

GLICÓSIDOS DE ESTEVIOL DE ALTA PUREZA

LISTADO DE SECUENCIAS

El archivo de texto titulado “39227_80PROV_Sequence_Listing_ST25.txt”, creado el 27 de noviembre de 2018, que tiene 15 kilobytes de datos, y presentado simultáneamente con el adjunto, se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad en esta solicitud.

CAMPO TÉCNICO

La presente invención se relaciona con un proceso para preparar composiciones que comprenden glicósidos de esteviol, que incluye composiciones de glicósido de esteviol altamente purificado.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los edulcorantes de alta intensidad tienen 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 productos dietéticos y reducidos en calorías, que incluyen 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 diabéticos y otros interesados en controlar su ingesta de carbohidratos.

Los glicósidos de esteviol son una clase de compuestos que se encuentran en las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, un arbusto perenne de la familia *Asteraceae* (*Compositae*), nativo de ciertas regiones de América del Sur. Se caracterizan estructuralmente por una base única, el esteviol, que se diferencia por la presencia de residuos de carbohidratos en las posiciones C13 y C19. Se acumulan en las hojas de *estevia* y componen aproximadamente el 10 %-20 % del peso seco total. En función al peso seco, los cuatro glicósidos principales encontrados en las hojas de *estevia* incluyen típicamente el esteviósido (9,1 %), el rebaudiósido A (3,8 %), el rebaudiósido C (0,6-1,0 %) y el dulcósido A (0,3 %). Otros glicósidos de esteviol conocidos incluyen el rebaudiósido B, C, D, E, F y M, el esteviolbiósido y el rubusósido.

Aunque se conocen métodos para preparar glicósidos de esteviol a partir de la *Stevia rebaudiana*, muchos de estos métodos no son adecuados para su uso comercial.

En consecuencia, persiste la necesidad de métodos simples, eficaces y económicos para preparar composiciones que comprenden glicósidos de esteviol, que incluyan

composiciones de glicósido de esteviol altamente purificado.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Las siguientes solicitudes se incorporan en la presente descripción como referencia en sus totalidades en esta solicitud: solicitud internacional núm. PCT/US2018/026920, presentada el 10 de abril de 2018; solicitud provisional de los EE. UU. núm. 62/644.065, presentada el 16 de marzo de 2018; y solicitud provisional de los EE. UU. núm. 62/644.407, presentada el 17 de marzo de 2018.

Como se usa en la presente descripción, el término abreviado “reb” se refiere a “rebaudiósido”. Ambos términos tienen el mismo significado y se pueden usar indistintamente.

Como se usa en la presente descripción, “biocatálisis” o “biocatalítico” se refiere al uso de catalizadores biológicos naturales o modificados, tales como enzimas o células que comprenden una o más enzimas, capaces de transformaciones químicas de una o múltiples etapas en compuestos orgánicos. Los procesos de biocatálisis incluyen procesos de fermentación, biosíntesis, bioconversión y biotransformación. Los métodos de biocatálisis de enzima aislada, así como de células

enteras, son conocidos en la técnica. Las enzimas proteicas catalizadoras biológicas pueden ser proteínas de origen natural o recombinantes.

Como se usa en la presente descripción, el término “glicósido(s) de esteviol” se refiere a un glicósido de esteviol, que incluye, pero no se limita a, glicósidos de esteviol de origen natural, p. ej., esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6, rebaudiósido E3, rebaudiósido D, rebaudiósido I, rebaudiósido AM, rebaudiósido D7, rebaudiósido M, rebaudiósido M4, rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m, rebaudiósido 1n, rebaudiósido 2a, glicósidos de esteviol sintéticos, p. ej., glicósidos de esteviol enzimáticamente glucosilados y combinaciones de estos.

Como se usa en la presente descripción, el término “SvG7” se refiere a cualquier glicósido de esteviol de origen natural o cualquier glicósido de esteviol sintético, que incluye los glicósidos de esteviol

enzimáticamente glucosilados y combinaciones de estos, específicamente una molécula que comprende esteviol que tiene siete residuos de glucosa unidos covalentemente que incluyen, pero no se limitan a, reb 1a, reb 1b, reb 1c, reb 1d, reb 1e, reb 1f, reb 1g, reb 1h, reb 1i, reb 1j, reb 1k, reb 1l, reb 1m, reb 1n y/o reb 2a. SvG7 puede referirse a un solo glicósido de esteviol que tiene siete residuos de glucosa unidos covalentemente o a una mezcla de glicósidos de esteviol que tiene siete residuos de glucosa unidos covalentemente.

La presente invención proporciona un proceso para preparar una composición que comprende un glicósido de esteviol objetivo al poner en contacto una composición de partida que comprende un sustrato orgánico con una célula microbiana y/o una preparación enzimática, y de esta manera producir una composición que comprende un glicósido de esteviol objetivo.

La composición de partida puede ser cualquier compuesto orgánico que comprende al menos un átomo de carbono. En una modalidad, la composición de partida se selecciona del grupo que consiste en glicósidos de esteviol, polioles o alcoholes de azúcar, varios carbohidratos.

El glicósido de esteviol objetivo puede ser cualquier glicósido de esteviol. En una modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el esteviolmonósido,

esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6, rebaudiósido E3, rebaudiósido D, rebaudiósido I, rebaudiósido AM, rebaudiósido D7, rebaudiósido M, rebaudiósido M4, rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m, rebaudiósido 1n, rebaudiósido 2a, SvG7 o un glicósido de esteviol sintético.

En una modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es un rebaudiósido 1a.

En una modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es un rebaudiósido 1b.

En una modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es un rebaudiósido 1c.

En una modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es un rebaudiósido 1d.

En una modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es un rebaudiósido 1e.

En una modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es un rebaudiósido 1f.

En una modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es un rebaudiósido 1g.

En una modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es un rebaudiósido 1h.

En una modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es un rebaudiósido 1i.

En una modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es un rebaudiósido 1j.

En una modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es un rebaudiósido 1k.

En una modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es un rebaudiósido 1l.

En una modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es un rebaudiósido 1m.

En una modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es un rebaudiósido 1n.

En una modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es un rebaudiósido 2a.

En una modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es un rebaudiósido M4.

En una modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es SvG7.

En algunas modalidades preferidas se usa la preparación enzimática que comprende una o más enzimas, o una célula microbiana que comprende una o más enzimas, capaces de convertir la composición de partida en

glicósidos de esteviol objetivo. La enzima puede estar ubicada en la superficie y/o dentro de la célula. La preparación enzimática se puede proporcionar en forma de una suspensión celular completa, un lisado crudo o como enzima(s) purificada(s). La preparación enzimática puede estar en forma libre o inmovilizada a un soporte sólido elaborado con materiales inorgánicos u orgánicos.

En algunas modalidades, una célula microbiana comprende las enzimas necesarias y los genes que las codifican para convertir la composición de partida en glicósidos de esteviol objetivo. En consecuencia, la presente invención también proporciona un proceso para preparar una composición que comprende un glicósido de esteviol objetivo al poner en contacto una composición de partida que comprende un sustrato orgánico con una célula microbiana que comprende al menos una enzima capaz de convertir la composición de partida en glicósidos de esteviol objetivo, y de esta manera producir un medio que comprende al menos un glicósido de esteviol objetivo.

Las enzimas necesarias para convertir la composición de partida en glicósidos de esteviol objetivo incluyen las enzimas de la biosíntesis de esteviol, NDP-glucosiltransferasas (NGT), ADP-glucosiltransferasas (AGT), CDP-glucosiltransferasas (CGT), GDP-glucosiltransferasas (GGT), TDP-glucosiltransferasas (TDP), UDP-glucosiltransferasas (UGT) y/o la enzima de

reciclado de NDP, la enzima de reciclado de ADP, la enzima de reciclado de CDP, la enzima de reciclado de GDP, la enzima de reciclado de TDP y/o la enzima de reciclado de UDP.

En una modalidad, las enzimas de la biosíntesis de esteviol incluyen enzimas de la ruta del mevalonato (MVA).

En otra modalidad, las enzimas de la biosíntesis de esteviol incluyen enzimas de la ruta del 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato no mevalonato (MEP/DOXP).

En una modalidad, las enzimas de la biosíntesis de esteviol se seleccionan del grupo que incluye geranilgeranil difosfato sintasa, copalil difosfato sintasa, kaureno sintasa, kaureno oxidasa, ácido kaurenoico 13-hidroxilasa (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 2,4-ciclodifosfato sintasa (MCS), 1-hidroxi-2-metil-2(E)-butenil 4-difosfato sintasa (HDS), L-hidroxi-2-metil-2(E)-butenil 4-difosfato reductasa (HDR), acetoacetil-CoA tiolasa, HMG-CoA reductasa truncada, mevalonato quinasa, fosfomevalonato quinasa, mevalonato pirofosfato decarboxilasa, citocromo P450 reductasa, etc.

La UDP-glucosiltransferasa puede ser cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviol y/o un sustrato de glicósido de esteviol para proporcionar el glicósido de esteviol objetivo.

Como se usa de aquí en adelante, el término “SuSy_AT”, a menos que se especifique de cualquier otra manera, se refiere a la sacarosa sintasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la “sec. con núm. de ident.:1” como se describe en el Ejemplo 1, o un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos sustancial (>85 %, >86 %, >87 %, >88 %, >89 %, >90 %, >91 %, >92 %, >93 %, >94 %, >95 %, >96 %, >97 %, >98 %, >99 %) con el polipéptido de la sec. con núm. de ident.:1, así como las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican esos polipéptidos.

Como se usa de aquí en adelante, el término “UGTS12”, a menos que se especifique de cualquier otra manera, se refiere a la UDP-glucosiltransferasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la “sec. con núm. de ident.:2” como se describe en el Ejemplo 1, o un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos sustancial (>85 %, >86 %, >87 %, >88 %, >89 %, >90 %, >91 %, >92 %, >93 %, >94 %, >95 %, >96 %, >97 %, >98 %, >99 %) con el

polipéptido de la sec. con núm. de ident.:2, así como las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican aquellos polipéptidos.

Como se usa de aquí en adelante, el término “UGT76G1”, a menos que se especifique de cualquier otra manera, se refiere a la UDP-glucosiltransferasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la “sec. con núm. de ident.:3” como se describe en el Ejemplo 1, o un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos sustancial (>85 %, >86 %, >87 %, >88 %, >89 %, >90 %, >91 %, >92 %, >93 %, >94 %, >95 %, >96 %, >97 %, >98 %, >99 %) con el polipéptido de la sec. con núm. de ident.:3, así como las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican aquellos polipéptidos.

En una modalidad, las enzimas de la biosíntesis de esteviol y las UDP-glucosiltransferasas se producen en una célula microbiana. La célula microbiana puede ser, por ejemplo, *E. coli*, *Saccharomyces* sp., *Aspergillus* sp., *Pichia* sp., *Bacillus* sp., *Yarrowia* sp. Etc. En otra modalidad, se sintetizan las UDP-glucosiltransferasas.

En una modalidad, la UDP-glucosiltransferasa se selecciona del grupo que incluye UGT74G1, UGT85C2, UGT76G1, UGT91D2, UGTS12, EUGT11 y UGT que tienen una identidad de secuencia de aminoácidos sustancial (>85 %, >86 %, >87 %, >88 %, >89 %, >90 %, >91 %, >92 %,

>93 %, >94 %, >95 %, >96 %, >97 %, >98 %, >99 %) con estos polipéptidos, así como moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican estas UGT.

En una modalidad, las enzimas de la biosíntesis de esteviol, las UGT, y el sistema de reciclado de UDP-glucosa están presentes en un microorganismo (célula microbiana). El microorganismo puede ser, por ejemplo, *E. coli*, *Saccharomyces* sp., *Aspergillus* sp., *Pichia* sp., *Bacillus* sp., *Yarrowia* sp.

En una modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviol o cualquier glicósido de esteviol de partida que tiene un grupo funcional -OH en C13 para dar un glicósido de esteviol objetivo que tiene un enlace glicosídico -O-glucosa beta glucopiranósido en C13. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT85C2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT85C2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviol o cualquier glicósido de esteviol de partida que tiene un grupo funcional -COOH en C19 para dar un glicósido de esteviol objetivo que tiene un enlace glicosídico -COO-glucosa beta glucopiranósido en C19. En una modalidad particular,

la UDP-glucosiltransferasa es UGT74G1, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT74G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa a cualquier glucosa existente en el lado C19 de cualquier glicósido de esteviol de partida para dar un glicósido de esteviol objetivo con al menos una glucosa adicional que tiene al menos un(os) enlace(s) glicosídico(s) beta 1→2 glucopiranosido en el(los) enlace(s) glicosídico(s) recientemente formado(s). En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa a cualquier glucosa existente en el lado C19 de cualquier glicósido de esteviol de partida para dar un glicósido de esteviol objetivo con al menos una glucosa adicional que tiene al menos un(os) enlace(s) glicosídico(s) beta 1→3 glucopiranosido en el(los)

enlace(s) glicosídico(s) recientemente formado(s). En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa a cualquier glucosa existente en el lado C19 de cualquier glicósido de esteviol de partida para dar un glicósido de esteviol objetivo con al menos una glucosa adicional que tiene al menos un(os) enlace(s) glicosídico(s) beta 1→4 glucopiranósido en el(los) enlace(s) glicosídico(s) recientemente formado(s). En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTSl2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTSl2. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGTl1, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGTl1. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2. En otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa a cualquier glucosa existente en el

lado C19 de cualquier glicósido de esteviol de partida para dar un glicósido de esteviol objetivo con al menos una glucosa adicional que tiene al menos un(os) enlace(s) glicosídico(s) beta 1→6 glucopiranosido en el(los) enlace(s) glicosídico(s) recientemente formado(s). En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa a cualquier glucosa existente en el lado C13 de cualquier glicósido de esteviol de partida para dar un glicósido de esteviol objetivo con al menos una glucosa adicional que tiene al menos un(os) enlace(s) glicosídico(s) beta 1→2 glucopiranosido en el(los) enlace(s) glicosídico(s) recientemente formado(s). En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun

otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa a cualquier glucosa existente en el lado C13 de cualquier glicósido de esteviol de partida para dar un glicósido de esteviol objetivo con al menos una glucosa adicional que tiene al menos un(os) enlace(s) glicosídico(s) beta 1→3 glucopiranosido en el(los) enlace(s) glicosídico(s) recientemente formado(s). En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa a cualquier glucosa existente en el lado C13 de cualquier glicósido de esteviol de partida para dar un glicósido de esteviol objetivo con al menos una glucosa adicional que tiene al menos un(os) enlace(s) glicosídico(s) beta 1→4 glucopiranosido en el(los) enlace(s) glicosídico(s) recientemente formado(s). En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que

tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2. En otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa a cualquier glucosa existente en el lado C13 de cualquier glicósido de esteviol de partida para dar un glicósido de esteviol objetivo con al menos una glucosa adicional que tiene al menos un(os) enlace(s) glicosídico(s) beta 1→6 glucopiranosido en el(los) enlace(s) glicosídico(s) recientemente formado(s). En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En una modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviol para formar

esteviolmonósido. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT85C2 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT85C2 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT85C2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviol para formar esteviolmonósido A. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT74G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT74G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviolmonósido para formar esteviolbiósido. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviolmonósido para

formar esteviolbiósido *D*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviolmonósido para formar rubusósido. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT74G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT74G1.

En una modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviolmonósido *A* para formar rubusósido. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT85C2 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT85C2 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT85C2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviolmonósido *A* para formar esteviolbiósido *A*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de

secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviolmonósido A para formar esteviolbiósido B. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviolbiósido para formar rebaudiósido B. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviolbiósido para formar esteviósido. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT74G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT74G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al

menos una unidad de glucosa al esteviolbiósido *D* para formar rebaudiósido *B*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviolbiósido *D* para formar rebaudiósido *G*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT74G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT74G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rubusósido para formar esteviósido. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular,

la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rubusósido para formar rebaudiósido G. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rubusósido para formar esteviósido A. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rubusósido para formar esteviósido B. En una modalidad particular, la UDP-

glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En una modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviolbiósido A para formar esteviósido A. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT85C2 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT85C2 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT85C2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviolbiósido A para formar esteviósido C. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En una modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviolbiósido B para formar esteviósido B. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT85C2 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT85C2 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT85C2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviolbiósido *B* para formar esteviósido *C*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *B* para formar rebaudiósido *A*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT74G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT74G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviósido para formar rebaudiósido *A*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al

menos una unidad de glucosa al esteviósido para formar rebaudiósido *E*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviósido para formar rebaudiósido *E2*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *G* para formar rebaudiósido *A*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que

tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *G* para formar rebaudiósido *E4*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *G* para formar rebaudiósido *E6*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviósido *A* para formar rebaudiósido *E*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En

otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviósido A para formar rebaudiósido E4. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviósido A para formar rebaudiósido E3. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviósido B para formar rebaudiósido E2. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de

aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviósido *B* para formar rebaudiósido *E6*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviósido *B* para formar rebaudiósido *E3*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En una modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa a esteviolbiósido *C* para formar rebaudiósido *E3*. En una modalidad particular, la

UDP-glucosiltransferasa es UGT85C2 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT85C2 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT85C2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *A* para formar rebaudiósido *D*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *A* para formar rebaudiósido *I*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *E* para formar rebaudiósido *D*. En una modalidad particular, la UDP-

glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido E para formar rebaudiósido AM. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido E2 para formar rebaudiósido I. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido E2 para formar rebaudiósido AM. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es

UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *E4* para formar rebaudiósido *D*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *E4* para formar rebaudiósido *D7*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *E6* para formar rebaudiósido *I*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que

tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *E6* para formar rebaudiósido *D7*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *E3* para formar rebaudiósido *AM*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es

EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *E3* para formar rebaudiósido *D7*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *D* para formar rebaudiósido *M*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *I* para formar rebaudiósido *M*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de

aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido AM para formar rebaudiósido M. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido AM para formar rebaudiósido M4. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *D7* para formar rebaudiósido *M*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *1a*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al

menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *1b*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *1c*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *1d*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que

tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *1e*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *1f*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *1g*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En

otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *1h*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *1i*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al

menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *1j*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *1k*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *1l*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que

tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *1m*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *1n*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M4* para formar rebaudiósido *2a*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

Opcionalmente, el método de la presente invención comprende además el reciclado de UDP para proporcionar UDP-glucosa. En una modalidad, el método comprende el reciclado de UDP al proporcionar un catalizador de reciclado y un sustrato de reciclado, de manera tal que la biotransformación del esteviol y/o el sustrato de glicósido de esteviol al glicósido de esteviol objetivo se realiza usando cantidades catalíticas de UDP-glucosiltransferasa y UDP-glucosa.

En una modalidad, el catalizador de reciclado es la sacarosa sintasa SuSy_At o una sacarosa sintasa que

tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con SuSy_At.

En una modalidad, el sustrato de reciclado para el catalizador de reciclado de UDP-glucosa es la sacarosa.

Opcionalmente, el método de la presente invención comprende además el uso de transglicosidasas que usan oligo o polisacáridos como donantes de azúcar para modificar moléculas receptoras de glicósido de esteviol objetivo. Los ejemplos no limitantes incluyen la ciclodextrina glicosiltransferasa (CGTasa), fructofuranosidasa, amilasa, sacarasa, glucosucrasa, beta-h-fructosidasa, beta-fructosidasa, sucrasa, fructosilinvertasa, invertasa alcalina, invertasa ácida, fructofuranosidasa. En algunas modalidades, la glucosa y el(los) azúcar(es) distintos de la glucosa, que incluyen pero no se limitan a la fructosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, desoxiglucosa y galactosa se transfieren a los glicósidos de esteviol objetivo receptores. En una modalidad, el glicósido de esteviol receptor es el rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m y/o rebaudiósido 1n. En otra modalidad, el glicósido de esteviol receptor es el rebaudiósido 2a.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol receptor es el rebaudiósido M4. En otra modalidad, el glicósido de esteviol receptor es SvG7.

Opcionalmente, el método de la presente invención comprende además separar el glicósido de esteviol objetivo del medio para proporcionar una composición de glicósido de esteviol objetivo altamente purificado. El glicósido de esteviol objetivo puede separarse mediante al menos un método adecuado, tal como, por ejemplo, la cristalización, la separación por membranas, la centrifugación, la extracción, la separación cromatográfica o una combinación de tales métodos.

En una modalidad, el glicósido de esteviol objetivo puede producirse dentro del microorganismo. En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo puede secretarse fuera del medio. En otra modalidad con relación a otra, el glicósido de esteviol liberado puede quitarse continuamente del medio. En aun otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo se separa después de la terminación de la reacción de conversión.

En una modalidad, la separación produce una composición que comprende más de aproximadamente 80 % en peso del glicósido de esteviol objetivo en base anhidra, es decir, una composición de glicósido de esteviol altamente purificado. En otra modalidad, la separación produce una

composición que comprende más de aproximadamente 90 % en peso del glicósido de esteviol objetivo. En modalidades particulares, la composición comprende más de aproximadamente 95 % en peso del glicósido de esteviol objetivo. En otras modalidades, la composición comprende más de aproximadamente 99 % en peso del glicósido de esteviol objetivo.

El glicósido de esteviol objetivo puede estar en cualquier forma polimórfica o amorfa, que incluye hidratos, solvatos, anhidro o combinaciones de estos.

Los glicósidos de esteviol objetivo purificados pueden usarse en productos consumibles como un edulcorante, un modificador del sabor, un sabor con propiedades modificadoras y/o un supresor de espuma. Los productos de consumo adecuados incluyen, pero no se limitan a, alimentos, bebidas, composiciones farmacéuticas, productos de tabaco, composiciones nutracéuticas, composiciones para la higiene bucal y composiciones cosméticas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1a a la Figura 1o muestran la estructura química de algunos glicósidos de esteviol SvG7 rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g,

rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m, rebaudiósido 1n y rebaudiósido 2a respectivamente.

Figura 1p muestra la estructura química del rebaudiósido M4.

Figura 2a a la Figura 2k muestran las rutas para producir rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m, rebaudiósido 1n, rebaudiósido 2a, rebaudiósido M4 y varios glicósidos de esteviol a partir de esteviol y varios glicósidos de esteviol intermedios.

Figura 3a a la Figura 3n muestran la producción biocatalítica de rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m y rebaudiósido 1n, respectivamente, del rebaudiósido A usando las enzimas UGTSl2 y UGT76G1 y el reciclado concomitante de UDP a UDP-glucosa a través de la sacarosa sintasa SuSy_At.

Figura 3o y la Figura 3p muestran la producción biocatalítica de rebaudiósido 2a y rebaudiósido M4, respectivamente, a partir de esteviósido usando las enzimas UGTSl2 y UGT76G1 y el reciclado concomitante de

UDP a UDP-glucosa a través de la sacarosa sintasa SuSy_At.

Figura 3q y la Figura 3r muestran la producción biocatalítica de rebaudiósido 2a y rebaudiósido M4, respectivamente, a partir de rebaudiósido AM usando las enzimas UGTSl2 y UGT76G1 y el reciclado concomitante de UDP a UDP-glucosa a través de la sacarosa sintasa SuSy_At.

Figura 3s muestra la producción biocatalítica de rebaudiósido 2a partir del rebaudiósido M4 usando las enzimas UGTSl2 y UGT76G1 y el reciclado concomitante de UDP a UDP glucosa a través de la sacarosa sintasa SuSy_At.

Figura 4 muestra el cromatograma HPLC de esteviósido. El pico con tiempo de retención de 20,958 minutos corresponde al esteviósido. El pico con tiempo de retención de 20,725 minutos corresponde al rebaudiósido A. El pico a 32,925 minutos corresponde al rebaudiósido B. El pico a 33,930 minutos corresponde al esteviolbiósido.

Figura 5 muestra el cromatograma HPLC del producto de la producción biocatalítica de las moléculas de SvG7 a partir de esteviósido. El pico a 6,459 minutos corresponde al rebaudiósido 2a. El pico a los 9,825 minutos corresponde al rebaudiósido AM. El pico a los 13,845 minutos corresponde al rebaudiósido M. El pico a

32,974 minutos corresponde al rebaudiósido B. El pico a 33,979 minutos corresponde al esteviolbiósido.

Figura 6 muestra el cromatograma HPLC de rebaudiósido 2a después de la purificación mediante HPLC. El pico con tiempo de retención de 6,261 minutos corresponde al rebaudiósido 2a.

Figura 7 muestra el espectro ^1H NMR del rebaudiósido 2a (500 MHz, piridina- d_5).

Figura 8 muestra el espectro HSQC del rebaudiósido 2a (500 MHz, piridina- d_5).

Figura 9 muestra el espectro H,H COSY del rebaudiósido 2a (500 MHz, piridina- d_5).

Figura 10 muestra el espectro HMBC del rebaudiósido 2a (500 MHz, piridina- d_5).

Figura 11a muestra el espectro HSQC-TOCSY del rebaudiósido 2a (500 MHz, piridina- d_5). Figura 11b muestra el espectro 1D-NOESY del rebaudiósido 2a (500 MHz, piridina- d_5).

Figura 12a y la Figura 12b muestran el cromatograma LC y el espectro de masa del rebaudiósido 2a respectivamente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención proporciona un proceso para preparar una composición que comprende un glicósido de esteviol objetivo al poner en contacto una composición de partida que comprende un sustrato orgánico con una célula microbiana y/o una preparación enzimática, y de esta manera producir una composición que comprende un glicósido de esteviol objetivo.

Un objeto de la invención es proporcionar un método biocatalítico eficiente para preparar glicósidos de esteviol objetivo, particularmente el esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6, rebaudiósido E3, rebaudiósido D, rebaudiósido I, rebaudiósido AM, rebaudiósido D7, rebaudiósido M, rebaudiósido M4, rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m, rebaudiósido 1n, rebaudiósido 2a y/o

SvG7 o un glicósido de esteviol sintético de varias composiciones de partida.

Composición de partida

Como se usa en la presente descripción, “composición de partida” se refiere a cualquier composición (generalmente una solución acuosa) que contiene uno o más compuestos orgánicos que comprenden al menos un átomo de carbono.

En una modalidad, la composición de partida se selecciona del grupo que consiste en esteviol, glicósidos de esteviol, polioles y varios carbohidratos.

La composición de partida del glicósido de esteviol se selecciona del grupo que consiste en esteviol, esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6, rebaudiósido E3, rebaudiósido D, rebaudiósido I, rebaudiósido AM, rebaudiósido D7, rebaudiósido M y/o rebaudiósido M4 u otro glicósido de esteviol que se produce en la planta *Stevia rebaudiana*, glicósidos de esteviol sintéticos, p. ej., glicósidos de esteviol glucosilados enzimáticamente y combinaciones de estos.

En una modalidad, la composición de partida es el esteviol.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol de la composición de partida es el esteviolmonósido.

En aun otra modalidad, el glicósido de esteviol de la composición de partida es el esteviolmonósido A.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol de la composición de partida es el esteviolbiósido.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol de la composición de partida es el esteviolbiósido D.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol de la composición de partida es el rubusósido.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol de la composición de partida es el rubusósido.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol de la composición de partida es el esteviolbiósido A.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol de la composición de partida es el esteviolbiósido B.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol de la composición de partida es el rebaudiósido B.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol de la composición de partida es el esteviósido.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol de la composición de partida es el rebaudiósido G.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol de la composición de partida es el esteviósido A.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol de la composición de partida es el esteviósido *B*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol de la composición de partida es el esteviósido *C*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol de la composición de partida es el rebaudiósido *A*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol de la composición de partida es el rebaudiósido *E*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol de la composición de partida es el rebaudiósido *E2*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol de la composición de partida es el rebaudiósido *E4*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol de la composición de partida es el rebaudiósido *E6*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol de la composición de partida es el rebaudiósido *E3*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol de la composición de partida es el rebaudiósido *D*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol de la composición de partida es el rebaudiósido *I*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol de la composición de partida es el rebaudiósido *AM*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol de la composición de partida es el rebaudiósido *D7*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol de la composición de partida es el rebaudiósido *M*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol de la composición de partida es el rebaudiósido *M4*.

El término “poliol” 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 hidroxilos, respectivamente. Un poliol también puede contener más de cuatro grupos hidroxilos, tales como un pentaol, hexaol, heptaol o lo similar, que contienen 5, 6 o 7 grupos hidroxilos, respectivamente. Adicionalmente, 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. Los ejemplos de polioles incluyen, pero no se limitan a, eritritol, maltitol, manitol, sorbitol, lactitol, xilitol, inositol, isomalta, propilenglicol, glicerol, treitol, galactitol, isomaltulosa hidrogenada, isomalto-oligosacáridos reducidos, xilooligosacáridos reducidos, gentio-oligosacáridos reducidos, jarabe de maltosa reducida, jarabe de glucosa reducida, hidrolizados de almidón hidrogenado, poliglicitoles y alcoholes de azúcar o cualquier otro carbohidrato capaz de reducirse.

El término “carbohidrato” se refiere a los compuestos de aldehído o cetona sustituidos con múltiples grupos hidroxilos, de la fórmula general $(CH_2O)_n$, en donde

n es 3-30, así como sus oligómeros y polímeros. Además, los carbohidratos de la presente invención pueden sustituirse o desoxigenarse en una o más posiciones. Como se usan en la presente descripción, los carbohidratos abarcan los carbohidratos no modificados, los derivados de carbohidratos, los carbohidratos sustituidos y los carbohidratos modificados. Como se usa en la presente descripción, las frases “derivados de carbohidrato”, “carbohidrato sustituido” y “carbohidratos modificados” son sinónimos. El carbohidrato modificado significa cualquier carbohidrato en donde al menos un átomo ha sido añadido, quitado, o sustituido, o combinaciones de estos. Por lo tanto, los derivados de carbohidratos o carbohidratos sustituidos incluyen monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos sustituidos y no sustituidos. Los derivados de carbohidratos o los carbohidratos sustituidos opcionalmente pueden ser desoxigenados en cualquier posición C correspondiente y/o sustituidos con una o más porciones tales como el hidrógeno, halógeno, haloalquilo, carboxilo, acilo, aciloxi, amino, amido, derivados de carboxilo, alquilamino, dialquilamino, arilamina, alcoxi, ariloxilo, nitro, ciano, sulfo, mercapto, imino, sulfonilo, sulfenilo, sulfinilo, sulfamoílo, carboalcoxi, carboxamida, fosfonilo, fosfinilo, fosforilo, fosfino, tioéster, tioéter, oximino, hidrazina, carbamilo, fosfo,

fosfonato, o cualquier otro grupo funcional viable que proporcione las funciones del derivado de carbohidrato o carbohidrato sustituido para mejorar el sabor dulce de la composición del edulcorante.

Los ejemplos de carbohidratos que pueden usarse de acuerdo con esta invención incluyen, pero no se limitan a, la tagatosa, trehalosa, galactosa, ramnosa, diversas ciclodextrinas, oligosacáridos cíclicos, diversos tipos de maltodextrinas, dextrano, sacarosa, glucosa, ribulosa, fructosa, treosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, manosa, idosa, lactosa, maltosa, azúcar invertido, isotrehalosa, neotrehalosa, isomaltulosa, eritrosa, desoxirribosa, gulosa, idosa, talosa, eritrulosa, xilulosa, psicosa, turanosa, celobiosa, amilopectina, glucosamina, manosamina, fucosa, ácido glucurónico, ácido glucónico, glucono-lactona, abequosa, galactosamina, oligosacáridos de remolacha, isomalto-oligosacáridos (isomaltosa, isomaltotriosa, panosa y lo similar), xilooligosacáridos (xilotriosa, xilobiosa y lo similar), oligosacáridos terminados en xilo, gentio-oligosacáridos (gentiobiosa, gentiotriosa, gentiotetraosa y lo similar), sorbosa, nigero-oligosacáridos, oligosacáridos palatinosa, fructooligosacáridos (kestosa, nistosa y lo similar), maltotetraol, maltotriol, malto-oligosacáridos (maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa, maltohexaosa, maltoheptaosa y lo similar), almidón, inulina, inulo-

oligosacáridos, lactulosa, melibiosa, rafinosa, ribosa, azúcares líquidos isomerizados tales como jarabes de maíz altos en fructosa, azúcares de acoplamiento y oligosacáridos de frijol de soja. Además, como se usan en la presente descripción, los carbohidratos, pueden estar en la configuración D o L.

La composición de partida puede ser sintética o purificada (parcial o totalmente), comercialmente disponible o preparada.

En una modalidad, la composición de partida es el glicerol.

En otra modalidad, la composición de partida es la glucosa.

En otra modalidad, la composición de partida es la ramnosa.

En aun otra modalidad, la composición de partida es la sacarosa.

En aun otra modalidad, la composición de partida es el almidón.

En otra modalidad, la composición de partida es la maltodextrina.

En aun otra modalidad, la composición de partida es la celulosa.

En aun otra modalidad, la composición de partida es la amilosa.

El(los) compuesto(s) orgánico(s) de la composición de partida sirve(n) como sustrato(s) para la producción del(de los) glicósido(s) de esteviol objetivo, como se describe en la presente descripción.

Glicósido de esteviol objetivo

El glicósido de esteviol objetivo del presente método puede ser cualquier glicósido de esteviol que pueda prepararse mediante el proceso descrito en la presente descripción. En una modalidad, el glicósido de esteviol objetivo se selecciona del grupo que consiste en esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6, rebaudiósido E3, rebaudiósido D, rebaudiósido I, rebaudiósido AM, rebaudiósido D7, rebaudiósido M, rebaudiósido M4, rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m, rebaudiósido 1n, rebaudiósido 2a, SvG7 u otro glicósido de esteviol que se produce en la planta *Stevia rebaudiana*, glicósidos de esteviol sintéticos, p.

ej., glicósidos de esteviol enzimáticamente glucosilados y combinaciones de estos.

En una modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el esteviolmonósido.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el esteviolmonósido A.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el esteviolbiósido.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el esteviolbiósido *D*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rubusósido.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el esteviolbiósido A.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el esteviolbiósido *B*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido *B*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el esteviósido.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido *G*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el esteviósido A.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el esteviósido *B*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el esteviósido *C*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido *A*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido *E*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido *E2*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido *E4*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido *E6*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido *E3*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido *D*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido *I*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido *AM*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido *D7*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido *M*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido *M4*.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido 1a.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido 1b.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido 1c.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido 1d.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido 1e.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido 1f.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido 1g.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido 1h.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido 1i.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido 1j.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido 1k.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido 1l.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido 1m.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido 1n.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido 2a.

En otra modalidad, el glicósido de esteviol objetivo es el SvG7.

El glicósido de esteviol objetivo puede estar en cualquier forma polimórfica o amorfa, que incluye hidratos, solvatos, anhidro o combinaciones de estos.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de esteviolmonósido.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de esteviolmonósido A.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de esteviolbiósido.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de esteviolbiósido D.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rubusósido.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de esteviolbiósido A.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de esteviolbiósido *B*.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *B*.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de esteviósido.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *G*.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de esteviósido *A*.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de esteviósido *B*.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de esteviósido *C*.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *A*.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *E*.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *E2*.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *E4*.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *E6*.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *E3*.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *D*.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *I*.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *AM*.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *D7*.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *E3*.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *M*.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *M4*.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido
1a.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido
1b.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido
1c.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido
1d.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido
1e.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido
1f.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido
1g.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido
1h.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido 1i.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido 1j.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido 1k.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido 1l.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido 1m.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido 1n.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido 2a.

En una modalidad, la presente invención es un proceso biocatalítico para la producción de SvG7.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la

producción de rebaudiósido 1a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido A y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido 1b partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido A y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido 1c partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido A y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido 1d partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido A y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido 1e partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido A y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido 1f a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido A y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido 1g a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido A y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *1h* a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido A y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *1i* a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido A y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *1j* a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido A y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *1k* a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido A y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *1l* a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido A y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *1m* a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido A y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la

producción de rebaudiósido *1n* a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido *A* y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *2a* a partir de una composición de partida que comprende esteviósido y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *M4* a partir de una composición de partida que comprende esteviósido y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *2a* a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido *AM* y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *M4* a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido *AM* y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *2a* a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido *M4* y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *1a* a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido *M* y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *1b* a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido *M* y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *1c* a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido *M* y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *1d* a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido *M* y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *1e* a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido *M* y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *1f* a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido *M* y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *1g* a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido *M* y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la

producción de rebaudiósido *1h* a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido *M* y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *1i* a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido *M* y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *1j* a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido *M* y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *1k* a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido *M* y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *1l* a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido *M* y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *1m* a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido *M* y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido *1n* a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido *M* y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de rebaudiósido 2a a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido *M4* y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de *SvG7* a partir de una composición de partida que comprende esteviósido y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de *SvG7* a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido *A* y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de *SvG7* a partir de una composición de partida que comprende esteviósido, rebaudiósido *A* y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de *SvG7* a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido *AM* y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la producción de *SvG7* a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido *M* y UDP-glucosa.

En una modalidad particular, la presente invención proporciona el proceso biocatalítico para la

producción de SvG7 a partir de una composición de partida que comprende rebaudiósido *M4* y UDP-glucosa.

Opcionalmente, el método de la presente invención comprende además separar el glicósido de esteviol objetivo del medio para proporcionar una composición de glicósido de esteviol objetivo altamente purificado. El glicósido de esteviol objetivo puede separarse mediante cualquier método adecuado, tal como, por ejemplo, la cristalización, la separación por membranas, la centrifugación, la extracción, la separación cromatográfica o una combinación de tales métodos.

En modalidades particulares, el proceso descrito en la presente descripción produce una composición de glicósido de esteviol objetivo altamente purificado. El término “altamente purificado”, como se usa en la presente descripción, se refiere a una composición que tiene más de aproximadamente 80 % en peso del glicósido de esteviol objetivo en base anhidra (seca). En una modalidad, la composición de glicósido de esteviol objetivo altamente purificado contiene más de aproximadamente 90 % en peso del glicósido de esteviol objetivo sobre una base anhidra (seca), tal como, por ejemplo, más de aproximadamente 91 %, más de aproximadamente 92 %, más de aproximadamente 93 %, más de aproximadamente 94 %, más de aproximadamente 95 %, más de aproximadamente 96 %, más de aproximadamente

97 %, más de aproximadamente 98 % o más de aproximadamente 99 % de contenido de glicósido de esteviol objetivo sobre una base seca.

En una modalidad, cuando el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido *M4*, el proceso descrito en la presente descripción proporciona una composición que tiene más de aproximadamente 90 % de contenido de rebaudiósido *M4* en peso sobre una base seca. En otra modalidad particular, cuando el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido *M4*, el proceso descrito en la presente descripción proporciona una composición que comprende más de aproximadamente 95 % de contenido en peso sobre una base seca.

En una modalidad, cuando el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido *2a*, el proceso descrito en la presente descripción proporciona una composición que tiene más de aproximadamente 90 % de contenido de rebaudiósido *2a* en peso sobre una base seca. En otra modalidad particular, cuando el glicósido de esteviol objetivo es el rebaudiósido *2a*, el proceso descrito en la presente descripción proporciona una composición que comprende más de aproximadamente 95 % de contenido en peso sobre una base seca.

En una modalidad, cuando el glicósido de esteviol objetivo es el *SvG7*, el proceso descrito en la presente descripción proporciona una composición que

tiene más de aproximadamente 90 % de contenido de SvG7 en peso sobre una base seca. En otra modalidad particular, cuando el glicósido de esteviol objetivo es el SvG7, el proceso descrito en la presente descripción proporciona una composición que comprende más de aproximadamente 95 % de contenido de SvG7 en peso sobre una base seca.

Microorganismos y preparaciones enzimáticas

En una modalidad de la presente invención, un microorganismo (célula microbiana) y/o preparación enzimática se pone en contacto con un medio que contiene la composición de partida para producir glicósidos de esteviol objetivo.

La enzima se puede proporcionar en forma de una suspensión celular completa, un lisado crudo, una enzima purificada o una combinación de estos. En una modalidad, el catalizador biológico es una enzima purificada capaz de convertir la composición de partida en el glicósido de esteviol objetivo. En otra modalidad, el catalizador biológico es un lisado crudo que comprende al menos una enzima capaz de convertir la composición de partida en el glicósido de esteviol objetivo. En aun otra modalidad, el catalizador biológico es una suspensión celular completa que comprende al menos una enzima capaz de convertir la composición de partida en el glicósido de esteviol objetivo.

En otra modalidad, el catalizador biológico es una o más células microbianas que comprenden la(s) enzima(s) capaz(es) de convertir la composición de partida en el glicósido de esteviol objetivo. La enzima puede estar ubicada en la superficie de la célula, dentro de la célula o ubicada tanto en la superficie de la célula como en el interior de la célula.

Las enzimas adecuadas para convertir la composición de partida en glicósidos de esteviol objetivo incluyen, pero no se limitan a, las enzimas de la biosíntesis de esteviol, las NDP-glucosiltransferasas (NGT), las ADP-glucosiltransferasas (AGT), las CDP-glucosiltransferasas (CGT), las GDP-glucosiltransferasas (GGT), las TDP-glucosiltransferasas (TDP), las UDP-glucosiltransferasas (UGT). Opcionalmente, puede incluir enzima(s) de reciclado de NDP, enzima(s) de reciclado de ADP, enzima(s) de reciclado de CDP, enzima(s) de reciclado de GDP, enzima(s) de reciclado de TDP y/o enzima(s) de reciclado de UDP.

En una modalidad, las enzimas de la biosíntesis de esteviol incluyen enzimas de la ruta del mevalonato (MVA).

En otra modalidad, las enzimas de la biosíntesis de esteviol incluyen enzimas de la ruta del 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato no mevalonato (MEP/DOXP).

En una modalidad, las enzimas de la biosíntesis de esteviol se seleccionan del grupo que incluye geranilgeranil difosfato sintasa, copalil difosfato sintasa, kaureno sintasa, kaureno oxidasa, ácido kaurenoico 13-hidroxilasa (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 2,4-ciclodifosfato sintasa (MCS), 1-hidroxi-2-metil-2(E)-butenil 4-difosfato sintasa (HDS), L-hidroxi-2-metil-2(E)-butenil 4-difosfato reductasa (HDR), acetoacetil-CoA tiolasa, HMG-CoA reductasa truncada, mevalonato quinasa, fosfomevalonato quinasa, mevalonato pirofosfato decarboxilasa, citocromo P450 reductasa, etc.

La UDP-glucosiltransferasa puede ser cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviol y/o un sustrato de glicósido de esteviol para proporcionar el glicósido de esteviol objetivo.

En una modalidad, las enzimas de la biosíntesis de esteviol y las UDP-glucosiltransferasas se producen en una célula microbiana. La célula microbiana puede ser, por ejemplo, *E. coli*, *Saccharomyces* sp., *Aspergillus* sp.,

Pichia sp., *Bacillus* sp., *Yarrowia* sp. Etc. En otra modalidad, se sintetizan las UDP-glucosiltransferasas.

En una modalidad, la UDP-glucosiltransferasa se selecciona del grupo que incluye UGT74G1, UGT85C2, UGT76G1, UGT91D2, UGTS12, EUGT11 y UGT que tienen una identidad de secuencia de aminoácidos sustancial (>85 %, >86 %, >87 %, >88 %, >89 %, >90 %, >91 %, >92 %, >93 %, >94 %, >95 %, >96 %, >97 %, >98 %, >99 %) con estos polipéptidos, así como moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican estas UGT.

En una modalidad, las enzimas de la biosíntesis de esteviol, las UGT, y el sistema de reciclado de UDP-glucosa están presentes en un microorganismo (célula microbiana). El microorganismo puede ser, por ejemplo, *E. coli*, *Saccharomyces* sp., *Aspergillus* sp., *Pichia* sp., *Bacillus* sp., *Yarrowia* sp.

En una modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviol o cualquier glicósido de esteviol de partida que tiene un grupo funcional -OH en C13 para dar un glicósido de esteviol objetivo que tiene un enlace glicosídico -O-glucosa beta glucopiranósido en C13. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT85C2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT85C2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviol o cualquier glicósido de esteviol de partida que tiene un grupo funcional -COOH en C19 para dar un glicósido de esteviol objetivo que tiene un enlace glicosídico -COO-glucosa beta glucopiranósido en C19. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT74G1, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT74G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa a cualquier glucosa existente en el lado C19 de cualquier glicósido de esteviol de partida para dar un glicósido de esteviol objetivo con al menos una glucosa adicional que tiene al menos un(os) enlace(s) glicosídico(s) beta 1→2 glucopiranósido en el(los) enlace(s) glicosídico(s) recientemente formado(s). En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTSl2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTSl2. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa a cualquier glucosa existente en el lado C19 de cualquier glicósido de esteviol de partida para dar un glicósido de esteviol objetivo con al menos una glucosa adicional que tiene al menos un(os) enlace(s) glicosídico(s) beta 1→3 glucopiranosido en el(los) enlace(s) glicosídico(s) recientemente formado(s). En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa a cualquier glucosa existente en el lado C19 de cualquier glicósido de esteviol de partida para dar un glicósido de esteviol objetivo con al menos una glucosa adicional que tiene al menos un(os) enlace(s) glicosídico(s) beta 1→4 glucopiranosido en el(los) enlace(s) glicosídico(s) recientemente formado(s). En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTSl2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTSl2. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 %

de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2. En otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa a cualquier glucosa existente en el lado C19 de cualquier glicósido de esteviol de partida para dar un glicósido de esteviol objetivo con al menos una glucosa adicional que tiene al menos un(os) enlace(s) glicosídico(s) beta 1→6 glucopiranósido en el(los) enlace(s) glicosídico(s) recientemente formado(s). En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa a cualquier glucosa existente en el lado C13 de cualquier glicósido de esteviol de partida para dar un glicósido de esteviol objetivo con al menos una glucosa adicional que tiene al menos un(os) enlace(s)

glicosídico(s) beta 1→2 glucopiranosido en el(los) enlace(s) glicosídico(s) recientemente formado(s). En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa a cualquier glucosa existente en el lado C13 de cualquier glicósido de esteviol de partida para dar un glicósido de esteviol objetivo con al menos una glucosa adicional que tiene al menos un(os) enlace(s) glicosídico(s) beta 1→3 glucopiranosido en el(los) enlace(s) glicosídico(s) recientemente formado(s). En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa a cualquier glucosa existente en el lado C13 de cualquier glicósido de esteviol de partida para dar un glicósido de esteviol objetivo con al menos

una glucosa adicional que tiene al menos un(os) enlace(s) glicosídico(s) beta 1→4 glucopiranosido en el(los) enlace(s) glicosídico(s) recientemente formado(s). En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2. En otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa a cualquier glucosa existente en el lado C13 de cualquier glicósido de esteviol de partida para dar un glicósido de esteviol objetivo con al menos una glucosa adicional que tiene al menos un(os) enlace(s) glicosídico(s) beta 1→6 glucopiranosido en el(los) enlace(s) glicosídico(s) recientemente formado(s). En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de

identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En una modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviol para formar esteviolmonósido. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT85C2 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT85C2 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT85C2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviol para formar esteviolmonósido A. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT74G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT74G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviolmonósido para formar esteviolbiósido. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de

secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviolmonósido para formar esteviolbiósido *D*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviolmonósido para formar rubusósido. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT74G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT74G1.

En una modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviolmonósido *A* para formar rubusósido. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT85C2 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT85C2 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT85C2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviolmonósido A para formar esteviolbiósido A. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviolmonósido A para formar esteviolbiósido B. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviolbiósido para formar rebaudiósido B. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviolbiósido para formar esteviósido. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT74G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT74G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviolbiósido *D* para formar rebaudiósido *B*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviolbiósido *D* para formar rebaudiósido *G*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT74G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT74G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rubusósido para formar esteviósido. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rubusósido para formar rebaudiósido G. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rubusósido para formar esteviósido A. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de

aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rubusósido para formar esteviósido B. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En una modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviolbiósido A para formar esteviósido A. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT85C2 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT85C2 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT85C2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviolbiósido A para formar esteviósido C. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En una modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviolbiósido *B* para formar esteviósido *B*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT85C2 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT85C2 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT85C2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviolbiósido *B* para formar esteviósido *C*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *B* para formar rebaudiósido *A*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT74G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT74G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviósido para formar rebaudiósido *A*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviósido para formar rebaudiósido *E*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviósido para formar rebaudiósido *E2*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al

menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *G* para formar rebaudiósido *A*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *G* para formar rebaudiósido *E4*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *G* para formar rebaudiósido *E6*. En una modalidad particular, la UDP-

glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviósido A para formar rebaudiósido E. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviósido A para formar rebaudiósido E4. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviósido A para formar rebaudiósido E3. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviósido *B* para formar rebaudiósido *E2*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviósido *B* para formar rebaudiósido *E6*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al esteviósido *B* para formar rebaudiósido *E3*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de

aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En una modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa a esteviolbiósido C para formar rebaudiósido E3. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT85C2 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT85C2 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT85C2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido A para formar rebaudiósido D. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al

menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *A* para formar rebaudiósido *I*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *E* para formar rebaudiósido *D*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *E* para formar rebaudiósido *AM*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *E2* para formar rebaudiósido *I*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *E2* para

formar rebaudiósido *AM*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *E4* para formar rebaudiósido *D*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *E4* para formar rebaudiósido *D7*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que

tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *E6* para formar rebaudiósido *I*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *E6* para formar rebaudiósido *D7*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *E3* para formar rebaudiósido *AM*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *E3* para formar rebaudiósido *D7*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *D* para formar rebaudiósido *M*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *I* para formar rebaudiósido *M*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *AM* para formar rebaudiósido *M*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *AM* para formar rebaudiósido *M4*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es

EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *D7* para formar rebaudiósido *M*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *1a*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En

otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *1b*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *1c*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al

menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *1d*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *1e*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *1f*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que

tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *lg*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *lh*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *li*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En

otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *1j*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *1k*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al

menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *1l*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *1m*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M* para formar rebaudiósido *1n*. En una modalidad particular, la UDP-

glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es cualquier UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al rebaudiósido *M4* para formar rebaudiósido *2a*. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGTS12 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGTS12. En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa es EUGT11, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con EUGT11. En aun otra modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT91D2, o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT91D2. En una modalidad particular, la UDP-glucosiltransferasa es UGT76G1 o una UGT que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con UGT76G1.

Opcionalmente, el método de la presente invención comprende además el reciclado de UDP para proporcionar UDP-glucosa. En una modalidad, el método comprende el reciclado

de UDP al proporcionar un catalizador de reciclado y un sustrato de reciclado, de manera tal que la biotransformación del esteviol y/o el sustrato de glicósido de esteviol al glicósido de esteviol objetivo se realiza usando cantidades catalíticas de UDP-glucosiltransferasa y UDP-glucosa.

En una modalidad, el catalizador de reciclado es la sacarosa sintasa SuSy_At o una sacarosa sintasa que tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con SuSy_At.

En una modalidad, el sustrato de reciclado para el catalizador de reciclado de UDP-glucosa es la sacarosa.

Opcionalmente, el método de la presente invención comprende además el uso de transglicosidasas que usan oligo o polisacáridos como donantes de azúcar para modificar moléculas receptoras de glicósido de esteviol objetivo. Los ejemplos no limitantes incluyen la ciclodextrina glicosiltransferasa (CGTasa), fructofuranosidasa, amilasa, sacarasa, glucosucrasa, beta-h-fructosidasa, beta-fructosidasa, sucrasa, fructosilinvertasa, invertasa alcalina, invertasa ácida, fructofuranosidasa. En algunas modalidades, la glucosa y el(los) azúcar(es) distintos de la glucosa, que incluyen pero no se limitan a la fructosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, desoxiglucosa y galactosa se transfieren a los

glicósidos de esteviol objetivo receptores. En una modalidad, el glicósido de esteviol receptor es el rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m y/o rebaudiósido 1n. En otra modalidad, el glicósido de esteviol receptor es el rebaudiósido 2a. En otra modalidad, el glicósido de esteviol receptor es el rebaudiósido M4. En otra modalidad, el glicósido de esteviol receptor es el SvG7.

En otra modalidad, la UDP-glucosiltransferasa capaz de añadir al menos una unidad de glucosa al glicósido de esteviol de la composición de partida tiene >85 % de identidad de secuencia de aminoácidos con las UGT seleccionadas de la siguiente lista de números identificadores de GenInfo, preferentemente del grupo presentado en la Tabla 1 y 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
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
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
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 de GI	Accesión	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	<i>Oryza sativa grupo japonica</i>
115459312	NP_001053256.1	<i>Oryza sativa grupo japonica</i>
115471069	NP_001059133.1	<i>Oryza sativa grupo japonica</i>
115471071	NP_001059134.1	<i>Oryza sativa grupo japonica</i>
116310985	CAH67920.1	<i>Oryza sativa grupo indica</i>
116788066	ABK24743.1	<i>Picea sitchensis</i>
122209731	Q2V6J9.1	<i>Fragaria x anassa</i>
125534461	EAY81009.1	<i>Oryza sativa grupo indica</i>
125559566	EAZ05102.1	<i>Oryza sativa grupo indica</i>
125588307	EAZ28971.1	<i>Oryza sativa grupo 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>

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>Oryza sativa grupo 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>Oryza sativa grupo 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>
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</i> subsp. <i>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>Oryza sativa</i> grupo <i>japonica</i>
470104266	XP_004288529.1	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>
470142008	XP_004306714.1	<i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>
475432777	EMT01232.1	<i>Aegilops tauschii</i>
51090402	BAD35324.1	<i>Oryza sativa</i> grupo <i>japonica</i>

Tabla 2

Número de GI	Accesión	Origen	Referencia interna
460409128	XP.004249992.1	<i>Solanum lycopersicum</i>	UGTS1
460386018	XP.004238697.1	<i>Solanum lycopersicum</i>	-
460409134	XP.004249995.1	<i>Solanum lycopersicum</i>	-
460410132	XP.004250485.1	<i>Solanum lycopersicum</i>	UGTS12

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>	-

Una modalidad de la presente invención es una célula microbiana que comprende una enzima, es decir, una enzima capaz de convertir la composición de partida en el glicósido de esteviol objetivo. En consecuencia, algunas modalidades del presente método incluyen poner en contacto un microorganismo con un medio que contiene la composición de partida para proporcionar un medio que comprende al menos un glicósido de esteviol objetivo.

El microorganismo puede ser cualquier microorganismo que tenga la(s) enzima(s) necesaria(s) para convertir la composición de partida en glicósido(s) de esteviol objetivo. Estas enzimas están codificadas dentro del genoma del microorganismo.

Los microorganismos adecuados incluyen, pero no se limitan a, *E. coli*, *Saccharomyces* sp., *Aspergillus* sp., *Pichia* sp., *Bacillus* sp., *Yarrowia* sp. etc.

En una modalidad, el microorganismo está libre cuando se pone en contacto con la composición de partida.

En otra modalidad, el microorganismo está inmovilizado cuando se pone en contacto con la composición de partida. Por ejemplo, el microorganismo puede inmovilizarse en un soporte sólido elaborado con

materiales inorgánicos u orgánicos. Los ejemplos no limitantes de soportes sólidos adecuados para inmovilizar el microorganismo incluyen la celulosa o el vidrio derivados, las cerámicas, los óxidos metálicos o las membranas. El microorganismo puede inmovilizarse en el soporte sólido, por ejemplo, mediante la unión covalente, la adsorción, el entrecruzamiento, el atrapamiento o la encapsulación.

En aun otra modalidad, la enzima capaz de convertir la composición de partida en el glicósido de esteviol objetivo se secreta fuera del microorganismo y en el medio de reacción.

El glicósido de esteviol objetivo se purifica opcionalmente. La purificación del glicósido de esteviol objetivo del medio de reacción puede lograrse mediante al menos un método adecuado para proporcionar una composición de glicósido de esteviol objetivo altamente purificado. Los métodos adecuados incluyen la cristalización, la separación por membranas, la centrifugación, la extracción (fase líquida o sólida), la separación cromatográfica, la HPLC (preparativa o analítica) o una combinación de tales métodos.

Usos

El(los) glicósido(s) objetivo(s) altamente purificado(s), particularmente el esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D,

rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6, rebaudiósido E3, rebaudiósido D, rebaudiósido I, rebaudiósido AM, rebaudiósido D7, rebaudiósido M, rebaudiósido M4, rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, rebaudiósido 1l, el rebaudiósido 1m, rebaudiósido 1n, rebaudiósido 2a y/o SvG7 obtenidos de acuerdo con esta invención puede(n) usarse “tal cual” o en combinación con otros edulcorantes, saborizantes, ingredientes alimenticios y combinaciones de estos.

Los ejemplos no limitantes de saborizantes incluyen, pero no se limitan a, la lima, el limón, la naranja, la fruta, el plátano, la uva, la pera, la piña, el mango, la baya, la almendra amarga, la cola, la canela, el azúcar, el algodón de azúcar, la vainilla y combinaciones de estos.

Los ejemplos no limitantes de otros ingredientes alimenticios incluyen, pero no se limitan a, los acidulantes, aminoácidos y ácidos orgánicos, agentes colorantes, agentes volumétricos, almidones modificados, gomas, texturizantes, conservantes, cafeína,

antioxidantes, emulsionantes, estabilizantes, espesantes, agentes gelificantes y combinaciones de estos.

El(los) glicósido(s) objetivo(s) altamente purificado(s), particularmente el esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6, rebaudiósido E3, rebaudiósido D, rebaudiósido I, rebaudiósido AM, rebaudiósido D7, rebaudiósido M, rebaudiósido M4, rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m, el rebaudiósido 1n, rebaudiósido 2a y/o SvG7 obtenido(s) de acuerdo con esta invención puede(n) prepararse en varias formas polimórficas, que incluyen, pero no se limitan a, hidratos, solvatos, formas amorfas anhidras y combinaciones de estos.

El(los) glicósido(s) objetivo altamente purificado(s), particularmente el esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido

A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6, rebaudiósido E3, rebaudiósido D, rebaudiósido I, rebaudiósido AM, rebaudiósido D7, rebaudiósido M, rebaudiósido M4, rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m, rebaudiósido 1n, el rebaudiósido 2a y/o SvG7 obtenido(s) de acuerdo con esta invención puede(n) incorporarse como un edulcorante natural de alta intensidad en productos alimenticios, bebidas, composiciones farmacéuticas, cosméticos, gomas de mascar, productos de mesa, cereales, productos lácteos, pastas dentales y otras composiciones para la cavidad bucal, etc.

En algunas modalidades, el(los) glicósido(s) objetivo altamente purificado(s) de la presente invención están presentes en productos alimenticios, bebidas, composiciones farmacéuticas, cosméticos, gomas de mascar, productos de mesa, cereales, productos lácteos, pastas dentales y otras composiciones para la cavidad bucal, etc. en una cantidad de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 12 % en peso, tal como, por ejemplo, aproximadamente 0,0001 % en peso, aproximadamente 0,0005 % en peso, aproximadamente 0,001 % en peso,

aproximadamente 0,005 % en peso, aproximadamente 0,01 % en peso, aproximadamente 0,05 % en peso, aproximadamente 0,1 % en peso, aproximadamente 0,5 % en peso, aproximadamente 1,0 % en peso, aproximadamente 1,5 % en peso, aproximadamente 2,0 % en peso, aproximadamente 2,5 % en peso, aproximadamente 3,0 % en peso, aproximadamente 3,5 % en peso, aproximadamente 4,0 % en peso, aproximadamente 4,5 % en peso, aproximadamente 5,0 % en peso, aproximadamente 5,5 % en peso, aproximadamente 6,0 % en peso, aproximadamente 6,5 % en peso, aproximadamente 7,0 % en peso, aproximadamente 7,5 % en peso, aproximadamente 8,0 % en peso, aproximadamente 8,5 % en peso, aproximadamente 9,0 % en peso, aproximadamente 9,5 % en peso, aproximadamente 10,0 % en peso, aproximadamente 10,5 % en peso, aproximadamente 11,0 % en peso, aproximadamente 11,5 % en peso o aproximadamente 12,0 % en peso.

En una modalidad particular, el edulcorante está presente en la bebida en una cantidad de aproximadamente 0,0001 % en peso a aproximadamente 8 % en peso, tal como por ejemplo, de aproximadamente 0,0001 % en peso a aproximadamente 0,0005 % en peso, de aproximadamente 0,0005 % en peso en peso a aproximadamente 0,001 % en peso, de aproximadamente 0,001 % en peso a aproximadamente 0,005 % en peso, de aproximadamente 0,005 % en peso a aproximadamente 0,01 % en peso, de aproximadamente 0,01 %

en peso a aproximadamente 0,05 % en peso, de aproximadamente 0,05 % en peso en peso a aproximadamente 0,1 % en peso, de aproximadamente 0,1 % en peso a aproximadamente 0,5 % en peso, de aproximadamente 0,5 % en peso a aproximadamente 1 % en peso, de aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 2 % en peso, de aproximadamente 2 % en peso a aproximadamente 3 % en peso, de aproximadamente 3 % en peso a aproximadamente 4 % en peso, de aproximadamente 4 % en peso a aproximadamente 5 % en peso, de aproximadamente 5 % en peso a aproximadamente 6 % en peso, de aproximadamente 6 % en peso a aproximadamente 7 % en peso y de aproximadamente 7 % en peso a aproximadamente 8 % en peso.

El(los) glicósido(s) objetivo(s) altamente purificado(s), particularmente el esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6, rebaudiósido E3, rebaudiósido D, rebaudiósido I, rebaudiósido AM, rebaudiósido D7, rebaudiósido M, rebaudiósido M4, rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j,

rebaudiósido 1k, rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m,
 rebaudiósido 1n, rebaudiósido 2a, SvG7 y/o combinaciones
 de estos, obtenido(s) de acuerdo con esta invención,
 puede(n) usarse como un compuesto edulcorante, o puede(n)
 usarse junto con al menos un edulcorante de alta
 intensidad de origen natural tal como el dulcósido A,
 dulcósido B, dulcósido C, dulcósido D, rebaudiósido A2,
 rebaudiósido A3, rebaudiósido A4, rebaudiósido B2,
 rebaudiósido C, rebaudiósido C2, rebaudiósido C3,
 rebaudiósido C4, rebaudiósido C5, rebaudiósido C6,
 rebaudiósido D2, rebaudiósido D3, rebaudiósido D4,
 rebaudiósido D5, rebaudiósido D6, rebaudiósido D8,
 rebaudiósido E5, rebaudiósido E7, rebaudiósido F,
 rebaudiósido F2, rebaudiósido F3, rebaudiósido H,
 rebaudiósido H2, rebaudiósido H3, rebaudiósido H4,
 rebaudiósido H5, rebaudiósido H6, rebaudiósido I2,
 rebaudiósido I3, rebaudiósido J, rebaudiósido K,
 rebaudiósido K2, rebaudiósido KA, rebaudiósido L,
 rebaudiósido M2, rebaudiósido M3, rebaudiósido N,
 rebaudiósido N2, rebaudiósido N3, rebaudiósido N4,
 rebaudiósido N5, rebaudiósido O, rebaudiósido O2,
 rebaudiósido O3, rebaudiósido O4, rebaudiósido Q,
 rebaudiósido Q2, rebaudiósido Q3, rebaudiósido R,
 rebaudiósido S, rebaudiósido T, rebaudiósido T1,
 rebaudiósido U, rebaudiósido U2, rebaudiósido V,
 rebaudiósido V2, rebaudiósido V3, rebaudiósido W,

rebaudiósido W2, rebaudiósido W3, rebaudiósido Y, rebaudiósido Z1, rebaudiósido Z2, esteviolbiósido C, esteviolbiósido E, esteviósido D, esteviósido E, esteviósido E2, esteviósido F, esteviósido G, esteviósido H, mogrósidos, brazeína, dihidrochalcona de neohesperidina, ácido glicirrízico y sus sales, taumatina, perillartina, pernandulcina, mukuroziósido, baiyunósido, flomisósido I, ácido dimetilhexahidrofluoreno-dicarboxílico, abrusósidos, periandrina, carnosiflósido, ciclocariósido, pterocariósido, polipodósido A, brasilina, hernandulcina, flodulcina, glicifilina, florizina, trilobatina, dihidroflavonol, dihidroquercetina-3-acetato, neoastilibina, trans-cinamaldehído, monatina, sales de monatina, otros edulcorantes derivados de indol, selligueain A, hematoxilina, monelina, osladina, pterocariósido A, pterocariósido B, mabinlina, pentadina, miraculina, curculina, neoculina, ácido clorogénico, cinarina, edulcorante Luo Han Guo, mogrósido V, siamenósido, siratosa y combinaciones de estos.

En una modalidad particular, el esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2,

rebaudiósido *E4*, rebaudiósido *E6*, rebaudiósido *E3*,
rebaudiósido *D*, rebaudiósido *I*, rebaudiósido *AM*,
rebaudiósido *D7*, rebaudiósido *M*, rebaudiósido *M4*,
rebaudiósido *1a*, rebaudiósido *1b*, rebaudiósido *1c*,
rebaudiósido *1d*, rebaudiósido *1e*, rebaudiósido *1f*, el
rebaudiósido *1g*, rebaudiósido *1h*, rebaudiósido *1i*,
rebaudiósido *1j*, rebaudiósido *1k*, rebaudiósido *1l*,
rebaudiósido *1m*, rebaudiósido *1n*, rebaudiósido *2a* y/o
SvG7 puede(n) usarse en una composición edulcorante que
comprende un compuesto seleccionado del grupo que
consiste en dulcósido *A*, dulcósido *B*, dulcósido *C*,
dulcósido *D*, rebaudiósido *A2*, rebaudiósido *A3*,
rebaudiósido *A4*, rebaudiósido *B2*, rebaudiósido *C*,
rebaudiósido *C2*, rebaudiósido *C3*, rebaudiósido *C4*,
rebaudiósido *C5*, rebaudiósido *C6*, rebaudiósido *D2*,
rebaudiósido *D3*, rebaudiósido *D4*, rebaudiósido *D5*,
rebaudiósido *D6*, rebaudiósido *D8*, rebaudiósido *E5*,
rebaudiósido *E7*, rebaudiósido *F*, rebaudiósido *F2*,
rebaudiósido *F3*, rebaudiósido *H*, rebaudiósido *H2*,
rebaudiósido *H3*, rebaudiósido *H4*, rebaudiósido *H5*,
rebaudiósido *H6*, rebaudiósido *I2*, rebaudiósido *I3*,
rebaudiósido *J*, rebaudiósido *K*, rebaudiósido *K2*,
rebaudiósido *KA*, rebaudiósido *L*, rebaudiósido *M2*,
rebaudiósido *M3*, rebaudiósido *N*, rebaudiósido *N2*,
rebaudiósido *N3*, rebaudiósido *N4*, rebaudiósido *N5*,
rebaudiósido *O*, rebaudiósido *O2*, rebaudiósido *O3*,

rebaudiósido *O4*, rebaudiósido *Q*, rebaudiósido *Q2*,
rebaudiósido *Q3*, rebaudiósido *R*, rebaudiósido *S*,
rebaudiósido *T*, rebaudiósido *T1*, rebaudiósido *U*,
rebaudiósido *U2*, rebaudiósido *V*, rebaudiósido *V2*,
rebaudiósido *V3*, rebaudiósido *W*, rebaudiósido *W2*,
rebaudiósido *W3*, rebaudiósido *Y*, rebaudiósido *Z1*,
rebaudiósido *Z2*, esteviolbiósido *C*, esteviolbiósido *E*,
esteviósido *D*, esteviósido *E*, esteviósido *E2*, esteviósido
F, esteviósido *G*, esteviósido *H*, NSF-02, Mogrósido *V*,
siratosa, Luo Han Guo, alulosa, alosa, D-tagatosa,
eritritol y combinaciones de estos.

El(los) glicósido(s) objetivo altamente
purificado(s), particularmente el esteviolmonósido,
esteviolmonósido *A*, esteviolbiósido, esteviolbiósido *D*,
rubusósido, esteviolbiósido *A*, esteviolbiósido *B*,
rebaudiósido *B*, esteviósido, rebaudiósido *G*, esteviósido
A, esteviósido *B*, esteviósido *C*, rebaudiósido *A*,
rebaudiósido *E*, rebaudiósido *E2*, rebaudiósido *E4*,
rebaudiósido *E6*, rebaudiósido *E3*, rebaudiósido *D*,
rebaudiósido *I*, rebaudiósido *AM*, rebaudiósido *D7*,
rebaudiósido *M*, rebaudiósido *M4*, rebaudiósido *1a*,
rebaudiósido *1b*, rebaudiósido *1c*, rebaudiósido *1d*,
rebaudiósido *1e*, rebaudiósido *1f*, rebaudiósido *1g*,
rebaudiósido *1h*, rebaudiósido *1i*, rebaudiósido *1j*,
rebaudiósido *1k*, rebaudiósido *1l*, rebaudiósido *1m*,
rebaudiósido *1n*, el rebaudiósido *2a* y/o SvG7 también

puede(n) usarse en combinación con edulcorantes sintéticos de alta intensidad tales como sucralosa, acesulfamo de potasio, aspartamo, alitamo, sacarina, dihidrochalcona de neohesperidina, ciclamato, neotamo, dulcina, suosan advantamo, sales de estos y combinaciones de estos.

Además, el(los) glicósido(s) de esteviol objetivo altamente purificado(s) particularmente el esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6, rebaudiósido E3, rebaudiósido D, rebaudiósido I, rebaudiósido AM, rebaudiósido D7, rebaudiósido M, rebaudiósido M4, rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, el rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m, rebaudiósido 1n, rebaudiósido 2a y/o SvG7 puede(n) usarse en combinación con supresores de edulcorantes naturales tales como el ácido gimnemico, hodulcina, zizifina, lactisol y otros. El esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A,

esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6, rebaudiósido E3, rebaudiósido D, rebaudiósido I, rebaudiósido AM, rebaudiósido D7, el rebaudiósido M, rebaudiósido M4, rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m, rebaudiósido 1n, rebaudiósido 2a y/o SvG7 también pueden combinarse con varios potenciadores del sabor umami. El esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6, rebaudiósido E3, rebaudiósido D, rebaudiósido I, rebaudiósido AM, rebaudiósido D7, rebaudiósido M, rebaudiósido M4, rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m, rebaudiósido 1n, el rebaudiósido 2a y/o SvG7 pueden mezclarse con el sabor

umami y aminoácidos dulces tales como el glutamato, ácido aspártico, glicina, alanina, treonina, prolina, serina, glutamato, lisina, triptófano y combinaciones de estos.

El(los) glicósido(s) de esteviol objetivo altamente purificado(s) particularmente el esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6, rebaudiósido E3, rebaudiósido D, rebaudiósido I, rebaudiósido AM, rebaudiósido D7, rebaudiósido M, rebaudiósido M4, rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, el rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m, rebaudiósido 1n, rebaudiósido 2a y/o SvG7 pueden usarse en combinación con uno o más aditivos seleccionados del grupo que consiste en carbohidratos, polioles, aminoácidos y sus sales correspondientes, poliaminoácidos y sus sales correspondientes, azúcares ácidos y sus sales correspondientes, nucleótidos, ácidos orgánicos, ácidos inorgánicos, sales orgánicas que incluyen sales de ácidos orgánicos y sales de base orgánicas, sales inorgánicas, compuestos amargos, saborizantes e

ingredientes saborizantes, compuestos astringentes, proteínas o hidrolizados de proteínas, surfactantes, emulsionantes, flavonoides, alcoholes, polímeros y combinaciones de estos.

El(los) glicósido(s) de esteviol objetivo altamente purificado(s), particularmente el esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6, rebaudiósido E3, rebaudiósido D, rebaudiósido I, rebaudiósido AM, rebaudiósido D7, rebaudiósido M, rebaudiósido M4, rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m, rebaudiósido 1n, rebaudiósido 2a y/o SvG7 puede(n) combinarse con polioles o alcoholes de azúcar. El término “poliol” 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 hidroxilos, respectivamente. Un poliol también puede contener más de cuatro grupos hidroxilos, tales como un pentaol, hexaol, heptaol o lo similar, que contienen 5, 6 o 7 grupos

hidroxilos, respectivamente. Adicionalmente, 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. Los ejemplos de polioles incluyen, pero no se limitan a, el eritritol, maltitol, manitol, sorbitol, lactitol, xilitol, inositol, isomalta, propilenglicol, glicerol, treitol, galactitol, isomaltulosa hidrogenada, isomalto-oligosacáridos reducidos, xilooligosacáridos reducidos, gentio-oligosacáridos reducidos, jarabe de maltosa reducido, jarabe de glucosa reducido, hidrolizados de almidón hidrogenado, poliglicitoles y alcoholes de azúcar o cualquier otro carbohidrato capaz de reducirse que no afecte desfavorablemente el sabor de la composición edulcorante.

El(los) glicósido(s) de esteviol objetivo altamente purificado(s), particularmente el esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6, rebaudiósido E3, rebaudiósido D, rebaudiósido I, rebaudiósido AM, rebaudiósido D7, rebaudiósido M, rebaudiósido M4,

rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, el rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m, rebaudiósido 1n, rebaudiósido 2a y/o SvG7 puede(n) combinarse con edulcorantes reducidos en calorías tales como, por ejemplo, D-tagatosa, L-azúcares, L-sorbosa, L-arabinosa y combinaciones de estos.

El(los) glicósido(s) de esteviol objetivo altamente purificado(s), particularmente el esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6, rebaudiósido E3, rebaudiósido D, rebaudiósido I, rebaudiósido AM, rebaudiósido D7, rebaudiósido M, rebaudiósido M4, rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m, rebaudiósido 1n, rebaudiósido 2a y/o SvG7 también puede(n) combinarse con varios carbohidratos. El término “carbohidrato” generalmente se refiere a los compuestos de aldehído o cetona sustituidos

con múltiples grupos hidroxilos, de la fórmula general $(CH_2O)_n$, en donde n es 3-30, así como sus oligómeros y polímeros. Además, los carbohidratos de la presente invención pueden sustituirse o desoxigenarse en una o más posiciones. Como se usan en la presente descripción, los carbohidratos abarcan los carbohidratos no modificados, los derivados de carbohidratos, los carbohidratos sustituidos y los carbohidratos modificados. Como se usa en la presente descripción, las frases “derivados de carbohidrato”, “carbohidrato sustituido” y “carbohidratos modificados” son sinónimos. El carbohidrato modificado significa cualquier carbohidrato en donde al menos un átomo ha sido añadido, quitado, o sustituido, o combinaciones de estos. Por lo tanto, los derivados de carbohidratos o carbohidratos sustituidos incluyen monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos y polisacáridos sustituidos y no sustituidos. Los derivados de carbohidratos o los carbohidratos sustituidos opcionalmente pueden ser desoxigenados en cualquier posición C correspondiente y/o sustituidos con una o más porciones tales como el hidrógeno, halógeno, haloalquilo, carboxilo, acilo, aciloxi, amino, amido, derivados de carboxilo, alquilamino, dialquilamino, arilamina, alcoxi, ariloxilo, nitro, ciano, sulfo, mercapto, imino, sulfonilo, sulfenilo, sulfinilo, sulfamoilo, carboalcoxi, carboxamida, fosfonilo, fosfinilo, fosforilo, fosfino,

tioéster, tioéter, oximino, hidrazina, carbamilo, fosfo, fosfonato, o cualquier otro grupo funcional viable que proporcione las funciones del derivado de carbohidrato o carbohidrato sustituido para mejorar el sabor dulce de la composición del edulcorante.

Los ejemplos de carbohidratos que pueden usarse de acuerdo con esta invención incluyen, pero no se limitan a, psicosa, turanosa, allosa, tagatosa, trehalosa, galactosa, ramnosa, diversas ciclodextrinas, oligosacáridos cíclicos, diversos tipos de maltodextrinas, dextrano, sacarosa, glucosa, ribulosa, fructosa, treosa, arabinosa, xilosa, lixosa, alosa, altrosa, manosa, idosa, lactosa, maltosa, azúcar invertido, isotrehalosa, neotrehalosa, isomaltulosa, eritrosa, desoxirribosa, gulosa, idosa, talosa, eritrulosa, xilulosa, psicosa, turanosa, celobiosa, amilopectina, glucosamina, manosamina, fucosa, ácido glucurónico, ácido glucónico, glucono-lactona, abequosa, galactosamina, oligosacáridos de remolacha, isomalto-oligosacáridos (isomaltosa, isomaltotriosa, panosa y lo similar), xilooligosacáridos (xilotriosa, xilobiosa y lo similar), oligosacáridos terminados en xilo, gentio-oligosacáridos (gentiobiosa, gentiotriosa, gentiotetraosa y lo similar), sorbosa, nigero-oligosacáridos, oligosacáridos palatinosa, fructooligosacáridos (kestosa, nistosa y lo similar), maltotetraol, maltotriol, malto-oligosacáridos (maltotriosa, maltotetraosa, maltopentaosa, maltohexaosa,

maltoheptaosa y lo similar), almidón, inulina, inulooligosacáridos, lactulosa, melibiosa, rafinosa, ribosa, azúcares líquidos isomerizados tales como jarabes de maíz altos en fructosa, azúcares de acoplamiento y oligosacáridos de frijol de soja. Además, como se usan en la presente descripción, los carbohidratos, pueden estar en la configuración D o L.

El(los) glicósido(s) de esteviol objetivo altamente purificado(s), particularmente el esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6, rebaudiósido E3, rebaudiósido D, rebaudiósido I, rebaudiósido AM, rebaudiósido D7, rebaudiósido M, rebaudiósido M4, rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, el rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m, rebaudiósido 1n, rebaudiósido 2a y/o SvG7 obtenido(s) de acuerdo con esta invención puede(n) usarse en combinación con diversas sustancias fisiológicamente activas o ingredientes funcionales. Los ingredientes funcionales generalmente se clasifican en categorías tales

como carotenoides, fibra dietaria, ácidos grasos, saponinas, antioxidantes, nutracéuticos, flavonoides, isotiocianatos, fenoles, esteroles y estanoles vegetales (fitoesteroles y fitoestanoles); polioles; prebióticos, probióticos; fitoestrógenos; proteína de soya; sulfuros/tioles; aminoácidos; proteínas; vitaminas; y minerales. Los ingredientes funcionales también pueden clasificarse en base a sus beneficios para la salud, tales como cardiovasculares, reductores del colesterol y antiinflamatorios. Los ingredientes funcionales ilustrativos se proporcionan en la patente núm. WO2013/096420, cuyo contenido se incorpora en la presente descripción como referencia.

El(los) glicósido(s) de esteviol objetivo altamente purificado(s), particularmente el esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6, rebaudiósido E3, rebaudiósido D, rebaudiósido I, rebaudiósido AM, rebaudiósido D7, rebaudiósido M, rebaudiósido M4, rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i,

rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m, rebaudiósido 1n, el rebaudiósido 2a y/o SvG7 obtenido(s) de acuerdo con esta invención puede(n) aplicarse como un edulcorante de alta intensidad para producir bebidas y productos alimenticios de cero calorías, calorías reducidas o para diabéticos con características de sabor mejoradas. También pueden usarse en bebidas, productos alimenticios, farmacéuticos y otros productos en los cuales no puede usarse el azúcar. Además, el(los) glicósido(s) de esteviol objetivo altamente purificado(s), particularmente el esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6, rebaudiósido E3, rebaudiósido D, rebaudiósido I, rebaudiósido AM, rebaudiósido D7, rebaudiósido M, rebaudiósido M4, rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m, el rebaudiósido 1n, rebaudiósido 2a y/o SvG7 puede(n) usarse como un edulcorante no solo para bebidas, productos alimenticios y otros productos

dedicados al consumo humano, sino también en pienso y forraje para animales con características mejoradas.

El(los) glicósido(s) de esteviol objetivo altamente purificado(s), particularmente el esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6, rebaudiósido E3, rebaudiósido D, rebaudiósido I, rebaudiósido AM, rebaudiósido D7, rebaudiósido M, rebaudiósido M4, rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m, rebaudiósido 1n, el rebaudiósido 2a y/o SvG7 obtenidos de acuerdo con esta invención puede(n) aplicarse como un supresor de espuma para producir bebidas y productos alimenticios de cero calorías, calorías reducidas o para diabéticos.

Los ejemplos de productos consumibles en los que el(los) glicósido(s) de esteviol objetivo altamente purificado(s), particularmente el esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B,

rebaudiósido *B*, esteviósido, rebaudiósido *G*, esteviósido *A*, esteviósido *B*, esteviósido *C*, rebaudiósido *A*, rebaudiósido *E*, rebaudiósido *E2*, rebaudiósido *E4*, rebaudiósido *E6*, rebaudiósido *E3*, rebaudiósido *D*, rebaudiósido *I*, rebaudiósido *AM*, rebaudiósido *D7*, rebaudiósido *M*, rebaudiósido *M4*, rebaudiósido *1a*, rebaudiósido *1b*, rebaudiósido *1c*, rebaudiósido *1d*, rebaudiósido *1e*, rebaudiósido *1f*, rebaudiósido *1g*, rebaudiósido *1h*, rebaudiósido *1i*, rebaudiósido *1j*, rebaudiósido *1k*, rebaudiósido *1l*, el rebaudiósido *1m*, rebaudiósido *1n*, rebaudiósido *2a* y/o SvG7 puede(n) usarse como un compuesto edulcorante que incluye, pero no se limita a, bebidas alcohólicas tales como vodka, vino, cerveza, licor y sake, etc.; jugos naturales; bebidas refrescantes, refrescos carbonatados, bebidas dietéticas, bebidas cero calorías, bebidas y alimentos reducidos en calorías, bebidas de yogur, jugos instantáneos, café instantáneo, tipos de bebidas instantáneas en polvo, productos enlatados, jarabes, pasta de frijol de soya fermentada; salsa de soya; vinagre; aderezos; mayonesa; ketchup; curry; sopa; caldo instantáneo; salsa de soya en polvo; vinagre en polvo; tipos de galletas; bizcochos de arroz; galletas saladas; pan; chocolates; caramelo; golosina; goma de mascar; jalea; pudín; frutas y vegetales conservados; crema fresca; confitura; mermelada; pasta de goma; leche en polvo; helado; helado

sin leche; vegetales y frutas envasadas en botellas; frijoles enlatados y hervidos; carne y alimentos hervidos en salsa edulcorada; productos alimenticios vegetales agrícolas; mariscos; jamón; salchicha; jamón de pescado; salchicha de pescado; pasta de pescado; productos de pescado muy fritos; productos de mariscos deshidratados; productos alimenticios congelados; algas marinas conservadas; carne conservada; tabaco; productos medicinales; y muchos otros. En principio puede tener aplicaciones ilimitadas.

Los ejemplos de productos consumibles en los que el(los) glicósido(s) de esteviol objetivo altamente purificado(s), particularmente el esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6, rebaudiósido E3, rebaudiósido D, rebaudiósido I, rebaudiósido AM, rebaudiósido D7, rebaudiósido M, rebaudiósido M4, rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, rebaudiósido 1l, el rebaudiósido 1m, rebaudiósido 1n, rebaudiósido 2a y/o SvG7 puede(n) usarse como un

modificador de sabor o sabor con propiedades modificadoras que incluyen, pero no se limita a, bebidas alcohólicas tales como vodka, vino, cerveza, licor y sake, etc.; jugos naturales; bebidas refrescantes, refrescos carbonatados, bebidas dietéticas, bebidas cero calorías, bebidas y alimentos reducidos en calorías, bebidas de yogur, jugos instantáneos, café instantáneo, tipos de bebidas instantáneas en polvo, productos enlatados, jarabes, pasta de frijol de soya fermentada; salsa de soya; vinagre; aderezos; mayonesa; ketchup; curry; sopa; caldo instantáneo; salsa de soya en polvo; vinagre en polvo; tipos de galletas; bizcochos de arroz; galletas saladas; pan; chocolates; caramelo; golosina; goma de mascar; jalea; pudín; frutas y vegetales conservados; crema fresca; confitura; mermelada; pasta de goma; leche en polvo; helado; helado sin leche; vegetales y frutas envasadas en botellas; frijoles enlatados y hervidos; carne y alimentos hervidos en salsa edulcorada; productos alimenticios vegetales agrícolas; mariscos; jamón; salchicha; jamón de pescado; salchicha de pescado; pasta de pescado; productos de pescado muy fritos; productos de mariscos deshidratados; productos alimenticios congelados; algas marinas conservadas; carne conservada; tabaco; productos medicinales; y muchos otros. En principio puede tener aplicaciones ilimitadas.

Durante la fabricación de productos tales como productos alimenticios, bebidas, farmacéuticos, cosméticos, productos de mesa y goma de mascar, pueden usarse los métodos convencionales tales como el mezclado, el amasado, la disolución, el encurtido, la permeación, la percolación, la aspersión, la atomización, la infusión y otros métodos.

Además, el(los) glicósido(s) de esteviol objetivo altamente purificado(s), esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6, rebaudiósido E3, rebaudiósido D, rebaudiósido I, el rebaudiósido AM, rebaudiósido D7, rebaudiósido M, rebaudiósido M4, rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m, rebaudiósido 1n, rebaudiósido 2a y/o SvG7 obtenido(s) en esta invención puede(n) usarse en formas secas o líquidas.

El glicósido de esteviol objetivo altamente purificado puede añadirse antes o después del tratamiento térmico de los productos alimenticios. La cantidad del

(de los) glicósido(s) de esteviol objetivo altamente purificado(s), particularmente el esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6, rebaudiósido E3, rebaudiósido D, el rebaudiósido I, rebaudiósido AM, rebaudiósido D7, rebaudiósido M, rebaudiósido M4, rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m, rebaudiósido 1n, rebaudiósido 2a y/o SvG7 depende del propósito del uso. Como se describió anteriormente, puede añadirse solo o en combinación con otros compuestos.

La presente invención también se dirige al mejoramiento del dulzor en bebidas que usan el esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6, rebaudiósido E3, rebaudiósido D, rebaudiósido I, rebaudiósido AM,

rebaudiósido *D7*, rebaudiósido *M*, rebaudiósido *M4*,
 rebaudiósido *1a*, rebaudiósido *1b*, rebaudiósido *1c*,
 rebaudiósido *1d*, rebaudiósido *1e*, rebaudiósido *1f*,
 rebaudiósido *1g*, rebaudiósido *1h*, rebaudiósido *1i*,
 rebaudiósido *1j*, rebaudiósido *1k*, rebaudiósido *1l*,
 rebaudiósido *1m*, rebaudiósido *1n*, rebaudiósido *2a* y/o SvG7
 como potenciador de dulzor, en donde el esteviolmonósido,
 esteviolmonósido *A*, esteviolbiósido, esteviolbiósido *D*,
 rubusósido, esteviolbiósido *A*, esteviolbiósido *B*,
 rebaudiósido *B*, esteviósido, rebaudiósido *G*, esteviósido *A*,
 esteviósido *B*, esteviósido *C*, rebaudiósido *A*, rebaudiósido
E, rebaudiósido *E2*, rebaudiósido *E4*, rebaudiósido *E6*,
 rebaudiósido *E3*, rebaudiósido *D*, rebaudiósido *I*,
 rebaudiósido *AM*, rebaudiósido *D7*, el rebaudiósido *M*,
 rebaudiósido *M4*, rebaudiósido *1a*, rebaudiósido *1b*,
 rebaudiósido *1c*, rebaudiósido *1d*, rebaudiósido *1e*,
 rebaudiósido *1f*, rebaudiósido *1g*, rebaudiósido *1h*,
 rebaudiósido *1i*, rebaudiósido *1j*, rebaudiósido *1k*,
 rebaudiósido *1l*, rebaudiósido *1m*, rebaudiósido *1n*,
 rebaudiósido *2a* y/o SvG7 están presentes en una
 concentración igual o menor que sus umbrales de
 reconocimiento del dulzor respectivos.

Como se usa en la presente descripción, el
 término “potenciador de dulzor” se refiere a un compuesto
 capaz de mejorar o intensificar la percepción del sabor
 dulce en una composición, tal como una bebida. El término

“potenciador de dulzor” es sinónimo de los términos “potenciador del sabor dulce”, “potenciador de dulzura”, “amplificador del dulzor” e “intensificador del dulzor”.

El término "concentración del umbral de reconocimiento del dulzor" como se usa generalmente en la presente descripción, es la menor concentración conocida de un compuesto dulce que es perceptible por el sentido humano del gusto, típicamente alrededor de 1,0 % de equivalencia de sacarosa (1,0 % SE). Generalmente, los potenciadores del dulzor pueden mejorar o potenciar el sabor dulce de los edulcorantes sin proporcionar ningún sabor dulce notable por sí mismos cuando están presentes en o por debajo de la concentración del umbral de reconocimiento del dulzor de un potenciador de dulzor dado; sin embargo, los potenciadores del dulzor pueden proporcionar por sí mismos un sabor dulce en concentraciones por encima de su concentración del umbral de reconocimiento del dulzor. La concentración del umbral de reconocimiento del dulzor es específica para un potenciador particular y puede variar en base a la matriz de bebida. La concentración del umbral de reconocimiento del dulzor puede determinarse fácilmente mediante la prueba de sabor que aumenta las concentraciones de un potenciador dado hasta que se detecta más de 1,0 % de equivalencia de sacarosa en una matriz de bebida dada. La concentración que proporciona aproximadamente 1,0 % de equivalencia de

sacarosa se considera el umbral de reconocimiento del dulzor.

En algunas modalidades, el edulcorante está presente en la bebida en una cantidad de aproximadamente 0,0001 % a aproximadamente 12 % en peso, tal como, por ejemplo, aproximadamente 0,0001 % en peso, aproximadamente 0,0005 % en peso, aproximadamente 0,001 % en peso, aproximadamente 0,005 % en peso, aproximadamente 0,01 % en peso, aproximadamente 0,05 % en peso, aproximadamente 0,1 % en peso, aproximadamente 0,5 % en peso, aproximadamente 1,0 % en peso, aproximadamente 1,5 % en peso, aproximadamente 2,0 % en peso, aproximadamente 2,5 % en peso, aproximadamente 3,0 % en peso, aproximadamente 3,5 % en peso, aproximadamente 4,0 % en peso, aproximadamente 4,5 % en peso, aproximadamente 5,0 % en peso, aproximadamente 5,5 % en peso, aproximadamente 6,0 % en peso, aproximadamente 6,5 % en peso, aproximadamente 7,0 % en peso, aproximadamente 7,5 % en peso en peso, aproximadamente 8,0 % en peso, aproximadamente 8,5 % en peso, aproximadamente 9,0 % en peso, aproximadamente 9,5 % en peso, aproximadamente 10,0 % en peso, aproximadamente 10,5 % en peso, aproximadamente 11,0 % en peso, aproximadamente 11,5 % en peso o aproximadamente 12,0 % en peso.

En una modalidad particular, el edulcorante está presente en la bebida en una cantidad de aproximadamente

0,0001 % en peso a aproximadamente 10 % en peso, tal como por ejemplo, de aproximadamente 0,0001 % en peso a aproximadamente 0,0005 % en peso, de aproximadamente 0,0005 % en peso a aproximadamente 0,001 % en peso en peso, de aproximadamente 0,001 % en peso a aproximadamente 0,005 % en peso, de aproximadamente 0,005 % en peso a aproximadamente 0,01 % en peso, de aproximadamente 0,01 % en peso a aproximadamente 0,05 % en peso, de aproximadamente 0,05 % en peso a aproximadamente 0,1 % en peso, de aproximadamente 0,1 % en peso en peso a aproximadamente 0,5 % en peso, de aproximadamente 0,5 % en peso a aproximadamente 1 % en peso, de aproximadamente 1 % en peso a aproximadamente 2 % en peso, de aproximadamente 2 % en peso a aproximadamente 3 % en peso, de aproximadamente 3 % en peso a aproximadamente 4 % en peso, de aproximadamente 4 % en peso a aproximadamente 5 % en peso, de aproximadamente 5 % en peso a aproximadamente 6 % en peso, de aproximadamente 6 % en peso a aproximadamente 7 % en peso, de aproximadamente 7 % en peso a aproximadamente 8 % en peso, de aproximadamente 8 % en peso a aproximadamente 9 % en peso o de aproximadamente 9 % en peso a aproximadamente 10 % en peso. En una modalidad particular, el edulcorante está presente en la bebida en una cantidad de aproximadamente 0,5 % en peso a aproximadamente 10 % en peso. En otra modalidad particular, el edulcorante está presente en la bebida en

una cantidad de aproximadamente 2 % en peso a aproximadamente 8 % en peso.

En una modalidad, el edulcorante es un edulcorante calórico tradicional. Los edulcorantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, sacarosa, fructosa, glucosa, jarabe de maíz de alta fructosa y jarabe de almidón de alta fructosa.

En otra modalidad, el edulcorante es eritritol.

En aun otra modalidad, el edulcorante es un azúcar raro. Los azúcares raros adecuados incluyen, pero no se limitan a, la D-alosa, D-psicosa, D-ribosa, D-tagatosa, L-glucosa, L-fucosa, L-arabinosa, D-turanosa, D-leucrosa y combinaciones de estas.

Se contempla que un edulcorante puede usarse solo o en combinación con otros edulcorantes.

En una modalidad, el azúcar raro es la D-alosa. En una modalidad más particular, la D-alosa está presente en la bebida en una cantidad de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 10 % en peso, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 8 %.

En otra modalidad, el azúcar raro es la D-psicosa. En una modalidad más particular, la D-psicosa está presente en la bebida en una cantidad de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 10 % en peso, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 8 %.

En aun otra modalidad, el azúcar raro es la D-ribosa. En una modalidad más particular, la D-ribosa está presente en la bebida en una cantidad de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 10 % en peso, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 8 %.

En aun otra modalidad, el azúcar raro es la D-tagatosa. En una modalidad más particular, la D-tagatosa está presente en la bebida en una cantidad de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 10 % en peso, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 8 %.

En una modalidad adicional, el azúcar raro es la L-glucosa. En una modalidad más particular, la D-glucosa está presente en la bebida en una cantidad de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 10 % en peso, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 8 %.

En una modalidad, el azúcar raro es la L-fucosa. En una modalidad más particular, la D-fucosa está presente en la bebida en una cantidad de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 10 % en peso, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 8 %.

En otra modalidad, el azúcar raro es la L-arabinosa. En una modalidad más particular, la D-arabinosa está presente en la bebida en una cantidad de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 10 % en peso, tal

como, por ejemplo, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 8 %.

En aun otra modalidad, el azúcar raro es la D-turanosa. En una modalidad más particular, la D-turanosa está presente en la bebida en una cantidad de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 10 % en peso, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 8 %.

En aun otra modalidad, el azúcar raro es la D-leucrosa. En una modalidad más particular, la D-leucrosa está presente en la bebida en una cantidad de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 10 % en peso, tal como, por ejemplo, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 8 %.

La adición del potenciador de dulzor a una concentración igual o menor que su umbral de reconocimiento del dulzor aumenta la equivalencia de sacarosa detectada de la bebida, que comprende el edulcorante y el potenciador de dulzor en comparación con una bebida correspondiente en ausencia del potenciador de dulzor. Además, el dulzor puede aumentarse en una cantidad mayor que el dulzor detectable de una solución que contiene la misma concentración de al menos un potenciador de dulzor en ausencia de cualquier edulcorante.

En consecuencia, la presente invención también proporciona un método para potenciar el dulzor de una

bebida que comprende un edulcorante que comprende proporcionar una bebida que comprende un edulcorante y añadir un potenciador de dulzor seleccionado de esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6, rebaudiósido E3, rebaudiósido D, rebaudiósido I, rebaudiósido AM, rebaudiósido D7, rebaudiósido M, rebaudiósido M4, rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m, rebaudiósido 1n, rebaudiósido 2a y/o SvG7 o una combinación de estos, en donde el esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6, rebaudiósido E3, rebaudiósido D, rebaudiósido I, rebaudiósido AM, rebaudiósido D7, rebaudiósido M, rebaudiósido M4, rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c,

rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f,
rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i,
rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, rebaudiósido 1l,
rebaudiósido 1m, rebaudiósido 1n, rebaudiósido 2a y/o
SvG7 están presentes en una concentración igual o menor a
sus umbrales de reconocimiento del dulzor.

La adición de esteviolmonósido, esteviolmonósido
A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido,
esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B,
esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido
B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E,
rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6,
rebaudiósido E3, rebaudiósido D, rebaudiósido I,
rebaudiósido AM, rebaudiósido D7, rebaudiósido M,
rebaudiósido M4, rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b,
rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e,
rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h,
rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k,
rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m, rebaudiósido 1n,
rebaudiósido 2a y/o SvG7 en una concentración igual o
menor que el umbral de reconocimiento del dulzor a una
bebida que contiene un edulcorante puede(n) aumentar la
equivalencia de sacarosa detectada de aproximadamente
1,0 % a aproximadamente 5,0 %, tal como, por ejemplo,
aproximadamente 1,0 %, aproximadamente 1,5 %,
aproximadamente 2,0 %, aproximadamente 2,5 %,

aproximadamente 3,0 %, aproximadamente 3,5 %, aproximadamente 4,0 %, aproximadamente 4,5 % o aproximadamente 5,0 %.

Los siguientes ejemplos ilustran las modalidades preferidas de la invención para la preparación de glicósido(s) de esteviol objetivo altamente purificado(s), particularmente el esteviolmonósido, esteviolmonósido A, esteviolbiósido, esteviolbiósido D, rubusósido, esteviolbiósido A, esteviolbiósido B, rebaudiósido B, esteviósido, rebaudiósido G, esteviósido A, esteviósido B, esteviósido C, rebaudiósido A, rebaudiósido E, rebaudiósido E2, rebaudiósido E4, rebaudiósido E6, rebaudiósido E3, rebaudiósido D, rebaudiósido I, rebaudiósido AM, rebaudiósido D7, rebaudiósido M, rebaudiósido M4, rebaudiósido 1a, rebaudiósido 1b, rebaudiósido 1c, rebaudiósido 1d, rebaudiósido 1e, rebaudiósido 1f, rebaudiósido 1g, rebaudiósido 1h, rebaudiósido 1i, rebaudiósido 1j, rebaudiósido 1k, rebaudiósido 1l, rebaudiósido 1m, rebaudiósido 1n, rebaudiósido 2a y/o SvG7. Se entenderá que la invención no se limita a los materiales, proporciones, condiciones y procedimientos establecidos en los ejemplos, que son solo ilustrativos.

Ejemplos

Ejemplo 1

Secuencias de proteínas de enzimas modificadas usadas en el proceso biocatalítico

Sec. con núm. de ident.:1:

>SuSy_At, variante PM1-54-2-E05 (sacarosa sintasa modificada; fuente del gen WT: *Arabidopsis thaliana*)

MANAERMITRVHSQRERLNETLVSERNEVLALLSRVEAKGKGILQQNQII
AEFEALPEQTRKKLEGGPFFDLLKSTQEAIVLPPWVALAVRPRPGVWEYL
RVNLHALVVEELQPAEFLHFKEELVDGVKNGNFTLELDFEPFNASIPRPT
LHKYIGNGVDFLNRHLSAKLFHDKESLLPLLDLFLRLHSHQGKNLMLSEKI
QNLNTLQHTLRKAEEYLAELKSETLYEEFEAKFEEIGLERGWGDNAERVL
DMIRLLLDLLEAPDPSTLETFLGRVPMVFNVVILSPHGYFAQDNVLGYPD
TGGQVVYILDQVRALEIEMLRQRIKQQGLNIKPRILILTRLLPDVGTTCG
ERLERYVDSEYCDILRVPPFRTEKGIVRKWISRFEVWPYLETYTEDAAVEL
SKELNGKPDLIIGNYSDGNLVASLLAHKLGVTQCTIAHALEKTKYPDSDI
YWKKLDDKYHFSQCFTADIFAMNHTDFIITSTFQEIAGSKETVGQYESHT
AFTLPGLYRVVHGIDVFDPKFNIVSPGADMSIYFPYTEEKRRRLTKFHSEI
EELLYSDVENDEHLCVLKDKKKPILFTMARLDRVKNLSGLVEWYGNTRL
RELNVNLVVVGDRRKESKDNEEKAEMKKMYDLIEEYKLNQGFWRWISSQMD
RVRNGELYRYICDTKGAFVQPALYEAFLTVEAMTCGLPTFATCKGGPA
EIIIVHGKSGFHIDPYHGDQAADLLADFFTKCKEDPSHWDEISKGGQLQRIE
EKYTWQIYSQRLLTGVYGFWKHVSNLDRLEHRRYLEMFYALKYRPLAQ
AVPLAQDD

Sec. con núm. de ident.:2:

>UGTS12, variante 0234 (glucosiltransferasa modificada; fuente del gen WT: *Solanum lycopersicum*)

MATNLRVLMFPWLAYGHISPFNLIAKQLADRGFLIYLCSTRINLESIIKK
IPEKYADSIHLIELQLPELPELPPHYHTTNGLPPLNPTLHKALKMSKPN
FSRILQNLKPDLLIYDVLQPAEHEVANEQGIPAGKLLVSCAAVFSYFFSF
RKNPGVEFPFPAIHLPEVEKVKIREILAKEPEEGGRLDEGNKQMMLMCTS
RTIEAKYIDYCTELCNWKVVPVGPFPQDLITNDADNKELIDWLGTKPENS
TVFVSFGSEYFLSKEDMEEIAFALEASNVNFIWVVRFPKGGEERNLEDALP
EGFLERIGERGRVLDKFAPQPRILNHPSTGGFISHCGWNSVMESIDFGVP
IIAMPIHNDQPINAKLMVELGVAVEIVRDDDGIHRGEIAEALKSVVTGE
TGEILRAKVREISKNLKSIRDEEMDAVAEELIQLCRNSNKS

Sec. con núm. de ident.:3:

>UGT76G1, variante 0042 (glucosiltransferasa modificada; fuente del gen WT: *Stevia rebaudiana*)

MENKTETTTRRRRRRIILFPVPFQGHINPILQLANVLYSKGFAITILHTNFNPKPKTSNYPHFTFRFI
LDNDPQDERISNLPTHGPLAGMRIPIINEHGADELRRLELLMLASEEDEEVSLITDALWYFAQD
VADSLNLRRLVLMTSSLFNFHAHVSLPQFDELGYLDPDDKTRLEEQASGFPMLKVVDIKSAYSNNWQ
IGKEILGKMIKQTKASSGVIWNSFKELEESELETVIREIPAPSFLIPLPKHLTASSSSLLDHDRTV
FEWLDQQAPSSVLYVSFGSTSEVDEKDFLEIARGLVDSGQSFLWVVRPGFVKGSTWVEPLPDGFLG
ERGKIVKWVPQQEVLAHPAIGAFWTHSGWNSTLESVCEGVPMIFSSFGGDQPLNARYMSDVLRVGV
YLENGWERGEVNVNAIRRMVDEEGEYIRQNARVLKQKADVSLMKGGSSYESLESLSYISSL

Ejemplo 2

Expresión y formulación de la variante SuSy At de la sec. con núm. de ident.:1

El gen que codifica la variante SuSy_At de la sec. con núm. de ident.:1 (EJEMPLO 1) se clonó en el vector de expresión pLE1A17 (derivado de pRSF-1b, Novagen). El plásmido resultante se usó para transformar las células BL21(DE3) de *E. coli*.

Las células se cultivaron en el medio ZYM505 (F. William Studier, Protein Expression and Purification 41 (2005) 207-234) suplementado con kanamicina (50 mg/l) a 37 °C. La expresión de los genes se indujo a una fase logarítmica mediante IPTG (0,2 mM) y se realizó a 30 °C y 200 rpm durante 16-18 horas.

Las células se recolectaron por centrifugación (3220 x g, 20 min, 4 °C) y se resuspendieron hasta una densidad óptica de 200 (medida a 600 nm (OD₆₀₀)) con un regulador de lisis celular (100 mM de Tris-HCl pH 7,0; 2 mM de MgCl₂, 20 U/ml de DNA nucleasa, 0,5 mg/ml de lisozima). Después, las células se alteraron por sonicación y los extractos crudos se separaron de los desechos celulares por centrifugación (18000 x g 40 min, 4 °C). El sobrenadante se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,2 µm y se diluyó 50:50 con agua destilada, lo que produjo una preparación enzimática activa.

Para las preparaciones enzimáticas activas de SuSy_At, la actividad en unidades se define de la siguiente manera: 1 mu de SuSy_At da lugar a 1 nmol de sacarosa en fructosa en 1 minuto. Las condiciones de reacción para el ensayo son 30 °C, 50 mM de regulador de fosfato potásico pH 7,0, 400 mM de sacarosa a t_0 , 3 mM de $MgCl_2$ y 15 mM de uridina difosfato (UDP).

Ejemplo 3

Expresión y formulación de la variante de UGTS12 de la sec. con núm. de ident.:2

El gen que codifica la variante UGTS12 de la sec. con núm. de ident.:2 (EJEMPLO 1) se clonó en el vector de expresión pLE1A17 (derivado de pRSF-1b, Novagen). El plásmido resultante se usó para transformar las células BL21(DE3) de *E. coli*.

Las células se cultivaron en el medio ZYM505 (F. William Studier, Protein Expression and Purification 41 (2005) 207-234) suplementado con kanamicina (50 mg/l) a 37 °C. La expresión de los genes se indujo a una fase logarítmica mediante IPTG (0,1 mM) y se realizó a 30 °C y 200 rpm durante 16-18 horas.

Las células se recolectaron por centrifugación (3220 x g, 20 min, 4 °C) y se resuspendieron hasta una densidad óptica de 200 (medida a 600 nm (OD_{600})) con un regulador de lisis celular (100 mM de Tris-HCl pH 7,0; 2 mM

de MgCl_2 , 20 U/ml de DNA nucleasa, 0,5 mg/ml de lisozima). Después, las células se alteraron por sonicación y los extractos crudos se separaron de los desechos celulares por centrifugación (18000 x g 40 min, 4 °C). El sobrenadante se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,2 μm y se diluyó con 50:50 con solución de sacarosa 1 M, lo que produjo una preparación enzimática activa.

Para las preparaciones enzimáticas activas de UGTSl2, la actividad en unidades se define de la siguiente manera: 1 mu de UGTSl2 da lugar a 1 nmol de rebaudiósido A (Reb A) en rebaudiósido D (Reb D) en 1 minuto. Las condiciones de reacción para el ensayo son 30 °C, 50 mm de regulador de fosfato de potasio pH 7,0, 10 mm de Reb A a t_0 , 500 mm de sacarosa, 3 mm de MgCl_2 , 0,25 mm de uridina difosfato (UDP) y 3 U/ml de SuSy_At.

Ejemplo 4

Expresión y formulación de la variante de UGT76G1 de la sec. con núm. de ident.:3

El gen que codifica la variante UGT76G1 de la sec. con núm. de ident.:3 (EJEMPLO 1) se clonó en el vector de expresión pLE1A17 (derivado de pRSF-1b, Novagen). El plásmido resultante se usó para transformar las células BL21(DE3) de *E. coli*.

Las células se cultivaron en el medio ZYM505 (F. William Studier, Protein Expression and Purification 41

(2005) 207-234) suplementado con kanamicina (50 mg/l) a 37 °C. La expresión de los genes se indujo a una fase logarítmica mediante IPTG (0,1 mM) y se realizó a 30 °C y 200 rpm durante 16-18 horas.

Las células se recolectaron por centrifugación (3220 x g, 20 min, 4 °C) y se resuspendieron hasta una densidad óptica de 200 (medida a 600 nm (OD₆₀₀)) con un regulador de lisis celular (100 mM de Tris-HCl pH 7,0; 2 mM de MgCl₂, 20 U/ml de DNA nucleasa, 0,5 mg/ml de lisozima). Después, las células se alteraron por sonicación y los extractos crudos se separaron de los desechos celulares por centrifugación (18000 x g 40 min, 4 °C). El sobrenadante se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,2 µm y se diluyó con 50:50 con solución de sacarosa 1 M, lo que produjo una preparación enzimática activa.

Para las preparaciones enzimáticas activas de UGT76G1, la actividad en unidades se define de la siguiente manera: 1 mu de UGT76G1 da lugar a 1 nmol de rebaudiósido *D* (Reb *D*) en rebaudiósido *M* (Reb *M*) en 1 minuto. Las condiciones de reacción para el ensayo son 30 °C, 50 mM de regulador de fosfato de potasio pH 7,0, 10 mM de Reb *D* a *t*₀, 500 mM de sacarosa, 3 mM de MgCl₂, 0,25 mM de uridina difosfato (UDP) y 3 U/ml de SuSy_At.

Ejemplo 5

Síntesis de SvG7 en una reacción de un solo recipiente,
añadiendo UGTS12, SuSy At y UGT76G1 al mismo tiempo.

Diversas moléculas SvG7 fueron sintetizadas directamente del esteviósido (ver la Figura 4) en una reacción de un solo recipiente, usando las tres enzimas (ver los EJEMPLOS 1, 2, 3 y 4): UGTS12 (variante de la sec. con núm. de ident.:2), SuSy_At (variante de la sec. con núm. de ident.:1) y UGT76G1 (variante de la sec. con núm. de ident.:3).

La solución de reacción final contenía 348 U/L de UGTS12, 1341 U/L de SuSy_At, 10 U/L de UGT76G1, 47 mm de esteviósido, 0,32 mm de uridina difosfato (UDP), 0,99 M de sacarosa, 3,9 mm de MgCl₂ y regulador de fosfato potásico (pH 6,6). Primero, se mezclaron 206 ml de agua destilada con 0,24 g MgCl₂·6H₂O, 102 g de sacarosa, 9,8 ml de 1,5 M de regulador de fosfato potásico (pH 6,6) y 15 g de esteviósido. El volumen final de la mezcla de la reacción se ajustó a 300 ml.

Después de disolver los componentes, la temperatura se ajustó a 45 °C y se añadió UGTS12, SuSy_At, UGT76G1 y 39 mg de UDP. La mezcla de reacción se incubó en un agitador a 45 °C durante 24 horas. Se añadió 39 mg de UDP adicionales a las 12 horas, 24 horas y 36

horas. El contenido de reb 2a y diversos SvG7 al final de la reacción (48 horas) se analizó por HPLC.

Ejemplo 6

Análisis HPLC

Para el análisis, las muestras de biotransformación se inactivaron mediante el ajuste de la mezcla de reacción a pH 5,5 usando 17 % H_3PO_4 y después se hirvieron durante 10 minutos. Las muestras resultantes se filtraron, los filtrados se diluyeron 10 veces y se usaron como muestras para el análisis HPLC. El ensayo de HPLC se realizó en un sistema de HPLC Agilent HP 1200, compuesto por una bomba, un termostato de columna, un muestrario automático, un detector de UV capaz de corregir antecedentes y un sistema de captación de datos. Los analitos se separaron usando Agilent Poroshell 120 SB-C18, 4,6 mm x 150 mm, 2,7 μm a 40 °C. La fase móvil consistió en dos premezclas:

- la premezcla 1 que contiene 75 % del 10 mm de regulador de fosfato (pH 2,6) y 25 % de acetonitrilo, y
- la premezcla 2 que contiene 68 % del 10 mm de regulador de fosfato (pH 2,6) y 32 % de acetonitrilo.

La elución en gradiente comenzó con la premezcla 1, cambió a la premezcla 2 a 50 % a 12,5 minutos, cambió

a la premezcla 2 a 100 % a 13 minutos. El tiempo total de la ejecución fue de 45 minutos. La temperatura de la columna se mantuvo a 40 °C. El volumen de la inyección fue 5 µl. Las especies de rebaudiósido se detectaron por UV a 210 nm.

La Tabla 3 muestra para cada punto de tiempo la conversión de esteviósido en especies de rebaudiósido identificadas (porcentaje de área). Los cromatogramas del material de partida del esteviósido y la mezcla de reacción a las 48 horas se muestran en la Figura 4 y Figura 5 respectivamente. Los expertos en la técnica apreciarán que los tiempos de retención pueden variar ocasionalmente con los cambios en el solvente y/o el equipo.

Tabla 3

La biotransformación de esteviósido a reb 2a (t.r. 6,459) y diversos SvG7

Pico	% de conversión a partir de esteviósido	
	Tiempo de reacción 0 h	Tiempo de reacción 48 h
t.r. 2,651	0	0,83
t.r. 2,874	0	6,79
t.r. 3,275	0	0,15
t.r. 3,570	0	0,05
t.r. 3,798	0	0,18
t.r. 4,279	0	0,08
t.r. 4,477	0	0,05
t.r. 4,798	0	0,04
t.r. 5,089	0	0,68
t.r. 5,350	0	0,86

t.r. 5,758	0	0,28
t.r. 5,896	0	1,06
t.r. 6,261	0	0,22
t.r. 6,459	0	1,37
t.r. 6,842	0	0,57
t.r. 7,952	0	0,5
t.r. 8,775	0	1,07
reb AM	0	65,7
t.r. 10,346	0	0,83
t.r. 11,217	0	0,54
t.r. 12,425	0	0,2
reb M	0	14,97
t.r. 15,174	0	0,4
reb A	12,97	0
Esteviósido	82,83	0
reb B	0,38	1,47
Esteviolbiósido	3,82	1,11

Ejemplo 7

Purificación del rebaudiósido 2a y diversos SvG7

300 ml de la mezcla de la reacción del EJEMPLO 5, (después de 48 h), se inactivó mediante el ajuste del pH a pH 5,5 con H_3PO_4 y después se hirvió durante 10 minutos y se filtró. El filtrado se cargó en una columna que contenía 500 ml de resina YWD03 (Cangzhou Yuanwei, China) preequilibrada con agua. La resina se lavó con 2,5 l de agua y el efluente de agua de esta etapa se descartó.

Los glicósidos de esteviol se eluyeron de la columna de resina YWD03 por elución mediante 2,5 L de etanol/agua al 70 % v/v. El efluente de esta etapa se

recolectó y secó al vacío a 60 °C para producir 20 g de producto sólido seco. Esta muestra se disolvió en agua y se sometió a un fraccionamiento y separación adicional por HPLC, usando las condiciones enumeradas en la Tabla 4 más abajo.

Las fracciones HPLC que correspondieron a los compuestos individuales de múltiples ensayos se combinaron de acuerdo con el tiempo de retención. Las fracciones se liofilizaron.

Tabla 4

Condiciones para la HPLC

Columna	Agilent Prodigy 3u ODS(3) 100 A, 4,6 mm x 250 mm, 3 micrones
Temperatura	40 °C
Fase móvil	Isocrático - agua 77 %, acetonitrilo 23 %
Velocidad de flujo	0,5 ml/min
Inyección	10 µl
Hora de terminación	45 min
Temperatura del muestrario automático	Ambiente
Detección	UV a 210 nm

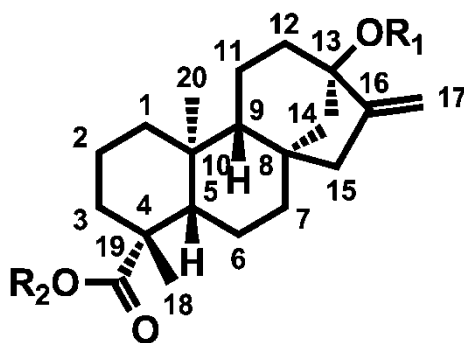
La pureza de las fracciones obtenidas se evaluó mediante el método de HPLC analítico descrito en el EJEMPLO 6. El cromatograma de rebaudiósido 2a purificado se muestra en la Figura 6.

Ejemplo 8

Elucidación de la estructura del rebaudiósido 2a

Los experimentos de NMR se realizaron en un espectrómetro Bruker 500 MHz, con la muestra disuelta en piridina-*d*₅. Junto con las señales de la muestra, se observaron señales de la piridina-*d*₅ a δ_c 123,5, 135,5, 149,9 ppm y δ_H 7,19, 7,55, 8,71 ppm.

El espectro ¹H-NMR del rebaudiósido 2a registrado en la piridina-*d*₅ confirmó la excelente calidad de la muestra (ver la Figura 7). La HSQC (ver la Figura 8) muestra la presencia de un grupo exo-metileno en la región del azúcar con un acoplamiento de largo alcance de C-15, observable en el H,H-COSY (Figura 9). Otras señales de extensión profunda de los carbonos cuaternarios (C-13, C-16 y C-19) se detectan por el HMBC (Figura 10). La correlación de las señales en la HSQC, HMBC y H,H-COSY revela la presencia del glicósido de esteviol con la siguiente estructura de aglicón:



La correlación de HSQC y HMBC muestra la presencia de siete señales anoméricas, marcadas con li, lii, liii, liv, lvi y lvii. La constante de acoplamiento de los protones anoméricos de aproximadamente 8 Hz, las señales amplias de su enlace de azúcar y las correlaciones NOE de los protones anoméricos permiten la identificación de estos siete azúcares como β -D-glucopiranosidos.

Los datos combinados de HSQC y HMBC revelan los enlaces azúcar-azúcar y los enlaces azúcar-aglicón. La asignación de la secuencia de azúcar se confirmó usando la combinación de HSQC-TOCSY (Figura 11a) y NOESY (Figura 11b).

En conjunto, los resultados de los experimentos NMR anteriores se usaron para asignar los cambios químicos de los protones y los carbonos de la estructura del rebaudiósido 2a (ver la Tabla 5).

Tabla 5

Cambios químicos del rebaudiósido 2a

Posición	δ_c [ppm]		δ_H [ppm]		J [Hz]/ (INT)	HMBC (H -> C)
Entidad de aglicón						
1	40,1	<i>t</i>	0,67 1,62	<i>m</i> <i>m</i>		
2	19,5	<i>t</i>	1,36 2,10	<i>m</i> <i>m</i>		
3	37,1	<i>t</i>	1,05	<i>m</i>		

			2,77	m		
4	44,5	s	-			
5	57,1	d	0,94	m		
6	21,8	t	1,92 2,13	m m		
7	40,9	t	1,22 1,36	m m		
8	42,1	s	-			
9	53,4	d	0,82	m		
10	39,1	s	-			
11	29,4	t	1,57 1,60	m m		
12	37,4	t	1,90 2,13	m m		
13	86,5	s	-			
14	43,4	t	1,77 2,47	d d	11,1 11,1	
15	47,2	t	1,96 1,99	d d	16,0 16,0	7, 8, 9, 14
16	153,7	s	-			
17	104,4	t	4,99 5,67	br s br s		13, 15, 16
18	28,5	q	1,40	s	(3H)	3, 4, 5, 19
19	175,7	s	-			
20	16,0	q	1,04	s	(3H)	1, 5, 9, 10

Tabla 5 (continuación)

Cambios químicos del rebaudiósido 2a

Posición	δ_c [ppm]		δ_H [ppm]		J [Hz]/ (Int)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	NOE (H $\rightarrow$ H)
Entidad de azúcar							
Azúcar I: β - D-glucopiranosido							
1 ⁱ	97,0	d	5,09	d	7,7	13	
2 ⁱ	81,9	d	4,16	m			
3 ⁱ	75,8	d	4,37	m			
4 ⁱ	81,9	d	3,85	m			

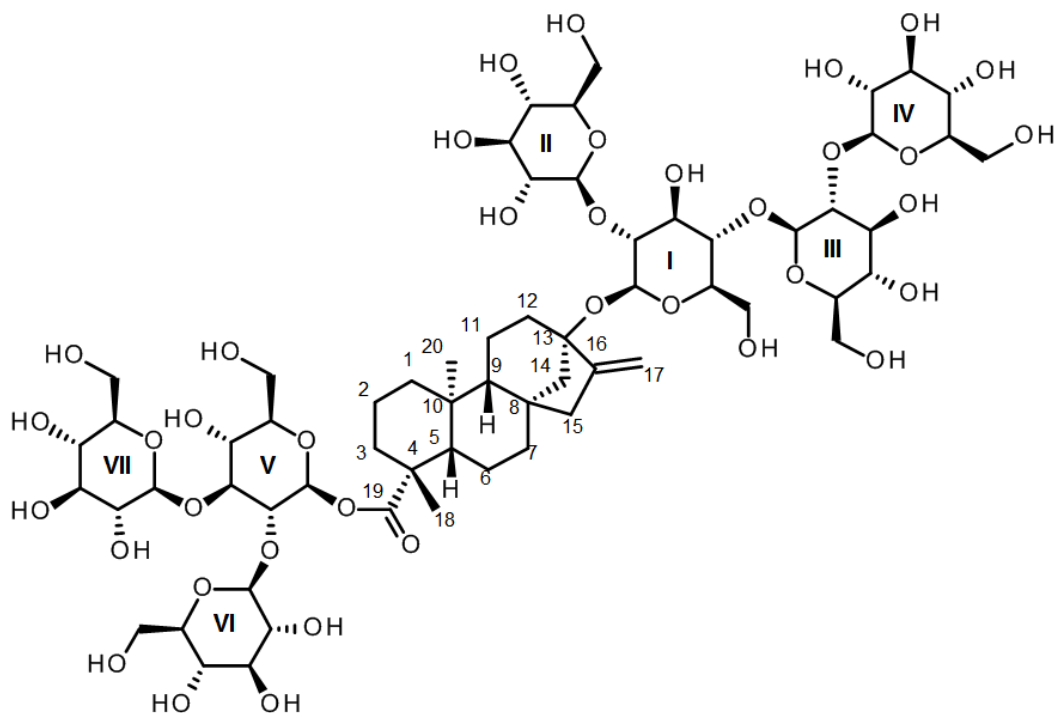
5 ⁱ	75,6	d	3,97	m			
6 ⁱ	61,8	t	4,20 4,80	m m			
Azúcar II: β - D-glucopiranosido							
1 ⁱⁱ	105,0	d	5,28	d	8,0	2 ⁱ	2 ⁱ
2 ⁱⁱ	76,3	d	4,09	m			
3 ⁱⁱ	78,0	d	4,29	m			
4 ⁱⁱ	70,8	d	4,24	m			
5 ⁱⁱ	78,1	d	3,91	m			
6 ⁱⁱ	61,4	t	4,39 4,50	m m			
Azúcar III: β - D-glucopiranosido							
1 ⁱⁱⁱ	102,4	d	4,98	d	8,1	4 ⁱ	4 ⁱ
2 ⁱⁱⁱ	84,8	d	4,05	m			
3 ⁱⁱⁱ	77,9	d	4,22	m			
4 ⁱⁱⁱ	70,9	d	4,12	m			
5 ⁱⁱⁱ	77,6	d	3,92	m			
6 ⁱⁱⁱ	62,5	t	4,31 4,53	m m			
Azúcar IV: β - D-glucopiranosido							
1 ^{iv}	106,4	d	5,22	d	7,8	2 ⁱⁱⁱ	2 ⁱⁱⁱ
2 ^{iv}	76,1	d	4,12	m			
3 ^{iv}	78,1	d	4,06	m			
4 ^{iv}	70,4	d	4,25	m			
5 ^{iv}	78,3	d	3,81	m			
6 ^{iv}	61,6	t	4,24 4,50	m m			
Azúcar V: β - D-glucopiranosido							
1 ^v	93,0	d	6,25	d	8,1	19	
2 ^v	76,8	d	4,47	m			
3 ^v	88,2	d	4,28	m			
4 ^v	69,1	d	4,12	m			
5 ^v	78,2	d	3,92	m			
6 ^v	61,5	t	4,16 4,33	m m			

Tabla 5 (continuación)

Cambios químicos del rebaudiósido 2a

Posición	δ_c [ppm]		δ_H [ppm]		J [Hz]/ (Int)	HMBC (H $\rightarrow$ C)	NOE (H $\rightarrow$ H)
Entidad de azúcar							
Azúcar VI: β - D-glucopiranosido							
1 ^{vi}	103,5	d	5,77	d	7,8	2 ^v	2 ^v
2 ^{vi}	75,4	d	4,00	m			
3 ^{vi}	77,6	d	4,27	m			
4 ^{vi}	71,1	d	4,27	m			
5 ^{vi}	78,0	d	3,96	m			
6 ^{vi}	62,7	t	4,42 4,58	m m			
Azúcar VII: β - D-glucopiranosido							
1 ^{vii}	104,4	d	5,28	d	8,0	3 ^v	3 ^v
2 ^{vii}	75,0	d	4,01	m			
3 ^{vii}	77,2	d	4,17	m			
4 ^{vii}	71,5	d	4,10	m			
5 ^{vii}	77,9	d	4,00	m			
6 ^{vii}	61,8	t	4,42 4,52	m m			

La correlación de todos los resultados de NMR indica el rebaudiósido 2a con siete β -D-glucosas unidas al aglicón de esteviol, como se ilustra con la siguiente estructura química:



El análisis LCMS (Figura 12a y Figura 12b) del rebaudiósido 2a mostró un ion $[M-H]^-$ a m/z 1451,6, de acuerdo con la fórmula molecular esperada de $C_{62}H_{100}O_{38}$ (calculada para el ion monoisotópico $[C_{62}H_{99}O_{38}]^-$: 1451,6 -). Los datos de MS confirman que el rebaudiósido 2a tiene una fórmula molecular de $C_{62}H_{100}O_{38}$. El análisis LCMS se realizó en las siguientes condiciones enumeradas en la Tabla 6.

Tabla 6

Condiciones para el análisis LCMS

Columna	Agilent Poroshell 120 SB-C18, 4,6 mm x 150 mm, 2,7 μ m
Temperatura	40 °C
Fase móvil	A: Solución de premezcla de la fase móvil - 25 % de acetonitrilo:75 % de ácido fórmico

	(0,1 % en agua) B: Solución de premezcla de la fase móvil - 32 % de acetonitrilo:68 % de ácido fórmico (0,1 % en agua)		
Gradiente	Tiempo (min)	A (%)	B (%)
	0	100	0
	12,0	100	0
	12,5	50	50
	13,0	0	100
	60,0	0	100
Velocidad de flujo	0,5 ml/min		
Inyección	2 µl		
Tiempo de ejecución	45 min		
Tiempo posterior	5 min		
Temperatura del muestrario automático	Ambiente		
Detección	MSD en modo de exploración negativa		
Configuración de MSD	Modo: ES-API, polaridad negativa Flujo del gas de secado: 13,0 l/min Presión del nebulizador: 30 psig Temperatura del gas de secado: 270 °C Fragmentador: 50 V Rangos de exploración: 500 a 1500 de masa		
Preparación de la muestra	1 mg/ml (30 % de ACN en agua)		