las etapas de contacto proporcionando sacarosa sintasa y sacarosa. Las variantes de ejemplo de UGT91D2 incluyen, entre otras, UGTSL y UGTSL2.

Compuestos y Composiciones

El método de la presente invención proporciona rebaudiósido I que tiene la siguiente fórmula:



Ácido (13-[(2-O-β-D-glucopiranosil-3-O-β-D-glucopiranosil)-β-D-glucopiranosil]oxi]ent-kaur-16-en-19-oico-(3-O-β-D-glucopiranosil)-β-D-glucopiranosil)éster] (Rebaudiósido I)

5 En realizaciones de ejemplo, el rebaudiósido I puede estar aislado y puro (es decir, >99 % de rebaudiósido I en peso sobre una base seca) o aislado y altamente purificado (es decir, más de aproximadamente 80 % en peso sobre una base seca).

10 También se divulgan composiciones, particularmente consumibles, que comprenden rebaudiósido I.

En un ejemplo, la composición comprende rebaudiósido I proporcionado como parte de una mezcla. Por ejemplo, la mezcla se selecciona del grupo que consiste en una mezcla de glucósidos de esteviol, un extracto de estevia, subproductos de otros procesos de aislamiento y purificación de glucósidos de esteviol, o cualquier combinación de los mismos. En un ejemplo, la mezcla contiene rebaudiósido I en una cantidad que varía de aproximadamente 1 % a aproximadamente 99 % en peso sobre una base seca, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 99 %, de aproximadamente 3 % a aproximadamente 99 %, de aproximadamente 4 % a aproximadamente 99 %, de aproximadamente 5 % a aproximadamente 99 %, de aproximadamente 10 % a aproximadamente 99 %, de aproximadamente 20 % a aproximadamente 99 %, de aproximadamente 30 % a aproximadamente 99 %, de aproximadamente 40 % a aproximadamente 99 %, de aproximadamente 50 % a aproximadamente 99 %, de aproximadamente 60 % a aproximadamente 99 %, de aproximadamente 70 % a aproximadamente 99 %, de aproximadamente 80 % a aproximadamente 99 % y de aproximadamente 90 % a aproximadamente 99 %. Por ejemplo, la mezcla contiene rebaudiósido I en una cantidad mayor que aproximadamente 90 % en peso sobre una base seca, por ejemplo, mayor que aproximadamente 91 %, mayor que aproximadamente 92 %, mayor que aproximadamente 93 %, mayor que aproximadamente 94 %, mayor que aproximadamente 95 %, mayor que aproximadamente 96 %, mayor que aproximadamente 97 %, mayor que aproximadamente 98 % y mayor que aproximadamente 99 %.

En un ejemplo, la composición comprende rebaudiósido I, proporcionado en forma de extracto de estevia. El extracto de estevia contiene uno o más glucósidos de esteviol adicionales que incluyen, entre otros, glucósidos de esteviol de origen natural, por ejemplo, esteviolmonósido, esteviolbiósido, rubusósido, dulcósido B, dulcósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido G, esteviósido, rebaudiósido C, rebaudiósido F, rebaudiósido A, rebaudiósido I, rebaudiósido E, rebaudiósido H, rebaudiósido L, rebaudiósido K, rebaudiósido J, rebaudiósido M, rebaudiósido M2, rebaudiósido D, rebaudiósido D2, rebaudiósido N, rebaudiósido O, glucósidos de esteviol sintéticos, por ejemplo, glucósidos de esteviol enzimáticamente glucosilados y combinaciones de los mismos.

En otro ejemplo, el método de la presente invención proporciona rebaudiósido I como un compuesto puro, es decir, >99 % de pureza en seco.

40 El rebaudiósido I puede estar presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 1 ppm a aproximadamente 10.000 ppm cuando la composición se agrega a un consumible, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 15 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 25 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 300 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 400 ppm a aproximadamente

10.000 ppm, de aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 600 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 700 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 800 a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 900 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 1.000 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 2.000 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 3.000 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 4.000 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 5.000 ppm a aproximadamente 10.000 ppm.

En otro ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 1.000 ppm cuando la composición se agrega a un consumible, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 800 ppm, de aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 800 ppm, de aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 600 ppm o de aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 250 ppm. Por ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 300 ppm a aproximadamente 600 ppm cuando la composición se agrega a un consumible.

Por ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 800 ppm cuando la composición se agrega a un consumible, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 100 ppm, aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 150 ppm, aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 250 ppm, aproximadamente 250 ppm a aproximadamente 300 ppm, de aproximadamente 300 ppm a aproximadamente 350 ppm, aproximadamente 350 ppm a aproximadamente 400 ppm, de aproximadamente 400 ppm a aproximadamente 450 ppm, aproximadamente 450 ppm a aproximadamente 500 ppm, aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 550 ppm, aproximadamente 550 ppm a aproximadamente 600 ppm, aproximadamente 600 ppm a aproximadamente 650 ppm, aproximadamente 650 ppm a aproximadamente 700 ppm, aproximadamente 700 ppm a aproximadamente 750 ppm o aproximadamente 750 ppm a aproximadamente 800 ppm.

Por ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de entre aproximadamente 200 ppm y aproximadamente 300 ppm cuando la composición se agrega a una bebida.

Por ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de entre aproximadamente 500 ppm y aproximadamente 600 ppm cuando la composición se agrega a una bebida.

En otro ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 50 ppm, aproximadamente 100 ppm, aproximadamente 150 ppm, aproximadamente 200 ppm, aproximadamente 250 ppm, aproximadamente 300 ppm, aproximadamente 350 ppm, aproximadamente 400 ppm, aproximadamente 450 ppm, aproximadamente 500 ppm, aproximadamente 550 ppm, aproximadamente 600 ppm, aproximadamente 650 ppm, aproximadamente 700 ppm, aproximadamente 750 ppm o aproximadamente 800 pm cuando la composición se agrega a un consumible.

Por ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 200 ppm cuando la composición se agrega a una bebida.

Por ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 275 ppm cuando la composición se agrega a una bebida.

Por ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 550 ppm cuando la composición se agrega a una bebida.

Por ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 600 ppm cuando la composición se agrega a una bebida.

Por ejemplo, el rebaudiósido I aislado y purificado o la composición que contiene el rebaudiósido I exhiben una intensidad menos dulce que el rebaudiósido M. En una realización particular, el rebaudiósido I aislado y purificado o una composición que contiene el rebaudiósido I exhiben aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 % o aproximadamente 50 % menos intensidad de dulzor persistente que el rebaudiósido M.

Composiciones Edulcorantes

También Se divulga una composición edulcorante que comprende rebaudiósido I. Además Se divulga una composición edulcorante que comprende rebaudiósido I altamente purificado o puro.

La "composición edulcorante", como se usa en el presente documento, se refiere a una composición útil para endulzar una composición endulzable (es decir, una composición que puede endulzarse) que contiene al menos un componente dulce en combinación con al menos otra sustancia.

5 En un ejemplo, el rebaudiósido I es el único edulcorante en la composición edulcorante, es decir, el rebaudiósido I es el único compuesto presente en la composición edulcorante que proporciona un dulzor detectable. En otro ejemplo, la composición edulcorante incluye un compuesto de rebaudiósido I en combinación con uno o más compuestos edulcorantes.

10 Por ejemplo, la composición edulcorante comprende rebaudiósido I y compuesto seleccionado del grupo que consiste en Reb A, B, C, D, E, M, N, O, M2, D2, glucósidos de esteviol glicosilados, Mogrósido V, eritritol, alulosa, extracto de estevia, extracto de Luo Han Guo y combinaciones de los mismos.

15 La cantidad de rebaudiósido I en la composición edulcorante puede variar. En un ejemplo, el rebaudiósido I está presente en una composición edulcorante en cualquier cantidad para impartir el dulzor deseado cuando la composición edulcorante se agrega a una composición edulcorable o consumible edulcorable.

20 El dulzor de un edulcorante sin sacarosa también se puede medir frente a una referencia de sacarosa determinando la equivalencia de sacarosa del edulcorante sin sacarosa. Típicamente, los panelistas de sabor están entrenados para detectar el dulzor de las soluciones de sacarosa de referencia que contenían entre 1-15 % de sacarosa (p/v). Luego se prueban otros edulcorantes sin sacarosa en una serie de diluciones para determinar la concentración del edulcorante sin sacarosa que es tan dulce como un porcentaje dado de referencia de sacarosa. Por ejemplo, si una solución de edulcorante al 1 % es tan dulce como una solución de sacarosa al 10 %, entonces se dice que el edulcorante es 10 veces más potente que la sacarosa.

25 En un ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición edulcorante en una cantidad efectiva para proporcionar una equivalencia de sacarosa de más de aproximadamente 10 % (p/v) cuando la composición edulcorante se agrega a una composición edulcorable o consumible edulcorante, tal como, por ejemplo, mayor que aproximadamente 11 %, mayor que aproximadamente 12 %, mayor que aproximadamente 13 % o mayor que aproximadamente 14 %.

30 La cantidad de sacarosa, y por lo tanto otra medida de dulzor, en una solución de referencia puede describirse en grados Brix ("Bx). Un grado Brix es 1 gramo de sacarosa en 100 gramos de solución y representa la concentración de la solución como porcentaje en peso (% p/p) (estrictamente hablando, en masa). En un ejemplo, una composición edulcorante comprende rebaudiósido I en una cantidad efectiva para proporcionar un dulzor equivalente de aproximadamente 0.50 a 14 grados Brix de azúcar cuando está presente en una composición edulcorada, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 11 grados Brix, de aproximadamente 4 a aproximadamente 7 grados Brix, o aproximadamente 5 grados Brix. En aun otro ejemplo, una composición que comprende rebaudiósido I está presente con al menos otro edulcorante en una cantidad efectiva para proporcionar cualquiera de los equivalentes de dulzor enumerados anteriormente.

35 En un ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición edulcorante en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 1 ppm a aproximadamente 10.000 ppm cuando la composición edulcorante se agrega a un consumible (por ejemplo, una bebida), como, por ejemplo, ejemplo, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 15 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 25 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 300 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 400 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 600 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 700 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 800 a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 900 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 1.000 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 2.000 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 3.000 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 4.000 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 5.000 ppm a aproximadamente 10.000 ppm. En otro ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición edulcorante en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 1.000 ppm cuando la composición edulcorante se agrega a un consumible, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 800 ppm, de aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 800 ppm, de aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 600 ppm o de aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 250 ppm. Por ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición edulcorante en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 300 ppm a aproximadamente 600 ppm cuando la composición edulcorante se agrega a un consumible.

65 En un ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición edulcorante en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente entre aproximadamente 400 y aproximadamente 800 ppm

cuando la composición edulcorante se agrega a un consumible, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 100 ppm, aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 150 ppm, aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 250 ppm, aproximadamente 250 ppm a aproximadamente 300 ppm, de aproximadamente 300 ppm a aproximadamente 350 ppm, aproximadamente 350 ppm a aproximadamente 400 ppm, de aproximadamente 400 ppm a aproximadamente 450 ppm, aproximadamente 450 ppm a aproximadamente 500 ppm, aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 550 ppm, aproximadamente 550 ppm a aproximadamente 600 ppm, aproximadamente 600 ppm a aproximadamente 650 ppm, aproximadamente 650 ppm a aproximadamente 700 ppm, aproximadamente 700 ppm a aproximadamente 750 ppm o aproximadamente 750 ppm a aproximadamente 800 ppm.

5
10 Por ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición edulcorante en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente entre aproximadamente 400 y aproximadamente 800 ppm cuando la composición edulcorante se agrega a una bebida.

15 Por ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición edulcorante en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente entre aproximadamente 500 y aproximadamente 600 ppm cuando la composición edulcorante se agrega a una bebida.

20 Cuando la composición edulcorante incluye rebaudiósido I en combinación con uno o más compuestos edulcorantes, la cantidad del compuesto edulcorante puede variar. En un ejemplo, la composición edulcorante está presente en la composición edulcorante en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de entre aproximadamente 1 % y aproximadamente 20 % cuando el compuesto edulcorante se agrega a un consumible, como, por ejemplo, entre aproximadamente 1 % y aproximadamente 5 %, entre aproximadamente 5 % y aproximadamente 10 %, entre aproximadamente 10 % y aproximadamente 15 %, entre aproximadamente 15 % y aproximadamente 20 %, o más particularmente, aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 % o aproximadamente del 5 %.

25
30 Se divulga una composición edulcorante que comprende (i) rebaudiósido I en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente entre aproximadamente 500 y aproximadamente 600 ppm cuando la composición edulcorante se agrega a una bebida; y (ii) un compuesto seleccionado del grupo que consiste en Reb A, B, C, D, E, M, N, O, M2, D2, glucósidos de esteviol glicosilados, Mogrósido V, eritritol, alulosa, extracto de estevia, Luo Han Guo extracto y combinaciones de los mismos.

35 Se divulga adicionalmente una composición edulcorante que comprende (i) rebaudiósido I en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente entre aproximadamente 500 y aproximadamente 600 ppm cuando la composición edulcorante se agrega a una bebida; y (ii) alulosa en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de entre aproximadamente 1 % y aproximadamente 5 % cuando la composición edulcorante se agrega a la bebida.

40 En otro ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición edulcorante en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 50 ppm, aproximadamente 100 ppm, aproximadamente 150 ppm, aproximadamente 200 ppm, aproximadamente 250 ppm, aproximadamente 300 ppm, aproximadamente 350 ppm, aproximadamente 400 ppm, aproximadamente 450 ppm, aproximadamente 500 ppm, aproximadamente 550 ppm, aproximadamente 600 ppm, aproximadamente 650 ppm, aproximadamente 700 ppm, aproximadamente 750 ppm o aproximadamente 800 ppm cuando la composición edulcorante se agrega a un consumible.

45
50 Por ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición edulcorante en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 550 ppm cuando la composición se agrega a una bebida. Opcionalmente, la composición edulcorante también incluye alulosa, por ejemplo, entre aproximadamente 1 % y aproximadamente 5 %, o más particularmente, aproximadamente 3.5 %.

55 Por ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición edulcorante en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 600 ppm cuando la composición se agrega a una bebida. Opcionalmente, la composición edulcorante también incluye alulosa, por ejemplo, entre aproximadamente 1 % y aproximadamente 5 %, o más particularmente, aproximadamente 3.5 %.

60 Por ejemplo, la composición edulcorante que comprende rebaudiósido I exhibe una intensidad menos dulce que el rebaudiósido M, o una composición edulcorante que comprende el mismo. Por ejemplo, el rebaudiósido I aislado y purificado o una composición que contiene rebaudiósido I exhibe aproximadamente 10 %, aproximadamente 15 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 25 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 35 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 45 % o aproximadamente 50 % persistiendo menos dulzor en intensidad que el rebaudiósido M, o una composición edulcorante que lo comprenda.

65 En algunos ejemplos, el rebaudiósido I está presente en la composición edulcorante en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración del compuesto que está por encima, o por debajo de su nivel umbral de reconocimiento de edulcorante cuando la composición edulcorante se agrega a un consumible (por ejemplo, una bebida).

Composiciones para potenciar el sabor

5 También se divulga una composición potenciadora del sabor que comprende rebaudiósido I. Además se divulga una composición potenciadora del sabor que comprende rebaudiósido I aislado y purificado.

10 "Composiciones potenciadoras del sabor", como se usa en el presente documento, se refiere a una composición capaz de potenciar o intensificar la percepción de un sabor particular en un consumible. Los términos "composiciones potenciadoras del sabor" o "potenciador del sabor" son sinónimos de los términos "agente de potenciación del sabor", "amplificador del sabor" e "intensificador del sabor". En general, la composición potenciadora del sabor proporcionada en este documento puede potenciar o hacer potente el sabor de los ingredientes del sabor, es decir, cualquier sustancia que proporcione dulzor, acidez, salinidad, sabor, amargor, sabor metálico, astringencia, sabor dulce persistente, aparición de dulzor, etc. según cualquier teoría, la composición potenciadora del sabor probablemente no aporta ningún sabor notable al consumible al que se agrega porque el rebaudiósido I está presente en el consumible en una concentración igual o inferior a su concentración umbral de reconocimiento de sabor.

20 "Concentración umbral de reconocimiento de sabor", como se usa en el presente documento, se refiere a la concentración más baja a la que el sabor particular o el mal sabor de un componente (por ejemplo, un compuesto) es perceptible en un consumible. La concentración umbral de reconocimiento de sabor varía para diferentes compuestos, y puede variar con respecto al individuo que percibe el sabor o el consumible particular.

25 En un ejemplo, la composición potenciadora del sabor comprende rebaudiósido I en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración que está en o por debajo de la concentración umbral de reconocimiento de sabor del rebaudiósido I cuando la composición potenciadora del sabor se agrega a un consumible.

30 Por ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición potenciadora del sabor en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración que está por debajo de la concentración umbral de reconocimiento de sabor del rebaudiósido I cuando la composición potenciadora del sabor se agrega a un consumible.

35 En algunos ejemplos, el rebaudiósido I está presente en la composición potenciadora del sabor en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración que es al menos aproximadamente 1 %, al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 15 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 % o al menos aproximadamente 50 % o más por debajo del umbral de concentración de reconocimiento de sabor cuando la composición que mejora el sabor se agrega a un consumible.

40 En algunos ejemplos, el rebaudiósido I está presente en la composición potenciadora del sabor en una cantidad que, cuando se agrega al consumible (por ejemplo, una bebida), proporcionará una concentración que varía de 1 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, tal como, para ejemplo, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 15 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 25 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 300 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 400 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 600 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 700 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 800 a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 900 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 1.000 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 2.000 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 3.000 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 4.000 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 5.000 ppm a aproximadamente 10.000 ppm. En algunos ejemplos, el rebaudiósido I está presente en la composición potenciadora del sabor en una cantidad que, cuando se agrega al consumible (por ejemplo, una bebida), proporcionará una concentración que varía de 1 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, como, por ejemplo, aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, de aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, de aproximadamente 30 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, de aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, de aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, de aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, de aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, de aproximadamente 300 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, de aproximadamente 400 ppm a aproximadamente 1.000 ppm y de aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 1.000 ppm.

65 Una persona experta en la técnica podrá seleccionar la concentración de rebaudiósido I en la composición potenciadora del sabor para que pueda impartir un sabor mejorado a un consumible que comprende al menos un ingrediente de sabor. Por ejemplo, un experto en la técnica puede seleccionar una concentración para el

rebaudiósido I en la composición potenciadora del sabor de modo que la composición potenciadora del sabor y/o el rebaudiósido I no imparta ningún sabor perceptible a un consumible cuando la composición potenciadora del sabor se añade a la misma.

- 5 En un ejemplo, la adición de la composición potenciadora del sabor aumenta el sabor detectado del al menos un ingrediente de sabor en el consumible en comparación con el sabor detectado del mismo ingrediente en el consumible en ausencia del potenciador del sabor.

10 Los ingredientes de sabor adecuados incluyen, pero no se limitan a, vainillina, extracto de vainilla, extracto de mango, canela, cítricos, coco, jengibre, viridiflorol, almendra, mentol (incluyendo mentol sin menta), extracto de piel de uva y extracto de semilla de uva. "Aromatizante" e "ingrediente aromatizante" son sinónimos y pueden incluir sustancias naturales o sintéticas o combinaciones de las mismas. Los aromatizantes también incluyen cualquier otra sustancia que imparta sabor y pueden incluir sustancias naturales o no naturales (sintéticas) que son seguras para humanos o animales cuando se usan en un rango generalmente aceptado. Entre los ejemplos no limitantes de aromatizantes registrados se incluyen Döhler™ Natural Flavoring Sweetness Enhancer K14323 (Döhler™, Darmstadt, Alemania), Symrise™ Natural Flavor Mask para edulcorantes 161453 y 164126 (Symrise™, Holzminden, Alemania), Natural Advantage™ Bitterness Blockers 1, 2, 9 y 10 (Natural Advantage™, Freehold, Nueva Jersey, Estados Unidos) y Sucramask™ (Creative Research Management, Stockton, California, Estados Unidos).

20 En otro ejemplo, la composición potenciadora del sabor que comprende rebaudiósido I mejora los sabores (ya sea sabores individuales o el sabor general) cuando se agrega al consumible. Alternativamente, se puede agregar rebaudiósido I directamente al consumible, es decir, no proporcionado en forma de composición, para potenciar el sabor. Entonces el rebaudiósido I es un potenciador del sabor y se agrega al consumible a una concentración igual o inferior a su concentración límite de reconocimiento de sabor.

25 Por ejemplo, la composición que mejora el sabor es una composición que mejora el dulzor. "Composición que mejora el dulzor", como se usa en el presente documento, se refiere a una composición capaz de potenciar o intensificar la percepción del sabor dulce de un consumible, tal como una bebida. El término "potenciador del dulzor" es sinónimo de los términos "potenciador del sabor dulce", "potenciador del dulzor", "amplificador del dulzor" e "intensificador del dulzor".

35 La "concentración umbral de reconocimiento de dulzor", como se usa en el presente documento, es la concentración más baja conocida de un compuesto dulce que es perceptible por el sentido del gusto humano. En general, la composición potenciadora del dulzor puede potenciar o hacer potente el sabor dulce de un consumible sin proporcionar ningún sabor dulce notable en sí mismo porque la concentración de rebaudiósido I en la composición potenciadora del dulzor es igual o inferior a su concentración umbral de reconocimiento de dulzor, ya sea en las composiciones potenciadoras del dulzor, el consumible después de la composición que mejora el dulzor ha sido agregado, o ambos. La concentración umbral de reconocimiento de dulzor es específica para un compuesto particular y puede variar según la temperatura, la matriz, los ingredientes y/o el sistema de sabor.

40 En un ejemplo, una composición que mejora el dulzor comprende el rebaudiósido I en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración que está en o por debajo de la concentración umbral de reconocimiento de dulzor del rebaudiósido I cuando la composición que mejora el dulzor se agrega a un consumible.

45 Por ejemplo, una composición que mejora el dulzor comprende el rebaudiósido I en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración que está por debajo del umbral de concentración de reconocimiento de dulzor del rebaudiósido I cuando la composición que mejora el dulzor se agrega a un consumible.

50 En algunos ejemplos, el rebaudiósido I está presente en la composición potenciadora del dulzor en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración que es al menos aproximadamente 1 %, al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 15 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 % o al menos aproximadamente 50 % o más por debajo del umbral de concentración de reconocimiento de dulzor de rebaudiósido I cuando la composición que mejora el dulzor se agrega a un consumible.

55 En algunos ejemplos, el rebaudiósido I está presente en la composición que mejora el dulzor en una cantidad que, cuando se agrega al consumible (por ejemplo, una bebida), proporcionará una concentración de aproximadamente 1 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, como por ejemplo, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 15 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 25 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 300 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 400 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 600 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 700 ppm a aproximadamente

10.000 ppm, de aproximadamente 800 a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 900 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 1.000 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 2.000 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 3.000 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 4.000 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 5.000 ppm a aproximadamente 10.000 ppm. En algunos ejemplos, el rebaudiosido I está presente en la composición que mejora el dulzor en una cantidad que, cuando se agrega al consumible (por ejemplo, una bebida), proporcionará una concentración de 1 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, como, por ejemplo, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, de aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, de aproximadamente 30 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, de aproximadamente 40 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, de aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, de aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, de aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, de aproximadamente 300 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, de aproximadamente 400 ppm a aproximadamente 1.000 ppm y de aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 1.000 ppm.

15 Alternativamente, se puede agregar rebaudiosido I directamente al consumible, es decir, no proporcionado en forma de composición, para potenciar el dulzor. Entonces el rebaudiosido I es un potenciador del dulzor y se agrega al consumible a una concentración igual o inferior a su concentración umbral de reconocimiento de dulzor.

20 El dulzor de una composición dada se mide típicamente con referencia a una solución de sacarosa. Véase en general "A Systematic Study of Concentration-Response Relationships of Sweeteners ", G.E. DuBois, D.E. Walters, S.S. Schifffman, Z.S. Warwick, B.J. Booth, S.D. Pecore, K. Gibes, B.T. Carr, and L.M. Brands, en Sweeteners: Discovery, Molecular Design and Chemoreception, D.E. Walters, F.T. Orthoefer and G.E. DuBois, Eds., American Chemical Society, Washington, DC (1991), págs. 261-276.

25 Se contempla que la composición potenciadora del dulzor puede incluir uno o más potenciadores del dulzor además del rebaudiosido I. En un ejemplo, la composición potenciadora del dulzor puede incluir un potenciador del dulzor adicional. En otros ejemplos, la composición que mejora el dulzor puede incluir dos o más potenciadores adicionales del dulzor. En los casos en que se utilizan dos o más potenciadores de dulzor, cada potenciador de dulzor debe estar presente por debajo de su respectiva concentración umbral de reconocimiento de dulzor.

30 Los potenciadores del dulzor adecuados incluyen, pero no se limitan a, el grupo que consiste en ácido 2-hidroxibenzoico, ácido 3-hidroxibenzoico, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido 2,4-dihidroxibenzoico, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido 2,5-dihidroxibenzoico, ácido 2,6-dihidroxibenzoico, ácido 2,3,4-trihidroxibenzoico, ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico, ácido 3-aminobenzoico, ácido 4-aminobenzoico, potenciador FEMA GRAS 4469, potenciador FEMA GRAS 4701, potenciador FEMA GRAS 4720, potenciador FEMA GRAS 4774, potenciador FEMA GRAS 4708, potenciador FEMA GRAS 4728, potenciador FEMA GRAS 4601 y combinaciones de los mismos.

35 En un ejemplo, la adición del (de los) potenciador(es) de dulzor aumenta la equivalencia de sacarosa detectada del al menos un edulcorante en un consumible en comparación con la equivalencia de sacarosa del mismo consumible en ausencia del potenciador de dulzor.

40 Más específicamente, el uso del rebaudiosido I y, opcionalmente, uno o más potenciadores del dulzor (solos o en forma de una composición) en un consumible (por ejemplo, una bebida), proporciona una equivalencia de sacarosa detectada al menos aproximadamente 0.5 % mayor que la equivalencia de sacarosa de un consumible correspondiente (por ejemplo, una bebida) en ausencia del rebaudiosido I y, opcionalmente, uno o más de otros potenciadores del dulzor. Por ejemplo, la equivalencia de sacarosa detectada de un consumible (por ejemplo, una bebida) que contiene rebaudiosido I y, opcionalmente, uno o más potenciadores del dulzor (solos o en forma de composición) puede ser al menos aproximadamente 1.0 %, aproximadamente 1.5 %, aproximadamente 2.0 %, aproximadamente 2.5 %, aproximadamente 3.0 %, aproximadamente 3.5 %, aproximadamente 4.5 %, aproximadamente 5.0 % o aproximadamente 5.5 % o más mayor que la equivalencia de sacarosa de un consumible correspondiente en ausencia del rebaudiosido I y, opcionalmente, uno o más otros potenciadores del dulzor.

45 Los edulcorantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, sacarosa, gliceraldehído, dihidroxiacetona, eritrosa, treosa, eritrolosa, arabinosa, lixosa, ribosa, xilosa, ribulosa, xilulosa, alosa, altrosa, galactosa, glucosa, gulosa, idosa, manosa, talosa, fructosa, psicosa, sorbosa, tagatosa, manoheptulosa, sedoheltulosa, octolosa, fucosa, ramnosa, arabinosa, turanosa, sialosa, rebaudiosido A, rebaudiosido B, rebaudiosido C, rebaudiosido D, rebaudiosido E, rebaudiosido F, rebaudiosido H, rebaudiosido L, rebaudiosido K, rebaudiosido J, rebaudiosido N, rebaudiosido O, dulcósido A, dulcósido B, rubusósido, estevia, esteviósido, mogrósido IV, mogrósido V, Luo Han Guo, siamenósido, monatina y sus sales (monatina SS, RR, RS, SR), curculina, ácido glicirrónico y sus sales, taumatina, monelina, mabinlina, brazeína, hernandulcina, filodulcina, glicifilina, floridizina, trilobatina, baiyunósido, osladina, polipodósido A, pterocariósido A, pterocariósido B, mucurosósido, flomisósido I, periandrina I, abrusósido A, esteviolbiósido y ciclocariósido I, alcoholes de azúcar tales como eritritol, sucralosa, acesulfamo de potasio, ácido acesulfamo y sus sales, aspartame, alitame, sacarina y sus sales, dihidrochalcona neohesperidina, ciclamato, ácido ciclámico y sus sales, neotame advantame, glucósidos de esteviol glucosilados (GSG) y combinaciones de los mismos.

65

En un ejemplo, el edulcorante es un edulcorante calórico o una mezcla de edulcorantes calóricos. En otro ejemplo, el edulcorante calórico se selecciona entre sacarosa, fructosa, glucosa, jarabe de maíz/almidón con alto contenido de fructosa, un azúcar de remolacha, un azúcar de caña y combinaciones de los mismos.

5 En otro ejemplo, el edulcorante es un azúcar raro seleccionado de D-psicosa, D-alosa, L-ribosa, D-tagatosa, L-glucosa, L-fucosa, L-arabinosa, turanosa y combinaciones de los mismos.

En aun otro ejemplo, el edulcorante es un edulcorante no calórico o una mezcla de edulcorantes no calóricos. En un ejemplo, el edulcorante no calórico es un edulcorante natural de alta potencia. Como se usa en el presente documento, la expresión "edulcorante natural de alta potencia" se refiere a cualquier composición que no se encuentre naturalmente en la naturaleza y característicamente tiene una potencia de dulzor mayor que la sacarosa, fructosa o glucosa, pero tiene menos calorías. El edulcorante natural de alta potencia se puede proporcionar como un compuesto puro o, como alternativa, como parte de un extracto.

15 En aun otro ejemplo, el edulcorante no calórico es un edulcorante sintético de alta potencia. Como se usa en el presente documento, la expresión "edulcorante sintético" se refiere a cualquier composición que no se encuentre naturalmente en la naturaleza y característicamente tiene una potencia de dulzor mayor que la sacarosa, fructosa o glucosa, pero tiene menos calorías.

20 Por ejemplo, el consumible es una bebida. La bebida comprende rebaudiósido I y al menos un edulcorante, en donde el rebaudiósido I está presente en una concentración igual o inferior a su umbral de reconocimiento de dulzor. El rebaudiósido I y al menos un edulcorante pueden proporcionarse cada uno por separado, o proporcionarse en forma de una composición que mejora el dulzor. Por ejemplo, la equivalencia de sacarosa detectada aumenta de, por ejemplo, aproximadamente 0.2 % a aproximadamente 5.0 %, tal como, por ejemplo, aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 % o aproximadamente 5 %.

El edulcorante puede ser cualquier edulcorante natural o sintético proporcionado en este documento. Por ejemplo, el edulcorante es un edulcorante de carbohidratos que proporciona calorías. Por consiguiente, la incorporación del potenciador del dulzor reduce así la cantidad de edulcorante de carbohidratos que proporciona calorías que debe usarse en un consumible dado, permitiendo así la preparación de consumibles de calorías reducidas.

Las composiciones pueden personalizarse para proporcionar el contenido calórico deseado. Por ejemplo, las composiciones pueden ser "completas en calorías", de modo que impartan el dulzor deseado cuando se agregan a un consumible (como, por ejemplo, una bebida) y tienen aproximadamente 120 calorías por porción de 8 onzas. Alternativamente, las composiciones pueden ser "bajas en calorías", de modo que impartan el dulzor deseado cuando se agregan a un consumible (como, por ejemplo, como bebida) y tienen menos de aproximadamente 60 calorías por porción de 8 onzas. En otros ejemplos, las composiciones pueden ser "bajas en calorías", de modo que impartan el dulzor deseado cuando se agregan a un consumible (como, por ejemplo, como bebida) y tienen menos de 40 calorías por porción de 8 onzas. En otros ejemplos más, las composiciones pueden ser de "cero calorías", de modo que impartan el dulzor deseado cuando se agregan a un consumible (como, por ejemplo, una bebida) y tienen menos de 5 calorías por 8 onzas. servicio.

Aditivos

45 Las composiciones, por ejemplo, las composiciones edulcorantes y las composiciones potenciadas del sabor pueden comprender, además del rebaudiósido I, uno o más aditivos, detallados a continuación en el presente documento. En algunos ejemplos, la composición contiene aditivos que incluyen, pero no se limitan a, carbohidratos, polioles, aminoácidos y sus sales correspondientes, poliaminoácidos y sus sales correspondientes, ácidos de azúcar y sus sales correspondientes, nucleótidos, ácidos orgánicos, ácidos inorgánicos, sales orgánicas que incluyen sales de ácidos orgánicos y sales de bases orgánicas, sales inorgánicas, compuestos amargos, aromatizantes e ingredientes aromatizantes, compuestos astringentes, proteínas o hidrolizados de proteínas, tensioactivos, emulsionantes, agentes de peso, gomas, antioxidantes, colorantes, flavonoides, alcoholes, polímeros y combinaciones del mismo. En algunas realizaciones, los aditivos actúan para mejorar el perfil temporal y de sabor del edulcorante para proporcionar una composición edulcorante con un sabor similar a la sacarosa.

55 En un ejemplo, las composiciones comprenden además contener uno o más polioles. El término "poliol", como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que contiene más de un grupo hidroxilo. Un poliol puede ser un diol, triol o un tetraol que contiene 2, 3 y 4 grupos hidroxilo, respectivamente. Un poliol también puede contener más de 4 grupos hidroxilo, como un pentaol, hexaol, heptaol o similares, que contenían 5, 6 o 7 grupos hidroxilo, respectivamente. Además, un poliol también puede ser un alcohol de azúcar, alcohol polihídrico o polialcohol que es una forma reducida de carbohidrato, en donde el grupo carbonilo (aldehído o cetona, azúcar reductor) se ha reducido a un grupo hidroxilo primario o secundario.

65 Ejemplos no limitativos de polioles incluyen eritritol, maltitol, manitol, sorbitol, lactitol, xilitol, isomaltol, propilenglicol, glicerol (glicerina), treitol, galactitol, palatinosa, isomalto-oligosacáridos reducidos, xilo-oligosacáridos reducidos,

gentio-oligosacáridos reducidos, jarabe de maltosa reducido, jarabe de glucosa reducido y alcoholes de azúcar o cualquier otro carbohidrato que pueda reducirse y que no afecte negativamente al sabor de las composiciones.

5 En ciertos ejemplos, el poliol está presente en las composiciones en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 250.000 ppm cuando está presente en un consumible, como, por ejemplo, una bebida. En otros ejemplos, el poliol está presente en las composiciones en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 400 ppm a aproximadamente 80.000 ppm cuando está presente en un consumible, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 5.000 ppm a aproximadamente 40.000 ppm.

10 En otros ejemplos, el rebaudiosido I está presente en la composición con el poliol en una relación en peso de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:800, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 1:4 a aproximadamente 1:800, de aproximadamente 1:20 a aproximadamente 1:600, de aproximadamente 1:50 a aproximadamente 1:300 o de aproximadamente 1:75 a aproximadamente 1:150.

15 Los aditivos de aminoácidos adecuados incluyen, pero sin limitación, ácido aspártico, arginina, glicina, ácido glutámico, prolina, treonina, teanina, cisteína, cistina, alanina, valina, tirosina, leucina, arabinosa, trans-4-hidroxiprolina, isoleucina, asparagina, serina, lisina, histidina, ornitina, metionina, carnitina, ácido aminobutírico (isómeros α , β y/o δ), glutamina, hidroxiprolina, taurina, norvalina, sarcosina y sus formas de sal, como sales de sodio o potasio o sales ácidas. Los aditivos de aminoácidos también pueden estar en la configuración D- o L- y en la forma mono, di o tri de los mismos o diferentes aminoácidos. Además, los aminoácidos pueden ser isómeros α , β , γ y/o δ si es apropiado. Las combinaciones de los aminoácidos anteriores y sus sales correspondientes (por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio, magnesio u otras sales de metales alcalinos o alcalinotérreos de los mismos, o sales ácidas) también son aditivos adecuados. Los aminoácidos pueden ser naturales o sintéticos. Los aminoácidos también pueden modificarse. Los aminoácidos modificados se refieren a cualquier aminoácido en donde se haya agregado, eliminado, sustituido un átomo o combinaciones de los mismos (por ejemplo, N-alkil aminoácido, N-acil aminoácido o N-metil aminoácido). Ejemplos no limitantes de aminoácidos modificados incluyen derivados de aminoácidos tales como trimetilglicina, N-metil-glicina y N-metil-alanina. Como se usa en el presente documento, los aminoácidos modificados abarcan aminoácidos tanto modificados como no modificados. Como se usa en el presente documento, los aminoácidos también abarcan tanto péptidos como polipéptidos (por ejemplo, dipéptidos, tripéptidos, tetrapéptidos y pentapéptidos) tales como glutatión y L-alanil-L-glutamina. Los aditivos de poliaminoácidos adecuados incluyen ácido poli-L-aspártico, poli-L-lisina (por ejemplo, poli-L- α -lisina o poli-L- ϵ -lisina), poli-L-ornitina (por ejemplo, poli-L- α -ornitina o poli-L- ϵ -ornitina), poli-L-arginina, otras formas poliméricas de aminoácidos y sus formas de sal (por ejemplo, sales de calcio, potasio, sodio o magnesio tales como la sal monosódica del ácido L-glutámico) Los aditivos de poliaminoácidos también pueden estar en la configuración D- o L-. Además, los poliaminoácidos pueden ser isómeros α -, β -, γ -, δ - y ϵ - si es apropiado. Las combinaciones de los poliaminoácidos anteriores y sus sales correspondientes (por ejemplo, sales de sodio, potasio, calcio, magnesio u otras sales de metales alcalinos o alcalinotérreos de los mismos o sales ácidas) también son aditivos adecuados. Los poliaminoácidos descritos en el presente documento también pueden comprender copolímeros de diferentes aminoácidos. Los poliaminoácidos pueden ser naturales o sintéticos. Los poliaminoácidos también pueden modificarse, de modo que se haya agregado, eliminado, sustituido al menos un átomo o combinaciones de los mismos (por ejemplo, N-alkil-poliaminoácido o N-acil-poliaminoácido). Como se usa en el presente documento, los poliaminoácidos abarcan tanto los poliaminoácidos modificados como los no modificados. Por ejemplo, los poliaminoácidos modificados incluyen, entre otros, poliaminoácidos de diversos pesos moleculares (MW), como la poli-L- α -lisina con un MW de 1.500, MW de 6.000, MW de 25.200, MW de 63.000, MW de 83.000 o MW de 300.000.

50 Por ejemplo, el aminoácido está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 50.000 ppm cuando está presente en un consumible, como, por ejemplo, una bebida. En otro ejemplo, el aminoácido está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 1.000 ppm a aproximadamente 10.000 ppm cuando está presente en un consumible, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 2.500 ppm a aproximadamente 5.000 ppm o de aproximadamente 250 ppm a aproximadamente 7.500 ppm.

55 Los aditivos de ácido de azúcar adecuados incluyen, pero sin limitación, aldónico, urónico, aldárico, algínico, glucónico, glucurónico, glucárico, galactárico, galacturónico, y sus sales (por ejemplo, sodio, potasio, calcio, sales de magnesio u otras sales fisiológicamente aceptables), y combinaciones de los mismos.

60 Los aditivos de nucleótidos adecuados incluyen, entre otros, monofosfato de inosina ("IMP"), monofosfato de guanosina ("GMP"), monofosfato de adenosina ("AMP"), monofosfato de citosina (CMP), monofosfato de uracilo (UMP), difosfato de inosina, difosfato de guanosina, difosfato de adenosina, difosfato de citosina, difosfato de uracilo, trifosfato de inosina, trifosfato de guanosina, trifosfato de adenosina, trifosfato de citosina, trifosfato de uracilo, sales de metales alcalinos o alcalinotérreos, y combinaciones de los mismos. Los nucleótidos descritos en el presente documento también pueden comprender aditivos relacionados con nucleótidos, tales como nucleósidos o bases de ácidos nucleicos (por ejemplo, guanina, citosina, adenina, timina, uracilo).

65

El nucleótido está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 1.000 ppm cuando está presente en un consumible, como, por ejemplo, una bebida.

5 Los aditivos de ácido orgánico adecuados incluyen cualquier compuesto que comprende una unidad estructural -COOH, tal como, por ejemplo, ácidos carboxílicos C2-C30, ácidos carboxílicos hidroxilos C2-C30 sustituidos, ácido
 10 butírico (ésteres etílicos), ácido butírico sustituido (ésteres etílicos), ácido benzoico, ácidos benzoicos sustituidos (por ejemplo, ácido 2,4-dihidroxibenzoico), ácidos cinámicos sustituidos, hidroxiacidos, ácidos hidroxibenzoicos sustituidos, ácidos anisicos ciclohexilcarboxílicos sustituidos, ácido tánico, ácido aconítico, ácido láctico, ácido
 15 tartárico, ácido cítrico, ácido isocítrico, ácido glucónico, ácidos glucoheptónicos, ácido adípico, ácido hidroxicitrico, ácido málico, ácido frutárico (una mezcla de ácidos málico, fumárico y tartárico), ácido fumárico, ácido maleico, ácido succínico, ácido clorogénico, ácido salicílico, creatina, ácido cafeico, ácidos biliares, ácido acético, ácido ascórbico, ácido algínico, ácido eritórbito, ácido poliglutámico, glucono delta lactona y sus derivados de sales de metales alcalinos o alcalinotérreos. Además, los aditivos ácidos orgánicos también pueden estar en la configuración D- o L-.

Las sales aditivas de ácido orgánico adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sales de sodio, calcio, potasio y magnesio de todos los ácidos orgánicos, tales como sales de ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido
 20 fumárico, ácido láctico (por ejemplo, lactato de sodio), ácido algínico (por ejemplo, alginato de sodio), ácido ascórbico (por ejemplo, ascorbato de sodio), ácido benzoico (por ejemplo, benzoato de sodio o benzoato de potasio), ácido sórbico y ácido adípico. Ejemplos de los aditivos de ácidos orgánicos descritos opcionalmente pueden estar sustituidos con al menos un grupo elegido de hidrógeno, alquilo, alqueno, alquínico, haloalquilo, carboxilo, acilo, aciloxi, amino, amido, derivados de carboxilo, alquilamino, dialquilamino, arilamino, alcoxi, ariloxi, nitro, ciano, sulfo, tiol, imina, sulfonilo, sulfenilo, sulfínico, sulfamilo, carboxalcoxi, carboxamido, fosfonilo, fosfinilo, fosforilo, fosfino, tioéster, tioéter, anhídrido, oximino, hidrazino, carbamilo, fósforo o fosfonato. Por ejemplo, el aditivo
 25 de ácido orgánico está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 5.000 ppm cuando está presente en un consumible, como, por ejemplo, una bebida.

Los aditivos de ácido inorgánico adecuados incluyen, pero no se limitan a, ácido fosfórico, ácido fosforoso, ácido
 30 polifosfórico, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido carbónico, dihidrogenofosfato de sodio y sales de metales alcalinos o alcalinotérreos (por ejemplo, hexafosfato de inositol Mg/Ca).

El aditivo de ácido inorgánico está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una
 35 concentración de aproximadamente 25 ppm a aproximadamente 25.000 ppm cuando está presente en un consumible, como, por ejemplo, una bebida.

Los aditivos compuestos amargos adecuados incluyen, pero no se limitan a, cafeína, quinina, urea, aceite de naranja amarga, naringina, cuasia y sus sales.

40 El compuesto amargo está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 25 ppm a aproximadamente 25.000 ppm cuando está presente en un consumible, como, por ejemplo, una bebida.

Los aditivos aromatizantes y aromatizantes adecuados incluyen, entre otros, vainillina, extracto de vainilla, extracto
 45 de mango, canela, cítricos, coco, jengibre, viridiflorol, almendra, mentol (incluido mentol sin menta), extracto de piel de uva y extracto de semilla de uva. "Aromatizante" e "ingrediente aromatizante" son sinónimos y pueden incluir sustancias naturales o sintéticas o combinaciones de las mismas. Los aromatizantes también incluyen cualquier otra sustancia que imparta sabor y pueden incluir sustancias naturales o no naturales (sintéticas) que son seguras para humanos o animales cuando se usan en un rango generalmente aceptado. Entre los ejemplos no limitantes de
 50 aromatizantes patentados se incluyen Döhler™ Natural Flavoring Sweetness Enhancer K14323 (Döhler™, Darmstadt, Alemania), Symrise™ Natural Flavor Mask para edulcorantes 161453 y 164126 (Symrise™, Holzminden, Alemania), Natural Advantage™ Bitterness Blockers 1, 2, 9 y 10 (Natural Advantage™, Freehold, Nueva Jersey, Estados Unidos) y Sucramask™ (Creative Research Management, Stockton, California, Estados Unidos).

55 El saborizante está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 0.1 ppm a aproximadamente 4.000 ppm cuando está presente en un consumible, como, por ejemplo, una bebida.

Los aditivos poliméricos adecuados incluyen, pero no se limitan a, quitosano, pectina, ácido péctico, pectínico, poliurónico, poligalacturónico, almidón, hidrocoloide alimentario o extractos crudos de los mismos (por ejemplo, goma de acacia senegal (Fibergum™), goma de acacia seyal, carragenano), poli-L-lisina (por ejemplo, poli-L- α -lisina o poli-L- ϵ -lisina), poli-L-ornitina (por ejemplo, poli-L- α -ornitina o poli-L- ϵ -ornitina), polipropilenglicol, polietilenglicol, poli(etilenglicol metil éter), poliarginina, ácido poliaspártico, ácido poliglutámico, polietilenimina, ácido algínico, alginato de sodio, alginato de propilenglicol y polietilenglicolglucato de sodio, hexametáfosfato de sodio y sus sales, y
 65 otros polímeros catiónicos y polímeros aniónicos.

El polímero está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 30 ppm a aproximadamente 2.000 ppm cuando está presente en un consumible, como, por ejemplo, una bebida.

5 Los aditivos adecuados de proteína o hidrolizado de proteína incluyen, pero no se limitan a, albúmina de suero bovino (BSA), proteína de suero (incluidas fracciones o concentrados de los mismos, como 90 % de proteína de suero instantánea, 34 % de proteína de suero, 50 % proteína de suero hidrolizada y concentrado de proteína de suero al 80 %), proteína de arroz soluble, proteína de soja, aislados de proteínas, hidrolizados de proteínas, productos de reacción de hidrolizados de proteínas, glicoproteínas y/o proteoglicanos que contenían aminoácidos (por ejemplo, glicina, alanina, serina, treonina, asparagina, glutamina, arginina, valina, isoleucina, leucina, norvalina, metionina, prolina, tirosina, hidroxiprolina y similares), colágeno (por ejemplo, gelatina), colágeno parcialmente hidrolizado (por ejemplo, colágeno de pescado hidrolizado) e hidrolizados de colágeno (por ejemplo, hidrolizado de colágeno porcino).

15 El hidrolizado de proteínas está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 50.000 ppm cuando está presente en un consumible, como, por ejemplo, una bebida.

20 Los aditivos tensioactivos adecuados incluyen, pero no se limitan a, polisorbatos (por ejemplo, monooleato de polioxi-etilensorbitano (polisorbato 80), polisorbato 20, polisorbato 60), dodecilsulfonato de sodio, dioctilsulfosuccinato o dioctilsulfosuccinato de sodio, dodecilsulfato de sodio, cloruro de cetilpiridinio, (cloruro de hexadecilpiridinio), bromuro de hexadeciltrimetilamonio, colato de sodio, carbamoilo, cloruro de colina, glicocolato de sodio, taurodesoxicolato de sodio, arginato láurico, estearoil lactilato de sodio, taurocolato de sodio, lecitinas, ésteres de oleato de sacarosa, ésteres de estearato de sacarosa, ésteres de palmitato de sacarosa, ésteres de laurato de sacarosa, otros emulsionantes y similares.

25 El aditivo tensioactivo está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 30 ppm a aproximadamente 2.000 ppm cuando está presente en un consumible, como, por ejemplo, una bebida.

30 Los aditivos flavonoides adecuados se clasifican como flavonoles, flavonas, flavanonas, flavan-3-oles, isoflavonas o antocianidinas. Ejemplos no limitativos de aditivos flavonoides incluyen, entre otros, catequinas (por ejemplo, extractos de té verde como Polyphenon™ 60, Polyphenon™ 30 y Polyphenon™ 25 (Mitsui Norin Co., Ltd., Japón), polifenoles, rutinas (por ejemplo, rutina modificada con enzimas Sanmelin™ AO (San-fi Gen FFI, Inc., Osaka, Japón)), neohesperidina, naringina, neohesperidina dihidrochalcona y similares.

35 El aditivo flavonoide está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 0.1 ppm a aproximadamente 1.000 ppm cuando está presente en un consumible, como, por ejemplo, una bebida.

40 Los aditivos alcohólicos adecuados incluyen, pero no se limitan a, etanol. Por ejemplo, el aditivo de alcohol está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 625 ppm a aproximadamente 10.000 ppm cuando está presente en un consumible, como, por ejemplo, una bebida.

45 Los aditivos compuestos astringentes adecuados incluyen, pero no se limitan a, ácido tánico, cloruro de europio (EuCl₃), cloruro de gadolinio (GdCl₃), cloruro de terbio (TbCl₃), alumbre, ácido tánico y polifenoles (por ejemplo, polifenoles de té). El aditivo astringente está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 5.000 ppm cuando está presente en un consumible, como, por ejemplo, una bebida.

50 Ingredientes Funcionales

Las composiciones proporcionadas en el presente documento también pueden contener uno o más ingredientes funcionales, que proporcionan un beneficio de salud real o percibido a la composición. Los ingredientes funcionales incluyen, entre otros, saponinas, antioxidantes, fuentes de fibra dietética, ácidos grasos, vitaminas, glucosamina, minerales, conservantes, agentes de hidratación, probióticos, prebióticos, agentes de control de peso, agentes de control de osteoporosis, fitoestrógenos, alcoholes saturados alifáticos primarios de cadena larga, fitosteroles y combinaciones de los mismos.

60 Saponina

En un ejemplo, el ingrediente funcional es al menos una saponina. Como se usa en el presente documento, la al menos una saponina puede comprender una sola saponina o una pluralidad de saponinas como ingrediente funcional para la composición proporcionada en el presente documento. Generalmente, la al menos una saponina está presente en la composición en una cantidad suficiente para promover la salud y el bienestar.

Las saponinas son productos vegetales glucosídicos naturales que comprenden una estructura de anillo de aglicona y una o más unidades estructurales de azúcar. La combinación de la aglicona no polar y la unidad estructural de azúcar soluble en agua proporciona propiedades tensioactivas de saponinas, que les permiten formar una espuma cuando se agitan en una solución acuosa.

5 Las saponinas se agrupan en función de varias propiedades comunes. En particular, las saponinas son tensioactivos que muestran actividad hemolítica y forman complejos con colesterol. Aunque las saponinas comparten estas propiedades, son estructuralmente diversas. Los tipos de estructuras de anillo de aglicona que forman la estructura de anillo en saponinas pueden variar mucho. Ejemplos no limitantes de los tipos de estructuras de anillo de aglicona en saponina incluyen esteroides, triterpenoides y alcaloides esteroideos. Ejemplos no limitantes de estructuras de anillo de aglicona específicas incluyen sojasapogenol A, sojasapogenol B y sojasopogenol E. El número y tipo de unidades estructurales de azúcar unidas a la estructura del anillo de aglicona también puede variar enormemente. Ejemplos no limitantes de unidades estructurales de azúcar incluyen glucosa, galactosa, ácido glucurónico, xilosa, ramnosa y unidades estructurales de metilpentosa. Ejemplos no limitativos de saponinas específicas incluyen acetil saponina del grupo A, acetil saponina del grupo B y acetil saponina del grupo E.

Las saponinas se pueden encontrar en una gran variedad de plantas y productos vegetales, y son especialmente frecuentes en las pieles y cortezas de las plantas donde forman una capa protectora cerosa. Varias fuentes comunes de saponinas incluyen la soja, que tiene aproximadamente un 5 % de contenido de saponina por peso seco, plantas de jabonaria (*Saponaria*), cuya raíz se usó históricamente como jabón, así como alfalfa, aloe, espárragos, uvas, garbanzos, yuca, y varios otras judías y malezas. Las saponinas se pueden obtener de estas fuentes utilizando técnicas de extracción bien conocidas por los expertos en la materia. Se puede encontrar una descripción de las técnicas de extracción convencionales en la patente de los Estados Unidos Appl. No. 2005/0123662.

25 Antioxidante

En otro ejemplo, el ingrediente funcional es al menos un antioxidante. Como se usa en el presente documento, el al menos un antioxidante puede comprender un único antioxidante o una pluralidad de antioxidantes como ingrediente funcional para las composiciones proporcionadas en el presente documento. Generalmente, el al menos un antioxidante está presente en la composición en una cantidad suficiente para promover la salud y el bienestar.

Como se usa en el presente documento "antioxidante" se refiere a cualquier sustancia que inhibe, suprime o reduce el daño oxidativo a las células y biomoléculas. Sin limitarse a la teoría, se cree que los antioxidantes inhiben, suprimen o reducen el daño oxidativo a las células o biomoléculas al estabilizar los radicales libres antes de que puedan causar reacciones dañinas. Como tal, los antioxidantes pueden prevenir o posponer la aparición de algunas enfermedades degenerativas.

Ejemplos de antioxidantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, vitaminas, cofactores de vitaminas, minerales, hormonas, carotenoides, terpenoides carotenoides, terpenoides no carotenoides, flavonoides, polifenoles flavonoides (por ejemplo, bioflavonoides), flavonoles, flavonas, fenoles, polifenoles, ésteres de fenoles, ésteres de polifenoles, fenólicos no flavonoides, isotiocianatos y combinaciones de los mismos. En algunos ejemplos, el antioxidante es vitamina A, vitamina C, vitamina E, ubiquinona, selenio mineral, manganeso, melatonina, α -caroteno, β -caroteno, licopeno, luteína, zeantina, crioxantina, resveratrol, eugenol, quercetina, catequina, gospol, hesperetina, curcumina, ácido ferúlico, timol, hidroxitirosol, cúrcuma, tomillo, aceite de oliva, ácido lipoico, glutatión, glutamina, ácido oxálico, compuestos derivados de tocoferol, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), tert-butilhidroquinona, ácido acético, pectina, tocotrienol, tocoferol, coenzima Q10, zeaxantina, astaxantina, cantaxantina, saponinas, limonoides, kaempferol, miricetina, isoramnetina, proantocianidinas, quercetina, rutina, luteolina, apigenina, tangeritina, hesperetina, naringenina, erodictyol, flavan-3-ols (p. ej., antocianidinas), galocatequinas, epicatequina y sus formas de galato, epigallocatequina y sus formas de galato (ECGC) teaflavina y sus formas de galato, tearubiginas, fitoestrógenos de isoflavona, genisteína, daidzeína, gliciteína, anitocianinas, cianuro, delfinidina, malvidina, pelargonidina, peonidina, petunidina, ácido elágico, ácido gálico, ácido salicílico, ácido rosmarínico, ácido cinámico y sus derivados (por ejemplo, ácido ferúlico), ácido clorogénico, ácido chicórico, gallotaninos, elagitaninos, antoxantinas, betacianinas y otros pigmentos vegetales, silimarina, ácido cítrico, lignano, antinutrientes, bilirrubina, ácido úrico, ácido R- α -lipoico, N-acetilcisteína, emblicanina, extracto de manzana, extracto de piel de manzana (*applephenon*), extracto de rooibos rojo, extracto de rooibos verdes, extracto de bayas de espino, extracto de frambuesa roja, antioxidante de café verde (GCA), extracto de aronia al 20 %, extracto de semilla de uva (*VinOseed*), extracto de cacao, extracto de lúpulo, extracto de mangostán, extracto de cáscara de mangostán, extracto de arándano, extracto de granada, extracto de cáscara de granada, extracto de semilla de granada, extracto de bayas de espino, extracto de granada de pomella, extracto de corteza de canela, extracto de piel de uva, extracto de arándano, extracto de corteza de pino, picrogenol, extracto de saúco, extracto de raíz de morera, extracto de gogi (gogi), extracto de mora, extracto de arándano, extracto de hoja de arándano, extracto de frambuesa, extracto de cúrcuma, bioflavonoides cítricos, grosella negra, jengibre, polvo de acai, extracto de grano de café verde, extracto de té verde y ácido fítico, o combinaciones de los mismos. En ejemplos alternativos, el antioxidante es un antioxidante sintético tal como hidroxitolueno butilado o hidroxianisol

butilado, por ejemplo. Otras fuentes de antioxidantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, frutas, verduras, té, cacao, chocolate, especias, hierbas, arroz, vísceras de ganado, levadura, granos enteros o granos de cereales.

5 Los antioxidantes particulares pertenecen a la clase de fitonutrientes llamados polifenoles (también conocidos como "polifenólicos"), que son un grupo de sustancias químicas que se encuentran en las plantas, caracterizadas por la presencia de más de un grupo fenol por molécula. Se puede derivar de los polifenoles una variedad de beneficios para la salud, incluida la prevención del cáncer, enfermedades cardíacas y enfermedades inflamatorias crónicas y la mejora de la fortaleza mental y física, por ejemplo. Los polifenoles adecuados incluyen catequinas, proantocianidinas, procianidinas, antocianinas, quercetina, rutina, resveratrol, isoflavonas, curcumina, punicalagina, elagitanino, hesperidina, naringina, flavonoides cítricos, ácido clorogénico, otros materiales similares y combinaciones de los mismos.

15 Por ejemplo, el antioxidante es una catequina tal como, por ejemplo, galato de epigallocatequina (EGCG). Las fuentes adecuadas de catequinas incluyen, entre otras, té verde, té blanco, té negro, té oolong, chocolate, cacao, vino tinto, semilla de uva, piel de uva roja, piel de uva púrpura, zumo de uva roja, zumo de uva púrpura, bayas, picnogenol y cáscara de manzana roja.

20 En algunos ejemplos, el antioxidante se elige entre proantocianidinas, procianidinas o combinaciones de las mismas. Las fuentes adecuadas de proantocianidinas y procianidinas incluyen, pero no se limitan a, uvas rojas, uvas púrpura, cacao, chocolate, semillas de uva, vino tinto, granos de cacao, arándano, cáscara de manzana, ciruela, mirtillo, grosellas negras, té verde, sorgo, canela, cebada, judías rojas, judías pintas, lúpulo, almendras, avellanas, nueces, pistacho, picnogenol y bayas coloridas.

25 Por ejemplo, el antioxidante es una antocianina. Fuentes adecuadas de antocianinas incluyen, entre otras, bayas rojas, arándanos, mirtillo, grosella, frambuesa, cereza, granada, fresa, saúco, aronia, piel de uva roja, piel de uva púrpura, semilla de uva, vino tinto, grosella negra, grosella roja, cacao, ciruela, cáscara de manzana, durazno, pera roja, repollo rojo, cebolla roja, naranja roja y moras.

30 En algunos ejemplos, el antioxidante se elige entre quercetina, rutina o combinaciones de los mismos. Las fuentes adecuadas de quercetina y rutina incluyen, entre otras, manzanas rojas, cebollas, col rizada, arándano, arándano rojo, aronia, grosella, mora, arándano, fresa, frambuesa, grosella negra, té verde, té negro, ciruela, albaricoque, perejil, puerro, brócoli, ají, vino de bayas y ginkgo.

35 En algunos ejemplos, el antioxidante es el resveratrol. Las fuentes adecuadas de resveratrol incluyen, entre otras, uvas rojas, cacahuete, arándano, arándano, arándano, morera, té japonés Itadori y vino tinto.

Por ejemplo, el antioxidante es una isoflavona. Las fuentes adecuadas de isoflavonas incluyen, entre otras, judías de soja, productos de soja, legumbres, brotes de alfalfa, garbanzos, cacahuete y trébol rojo.

40 En algunos ejemplos, el antioxidante es la curcumina. Las fuentes adecuadas de curcumina incluyen, entre otras, cúrcuma y mostaza.

45 Por ejemplo, el antioxidante se elige entre punicalagina, elagitanina o combinaciones de los mismos. Las fuentes adecuadas de punicalagina y elagitanina incluyen, entre otras, granada, frambuesa, fresa, nuez y vino tinto envejecido en roble.

50 En algunos ejemplos, el antioxidante es un flavonoide cítrico, como la hesperidina o la naringina. Las fuentes adecuadas de flavonoides cítricos, como hesperidina o naringina, incluyen, entre otras, naranjas, pomelos y zumos cítricos.

55 Por ejemplo, el antioxidante es el ácido clorogénico. Las fuentes adecuadas de ácido clorogénico incluyen, entre otras, café verde, yerba mate, vino tinto, semilla de uva, piel de uva roja, piel de uva púrpura, zumo de uva roja, zumo de uva púrpura, zumo de manzana, grosella, granada, arándano, fresa, girasol, equinácea, picnogenol y cáscara de manzana.

Fibra dietética

60 En otro ejemplo, el ingrediente funcional es al menos una fuente de fibra dietética. Como se usa en el presente documento, la al menos una fuente de fibra dietética puede comprender una única fuente de fibra dietética o una pluralidad de fuentes de fibra dietética como ingrediente funcional para las composiciones proporcionadas en el presente documento. Generalmente, la al menos una fuente de fibra dietética está presente en la composición en una cantidad suficiente para promover la salud y el bienestar.

65 Numerosos carbohidratos poliméricos que tienen estructuras significativamente diferentes tanto en la composición como en los enlaces caen dentro de la definición de fibra dietética. Dichos compuestos son bien conocidos por los expertos en la técnica, ejemplos no limitativos de los cuales incluyen polisacáridos sin almidón, lignina, celulosa,

metilcelulosa, hemicelulosas, β -glucanos, pectinas, gomas, mucílago, ceras, inulinas, oligosacáridos, fructooligosacáridos, ciclodextrinas, quitinas y combinaciones de las mismas.

5 Los polisacáridos son carbohidratos complejos compuestos de monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos. Los polisacáridos sin almidón están unidos con enlaces β , que los humanos no pueden digerir debido a la falta de una enzima para romper los enlaces β . Por el contrario, los polisacáridos de almidón digeribles generalmente comprenden enlaces α (1-4).

10 La lignina es un polímero grande, altamente ramificado y reticulado basado en unidades de fenilpropano oxigenado. La celulosa es un polímero lineal de moléculas de glucosa unidas por un enlace β (1-4), que las amilasas de mamíferos no pueden hidrolizar. La metilcelulosa es un éster metílico de celulosa que frecuentemente se usa en alimentos como espesante y emulsionante. Está disponible comercialmente (por ejemplo, Citrucel de GlaxoSmithKline, Celevac de Shire Pharmaceuticals). Las hemicelulosas son polímeros altamente ramificados que consisten principalmente en glucurono- y 4-O-metilglucuroxilanos. Los β -glucanos son polímeros de enlaces mixtos 15 (1-3), (1-4) β -D-glucosa que se encuentran principalmente en los cereales, como la avena y la cebada. Las pectinas, como la beta pectina, son un grupo de polisacáridos compuestos principalmente de ácido D-galacturónico, que se metoxila en grados variables.

20 Las gomas y los mucílago representan una amplia gama de diferentes estructuras ramificadas. La goma guar, derivada del endospermo molido de la semilla guar, es un galactomanano. La goma guar está disponible comercialmente (por ejemplo, Benefiber de Novartis AG). Otras gomas, como la goma arábiga y las pectinas, todavía tienen estructuras diferentes. Todavía otras gomas incluyen goma xantano, goma gelano, goma tara, goma de cáscara de semilla de psyllium y goma de algarrobo.

25 Las ceras son ésteres de etilenglicol y dos ácidos grasos, que generalmente se presentan como un líquido hidrófobo que es insoluble en agua.

30 Las inulinas comprenden oligosacáridos de origen natural que pertenecen a una clase de carbohidratos conocidos como fructanos. Generalmente están compuestos de unidades de fructosa unidas por enlaces glucosídicos β (2-1) con una unidad de glucosa terminal. Los oligosacáridos son polímeros de sacáridos que contenían típicamente azúcares de tres a seis componentes. Por lo general, se encuentran unidos a O N a cadenas laterales de aminoácidos compatibles en proteínas o a moléculas de lípidos. Los fructooligosacáridos son oligosacáridos que consisten en cadenas cortas de moléculas de fructosa.

35 Las fuentes alimenticias de fibra dietética incluyen, pero no se limitan a, granos, legumbres, frutas y verduras. Los granos que proporcionan fibra dietética incluyen, entre otros, avena, centeno, cebada, trigo. Las legumbres que proporcionan fibra incluyen, pero no se limitan a, guisantes y judías como la soja. Las frutas y verduras que proporcionan una fuente de fibra incluyen, entre otras, manzanas, naranjas, peras, plátanos, bayas, tomates, judías verdes, brócoli, coliflor, zanahorias, patatas, apio. Los alimentos vegetales como el salvado, las nueces y las 40 semillas (como las semillas de lino) también son fuentes de fibra dietética. Las partes de las plantas que proporcionan fibra dietética incluyen, entre otros, los tallos, raíces, hojas, semillas, pulpa y piel.

45 Aunque la fibra dietética generalmente se deriva de fuentes vegetales, los productos animales no digeribles como las quitinas también se clasifican como fibra dietética. La quitina es un polisacárido compuesto por unidades de acetilglucosamina unidas por enlaces β (1-4), similares a los enlaces de la celulosa.

50 Las fuentes de fibra dietética frecuentemente se dividen en categorías de fibra soluble e insoluble en función de su solubilidad en agua. Tanto las fibras solubles como las insolubles se encuentran en los alimentos vegetales en diversos grados dependiendo de las características de la planta. Aunque insoluble en agua, la fibra insoluble tiene propiedades hidrofílicas pasivas que ayudan a aumentar el volumen, ablandar las heces y acortar el tiempo de tránsito de los sólidos fecales a través del tracto intestinal.

55 A diferencia de la fibra insoluble, la fibra soluble se disuelve fácilmente en agua. La fibra soluble se somete a un procesamiento metabólico activo mediante fermentación en el colon, lo que aumenta la microflora del colon y, por lo tanto, aumenta la masa de sólidos fecales. La fermentación de fibras por bacterias colónicas también produce productos finales con importantes beneficios para la salud. Por ejemplo, la fermentación de las masas de alimentos produce gases y ácidos grasos de cadena corta. Los ácidos producidos durante la fermentación incluyen los ácidos 60 butírico, acético, propiónico y valérico que tienen varias propiedades beneficiosas, como la estabilización de los niveles de glucosa en la sangre al actuar sobre la liberación de insulina pancreática y proporcionar el control del hígado mediante la descomposición del glucógeno. Además, la fermentación de fibra puede reducir la aterosclerosis al disminuir la síntesis de colesterol en el hígado y reducir los niveles sanguíneos de LDL y triglicéridos. Los ácidos producidos durante la fermentación reducen el pH del colon, protegiendo así el revestimiento del colon de la formación de pólipos cancerosos. El pH colónico más bajo también aumenta la absorción de minerales, mejora las propiedades de barrera de la capa mucosa del colon e inhibe los irritantes inflamatorios y de adhesión. La 65 fermentación de las fibras también puede beneficiar al sistema inmunitario al estimular la producción de células T auxiliares, anticuerpos, leucocitos, esplenocitos, citoquinas y linfocitos.

Ácidos grasos

5 En otro ejemplo, el ingrediente funcional es al menos un ácido graso. Como se usa en el presente documento, el al menos un ácido graso puede ser un ácido graso único o una pluralidad de ácidos grasos como ingrediente funcional para las composiciones proporcionadas en el presente documento. Generalmente, el al menos un ácido graso está presente en la composición en una cantidad suficiente para promover la salud y el bienestar.

10 Como se usa en este documento, "ácido graso" se refiere a cualquier ácido monocarboxílico de cadena lineal e incluye ácidos grasos saturados, ácidos grasos insaturados, ácidos grasos de cadena larga, ácidos grasos de cadena media, ácidos grasos de cadena corta, precursores de ácidos grasos (incluyendo precursores de ácidos grasos omega-9) y ácidos grasos esterificados. Como se usa en el presente documento, "ácido graso poliinsaturado de cadena larga" se refiere a cualquier ácido carboxílico poliinsaturado o ácido orgánico con una cola alifática larga. Como se usa en el presente documento, "ácido graso omega-3" se refiere a cualquier ácido graso poliinsaturado que tiene un primer doble enlace como el tercer enlace carbono-carbono desde el extremo metilo terminal de su cadena de carbono. Por ejemplo, el ácido graso omega-3 puede comprender un ácido graso omega-3 de cadena larga. Como se usa en el presente documento, "ácido graso omega-6" es cualquier ácido graso poliinsaturado que tiene un primer doble enlace como el sexto enlace carbono-carbono desde el extremo metilo terminal de su cadena de carbono.

20 Los ácidos grasos omega-3 adecuados pueden derivarse de algas, peces, animales, plantas o combinaciones de los mismos, por ejemplo. Ejemplos de ácidos grasos omega-3 adecuados incluyen, pero sin limitación, ácido linolénico, ácido alfa-linolénico, ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico, ácido estearidónico, ácido eicosatetraenoico y combinaciones de los mismos. En algunos ejemplos, se pueden proporcionar ácidos grasos omega-3 adecuados en aceites de pescado (por ejemplo, aceite de lacha, aceite de atún, aceite de salmón, aceite de bonito y aceite de bacalao), aceites omega-3 de microalgas o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, los ácidos grasos omega-3 adecuados pueden derivarse de aceites de ácidos grasos omega-3 disponibles comercialmente, como el aceite Microalgae DHA (de Martek, Columbia, MD), OmegaPure (de Omega Protein, Houston, TX), Marinol C-38 (de Lipid Nutrition, Channahon, IL), aceite Bonito y MEG-3 (de Ocean Nutrition, Dartmouth, NS), Evogel (de Symrise, Holzminden, Alemania), aceite marino, de atún o salmón (de Arista Wilton, CT), OmegaSource 2000, Marine Oil, de lacha y Marine Oil, de bacalao (de OmegaSource, RTP, NC).

35 Los ácidos grasos omega-6 adecuados incluyen, pero no se limitan a, ácido linoleico, ácido gamma-linolénico, ácido dihomo-gamma-linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosadienoico, ácido docosadienoico, ácido adrenico, ácido docosapentaenoico y combinaciones de los mismos.

40 Los ácidos grasos esterificados adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, monoacilglicérols que contenían ácidos grasos omega-3 y/o omega-6, diacilglicérols que contenían ácidos grasos omega-3 y/u omega-6, o triacilglicérols que contenían omega-3 y/o ácidos grasos omega-6 y combinaciones de los mismos.

Vitaminas

En otro ejemplo, el ingrediente funcional es al menos una vitamina.

45 Como se usa en el presente documento, la al menos una vitamina puede ser una sola vitamina o una pluralidad de vitaminas como ingrediente funcional para las composiciones proporcionadas en el presente documento. Generalmente, la al menos una vitamina está presente en la composición en una cantidad suficiente para promover la salud y el bienestar.

50 Las vitaminas son compuestos orgánicos que el cuerpo humano necesita en pequeñas cantidades para su funcionamiento normal. El cuerpo usa vitaminas sin descomponerlas, a diferencia de otros nutrientes como los carbohidratos y las proteínas. Hasta la fecha, se han reconocido trece vitaminas, y se pueden usar una o más en las composiciones del presente documento. Las vitaminas adecuadas incluyen, vitamina A, vitamina D, vitamina E, vitamina K, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B5, vitamina B6, vitamina B7, vitamina B9, vitamina B12 y vitamina C. Muchas de las vitaminas también tienen nombres químicos alternativos, ejemplos no limitativos de los cuales se proporcionan a continuación.

Vitamina	Nombres alternativos
Vitamina A	Retinol Retinaldehído Ácido retinoico Retinoides Retinal Éster retinoico

(continuación)

Vitamina	Nombres alternativos
Vitamina D (vitaminas D1-D5)	Calciferol Colecalciferol Lumisterol Ergocalciferol Dihidrotaquisterol 7-deshidrocolesterol
Vitamina E	Tocoferol Tocotrienol
Vitamina K	Filoquinona Naftoquinona
Vitamina B1	Tiamina
Vitamina B2	Riboflavina Vitamina G
Vitamina B3	Niacina Ácido nicotínico Vitamina PP
Vitamina B5	Ácido pantoténico
Vitamina B6	Piridoxina Piridoxal Piridoxamina
Vitamina B7	Biotina Vitamina H
Vitamina B9	Ácido fólico Folato Folacina Vitamina M Ácido Pteroil-L-glutámico
Vitamina B12	Cobalamina Cianocobalamina
Vitamina C	Ácido ascórbico

5 Varios otros compuestos han sido clasificados como vitaminas por algunas autoridades. Estos compuestos pueden denominarse pseudovitaminas e incluyen, entre otros, compuestos como ubiquinona (coenzima Q10), ácido pangámico, dimetilglicina, taestrilo, amigdalina, flavanoides, ácido para-aminobenzoico, adenina, ácido adenílico y s-metilmetionina. Como se usa en este documento, el término vitamina incluye pseudovitaminas.

10 En algunos ejemplos, la vitamina es una vitamina liposoluble elegida entre vitamina A, D, E, K y combinaciones de las mismas.

En otros ejemplos, la vitamina es una vitamina soluble en agua elegida entre vitamina B1, vitamina B2, vitamina B3, vitamina B6, vitamina B12, ácido fólico, biotina, ácido pantoténico, vitamina C y combinaciones de las mismas.

15 Glucosamina

En otro ejemplo, el ingrediente funcional es la glucosamina.

Generalmente, la glucosamina está presente en las composiciones en una cantidad suficiente para promover la salud y el bienestar.

La glucosamina, también llamada quitosamina, es un aminoazúcar que se considera un precursor importante en la síntesis bioquímica de proteínas y lípidos glicosilados. La D-glucosamina se produce naturalmente en el cartílago en forma de glucosamina-6-fosfato, que se sintetiza a partir de fructosa-6-fosfato y glutamina. Sin embargo, la glucosamina también está disponible en otras formas, ejemplos no limitantes de los cuales incluyen clorhidrato de glucosamina, sulfato de glucosamina, N-acetil-glucosamina, o cualquier otra forma de sal o combinaciones de los mismos. La glucosamina se puede obtener por hidrólisis ácida de las conchas de langostas, cangrejos, camarones o langostinos utilizando métodos bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, la glucosamina puede derivarse de biomasa fúngica que contiene quitina, como se describe en la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2006/0172392.

Las composiciones pueden comprender además sulfato de condroitina.

Mineral

En algunos ejemplos, el ingrediente funcional es al menos un mineral.

Como se usa en el presente documento, el al menos un mineral puede ser un solo mineral o una pluralidad de minerales como ingrediente funcional para las composiciones proporcionadas en el presente documento. Generalmente, el al menos un mineral está presente en la composición en una cantidad suficiente para promover la salud y el bienestar.

Los minerales, de acuerdo con las enseñanzas de esta divulgación, comprenden elementos químicos inorgánicos requeridos por organismos vivos. Los minerales están compuestos por una amplia gama de composiciones (por ejemplo, elementos, sales simples y silicatos complejos) y también varían ampliamente en la estructura cristalina. Pueden presentarse de forma natural en alimentos y bebidas, pueden agregarse como suplemento o pueden consumirse o administrarse por separado de los alimentos o bebidas.

Los minerales se pueden clasificar como minerales mayores, que se requieren en cantidades relativamente grandes, o minerales traza, que se requieren en cantidades relativamente pequeñas. Los minerales mayores generalmente se requieren en cantidades mayores o iguales a aproximadamente 100 mg por día y los minerales traza son aquellos que se requieren en cantidades menores a aproximadamente 100 mg por día.

Por ejemplo, el mineral se elige entre minerales mayores, minerales traza o combinaciones de los mismos. Ejemplos no limitativos de minerales mayores incluyen calcio, cloro, magnesio, fósforo, potasio, sodio y azufre. Ejemplos no limitativos de minerales traza incluyen cromo, cobalto, cobre, flúor, hierro, manganeso, molibdeno, selenio, zinc y yodo. Aunque el yodo generalmente se clasifica como un mineral traza, se requiere en mayores cantidades que otros minerales traza y, frecuentemente, se clasifica como un mineral mayor.

En otro ejemplo, el mineral es un mineral traza, que se cree que es necesario para la nutrición humana, cuyos ejemplos no limitativos incluyen bismuto, boro, litio, níquel, rubidio, silicio, estroncio, telurio, estaño, titanio, tungsteno y vanadio.

Los minerales descritos aquí pueden estar en cualquier forma conocida por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los minerales pueden estar en su forma iónica, teniendo una carga positiva o negativa. En otro ejemplo, los minerales pueden estar en su forma molecular. Por ejemplo, el azufre y el fósforo frecuentemente se encuentran naturalmente como sulfatos, sulfuros y fosfatos.

Conservantes

En otro ejemplo, el ingrediente funcional es al menos un conservante.

Como se usa en el presente documento, el al menos un conservante puede ser un solo conservante o una pluralidad de conservantes como ingrediente funcional para las composiciones proporcionadas en el presente documento. Generalmente, el al menos un conservante está presente en la composición en una cantidad suficiente para promover la salud y el bienestar.

Por ejemplo, el conservante se elige entre antimicrobianos, antioxidantes, antienzimáticos o combinaciones de los mismos. Ejemplos no limitativos de antimicrobianos incluyen sulfitos, propionatos, benzoatos, sorbatos, nitratos, nitritos, bacteriocinas, sales, azúcares, ácido acético, dicarbonato de dimetilo (DMDC), etanol y ozono.

Por ejemplo, el conservante es un sulfito. Los sulfitos incluyen, entre otros, dióxido de azufre, bisulfito de sodio e hidrogenosulfito de potasio.

En otro ejemplo, el conservante es un propionato. Los propionatos incluyen, entre otros, ácido propiónico, propionato de calcio y propionato de sodio.

5 En aun otro ejemplo, el conservante es un benzoato. Los benzoatos incluyen, entre otros, benzoato de sodio y ácido benzoico.

En otro ejemplo, el conservante es un sorbato. Los sorbatos incluyen, entre otros, sorbato de potasio, sorbato de sodio, sorbato de calcio y ácido sórbico.

10 En todavía otro ejemplo, el conservante es un nitrato y/o un nitrito. Los nitratos y nitritos incluyen, entre otros, nitrato de sodio y nitrito de sodio.

En aun otro ejemplo, el al menos un conservante es una bacteriocina, tal como, por ejemplo, nisina.

15 En otro ejemplo, el conservante es etanol.

En aun otro ejemplo, el conservante es ozono.

20 Ejemplos no limitantes de antienzimáticos adecuados para su uso como conservantes incluyen ácido ascórbico, ácido cítrico y agentes quelantes de metales tales como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA).

Agentes de hidratación

25 En otro ejemplo, el ingrediente funcional es al menos un agente de hidratación.

Como se usa en el presente documento, el al menos un agente de hidratación puede ser un agente de hidratación único o una pluralidad de agentes de hidratación como ingrediente funcional para las composiciones proporcionadas en el presente documento. Generalmente, el al menos un agente de hidratación está presente en la composición en una cantidad suficiente para promover la salud y el bienestar.

30 Los productos de hidratación ayudan al cuerpo a reemplazar los líquidos que se pierden por excreción. Por ejemplo, el fluido se pierde como sudor para regular la temperatura corporal, como orina para excretar sustancias de desecho y como vapor de agua para intercambiar gases en los pulmones. La pérdida de líquidos también puede ocurrir debido a una amplia gama de causas externas, cuyos ejemplos no limitativos incluyen actividad física, exposición al
35 aire seco, diarrea, vómitos, hipertermia, choque, pérdida de sangre e hipotensión. Las enfermedades que causan pérdida de líquidos incluyen diabetes, cólera, gastroenteritis, shigelosis y fiebre amarilla. Las formas de desnutrición que causan la pérdida de líquidos incluyen el consumo excesivo de alcohol, desequilibrio electrolítico, ayuno y pérdida rápida de peso.

40 Por ejemplo, el producto de hidratación es una composición que ayuda al cuerpo a reemplazar los líquidos que se pierden durante el ejercicio. Por consiguiente, en un ejemplo, el producto de hidratación es un electrolito, cuyos ejemplos no limitantes incluyen sodio, potasio, calcio, magnesio, cloruro, fosfato, bicarbonato y combinaciones de los mismos. Los electrolitos adecuados también se divulgan en la Patente de los Estados Unidos No. 5,681,569.

45 Por ejemplo, los electrolitos se obtienen de sus sales solubles en agua correspondientes. Ejemplos no limitantes de sales para uso en realizaciones particulares incluyen cloruros, carbonatos, sulfatos, acetatos, bicarbonatos, citratos, fosfatos, hidrogenofosfatos, tartratos, sorbatos, citratos, benzoatos o combinaciones de los mismos. En otros ejemplos, los electrolitos son proporcionados por zumos, extractos de frutas, extractos vegetales, té o extractos de
50 té.

Por ejemplo, el producto de hidratación es un carbohidrato para complementar las reservas de energía quemadas por los músculos. Carbohidratos adecuados se describen en las Patentes Estadounidenses Nos. 4,312,856, 4,853,237, 5,681,569 y 6,989,171. Ejemplos no limitativos de carbohidratos adecuados incluyen monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos, polisacáridos complejos o combinaciones de los mismos. Ejemplos no limitativos de tipos adecuados de monosacáridos incluyen triosas, tetrasas, pentosas, hexosas, heptosas, octosas y nonosas. Ejemplos no limitativos de tipos específicos de monosacáridos adecuados incluyen gliceraldehído, dihidroxiacetona, eritrosa, treosa, eritrolosa, arabinosa, lixosa, ribosa, xilosa, ribulosa, xilulosa, alosa, altrosa, galactosa, glucosa, gulosa, idosa, manosa, talosa, fructosa, psicosa, sorbosa, tagatosa, manoheptulosa, sedoheptulosa, octolosa y sialosa. Ejemplos no limitantes de disacáridos adecuados incluyen sacarosa, lactosa y maltosa. Ejemplos no
60 limitativos de oligosacáridos adecuados incluyen sacarosa, maltotriosa y maltodextrina. En otros ejemplos, los carbohidratos son proporcionados por un jarabe de maíz, un azúcar de remolacha, un azúcar de caña, un zumo o un té.

65 En otro ejemplo, la hidratación es un flavanol que proporciona rehidratación celular. Los flavanoles son una clase de sustancias naturales presentes en las plantas, y generalmente comprenden un esqueleto molecular de 2-fenilbenzopirona unido a una o más unidades estructurales químicas. Entre los ejemplos no limitativos de flavanoles

adecuados se incluyen catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina, galato de epicatequina, galato de epigalocatequina 3, teaflavina, teaflavina 3-galato, teaflavina 3'-galato, teaflavina 3,3'-galato, tearubigina o combinaciones de los mismos. Varias fuentes comunes de flavanoles incluyen plantas de té, frutas, verduras y flores. Por ejemplo, el flavanol se extrae del té verde.

5 Por ejemplo, el producto de hidratación es una solución de glicerol para potenciar la resistencia al ejercicio. Se ha demostrado que la ingestión de una solución que contiene glicerol proporciona efectos fisiológicos beneficiosos, como volumen sanguíneo expandido, frecuencia cardíaca más baja y temperatura rectal más baja.

10 Probióticos/Prebióticos

En algunos ejemplos, el ingrediente funcional se elige entre al menos un probiótico, prebiótico y una combinación de los mismos.

15 Como se usa en el presente documento, el al menos un probiótico o prebiótico puede ser un solo probiótico o prebiótico o una pluralidad de probióticos o prebióticos como ingrediente funcional para las composiciones proporcionadas en el presente documento. Generalmente, el al menos un probiótico, prebiótico o combinación de los mismos está presente en la composición en una cantidad suficiente para promover la salud y el bienestar.

20 Los probióticos, de acuerdo con las enseñanzas de esta divulgación, comprenden microorganismos que benefician la salud cuando se consumen en una cantidad efectiva. Deseablemente, los probióticos afectan beneficiosamente la microflora gastrointestinal natural del cuerpo humano e imparten beneficios para la salud además de la nutrición. Los probióticos pueden incluir, sin limitación, bacterias, levaduras y hongos.

25 Los prebióticos, de acuerdo con las enseñanzas de esta divulgación, son composiciones que promueven el crecimiento de bacterias beneficiosas en los intestinos. Las sustancias prebióticas pueden ser consumidas por un probiótico relevante, o de otra manera ayudar a mantener vivo el probiótico relevante o estimular su crecimiento. Cuando se consumen en una cantidad efectiva, los prebióticos también afectan beneficiosamente la microflora gastrointestinal natural del cuerpo humano y, por lo tanto, imparten beneficios para la salud además de la nutrición.

30 Los alimentos prebióticos ingresan al colon y sirven como sustrato para las bacterias endógenas, proporcionando indirectamente al huésped energía, sustratos metabólicos y micronutrientes esenciales. La digestión y absorción del cuerpo de los alimentos prebióticos depende de la actividad metabólica bacteriana, que salva la energía para el huésped de los nutrientes que escapan de la digestión y la absorción en el intestino delgado.

35 Por ejemplo, el probiótico es un microorganismo beneficioso que afecta beneficiosamente la microflora gastrointestinal natural del cuerpo humano e imparte beneficios para la salud además de la nutrición. Ejemplos de probióticos incluyen, pero no se limitan a, bacterias del género *Lactobacilli*, *Bifidobacteria*, *Streptococci* o combinaciones de los mismos, que confieren efectos beneficiosos para los humanos.

40 Por ejemplo, el al menos un probiótico se elige del género *Lactobacilli*. Los lactobacilos (es decir, las bacterias del género *Lactobacillus*, en adelante "L.") se han utilizado durante varios cientos de años como conservantes de alimentos y para promover la salud humana. Ejemplos no limitantes de especies de *Lactobacilli* encontradas en el tracto intestinal humano incluyen *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. saliva roes*, *L. brevis*, *L. leichmannii*, *L. plantarum*, *L. cellobiosus*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. GG*, *L. bulgaricus* y *L. thermophilus*.

45 Por ejemplo, el probiótico se elige del género *Bifidobacteria*. También se sabe que las bifidobacterias ejercen una influencia beneficiosa sobre la salud humana al producir ácidos grasos de cadena corta (por ejemplo, ácidos acético, propiónico y butírico), ácidos láctico y fórmico como resultado del metabolismo de los carbohidratos. Las especies no limitantes de *Bifidobacteria* encontradas en el tracto gastrointestinal humano incluyen *B. angulatum*, *B. animalis*, *B. asteroides*, *B. bifidum*, *B. boum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. choerinum*, *B. coryneforme*, *B. cuniculi*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. gallinarum*, *B. indicum*, *B. longum*, *B. magnum*, *B. merycicum*, *B. minimum*, *B. pseudocatenulatum*, *B. pseudolongum*, *B. psychraerophilum*, *B. pullorum*, *B. ruminantium*, *B. saeculare*, *B. scardovii*, *B. simiae*, *B. subtile*, *B. thermacidophilum*, *B. thermophilum*, *B. urinalis* y *B. sp.*

55 Por ejemplo, el probiótico se elige del género *Streptococcus*. *Streptococcus thermophilus* es un anaerobio facultativo grampositivo. Se clasifica como una bacteria del ácido láctico y comúnmente se encuentra en la leche y los productos lácteos, y se usa en la producción de yogur. Otras especies prebióticas no limitantes de esta bacteria incluyen *Streptococcus salivarius* y *Streptococcus cremoris*.

60 Los probióticos que pueden usarse son bien conocidos por los expertos en la materia. Ejemplos no limitantes de alimentos que comprenden probióticos incluyen yogur, chucrut, kéfir, kimchi, vegetales fermentados y otros alimentos que contenían un elemento microbiano que afecta beneficiosamente al animal huésped al mejorar el microbalance intestinal.

65 Los prebióticos incluyen, sin limitación, mucopolisacáridos, oligosacáridos, polisacáridos, aminoácidos, vitaminas, precursores de nutrientes, proteínas y combinaciones de los mismos.

Por ejemplo, el prebiótico se elige entre fibras dietéticas, que incluyen, sin limitación, polisacáridos y oligosacáridos. Estos compuestos tienen la capacidad de aumentar la cantidad de probióticos, lo que conduce a los beneficios conferidos por los probióticos. Ejemplos no limitantes de oligosacáridos que se clasifican como prebióticos incluyen fructooligosacáridos, inulinas, isomaltooligosacáridos, lactilol, lactosucrosa, lactulosa, pirodextrinas, oligosacáridos de soja, transgalactooligosacáridos y xilooligosacáridos.

Por ejemplo, el prebiótico es un aminoácido. Aunque varios prebióticos conocidos se descomponen para proporcionar carbohidratos para los probióticos, algunos probióticos también requieren aminoácidos para su alimentación.

Los prebióticos se encuentran naturalmente en una variedad de alimentos que incluyen, entre otros, plátanos, bayas, espárragos, ajo, trigo, avena, cebada (y otros granos enteros), linaza, tomates, alcachofa de Jerusalén, cebollas y achicoria, verduras (por ejemplo, hojas de diente de león, espinacas, col rizada, acelgas, kale, hojas de mostaza, hojas de nabo) y legumbres (por ejemplo, lentejas, judías, garbanzos, judías azules, judías blancas, judías negras).

Agentes para control de peso

En otro ejemplo, el ingrediente funcional es al menos un agente de control de peso.

Como se usa en el presente documento, el al menos un agente de control de peso puede ser un agente de control de peso único o una pluralidad de agentes de control de peso como ingrediente funcional para las composiciones proporcionadas en el presente documento. Generalmente, el al menos un agente de control de peso está presente en la composición en una cantidad suficiente para promover la salud y el bienestar.

Como se usa en el presente documento, "un agente de control de peso" incluye un supresor del apetito y/o un agente de termogénesis. Como se usa en el presente documento, las expresiones "supresor del apetito", "composiciones de saciedad del apetito", "agentes de saciedad" e "ingredientes de saciedad" son sinónimos. La expresión "supresor del apetito" describe macronutrientes, extractos de hierbas, hormonas exógenas, anorécticos, anorexigénicos, drogas farmacéuticas y sus combinaciones, que cuando se administran en una cantidad efectiva, suprimen, inhiben, reducen o restringen el apetito de una persona. La expresión "agente de termogénesis" describe macronutrientes, extractos de hierbas, hormonas exógenas, anorécticos, anorexigénicos, drogas farmacéuticas y combinaciones de los mismos, que cuando se administran en una cantidad efectiva, activan o mejoran la termogénesis o el metabolismo de una persona.

Los agentes de control de peso adecuados incluyen macronutrientes seleccionados del grupo que consiste en proteínas, carbohidratos, grasas dietéticas y combinaciones de los mismos. El consumo de proteínas, carbohidratos y grasas en la dieta estimula la liberación de péptidos con efectos supresores del apetito. Por ejemplo, el consumo de proteínas y grasas en la dieta estimula la liberación de la hormona intestinal colecitoquinina (CCK), mientras que el consumo de carbohidratos y grasas en la dieta estimula la liberación del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1).

Los agentes macronutrientes de control de peso adecuados también incluyen carbohidratos. Los carbohidratos generalmente comprenden azúcares, almidones, celulosa y gomas que el cuerpo convierte en glucosa para obtener energía. Los carbohidratos frecuentemente se clasifican en dos categorías, carbohidratos digeribles (por ejemplo, monosacáridos, disacáridos y almidón) y carbohidratos no digeribles (por ejemplo, fibra dietética). Los estudios han demostrado que los carbohidratos no digeribles y los carbohidratos poliméricos complejos que tienen una absorción y digestibilidad reducidas en el intestino delgado estimulan respuestas fisiológicas que inhiben la ingesta de alimentos. Por consiguiente, los carbohidratos descritos en este documento comprenden deseablemente carbohidratos no digeribles o carbohidratos con digestibilidad reducida. Ejemplos no limitantes de tales carbohidratos incluyen povidexrosa; inulina; polioles derivados de monosacáridos tales como eritritol, manitol, xilitol y sorbitol; alcoholes derivados de disacáridos tales como isomalta, lactitol y maltitol; e hidrolizados de almidón hidrogenados. Los carbohidratos se describen con más detalle a continuación.

En otro ejemplo, el agente de control de peso es una grasa dietética. Las grasas dietéticas son lípidos que comprenden combinaciones de ácidos grasos saturados e insaturados. Se ha demostrado que los ácidos grasos poliinsaturados tienen un mayor poder saciante que los ácidos grasos monoinsaturados. Por consiguiente, las grasas dietéticas descritas en el presente documento comprenden deseablemente ácidos grasos poliinsaturados, cuyos ejemplos no limitantes incluyen triacilgliceroles.

Por ejemplo, los agentes de control de peso son un extracto de hierbas. Se han identificado extractos de numerosos tipos de plantas que poseen propiedades supresoras del apetito. Ejemplos no limitantes de plantas cuyos extractos tienen propiedades supresoras del apetito incluyen plantas de los géneros *Hoodia*, *Trichocaulon*, *Caralluma*, *Stapelia*, *Orbea*, *Asclepias* y *Camelia*. Otros ejemplos incluyen extractos derivados de *Gymnema Sylvestre*, nuez de cola, *Citrus aurantium*, yerba mate, *Griffonia Simplicifolia*, Guaraná, mirra, lípidos de guggul y aceite de semilla de grosella negra.

Los extractos de hierbas pueden prepararse a partir de cualquier tipo de material vegetal o biomasa vegetal. Ejemplos no limitantes de material vegetal y biomasa incluyen los tallos, raíces, hojas, polvo seco obtenido del material vegetal y savia o savia seca. Los extractos de hierbas generalmente se preparan extrayendo la savia de la planta y luego secando la savia por pulverización. Alternativamente, se pueden emplear procedimientos de extracción con disolvente. Después de la extracción inicial, puede ser deseable fraccionar aún más el extracto inicial (por ejemplo, mediante cromatografía en columna) para obtener un extracto de hierbas con actividad mejorada. Dichas técnicas son bien conocidas por los expertos en la materia.

Por ejemplo, el extracto de hierbas se deriva de una planta del género *Hoodia*, cuyas especies incluyen *H. alstonii*, *H. currorii*, *H. dregei*, *H. flava*, *H. gordonii*, *H. jutatae*, *H. mossamedensis*, *H. officinalis*, *H. parviflorai*, *H. pedicellata*, *H. pilifera*, *H. ruschii* y *H. triebneri*. Las plantas de *Hoodia* son suculentas nativas del sur de África. Se cree que un glucósido de esterol de *Hoodia*, conocido como P57, es responsable del efecto supresor del apetito de la especie *Hoodia*.

En otro ejemplo, el extracto de hierbas se deriva de una planta del género *Caralluma*, cuyas especies incluyen *C. indica*, *C. fimbriata*, *C. atenuados*, *C. tuberculata*, *C. edulis*, *C. adscendens*, *C. stalagmifera*, *C. umbelado*, *C. penicillata*, *C. russeliana*, *C. retrospiciens*, *C. Arabica* y *C. lasiantha*. Las plantas de *Carralluma* pertenecen a la misma subfamilia que *Hoodia*, *Asclepiadaceae*. Los *caralluma* son plantas pequeñas, erectas y carnosas nativas de la India que tienen propiedades medicinales, como la supresión del apetito, que generalmente se atribuyen a glucósidos que pertenecen al grupo de glucósidos pregnano, cuyos ejemplos no limitativos incluyen caratubósido A, caratubósido B, boucerósido I, boucerósido II, boucerósido III, boucerósido IV, boucerósido V, boucerósido VI, boucerósido VII, boucerósido VIII, boucerósido IX y boucerósido X.

En otro ejemplo, el al menos un extracto de hierbas se deriva de una planta del género *Trichocaulon*. Las plantas de *Trichocaulon* son suculentas que generalmente son nativas del sur de África, similares a *Hoodia*, e incluyen las especies *T. piliferum* y *T. officinale*.

En otro ejemplo, el extracto de hierbas deriva de una planta del género *Stapelia* u *Orbea*, cuyas especies incluyen *S. gigantean* y *O. variegata*, respectivamente. Las plantas *Stapelia* y *Orbea* pertenecen a la misma subfamilia que *Hoodia*, *Asclepiadaceae*. Sin desear limitarse a ninguna teoría, se cree que los compuestos que exhiben actividad supresora del apetito son saponinas, como los glucósidos pregnano, que incluyen estavarósidos A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, y K.

En otro ejemplo, el extracto de hierbas se deriva de una planta del género *Asclepias*. Las plantas *Asclepias* también pertenecen a la familia de plantas *Asclepiadaceae*. Ejemplos no limitativos de plantas de *Asclepias* incluyen *A. incarnate*, *A. curassayica*, *A. syriaca* y *A. tuberosa*. No deseando estar atados a ninguna teoría, se cree que los extractos comprenden compuestos esteroideos, como los glucósidos pregnano y la aglicona pregnano, que tienen efectos supresores del apetito.

En un ejemplo, el agente de control de peso es una hormona exógena que tiene un efecto de control de peso. Ejemplos no limitantes de tales hormonas incluyen CCK, péptido YY, grelina, bombesina y péptido liberador de gastrina (GRP), enterostatina, apolipoproteína A-IV, GLP-1, amilina, somastatina y leptina.

En otro ejemplo, el agente de control de peso es una droga farmacéutica. Ejemplos no limitativos incluyen fentenima, dietilpropión, fendimetrazina, sibutramina, rimonabant, oxintomodulina, clorhidrato de floxetina, efedrina, fenetilamina u otros estimulantes.

Agente de manejo de osteoporosis

En otro ejemplo, el ingrediente funcional es al menos un agente de manejo de la osteoporosis.

Como se usa en el presente documento, el al menos un agente de manejo de la osteoporosis puede ser un agente de manejo de la osteoporosis único o una pluralidad de agentes de manejo de la osteoporosis como ingrediente funcional para las composiciones proporcionadas en el presente documento. Generalmente, el al menos un agente para el manejo de la osteoporosis está presente en la composición en una cantidad suficiente para promover la salud y el bienestar.

La osteoporosis es un trastorno esquelético de resistencia ósea comprometida, que da como resultado un mayor riesgo de fractura ósea. En general, la osteoporosis se caracteriza por la reducción de la densidad mineral ósea (DMO), la alteración de la microarquitectura ósea y cambios en la cantidad y variedad de proteínas no colágenas en el hueso.

En algunos ejemplos, el agente de manejo de la osteoporosis es al menos una fuente de calcio. Por ejemplo, la fuente de calcio es cualquier compuesto que contenga calcio, incluidos los complejos de sal, las especies solubilizadas y otras formas de calcio. Ejemplos no limitantes de fuentes de calcio incluyen calcio quelado con aminoácidos, carbonato de calcio, óxido de calcio, hidróxido de calcio, sulfato de calcio, cloruro de calcio, fosfato de

calcio, hidrogenofosfato de calcio, dihidrogenofosfato de calcio, citrato de calcio, malato de calcio, malato citrato de calcio, gluconato de calcio, tartrato de calcio, lactato de calcio, especies solubilizadas de los mismos y combinaciones de los mismos.

5 Por ejemplo, el agente de manejo de la osteoporosis es una fuente de magnesio. La fuente de magnesio es cualquier compuesto que contenga magnesio, incluidos los complejos de sal, las especies solubilizadas y otras formas de magnesio. Ejemplos no limitantes de fuentes de magnesio incluyen cloruro de magnesio, citrato de magnesio, gluceptato de magnesio, gluconato de magnesio, lactato de magnesio, hidróxido de magnesio, picolato de magnesio, sulfato de magnesio, especies solubilizadas de los mismos y mezclas de los mismos. En otra realización particular, la fuente de magnesio comprende un magnesio quelado con aminoácidos o quelato con creatina.

En otros ejemplos, el agente de osteoporosis se elige entre las vitaminas D, C, K, sus precursores y/o betacaroteno y combinaciones de los mismos.

15 Numerosas plantas y extractos de plantas también se han identificado como eficaces en la prevención y el tratamiento de la osteoporosis. No deseando estar atados a ninguna teoría, se cree que las plantas y los extractos de plantas estimulan las proteínas morfogénicas óseas y/o inhiben la resorción ósea, estimulando así la regeneración y la resistencia ósea. Ejemplos no limitativos de plantas y extractos de plantas adecuados como agentes para el manejo de la osteoporosis incluyen especies del género *Taraxacum* y *Amelanchier*, como se describe en la Publicación de Patente de los Estados Unidos No. 2005/0106215, y especies de los géneros *Lindera*, *Artemisia*, *Acorus*, *Carthamus*, *Carum*, *Cnidium*, *Curcuma*, *Cyperus*, *Juniperus*, *Prunus*, *Iris*, *Cichorium*, *Dodonaea*, *Epimedium*, *Erigonoum*, *Soja*, *Mentha*, *Ocimum*, *thymus*, *Tanacetum*, *Plantago*, *Spearmint*, *Bixa*, *Vitis*, *Rosemarinus*, *Rhus* y *Anethum*, como se describe en la Publicación de los Estados Unidos. No. 2005/0079232.

25 Fitoestrógeno

En otro ejemplo, el ingrediente funcional es al menos un fitoestrógeno.

30 Como se usa en el presente documento, el al menos un fitoestrógeno puede ser un solo fitoestrógeno o una pluralidad de fitoestrógenos como ingrediente funcional para las composiciones proporcionadas en el presente documento. Generalmente, el al menos un fitoestrógeno está presente en la composición en una cantidad suficiente para promover la salud y el bienestar.

35 Los fitoestrógenos son compuestos que se encuentran en las plantas que típicamente se pueden administrar a los cuerpos humanos por ingestión de las plantas o las partes de la planta que tienen los fitoestrógenos. Como se usa en el presente documento, "fitoestrógeno" se refiere a cualquier sustancia que, cuando se introduce en un cuerpo, produce un efecto similar al estrógeno de cualquier grado. Por ejemplo, un fitoestrógeno puede unirse a los receptores de estrógeno dentro del cuerpo y tener un pequeño efecto similar al estrógeno.

40 Ejemplos de fitoestrógenos adecuados incluyen, pero sin limitación, isoflavonas, estilbenos, lignanos, lactonas de ácido resorcíclico, coumestanos, coumestrol, equol y combinaciones de los mismos. Las fuentes de fitoestrógenos adecuados incluyen, entre otros, granos enteros, cereales, fibras, frutas, verduras, cohosh negro, raíz de agave, grosella negra, espino negro, castañas, corteza de sauquillo, raíz de dong quai, raíz del palo del diablo, raíz de falso unicornio, raíz de ginseng, senecio común, regaliz, senecio aureo, hierba de agripalma, raíz de peonía, hojas de frambuesa, plantas familiares de rosa, hojas de salvia, raíz de zarzaparrilla, palma enana americana, raíz de ñame silvestre, flores de milenrama, legumbres, soja, productos de soja (por ejemplo, miso, harina de soja, leche de soja, nueces de soja, aislado de proteína de soja, tempen o tofu) garbanzos, nueces, lentejas, semillas, trébol, trébol rojo, hojas de diente de león, raíces de diente de león, semillas de fenogreco, té verde, lúpulo, vino tinto, linaza, ajo, cebolla, linaza, borraja, marihuana, alcaravea, asuzgatillo, vítex, dátiles, eneldo, semillas de hinojo, gotu kola, cardo mariano, poleo, granadas, madera del sur, harina de soja, tanaceto y raíz de vid kudzu (raíz de pueraria) y similares, y combinaciones de los mismos.

55 Las isoflavonas pertenecen al grupo de fitonutrientes llamados polifenoles. En general, los polifenoles (también conocidos como "polifenoles") son un grupo de sustancias químicas que se encuentran en las plantas, caracterizadas por la presencia de más de un grupo fenol por molécula.

Las isoflavonas de fitoestrógenos adecuadas incluyen genisteína, daidzeína, gliciteína, biocanina A, formononetina, sus respectivos glucósidos y conjugados de glucósidos, matairesinol, secoisolariciresinol, enterolactona, enterodiol, proteína vegetal texturizada y combinaciones de los mismos.

60 Las fuentes adecuadas de isoflavonas incluyen, pero no se limitan a, judías de soja, productos de soja, legumbres, brotes de alfalfa, garbanzos, cacahuets y trébol rojo.

65 Alcohol saturado alifático primario de cadena larga

En otro ejemplo, el ingrediente funcional es al menos un alcohol saturado alifático primario de cadena larga.

Como se usa en el presente documento, el al menos un alcohol saturado alifático primario de cadena larga puede ser un alcohol saturado alifático primario de cadena larga o una pluralidad de alcoholes saturados alifáticos primarios de cadena larga como ingrediente funcional para las composiciones proporcionadas en el presente documento. Generalmente, el al menos un alcohol saturado alifático primario de cadena larga está presente en la composición en una cantidad suficiente para promover la salud y el bienestar.

Los alcoholes saturados alifáticos primarios de cadena larga son un grupo diverso de compuestos orgánicos. El término alcohol se refiere al hecho de que estos compuestos presentan un grupo hidroxilo (-OH) unido a un átomo de carbono. El término primario se refiere al hecho de que en estos compuestos el átomo de carbono que está unido al grupo hidroxilo está unido a solo otro átomo de carbono. El término saturado se refiere al hecho de que estos compuestos no tienen enlaces pi carbono a carbono. El término alifático se refiere al hecho de que los átomos de carbono en estos compuestos están unidos en cadenas lineales o ramificadas en lugar de en anillos. El término cadena larga se refiere al hecho de que el número de átomos de carbono en estos compuestos es de al menos 8 carbonos).

Ejemplos no limitantes de alcoholes alifáticos primarios alifáticos de cadena larga particulares incluyen el 1-octanol de 8 átomos de carbono, el 1-nonanol de 9 carbonos, el 1-decanol de 10 átomos de carbono, el 1-dodecanol de 12 átomos de carbono, 1-tetradecanol de 14 átomos de carbono, 1-hexadecanol de 16 átomos de carbono, 1-octadecanol, de 18 átomos de carbono, 1 eicosanol de 20 átomos de carbono, 1-docosanol de 22 átomos de carbono, 1-tetracosanol de 24 átomos de carbono, 1-hexacosanol de 26 átomos de carbono, 1-heptacosanol de 27 átomos de carbono, 1-octanosol de 28 átomos de carbono, 1-nonacosanol de 29 átomos de carbono, 1-triacontanol de 30 átomos de carbono, 1-dotriacontanol de 32 átomos de carbono, y el 1-tetracontanol de 34 átomos de carbono.

Por ejemplo, los alcoholes alifáticos primarios saturados de cadena larga son policosanoles. Policosanol es el término para una mezcla de alcoholes saturados alifáticos primarios de cadena larga compuestos principalmente de 28 carbonos 1-octanosol y 30 carbonos 1-triacontanol, así como otros alcoholes en concentraciones más bajas como 22 carbonos 1-docosanol, 24 carbonos 1-tetracosanol, 26 carbonos 1-hexacosanol, 27 carbonos 1-heptacosanol, 29 carbonos 1-nonacosanol, 32 carbonos 1-dotriacontanol y 34 carbonos 1-tetracontanol.

Los alcoholes saturados alifáticos primarios de cadena larga se derivan de grasas y aceites naturales. Se pueden obtener de estas fuentes utilizando técnicas de extracción bien conocidas por los expertos en la materia. Los policosanoles pueden aislarse de una variedad de plantas y materiales que incluyen caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), ñames (por ejemplo, *Dioscorea oposita*), salvado de arroz (por ejemplo, *Oryza sativa*) y cera de abejas. Los policosanoles se pueden obtener de estas fuentes usando técnicas de extracción bien conocidas por los expertos en la materia. Se puede encontrar una descripción de tales técnicas de extracción en la Patente de los Estados Unidos Appl. No. 2005/0220868.

Fitosteroles

En otro ejemplo, el ingrediente funcional es al menos un fitosterol, fitostanol o combinación de los mismos.

Generalmente, el al menos un fitosterol, fitostanol o combinación de los mismos está presente en la composición en una cantidad suficiente para promover la salud y el bienestar.

Como se usa en el presente documento, las expresiones "estanol", "estanol vegetal" y "fitostanol" son sinónimos.

Los esteroides y estanoles vegetales están presentes naturalmente en pequeñas cantidades en muchas frutas, verduras, nueces, semillas, cereales, legumbres, aceites vegetales, corteza de los árboles y otras fuentes vegetales. Aunque las personas normalmente consumen esteroides y estanoles vegetales todos los días, las cantidades consumidas son insuficientes para tener efectos reductores del colesterol u otros beneficios para la salud. En consecuencia, sería deseable suplementar alimentos y bebidas con esteroides y estanoles vegetales.

Los esteroides son un subgrupo de esteroides con un grupo hidroxilo en C-3. En general, los fitoesteroides tienen un doble enlace dentro del núcleo de esteroides, como el colesterol; sin embargo, los fitoesteroides también pueden comprender una cadena lateral sustituida (R) en C-24, como un grupo etilo o metilo, o un doble enlace adicional. Las estructuras de los fitoesteroides son bien conocidas por los expertos en la materia.

Se han descubierto al menos 44 fitoesteroides de origen natural, y generalmente se derivan de plantas, tales como aceites de maíz, soja, trigo y madera; sin embargo, también pueden producirse sintéticamente para formar composiciones idénticas a las de la naturaleza o que tienen propiedades similares a las de los fitoesteroides naturales. Ejemplos no limitantes de fitoesteroides bien conocidos por los expertos en la técnica incluyen 4-desmetilesteroides (por ejemplo, β -sitosterol, campesterol, stigmasterol, brasicasterol, 22-deshidrobrasicasterol y Δ 5-avenasterol), 4-monometil esteroides y 4,4-dimetil esteroides (alcoholes triterpénicos) (por ejemplo, cicloartenol, 24-metilcicloartenol y ciclobranol).

Como se usa en el presente documento, las expresiones "estanol", "estanol vegetal" y "fitostanol" son sinónimos. Los fitostanoles son alcoholes de esteroides saturados presentes en pequeñas cantidades en la naturaleza y también pueden producirse sintéticamente, como por hidrogenación de fitosteroides. Ejemplos no limitativos de fitostanoles incluyen β -sitostanol, campestanol, cicloartanol y formas saturadas de otros alcoholes triterpénicos.

5 Tanto los fitosteroides como los fitostanoles, como se usan en este documento, incluyen los diversos isómeros tales como los isómeros α y β (por ejemplo, α -sitosterol y β -sitostanol, que comprenden uno de los fitosteroides y fitostanoles más eficaces, respectivamente, para reducir el suero colesterol en mamíferos).

10 Los fitosteroides y fitostanoles también pueden estar en su forma de éster. Los métodos adecuados para derivar los ésteres de fitosteroides y fitostanoles son bien conocidos por los expertos en la materia, y se describen en las Patentes Estadounidenses Nos. 6,589,588, 6,635,774, 6,800,317 y en la Publicación de Patente Estadounidense No. 2003/0045473. Ejemplos no limitativos de ésteres de fitosterol y fitostanol adecuados incluyen acetato de sitosterol, oleato de sitosterol, oleato de estigmasterol y sus correspondientes ésteres de fitostanol. Los fitosteroides y
15 fitostanoles también pueden incluir sus derivados.

En general, la cantidad de ingrediente funcional en la composición varía ampliamente dependiendo de la composición particular y del ingrediente funcional deseado. Los expertos en la materia determinarán fácilmente la cantidad apropiada de ingrediente funcional para cada composición.

20 Un método para preparar una composición comprende combinar rebaudiosido I y al menos un edulcorante y/o aditivo y/o ingrediente funcional.

Consumibles

25 Por ejemplo, la composición es un consumible que comprende rebaudiosido I, o un consumible que comprende una composición que comprende rebaudiosido I (por ejemplo, una composición edulcorante).

30 El rebaudiosido I, o una composición que lo comprende, puede incorporarse en cualquier composición comestible u oral conocida (denominada en el presente documento "consumible"), tal como, por ejemplo, composiciones farmacéuticas, mezclas y composiciones de gel comestible, dental composiciones, productos alimenticios (dulces, condimentos, goma de mascar, productos horneados de composiciones de cereales, productos lácteos y composiciones edulcorantes de mesa) bebidas y productos de bebidas.

35 Los consumibles, tal como se usan en el presente documento, significan sustancias que se ponen en contacto con la boca del hombre o animal, incluidas sustancias que se ingieren y posteriormente se expulsan de la boca y sustancias que se beben, se comen, se tragan o se ingieren de otra manera, y son seguras para consumo humano o animal cuando se usa en un rango generalmente aceptable.

40 Por ejemplo, una bebida es un consumible. La bebida puede endulzarse o no endulzarse antes de la adición de rebaudiosido I o una composición que comprende rebaudiosido I. El rebaudiosido I, o una composición que comprende un rebaudiosido I, puede agregarse a una bebida o matriz de bebidas para endulzar la bebida o potenciar su dulzor o sabor existente.

45 Se divulga un consumible que comprende rebaudiosido I. La concentración de rebaudiosido I en el consumible puede ser superior, igual o inferior a su concentración umbral de dulzor.

50 Se divulga adicionalmente una bebida que comprende rebaudiosido I. La concentración de rebaudiosido I en la bebida puede ser superior, igual o inferior a su concentración umbral de dulzor.

El consumible puede incluir opcionalmente aditivos, edulcorantes adicionales, ingredientes funcionales y combinaciones de los mismos, como se describe en el presente documento. Cualquiera de los aditivos, edulcorantes adicionales e ingredientes funcionales descritos anteriormente pueden estar presentes en el consumible.

55 Composiciones farmacéuticas

Se divulga una composición farmacéutica que comprende una sustancia farmacéuticamente activa y rebaudiosido I.

60 Se divulga además una composición farmacéutica que comprende una sustancia farmacéuticamente activa y una composición que comprende rebaudiosido I.

El rebaudiosido I o composición que comprende rebaudiosido I puede estar presente como un material excipiente en la composición farmacéutica, que puede enmascarar un sabor amargo o indeseable de una sustancia farmacéuticamente activa u otro material excipiente. La composición farmacéutica puede estar en forma de una
65 tableta, una cápsula, un líquido, un aerosol, un polvo, una tableta o polvo efervescente, un jarabe, una emulsión, una suspensión, una solución o cualquier otra forma para proporcionar la composición farmacéutica a un paciente. Por

ejemplo, la composición farmacéutica puede estar en una forma para administración oral, administración bucal, administración sublingual o cualquier otra vía de administración como se conoce en la técnica.

5 Como se hace referencia en este documento, "sustancia farmacéuticamente activa" significa cualquier fármaco, formulación de fármaco, medicación, agente profiláctico, agente terapéutico u otra sustancia que tenga actividad biológica. Como se hace referencia en este documento, "material excipiente" se refiere a cualquier sustancia inactiva utilizada como vehículo para un ingrediente activo, tal como cualquier material para facilitar la manipulación, estabilidad, dispersabilidad, humectabilidad y/o cinética de liberación de una sustancia farmacéuticamente activa.

10 Las sustancias farmacéuticamente activas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, medicamentos para el tracto gastrointestinal o el sistema digestivo, para el sistema cardiovascular, para el sistema nervioso central, para el dolor o la conciencia, para trastornos musculoesqueléticos, para el ojo, para el oído, la nariz y la orofaringe, para el sistema respiratorio, para problemas endocrinos, para el sistema reproductivo o urinario, para la anticoncepción, para obstetricia y ginecología, para la piel, para infecciones e infestaciones, para inmunología, para trastornos alérgicos, para nutrición, para trastornos neoplásicos, para diagnóstico, para eutanasia u otras funciones o trastornos biológicos. Ejemplos de sustancias farmacéuticamente activas adecuadas incluyen, entre otros, antiácidos, supresores de reflujo, antiflatulentos, antidopaminérgicos, inhibidores de la bomba de protones, citoprotectores, análogos de prostaglandinas, laxantes, antiespasmódicos, antidiarreicos, sequestrantes de ácidos biliares, opioides, bloqueadores de los receptores de calcio, beta bloqueadores de canales, diuréticos, glucósidos cardíacos, antiarrítmicos, nitratos, antianginosos, vasoconstrictores, vasodilatadores, activadores periféricos, inhibidores de la ACE, bloqueadores de los receptores de angiotensina, bloqueadores alfa, anticoagulantes, heparina, fármacos antiplaquetarios, fibrinolíticos, factores antihemofílicos, fármacos hemostáticos, agentes hipolipidémicos, estatinas, hipnóticos, anestésicos, antipsicóticos, antidepresivos, antieméticos, anticonvulsivos, antiepilépticos, ansiolíticos, barbitúricos, drogas trastornos del movimiento, estimulantes, benzodiacepinas, ciclopirononas, antagonistas de dopamina, antihistamínicos, colinérgicos, anticolinérgicos, eméticos, cannabinoides, analgésicos, relajantes musculares, antibióticos, aminoglucósidos, antivirales, antimicóticos, antiinflamatorios, medicamentos contra el glaucoma, simpaticomiméticos, esteroides, ceruminolíticos, broncodilatadores, NSAID, antitusivos, mucolíticos, descongestionantes, corticosteroides, andrógenos, antiandrógenos, gonadotropinas, hormonas de crecimiento, insulina, antidiabéticos, hormona tiroideas, calcitonina, difosfonatos, análogos de vasopresina, agentes alcalinizantes, quinolonas, anticolinesterasa, sildenafil, anticonceptivos orales, terapias de reemplazo hormonal, reguladores óseos, hormonas foliculoestimulantes, hormonas luteinizantes, ácido gamolenico, progestágeno, agonista de dopamina, estrógeno, prostaglandina, gonadorrelina, clomifeno, tamoxifeno, dietilstilbestrol, antilepróticos, fármacos antituberculosos, antipalúdicos, antihelmínticos, antiprotozoarios, antisueros, vacunas, interferones, tónicos, vitaminas, fármacos citotóxicos, hormonas sexuales, inhibidores de aromatasa, inhibidores de somatostatina o sustancias de tipo similar, o combinaciones de los mismos. Dichos componentes generalmente se reconocen como seguros (GRAS) y/o están aprobados por la U.S. Food and Drug Administration (FDA).

40 La sustancia farmacéuticamente activa está presente en la composición farmacéutica en cantidades que varían ampliamente dependiendo del agente farmacéuticamente activo particular que se use y sus aplicaciones previstas. Una dosis efectiva de cualquiera de las sustancias farmacéuticamente activas descritas en el presente documento puede determinarse fácilmente mediante el uso de técnicas convencionales y observando los resultados obtenidos en circunstancias análogas. Al determinar la dosis efectiva, se consideran varios factores que incluyen, entre otros: la especie del paciente; su tamaño, edad y salud general; la enfermedad específica involucrada; el grado de afectación o la gravedad de la enfermedad; la respuesta del paciente individual; el agente farmacéuticamente activo particular administrado; el modo de administración; la biodisponibilidad característica de la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado; y el uso de medicación concomitante. La sustancia farmacéuticamente activa se incluye en el vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable en una cantidad suficiente para administrar a un paciente una cantidad terapéutica de la sustancia farmacéuticamente activa in vivo en ausencia de efectos tóxicos graves cuando se usa en cantidades generalmente aceptables. Por lo tanto, los expertos en la técnica pueden discernir fácilmente cantidades adecuadas.

55 Por ejemplo, la concentración de sustancia farmacéuticamente activa en la composición farmacéutica dependerá de las tasas de absorción, inactivación y excreción del fármaco, así como de otros factores conocidos por los expertos en la técnica. Cabe señalar que los valores de dosificación también variarán con la gravedad de la afección por aliviar. Debe entenderse además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones farmacéuticas, y que los rangos de dosificación establecidos en este documento son solo de ejemplo. La sustancia farmacéuticamente activa puede administrarse de una vez, o puede dividirse en varias dosis más pequeñas para administrarse con intervalos de tiempo variables.

60 La composición farmacéutica también puede comprender otros materiales excipientes farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de materiales excipientes adecuados incluyen, entre otros, antiadherentes, aglutinantes (por ejemplo, celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina), recubrimientos, desintegrantes, rellenos, diluyentes, suavizantes, emulsionantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes, adyuvantes, lubricantes, agentes funcionales (por ejemplo, nutrientes), modificadores de la viscosidad, agentes de carga, gliadants (por

ejemplo, dióxido de silicio coloidal), agentes tensioactivos, agentes osmóticos, diluyentes o cualquier otro ingrediente no activo, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden incluir materiales excipientes seleccionados del grupo que consiste en carbonato de calcio, agentes colorantes, blanqueadores, conservantes y sabores, triacetina, estearato de magnesio, esteroides, sabores naturales o artificiales, aceites esenciales, extractos de plantas, esencias de frutas, gelatinas, o combinaciones de las mismas.

El material excipiente de la composición farmacéutica puede incluir opcionalmente otros edulcorantes artificiales o naturales, edulcorantes a granel o combinaciones de los mismos. Los edulcorantes a granel incluyen compuestos calóricos y no calóricos. Por ejemplo, el aditivo funciona como edulcorante a granel. Ejemplos no limitantes de edulcorantes a granel incluyen sacarosa, dextrosa, maltosa, dextrina, azúcar invertida seca, fructosa, jarabe de maíz alto en fructosa, levulosa, galactosa, sólidos de jarabe de maíz, tagatosa, polioles (por ejemplo, sorbitol, manitol, xilitol, lactitol, eritritol y maltitol), hidrolizados de almidón hidrogenado, isomalta, trehalosa y mezclas de los mismos. Por ejemplo, el edulcorante a granel está presente en la composición farmacéutica en cantidades que varían ampliamente dependiendo del grado de dulzor deseado. Cantidades adecuadas de ambos edulcorantes serían fácilmente discernibles para los expertos en la materia.

Mezclas de gel comestibles y composiciones de gel comestibles

Se divulga un gel comestible o una mezcla de gel comestible que comprende rebaudiósido I. Además se describe un gel comestible o una mezcla de gel comestible que comprende una composición que comprende rebaudiósido I.

Los geles comestibles son geles que se pueden comer. Un gel es un sistema coloidal en donde una red de partículas abarca el volumen de un medio líquido. Aunque los geles se componen principalmente 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 sólidos, materiales gelatinosos. Los geles se pueden usar en varias aplicaciones. Por ejemplo, los geles se pueden usar en alimentos, pinturas y adhesivos.

Ejemplos no limitativos de composiciones de gel comestible incluyen postres de gel, pudines, gelatinas, pastas, golosinas, aspics, malvaviscos, caramelos de goma o similares. Las mezclas de gel comestible generalmente son sólidos en polvo o granulares a los que se puede agregar un fluido para formar una composición de gel comestible. Ejemplos no limitantes de fluidos incluyen agua, fluidos lácteos, fluidos análogos a lácteos, zumos, alcohol, bebidas alcohólicas y combinaciones de los mismos. Ejemplos no limitativos de fluidos lácteos que pueden usarse incluyen leche, leche cultivada, nata, suero de leche fluido y mezclas de los mismos. Ejemplos no limitativos de fluidos análogos de lácteos que pueden usarse incluyen, por ejemplo, leche de soja y blanqueador no lácteo para café. Debido a que los productos de gel comestible que se encuentran en el mercado típicamente están endulzados con sacarosa, es deseable endulzar geles comestibles con un edulcorante alternativo para proporcionar una alternativa baja en calorías o sin calorías.

Como se usa en el presente documento, el término "ingrediente gelificante" denota cualquier material que pueda formar un sistema coloidal dentro de un medio líquido. Ejemplos no limitantes de ingredientes gelificantes incluyen gelatina, alginato, carragenano, goma, pectina, konjac, agar, ácido alimentario, cuajo, almidón, derivados de almidón y combinaciones de los mismos. Los expertos en la materia saben bien que la cantidad de ingrediente gelificante utilizado en una mezcla de gel comestible o una composición de gel comestible varía considerablemente dependiendo de varios factores, como el ingrediente gelificante particular utilizado, la base fluida particular utilizada, y las propiedades deseadas para el gel.

Las mezclas de gel comestible y los geles comestibles pueden prepararse usando ingredientes que incluyen ácidos alimentarios, una sal de un ácido alimentario, un sistema de amortiguación, un agente de carga, un secuestrante, un agente de entrecruzamiento, uno o más sabores, uno o más colores y combinaciones de los mismos. Ejemplos no limitantes de ácidos alimentarios incluyen ácido cítrico, ácido adípico, ácido fumárico, ácido láctico, ácido málico y combinaciones de los mismos. Ejemplos no limitantes de sales de ácidos alimentarios incluyen sales de sodio de ácidos alimentarios, sales de potasio de ácidos alimentarios y combinaciones de los mismos. Ejemplos no limitantes de agentes de carga incluyen rafilosa, isomalta, sorbitol, polidextrosa, maltodextrina y combinaciones de los mismos. Ejemplos no limitantes de secuestrantes incluyen tetraacetato de etileno disódico de calcio, glucono delta-lactona, gluconato de sodio, gluconato de potasio, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y combinaciones de los mismos. Ejemplos no limitantes de agentes de entrecruzamiento incluyen iones de calcio, iones de magnesio, iones de sodio y combinaciones de los mismos.

Composiciones dentales

Se divulga una composición dental que comprende rebaudiósido I. Además se divulga una composición dental que comprende una composición que comprende rebaudiósido I. Las composiciones dentales generalmente comprenden una sustancia dental activa y un material base. El rebaudiósido I o una composición que comprende rebaudiósido I se puede usar como material base para endulzar la composición dental. La composición dental puede tener la forma de cualquier composición oral utilizada en la cavidad oral, como agentes refrescantes de la boca, agentes para

hacer gárgaras, agentes de enjuague bucal, pasta de dientes, abrillantado dental, dentífricos, aerosoles para la boca, agentes para blanquear los dientes, hilo dental y similares, por ejemplo.

Como se hace referencia en el presente documento, "sustancia dental activa" significa cualquier composición que se puede usar para mejorar la apariencia estética y/o la salud de los dientes o las encías o prevenir la caries dental. Como se menciona en este documento, "material base" se refiere a cualquier sustancia inactiva utilizada como vehículo para una sustancia dental activa, como cualquier material para facilitar el manejo, la estabilidad, la dispersabilidad, la humectabilidad, la formación de espuma y/o la cinética de liberación de una sustancia dental activa.

Las sustancias dentales activas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, sustancias que eliminan la placa dental, eliminan los alimentos de los dientes, ayudan a eliminar y/o enmascarar la halitosis, prevenir la caries dental y prevenir la enfermedad de las encías (es decir, gingival). Entre los ejemplos de sustancias dentales activas adecuadas se incluyen, entre otros, fármacos anticaries, fluoruro, fluoruro de sodio, monofluorofosfato de sodio, fluoruro estannoso, peróxido de hidrógeno, peróxido de carbamida (es decir, peróxido de urea), agentes antibacterianos, agentes de eliminación de placa, quitamanchas, agentes anticálculos, abrasivos, bicarbonato de sodio, percarbonatos, perboratos de metales alcalinos y alcalinotérreos, o sustancias de tipo similar, o combinaciones de los mismos. Dichos componentes generalmente se reconocen como seguros (GRAS) y/o están aprobados por la U.S. Food and Drug Administration (FDA).

Por ejemplo, la sustancia dental activa está presente en la composición dental en una cantidad que varía de aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 3000 ppm de la composición dental. Generalmente, la sustancia dental activa está presente en la composición dental en una cantidad efectiva para al menos mejorar la apariencia estética y/o la salud de los dientes o las encías marginalmente o prevenir la caries dental. Por ejemplo, una composición dental que comprende una pasta dental puede incluir una sustancia dental activa que comprende fluoruro en una cantidad de aproximadamente 850 a 1.150 ppm.

La composición dental también puede comprender materiales base además del rebaudiósido I o composición que comprende rebaudiósido I. Ejemplos de materiales base adecuados para las realizaciones de esta invención incluyen, pero no se limitan a, agua, laurilsulfato de sodio u otros sulfatos, humectantes, enzimas, vitaminas, hierbas, calcio, saborizantes (por ejemplo, menta, chicle, canela, limón o naranja), agentes tensioactivos, aglutinantes, conservantes, agentes gelificantes, modificadores del pH, activadores de peróxido, estabilizadores, agentes colorantes o similares. materiales tipo, y combinaciones de los mismos.

El material base de la composición dental puede incluir opcionalmente otros edulcorantes artificiales o naturales, edulcorantes a granel o combinaciones de los mismos. Los edulcorantes a granel incluyen compuestos calóricos y no calóricos. Ejemplos no limitantes de edulcorantes a granel incluyen sacarosa, dextrosa, maltosa, dextrina, azúcar invertida seca, fructosa, jarabe de maíz alto en fructosa, levulosa, galactosa, sólidos de jarabe de maíz, tagatosa, polioles (por ejemplo, sorbitol, manitol, xilitol, lactitol, eritritol y maltitol), hidrolizados de almidón hidrogenado, isomalta, trehalosa y mezclas de los mismos. Generalmente, la cantidad de edulcorante a granel presente en la composición dental varía ampliamente dependiendo de la composición dental y el grado deseado de dulzor. Los expertos en la materia determinarán fácilmente la cantidad apropiada de edulcorante a granel. Por ejemplo, el edulcorante a granel está presente en la composición dental en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 5 por ciento en peso de la composición dental.

Por ejemplo, el material base está presente en la composición dental en una cantidad que varía de aproximadamente 20 a aproximadamente 99 por ciento en peso de la composición dental. Generalmente, el material base está presente en una cantidad efectiva para proporcionar un vehículo para una sustancia dental activa.

Por ejemplo, una composición dental comprende rebaudiósido I y una sustancia dental activa. En otro ejemplo, una composición dental comprende una composición que comprende rebaudiósido I y una sustancia dental activa. En general, la cantidad de edulcorante varía ampliamente dependiendo de la naturaleza de la composición dental particular y el grado deseado de dulzor.

Los productos alimenticios incluyen, pero no se limitan a, dulces, condimentos, goma de mascar, cereales, productos horneados y productos lácteos.

Golosina

Se divulga un dulce que comprende rebaudiósido I. Además se describe una golosina que comprende una composición que comprende rebaudiósido I.

Como se hace referencia en el presente documento, "golosina" puede significar un dulce, una piruleta, una golosina o un término similar. La golosina generalmente contiene un componente de composición base y un componente edulcorante. El rebaudiósido I o una composición que comprende rebaudiósido I puede servir como componente edulcorante. La golosina puede estar en forma de cualquier alimento que normalmente se percibe como rico en

azúcar o que sea típicamente dulce. Por ejemplo, las golosinas pueden ser productos de panadería como pasteles; postres como yogur, jaleas, jaleas para beber, budines, crema bávara, manjar blanco, pasteles, bizcocho de chocolate, *mousse* y similares, productos alimenticios endulzados que se comen a la hora del té o después de las comidas; comidas congeladas; golosinas frías, por ejemplo, tipos de helados como helados, leche helada, lactohelado y similares (productos alimenticios en los que se agregan edulcorantes y otros tipos de materias primas a los productos lácteos, y la mezcla resultante se agita y congela), y golosinas de hielo tales como sorbetes, helados de postre y similares (productos alimenticios en los que se agregan varios otros tipos de materias primas a un líquido azucarado, y la mezcla resultante se agita y se congela); golosinas generales, por ejemplo, golosinas horneadas o golosinas al vapor tales como galletas saladas, galletas, bollos con relleno de mermelada de judías, halvah, alfajor y similares; pasteles de arroz y bocadillos; productos de mesa; golosinas de azúcar en general tales como goma de mascar (por ejemplo, que incluyen composiciones que comprenden una base de goma masticable sustancialmente insoluble en agua, tal como chicle o sustitutos de la misma, que incluyen jetulong, goma guttakay o ciertas resinas o ceras sintéticas naturales comestibles), caramelo duro, caramelo blando, mentas, caramelos de turrón, gominolas, golosina de azúcar, tofe, caramelo masticable, tableta de leche suiza, caramelo de regaliz, chocolates, dulces de gelatina, malvavisco, mazapán, divinidad, algodón de azúcar y similares; salsas, incluidas salsas con sabor a frutas, salsas de chocolate y similares; geles comestibles; cremas que incluyen cremas de mantequilla, pastas de harina, crema batida y similares; jaleas, incluyendo jalea de fresa, mermelada y similares; y panes, incluidos panes dulces y similares u otros productos de almidón, y combinaciones de los mismos.

Como se hace referencia en el presente documento, "composición base" significa cualquier composición que puede ser un alimento y proporciona una matriz para transportar el componente edulcorante.

Las composiciones base adecuadas pueden incluir harina, levadura, agua, sal, mantequilla, huevos, leche, leche en polvo, licor, gelatina, nueces, chocolate, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido fumárico, sabores naturales, sabores artificiales, colorantes, polioles, sorbitol, isomalta, maltitol, lactitol, ácido málico, estearato de magnesio, lecitina, jarabe de glucosa hidrogenado, glicerina, goma natural o sintética, almidón y similares, y combinaciones de los mismos. Dichos componentes generalmente se reconocen como seguros (GRAS) y/o están aprobados por la U.S. Food and Drug Administration (FDA). Por ejemplo, la composición base está presente en la golosina en una cantidad que varía de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 99 por ciento en peso de la golosina. Generalmente, la composición base está presente en la golosina en una cantidad para proporcionar un producto alimenticio.

La composición base de la golosina puede incluir opcionalmente otros edulcorantes artificiales o naturales, edulcorantes a granel o combinaciones de los mismos. Los edulcorantes a granel incluyen compuestos calóricos y no calóricos. Ejemplos no limitantes de edulcorantes a granel incluyen sacarosa, dextrosa, maltosa, dextrina, azúcar invertida seca, fructosa, jarabe de maíz alto en fructosa, levulosa, galactosa, sólidos de jarabe de maíz, tagatosa, polioles (por ejemplo, sorbitol, manitol, xilitol, lactitol, eritritol y maltitol), hidrolizados de almidón hidrogenado, isomalta, trehalosa y mezclas de los mismos. Generalmente, la cantidad de edulcorante a granel presente en la golosina varía ampliamente dependiendo de la golosina particular y el grado deseado de dulzor. Los expertos en la materia determinarán fácilmente la cantidad apropiada de edulcorante a granel.

Por ejemplo, una golosina comprende rebaudiósido I o una composición que comprende rebaudiósido I y una composición base. Generalmente, la cantidad de rebaudiósido I en la golosina varía ampliamente dependiendo de la golosina particular y el grado deseado de dulzor. Los expertos en la materia determinarán fácilmente la cantidad apropiada. Por ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la golosina en una cantidad en el rango de aproximadamente 30 ppm a aproximadamente 6000 ppm de la golosina. En otro ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la golosina en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 1 ppm a aproximadamente 10.000 ppm del dulce. En los ejemplos en los que la golosina comprende caramelo duro, el rebaudiósido I está presente en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 150 ppm a aproximadamente 2250 ppm del caramelo duro.

Composiciones de condimentos

Se divulga un condimento que comprende rebaudiósido I. Además se describe un condimento que comprende una composición que comprende rebaudiósido I. Los condimentos, como se usan en este documento, son composiciones usadas para potenciar o mejorar el sabor de un alimento o bebida. Ejemplos no limitantes de condimentos incluyen salsa de tomate (*catsup*); mostaza; salsa de barbacoa; mantequilla; salsa de chile chutney; salsa de cóctel; curry; pastas para inmersión; salsa de pescado; rábano picante; salsa picante; gelatinas, jaleas, mermeladas o conservas; mayonesa; mantequilla de cacahuete; rábano; *remoulade*; aderezos para ensaladas (por ejemplo, aceite y vinagre, César, francés, ranchera, queso azul, rusa, mil islas, italiana y vinagreta balsámica), salsa; chucrut; salsa de soja; salsa de carne; jarabes; salsa tártara; y salsa Worcestershire.

Las bases de condimento generalmente comprenden una mezcla de diferentes ingredientes, ejemplos no limitativos de los cuales incluyen vehículos (por ejemplo, agua y vinagre); especias o condimentos (por ejemplo, sal, pimienta, ajo, semillas de mostaza, cebolla, pimentón, cúrcuma y combinaciones de los mismos); frutas, verduras o sus productos (por ejemplo, tomates o productos a base de tomate (pasta, puré), zumos de frutas, cáscaras de zumos de frutas y combinaciones de los mismos); aceites o emulsiones de aceite, particularmente aceites vegetales; espesantes (por ejemplo, goma de xantano, almidón alimentario, otros hidrocoloides y combinaciones de los

mismos); y agentes emulsionantes (por ejemplo, sólidos de yema de huevo, proteína, goma arábiga, goma de algarroba, goma guar, goma karaya, goma de tragacanto, ésteres de carragenano, pectina, propilenglicol de ácido alginico, carboximetilcelulosa de sodio, polisorbatos y combinaciones de los mismos). Las recetas para bases de condimentos y los métodos para preparar bases de condimentos son bien conocidos por los expertos en la materia.

En general, los condimentos también comprenden edulcorantes calóricos, tales como sacarosa, jarabe de maíz alto en fructosa, melaza, miel o azúcar moreno. En algunos ejemplos de los condimentos proporcionados aquí, se usa rebaudiósido I o una composición que comprende rebaudiósido I en lugar de edulcorantes calóricos tradicionales. Por consiguiente, una composición de condimento deseablemente comprende rebaudiósido I o una composición que comprende rebaudiósido I y una base de condimento.

La composición de condimento puede incluir opcionalmente otros edulcorantes naturales y/o sintéticos de alta potencia, edulcorantes a granel, agentes modificadores del pH (por ejemplo, ácido láctico, ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido acético y combinaciones de los mismos), rellenos, agentes funcionales (por ejemplo, agentes farmacéuticos, nutrientes o componentes de un alimento o planta), aromatizantes, colorantes o combinaciones de los mismos.

Composiciones de goma de mascar

Se divulga una composición de goma de mascar que comprende rebaudiósido I. Además Se divulga una composición de goma de mascar que comprende una composición que comprende rebaudiósido I. Las composiciones de goma de mascar generalmente comprenden una porción soluble en agua y una porción de base de goma masticable insoluble en agua. La porción soluble en agua, que típicamente incluye la composición, se disipa con una porción del agente saborizante durante un período de tiempo durante la masticación, mientras que la porción de base de goma insoluble se retiene en la boca. La base de goma insoluble generalmente determina si una goma se considera goma de mascar, goma para burbujas o una goma funcional.

La base de goma de mascar insoluble, que generalmente está presente en la composición de goma de mascar en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 por ciento en peso de la composición de goma de mascar, generalmente comprende combinaciones de elastómeros, suavizantes (plastificantes), emulsionantes, resinas y cargas. Dichos componentes generalmente se consideran de grado alimenticio, reconocidos como seguros (GRA) y/o están aprobados por la U.S. Food and Drug Administration (FDA).

Los elastómeros, el componente principal de la base de goma, proporcionan la naturaleza cohesiva y gomosa a las gomas y pueden incluir uno o más cauchos naturales (por ejemplo, látex ahumado, látex líquido o guayule); gomas naturales (por ejemplo, jelutong, perillo, sorva, *Massaranduba balata*, chocolate massaranduba, níspero, rosindinha, chicle y hang kang de guta); o elastómeros sintéticos (por ejemplo, copolímeros de butadieno-estireno, copolímeros de isobutileno-isopreno, polibutadieno, poliisobutileno y elastómeros poliméricos de vinilo). Por ejemplo, el elastómero está presente en la base de goma en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 3 a aproximadamente 50 por ciento en peso de la base de goma.

Las resinas se usan para variar la firmeza de la base de goma y ayudar a suavizar el componente elastómero de la base de goma. Ejemplos no limitativos de resinas adecuadas incluyen un éster de colofonia, una resina de terpeno (por ejemplo, una resina de terpeno de α -pineno, β -pineno y/o d-limoneno), acetato de polivinilo, alcohol polivinílico, acetato de etileno y vinilo y acetato de vinilo y copolímeros de laurato de vinilo. Ejemplos no limitantes de ésteres de colofonia incluyen un éster de glicerol de una colofonia parcialmente hidrogenada, un éster de glicerol de una colofonia polimerizada, un éster de glicerol de una colofonia parcialmente dimerizada, un éster de glicerol de colofonia, un éster de pentaeritritol de una colofonia parcialmente hidrogenada, un éster metílico de colofonia, o un éster metílico de una colofonia parcialmente hidrogenada. Por ejemplo, la resina está presente en la base de goma en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 75 por ciento en peso de la base de goma.

Los suavizantes, que también se conocen como plastificantes, se usan para modificar la facilidad de masticación y/o sensación en la boca de la composición de goma de mascar. En general, los suavizantes comprenden aceites, grasas, ceras y emulsionantes. Ejemplos no limitantes de aceites y grasas incluyen sebo, sebo hidrogenado, aceites vegetales grandes, hidrogenados o parcialmente hidrogenados (por ejemplo, soja, canola, semillas de algodón, girasol, palma, coco, maíz, cártamo o aceites de almendra de palma), manteca de cacao, monoestearato de glicerol, triacetato de glicerol, abietato de glicerol, leitina, monoglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos acetilados de triglicéridos y ácidos grasos libres. Ejemplos no limitativos de ceras incluyen ceras de polipropileno/polietileno/Fisher-Tropsch, parafina y ceras microcristalinas y naturales (por ejemplo, candelilla, cera de abejas y carnauba). Las ceras microcristalinas, especialmente aquellas con un alto grado de cristalinidad y un alto punto de fusión, también pueden considerarse agentes de cuerpo o modificadores de textura.

Por ejemplo, los suavizantes están presentes en la base de goma en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 25 por ciento en peso de la base de goma.

Los emulsionantes se usan para formar una dispersión uniforme de las fases insolubles y solubles de la composición de goma de mascar y también tienen propiedades plastificantes. Los emulsionantes adecuados incluyen monoestearato de glicerol (GMS), lecitina (fosfatidilcolina), ácido poliglicerol poliricinoleico (PPGR), mono y diglicéridos de ácidos grasos, diestearato de glicerol, tracetina, monoglicérido acetilado, triacetato de glicerol y estearato de magnesio. Por ejemplo, los emulsionantes están presentes en la base de goma en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 30 por ciento en peso de la base de goma.

La composición de goma de mascar también puede comprender adyuvantes o cargas en la base de goma y/o la porción soluble de la composición de goma de mascar. Los adyuvantes y rellenos adecuados incluyen lecitina, inulina, povidexina, carbonato de calcio, carbonato de magnesio, silicato de magnesio, caliza molida, hidróxido de aluminio, silicato de aluminio, talco, arcilla, alúmina, dióxido de titanio y fosfato de calcio. En algunos ejemplos, la lecitina puede usarse como una carga inerte para disminuir la pegajosidad de la composición de goma de mascar. En otros ejemplos, se pueden usar copolímeros de ácido láctico, proteínas (por ejemplo, gluten y/o zeína) y/o guar para crear una goma que sea más fácilmente biodegradable. Los adyuvantes o rellenos están generalmente presentes en la base de goma en una cantidad de hasta aproximadamente el 20 por ciento en peso de la base de goma. Otros ingredientes opcionales incluyen agentes colorantes, blanqueadores, conservantes y sabores.

En algunos ejemplos de la composición de goma de mascar, la base de goma comprende de aproximadamente 5 a aproximadamente 95 por ciento en peso de la composición de goma de mascar, por ejemplo de aproximadamente 15 a aproximadamente 50 por ciento en peso de la composición de goma de mascar, o de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 por ciento en peso de la composición de goma de mascar.

La porción soluble de la composición de goma de mascar puede incluir opcionalmente otros edulcorantes artificiales o naturales, edulcorantes a granel, suavizantes, emulsionantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes, adyuvantes, rellenos, agentes funcionales (por ejemplo, agentes farmacéuticos o nutrientes), o combinaciones del mismo. Ejemplos adecuados de suavizantes y emulsionantes se describen anteriormente.

Los edulcorantes a granel incluyen compuestos tanto calóricos como no calóricos. Ejemplos no limitantes de edulcorantes a granel incluyen sacarosa, dextrosa, maltosa, dextrina, azúcar invertida seca, fructosa, jarabe de maíz alto en fructosa, levulosa, galactosa, sólidos de jarabe de maíz, tagatosa, polioles (por ejemplo, sorbitol, manitol, xilitol, lactitol, eritritol y maltitol), hidrolizados de almidón hidrogenado, isomalta, trehalosa y mezclas de los mismos. Por ejemplo, el edulcorante a granel está presente en la composición de goma de mascar en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 1 a aproximadamente 75 por ciento en peso de la composición de goma de mascar.

Los agentes saborizantes pueden usarse en la base de goma insoluble o en la porción soluble de la composición de goma de mascar. Tales agentes saborizantes pueden ser sabores naturales o artificiales.

Por ejemplo, el agente aromatizante comprende un aceite esencial, tal como un aceite derivado de una planta o una fruta, aceite de menta, aceite de menta verde, otros aceites de menta, aceite de clavo, aceite de canela, aceite de gaulteria, laurel, tomillo, hoja de cedro, nuez moscada, pimienta de Jamaica, salvia, macis y almendras. En otro ejemplo, el agente aromatizante comprende un extracto de planta o una esencia de fruta tal como manzana, plátano, sandía, pera, durazno, uva, fresa, frambuesa, cereza, ciruela, piña, albaricoque y mezclas de los mismos. En aun otro ejemplo, el agente aromatizante comprende un aroma cítrico, como un extracto, esencia o aceite de limón, lima, naranja, mandarina, pomelo, limón o kumquat.

Por ejemplo, una composición de goma de mascar comprende rebaudiósido I o una composición que comprende rebaudiósido I y una base de goma. Por ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición de goma de mascar en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 1 ppm a aproximadamente 10.000 ppm de la composición de goma de mascar.

Composiciones de cereales

Se divulga una composición de cereal que comprende rebaudiósido I. Además Se divulga una composición de cereal que comprende una composición que comprende rebaudiósido I. Las composiciones de cereal se comen típicamente como alimentos básicos o como aperitivos. Ejemplos no limitativos de composiciones de cereales incluyen cereales listos para comer, así como cereales calientes. Los cereales listos para comer son cereales que el consumidor puede comer sin más procesamiento (es decir, cocción). Ejemplos de cereales listos para comer incluyen cereales para el desayuno y barras para bocadillos. Los cereales para el desayuno generalmente se procesan para producir una forma triturada, escamosa, hinchada o extrudida. Los cereales para el desayuno generalmente se comen fríos y frecuentemente se mezclan con leche y/o fruta. Las barras para bocadillos incluyen, por ejemplo, barras energéticas, pasteles de arroz, barras de granola y barras nutricionales. Los cereales calientes generalmente se cocinan, generalmente en leche o agua, antes de comerlos. Ejemplos no limitantes de cereales calientes incluyen sémola, gachas, polenta, arroz y avena arrollada.

Las composiciones de cereales generalmente comprenden al menos un ingrediente de cereal. Como se usa en el presente documento, el término "ingrediente de cereal" denota materiales tales como granos enteros o parciales,

semillas enteras o partes, y hierba entera o partes. Ejemplos no limitativos de ingredientes de cereales incluyen maíz, trigo, arroz, cebada, salvado, endospermo de salvado, bulgur, sorgo, mijo, avena, centeno, triticale, trigo sarraceno, fonio, quinua, judías, soja, amaranto, teff, espelta y kaniwa.

5 Por ejemplo, la composición de cereal comprende rebaudiósido I o una composición que comprende rebaudiósido I y al menos un ingrediente de cereal. El rebaudiósido I o la composición que comprende rebaudiósido I se puede agregar a la composición de cereal de varias maneras, como, por ejemplo, como recubrimiento, glaseado, 10
abrillantado o una mezcla de matriz (es decir, agregado como ingrediente a la formulación del cereal antes de la preparación del producto de cereal final).

10 Por consiguiente, por ejemplo, se agrega rebaudiósido I o una composición que comprende rebaudiósido I a la composición de cereal como una mezcla de matriz. En un ejemplo, el rebaudiósido I o una composición que comprende rebaudiósido I se mezcla con un cereal caliente antes de cocinar para proporcionar un producto de cereal caliente endulzado. En otro ejemplo, el rebaudiósido I o una composición que comprende rebaudiósido I se 15
mezcla con la matriz de cereal antes de que se extraiga el cereal.

En otro ejemplo, el rebaudiósido I o una composición que comprende un rebaudiósido I se agrega a la composición de cereal como un recubrimiento, tal como, por ejemplo, combinando el rebaudiósido I o un rebaudiósido I con un aceite de calidad alimentaria y aplicando la mezcla sobre el cereal. En un ejemplo diferente, el rebaudiósido I o una 20
composición que comprende rebaudiósido I y el aceite de calidad alimentaria se puede aplicar al cereal por separado, aplicando primero el aceite o el edulcorante. Ejemplos no limitativos de aceites de grado alimenticio incluyen aceites vegetales tales como aceite de maíz, aceite de soja, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de coco, aceite de canola, aceite de oliva, aceite de semillas de sésamo, aceite de palma, aceite de almendra de palma y mezclas de los mismos. En aun otro ejemplo, se pueden usar grasas de calidad alimentaria en lugar de los aceites, siempre que la grasa se derrita antes de aplicarla sobre el cereal. 25

En otro ejemplo, se agrega rebaudiósido I o una composición que comprende rebaudiósido I a la composición de cereal como un abrillantado. Ejemplos no limitativos de agentes de abrillantado incluyen jarabe de maíz, jarabes de miel y sólidos de jarabe de miel, jarabes de arce y sólidos de jarabe de arce, sacarosa, isomalta, polidextrosa, polioles, hidrolizado de almidón hidrogenado, soluciones acuosas de los mismos y mezclas de los mismos. En otro 30
ejemplo de este tipo, se agrega rebaudiósido I o una composición que comprende rebaudiósido I como un abrillantado combinando con un agente de abrillantado y un aceite o grasa de calidad alimentaria y aplicando la mezcla al cereal. En aun otro ejemplo, un sistema de goma, tal como, por ejemplo, goma de acacia, carboximetilcelulosa o algina, puede agregarse al abrillantado para proporcionar soporte estructural. Además, el abrillantado también puede incluir un agente colorante, y también puede incluir un sabor. 35

En otro ejemplo, se agrega rebaudiósido I o una composición que comprende rebaudiósido I a la composición de cereal como un glaseado. En uno de tales ejemplos, el rebaudiósido I o una composición que comprende rebaudiósido I se combina con agua y un agente de glaseado y luego se aplica al cereal. Ejemplos no limitantes de 40
agentes de glaseado incluyen maltodextrina, sacarosa, almidón, polioles y mezclas de los mismos. El glaseado también puede incluir un aceite de calidad alimentaria, una grasa de calidad alimentaria, un agente colorante y/o un sabor.

45 Generalmente, la cantidad de rebaudiósido I en una composición de cereal varía ampliamente dependiendo del tipo particular de composición de cereal y su dulzor deseado. Los expertos en la materia pueden discernir fácilmente la cantidad apropiada de edulcorante para poner en la composición del cereal. Por ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición de cereal en una cantidad en el rango de aproximadamente 0.02 a aproximadamente 1.5 por ciento en peso de la composición de cereal y el al menos un aditivo está presente en la composición de cereal en una cantidad en el rango de aproximadamente 1 a aproximadamente el 5 por ciento en peso de la composición 50
de cereales.

Productos horneados

55 Se divulga un producto horneado que comprende rebaudiósido I. Además se describe un producto horneado que comprende una composición que comprende rebaudiósido I. Los productos horneados, como se usan en el presente documento, incluyen productos listos para comer y todos listos para hornear, harinas y mezclas que requieren preparación antes de servir. Ejemplos no limitativos de productos horneados incluyen pasteles, galletas, galletas saladas, galletitas, bizcochos de chocolate, magdalenas, panecillos, rosquillas, roscas, tortas alemanas, pasteles, 60
cruasanes, galletas, pan, productos de pan y bollos.

Los productos horneados de ejemplo se pueden clasificar en tres grupos: masas de pan (por ejemplo, panes blancos, panes variados, bollos blandos, panecillos duros, rosquillas, masa de pizza y tortillas de harina), masas dulces (por ejemplo, bollos, cruasanes, galletas saladas, hojaldre, masa de pastel, galletas y galletitas) y rebozados (por ejemplo, pasteles como esponja, libra, comida del diablo, tarta de queso y pastel de capas, rosquillas u otros pasteles, bizcochos de chocolate y magdalenas con levadura). Las masas generalmente se caracterizan por ser a 65
base de harina, mientras que las pastas son más a base de agua.

Los productos horneados generalmente comprenden una combinación de edulcorante, agua y grasa. Los productos horneados también pueden contener harina para hacer una masa o una masa batida. El término "masa" como se usa en el presente documento es una mezcla de harina y otros ingredientes lo suficientemente rígidos como para amasar o enrollar. El término "masa batida" tal como se usa en el presente documento consiste en harina, líquidos tales como leche o agua y otros ingredientes, y es lo suficientemente delgado como para verterlo o dejarlo caer de una cuchara. Deseablemente, la harina está presente en los productos horneados en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 15 a aproximadamente 60 % en peso seco, por ejemplo de aproximadamente 23 a aproximadamente 48 % en peso seco.

El tipo de harina puede seleccionarse con base en el producto deseado. En general, la harina comprende una harina no tóxica comestible que se utiliza convencionalmente en productos horneados. Por ejemplo, la harina puede ser una harina para hornear blanqueada, harina de uso general o harina sin blanquear. En otros ejemplos, también se pueden usar harinas que han sido tratadas de otras maneras. Por ejemplo, la harina puede enriquecerse con vitaminas, minerales o proteínas adicionales. Ejemplos no limitativos de harinas incluyen trigo, harina de maíz, granos integrales, fracciones de granos integrales (trigo, salvado y avena), y combinaciones de los mismos. También se pueden usar almidones o material farináceo como harina. Los almidones alimenticios comunes generalmente se derivan de patata, maíz, trigo, cebada, avena, tapioca, arrurruz y sagú. También se pueden usar almidones modificados y almidones pregelatinizados.

El tipo de grasa o aceite puede comprender cualquier grasa, aceite comestible o combinación de los mismos que sea adecuada para hornear. Ejemplos no limitantes de grasas incluyen aceites vegetales, sebo, manteca de cerdo, aceites marinos y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, las grasas pueden ser fraccionadas, parcialmente hidrogenadas y/o intensificadas. En otro ejemplo, la grasa deseablemente comprende grasas reducidas, bajas en calorías o no digeribles, sustitutos de grasas o grasas sintéticas. En aun otro ejemplo, también se pueden usar mantecas, grasas o mezclas de grasas duras y blandas. En algunos ejemplos, los acortamientos pueden derivarse principalmente de triglicéridos derivados de fuentes vegetales (por ejemplo, aceite de semilla de algodón, aceite de soja, aceite de cacahuete, aceite de linaza, aceite de sésamo, aceite de palma, aceite de semilla de palma, aceite de colza, aceite de cártamo, aceite de coco, aceite de maíz, aceite de semilla de girasol y sus mezclas). También se pueden usar triglicéridos sintéticos o naturales de ácidos grasos que tengan longitudes de cadena de 8 a 24 átomos de carbono. Deseablemente, la grasa está presente en el producto horneado en una cantidad en el intervalo de aproximadamente 2 a aproximadamente 35 % en peso en seco, por ejemplo de aproximadamente 3 a aproximadamente 29 % en peso en seco.

Los productos horneados también comprenden agua en cantidades suficientes para proporcionar la consistencia deseada, lo que permite la formación, el mecanizado y el corte adecuados del producto horneado antes o después de la cocción. El contenido de humedad total del producto horneado incluye el agua añadida directamente al producto horneado, así como el agua presente en los ingredientes añadidos por separado (por ejemplo, harina, que generalmente incluye aproximadamente 12 a aproximadamente 14 % en peso de humedad). Deseablemente, el agua está presente en el producto horneado en una cantidad de hasta aproximadamente un 25 % en peso del producto horneado.

Los productos horneados también pueden comprender una cantidad de ingredientes convencionales adicionales tales como agentes leudantes, sabores, colorantes, leche, subproductos lácteos, huevo, subproductos de huevo, cacao, vainilla u otro saborizante, así como inclusiones tales como nueces, pasas, cerezas, manzanas, albaricoques, duraznos, otras frutas, cáscaras de cítricos, conservantes, cocos, hojuelas con sabor, como hojuelas de chocolate, hojuelas de caramelo y hojuelas de caramelo, y combinaciones de los mismos. En algunos ejemplos, los productos horneados también pueden comprender emulsionantes, tales como lecitina y monoglicéridos.

Los agentes leudantes pueden comprender agentes leudantes químicos o agentes leudantes de levadura. Ejemplos no limitativos de agentes leudantes químicos incluyen bicarbonato de sodio (por ejemplo, bicarbonato de sodio, potasio o aluminio), ácido para horneado (por ejemplo, fosfato de aluminio y sodio, fosfato monocálcico o fosfato dicálcico) y combinaciones de los mismos.

El cacao puede comprender chocolate natural o "de proceso holandés" del cual una porción sustancial de la grasa o manteca de cacao se ha extraído por prensado o eliminado por extracción con solvente, prensado u otros medios. Por ejemplo, puede ser necesario reducir la cantidad de grasa en un producto horneado que comprende chocolate debido a la grasa adicional presente en la manteca de cacao. En algunos ejemplos, puede ser necesario agregar mayores cantidades de chocolate en comparación con el cacao para proporcionar una cantidad equivalente de saborizante y colorante.

Los productos horneados generalmente también comprenden edulcorantes calóricos, tales como sacarosa, jarabe de maíz alto en fructosa, eritritol, melaza, miel o azúcar moreno. En algunos ejemplos de los productos horneados proporcionados aquí, el edulcorante calórico se reemplaza parcial o totalmente con rebaudiósido I o una composición que comprende rebaudiósido I. En consecuencia, en un ejemplo, un producto horneado comprende rebaudiósido I o una composición que comprende rebaudiósido I en combinación con una grasa, agua y

opcionalmente harina. Por ejemplo, el producto horneado opcionalmente puede incluir otros edulcorantes naturales y/o sintéticos de alta potencia y/o edulcorantes a granel.

Productos lácteos

5 Se divulga un producto lácteo que comprende rebaudiósido I. Además se describe un producto lácteo que comprende una composición que comprende rebaudiósido I. Los productos lácteos y los procesos para fabricar productos lácteos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los productos lácteos, tal como se usan en el presente documento, comprenden leche o alimentos producidos a partir de leche. Ejemplos no limitativos de 10 productos lácteos incluyen leche, nata de leche, crema agria, nata fresca, suero de leche, suero de leche cultivado, leche en polvo, leche condensada, leche evaporada, mantequilla, queso, requesón, queso crema, yogur, helado, natillas congeladas, yogur congelado, helado, vía, piima, filmjölkk, kajmak, kéfir, viili, kumis, airag, leche helada, caseína, ayran, lassi, khoa o combinaciones de los mismos.

15 La leche es un fluido secretado por las glándulas mamarias de los mamíferos hembra para la alimentación de sus crías. La capacidad femenina de producir leche es una de las características definitorias de los mamíferos y proporciona la principal fuente de nutrición para los recién nacidos antes de que puedan digerir alimentos más diversos. Por ejemplo, los productos lácteos se derivan de la leche cruda de vacas, cabras, ovejas, yeguas, burras, camellas, búfalas de agua, yaks hembra, renos hembra, alces hembra o mujeres.

20 Por ejemplo, el procesamiento del producto lácteo a partir de leche cruda generalmente comprende los pasos de pasteurización, desnatado y homogeneización. Aunque la leche cruda se puede consumir sin pasteurización, generalmente se pasteuriza para destruir microorganismos nocivos como bacterias, virus, protozoos, mohos y levaduras. La pasteurización generalmente comprende calentar la leche a una temperatura alta durante un corto 25 período de tiempo para reducir sustancialmente el número de microorganismos, reduciendo así el riesgo de enfermedad.

30 El desnatado tradicionalmente sigue la etapa de pasteurización e implica la separación de la leche en una capa de nata con mayor contenido de grasa y una capa de leche con bajo contenido de grasa. La leche se separará en capas de leche y nata por reposo durante doce a veinticuatro horas. La nata se eleva hasta la parte superior de la capa de leche y se puede desnatar y usar como un producto lácteo separado. Alternativamente, se pueden usar centrifugadoras para separar la nata de la leche. La leche restante se clasifica de acuerdo con el contenido de grasa de la leche, ejemplos no limitativos de los cuales incluyen leche entera, 2 %, 1 % y desnatada.

35 Después de eliminar la cantidad deseada de grasa de la leche mediante el desnatado, la leche frecuentemente se homogeneiza. La homogeneización evita que la nata se separe de la leche y generalmente implica bombear la leche a altas presiones a través de tubos estrechos para romper los glóbulos de grasa en la leche. La pasteurización, el desnatado y la homogeneización de la leche son comunes, pero no se requieren para producir productos lácteos consumibles. En consecuencia, los productos lácteos adecuados pueden no someterse a etapas de procesamiento, 40 una sola etapa de procesamiento o combinaciones de las etapas de procesamiento descritas en este documento. Los productos lácteos adecuados también pueden someterse a etapas de procesamiento además de o aparte de las etapas de procesamiento descritas aquí.

45 Algunos ejemplos comprenden productos lácteos producidos a partir de leche mediante etapas de procesamiento adicionales. Como se describió anteriormente, la nata se puede desnatar desde la parte superior de la leche o separarse de la leche usando máquinas centrifugadoras. Por ejemplo, el producto lácteo comprende crema agria, un producto lácteo rico en grasas que se obtiene fermentando la nata usando un cultivo bacteriano. La bacteria produce ácido láctico durante la fermentación, que agria y espesa la nata. En otro ejemplo, el producto lácteo comprende nata fresca, una nata espesa ligeramente agriada con cultivo bacteriano de manera similar a la crema agria. La nata 50 fresca normalmente no es tan espesa ni tan agria como la crema agria. En aun otro ejemplo, el producto lácteo comprende suero de mantequilla cultivado. El suero de mantequilla cultivado se obtiene agregando bacterias a la leche. La fermentación resultante, en donde el cultivo bacteriano convierte la lactosa en ácido láctico, le da un sabor agrio al suero de mantequilla cultivado. Aunque se produce de manera diferente, el suero de mantequilla cultivado generalmente es similar al suero de mantequilla tradicional, que es un subproducto de la fabricación de mantequilla.

55 En algunos ejemplos, los productos lácteos comprenden leche en polvo, leche condensada, leche evaporada, o combinaciones de los mismos. La leche en polvo, la leche condensada y la leche evaporada generalmente se producen al eliminar el agua de la leche. Por ejemplo, el producto lácteo comprende una leche en polvo que comprende sólidos lácteos secos con un bajo contenido de humedad. En otro ejemplo, el producto lácteo comprende 60 leche condensada. La leche condensada generalmente comprende leche con un contenido de agua reducido y edulcorante agregado, produciendo un producto espeso y dulce con una larga vida útil. En aun otro ejemplo, el producto lácteo comprende leche evaporada. La leche evaporada generalmente comprende leche fresca y homogeneizada de la que se ha eliminado aproximadamente el 60 % del agua, que se ha enfriado, fortificado con aditivos como vitaminas y estabilizadores, envasado y finalmente esterilizado. Por ejemplo, el producto lácteo 65 comprende una nata seca y rebaudiósido I o una composición que comprende rebaudiósido I.

En otro ejemplo, el producto lácteo proporcionado en este documento comprende mantequilla. La mantequilla generalmente se prepara batiendo nata o leche fresca o fermentada. La mantequilla generalmente comprende grasa de mantequilla que rodea pequeñas gotas que comprenden principalmente agua y proteínas de la leche. El proceso de batido daña las membranas que rodean los glóbulos microscópicos de la grasa de mantequilla, permitiendo que las grasas de la leche se unan y se separen de las otras partes de la nata. En aun otro ejemplo, el producto lácteo comprende suero de mantequilla, que es el líquido de sabor agrio que queda después de producir mantequilla a partir de leche entera por el proceso de batido.

En aun otro ejemplo, el producto lácteo comprende queso, un alimento sólido producido al cuajar la leche usando una combinación de cuajo o sustitutos de cuajo y acidificación. El cuajo, un complejo natural de enzimas producidas en los estómagos de los mamíferos para digerir la leche, se usa en la fabricación de queso para cuajar la leche, haciendo que se separe en sólidos conocidos como cuajada y líquidos conocidos como suero. En general, el cuajo se obtiene del estómago de los rumiantes jóvenes, como los terneros; sin embargo, las fuentes alternativas de cuajo incluyen algunas plantas, organismos microbianos y bacterias, hongos o levaduras genéticamente modificados. Además, la leche puede coagularse agregando ácido, tal como ácido cítrico. Generalmente, se usa una combinación de cuajo y/o acidificación para cuajar la leche. Después de separar la leche en cuajada y suero, algunos quesos se hacen simplemente escurriendo, salando y empacando la cuajada. Para la mayoría de los quesos, sin embargo, se necesita más procesamiento. Se pueden usar muchos métodos diferentes para producir los cientos de variedades disponibles de queso. Los métodos de procesamiento incluyen calentar el queso, cortarlo en cubos pequeños para drenar, salar, estirar, procesamiento cheddar, lavar, moldear, envejecer y madurar. Algunos quesos, como los quesos azules, tienen bacterias o mohos adicionales que se introducen antes o durante el envejecimiento, impartiendo sabor y aroma al producto terminado. El requesón es un producto de cuajada de queso con un sabor suave que se drena pero no se prensa para que quede algo de suero. La cuajada generalmente se lava para eliminar la acidez. El queso crema es un queso blanco suave, de sabor suave con un alto contenido de grasa que se produce al agregar nata a la leche y luego cuajar para formar una cuajada rica. Alternativamente, el queso crema se puede hacer con leche desnatada con nata agregada a la cuajada. Debe entenderse que el queso, como se usa en el presente documento, comprende todos los alimentos sólidos producidos por la leche cuajada.

En otro ejemplo, el producto lácteo comprende yogur. El yogur generalmente se produce por la fermentación bacteriana de la leche. La fermentación de la lactosa produce ácido láctico, que actúa sobre las proteínas de la leche para darle al yogur una textura y acidez similar a un gel. En algunos ejemplos, el yogur se puede endulzar con un edulcorante y/o con sabor. Ejemplos no limitantes de aromatizantes incluyen, pero no se limitan a, frutas (por ejemplo, durazno, fresa, plátano), vainilla y chocolate. El yogur, como se usa en este documento, también incluye variedades de yogur con diferentes consistencias y viscosidades, como dadiah, labneh o labaneh, búlgaro, kéfir y matsoni. En otro ejemplo, el producto lácteo comprende una bebida a base de yogur, también conocida como yogur bebible o batido de yogur. En algunos ejemplos, la bebida a base de yogur puede comprender edulcorantes, aromatizantes, otros ingredientes o combinaciones de los mismos.

Se pueden usar otros productos lácteos más allá de los descritos aquí. Dichos productos lácteos son bien conocidos por los expertos en la técnica, ejemplos no limitativos de los cuales incluyen leche, leche y zumo, café, té, vía, piima, filmjolk, kajmak, kephir, villi, kumis, airag, leche helada, caseína, ayran, lassi y khoa.

En algunos ejemplos, las composiciones lácteas también pueden comprender otros aditivos. Ejemplos no limitativos de aditivos adecuados incluyen edulcorantes y saborizantes tales como chocolate, fresa y plátano. Algunos ejemplos de las composiciones lácteas proporcionadas en el presente documento también pueden comprender suplementos nutricionales adicionales tales como vitaminas (por ejemplo, vitamina D) y minerales (por ejemplo, calcio) para mejorar la composición nutricional de la leche.

Por ejemplo, la composición láctea comprende rebaudiósido I o una composición que comprende rebaudiósido I en combinación con un producto lácteo. Por ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición láctea en una cantidad en el rango de aproximadamente 200 a aproximadamente 20.000 por ciento en peso de la composición láctea.

El rebaudiósido I o composiciones que comprenden rebaudiósido I también es adecuado para su uso en productos agrícolas procesados, productos de ganadería o mariscos; productos cárnicos procesados tales como salchichas y similares; productos alimenticios de retorta, encurtidos, conservas hervidas en salsa de soja, exquisiteces, guarniciones; sopas; refrigerios como patatas fritas, galletas o similares; como relleno triturado, hoja, vástago, tallo, hoja curada homogeneizada y alimento para animales.

60 Composiciones edulcorantes de mesa

Se divulga un edulcorante de mesa que comprende rebaudiósido I. La composición de mesa puede incluir además al menos un agente de carga, aditivo, agente antiaglomerante, ingrediente funcional o una combinación de los mismos.

65 Los "agentes de carga" adecuados incluyen, pero sin limitación, maltodextrina (10 DE, 18 DE o 5 DE), sólidos de jarabe de maíz (20 o 36 DE), sacarosa, fructosa, glucosa, azúcar invertido, sorbitol, xilosa, ribulosa, manosa, xilitol,

manitol, galactitol, eritritol, maltitol, lactitol, isomalt, maltosa, tagatosa, lactosa, inulina, glicerol, propilenglicol, polioles, polidextrosa, fructooligosacáridos, celulosa y derivados de celulosa, y similares, y mezclas de los mismo. Además, el azúcar granulada (sacarosa) u otros edulcorantes calóricos como la fructosa cristalina, otros carbohidratos o alcoholes de azúcar se pueden usar como agentes de carga debido a su buena uniformidad de contenido sin la adición de calorías significativas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "agente antiaglomerante" y "agente de flujo" se refieren a cualquier composición que ayuda a la uniformidad de contenido y disolución uniforme. Ejemplos no limitantes de agentes antiaglomerantes incluyen crema tártara, silicato de calcio, dióxido de silicio, celulosa microcristalina (Avicel, FMC BioPolymer, Filadelfia, Pensilvania) y fosfato tricálcico. En un ejemplo, los agentes antiaglomerantes están presentes en la composición edulcorante de mesa en una cantidad de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 3 % en peso de la composición edulcorante de mesa.

Las composiciones edulcorantes de mesa se pueden envasar en cualquier forma conocida en la técnica. Las formas no limitantes incluyen, pero no se limitan a, forma de polvo, forma granular, paquetes, tabletas, bolsitas, gránulos, cubos, sólidos y líquidos.

En un ejemplo, la composición edulcorante de mesa es un paquete de una porción (control de porciones) que comprende una mezcla seca. Las formulaciones de mezcla seca generalmente pueden comprender polvo o gránulos. Aunque la composición edulcorante de sobremesa puede estar en un paquete de cualquier tamaño, un ejemplo ilustrativo no limitativo de paquetes de edulcorante de sobremesa de control de porciones convencionales tiene aproximadamente 2.5 por 1.5 pulgadas y contiene aproximadamente 1 gramo de una composición edulcorante que tiene un dulzor equivalente a 2 cucharaditas de azúcar granulada (~8 g). La cantidad de rebaudiosido I en una formulación de edulcorante de mesa de mezcla seca puede variar. Por ejemplo, una formulación de edulcorante de mesa de mezcla seca puede contener rebaudiosido I en una cantidad de aproximadamente 1 % (p/p) a aproximadamente 10 % (p/p) de la composición de edulcorante de mesa.

Ejemplos de edulcorantes de mesa sólidos incluyen cubos y tabletas. Un ejemplo no limitativo de cubos convencionales tiene un tamaño equivalente a un cubo estándar de azúcar granulada, que mide aproximadamente 2.2 x 2.2 x 2.2 cm³ y pesa aproximadamente 8 g. En un ejemplo, un edulcorante de mesa sólido tiene la forma de una tableta o cualquier otra forma conocida por los expertos en la materia.

También se puede divulgar una composición edulcorante de mesa en forma de un líquido, en donde el rebaudiosido I se combina con un vehículo líquido. Ejemplos no limitativos adecuados de agentes portadores para edulcorantes de mesa líquidos incluyen agua, alcohol, polioliol, base de glicerina o base de ácido cítrico disuelto en agua y mezclas de los mismos. El equivalente de dulzor de una composición edulcorante de mesa para cualquiera de las formas descritas en este documento o conocidas en la técnica se puede variar para obtener un perfil de dulzor deseado. Por ejemplo, una composición edulcorante de mesa puede comprender un dulzor comparable a la de una cantidad equivalente de azúcar estándar. En otro ejemplo, la composición edulcorante de mesa puede comprender un dulzor de hasta 100 veces la de una cantidad equivalente de azúcar. En otro ejemplo, la composición edulcorante de mesa puede comprender un dulzor de hasta 90 veces, 80 veces, 70 veces, 60 veces, 50 veces, 40 veces, 30 veces, 20 veces, 10 veces, 9 veces, 8 veces, 7 veces, 6 veces, 5 veces, 4 veces, 3 veces y 2 veces la cantidad de azúcar equivalente.

Bebidas y productos de bebidas

Se divulga una bebida o producto de bebida que comprende rebaudiosido I. Además se describe una bebida, o una bebida que comprende una composición que comprende rebaudiosido I (por ejemplo, una composición edulcorante).

Como se usa en el presente documento, un "producto de bebida" es una bebida lista para beber, un concentrado de bebida, un jarabe de bebida o una bebida en polvo. Las bebidas listas para beber adecuadas incluyen bebidas carbonatadas y no carbonatadas. Las bebidas carbonatadas incluyen, entre otras, bebidas burbujeantes mejoradas, cola, bebidas burbujeantes con sabor a lima-limón, bebidas burbujeantes con sabor a naranja, bebidas burbujeantes con sabor a uva, bebidas burbujeantes con sabor a fresa, bebidas burbujeantes con sabor a piña, ginger-ale, refrescos y zarzaparrilla. Las bebidas no carbonatadas incluyen, pero no se limitan a, zumo de fruta, zumo con sabor a fruta, bebidas de zumo, néctares, zumo de vegetales, zumo con sabor a verduras, bebidas deportivas, bebidas energéticas, bebidas de agua mejoradas, agua mejorada con vitaminas, bebidas cercanas al agua (por ejemplo, agua con saborizantes naturales o sintéticos), agua de coco, bebidas tipo té (por ejemplo, té negro, té verde, té rojo, té oolong), café, bebida de cacao, bebidas que contenían componentes lácteos (por ejemplo, bebidas lácteas, café que contiene componentes lácteos, café con leche, té con leche, bebidas lácteas de frutas), bebidas que contenían extractos de cereales, batidos y combinaciones de los mismos.

Los concentrados de bebidas y los jarabes de bebidas se preparan con un volumen inicial de matriz líquida (por ejemplo, agua) y los ingredientes de bebida deseados. Las bebidas de alta potencia se preparan agregando más volúmenes de agua. Las bebidas en polvo se preparan mezclando en seco todos los ingredientes de la bebida en ausencia de una matriz líquida. Las bebidas de alta potencia se preparan agregando el volumen total de agua.

- 5 Las bebidas comprenden una matriz líquida, es decir, el ingrediente básico en donde se disuelven los ingredientes, incluidas las composiciones descritas. En un ejemplo, una bebida comprende agua de calidad de bebida como la matriz líquida, tal como, por ejemplo, agua desionizada, agua destilada, agua de ósmosis inversa, agua tratada con carbón, agua purificada, agua desmineralizada y combinaciones de las mismas. Las matrices líquidas adecuadas adicionales incluyen, pero sin limitación, ácido fosfórico, regulador fosfato, ácido cítrico, regulador citrato y agua tratada con carbono.
- 10 En un ejemplo, el consumible es una bebida que comprende rebaudiósido I.
- En otro ejemplo, una bebida contiene una composición que comprende rebaudiósido I.
- 15 Se divulga un producto de bebida que comprende rebaudiósido I.
- Se divulga adicionalmente un producto de bebida que contiene una composición que comprende rebaudiósido I.
- 20 La concentración de rebaudiósido I en la bebida o producto de bebida puede ser superior, igual o inferior a su umbral de dulzor o concentración de reconocimiento.
- 25 Por ejemplo, la concentración de rebaudiósido I en la bebida o producto de bebida está por encima de su umbral de dulzor o concentración de reconocimiento de sabor. En un ejemplo, la concentración de rebaudiósido I es al menos aproximadamente 1 %, al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 15 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 %, aproximadamente al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente 40 %, aproximadamente al menos aproximadamente 45 %, al menos aproximadamente 50 % o más por encima de su umbral de dulzor o concentración de reconocimiento de sabor.
- 30 En otro ejemplo, la concentración de rebaudiósido I en la bebida o producto de bebida está en, o aproximadamente, el umbral de dulzor o concentración de reconocimiento de sabor del rebaudiósido I.
- 35 En aun otro ejemplo, la concentración de rebaudiósido I en la bebida o producto de bebida está por debajo del umbral de concentración de dulzor o reconocimiento de sabor del rebaudiósido I. En un ejemplo, la concentración de rebaudiósido I es al menos aproximadamente 1 %, al menos aproximadamente 5 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 15 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 %, aproximadamente al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente 40 %, aproximadamente al menos aproximadamente 45 %, al menos aproximadamente 50 % o más por debajo de su umbral de dulzor o concentración de reconocimiento de sabor.
- 40 Se divulga una bebida o producto de bebida que contiene rebaudiósido I en una cantidad que varía de aproximadamente 1 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 15 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 10.000 ppm o de aproximadamente 25 ppm a aproximadamente 10.000. En otro ejemplo, el rebaudiósido I está presente en una bebida en una cantidad que varía de aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 600 ppm. En aún otros ejemplos, el rebaudiósido I está presente en una bebida en una cantidad que varía de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 ppm, de aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 300 ppm, de aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 400 ppm, o de aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 500 ppm. En aun otro ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la bebida o producto de bebida en una cantidad que varía de aproximadamente 300 a aproximadamente 700 ppm, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 400 ppm a aproximadamente 600 ppm. En otro ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la bebida o producto de bebida en una cantidad que varía de aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 400 ppm, tal como, por ejemplo, aproximadamente 200 a aproximadamente 250 ppm, aproximadamente 250 ppm a aproximadamente 300 ppm, aproximadamente 300 a aproximadamente 350 ppm o aproximadamente 350 ppm. En aun otro ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la bebida o producto de bebida en una cantidad que varía de aproximadamente 450 ppm a aproximadamente 650 ppm, tal como, por ejemplo, aproximadamente 450 ppm a aproximadamente 500 ppm, aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 550 ppm, aproximadamente 550 ppm a aproximadamente 600 ppm, o aproximadamente 600 a aproximadamente 650 ppm.
- 50 Por ejemplo, la presente bebida es un rebaudiósido I que comprende una cantidad de aproximadamente 200 a aproximadamente 300 ppm, tal como, por ejemplo, aproximadamente 200 ppm, aproximadamente 225, aproximadamente 250 ppm, aproximadamente 275 ppm, o aproximadamente 300 ppm.
- 55 Por ejemplo, la presente bebida es un rebaudiósido I que comprende una cantidad de aproximadamente 500 a aproximadamente 600 ppm, tal como, por ejemplo, aproximadamente 500 ppm, aproximadamente 525 ppm, aproximadamente 550 ppm, aproximadamente 575 ppm o aproximadamente 600 ppm.
- 60
- 65

La bebida puede incluir además al menos un edulcorante adicional. Puede usarse cualquiera de los edulcorantes detallados aquí, incluidos los edulcorantes naturales, no naturales o sintéticos. Estos se pueden agregar a la bebida antes, simultáneamente con o después del rebaudiosido I.

5 En un ejemplo, la bebida contiene un edulcorante de carbohidratos en una concentración de aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 140.000 ppm. Los edulcorantes sintéticos pueden estar presentes en la bebida en una concentración de aproximadamente 0.3 ppm a aproximadamente 3.500 ppm. Los edulcorantes naturales de alta potencia pueden estar presentes en la bebida en una concentración de aproximadamente 0.1 ppm a aproximadamente 3.000 ppm.

10 La bebida puede comprender además aditivos que incluyen, pero no se limitan a, carbohidratos, polioles, aminoácidos y sus sales correspondientes, poliaminoácidos y sus sales correspondientes, ácidos de azúcar y sus sales correspondientes, nucleótidos, ácidos orgánicos, ácidos inorgánicos, sales orgánicas que incluyen sales de ácidos orgánicos y sales de bases orgánicas, sales inorgánicas, compuestos amargos, cafeína, aromatizantes e ingredientes aromatizantes, compuestos astringentes, proteínas o hidrolizados de proteínas, tensioactivos, emulsionantes, agentes de peso, zumos, lácteos, cereales y otros extractos de plantas, flavonoides, alcoholes, polímeros y combinaciones de los mismos. Se puede usar cualquier aditivo adecuado descrito aquí.

15 En un ejemplo, el poliol puede estar presente en la bebida en una concentración de aproximadamente 100 ppm a aproximadamente 250.000 ppm, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 5.000 ppm a aproximadamente 40.000 ppm.

20 En otro ejemplo, el aminoácido puede estar presente en la bebida en una concentración de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 50.000 ppm, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 1.000 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, de aproximadamente 2.500 ppm a aproximadamente 5.000 ppm o de aproximadamente 250 ppm a aproximadamente 7.500 ppm.

25 En aun otro ejemplo, el nucleótido puede estar presente en la bebida en una concentración de aproximadamente 5 ppm a aproximadamente 1.000 ppm.

30 En aun otro ejemplo, el aditivo ácido orgánico puede estar presente en la bebida en una concentración de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 5.000 ppm.

35 En aun otro ejemplo, el aditivo de ácido inorgánico puede estar presente en la bebida en una concentración de aproximadamente 25 ppm a aproximadamente 25.000 ppm.

40 En aun otro ejemplo, el compuesto amargo puede estar presente en la bebida en una concentración de aproximadamente 25 ppm a aproximadamente 25.000 ppm.

45 En aun otro ejemplo, el saborizante puede estar presente en la bebida a una concentración de aproximadamente 0.1 ppm a aproximadamente 4.000 ppm.

50 En todavía un ejemplo adicional, el polímero puede estar presente en la bebida en una concentración de aproximadamente 30 ppm a aproximadamente 2.000 ppm.

55 En otro ejemplo, el hidrolizado de proteína puede estar presente en la bebida en una concentración de aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 50.000.

60 En aun otro ejemplo, el aditivo tensioactivo puede estar presente en la bebida en una concentración de aproximadamente 30 ppm a aproximadamente 2.000 ppm.

65 En aun otro ejemplo, el aditivo flavonoide puede estar presente en la bebida a una concentración de aproximadamente 0.1 ppm a aproximadamente 1.000 ppm.

70 En aun otro ejemplo, el aditivo de alcohol puede estar presente en la bebida en una concentración de aproximadamente 625 ppm a aproximadamente 10.000 ppm.

75 En todavía un ejemplo adicional, el aditivo astringente puede estar presente en la bebida en una concentración de aproximadamente 10 ppm a aproximadamente 5.000 ppm.

80 La bebida puede contener además uno o más ingredientes funcionales, detallados anteriormente. Los ingredientes funcionales incluyen, entre otros, vitaminas, minerales, antioxidantes, conservantes, glucosamina, polifenoles y combinaciones de los mismos. Se puede usar cualquier ingrediente funcional adecuado descrito aquí.

85 Se contempla que el pH del consumible, tal como, por ejemplo, una bebida, no afecta material o adversamente el sabor del edulcorante. Un ejemplo no limitativo del rango de pH de la bebida puede ser de aproximadamente 1.8 a

aproximadamente 10. Un ejemplo adicional incluye un rango de pH de aproximadamente 2 a aproximadamente 5. Por ejemplo, el pH de la bebida puede ser de aproximadamente 2.5 a aproximadamente 4.2. Los expertos en la materia entenderán que el pH de la bebida puede variar según el tipo de bebida. Las bebidas lácteas, por ejemplo, pueden tener pH superiores a 4.2.

5 La acidez titulable de una bebida que comprende rebaudiósido I puede, por ejemplo, variar de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 1.0 % en peso de bebida.

10 En un ejemplo, el producto de bebida gaseosa tiene una acidez de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 1.0 % en peso de la bebida, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 0.05 % a aproximadamente 0.25 % en peso de bebida.

15 La carbonatación de un producto de bebida burbujeante tiene de 0 a aproximadamente 2 % (p/p) de dióxido de carbono o su equivalente, por ejemplo, de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 1.0 % (p/p).

La temperatura de una bebida puede, por ejemplo, variar de aproximadamente 4°C a aproximadamente 100°C, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 4°C a aproximadamente 25°C.

20 La bebida puede ser una bebida de calorías completas que tiene hasta aproximadamente 120 calorías por porción de 8 oz.

La bebida puede ser una bebida de calorías medias que tiene hasta aproximadamente 60 calorías por porción de 8 onzas.

25 La bebida puede ser una bebida baja en calorías que tiene hasta aproximadamente 40 calorías por porción de 8 onzas.

La bebida puede ser de cero calorías que tiene menos de aproximadamente 5 calorías por porción de 8 onzas.

30 Métodos de uso

Los compuestos y composiciones pueden usarse para impartir dulzor o para potenciar el sabor o dulzor de los consumibles u otras composiciones.

35 Se divulga un método para preparar un consumible que comprende (i) proporcionar una matriz consumible y (ii) añadir rebaudiósido I a la matriz consumible para proporcionar un consumible.

40 También se describe un método para preparar una bebida que comprende (i) proporcionar una matriz líquida o de bebida y (ii) añadir rebaudiósido I a la matriz consumible para proporcionar una bebida.

Se divulga además un método para preparar un consumible edulcorado que comprende (i) proporcionar un consumible edulcorante y (ii) añadir rebaudiósido I al consumible edulcorante para proporcionar un consumible edulcorado.

45 Además se describe un método para preparar una bebida endulzada que comprende (i) proporcionar una bebida endulzable y (ii) añadir rebaudiósido I a la bebida endulzable para proporcionar una bebida endulzada.

50 En los métodos anteriores, se puede proporcionar rebaudiósido I como tal, o en forma de una composición. Cuando el rebaudiósido I se proporciona como composición, la cantidad de la composición es efectiva para proporcionar una concentración de rebaudiósido I que está por encima, por debajo o por debajo de su umbral de concentración de reconocimiento de sabor o dulzor cuando la composición se agrega al consumible (por ejemplo, la bebida). Cuando el rebaudiósido I no se proporciona como composición, se puede agregar al consumible a una concentración que esté por encima, por debajo o por debajo de su umbral de concentración de reconocimiento de sabor o dulzor.

55 Se divulga un método para potenciar el dulzor de un consumible que comprende (i) proporcionar un consumible que comprende uno o más ingredientes dulces y (ii) agregar rebaudiósido I (1) al consumible para proporcionar un consumible con dulzor mejorada, en donde el rebaudiósido I se agrega al consumible a una concentración igual o inferior a su umbral de concentración de reconocimiento de dulzor. Por ejemplo, el rebaudiósido I se agrega al consumible a una concentración por debajo de su umbral de concentración de reconocimiento de dulzor.

60 También se describe un método para potenciar el dulzor de un consumible que comprende (i) proporcionar un consumible que comprende uno o más ingredientes dulces y (ii) agregar una composición que comprende rebaudiósido I al consumible para proporcionar un consumible con dulzor mejorado, en donde el rebaudiósido I está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de rebaudiósido I en o por debajo de su concentración umbral de reconocimiento de dulzor cuando la composición se agrega al consumible.

65

Por ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de rebaudiósido I por debajo de su umbral de concentración de reconocimiento de dulzor.

Se divulga adicionalmente un método para potenciar el dulzor de una bebida que comprende (i) proporcionar una bebida que comprende al menos un ingrediente dulce y (ii) añadir rebaudiósido I a la bebida para proporcionar una bebida con dulzor mejorada, en donde el rebaudiósido I es agregado a la bebida en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración igual o inferior a su umbral de concentración de reconocimiento de dulzor. Por ejemplo, el rebaudiósido I se agrega al consumible en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración por debajo de su umbral de concentración de reconocimiento de dulzor.

Se divulga adicionalmente un método para potenciar el dulzor de una bebida que comprende (i) proporcionar una bebida que comprende uno o más ingredientes dulces y (ii) añadir una composición que comprende rebaudiósido I al consumible para proporcionar una bebida con dulzor mejorada, en donde el rebaudiósido I está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de rebaudiósido I en o por debajo de su concentración umbral de reconocimiento de dulzor cuando la composición se agrega a la bebida. Por ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de rebaudiósido I por debajo de su concentración umbral de reconocimiento de dulzor cuando la composición se agrega a la bebida.

Se divulga adicionalmente un método para potenciar el sabor de un consumible, que comprende (i) proporcionar un consumible que comprende al menos un ingrediente de sabor y (ii) añadir rebaudiósido I al consumible para proporcionar un consumible con sabor mejorado, en donde el rebaudiósido I se agrega al consumible a una concentración igual o inferior a su umbral de concentración de reconocimiento de sabor. Por ejemplo, el rebaudiósido I se agrega al consumible a una concentración por debajo de este umbral de concentración de reconocimiento de sabor.

Se divulga adicionalmente un método para potenciar el sabor de un consumible que comprende (i) proporcionar un consumible que comprende al menos un ingrediente de sabor y (ii) agregar una composición rebaudiósido I al consumible para proporcionar un consumible con sabor mejorado, en donde rebaudiósido I está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de rebaudiósido I en o por debajo de su concentración umbral de reconocimiento de sabor cuando la composición se agrega al consumible. Por ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de rebaudiósido I por debajo de su concentración umbral de reconocimiento de sabor cuando la composición se agrega al consumible.

Se divulga además un método para potenciar el sabor de una bebida que comprende (i) proporcionar una bebida que comprende al menos un ingrediente de sabor y (ii) añadir rebaudiósido I a la bebida para proporcionar una bebida con sabor mejorado, en donde el rebaudiósido I es agregado a la bebida a una concentración igual o inferior a su concentración límite de reconocimiento de sabor. Por ejemplo, el rebaudiósido I se agrega al consumible a una concentración por debajo de su concentración umbral de reconocimiento de sabor.

Se divulga adicionalmente un método para potenciar el sabor de una bebida que comprende (i) proporcionar una bebida que comprende al menos un ingrediente de sabor y (ii) agregar una composición que comprende rebaudiósido I a la bebida para proporcionar una bebida con sabor mejorado en donde el rebaudiósido I está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de rebaudiósido I en o por debajo de su concentración umbral de reconocimiento de sabor cuando la composición se agrega a la bebida. Por ejemplo, el rebaudiósido I está presente en la composición en una cantidad efectiva para proporcionar una concentración de rebaudiósido I por debajo de su concentración umbral de reconocimiento de sabor cuando la composición se agrega al consumible.

También se divulgan métodos para preparar composiciones edulcoradas (por ejemplo, consumibles edulcorados) y composiciones potenciadas de sabor (por ejemplo, consumibles mejorados aromatizados) mediante la adición de rebaudiósido I o composiciones que comprenden rebaudiósido I a tales composiciones/consumibles.

Los siguientes ejemplos ilustran realizaciones preferidas de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Producción in vivo de UGT76G1 (fuera del alcance de la invención)

Se añadieron lados de restricción NcoI y NdeI a la secuencia nucleica original como se describe en el número de acceso de Genbank. AAR06912.1. Después de la optimización del codón se obtuvo la siguiente secuencia nucleica:

CCATGGCCCATATGGAAAACAAAACCGAAACCACCGTTCGTCGTCGTCGCCGT
ATTATTCTGTTTCCGGTTCGGTTCAGGGTCATATTAATCCGATTCCTGCAGCTG
GCAAATGTGCTGTATAGCAAAGGTTTTAGCATTACCATTTTTTCATACCAATTTT
AACAAACCGAAAACCAGCAATTATCCGCATTTTACCTTTCGCTTTATTCTGGAT
AATGATCCGCAGGATGAACGCATTAGCAATCTGCCGACACATGGTCCGCTGGC
AGGTATGCGTATTCCGATTATTAACGAACATGGTGCAGATGAACTGCGTCGTG
AACTGGAAGTGTGATGCTGGCAAGCGAAGAAGATGAAGAAGTTAGCTGTCT
GATTACCGATGCACTGTGGTATTTTGCACAGAGCGTTGCAGATAGCCTGAATC
TGCGTCGTCGGTTCTGATGACCAGCAGCCTGTTAACTTTCATGCACATGTTA
GCCTGCCGCAGTTTGATGAACTGGGTTATCTGGATCCGGATGATAAAACCCGT
CTGGAAGAACAGGCAAGCGGTTTTCCGATGCTGAAAGTGAAAGATATCAAAA
GCGCCTATAGCAATTGGCAGATTCTGAAAGAAATTCTGGGCAAAATGATTA
CAGACCAAAGCAAGCAGCGGTGTTATTTGGAATAGCTTTAAAGAACTGGAAG
AAAGCGAACTGGAACCCGTGATTCGTGAAATTCCGGCACCGAGCTTTCTGATT
CCGCTGCCGAAACATCTGACCGCAAGCAGCAGCAGCCTGCTGGATCATGATCG
TACCGTTTTTCAGTGGCTGGATCAGCAGCCTCCGAGCAGCGTTCTGTATGTTAG
CTTTGGTAGCACCAGCGAAGTTGATGAAAAAGATTTTCTGGAAATTGCCCGTG
GTCTGGTTGATAGCAAACAGAGCTTTCTGTGGGTTGTTTCGTCCGGGTTTTGTTA
AAGGTAGCACCTGGGTTGAACCGCTGCCGGATGGTTTTCTGGGTGAACGTGGT
CGTATTGTTAAATGGGTTCCGCAGCAAGAAGTTCTGGCACACGGCGCAATTGG
TGCATTTTGGACCCATAGCGGTTGGAATAGCACCCCTGGAAAGCGTTTGTGAAG
GTGTTCCGATGATTTTTAGCGATTTTGGTCTGGATCAGCCGCTGAATGCACGTT
ATATGAGTGATGTTCTGAAAGTGGGTGTGTATCTGGAAAATGGTTGGGAACGT
GGTGAAATTGCAAATGCAATTCGTCGTGTTATGGTGGATGAAGAAGGTGAATA
TATTCGTCAGAATGCCCGTGTCTGAAACAGAAAGCAGATGTTAGCCTGATGA
AAGGTGGTAGCAGCTATGAAAGCCTGGAAAGTCTGGTTAGCTATATTAGCAGC
CTGTAATAACTCGAG (SEQ ID NO: 1).

- 5 Después de la síntesis del gen y la subclonación en el vector pET30A+ usando sitios de clonación NdeI y XhoI, el plásmido UGT76G1_pET30a+ se introdujo en *E. coli* B121 (DE3) y *E. coli* EC100 por electroporación. Las células obtenidas se cultivaron en placas de Petri en presencia de kanamicina y se seleccionaron colonias adecuadas y se dejaron crecer en medio líquido LB (matraces erlenmeyer). Se añadió glicerol a la suspensión como crioprotector y se almacenaron alícuotas de 400 µL a -20°C y a -80°C.
- 10 Las partes alícuotas de almacenamiento de *E. coli* BL21 (DE3) que contiene el plásmido pET30A+_UGT76G1 se descongelaron y se añadieron a 30 ml de medio LBGKP (caldo Luria 20 g/l Lennox; regulador PIPES 50 mM pH 7.00; regulador fosfato 50 mM pH 7.00; 2.5 g/l de glucosa y 50 mg/l de kanamicina). Este cultivo se dejó agitar a 135 rpm a 30°C durante 8 h.
- 15 El medio de producción contenía 60 g/l de medio instantáneo de Overnight Express Instant (Novagen), 10 g/l de glicerol y 50 mg/l de kanamicina. El medio se dejó agitar a 20°C mientras se tomaban muestras para medir la DO y el pH. Los cultivos dieron un crecimiento significativo y se obtuvo una buena DO. Después de 40 h, las células se recolectaron por centrifugación y se congelaron para producir 12.7 g de peso húmedo celular.
- 20 La lisis se realizó mediante la adición de la mezcla Bugbuster Master (Novagen) y el lisado se recuperó por centrifugación y se mantuvo congelado. Las pruebas de actividad se realizaron con lisado descongelado.

Ejemplo 2

Producción in vitro de UGT76G1 (fuera del alcance de la invención)

5 Se utilizó el kit del sistema de expresión de proteína de alto rendimiento S30 T7 de Promega. Se mezclaron 4 µg de plásmido UGT76G1_pET30a+ de *E. coli* EC100 con 80 µl de premezcla S30 plus y se agregaron 72 µl de extracto S30 T7. Se añadió agua libre de nucleasas para obtener un volumen total de 200 µl y la solución resultante se incubó durante 2 h a 30°C. Se usaron 180 µl en la reacción de prueba catalítica.

10 Ejemplo 3

Producción in vitro de UGT91D2 (fuera del alcance de la invención)

15 Se añadieron lados de restricción NcoI y NdeI a la secuencia nucleica original como se describe en el número de acceso de Genbank. ACE87855.1. Después de la optimización del codón se obtuvo la siguiente secuencia nucleica:

CCATGGCACATATGGCAACCAGCGATAGCATTGTTGATGATCGTAAACAGCTG
 CATGTTGCAACCTTCCGTGGCTGGCATTGTTGGTCATATTCTGCCGTATCTGCAG
 CTGAGCAAACCTGATTGCAGAAAAAGGTCATAAAGTGAGCTTCTGAGCACCA
 CCCGTAATATTCAGCGTCTGAGCAGCCATATTAGTCCGCTGATTAATGTTGTTC
 AGCTGACCCTGCCTCGTGTCAAGAAGTCCCGGAAGATGCCGAAGCAACCACC
 GATGTTTCATCCGGAAGATATTCCGTATCTGAAAAAAGCAAGTGATGGTCTGCA
 GCCGGAAGTTACCCGTTTTCTGGAACAGCATAGTCCGGATTGGATCATCTATG
 ATTATACCCATTATTGGCTGCCGAGCATTGCAGCAAGCCTGGGTATTAGCCGT
 GCACATTTTAGCGTTACCACCCCGTGGGCAATTGCATATATGGGTCCGAGCGC
 AGATGCAATGATTAATGGTAGTGATGGTTCGTACCACCGTTGAAGATCTGACCA
 CCCCTCCGAAATGGTTTTCCGTTTTCCGACCAAAGTTTTGTTGGCGTAAACATGATC
 TGGCACGTCTGGTTCCGTATAAAGCACCCGGTATTAGTGATGGTTATCGTATG
 GGTCTGGTTCTGAAAGGTAGCGATTGTCTGCTGAGCAAATGCTATCATGAATT
 TGGCACCCAGTGGCTGCCGCTGCTGGAAACCCTGCATCAGGTTCCGGTTGTTT
 CGGTGGGTCTGCTGCCTCCGGAAGTTCGGGGTATGAAAAAGATGAAACCTG
 GGTTAGCATCAAAAAATGGCTGGATGGTAAACAGAAAGGTAGCGTGGTTTAT
 GTTGCACTGGGTAGCGAAGTTCTGGTTAGCCAGACCGAAGTTGTTGAACTGGC
 ACTGGGTCTGGAACCTGAGCGGTCTGCCGTTTTGTTTGGGCATATCGTAAACCGA
 AAGGTCCGGCAAAAAGCGATAGCGTTGAACTGCCGGATGGTTTTGTTGAAACGT
 ACCCGTGATCGTGGTCTGGTTTTGGACCAGCTGGGCACCTCAGCTGCGTATTCT
 GAGCCATGAAAGCGTTTTGTGGTTTTCTGACCCATTGTGGTAGCGGTAGCATTG
 TGGAAGGTCTGATGTTTGGTCATCCGCTGATTATGCTGCCGATTTTTGGTGATC
 AGCCGCTGAATGCACGTCTGCTGGAAGATAAACAGGTTGGTATTGAAATTCCG
 CGTAATGAAGAAGATGGTTGCCTGACCAAAGAAAGCGTTGCACGTAGCCTGC
 GTAGCGTTGTTGTTGAAAAAGAAGGCGAAATCTATAAAGCCAATGCACGTGA
 ACTGAGCAAATCTATAATGATACCAAAGTGAAAAAGAATATGTGAGCCAG
 TTCGTGGATTATCTGGAAAAAACACCCGTGCAGTTGCCATTGATCACGAAAG
 CTAATGACTCGAG (SEQ ID NO: 2)

20 Después de la síntesis del gen y la subclonación en el vector pET30A+ usando sitios de clonación NcoI y XhoI, el plásmido UGT91D2_pET30a+ se introdujo en *E. coli* EC100 por electroporación. Las células obtenidas se cultivaron

en presencia de kanamicina y se seleccionaron colonias adecuadas y se dejaron crecer en medio líquido LB (matraces erlenmeyer). Se añadió glicerol a la suspensión como crioprotector y se almacenaron alícuotas de 400 µl a -20°C y a -80°C.

5 Se usó el kit del sistema de expresión de proteína de alto rendimiento S30 T7 de Promega para la síntesis in vitro de la proteína.

10 Se mezclaron 4 µg de plásmido UGT91D2_pET30a+ con 80 µl de premezcla S30 plus y se agregaron 72 µl de extracto S30 T7. Se añadió agua libre de nucleasas para obtener un volumen total de 200 µl y la solución resultante se incubó durante 2 h a 30°C. Se usaron 5 µl para el análisis de páginas SDS mientras que los 45 µl restantes se usaron en la reacción de prueba catalítica.

Ejemplo 4

15 Producción in vivo de UGTSL (fuera del alcance de la invención)

20 El vector pET30A+ que contiene el gen correspondiente a la enzima (GI 460409128, Versión XP_004249992.1) se introdujo en *E. coli* BL21 (DE3) por choque térmico. Las células obtenidas se cultivaron en placas de Petri en presencia de kanamicina y se seleccionaron colonias adecuadas y se dejaron crecer en medio líquido LB (matraces Erlenmeyer). Se añadió glicerol a la suspensión como crioprotector y se almacenaron alícuotas de 400 µl a -20°C y a -80°C.

25 Las partes alícuotas de almacenamiento de *E. coli* BL21 (DE3) que contenían los plásmidos pET30A+_UGT se descongelaron y se añadieron a 30 ml de medio LBGKP (caldo Luria de 20 g/l Lennox; regulador PIPES 50 mM pH 7.00; regulador fosfato 50 mM pH 7.00; 2.5 g/l de glucosa y 50 mg/l de kanamicina). Este cultivo se dejó agitar a 135 rpm a 30°C durante 8 horas.

30 El medio de producción contenía 60 g/l de Overnight Express Instant TB (Novagen), 10 g/l de glicerol y 50 mg/l de kanamicina. El precultivo se añadió a 400 ml de este medio y la solución se dejó agitar a 20°C mientras se tomaban muestras para medir la DO y el pH. Los cultivos dieron un crecimiento significativo y se obtuvo una buena DO. Después de 40 horas, las células se recolectaron por centrifugación y se congelaron. Los pesos húmedos de la celda (CWW) fueron de 6.8 g.

35 La lisis se realizó mediante la adición de la mezcla Bugbuster Master (Novagen) y el lisado se recuperó por centrifugación y se usó fresco.

Ejemplo 5

40 Producción in vivo de UGTSL2 (fuera del alcance de la invención)

Secuencia de aminoácidos UGTSL2 (GI_460410132/XP_004250485.1):

MATNLRVLMFPWLAYGHISPFLNIAKQLADRGFLIYLCSTRINLESIIKKIPEKYAD
 SIHLIELQLPELPELPHYHTTNGLPPLHNP TLHKALKMSKPNFSRILQNLKPDLLIY
 DVLQPWAEHVANEQNIPAGKLLTSCAAVFSYFFSFRKNPGVEFPFPAIHLPEVEKV
 KIREILAKEPEEGRLDEGNKQMMLMCTSR TIEAKYIDYCTELCNWKVVPVGPFP
 QDLITNDADNKELIDWLGTKHENSTVFVSFGSEYFLSKEDMEEVAFLELSNVNFI
 WVARFPKGEERNLEDALPKGFLERIGERGRVLDKFAPQPRILNHPSTGGFISHCGW
 NSAMESIDFGVPIIAMP IHNQPINAKLMVELGVAVEIVRDDDGGKIHRGEIAETLKS
 VVTGETGEILRAKVREISKNLKSIRDEEMDAVAEELIQLCRNSNKS (SEQ ID NO:
 9).

45 El vector pET30A+ que contiene el gen UGTSL2 se introdujo en *E. coli* B121 (DE3) por choque térmico. Las células obtenidas se cultivaron en placas de Petri en presencia de kanamicina y se seleccionaron colonias adecuadas y se dejaron crecer en medio líquido LB (matraces erlenmeyer). Se añadió glicerol a la suspensión como crioprotector y se almacenaron alícuotas de 400 µl a -20°C y a -80°C.

50 Las partes alícuotas de almacenamiento de *E. coli* BL21 (DE3) que contenían los plásmidos pET30A+_UGTSL2 se descongelaron y se agregaron a 30 ml de medio LBGKP (20 g/l de caldo Luria Lennox; regulador PIPES 50 mM pH

7.00; regulador fosfato 50 mM pH 7.00; 2.5 g/l de glucosa y 50 mg/l de kanamicina). Este cultivo se dejó agitar a 135 rpm a 30°C durante 8 h.

5 El medio de producción contenía 60 g/l de Overnight Express Instant TB (Novagen), 10 g/l de glicerol y 50 mg/l de kanamicina. El precultivo se añadió a 200 ml de este medio y la solución se dejó agitar a 20°C mientras se tomaban muestras para medir la DO y el pH. El cultivo dio un crecimiento significativo y se obtuvo una buena DO. Después de 40 h, las células se recolectaron por centrifugación y se congelaron para obtener 6.22 g de peso húmedo celular.

10 La lisis se realizó en 1.4 g de células mediante la adición de la mezcla Bugbuster Master (Novagen) y el lisado se recuperó por centrifugación y se usó fresco.

Ejemplo 6

Reacción catalítica con UGT76G1 producido in vivo (fuera del alcance de la invención)

15 El volumen total de la reacción fue de 5.0 ml con la siguiente composición: regulador de fosfato de sodio 50 mM, pH 7.2, MgCl₂ 3 mM, UDP-glucosa 2.5 mM, esteviósido 0.5 mM y 500 µL de lisado descongelado UGT76G1. Las reacciones se realizaron a 30°C en un agitador orbital a 135 rpm. Para cada muestra, se enfriaron 460 µl de la mezcla de reacción con 40 µl de H₂SO₄ 2N y 420 µl de metanol/agua (6/4). Las muestras se centrifugaron
20 inmediatamente y se mantuvieron a 10°C antes del análisis por HPLC (CAD). La HPLC indicó una conversión casi completa de esteviósido en rebaudiósido A (Figura 4).

Ejemplo 7

25 Preparación y actividad de UGT76G1 preparado por el plásmido pET30a+ y la cepa de expresión BL21 (DE3) (fuera del alcance de la invención)

30 El plásmido pET30+_UGT76G1 se transformó en la cepa de expresión BL21 (DE3) (células electrocompetentes *E. Cloni*® EXPRESS). Las células obtenidas se cultivaron en medio de agar LB en placas de Petri en presencia de kanamicina. Se seleccionaron colonias adecuadas y se les permitió crecer en medio líquido LBGKP que contenía kanamicina. Se añadió glicerol y se almacenaron alícuotas de 400 µl a -20°C y a -80°C.

35 Se descongeló una alícuota de almacenamiento y se añadió a 30 ml de medio LBGKP. Este cultivo se dejó agitar a 30°C durante 8 h y posteriormente se usó para inocular 400 ml de medio de producción que contenía 60 g/l de "medio Overnight Express Instant TB" (Novagen, referencia 71491-5), 10 g/l de glicerol y 50 mg/l de kanamicina. Se dejó agitar el medio a 20°C mientras se tomaban muestras para medir la DO (600 nm) y el pH. Después de 40 h, las células se recolectaron por centrifugación y se congelaron. El peso húmedo celular obtenido fue de 10.58 g.

40 Se sometieron a lisis 3.24 g del sedimento obtenido mediante la adición de 8.1 ml de "mezcla Bugbuster Master" (Novagen, referencia 71456) y 3.5 ml de agua. El lisado se recuperó por centrifugación y se mantuvo congelado.

Ejemplo 8

45 Preparación y actividad de UGT76G1 preparado por el plásmido pET30a+ y la cepa de expresión Tuner (DE3) (fuera del alcance de la invención)

50 El plásmido pET30+_UGT76G1 se transformó en la cepa de expresión Tuner (DE3) (células competentes Novagen Tunertm (DE3)) mediante tratamiento de choque térmico. Las células obtenidas se cultivaron en medio de agar LB en placas de Petri en presencia de kanamicina. Se seleccionaron colonias adecuadas y se les permitió crecer en medio líquido LBGKP que contenía kanamicina). Se añadió glicerol y se almacenaron alícuotas de 400 µl a -20°C y a -80°C.

55 Se descongeló una alícuota de almacenamiento y se añadió a 100 ml de medio LB que contenía 50 mg/l de kanamicina. Este cultivo permitió agitar a 30°C durante 15 h. Se usaron 4.4 ml de este cultivo para inocular 200 ml de medio de producción que contenía LB. Este medio se dejó agitar a 37°C hasta que se obtuvo una DO (600 nm) de 0.9, después de lo cual se añadieron 400 µl de una solución de IPTG 100 mM y el medio se dejó agitar a 30°C durante 4 h. Las células fueron cosechadas por centrifugación y congeladas. El peso húmedo celular obtenido fue 1.38 g.

60 El sedimento obtenido se sometió a lisis mediante la adición de 4.9 ml de "mezcla Bugbuster Master" (Novagen, referencia 71456) y 2.1 ml de agua. El lisado se recuperó por centrifugación y se mantuvo congelado.

Ejemplo 9

65 Preparación y actividad de UGT76G1 preparada por plásmido pMAL y cepa de expresión BL21 (fuera del alcance de la invención)

Después de subclonar el gen UGT76G1 sintético en el plásmido pMAL usando sitios de clonación Nde1 y Sal1, el plásmido pMAL_UGT76G1 se transformó en la cepa de expresión BL21 (*E. coli* competente de New England Biolabs BL21 competente) mediante tratamiento con choque térmico. Las células obtenidas se cultivaron en medio de agar LB en placas de Petri en presencia de ampicilina. Se seleccionaron colonias adecuadas y se les permitió crecer en medio líquido LBGKP que contiene ampicilina. Se añadió glicerol y se almacenaron alícuotas de 400 µl a -20°C y a -80°C.

Se descongeló una alícuota de almacenamiento y se añadió a 30 ml de medio LBGKP. Este cultivo se dejó agitar a 30°C durante 8 h y posteriormente se usó para inocular 400 ml de medio de producción que contenía 60 g/l de "medio Overnight Express Instant TB" (Novagen, referencia 71491-5), 10 g/l de glicerol y 50 mg/l de ampicilina. El medio se dejó agitar a 20°C mientras se tomaban muestras para medir la DO y el pH. Después de 40 h, las células se recolectaron por centrifugación y se congelaron. El peso húmedo celular obtenido fue de 5.86 g.

Se sometieron a lisis 2.74 g del sedimento obtenido mediante la adición de 9.6 ml de "Bugbuster Master Mix" (Novagen, referencia 71456) y 4.1 ml de agua. El lisado se recuperó por centrifugación y se mantuvo congelado.

Ejemplo 10

Preparación y actividad de UGT76G1 preparada por plásmido pMAL y cepa de expresión ArcticExpress (fuera del alcance de la invención)

El plásmido pMAL_UGT76G1 se transformó en la cepa de expresión ArcticExpress (células competentes Agilent ArcticExpress) mediante tratamiento de choque térmico. Las células obtenidas se cultivaron en medio de agar LB en placas de Petri en presencia de ampicilina y geneticina. Se seleccionaron colonias adecuadas y se les permitió crecer en medio líquido LBGKP que contenía ampicilina y geneticina. Se añadió glicerol y se almacenaron alícuotas de 400 µL a -20°C y a -80°C.

Se descongeló una alícuota de almacenamiento y se añadió a 30 ml de medio LBGKP (que contenía ampicilina y geneticina). Este cultivo se dejó agitar a 30°C durante 8 h y posteriormente se usó para inocular 400 ml de medio de producción que contenía 60 g/l de "medio Overnight Express Instant TB" (Novagen, referencia 71491-5), 10 g/l de glicerol y 50 mg/l de ampicilina. El medio se dejó agitar a 12°C mientras se tomaban muestras para medir la DO (600 nm) y el pH. Después de 68 h, las células se recolectaron por centrifugación y se congelaron. El peso húmedo celular obtenido fue de 8.96 g.

Se sometieron a lisis 2.47 g del sedimento obtenido mediante la adición de 8.73 ml de "Mezcla Bugbuster Master" (Novagen, referencia 71456) y 3.79 ml de agua. El lisado se recuperó por centrifugación y se mantuvo congelado.

Ejemplo 11

Preparación y actividad de UGT76G1 preparada por el plásmido pCOLDIII y la cepa de expresión ArcticExpress (fuera del alcance de la invención)

Después de subclonar el gen sintético UGT76G1 en el plásmido pCOLDIII usando sitios de clonación Nde1 y Xho1, el plásmido pCOLDIII_UGT76G1 se transformó en la cepa de expresión ArcticExpress (células competentes Agilent ArcticExpress) mediante tratamiento de choque térmico. Las células obtenidas se cultivaron en medio de agar LB en placas de Petri en presencia de ampicilina y geneticina. Se seleccionaron colonias adecuadas y se les permitió crecer en medio líquido LBGKP que contenía ampicilina y geneticina. Se añadió glicerol y se almacenaron alícuotas de 400 µl a -20°C y a -80°C.

Se descongeló una alícuota de almacenamiento y se añadió a 30 ml de medio LBGKP (que contenía ampicilina y geneticina). Este cultivo se dejó agitar a 30°C durante 8 h y posteriormente se usó para inocular 400 ml de medio de producción que contenía 60 g/l de "medio Overnight Express Instant TB" (Novagen, referencia 71491-5), 10 g/l de glicerol y 50 mg/l de kanamicina. El medio se dejó agitar a 12°C mientras se tomaban muestras para medir la DO (600 nm) y el pH. Después de 63 h, las células se recolectaron por centrifugación y se congelaron. El peso húmedo celular obtenido fue de 6.54 g.

Se sometieron a lisis 2.81 g del sedimento obtenido mediante la adición de 9.8 ml de "Mezcla Bugbuster Master" (Novagen, referencia 71456) y 4.2 ml de agua. El lisado se recuperó por centrifugación y se mantuvo congelado.

Ejemplo 12

Preparación y actividad de UGT76G1 preparado por el plásmido pCOLDIII y la cepa de expresión Origami2 (DE3) (fuera del alcance de la invención)

El plásmido pCOLDIII_UGT76G1 se transformó en la cepa de expresión Origami2 (DE3) (células competentes Novagen Origami™ 2 (DE3)) mediante tratamiento de choque térmico. Las células obtenidas se cultivaron en medio de agar LB en placas de Petri en presencia de ampicilina. Se seleccionaron colonias adecuadas y se les permitió crecer en medio líquido LBGKP que contenía ampicilina. Se añadió glicerol y se almacenaron alícuotas de 400 µL a -20°C y -80°C.

Se descongeló una alícuota de almacenamiento y se añadió a 30 ml de medio LBGKP (que contenía ampicilina). Este cultivo se dejó agitar a 30°C durante 8 h y posteriormente se usó para inocular 400 ml de medio de producción que contenía 60 g/l de "medio Overnight Express Instant TB" (Novagen, referencia 71491-5), 10 g/l de glicerol y 50 mg/l de kanamicina. El medio se dejó agitar a 12°C mientras se tomaban muestras para medir la DO (600 nm) y el pH. Después de 68 h, las células se recolectaron por centrifugación y se congelaron. El peso húmedo celular obtenido fue de 2.53 g.

Se sometieron a lisis 1.71 g del sedimento obtenido mediante la adición de 6.0 ml de "mezcla Bugbuster Master" (Novagen, referencia 71456) y 1.9 ml de agua. El lisado se recuperó por centrifugación y se mantuvo congelado.

Ejemplo 13

Preparación de UGT91D2 usando plásmido pMAL y cepa de expresión BL21 (fuera del alcance de la invención)

Después de subclonar el gen UGT91D2 sintético en el plásmido pMAL usando sitios de clonación Nde1 y Sal1, el plásmido pMAL_UGT91D2 se transformó en la cepa de expresión BL21 (*E. coli* de New England Biolabs BL21 Competente) mediante tratamiento con choque térmico. Las células obtenidas se cultivaron en medio de agar LB en placas de Petri en presencia de ampicilina. Se seleccionaron colonias adecuadas y se les permitió crecer en medio líquido LBGKP que contiene ampicilina). Se añadió glicerol y se almacenaron alícuotas de 400 µL a -20°C y a -80°C.

Se descongeló una alícuota de almacenamiento y se añadió a 30 ml de medio LBGKP. Este cultivo se dejó agitar a 30°C durante 8 h y posteriormente se usó para inocular 400 ml de medio de producción que contenía 60 g/l de "medio Overnight Express Instant TB" (Novagen, referencia 71491-5), 10 g/l de glicerol y 50 mg/l de Ampicilina. El medio se dejó agitar a 20°C mientras se tomaban muestras para medir la DO y el pH. Después de 40 h, las células se recolectaron por centrifugación y se congelaron. El peso húmedo celular obtenido es 12.32 g.

Se sometieron a lisis 2.18 g del sedimento obtenido mediante la adición de 7.7 ml de "Mezcla Bugbuster Master" (Novagen, referencia 71456) y 3.2 ml de agua. El lisado se recuperó por centrifugación y se usó directamente para la prueba de actividad.

Ejemplo 14

Preparación de UGT91D2 usando plásmido pMAL y cepa de expresión ArcticExpress (fuera del alcance de la invención)

El plásmido pMAL_UGT91D2 se transformó en la cepa de expresión ArcticExpress (células competentes Agilent ArcticExpress) mediante tratamiento de choque térmico. Las células obtenidas se cultivaron en medio de agar LB en placas de Petri en presencia de ampicilina y geneticina. Se seleccionaron colonias adecuadas y se les permitió crecer en medio líquido LBGKP que contenía ampicilina y geneticina. Se añadió glicerol y se almacenaron alícuotas de 400 µl a -20°C y a -80°C.

Se descongeló una alícuota de almacenamiento y se añadió a 30 ml de medio LBGKP (que contenía ampicilina y geneticina). Este cultivo se dejó agitar a 30°C durante 8 h y posteriormente se usó para inocular 400 ml de medio de producción que contenía 60 g/l de "medio Overnight Express Instant TB" (Novagen, referencia 71491-5), 10 g/l de glicerol y 50 mg/l de Ampicilina. Se dejó agitar el medio a 20°C durante 16 h seguido de otras 50 h a 12°C mientras se toman muestras para medir la DO (600 nm) y el pH. Las células fueron cosechadas por centrifugación y congeladas. El peso húmedo celular obtenido es 15.77 g.

Se sometieron a lisis 2.57 g del sedimento obtenido mediante la adición de 9.0 ml de "Mezcla Bugbuster Master" (Novagen, referencia 71456) y 3.8 ml de agua. El lisado se recuperó por centrifugación y se usó directamente para la prueba de actividad.

Ejemplo 15

Preparación de UGT91D2 usando el plásmido pET30a+ y la cepa de expresión Tuner (DE3) (fuera del alcance de la invención)

El plásmido pET30a+_UGT91D2 se transformó en la cepa de expresión Tuner (DE3) (células competentes Novagen Tuner™ (DE3)) mediante tratamiento de choque térmico. Las células obtenidas se cultivaron en medio de agar LB en placas de Petri en presencia de kanamicina. Se seleccionaron colonias adecuadas y se dejaron crecer en medio

Líquido LBGKP (que contenía kanamicina). Se añadió glicerol y se almacenaron alícuotas de 400 µL a -20°C y a -80°C.

5 Se descongeló una alícuota de almacenamiento y se añadió a 100 ml de medio LB que contenía 50 mg/l de kanamicina. Este cultivo permitió agitar a 30°C durante 15 h. Se usaron 6.2 ml de este cultivo para inocular 500 ml de medio de producción que contenía LB. Este medio se dejó agitar a 37°C hasta que se obtuvo una DO (600 nm) de 0.9, después de lo cual se agregaron 500 µL de una solución de IPTG 100 mM (la concentración de IPTG en el medio es 100 µM) y el medio se dejó agitar a 30°C durante 4 h, las células fueron cosechadas por centrifugación y congeladas. El peso húmedo celular obtenido es de 4.02 g.

10 Se sometieron a lisis 1.92 g del sedimento obtenido mediante la adición de 6.8 ml de "mezcla Bugbuster Master" (Novagen, referencia 71456) y 2.8 ml de agua. El lisado se recuperó por centrifugación y se probó directamente por actividad.

15 Ejemplo 16

Preparación de UGT91D2 usando el plásmido pET30a+ y la cepa de expresión ArcticExpress (fuera del alcance de la invención)

20 El plásmido pET30a+ _UGT91D2 se transformó en la cepa de expresión ArcticExpress (DE3) (células competentes Agilent ArcticExpress) mediante tratamiento de choque térmico. Las células obtenidas se cultivaron en medio de agar LB en placas de Petri en presencia de kanamicina y geneticina. Se seleccionaron colonias adecuadas y se les permitió crecer en medio líquido LBGKP que contenía kanamicina y geneticina. Se añadió glicerol y se almacenaron alícuotas de 400 µL a -20°C y a -80°C.

25 Se descongeló una alícuota de almacenamiento y se añadió a 30 ml de medio LBGKP (que contenía kanamicina y geneticina). Este cultivo se dejó agitar a 30°C durante 8 h y posteriormente se usó para inocular 400 ml de medio de producción que contenía 60 g/l de "medio Overnight Express Instant TB" (Novagen, referencia 71491-5), 10 g/l de glicerol y 50 mg/l de Ampicilina. Se dejó agitar el medio a 20°C durante 16 h seguido de otras 50 h a 12°C mientras se toman muestras para medir la DO (600 nm) y el pH. Después de 60 h, las células se recolectaron por centrifugación y se congelaron. El peso húmedo celular obtenido es 16.07 g.

30 Se sometieron a lisis 3.24 g del sedimento obtenido mediante la adición de 11.4 ml de "Mezcla Bugbuster Master" (Novagen, referencia 71456) y 4.8 ml de agua. El lisado se recuperó por centrifugación y se usó directamente para la prueba de actividad.

35 Ejemplo 17

Determinación de la actividad de preparaciones in vivo de UGT91D2 (fuera del alcance de la invención)

40 Se realizaron pruebas de actividad a escala de 5 ml con 1000 µl de lisado para la transformación de Rubusósido a Estevióside usando 0.5 mM de sustrato, 2.5 mM de UDP-Glucosa y MgCl₂ 3 mM en regulador de fosfato de sodio 50 mM a pH 7.2. Las muestras fueron tomadas y analizadas por HPLC. Los resultados para las diferentes preparaciones de UGT91D2 se resumen en la siguiente tabla.

45

Plásmido	Cepa de expresión	Actividad de transformación*
		Rubusósido a Estevióside
pMAL	BL21	9 mU mL ⁻¹
pMAL	ArcticExpress	60 mU mL ⁻¹
pET30a+	Tuner (DE3)	28 mU mL ⁻¹
pET30a+	ArcticExpress (DE3)	21 mU mL ⁻¹

*Nota: Las actividades se mencionan por ml de lisado. 1 U transformará 1 µmol de sustrato en 1 hora a 30°C y pH 7.2

Ejemplo 18

50 Evolución dirigida de UGT76G1 para la conversión de Rebaudiósido D en Rebaudiósido M (fuera del alcance de la invención)

A partir de la secuencia de aminoácidos de UGT76G1, como se describe en Genbank (AAR06912.1), se identificaron diferentes mutaciones en varias posiciones de aminoácidos que podrían alterar la actividad de la

ES 2 805 014 T3

- 5 enzima para la transformación del rebaudiósido D (Reb D) al rebaudiósido M (Reb M). Esta lista de mutaciones, diseñada por la estrategia DNA2.0 ProteinGPS™, se usó posteriormente para sintetizar 96 genes variantes que contenían 3, 4 o 5 de estas mutaciones que fueron optimizadas con codón para la expresión en *E. coli*. Los genes se subclonaron en el plásmido pET30a+ y se usaron para la transformación de células *E. coli* BL21 (DE3) químicamente competentes. Las células obtenidas se cultivaron en placas de Petri en medio LB sólido en presencia de kanamicina. Se seleccionaron colonias adecuadas y se dejaron crecer en medio LB líquido en tubos. Se añadió glicerol a la suspensión como crioprotector y se almacenaron alícuotas de 400 µL a -20°C y a -80°C.
- 10 Estas alícuotas de almacenamiento de *E. coli* BL21 (DE3) que contenían los plásmidos pET30a+_UGT76G1var se descongelaron y se añadieron al medio LBGKP (20 g/l Luria Broth Lennox; regulador PIPES 50 mM pH 7.00; regulador fosfato 50 mM pH 7.00; 2.5 g/l de glucosa y 50 mg/l de kanamicina). Este cultivo se dejó agitar en una placa de 96 microtitulación a 135 rpm a 30°C durante 8 h.
- 15 Se inocularon 3.95 ml de medio de producción que contenía 60 g/l de medio Overnight Express™ Instant TB (Novagen®), 10 g/l de glicerol y 50 mg/l de kanamicina con 50 µl del cultivo descrito anteriormente. En una placa de 48 pozos, el cultivo resultante se dejó agitar a 20°C. Los cultivos dieron un crecimiento significativo y se obtuvo una buena DO (600 nm; 1 cm). Después de 44 h, las células se recolectaron por centrifugación y se congelaron.
- 20 La lisis se realizó mediante la adición de la mezcla Bugbuster Master® (Novagen®) a las células descongeladas y el lisado se recuperó por centrifugación. Se realizaron pruebas de actividad con 100 µl de lisado fresco que se agregó a una solución de Rebaudiósido D (concentración final 0.5 mM), MgCl₂ (concentración final 3 mM) y UDP-Glucosa (concentración final 2.5 mM) en regulador fosfato 50 mM pH 7.2.
- 25 La reacción se dejó correr a 30°C y se tomaron muestras después de 2, 4, 7 y 24 h. para determinar la conversión y la tasa inicial por HPLC (detección CAD) utilizando el método analítico que se describió anteriormente para la transformación de Rebaudiósido D en Rebaudiósido M. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Clon	Mutaciones*	Conversión Reb D a Reb M después de 24 h (%)	Tasa inicial (Reb M área/min)
UGT76G1var1	E224A_F314S_R334K	51.8	5.5E+07
UGT76G1var2	S274G_T284I_L379G	49.3	4.7E+07
UGT76G1var3	I295T_S357C_V366I	9.6	1.6E+06
UGT76G1var4	E224D_E231A_F265I	14.7	8.6E+06
UGT76G1var5	F22Y_I373L_P382M	3.5	2.3E+06
UGT76G1var6	Q266S_S357N_I373L	0.5	1.8E+06
UGT76G1var7	F22L_I43V_A239V	0.2	-6.0E+04
UGT76G1var8	E224A_Q266S_Q342E	0.5	2.3E+04
UGT76G1var9	E231A_D301N_G348P	52.0	4.9E+07
UGT76G1var10	A33G_L246F_Q342E	0.3	-7.7E+02
UGT76G1var11	F22L_A33G_V310I	0.4	3.8E+04
UGT76G1var12	L243P_K303G_A352G	0.5	8.7E+04
UGT76G1var13	L243A_S357C_A385T	0.2	-3.3E+04
UGT76G1var14	A239I_F265I_V396F	5.3	1.5E+06
UGT76G1var15	F41L_L246F_Q425E	5.6	1.5E+06
UGT76G1var16	F265I_P272A_I335V	18.6	5.8E+06
UGT76G1var17	F265L_Q266E_Q342K	0.7	7.2E+05
UGT76G1var18	L243P_S274G_N409R	1.9	5.0E+05
UGT76G1var19	E224D_E229A_Q432E	10.5	5.5E+06
UGT76G1var20	S375M_K393G_Y397E	1.8	1.9E+06

ES 2 805 014 T3

(continuación)

Clon	Mutaciones*	Conversión Reb D a Reb M después de 24 h (%)	Tasa inicial (Reb M área/min)
UGT76G1var21	A239V_V300A_K303G	41.9	3.3E+07
UGT76G1var22	E231A_V310I_R334K	34.4	2.4E+07
UGT76G1var23	T263S_G348P_A352G	47.8	4.1E+07
UGT76G1var24	A239I_P272A_Q425E	31.0	2.1E+07
UGT76G1var25	T284L_Q342K_Y397Q	0.9	6.3E+04
UGT76G1var26	S241I_F265L_F377C	1.8	7.5E+05
UGT76G1var27	A239I_L379A_V394I	29.0	1.5E+07
UGT76G1var28	L243A_S274G_P382M	6.1	2.4E+06
UGT76G1var29	F22Y_V279I_N409R	41.0	2.9E+07
UGT76G1var30	I43V_E224A_S241I	13.6	5.6E+06
UGT76G1var31	E224D_L243P_V300A	0.4	2.4E+05
UGT76G1var32	A239V_L243A_S375M	0.0	-4.4E+04
UGT76G1var33	A33G_R334H_Y397Q	1.0	7.5E+06
UGT76G1var34	I43V_T284I_I295T	3.4	1.5E+06
UGT76G1var35	T284L_F314S_S357N	0.5	1.8E+05
UGT76G1var36	F265L_L379A_V396F	20.0	8.8E+06
UGT76G1var37	E229A_L379G_I407V	39.1	2.8E+07
UGT76G1var38	F41L_I295M_F377C	8.2	3.7E+06
UGT76G1var39	F22Y_F41L_V366I	7.2	3.3E+06
UGT76G1var40	T263S_Q266E_S375R	47.6	3.3E+07
UGT76G1var41	L246F_A385T_K393G	0.8	1.4E+06
UGT76G1var42	T263S_Q266S_R334H	34.6	2.2E+07
UGT76G1var43	S241I_P272A_V279I	19.9	9.4E+06
UGT76G1var44	I335V_S375R_I407V	35.3	2.3E+07
UGT76G1var45	V279I_D301N_S389E	38.6	2.3E+07
UGT76G1var46	F22L_Q266E_I295M	0.6	9.8E+05
UGT76G1var47	E229A_T284I_S389E	4.8	2.7E+06
UGT76G1var48	V394I_Y397E_Q432E	47.6	3.8E+07
UGT76G1var49	F41L_Q266E_T284I_Y397Q	2.6	1.1E+06
UGT76G1var50	F22Y_V310I_S375M_F377C	1.9	7.9E+05
UGT76G1var51	K303G_S357C_S389E_V396F	18.7	9.5E+06
UGT76G1var52	D301N_I373L_F377C_I407V	12.9	4.6E+06
UGT76G1var53	R334K_A352G_P382M_S389E	9.3	4.1E+06
UGT76G1var54	E229A_T284L_R334K_Q342E	0.7	4.3E+05
UGT76G1var55	I295M_Q342E_V366I_N409R	1.0	2.2E+05

ES 2 805 014 T3

(continuación)

Clon	Mutaciones*	Conversión Reb D a Reb M después de 24 h (%)	Tasa inicial (Reb M área/min)
UGT76G1var56	L246F_A352G_S357N_Q432E	0.4	4.1E+04
UGT76G1var57	S241I_T263S_L379G_A385T	0.8	1.5E+05
UGT76G1var58	S357C_S375M_N409R_Q425E	7.5	2.2E+06
UGT76G1var59	I335V_K393G_V394I_Y397Q	33.0	2.7E+07
UGT76G1var60	E231A_L243A_V279I_S357N	0.5	9.5E+04
UGT76G1var61	I43V_F265I_Q266S_L379A	6.4	2.0E+06
UGT76G1var62	L243P_P272A_V394I_V396F	0.1	3.4E+04
UGT76G1var63	F314S_R334H_Q342K_L379G	3.4	1.2E+06
UGT76G1var64	F22L_A239I_R334H_I407V	0.3	3.1E+04
UGT76G1var65	A33G_A239V_P382M_Q425E	1.2	3.3E+05
UGT76G1var66	F265L_V310I_V366I_A385T	0.8	3.7E+05
UGT76G1var67	E224D_F314S_S375R_Y397E	-2.1	-5.6E+05
UGT76G1var68	Q342K_G348P_I373L_Y397E	-1.4	-1.1E+05
UGT76G1var69	S274G_I295T_I335V_L379A	24.7	8.3E+06
UGT76G1var70	E224A_I295T_V300A_G348P	24.0	8.4E+06
UGT76G1var71	I295M_V300A_K393G_Q432E	42.9	2.1E+07
UGT76G1var72	T284L_D301N_K303G_S375R	19.2	9.1E+06
UGT76G1var73	F22Y_D301N_R334H_Q342E_V396F	0.8	8.7E+05
UGT76G1var74	I295T_I373L_S375R_Y397Q_Q432E	0.6	9.6E+04
UGT76G1var75	F41L_A239I_Q266S_S375M_P382M	0.8	-1.3E+05
UGT76G1var76	F22Y_A239I_L246F_I295M_R334K	2.6	7.2E+05
UGT76G1var77	A239V_F265I_I295T_D301N_K393G	1.9	4.4E+05
UGT76G1var78	V279I_V300A_V310I_I335V_S357C	3.2	8.2E+05
UGT76G1var79	E224D_T284I_V366I_I373L_K393G	8.5	3.8E+06
UGT76G1var80	L243P_L379A_S389E_Q425E_Q432E	1.0	2.1E+05
UGT76G1var81	A33G_T263S_S274G_V279I_Y397E	15.0	6.5E+06
UGT76G1var82	E224D_L243A_F265L_R334H_A352G	1.1	2.5E+05
UGT76G1var83	I43V_Q342E_S357N_S375R_L379G	0.5	4.3E+04
UGT76G1var84	F22L_Q266S_F314S_A352G_S357C	1.2	2.3E+05
UGT76G1var85	T284L_G348P_F377C_P382M_N409R	1.8	4.0E+05
UGT76G1var86	E224A_T284L_V396F_Y397E_I407V	1.6	3.8E+05
UGT76G1var87	S241I_L243A_V300A_F314S_N409R	35.7	2.1E+07
UGT76G1var88	A239V_T284I_V310I_Q342K_L379A	1.6	3.8E+05
UGT76G1var89	F41L_E229A_E231A_F265L_P272A	1.2	2.1E+05
UGT76G1var90	E231A_S241I_S274G_Y397Q_Q425E	34.5	1.9E+07

(continuación)

Clon	Mutaciones*	Conversión Reb D a Reb M después de 24 h (%)	Tasa inicial (Reb M área/min)
UGT76G1var91	E224A_L246F_T263S_F265I_Q342K	1.2	2.3E+05
UGT76G1var92	K303G_S357N_V366I_V394I_I407V	1.6	3.6E+05
UGT76G1var93	I43V_Q266E_S375M_S389E_V394I	1.8	4.5E+05
UGT76G1var94	Q266E_P272A_R334K_G348P_L379G	72.0	7.9E+07
UGT76G1var95	A33G_I295M_K303G_I335V_A385T	-1.3	-1.7E+05
UGT76G1var96	F22L_E229A_L243P_F377C_A385T	1.2	2.7E+05

*Las mutaciones se indican de la siguiente manera: aminoácido original-posición-aminoácido nuevo: Por ejemplo, la mutación de una alanina en la posición 33 a una glicina se observa como A33G.

Ejemplo 19

5 Producción in vivo de UGT76G1 en *S. cerevisiae* (fuera del alcance de la invención)UGT76G1 [*Stevia rebaudiana*] (gi_37993653/gb_AAR06912.1)

MENKTETTVRRRRRIILFPVPFQGHINPILQLANVLYSKGFSITIFHTNFNPKPKTSNY
PHFTFRFILDNDPQDERISNLPTHGPLAGMRIPINEHGADLRRELELLMLASEEDE
EVSCLITDALWYFAQSVADSLNLRRLVLMTSSLFNFHAHVSLPQFDELGYLDPDD
KTRLEEQASGFPMLKVVDIKSAYSNWQILKEILGKMIKQTKASSGVIWNSFKELEE
SELETVIREIPAPSFLIPLPKHLTASSSSLLDHDRTVFQWLDQQPPSSVLYVSFGSTS
EVDEKDFLEIARGLVDSKQSFLWVVRPGFVKGSTWVEPLPDGFLGERGRIVKWVWP
QQEVLAHGAIGAFWTHSGWNSTLESVCEGVPMIFSDFGLDQPLNARYMSDVLKV
GVYLENGWERGEIANAIRRMVDEEGEYIRQNARVLKQKADVSLMKGGSSYESL
ESLVSYISSL.

10 La secuencia de aminoácidos mencionada anteriormente fue un codón optimizado para la expresión en *S. cerevisiae*. Además, la secuencia consenso de levadura AACACA se añadió antes del codón de inicio ATG. El gen sintético se subclonó en el vector pYES2 usando sitios de restricción Hind III y Xba I. El vector pYES2_UGT76G1_Sc se usó para transformar células INVSc1 de *S. cerevisiae* químicamente competentes (Invitrogen).

15 Las células se cultivaron en un medio mínimo sintético sólido que contenía glucosa al 2 % que carecía de uracilo y se recogió una colonia única y se dejó crecer en medio líquido sintético mínimo que carecía de uracilo (SC-U que contenía glucosa al 2 %). Después de la centrifugación, las células se suspendieron con SC-U (que contenía 2 % de glucosa) y 60 % de glicerol/agua. Las alícuotas se almacenaron a -80°C y se usó una alícuota para comenzar un cultivo en SC-U (que contenía 2 % de glucosa) durante 43 h a 30°C. Parte de este cultivo se centrifugó y se suspendió en medio de inducción (SC-U que contiene 2 % de galactosa) durante 19h30 a 30°C.

20 Las células se obtuvieron por centrifugación y lisis con cinco volúmenes de reactivo de lisis celular CelLytic™ Y (Sigma). Los lisados se usaron directamente para las pruebas de actividad (UGT76G1_Sc).

Ejemplo 20

25 Evolución dirigida de UGT76G1 para la conversión de rebaudiósido D a rebaudiósido M (round 2) (fuera del alcance de la invención)

30 El clon más activo de la primera round de evolución dirigida de UGT76G1 (véase EJEMPLO 18 UGT76G1var94 que contiene mutaciones: Q266E_P272A_R334K_G348P_L379G) fue elegido como clon de referencia para la round 2. Se estableció una lista de 53 mutaciones que contenían diferentes mutaciones positivas identificadas de la primera mutaciones redondas y nuevas obtenidas por la estrategia DNA2.0 ProteinGPStm. Esta lista de mutaciones se utilizó posteriormente para diseñar 92 genes variantes que contenían cada uno 3 mutaciones diferentes. Después de la

35

ES 2 805 014 T3

5 codificación optimizada para la expresión en *E. coli*, los genes se sintetizaron, se subclonaron en el plásmido pET30a+ y se usaron para la transformación de células *E. coli* BL21 químicamente competentes (DE3). Las células obtenidas se cultivaron en placas de Petri en medio LB sólido en presencia de kanamicina. Se seleccionaron colonias adecuadas y se dejaron crecer en medio LB líquido en tubos. Se añadió glicerol a la suspensión como crioprotector y se almacenaron alícuotas de 400 µL a -20°C y a -80°C.

10 Estas alícuotas de almacenamiento de *E. coli* BL21 (DE3) que contenían los plásmidos pET30a+_UGT76G1var se descongelaron y se añadieron al medio LBGKP (20 g/l de caldo Luria Broth Lennox; regulador PIPES 50 mM pH 7.00; regulador fosfato 50 mM pH 7.00; 2.5 g/l de glucosa y 50 mg/l de kanamicina). Este cultivo se dejó agitar en una placa de 96 microtitulación a 30°C durante 8 h.

15 Se inocularon 3.95 ml de medio de producción que contenía 60 g/l de medio TB instantáneo Overnight Express™ (Novagen®), 10 g/l de glicerol y 50 mg/l de kanamicina con 50 µl del cultivo descrito anteriormente. En una placa de 48 pozos, el cultivo resultante se dejó agitar a 20°C. Los cultivos dieron un crecimiento significativo y se obtuvo una buena DO (600 nm). Después de 44 h, las células se recolectaron por centrifugación y se congelaron.

20 La lisis se realizó mediante la adición de la mezcla Bugbuster® Master (Novagen®) a las células descongeladas y el lisado se recuperó por centrifugación. Se realizaron pruebas de actividad con 100 µl de lisado fresco que se agregó a una solución de Rebaudiósido D (concentración final 0.5 mM), MgCl₂ (concentración final 3 mM) y UDP-Glucosa (concentración final 2.5 mM) en regulador fosfato 50 mM pH 7.2.

25 La reacción se dejó correr a 30°C y se tomaron muestras después de 2, 4, 7 y 24 h para determinar la conversión y la tasa inicial por HPLC (detección CAD) usando el método analítico que se describió anteriormente para la transformación de Rebaudiósido D en Rebaudiósido M. En paralelo, los experimentos se realizaron con el clon de referencia, Round1-Var94. La conversión después de las 22 h y la tasa inicial para este clon de referencia se definió como 100 % y las conversiones normalizadas y las tasas iniciales para los clones de la round 2 se muestran en la siguiente tabla:

Clon	Mutaciones*	Conversión normalizada Reb D a Reb M después de 22h.	Tasa inicial normalizada (0-4h)
Round1-Var94	UGT76G1 (Q266E_P272A_R334K_G348P_L379G) clon de referencia	100 %	100 %
Round2-Var1	Round1-Var94 (A213N_P348G_I411V)	70 %	86 %
Round2-Var2	Round1-Var94 (K303G_I423M_Q425E)	120 %	134 %
Round2-Var3	Round1-Var94 (V20L_N138K_S147G)	14 %	15 %
Round2-Var4	Round1-Var94 (I16V_V133A_L299I)	37 %	43 %
Round2-Var5	Round1-Var94 (S241V_S274G_Q432E)	75 %	72 %
Round2-Var6	Round1-Var94 (I16V_L139V_I218V)	62 %	68 %
Round2-Var7	Round1-Var94 (K334R_N409K_Q432E)	104 %	92 %
Round2-Var8	Round1-Var94 (I15L_R141T_I407V)	17 %	26 %
Round2-Var9	Round1-Var94 (R141T_K303G_G379L)	31 %	42 %
Round2-Var10	Round1-Var94 (I190L_K303G_P348G)	131 %	149 %
Round2-Var11	Round1-Var94 (E266Q_F314S_N409R)	106 %	132 %

ES 2 805 014 T3

(continuación)

Clon	Mutaciones*	Conversión normalizada Reb D a Reb M después de 22h.	Tasa inicial normalizada (0-4h)
Round2-Var12	Round1-Var94 (V133A_I295V_K303G)	43 %	49 %
Round2-Var13	Round1-Var94 (I16V_S241V_N409R)	80 %	79 %
Round2-Var14	Round1-Var94 (A239V_K334R_G379L)	58 %	55 %
Round2-Var15	Round1-Var94 (I190L_K393R_V396L)	118 %	126 %
Round2-Var16	Round1-Var94 (L101F_I295M_K393R)	84 %	89 %
Round2-Var17	Round1-Var94 (A239V_E266Q_Q425E)	96 %	101 %
Round2-Var18	Round1-Var94 (V20L_I190L_I423M)	98 %	98 %
Round2-Var19	Round1-Var94 (V20L_G379L_S456L)	84 %	81 %
Round2-Var20	Round1-Var94 (K334R_P348G_N409R)	73 %	73 %
Round2-Var21	Round1-Var94 (E231A_S241V_E449D)	53 %	50 %
Round2-Var22	Round1-Var94 (K188R_L299I_V394I)	56 %	59 %
Round2-Var23	Round1-Var94 (E231A_S274G_V394I)	110 %	124 %
Round2-Var24	Round1-Var94 (S42A_I295V_Q432E)	71 %	78 %
Round2-Var25	Round1-Var94 (A213N_A272P_K334R)	95 %	80 %
Round2-Var26	Round1-Var94 (L158Y_S274K_N409K)	80 %	50 %
Round2-Var27	Round1-Var94 (K188R_I295M_Q425E)	132 %	116 %
Round2-Var28	Round1-Var94 (I15L_I295M_V394I)	53 %	36 %
Round2-Var29	Round1-Var94 (V133A_A239V_V394I)	47 %	30 %
Round2-Var30	Round1-Var94 (L158Y_F314S_K316R)	107 %	72 %
Round2-Var31	Round1-Var94 (L158Y_A239V_A272P)	54 %	30 %
Round2-Var32	Round1-Var94 (F46I_D301N_V396L)	109 %	101 %
Round2-Var33	Round1-Var94 (L101F_I218V_Q432E)	78 %	54 %

ES 2 805 014 T3

(continuación)

Clon	Mutaciones*	Conversión normalizada Reb D a Reb M después de 22h.	Tasa inicial normalizada (0-4h)
Round2-Var34	Round1-Var94 (I16V_F46I_I295M)	110 %	95 %
Round2-Var35	Round1-Var94 (A213N_E266S_I407V)	98 %	79 %
Round2-Var36	Round1-Var94 (A239V_S274K_I295M)	102 %	89 %
Round2-Var37	Round1-Var94 (A239V_F314S_S450K)	105 %	99 %
Round2-Var38	Round1-Var94 (L139V_K188R_D301N)	66 %	51 %
Round2-Var39	Round1-Var94 (I45V_I218V_S274K)	87 %	58 %
Round2-Var40	Round1-Var94 (S241V_K303G_V394I)	78 %	57 %
Round2-Var41	Round1-Var94 (R141T_S274G_K334R)	41 %	28 %
Round2-Var42	Round1-Var94 (V217L_S274G_L299I)	47 %	34 %
Round2-Var43	Round1-Var94 (S274G_D301N_P348G)	98 %	91 %
Round2-Var44	Round1-Var94 (E231A_N409R_S450K)	87 %	65 %
Round2-Var45	Round1-Var94 (R64H_E231A_K316R)	88 %	64 %
Round2-Var46	Round1-Var94 (V394I_N409K_I411V)	110 %	100 %
Round2-Var47	Round1-Var94 (I45V_I295M_K303G)	113 %	88 %
Round2-Var48	Round1-Var94 (L101F_V396L_L398V)	46 %	43 %
Round2-Var49	Round1-Var94 (N27S_L101F_S447A)	54 %	37 %
Round2-Var50	Round1-Var94 (S274G_F314S_L398V)	129 %	156 %
Round2-Var51	Round1-Var94 (E266Q_L299I_K393R)	70 %	51 %
Round2-Var52	Round1-Var94 (V217L_E266S_V394I)	62 %	48 %
Round2-Var53	Round1-Var94 (N138K_A272P_N409R)	118 %	102 %
Round2-Var54	Round1-Var94 (E266S_F314S_Q432E)	124 %	146 %
Round2-Var55	Round1-Var94 (D301N_G379L_L398V)	56 %	45 %

ES 2 805 014 T3

(continuación)

Clon	Mutaciones*	Conversión normalizada Reb D a Reb M después de 22h.	Tasa inicial normalizada (0-4h)
Round2-Var56	Round1-Var94 (F46I_E266S_K334R)	123 %	142 %
Round2-Var57	Round1-Var94 (A272P_V394I_Q432E)	133 %	142 %
Round2-Var58	Round1-Var94 (V394I_I407V_S456L)	118 %	114 %
Round2-Var59	Round1-Var94 (I218V_E266Q_I423M)	106 %	98 %
Round2-Var60	Round1-Var94 (A272P_G379L_I407V)	80 %	63 %
Round2-Var61	Round1-Var94 (E231A_K303G_S456L)	113 %	110 %
Round2-Var62	Round1-Var94 (I190L_E266Q_I407V)	150 %	167 %
Round2-Var63	Round1-Var94 (N27S_L139V_I295V)	43 %	25 %
Round2-Var64	Round1-Var94 (V217L_I423M_S447A)	67 %	51 %
Round2-Var65	Round1-Var94 (L158Y_E266S_E449D)	68 %	43 %
Round2-Var66	Round1-Var94 (S42A_F46I_I407V)	160 %	203 %
Round2-Var67	Round1-Var94 (N138K_E231A_D301N)	118 %	93 %
Round2-Var68	Round1-Var94 (K188R_G379L_N409R)	52 %	35 %
Round2-Var69	Round1-Var94 (I15L_E231A_V396L)	38 %	22 %
Round2-Var70	Round1-Var94 (E231A_Q425E_Q432E)	115 %	119 %
Round2-Var71	Round1-Var94 (D301N_K316R_Q425E)	126 %	121 %
Round2-Var72	Round1-Var94 (L139V_I295M_F314S)	76 %	91 %
Round2-Var73	Round1-Var94 (S147G_E266S_D301N)	30 %	18 %
Round2-Var74	Round1-Var94 (R64H_S147G_S447A)	23 %	12 %
Round2-Var75	Round1-Var94 (S42A_K303G_L398V)	95 %	110 %
Round2-Var76	Round1-Var94 (I45V_D301N_E449D)	62 %	60 %
Round2-Var77	Round1-Var94 (V133A_E266S_I411V)	37 %	28 %

(continuación)

Clon	Mutaciones*	Conversión normalizada Reb D a Reb M después de 22h.	Tasa inicial normalizada (0-4h)
Round2-Var78	Round1-Var94 (I45V_N409R_Q425E)	63 %	59 %
Round2-Var79	Round1-Var94 (R141T_A272P_F314S)	23 %	10 %
Round2-Var80	Round1-Var94 (E266S_S274G_N409R)	81 %	91 %
Round2-Var81	Round1-Var94 (N409K_Q425E_S450K)	81 %	84 %
Round2-Var82	Round1-Var94 (N27S_R64H_K393R)	47 %	37 %
Round2-Var83	Round1-Var94 (S42A_A213N_V217L)	62 %	46 %
Round2-Var84	Round1-Var94 (N27S_S274K_I407V)	49 %	44 %
Round2-Var85	Round1-Var94 (I411V_Q425E_S456L)	75 %	81 %
Round2-Var86	Round1-Var94 (A239V_K316R_E449D)	83 %	72 %
Round2-Var87	Round1-Var94 (S147G_A239V_P348G)	18 %	7 %
Round2-Var88	Round1-Var94 (V20L_S274G_S450K)	71 %	68 %
Round2-Var89	Round1-Var94 (F314S_V394I_S447A)	88 %	123 %
Round2-Var90	Round1-Var94 (R64H_E266Q_I295M)	45 %	47 %
Round2-Var91	Round1-Var94 (N138K_I295V_I407V)	50 %	51 %
Round2-Var92	Round1-Var94 (I15L_P348G_Q432E)	18 %	13 %

*Las mutaciones se anotan de la siguiente manera: gen de referencia-aminoácido original-posición-aminoácido nuevo: por ejemplo, la mutación de una alanina en la posición 33 a una glicina para la variante 94 de la primera round de evolución dirigida de UGT76G1 se observa como Round1-Var94 (A33G)

5 El modelado de estos resultados permitió obtener una clasificación del efecto de cada mutación. Se determinó que las siguientes mutaciones son beneficiosas para la actividad: S42A, F46I, I190L, S274G, I295M, K303G, F314S, K316R, K393R, V394I, I407V, N409K, N409R, Q425E, Q432E, S447A, S456L.

Ejemplo 21

10 Evolución dirigida de UGT76G1 para la conversión de Rebaudiósido D a Rebaudiósido X (Round 3) (fuera del alcance de la invención)

15 El clon más activo de la segunda round de evolución dirigida de UGT76G1 (véase Ejemplo 20 round2_UGT76G1var66 que contiene mutaciones: S42A_F46I_I407V) fue elegido como clon de referencia para una tercera round de evolución dirigida. Se estableció una lista de 56 mutaciones que contenían diferentes mutaciones positivas identificadas de la segunda round y 30 mutaciones nuevas obtenidas por la estrategia DNA2.0 ProteinGPStm. Esta lista de mutaciones se utilizó posteriormente para diseñar 92 genes variantes que contenían cada 3 o 4 mutaciones diferentes. Después de la codificación optimizada para la expresión en *E. coli*, los genes se sintetizaron, se subclonaron en el plásmido pET30a+ y se usaron para la transformación de células químicamente

ES 2 805 014 T3

competentes *E. coli* BL21 (DE3). Las células obtenidas se cultivaron en placas de Petri en medio LB sólido en presencia de kanamicina. Se seleccionaron colonias adecuadas y se dejaron crecer en medio LB líquido en tubos. Se añadió glicerol a la suspensión como crioprotector y se almacenaron alícuotas de 400 µL a -20°C y a -80°C.

- 5 Estas alícuotas de almacenamiento de *E. coli* BL21(DE3) que contenían los plásmidos pET30a+ _UGT76G1var se descongelaron y se añadieron al medio LBGKP (20 g/l Luria Broth Lennox; regulador PIPES 50 mM pH 7.00; regulador fosfato 50 mM pH 7.00; 2.5 g/l de glucosa y 50 mg/l de kanamicina). Este cultivo se dejó agitar en una placa de microtitulación 96 a 30°C durante 8 h.
- 10 Se inocularon 3.95 ml de medio de producción que contenía 60 g/l de medio Overnight Express™ Instant TB (Novagen®), 10 g/l de glicerol y 50 mg/l de kanamicina con 50 µl del cultivo descrito anteriormente. En una placa de 48 pozos, el cultivo resultante se dejó agitar a 20°C. Los cultivos dieron un crecimiento significativo y se obtuvo una buena DO (600 nm). Después de 44 h, las células se recolectaron por centrifugación y se congelaron.
- 15 La lisis se realizó mediante la adición de la mezcla Bugbuster Master® (Novagen®) a las células descongeladas y el lisado se recuperó por centrifugación. Se realizaron pruebas de actividad con 100 µl de lisado fresco que se agregó a una solución de Rebaudiósido D (concentración final 0.5 mM), MgCl₂ (concentración final 3 mM) y UDP-Glucosa (concentración final 2.5 mM) en regulador fosfato 50 mM pH 7.2.
- 20 La reacción se dejó correr a 30°C y se tomaron muestras después de 1, 2, 4, 6 y 22 h para determinar la conversión y la tasa inicial por HPLC (detección CAD) usando el método analítico que se describió anteriormente para la transformación de Rebaudiósido D a Rebaudiósido M. En paralelo, los experimentos se realizaron con el clon de referencia, Round2-Var66. La conversión después de las 22 h y la tasa inicial para este clon de referencia se definió como 100 % y las conversiones normalizadas y las tasas iniciales para los clones de la round 3 se muestran en la siguiente tabla:
- 25

Clon	Mutaciones*	Conversión normalizada Reb D a Reb M después de 22 h.	Tasa inicial normalizada (0-4h)
Round2-Var66	UGT76G1 (S42A_F46I_Q266E_P272A_R334K_G348P_L379G_I407V) clon de referencia	100 %	100 %
Round3-Var1	Round2-Var66 (I46F_L121I_E229A_K393R)	42 %	96 %
Round3-Var2	Round2-Var66 (F18V_A213N_E266S)	7 %	36 %
Round3-Var3	Round2-Var66 (F41L_I190L_A239V_K316R)	20 %	64 %
Round3-Var4	Round2-Var66 (N138K_S274G_Q425E_S456L)	92 %	104 %
Round3-Var5	Round2-Var66 (F22Y_E229S_V407I_N409R)	15 %	66 %
Round3-Var6	Round2-Var66 (F150A_G216A_T355S_S447A)	15 %	50 %
Round3-Var7	Round2-Var66 (V394I_N409R_Q425E_S447A)	72 %	97 %
Round3-Var8	Round2-Var66 (Y37H_F41L_N409R_Q425E)	6 %	37 %
Round3-Var9	Round2-Var66 (L121V_F182L_K303G_E331G)	75 %	95 %
Round3-Var10	Round2-Var66 (S274G_K303G_N409R_Q432E)	99 %	106 %
Round3-Var11	Round2-Var66 (F41L_K303G_F314S)	26 %	67 %

ES 2 805 014 T3

(continuación)

Clon	Mutaciones*	Conversión normalizada Reb D a Reb M después de 22 h.	Tasa inicial normalizada (0-4h)
Round3-Var12	Round2-Var66 (F22Y_R141S_T284V)	3 %	15 %
Round3-Var13	Round2-Var66 (I190L_E229A_T284V)	31 %	70 %
Round3-Var14	Round2-Var66 (K303G_Q425E_S447A)	109 %	114 %
Round3-Var15	Round2-Var66 (K316R_L383V_V394I)	107 %	117 %
Round3-Var16	Round2-Var66 (I190L_K303G_S447A_S456L)	112 %	110 %
Round3-Var17	Round2-Var66 (N138G_V264C_A352G_S447A)	102 %	107 %
Round3-Var18	Round2-Var66 (S274K_V407I_Q425E)	91 %	107 %
Round3-Var19	Round2-Var66 (I190L_S274G_K393R_V394I)	120 %	108 %
Round3-Var20	Round2-Var66 (A213N_L277I_Q425E_E449D)	79 %	101 %
Round3-Var21	Round2-Var66 (I46L_K303G_K393R)	147 %	117 %
Round3-Var22	Round2-Var66 (S221T_S274G_S375Q)	19 %	65 %
Round3-Var23	Round2-Var66 (Y37H_L383V_S456L)	67 %	99 %
Round3-Var24	Round2-Var66 (N138G_I190L_I295T_N409R)	45 %	84 %
Round3-Var25	Round2-Var66 (A42S_S119A_K303G_V407I)	92 %	99 %
Round3-Var26	Round2-Var66 (F22Y_I46F_I190L_V394I)	76 %	95 %
Round3-Var27	Round2-Var66 (N138K_A213N_F314S)	83 %	92 %
Round3-Var28	Round2-Var66 (D301N_F314S_V394I_N409R)	76 %	86 %
Round3-Var29	Round2-Var66 (G216A_E266S_Q432E)	70 %	88 %
Round3-Var30	Round2-Var66 (N138K_A239V_P382R_K393R)	42 %	76 %
Round3-Var31	Round2-Var66 (I46L_S274G_K316R_S456L)	149 %	109 %
Round3-Var32	Round2-Var66 (F18V_I190L_S375Q_S456L)	1 %	2 %
Round3-Var33	Round2-Var66 (N138K_R141S_S274G)	18 %	57 %

ES 2 805 014 T3

(continuación)

Clon	Mutaciones*	Conversión normalizada Reb D a Reb M después de 22 h.	Tasa inicial normalizada (0-4h)
Round3-Var34	Round2-Var66 (N138K_K393R_N409R_S447A)	59 %	82 %
Round3-Var35	Round2-Var66 (I295T_K303G_P382R_V394I)	31 %	70 %
Round3-Var36	Round2-Var66 (N138K_I218V_S456L)	54 %	81 %
Round3-Var37	Round2-Var66 (M145R_S274K_L383V)	1 %	1 %
Round3-Var38	Round2-Var66 (F182L_A352G_V394I)	86 %	96 %
Round3-Var39	Round2-Var66 (A42S_N138G_E229A_S456L)	21 %	77 %
Round3-Var40	Round2-Var66 (R141S_I190L_E331G_Q425E)	6 %	35 %
Round3-Var41	Round2-Var66 (E229S_K316R_T355S)	32 %	81 %
Round3-Var42	Round2-Var66 (I46F_N138K_F292L_N409R)	30 %	83 %
Round3-Var43	Round2-Var66 (A42S_F182L_L277I_T355S)	40 %	89 %
Round3-Var44	Round2-Var66 (S274G_T284V_Q425E)	85 %	93 %
Round3-Var45	Round2-Var66 (A272P_E331G_V394I_S447A)	88 %	96 %
Round3-Var46	Round2-Var66 (S274G_F314S_Q432E_S447A)	112 %	104 %
Round3-Var47	Round2-Var66 (L121I_K316R_S375Q_N409R)	24 %	76 %
Round3-Var48	Round2-Var66 (L121I_N138K_F150A_K303G)	40 %	83 %
Round3-Var49	Round2-Var66 (I46F_V264C_Q432E)	61 %	98 %
Round3-Var50	Round2-Var66 (F150A_A272P_D301N_K316R)	44 %	88 %
Round3-Var51	Round2-Var66 (I46L_R64V_A239V)	28 %	71 %
Round3-Var52	Round2-Var66 (L121I_I218V_F314S)	87 %	94 %
Round3-Var53	Round2-Var66 (I190L_G216A_E449D)	49 %	90 %
Round3-Var54	Round2-Var66 (S274G_I295M_F314S)	128 %	106 %
Round3-Var55	Round2-Var66 (F22Y_S274G_P382R_Q432E)	39 %	48 %

ES 2 805 014 T3

(continuación)

Clon	Mutaciones*	Conversión normalizada Reb D a Reb M después de 22 h.	Tasa inicial normalizada (0-4h)
Round3-Var56	Round2-Var66 (N138K_I190L_K334R)	93 %	97 %
Round3-Var57	Round2-Var66 (N138G_I295M_K303G)	110 %	100 %
Round3-Var58	Round2-Var66 (L121V_G216A_Q425E_S456L)	28 %	52 %
Round3-Var59	Round2-Var66 (F182L_F314S_K393R)	92 %	97 %
Round3-Var60	Round2-Var66 (R64V_K316R_N409K)	16 %	54 %
Round3-Var61	Round2-Var66 (V264C_S274G_K393R)	102 %	98 %
Round3-Var62	Round2-Var66 (F41L_K393R_S456L)	12 %	49 %
Round3-Var63	Round2-Var66 (A42S_S274G_F292L_V394I)	75 %	87 %
Round3-Var64	Round2-Var66 (I190L_S221T_E266S_S447A)	34 %	71 %
Round3-Var65	Round2-Var66 (R64V_E229S_S274K)	12 %	49 %
Round3-Var66	Round2-Var66 (S221T_K334R_K393R_V394I)	72 %	90 %
Round3-Var67	Round2-Var66 (I190L_K393R_Q425E_Q432E)	101 %	102 %
Round3-Var68	Round2-Var66 (F18V_N138K_M145R)	1 %	1 %
Round3-Var69	Round2-Var66 (I218V_F292L_K316R_S447A)	40 %	79 %
Round3-Var70	Round2-Var66 (L121V_E229A_K316R_Q432E)	19 %	63 %
Round3-Var71	Round2-Var66 (Y37H_L121V_D301N)	35 %	68 %
Round3-Var72	Round2-Var66 (N138K_V394I_Q432E_S456L)	66 %	89 %
Round3-Var73	Round2-Var66 (T284V_I295M_A352G_L383V)	69 %	89 %
Round3-Var74	Round2-Var66 (S119A_F150A_V394I_Q425E)	66 %	88 %
Round3-Var75	Round2-Var66 (F18V_A239V_S447A)	8 %	27 %
Round3-Var76	Round2-Var66 (K303G_N409R_Q432E)	84 %	97 %
Round3-Var77	Round2-Var66 (Y37H_A272P_K334R_E449D)	75 %	89 %

ES 2 805 014 T3

(continuación)

Clon	Mutaciones*	Conversión normalizada Reb D a Reb M después de 22 h.	Tasa inicial normalizada (0-4h)
Round3-Var78	Round2-Var66 (K303G_F314S_V394I_Q425E)	121 %	104 %
Round3-Var79	Round2-Var66 (R141S_I295T_F314S_Q432E)	9 %	29 %
Round3-Var80	Round2-Var66 (N138K_I190L_F314S_N409R)	90 %	97 %
Round3-Var81	Round2-Var66 (S119A_E331G_S456L)	87 %	97 %
Round3-Var82	Round2-Var66 (K303G_F314S_K393R_S456L)	100 %	100 %
Round3-Var83	Round2-Var66 (N138K_A352G_V407I_Q432E)	72 %	95 %
Round3-Var84	Round2-Var66 (S274G_L277I_I295T)	34 %	81 %
Round3-Var85	Round2-Var66 (R64V_L277I_F314S_S447A)	34 %	61 %
Round3-Var86	Round2-Var66 (S221T_N409K_Q432E)	39 %	75 %
Round3-Var87	Round2-Var66 (N409R_S447A_S456L)	52 %	86 %
Round3-Var88	Round2-Var66 (K393R_Q425E_Q432E)	102 %	99 %
Round3-Var89	Round2-Var66 (I46L_F292L_S375Q_N409K)	8 %	35 %
Round3-Var90	Round2-Var66 (M145R_K393R_N409R)	1 %	1 %
Round3-Var91	Round2-Var66 (S119A_M145R_T355S_P382R)	0 %	1 %
Round3-Var92	Round2-Var66 (I190L_E229S_V264C_F314S)	64 %	82 %

*Las mutaciones se anotan de la siguiente manera: gen de referencia-aminoácido original-posición-aminoácido nuevo: por ejemplo, la mutación de una isoleucina en la posición 190 a una leucina para la variante 66 de la segunda round de evolución dirigida de UGT76G1 se observa como Round2-Var66 (I190L)

5 El modelado de estos resultados permitió obtener una clasificación del efecto de cada mutación. Las siguientes mutaciones se determinaron como beneficiosas para la actividad: I46L, I295M, S119A, S274G, K334R, F314S, K303G, K316R, K393R, I190L, Q425E, Q432E, N138G, V394I, F182L, V407I, A272P, V264C, E449D, A352G.

Ejemplo 22

10 Conversión de rebaudiósido A en rebaudiósido I usando UGT76G1

La reacción se realizó usando UGT76G1-R1-F12 (también conocido como UGT76G1var94)

15 El volumen total de la reacción fue de 40 ml con la siguiente composición: regulador de fosfato de potasio 50 mM pH 7.5, MgCl₂ 3 mM, UDP-glucosa 2.5 mM, rebaudiósido A 0.5 mM y 4 ml de lisado UGT76G1-R1-F12 (2.5 U/ml). La reacción se realizó a 30°C en un agitador orbital a 135 rpm. Para el muestreo, se inactivaron 125 µl de la mezcla de reacción con 10 µl de H₂SO₄ 2N y 115 µl de metanol/agua (7/3). Las muestras se centrifugaron inmediatamente y se mantuvieron a 10°C antes del análisis mediante LC-MS. Se utilizó un sistema HPLC Agilent serie 1200, equipado con bomba binaria (G1312B), muestreador automático (G1367D), compartimento de columna termostaticado

ES 2 805 014 T3

(G1316B), detector DAD (G1315C), conectado con Agilent 6110A MSD y en interfaz con el software "LC/MSD Chemstation".

Condiciones del instrumento

Columna	Phenomenex Kinetex 2.6u C18 100A, 4.6mm x 150mm, 2.6µm
Temperatura de columna	55°C
Detección	DAD a 210nm hasta 360nm MSD (Modo de escaneo y SIM) Modo: ES-API, Polaridad negativa Flujo de gas de secado: 13.0 L/min. Presión del nebulizador: 30 psig Temperatura del gas de secado: 270°C
Duración del análisis	20 min
Volumen inyectado	2 µl
Rata de flujo	0.8 ml/min

5

Programa de gradiente de fase móvil

Tiempo (min)	A (%): Ácido fórmico 0.1 %	B (%): Acetonitrilo
0	76	24
8.5	76	24
10.0	71	29
16.5	70	30

El perfil de reacción se muestra en la Figura 5.

10 Después de 42 h de reacción, se enfriaron 20 ml de la mezcla de reacción con 20 ml de etanol y se usaron para dilucidar la estructura.

15 De manera similar, los mejores clones de UGT76G1 dirigieron la evolución round 1 (UGT76G1-R1-F12), round 2 (UGT76G1-R2-B9 identificados anteriormente como "Round2-Var66") y round 3 (UGT76G1-R3-G3 identificados anteriormente como "Round3-Var21") y UGT76G1 nativo se probaron para la conversión de Rebaudiósido A en Rebaudiósido I. Los resultados se muestran en la Figura 5.

Ejemplo 23

20 Aislamiento y caracterización de rebaudiósido I

Muestra de reacción cruda. La muestra, Lot Crude CB-2977-198, usada para aislamiento, se preparó de acuerdo con el Ejemplo 22 con UGT76G1.

25 Análisis por HPLC. Los análisis preliminares de HPLC de las muestras se realizaron utilizando un sistema Waters 2695 Alliance System con el siguiente método: Phenomenex Synergi Hydro-RP, 4.6 × 250 mm, 4 µm (p/n 00G-4375-E0); Temperatura de la columna: 55°C; Fase móvil A: 0.0284 % de NH₄OAc y 0.0116 % de HOAc en agua; Fase móvil B: acetonitrilo (MeCN); Rata de flujo: 1.0 ml/min; Volumen de inyección: 10 µl. La detección fue por UV (210 nm) y CAD

30

Gradiente:

Tiempo (min)	%A	%B
0.0 - 8.5	75	25
10.0	71	29
16.5	70	30
18.5 - 24.5	66	34

(continuación)

Tiempo (min)	%A	%B
26.5 - 29.0	48	52
31 - 37	30	70
38	75	25

5 Aislamiento por HPLC. La purificación se realizó usando una columna Waters Atlantis dC18 (30 × 100 mm, 5 µm, p/n 186001375) con condiciones de fase móvil isocrática de 80:20 de agua/MeCN. La rata de flujo se mantuvo a 45 ml/min y la carga de inyección fue de 180 µg. La longitud de onda del detector se ajustó a 210 nm.

10 Los análisis de fracciones se realizaron usando una columna Waters Atlantis dC18 (4.6 x 150 mm, 5 µm, p/n 186001342); Fase móvil A: agua; Fase móvil B: MeCN; Rata de flujo: 1 ml/min; Condiciones de la fase móvil isocrática: 75:25 A/B durante 30 min.

15 MS y MS/MS. Los datos de MS y MS/MS se generaron con un espectrómetro de masas Waters QToF Micro equipado con una fuente de ionización por electroaspersión. La muestra fue analizada por ESI negativo. La muestra se diluyó a una concentración de 0.25 mg/ml con H₂O:MeCN (1:1) y se introdujo mediante inyección de flujo para la adquisición de datos de MS. La muestra se diluyó más a 0.01 mg/ml para obtener una buena s/n para sintonizar para MS/MS y se adquirió por infusión directa. La energía de colisión se ajustó a 60 V para adquirir datos de MS/MS con picos de iones de fragmentos aumentados debido a la naturaleza de la molécula.

20 RMN. La muestra se preparó disolviendo ~1.0 mg en 180 µL de piridina-d₅+TMS, y los datos de RMN se obtuvieron en un instrumento Bruker Avance de 500 MHz con una sonda inversa de 2.5 mm o una sonda de banda ancha de 5 mm. Los datos de ¹³C y HMBC RMN fueron adquiridos en el Rensselaer Polytechnic Institute utilizando sus instrumentos Bruker Avance de 600 MHz y 800 MHz con criosonda de 5 mm, respectivamente. Los espectros de ¹H y ¹³C RMN se referenciaron a la resonancia de TMS (δ_H 0.00 ppm y δ_C 0.0 ppm).

25 El aislamiento de Reb I se realizó usando una mezcla de glucósido de esteviol semisintético, número de lote CB-2977-198. El material se analizó por HPLC como se describió anteriormente. El pico Reb I se observó a un tiempo de retención (t_R) de aproximadamente 17 min como se muestra en la Figura 6.

Resultados y discusión

30 El pico reb I se aisló del crudo de reacción como se describió anteriormente. La fracción aislada se combinó y se liofilizó. La pureza del producto final fue del 91 % según lo confirmado por LC-CAD usando el método descrito anteriormente. Se proporcionó aproximadamente 1 mg de Reb I para análisis espectroscópicos y espectrométricos.

35 Espectrometría de masas. El espectro de masas ESI-TOF adquirido al infundir una muestra de reb I mostró un ion [M-H]⁻ a m/z 1127.4741. La masa del ion [MH]⁻ estaba en buen acuerdo con la fórmula molecular C₅₀H₇₉O₂₈ (calculado para C₅₀H₇₉O₂₈: 1127.4758, error: - 1.5 ppm) esperada para reb I. Los datos de MS confirmaron que reb I tiene una masa nominal de 1128 Daltons con la fórmula molecular, C₅₀H₈₀O₂₈.

40 El espectro MS/MS de reb I, seleccionando el ion [MH]⁻ a m/z 1127.4 para fragmentación, indicó pérdida de dos unidades de azúcar a m/z 803.5301, sin embargo no mostró fragmentación adicional con energía de colisión de 30 V. Cuando se aplicó una mayor energía de colisión (60 V), no se observó el ion original, pero se observó pérdida secuencial de tres unidades de azúcar a m/z 641.4488, 479.3897 y 317.3023 a partir de m/z 803.5301.

45 Espectroscopía de RMN. Se realizaron una serie de experimentos de RMN que incluyen ¹H RMN, ¹³C RMN, ¹H-¹H COSBY, HSQC-DEPT, HMBC NOESY y 1D TOCSY para permitir la asignación de reb I.

50 En el espectro ¹H RMN de reb I adquirido a 300 K, uno de los protones anoméricos estaba completamente oscurecido por la resonancia del agua. Por lo tanto, el espectro de ¹H RMN de la muestra se adquirió a una temperatura más baja (292 K), para desplazar la resonancia del agua, y a esta temperatura el protón anomérico se resolvió suficientemente. Por lo tanto, todos los demás datos de RMN de reb I se adquirieron a 292 K.

55 Los datos de RMN 1D y 2D indicaron que el núcleo central del glucósido es un diterpeno. Una correlación de HMBC de los protones de metilo en δ_H 1.22 con el carbonilo en δ_C 176.9 permitió la asignación de uno de los grupos metilo terciarios (C-18) y C-19 y proporcionó un punto de partida para la asignación del resto de la aglicona. Las correlaciones adicionales de HMBC de los protones de metilo (H-18) a los carbonos a δ_C 38.5, 44.0 y 57.2 permitieron la asignación de C-3, C-4 y C-5. El análisis de los datos de ¹H-¹³C HSQC-DEPT indicó que el carbono en δ_C 38.5 era un grupo metileno y el carbono en δ_C 57.2 era un metino que se asignó como C-3 y C-5, respectivamente. Esto dejó el carbono en δ_C 44.0, que no mostró una correlación en el espectro HSQC-DEPT, para ser asignado como el carbono cuaternario, C-4. Los desplazamientos químicos ¹H para C-3 (δ_H 1.02 y 2.35) y C-5

ES 2 805 014 T3

(δ_H 1.03) se asignaron utilizando los datos HSQC-DEPT. Una correlación COSY entre uno de los protones H-3 (δ_H 1.02) y un protón en δ_H 1.44 permitió la asignación de uno de los protones H-2 que a su vez mostró una correlación con un protón en δ_H 0.74 que fue asignado a H-1. Los desplazamientos químicos restantes de 1H y ^{13}C para C-1 y C-2 se asignaron luego sobre la base de correlaciones adicionales COSY y HSQC-DEPT y se resumen en la tabla a continuación.

5

1H y ^{13}C RMN (500 y 150 MHz, piridina- d_5), asignaciones del Rebaudiósido I aglicona.

Posición	1H	^{13}C
1	0.74 t (11.6) 1.75 m	40.7
2	1.44 m 2.20 m	19.4
3	1.02 m 2.35 m	38.5
4	---	44.0
5	1.03 m	57.2
6	1.90 m 2.33 m	22.2
7	1.29 m 1.31 m	41.7
8	---	42.3
9	0.88 d (6.3)	54.1
10	---	39.8
11	1.67 m 1.70 m	20.5
12	1.98 m 2.28 m	37.3
13	---	86.7

(continuación)

Posición	¹ H	¹³ C
14	1.78 m 2.59 d (11.9)	44.3
15	2.04 brs	47.6
16	---	154.0
17	5.02 s 5.67 s	104.8
18	1.22 s	28.4
19	---	176.9
20	1.26 s	15.7

5 El otro singlete de metilo terciario, observado en δ_H 1.26, mostró correlaciones de HMBC con C-1 y C-5 y fue asignado como H-20. Los protones de metilo mostraron correlaciones adicionales de HMBC con un carbono cuaternario (δ_C 39.8) y un carbono metínico (δ_C 54.1) que fueron asignados como C-10 y C-9, respectivamente. Las correlaciones COSY entre H-5 (δ_H 1.03) y protones en δ_H 1.90 y 2.33 permitieron la asignación de los protones H-6, que a su vez mostraron correlaciones con los protones en δ_H 1.29 y 1.31 que fueron asignados a H-7. Los desplazamientos químicos de ¹³C para C-6 (δ_C 22.2) y C-7 (δ_C 41.7) se determinaron a partir de los datos de HSQC-DEPT. Las correlaciones COSY entre H-9 (δ_H 0.88) y protones en δ_H 1.67 y 1.70 permitieron la asignación de los protones H-11 que a su vez mostraron correlaciones COSY a los protones en δ_H 1.98 y 2.28 que fueron asignados como protones H-12. Los datos HSQC-DEPT se utilizaron para asignar C-11 (δ_C 20.5) y C-12 (δ_C 37.3). Los protones olefinicos observados en δ_H 5.02 y 5.67 mostraron correlaciones de HMBC con un carbono cuaternario en δ_C 86.7 (C-13) y, por lo tanto, se asignaron a H-17 (δ_C 104.8 a través de HSQC-DEPT). El protón metino H-9 mostró correlaciones de HMBC con los carbonos a δ_C 42.3, 44.3 y 47.6 que fueron asignados como C-8, C-14 y C-15, respectivamente. Los desplazamientos químicos ¹H en C-14 (δ_H 1.78 y 2.59) y C-15 (δ_H 2.04) se asignaron utilizando los datos HSQC-DEPT. Las correlaciones adicionales de HMBC de H-9 a C-11 y H-12 a C-9 confirmaron aún más las asignaciones realizadas anteriormente. Las correlaciones de HMBC observadas desde H-14 a un carbono cuaternario a δ_C 154.0 permitieron la asignación de C-16 para completar la asignación del núcleo central.

Se usaron correlaciones observadas en el espectro NOESY para asignar la estereoquímica relativa del núcleo central de diterpeno. En el espectro NOESY, se observaron correlaciones NOE entre H-14 y H-20, lo que indica que H-14 y H-20 están en la misma cara de los anillos. Del mismo modo, se observaron correlaciones de NOE entre H-9 y H-5, así como H-5 y H-18. No se observaron correlaciones NOE entre H-9 y H-14. Los datos de NOESY indican que H-5, H-9 y H-18 estaban en la cara opuesta de los anillos en comparación con H-14 y H-20 como se presenta en la figura a continuación. Por lo tanto, estos datos indican que la estereoquímica relativa en el núcleo central se retuvo durante la etapa de glicosilación.

30 El análisis de los datos de ¹H-¹³C HSQC-DEPT para reb I confirmó la presencia de cinco protones anoméricos. Los cinco protones anoméricos se resolvieron en los espectros adquiridos a 292 K a δ_H 6.14 (δ_C 95.3), 5.57 (δ_C 104.6), 5.38 (δ_C 104.7), 5.29 (δ_C 105.0) y 5.06 (δ_C 98.0). Además, los cinco protones anoméricos tenían acoplamientos grandes (7.7 Hz - 8.2 Hz), lo que indica que tenían configuraciones β . El protón anomérico observado en δ_H 6.14 mostró una correlación de HMBC con C-19 que indica que corresponde al protón anomérico de Glc_I. De manera similar, el protón anomérico observado en δ_H 5.06 mostró una correlación HMBC con C-13 permitiendo que se le asigne como el protón anomérico de Glc_{II}.

El protón anomérico Glc_I (δ_H 6.14) mostró una correlación COSY con un protón en δ_H 4.18 que fue asignado como Glc_I H-2. Debido a la superposición de datos, el espectro COSY no permitió la asignación de H-3 o H-4. Por lo tanto, se realizó una serie de experimentos 1D TOCSY usando irradiación selectiva del protón anomérico Glc_I con varios tiempos de mezcla diferentes. Además de confirmar la asignación para Glc_I H-2, los datos de TOCSY mostraron protones en δ_H 4.27, 4.25 y 3.93 que fueron asignados como H-3, H-4 y H-5, respectivamente. El protón observado en δ_H 4.37 en el espectro TOCSY se asignó a uno de los protones Glc_I H-6. El otro protón de metileno H-6 en δ_H 4.27 se asignó con base en la correlación COSY de H-5 a δ_H 4.27. Los desplazamientos químicos de ¹³C para Glc_I C-2 (δ_C 72.5), C-3 (δ_C 89.4), C-4 (δ_C 69.2), C-5 (δ_C 78.2-78.8) y C-6 (δ_C 61.7) se asignaron usando los datos HSQC-

DEPT. Las correlaciones de HMBC de H-1 a C-3 y H-4 a C-6 confirmaron aún más las asignaciones realizadas anteriormente para completar la asignación de Glc_I.

5 De las cuatro unidades estructurales de glucosa no asignadas restantes, una fue asignada como sustituyente en C-3 de Glc_I con base en las correlaciones de HeMBC. El protón anomérico observado en δ_H 5.29 mostró una correlación HMBC con Glc_I C-3 y fue asignado como el protón anomérico de Glc_V. También se observó la correlación recíproca de HMBC de Glc_I H-3 con el carbono anomérico de Glc_V.

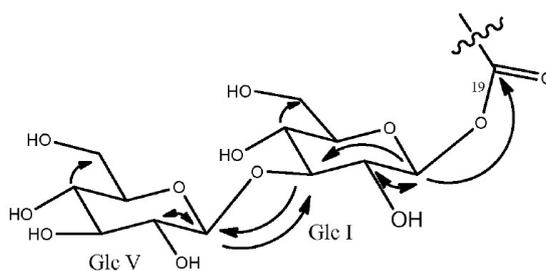
10 En la siguiente tabla se muestra un resumen de los desplazamientos químicos 1H y ^{13}C para el glucósido en C-19:

Asignaciones de RMN 1H y ^{13}C (500 y 150 MHz, piridina- d_5) del glucósido Rebaudiósido I C-19.

Posición	1H	^{13}C
Glc _I -1	6.14 d (8.2)	95.3
Glc _I -2	4.18 m	72.5
Glc _I -3	4.27 m	89.4
Glc _I -4	4.25 m	69.2
Glc _I -5	3.93 m	78.2-78.8 [†]
Glc _I -6	4.27 m, 4.37 m	61.7
Glc _V -1	5.29 d (7.9)	105.0
Glc _V -2	4.04 m	75.3 o 75.5
Glc _V -3	4.27 m	78.2-78.6 [†]
Glc _V -4	4.12 m	71.5 o 71.6
Glc _V -5	4.05 m	78.5 o 78.6 [†]
Glc _V -6	4.26 m, 4.56 m	62.3 o 62.4

[†]Cinco resonancias de carbono en el rango de 78.2-78.8 (78.16, 78.47, 78.50, 78.55 y 78.77), por lo tanto, el desplazamiento químico no se pudo asignar inequívocamente.

A continuación se proporciona un resumen de las correlaciones clave de HMBC y COSY utilizadas para asignar la región de glucósido C-19.



 1H - ^{13}C Correlaciones HMBC
 1H - 1H Correlaciones COSY

15 El protón anomérico de Glc_V (δ_H 5.29) mostró una correlación COSY con un protón en δ_H 4.04 que fue asignado como Glc_V H-2. Glc_V C-2 (δ_C 75.3 o 75.5) se asignó luego utilizando los datos HSQC-DEPT. Debido a la superposición de los datos, el espectro COSY no permitió la asignación de los protones restantes. Por lo tanto, se realizó una serie de experimentos 1D TOCSY utilizando irradiación selectiva del protón anomérico Glc_V con varios tiempos de mezcla diferentes. Además de confirmar las asignaciones para Glc_V H-2, los datos TOCSY permitieron la asignación de Glc_V H-3 (δ_H 4.27), H-4 (δ_H 4.12) y H-5 (δ_H 4.05). El protón observado en δ_H 4.56 en el espectro TOCSY se asignó a uno de los protones Glc_V H-6. El otro protón de metileno H-6 en δ_H 4.26 se asignó con base en

20

la correlación COSY de H-5 a δ_H 4.26. Los desplazamientos químicos de ^{13}C para Glc_v C-3 (δ_C 78.2-78.6), C-4 (δ_C 71.5 o 71.6), C-5 (δ_C 78.5 o 78.6) y C-6 (δ_C 62.3 o 62.4) se asignaron utilizando el HSQC -DEPT datos para completar la asignación de Glc_v.

5 La asignación de Glc_{II} se realizó de manera similar. El protón anomérico Glc_{II} (δ_H 5.06) mostró una correlación COSY con un protón en δ_H 4.34 que se asignó como Glc_{II} H-2 y a su vez mostró una correlación COSY con un protón en δ_H 4.20 (Glc_{II} H-3) que mostró una correlación adicional con un protón en δ_H 3.97 (Glc_{II} H-4) que también mostró una correlación COSY con un protón en δ_H 3.80 (Glc_{II} H-5). H-5 mostró correlaciones COSY adicionales a los protones en δ_H 4.18 y 4.49 que fueron asignados a H-6. También se realizó una serie de experimentos 1D TOCSY utilizando irradiación selectiva del protón anomérico Glc_{II} con varios tiempos de mezcla diferentes. Los datos de TOCSY confirmaron las asignaciones de protones anteriores. La asignación de los desplazamientos químicos ^{13}C para Glc_{II} C-2 (δ_C 80.2), C-3 (δ_C 87.5), C-4 (δ_C 70.1), C-5 (δ_C 77.6) y C-6 (δ_C 62.5) se basó en Datos HSQC-DEPT. Las correlaciones de HMBC de Glc_{II} H-3 a C-2 y C-4 y también de Glc_{II} H-4 a C-3, C-5 y C-6 confirmaron las asignaciones realizadas anteriormente para completar la asignación de Glc_{II}.

15 Las dos unidades estructurales de glucosa no asignadas restantes se asignaron como sustituyentes en C-2 y C-3 de Glc_{II} con base en correlaciones de HMBC. El protón anomérico observado en δ_H 5.57 mostró una correlación HMBC con Glc_{II} C-2 y fue asignado como el protón anomérico de Glc_{III}. El protón anomérico observado en δ_H 5.38 mostró una correlación HMBC con Glc_{II} C-3 y fue asignado como el protón anomérico de Glc_{IV}. También se observaron las correlaciones recíprocas de HMBC de Glc_{II} H-2 con el carbono anomérico de Glc_{III} y de Glc_{II} H-3 con el carbono anomérico de Glc_{IV}.

25 El protón anomérico de Glc_{III} (δ_H 5.57) mostró una correlación COSY con un protón en δ_H 4.21 que fue asignado como Glc_{III} H-2. Glc_{III} C-2 (δ_C 76.3) se asignó luego utilizando los datos HSQC-DEPT. Debido a la superposición de datos, el espectro COSY no permitió la asignación de los protones restantes. Por lo tanto, se realizó una serie de experimentos 1D TOCSY usando irradiación selectiva del protón anomérico Glc_{III} con varios tiempos de mezcla diferentes. Además de confirmar las asignaciones para Glc_{III} H-2, los datos TOCSY permitieron la asignación de Glc_{III} H-3 (δ_H 4.27), H-4 (δ_H 4.25) y H-5 (δ_H 3.94). Los protones observados en δ_H 4.41 y δ_H 4.53 en el espectro TOCSY se asignaron como protones Glc_{III} H-6. Los desplazamientos químicos de ^{13}C para C-3 (δ_C 78.2-78.6), C-4 (δ_C 72.1), C-5 (δ_C 78.2-78.8) y C-6 (δ_C 63.1) se asignaron utilizando los datos HSQC-DEPT. Las correlaciones de HMBC de H-5 a un carbono en δ_C 63.1 confirmaron además la asignación de Glc_{III} C-6 para completar la asignación de Glc_{III}.

35 El protón anomérico de Glc_{IV} (δ_H 5.38) mostró una correlación COSY con un protón en δ_H 4.01 que fue asignado como Glc_{IV} H-2. Glc_{IV} C-2 (δ_C 75.3 o 75.5) se asignó luego utilizando los datos HSQC-DEPT. Debido a la superposición de datos, el espectro COSY no permitió la asignación de los protones restantes. Por lo tanto, se realizaron una serie de experimentos 1D TOCSY utilizando irradiación selectiva del protón anomérico Glc_{IV} con varios tiempos de mezcla diferentes. Además de confirmar las asignaciones para Glc_{IV} H-2, los datos 1D TOCSY permitieron la asignación de H-3 (δ_H 4.28), H-4 (δ_H 4.11), H-5 (δ_H 4.13) y H-6 (δ_H 4.25 y 4.58). El protón en δ_H 4.25 también mostró una correlación COSY con δ_H 4.58 además confirmó que estos protones pertenecen a H-6. Los desplazamientos químicos de ^{13}C para C-3 (δ_C 78.2-78.6), C-4 (δ_C 72.1), C-5 (δ_C 78.2-78.6) y C-6 (δ_C 62.3 o 62.4) se asignaron utilizando los datos HSQC-DEPT. Las correlaciones de HMBC de H-4 a C-6 y H-5 a C-1 confirmaron aún más la asignación de Glc_{IV} C-6 para completar la asignación de Glc_{IV}.

45 A continuación se muestra un resumen de los desplazamientos químicos ^1H y ^{13}C para el glucósido en C-13:

Asignaciones de RMN ^1H y ^{13}C (500 y 150 MHz, piridina- d_5) del glucósido Rebaudiósido I C-13.

Posición	^1H	^{13}C
Glc _{II} -1	5.06 d (7.9)	98.0
Glc _{II} -2	4.34 m	80.6
Glc _{II} -3	4.20 m	87.5
Glc _{II} -4	3.97 m	70.1
Glc _{II} -5	3.80 m	77.6
Glc _{II} -6	4.18 m, 4.49 m	62.5
Glc _{III} -1	5.57 d (7.7)	104.6
Glc _{III} -2	4.21 m	76.3
Glc _{III} -3	4.27 m	78.2-78.6 [†]
Glc _{III} -4	4.25 m	72.1

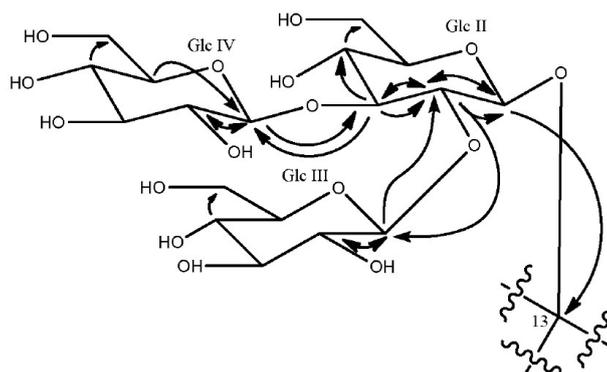
(continuación)

Posición	¹ H	¹³ C
GlcIII-5	3.94m	78.2-78.8†
GlcIII-6	4.41 m, 4.53 m	63.1
GlcIV-1	5.38 d (7.9)	104.7
GlcIV-2	4.01 m	75.3 o 75.5
GlcIV-3	4.28 m	78.2-78.6†
GlcIV-4	4.11 m	72.1
GlcIV-5	4.13 m	78.2-78.6†
GlcIV-6	4.25 m, 4.58 m	62.3 o 62.4

†Cinco resonancias de carbono en el rango de 78.2-78.8 (78.16, 78.47, 78.50, 78.55 y 78.77), por lo tanto, el desplazamiento químico no se pudo asignar de manera inequívoca.

A continuación se proporciona un resumen de las correlaciones clave de HMBC y COSY utilizadas para asignar la región de glucósido C-13.

5



 ¹H-¹³C Correlaciones HMBC
 ¹H-¹H Correlaciones COSY

Los análisis de RMN y MS del rebaudiósido I permitieron la asignación completa de la estructura como ácido (13-[(2-O-β-D-glucopiranosilo-3-O-β-D-glucopiranosilo)-β-D-glucopiranosilo]oxi]ent-kaur-16-en-19-oico-(3-O-β-D-glucopiranosilo)-β-D-glucopiranosilo)éster].

10

Ejemplo 24

Características sensoriales del rebaudiósido I

15

El rebaudiósido I fue evaluado para determinar su perfil sensorial, incluso en comparación con el rebaudiósido M.

Preparación de la muestra. Las muestras se prepararon a una concentración de 400 ppm en una matriz de agua. Se realizó un análisis para determinar la concentración real de las muestras.

20

Metodología

Siete panelistas participaron en las pruebas de rebaudiósido I y rebaudiósido M. Las muestras se sirvieron a aproximadamente 4°C. Los panelistas recibieron instrucciones de tomar 1 sorbo de la muestra (10 ml), mantener en la boca durante 5 segundos, expectorar y calificar los atributos de sabor, como se describe a continuación. Se

25

dispuso un descanso de 5 minutos entre cada muestra y se indicó a los panelistas que limpiaran sus paladares con al menos 1 bocado de una galleta sin sal y 2 sorbos de agua filtrada. Las muestras fueron aleatorizadas y cada muestra estaba presente en réplica en la sesión.

5 Los atributos evaluados incluyeron: intensidad de sabor dulce (nivel máximo de dulzor en la boca durante 5 segundos); intensidad del sabor amargo (nivel máximo de amargor en la boca durante 5 segundos); intensidad dulce total máxima (la intensidad dulce máxima experimentada desde el tiempo en que se toma el sorbo hasta 1 minuto); intensidad amarga máxima total (la intensidad amarga máxima experimentada desde el momento en que el sorbo se toma hasta 1 minuto); otra intensidad (intensidad de cualquier sabor, aromático o sensación en boca que no sea dulce y amargo (por ejemplo, metálico, plástico, regaliz, etc.); intensidad dulce persistente (intensidad dulce 1 minuto después de expectorar la muestra); e intensidad de sabor amargo (amargo intensidad un minuto después de expectorar la muestra).

15 Se usó un análisis ANOVA de 3 vías para comparar los edulcorantes para cada atributo y se determinó la significancia al 95 % de CL. Se utilizó LSD de Fisher para comparar diferencias significativas entre las puntuaciones medias.

Resultados

20 El rebaudiósido I tenía una intensidad de sabor dulce más baja, una intensidad dulce máxima global y una intensidad dulce persistente.

Tabla 1: Atributos sensoriales del rebaudiósido I en comparación con el rebaudiósido M a 400 ppm

	Intensidad de sabor dulce	Intensidad de sabor amargo	Intensidad máxima total de dulzor	Intensidad de amargo	Otra intensidad	Intensidad persistente dulce	Intensidad de retrogusto amargo
(Reb M)	7.4	1.0	8.0	1.6	0.9	4.9	0.8
(Reb I)	5.9	1.4	7.2	2.1	1.3	3.5	1.3

25 Ejemplo 25: Formulaciones de bebidas (que quedan fuera del alcance de la invención)

Té negro saborizado: Las propiedades de sabor de una bebida de té negro saborizado con cero calorías que contiene Reb A en una concentración de 275 ppm se compara con una bebida de té negro saborizado con cero calorías comparable con Reb I en una concentración de 275 ppm. Se determina que la bebida que contiene Reb I tiene un acabado mucho más limpio con menos dulzor persistente y un perfil de dulzor general más redondeado.

35 Agua potenciada: Las propiedades de sabor de una bebida de agua mejorada con cero calorías que contiene Reb A en una concentración de 200 ppm se compara con una bebida de agua potenciado con cero calorías comparable que contiene Reb I en una concentración de 200 ppm. La bebida que contiene Reb I tiene un acabado más limpio y tiene un dulzor reducido y persistente y una calidad de sabor dulce más redondeada.

40 Bebida burbujeante con sabor a lima-limón: Los niveles de Reb I se evalúan en una base de bebida burbujeante con sabor a lima-limón con cero calorías para determinar el efecto de aumentar el dulzor. Se prepararon muestras de la bebida burbujeante con sabor a lima-limón con Reb I en cantidades entre 400 y 750 ppm (en incrementos de 50 ppm) y alulosa al 3.5 %. Todas las muestras tienen un sabor significativamente mejor que las formulaciones que contenían Reb A comparables, lo que da como resultado perfiles más limpios con una mayor intensidad de dulzor y una característica de retrogusto no negativa. Se ha encontrado que las muestras que tienen 550 ppm y 600 ppm de Reb I son las más cercanas en nivel de dulzor a una formulación de bebida espumosa con sabor a limón y lima azucarada 10.0 Brix HFCS.

45 Listado de secuencias

<110> The Coca-Cola Company

50 <120> MÉTODOS PARA PREPARAR REBAUDIÓSIDO I Y USOS

<130> 12600.105145

<140> PCT/US2015/045906

55 <141> 2015-08-19

ES 2 805 014 T3

<150> 62/039,344
 <151> 2014-08-19

<160> 4

5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1397

10

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de expresión optimizada para codones

15

<400> 1

```

ccatggccca tatggaaaac aaaaccgaaa ccaccgttcg tcgtcgtcgc cgtattattc      60
tgtttcgggt tccgtttcag ggatcatatta atccgattct gcagctggca aatgtgctgt      120
atagcaaagg ttttagcatt accatTTTTc ataccaattt taacaaaccg aaaaccagca      180
attatccgca ttttaccttt cgctttattc tggataatga tccgcaggat gaacgcatta      240
gcaatctgcc gacacatggt ccgctggcag gtatgcgtat tccgattatt aacgaacatg      300
gtgcagatga actgcgtcgt gaactggaac tgctgatgct ggcaagcga gaagatgaag      360
aagttagctg tctgattacc gatgcaactgt ggtatTTTTc acagagcgtt gcagatagcc      420
tgaatctgcg tcgtctgggt ctgatgacca gcagcctggt taactttcat gcacatgtta      480
gcctgccgca gtttgatgaa ctgggttattc tggatccgga tgataaaacc cgtctggaag      540
aacaggcaag cggTTTTccg atgctgaaag tgaaagatat caaaagcgc tatagcaatt      600
ggcagattct gaaagaaatt ctgggcaaaa tgattaaaca gaccaaagca agcagcgggtg      660
ttatTTggaa tagctTTaaa gaactggaag aaagcgaact ggaaaccgtg attcgtgaaa      720
ttccggcacc gagctttctg attccgctgc cgaaacatct gaccgcaagc agcagcagcc      780
tgctggatca tgatcgtacc gTTTTcagt ggctggatca gcagcctccg agcagcgttc      840
tgtatgttag cTTTggtagc accagcgaag ttgatgaaaa agatTTTctg gaaattgccc      900
gtggtctggt tgatagcaaa cagagctTtc tgtgggttgt tcgtccgggt tttgttaaag      960
gtagcacctg ggttgaaccg ctgccggatg gTTTTctggg tgaacgtggt cgtattgtta     1020
aatgggttcc gcagcaagaa gTctggcac acggcgcgat tggTgcattt tggaccata     1080
gCGgtTggaa tagcaccctg gaaagcgtt gtgaaggTgt tccgatgatt ttagcagatt     1140
ttggtctgga tcagccgctg aatgcacgtt atatgagtga tgtTctgaaa gtgggtgtgt     1200
atctggaaaa tggTtgggaa cgtggtgaaa ttgcaaatgc aattcgtcgt gttatggtgg     1260
atgaagaagg tgaatatatt cgtcagaatg cccgtgtTct gaaacagaaa gcagatgtta     1320
gcctgatgaa aggtggtagc agctatgaaa gcctggaaag tctggttagc tatattagca     1380
gcctgtaata actcgag                                     1397
    
```

20

ES 2 805 014 T3

<210> 2
 <211> 1442
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220><223> Secuencia de expresión optimizada para codones

<400> 2

```
ccatggcaca tatggcaacc agcgatagca ttgttgatga tcgtaaacag ctgcatggtg      60
caacctttcc gtggctggca tttggtcata ttctgccgta tctgcagctg agcaaaactga      120
ttgcagaaaa aggtcataaa gtgagctttc tgagcaccac ccgtaatatt cagcgtctga      180
gcagccatat tagtccgctg attaatggtg ttcagctgac cctgcctcgt gttcaagaac      240
tgccggaaga tgccgaagca accaccgatg ttcacccgga agatattccg tatctgaaaa      300
aagcaagtga tggctctgcag ccggaagtta cccgttttct ggaacagcat agtccggatt      360
ggatcatcta tgattatacc cattattggc tgccgagcat tgcagcaagc ctgggtatta      420
gccgtgcaca ttttagcggt accaccccgt gggcaattgc atatatgggt ccgagcgcag      480
atgcaatgat taatggtagt gatggctgta ccaccgttga agatctgacc acccctccga      540
aatggtttcc gtttccgacc aaagtttggt ggcgtaaaca tgatctggca cgtctggttc      600
cgtataaagc accgggtatt agtgatggtt atcgtatggg tctggttctg aaaggtagcg      660
attgtctgct gagcaaatgc tatcatgaat ttggcaccca gtggctgccg ctgctggaaa      720
ccctgcatca ggttccgggt gttccgggtg gtctgctgcc tccggaagtt ccgggtgatg      780
aaaaagatga aacctgggtt agcatcaaaa aatggctgga tggtaaacag aaaggtagcg      840
tggtttatgt tgcaactgggt agcgaagttc tggttagcca gaccgaagtt gttgaactgg      900
caactgggtct ggaactgagc ggtctgccgt ttgtttgggc atatcgtaaa ccgaaaggctc      960
cggcaaaaag cgatagcggt gaactgccgg atggttttgt tgaacgtacc cgtgatcgtg     1020
gtctggtttg gaccagctgg gcacctcagc tgcgtattct gagccatgaa agcgtttgtg     1080
gttttctgac ccattgtggt agcggtagca ttgtggaagg tctgatgttt ggtcatccgc     1140
tgattatgct gccgattttt ggtgatcagc cgctgaatgc acgtctgctg gaagataaac     1200
10 aggttggtat tgaaattccg cgtaatgaag aagatgggtg cctgaccaa gaaagcgttg     1260
cacgtagcct gcgtagcggt gttggtgaaa aagaaggcga aatctataaa gccaatgcac     1320
gtgaactgag caaaatctat aatgatacca aagtggaaaa agaatatgtg agccagttcg     1380
tgattatctt ggaaaaaac acccgtgcag ttgccattga tcacgaaagc taatgactcg     1440
ag                                                                 1442
```

15

<210> 3
 <211> 442
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> UGTSL2 artificial expresado

<400> 3

5

ES 2 805 014 T3

Met Ala Thr Asn Leu Arg Val Leu Met Phe Pro Trp Leu Ala Tyr Gly
 1 5 10 15

His Ile Ser Pro Phe Leu Asn Ile Ala Lys Gln Leu Ala Asp Arg Gly
 20 25 30

Phe Leu Ile Tyr Leu Cys Ser Thr Arg Ile Asn Leu Glu Ser Ile Ile
 35 40 45

Lys Lys Ile Pro Glu Lys Tyr Ala Asp Ser Ile His Leu Ile Glu Leu
 50 55 60

Gln Leu Pro Glu Leu Pro Glu Leu Pro Pro His Tyr His Thr Thr Asn
 65 70 75 80

Gly Leu Pro Pro His Leu Asn Pro Thr Leu His Lys Ala Leu Lys Met
 85 90 95

Ser Lys Pro Asn Phe Ser Arg Ile Leu Gln Asn Leu Lys Pro Asp Leu
 100 105 110

Leu Ile Tyr Asp Val Leu Gln Pro Trp Ala Glu His Val Ala Asn Glu
 115 120 125

Gln Asn Ile Pro Ala Gly Lys Leu Leu Thr Ser Cys Ala Ala Val Phe
 130 135 140

Ser Tyr Phe Phe Ser Phe Arg Lys Asn Pro Gly Val Glu Phe Pro Phe
 145 150 155 160

Pro Ala Ile His Leu Pro Glu Val Glu Lys Val Lys Ile Arg Glu Ile
 165 170 175

ES 2 805 014 T3

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

<210> 4
<211> 458
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> UGT76G1 artificial expresado

10

<400> 4

ES 2 805 014 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 805 014 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Glu Pro Leu Pro Asp Gly Phe Leu Gly Glu Arg Gly Arg Ile Val
325 330 335

Lys Trp Val Pro Gln Gln Glu Val Leu Ala His Gly Ala Ile Gly Ala
340 345 350

Phe Trp Thr His Ser Gly Trp Asn Ser Thr Leu Glu Ser Val Cys Glu
355 360 365

Gly Val Pro Met Ile Phe Ser Asp Phe Gly Leu Asp Gln Pro Leu Asn
370 375 380

Ala Arg Tyr Met Ser Asp Val Leu Lys Val Gly Val Tyr Leu Glu Asn
385 390 395 400

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

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

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una composición de rebaudiósido I, que comprende:
 - 5 a. poner en contacto una composición de partida que comprende rebaudiósido A con un biocatalizador capaz de convertir el rebaudiósido A en rebaudiósido I para proporcionar una composición que comprende rebaudiósido I, en donde el biocatalizador es una UDP-glicosiltransferasa (UGT) que es una variante UGT76G1 seleccionada del grupo que consiste en
 - 10 UGT76G1-R1-F12 que comprende las mutaciones puntuales Q266E, P272A, R334K, G348P y L379G, UGT76G1-R2-B9 que comprende UGT76G1-R1-F12 que comprende mutaciones puntuales adicionales S42A, F46I e I407V, y
 - 15 UGT76G1-R3-G3 que comprende UGT76G1-R2-B9 que comprende mutaciones puntuales adicionales I46L, K303G y K393R.
 2. El método de la reivindicación 1, en donde el UGT se proporciona en la forma seleccionada de purificado, un lisado crudo o una suspensión celular entera.
 - 20 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde el UGT se proporciona en un microorganismo.
 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el rebaudiósido A se proporciona en forma pura, o en una mezcla de glucósido de esteviol o extracto de estevia que contiene al menos aproximadamente 50 % de rebaudiósido A en peso.
 - 25 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la composición de rebaudiósido I comprende más de aproximadamente 1 % de rebaudiósido I en peso.
 - 30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende adicionalmente separar el rebaudiósido I para proporcionar una composición de rebaudiósido I separada.
 7. El método de la reivindicación 6, que comprende adicionalmente purificar la composición de rebaudiósido I separada para proporcionar un rebaudiósido I altamente purificado, en donde el rebaudiósido I altamente purificado comprende más de aproximadamente 80 % de rebaudiósido I en peso.
 - 35 8. Un método para preparar una composición de rebaudiósido I altamente purificada, que comprende:
 - a. poner en contacto una composición de partida que comprende rebaudiósido A con una variante UGT76G1 seleccionada del grupo que consiste en UGT76G1-R1-F12, UGT76G1-R2-B9 y UGT76G1-R3-G3, y UDP-glucosa para formar una composición que comprende rebaudiósido I, y opcionalmente reciclar concomitantemente UDP-glucosa al proporcionar sacarosa sintasa y sacarosa;
 - 40 b. separar el rebaudiósido I para formar una composición de rebaudiósido I separada; y,
 - 45 c. purificar la composición de rebaudiósido I separada para proporcionar una composición de rebaudiósido I altamente purificada, en donde el rebaudiósido I altamente purificado comprende más de aproximadamente 80 % de rebaudiósido I en peso.
 - 50 9. El método de la reivindicación 8, que comprende adicionalmente:
 - a. poner en contacto una composición que comprende esteviósido con UGT76G1 y UDP-glucosa para proporcionar una composición que comprende rebaudiósido A, y
 - 55 b. separación del rebaudiósido A.
 10. El método de la reivindicación 8, que comprende adicionalmente:
 - a. poner en contacto una composición que comprende rubusósido con UGT91D2, o una variante del mismo que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de aproximadamente 75 % o más, y UDP-glucosa para proporcionar una composición que comprende esteviósido; y
 - 60 b. separar el esteviósido.

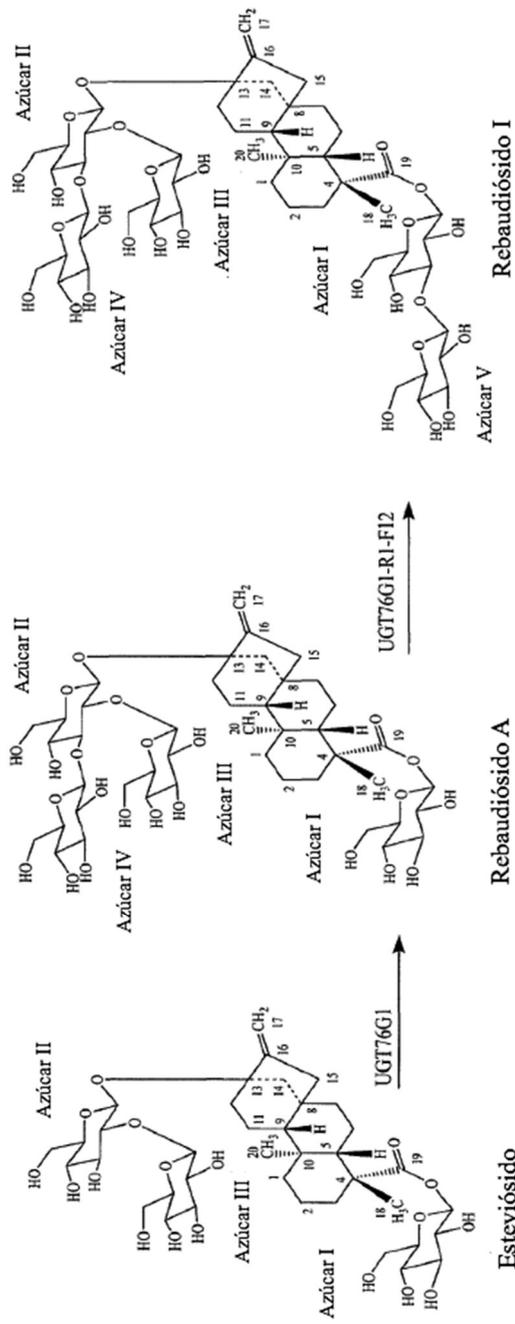


FIG. 1

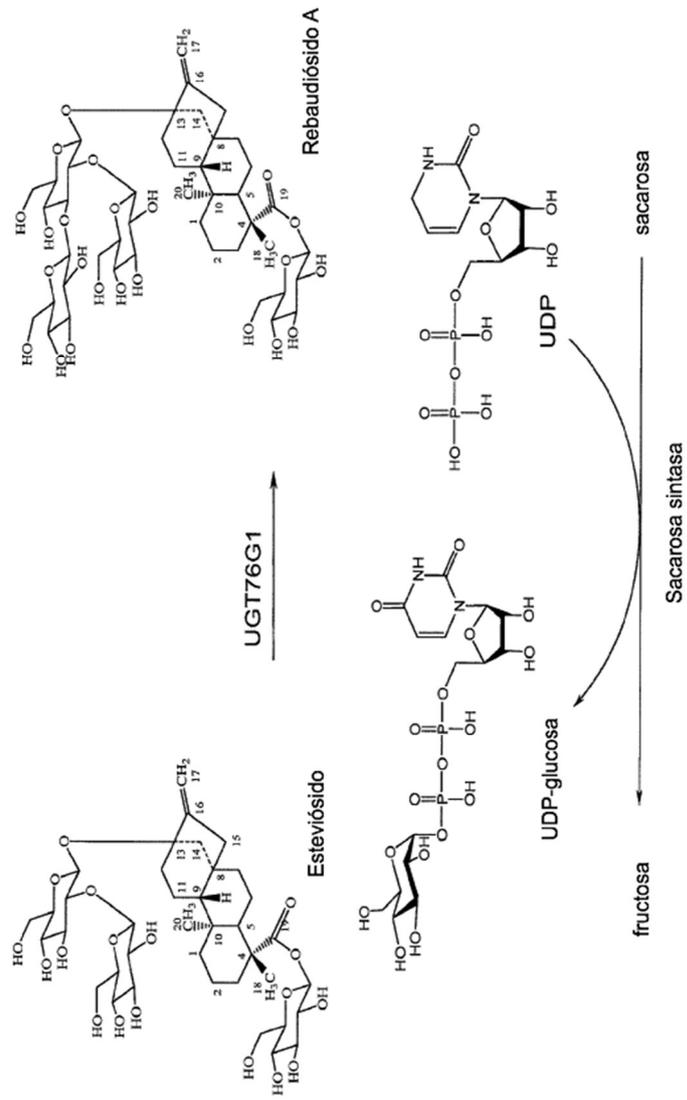


FIG. 2

Transformación catalizada de UGT76G1 de esteviósido a Reb A
medido por CAD

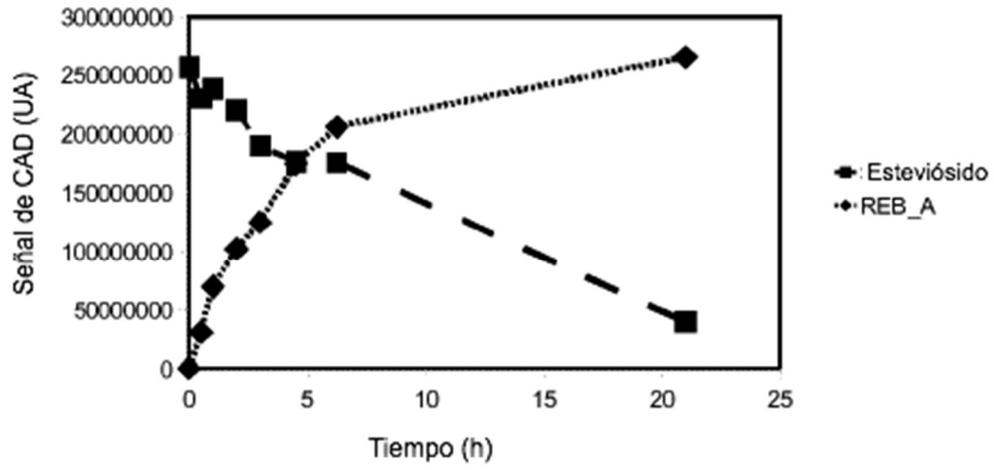


FIG. 3

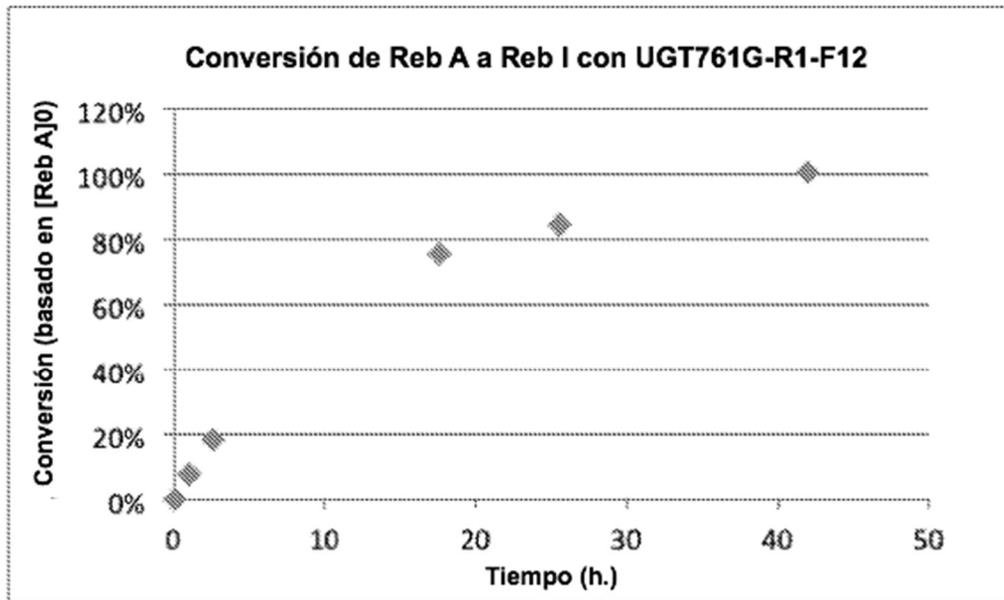


FIG. 4

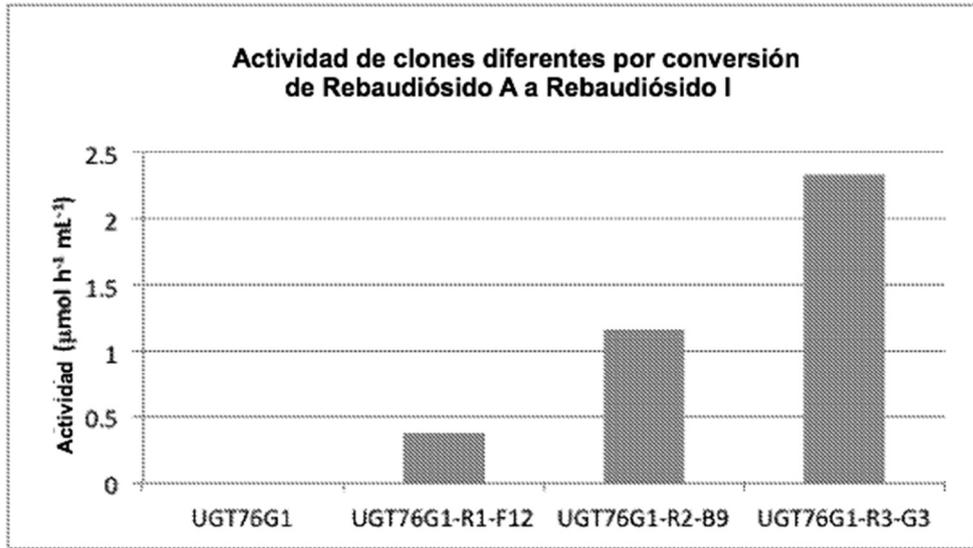


FIG. 5

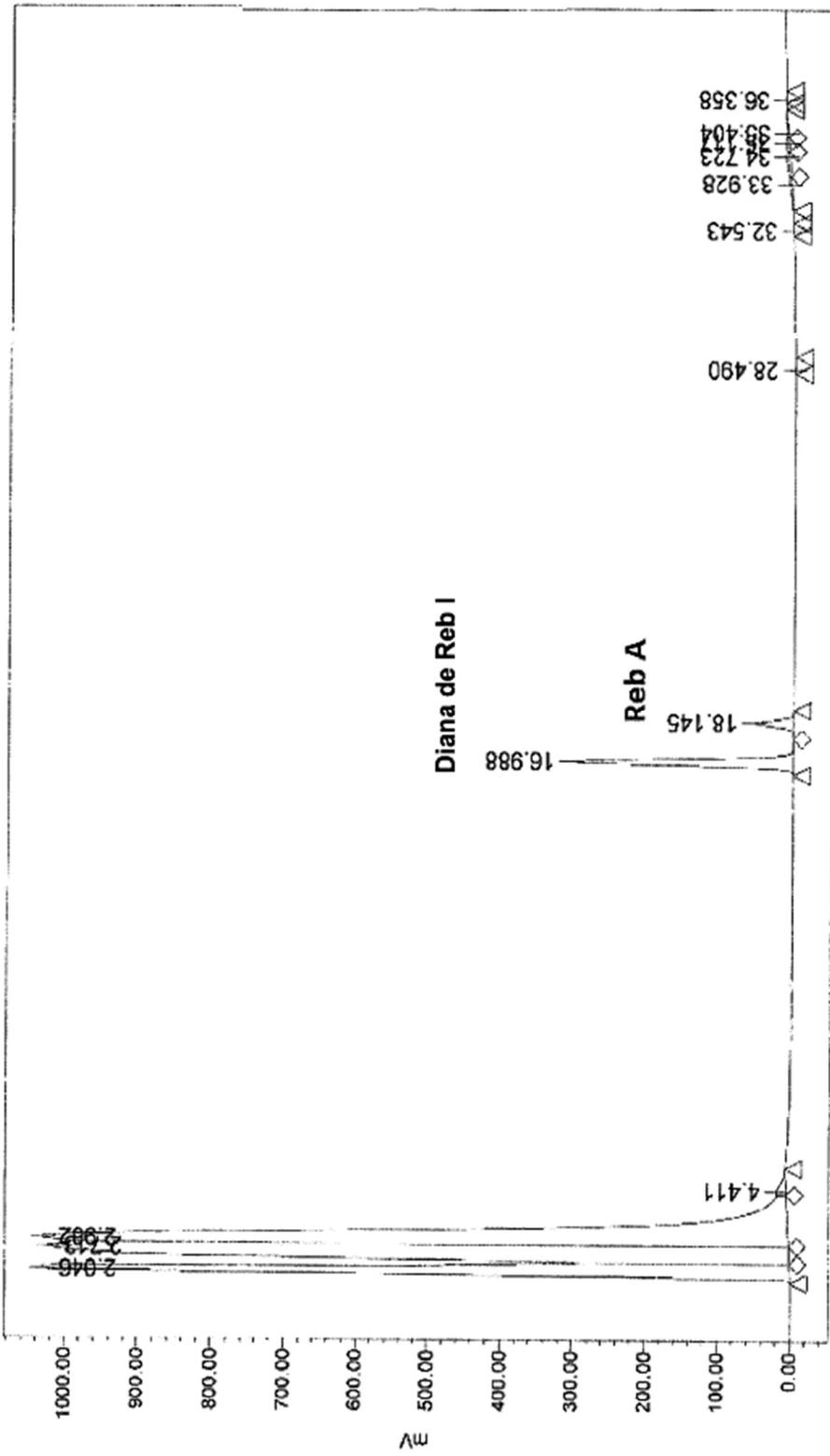
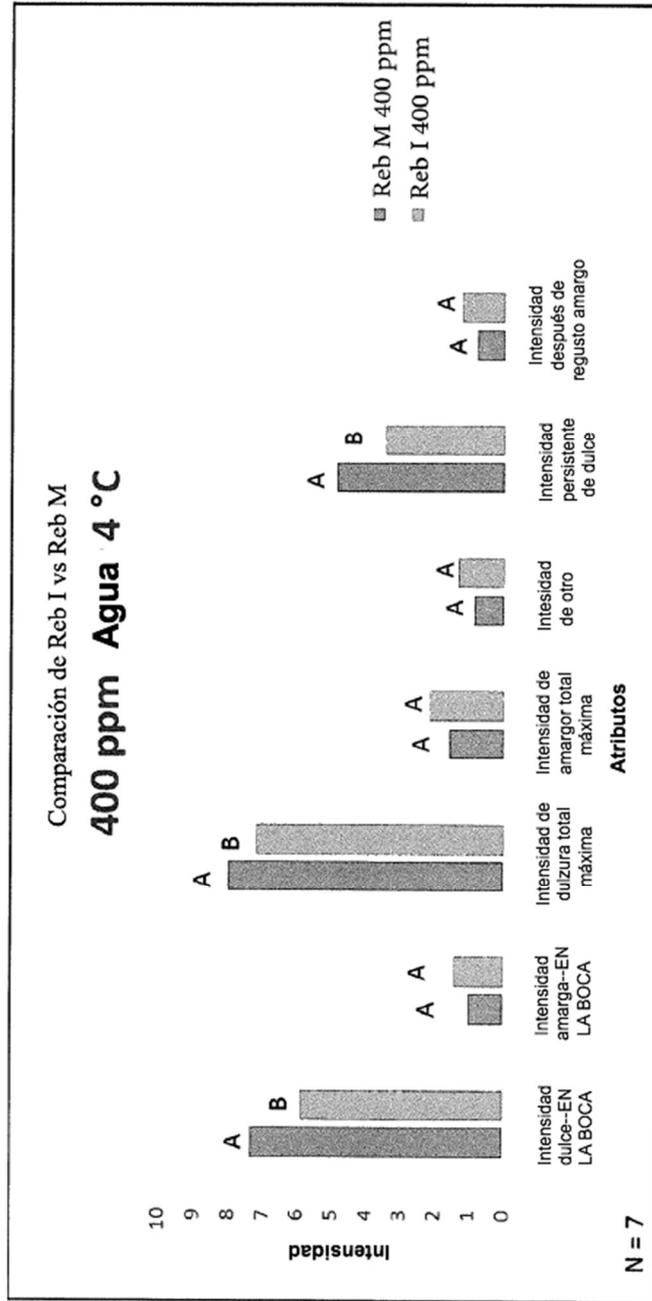


FIG. 6



Medias con niveles diferentes son significativamente diferentes

FIG. 7