

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 997**

51 Int. Cl.:

A23L 1/236 (2006.01)

A23L 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2010 E 10789086 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.10.2014 EP 2482676**

54 Título: **Reducción o eliminación del sabor residual en un edulcorante utilizando rebaudiósido D**

30 Prioridad:

16.06.2009 US 187470 P

19.01.2010 US 296107 P

04.12.2009 US 266728 P

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

03.12.2014

73 Titular/es:

**EPC (BEIJING) NATURAL PRODUCTS CO., LTD.
(100.0%)**

**4/F, 3/D, B Building, No. 12, Hongda Beilu,
Economic and Technical, Development Area
Beijing 100176 , CN**

72 Inventor/es:

**SHI, JINGANG;
FENG, YUNLONG;
ZHAO, CHENGHAI y
WANG, HANSHENG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 523 997 T3

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

DESCRIPCIÓN

Reducción o eliminación del sabor residual en un edulcorante utilizando rebaudiósido D

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a un método para reducir o eliminar el sabor residual en un edulcorante o una composición edulcorada artificialmente, que comprende el paso de añadir al menos 0,5% de rebaudiósido D en peso al edulcorante o la composición. La composición de estevia resultante comprende una cantidad incrementada de al menos 0,05% de rebaudiósido D, en peso, en comparación con la cantidad de rebaudiósido D encontrada en la estevia existente naturalmente u otras sustancias existentes naturalmente que incluyen componentes de estevia. El método de la presente invención puede utilizarse para preparar composiciones de estevia que tienen una cantidad incrementada de al menos 0,5% en peso de rebaudiósido D en comparación con el contenido de rebaudiósido D encontrado en la estevia existente naturalmente u otras sustancias existentes naturalmente que incluyen componentes de estevia. Se describe también en esta memoria un proceso para convertir rebaudiósido A o esteviósido en rebaudiósido D. La conversión puede realizarse por una síntesis química elegante.

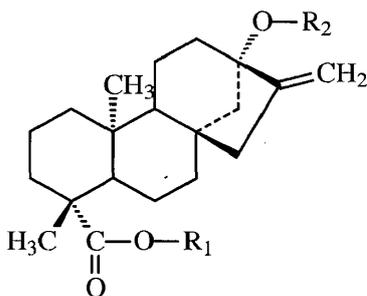
ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 Estevia es un género de aproximadamente 240 especies de hierbas y arbustos de la familia de los girasoles (Asteráceas), nativas de Sudamérica y América Central subtropical y tropical.

La especie *Stevia rebaudiana* Bertoni, conocida comúnmente como hoja dulce, hoja de azúcar, o simplemente estevia, se cultiva en gran escala por sus hojas dulces. Las hojas se han utilizado tradicionalmente como edulcorante. Los esteviósidos y rebaudiósidos son los constituyentes principales de los glicósidos encontrados en las hojas de la planta estevia.

Los extractos de estevia contienen generalmente un porcentaje elevado de los glicósidos del diterpeno esteviol. Las hojas de *Stevia rebaudiana* contienen 10 glicósidos de esteviol diferentes. Los glicósidos de esteviol están considerados como edulcorantes de alta intensidad (aproximadamente 250-300 veces la de la sacarosa) y han sido utilizados desde hace varios años en varios países como edulcorante para una gama de productos alimenticios. El esteviósido y el rebaudiósido A son los compuestos edulcorantes principales y van acompañados generalmente por pequeñas cantidades de otros glicósidos de esteviol. La calidad de sabor de rebaudiósido A es mejor que la del esteviósido, debido a dulzor aumentado y amargor disminuido (Phytochemistry 68, 2007, 1855-1863).

Las estructuras y los números de registro del servicio de Chemical Abstracts para esteviol y sus glicósidos que son los agentes edulcorantes principales de los glicósidos aditivos de esteviol se muestran a continuación:



40

	Nombre del compuesto	C.A.S. No.	R ₁	R ₂
1	Esteviol	471-80-7	H	H
2	Esteviolbiónido	41093-60-1	H	β -Glc- β -Glc(2→1)
3	Esteviósido	57817-89-7	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2→1)
4	Rebaudiósido A	58543-16-1	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2→1) β -Glc(3→1)
5	Rebaudiósido B	58543-17-2	H	β -Glc- β -Glc(2→1) β -Glc(3→1)
6	Rebaudiósido C	63550-99-2	β -Glc	β -Glc- β -Rha(2→1) β -Glc(3→1)

7	Rebaudiósido D	63279-13-0	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow) β -Glc(3 \rightarrow 1)
8	Rebaudiósido E	63279-14-1	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)
9	Rebaudiósido F	438045-89-7	β -Glc	β -Glc- β -Xyl(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
10	Rubusósido	63849-39-4	β -Glc	β -Glc
11	Dulcósido A	64432-06-0	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2 \rightarrow 1)

Las preparaciones de glicósidos de esteviol son por regla general polvos de color blanco a amarillo claro que son solubles en agua y etanol en todas proporciones. Los polvos pueden ser inodoros o tener un olor suave característico. Las soluciones acuosas son 200 a 300 veces más dulces que la sacarosa en condiciones idénticas.

5 Por tener sus extractos hasta 300 veces el dulzor del azúcar común, estevia ha ganado la atención con el aumento de demanda para alternativas alimenticias pobres en carbohidratos y con contenido bajo de azúcar común.

La investigación médica ha demostrado también posibles beneficios de estevia en el tratamiento de la obesidad y la presión sanguínea elevada. Dado que estevia tiene un efecto insignificante sobre el contenido de glucosa en sangre,

10 es atractivo como edulcorante natural para la gente sometida a dietas con contenido controlado de carbohidratos.

Como edulcorante y sustituto del azúcar común, el rebaudiósido A tiene un comienzo más lento y mayor duración que la del azúcar común, y está considerado muy próximo a la sacarosa, aunque algunos de sus extractos pueden tener un sabor residual amargo o análogo al regaliz a concentraciones elevadas. Todos los glicósidos de esteviol son amargos, algunos en menor grado y otros en mayor grado.

15

Por consiguiente, existe necesidad de un edulcorante que contrarreste una o más de las desventajas actuales arriba indicadas.

20 La Solicitud de Patente Internacional WO 2006/072921 describe un intento de enmascarar el sabor residual amargo de un extracto de estevia utilizando maltol. La Solicitud de Patente Internacional WO 2007/061898 da a conocer diversos artículos horneados que contienen al menos un edulcorante de alta potencia elevada y al menos una composición mejoradora del sabor. La Solicitud de Patente Japonesa JP S59 120073 describe un intento de preparar un edulcorante exento de sabor amargo por tratamiento de esteviósido con β -glucosil-transferasa. Sin embargo, se necesitan métodos y composiciones mejorados adicionales.

25

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

30 La presente invención proporciona sorprendentemente la capacidad de enmascarar, reducir o eliminar el amargor en una composición que por lo demás es dulce. En particular, las composiciones que contienen glicósidos de esteviol tienen típicamente un sabor residual amargo. Este enmascaramiento del amargor se debe a la incorporación de una cantidad incrementada, con relación a la composición dada, de rebaudiósido D.

35 Sorprendentemente, se ha encontrado que por aumento de la cantidad de rebaudiósido D presente en una composición que incluye rebaudiósido A y/u otros componentes de estevia tales como glicósidos de esteviol que tienen un sabor residual, un aumento mayor que 0,5% en peso de rebaudiósido D contrarresta, reduce, elimina o enmascara el sabor residual de rebaudiósido A (y/o los componentes de una composición dada que causan un sabor residual).

40 Conforme a ello, la presente invención proporciona un método para reducir o eliminar el sabor residual en un edulcorante o una composición edulcorada artificialmente, que comprende el paso de añadir al menos 0,5% de rebaudiósido D en peso al edulcorante o la composición. El método de la presente invención puede utilizarse para proporcionar composiciones con rebaudiósido D. Se describen también en esta memoria métodos para preparar rebaudiósido D.

45

Hasta el momento de la presente exposición, no se había apreciado que rebaudiósido D pudiera contrarrestar los efectos de sabor residual de los glicósidos de esteviol, tales como rebaudiósido A. El rebaudiósido A es un componente principal de los extractos de estevia.

50 Si bien se dan a conocer realizaciones múltiples, todavía otras realizaciones de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción detallada que sigue. Como resultará evidente, la invención es susceptible de modificaciones en diversos aspectos obvios, todo ello sin desviarse del alcance de la presente invención. De acuerdo con ello, las descripciones detalladas deben considerarse como de naturaleza ilustrativa y no restrictiva.

55

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, los términos "que incluye" y "que comprende" son términos indefinidos y deberían interpretarse con el significado de "que incluye, pero sin carácter limitante ...". Estos términos abarcan los términos más restrictivos "constituido esencialmente por" y "constituido por".

Debe indicarse que, como se utiliza en esta memoria y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno/a", y "el/la" incluyen los plurales correspondientes a no ser que el contexto dicte claramente lo contrario. Asimismo, los términos "un" (o "uno(a)"), "uno o más" y "al menos uno(a)" pueden utilizarse intercambiamente en esta memoria. Debe indicarse también que los términos "que comprende", "que incluye", "caracterizado por" y "que tiene" pueden utilizarse de modo intercambiable.

A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en esta memoria tienen los mismos significados que son entendidos comúnmente por una persona con experiencia ordinaria en la técnica a la que pertenece esta invención. Las publicaciones y patentes mencionadas específicamente en esta memoria describen y dan a conocer productos químicos, instrumentos, análisis estadísticos y metodologías que podrían utilizarse en conexión con la invención. Todas las referencias citadas en esta memoria descriptiva deben considerarse como indicativas del nivel de experiencia en la técnica. Nada de lo contenido en esta memoria debe interpretarse como admisión de que la invención no tiene derecho a antedatar dicha exposición en virtud de invención anterior.

La expresión "glicósidos de esteviol" está reconocida en la técnica y debe entenderse que incluye los constituyentes mayores y menores de estevia. Éstos incluyen, aunque sin carácter limitante, componentes de estevia tales como Esteviol, Esteviolbiónido, Esteviósido, Rebaudiósido A (RA), Rebaudiósido B (RB), Rebaudiósido C (RC), Rebaudiósido D (RD), Rebaudiósido E (RE), Rebaudiósido F (RF), Rubusósido y Dulcósido A. Típicamente, estevia contiene menos de una cantidad traza de rebaudiósido D. Los extractos de estevia típicos contienen también menos de aproximadamente 0,1% en peso de Rebaudiósido D (RD). Como consecuencia, es sumamente sorprendente, desconocido e impredecible que el rebaudiósido D pudiera contrarrestar el sabor residual de los componentes de extractos de estevia.

Debe entenderse que la expresión "edulcorante que contiene estevia" incluye cualquier composición que se prepare a partir de una planta estevia, tal como un extracto de estevia. El edulcorante puede incluir uno o más de los componentes asociados con la planta estevia, tales como los arriba indicados. Una vez más, los edulcorantes que contienen estevia contienen menos de aproximadamente 0,1% en peso de RD.

Una "composición de estevia", como se hace referencia a la misma en esta memoria, concierne a un extracto de estevia que incluye RA y uno o más glicósidos de esteviol encontrados en la planta estevia. En particular, el método de la presente invención puede utilizarse para proporcionar composiciones de estevia que están enriquecidas con RD en cantidades que enmascaran o alteran el sabor de los glicósidos de esteviol, RA en particular, de tal modo que el sabor residual asociado con los glicósidos de esteviol, tales como RA, se reduce, se elimina o se hace imperceptible por un individuo que saboree la composición.

El método de la presente invención puede utilizarse para proporcionar una composición que está enriquecida en rebaudiósido D (en lo sucesivo RD). El contenido de RD en la composición es mayor que 0,5% en peso con relación a la cantidad encontrada en una fuente de estevia existente naturalmente, un extracto de estevia, un alimento, o un edulcorante. Los edulcorantes o extractos de estevia típicos contienen más de 99% en peso de rebaudiósido A y cantidades traza de los restantes glicósidos de estevia u otros componentes, tales como celulosa y análogos.

El método de la presente invención puede utilizarse también para proporcionar una composición que comprende aproximadamente 99,5% en peso de RA y al menos aproximadamente 0,5% de RD. Se ha encontrado que el hecho de tener al menos 0,5% de RD en una composición de este tipo enmascara o elimina el sabor residual del RA.

El método de la presente invención puede utilizarse para preparar una composición enriquecida en RD, con inclusión de la conversión de rebaudiósido A o esteviósido en rebaudiósido D.

Después de una serie de estudios sobre glicósidos de esteviol, los investigadores de la presente invención han descubierto que la sensibilidad de sabor de rebaudiósido D está más próxima a la sacarosa que la del rebaudiósido A. Todos los glicósidos de esteviol tienen sabor residual amargo, pero se ha descubierto que RD enmascara el amargor y/o el sabor residual del regaliz. RD reduce el sabor residual hasta un punto que el mismo está notablemente reducido (frente a una muestra que no está enriquecida con el RD a un nivel de al menos 5% de RD con respecto a la muestra de control) o hasta un punto que el mismo es imperceptible para el individuo.

Como edulcorante, la aceptación del sabor dulce determina el valor de mercado. El aumento en la cantidad de rebaudiósido D presente en una composición de estevia contrarresta el sabor residual rechazable. El dulzor está relacionado con la sensibilidad de sabor. La posibilidad de producir RD en escala industrial proporcionará la oportunidad de utilizar RD como un sustituto importante del azúcar común.

Debido a las estructuras similares de los glicósidos de esteviol, el rebaudiósido D puede sintetizarse a partir de diversas materias primas, como rebaudiósido A, esteviósido, etc.

5 Por ejemplo, si se utilizara rebaudiósido A como material de partida, el grupo azúcar en la posición C-13 no debería cambiar, y debería añadirse una glucosa en la posición C-19 a otra glucosa por enlace glucosídico. Como resultado, el grupo azúcar en la posición C-19 debería convertirse en una soforosa.

10 De igual manera, otros compuestos utilizados como material de partida deberían cambiar o proteger también selectivamente los grupos en posición C-13 y C-19 en el proceso de síntesis.

Conforme al estado actual del material de partida, la estrategia de síntesis y las secuencias de reacción pueden ser diferentes.

15 El rebaudiósido D puede obtenerse también a partir de la planta estevia por técnicas de recristalización. Especialmente, para algunas especies de estevia que están enriquecidas en RD, la recristalización puede alcanzar un resultado de extracción de RD satisfactorio.

20 El investigador de esta invención ha encontrado que el aumento del contenido de rebaudiósido D en un alimento o bebida puede mejorar el sabor residual, v.g., que éste es más análogo al de la sacarosa, y tiene un sabor residual menos amargo que los productos que contienen estevia (v.g., composiciones que contienen glicósidos de esteviol) sin la cantidad incrementada de RD.

25 Se ha encontrado que, por encima de 0,5% en peso de RD, con respecto al peso global de un edulcorante de RA, puede aportar mejor sabor cuando se come o se bebe. Más de 1% en peso de RD, en comparación con el peso global de un edulcorante dado, ha producido ya un efecto acusado. Basándose en las ventajas de RD, cuanto mayor es el contenido de RD en uso, tanto mejor es el sabor que el del edulcorante actual de RA (95% de pureza de extracto de estevia).

30 Por ejemplo, el porcentaje en peso de rebaudiósido A a rebaudiósido D puede ser 99:1, 98,5:1,5, 98:2, 97,5:2,5, 97:3, 96,5:3,5, 96:4, 95,5:4,5, ó 95:5 en peso en una composición. La composición puede ser una combinación de RA y RD solos o en combinación con un producto mariscos,

35 En otro ejemplo, el método de la invención puede utilizarse para proporcionar una composición de estevia que comprende desde aproximadamente 98,5 a aproximadamente 97,5% en peso de rebaudiósido A y desde aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,5% en peso de rebaudiósido D. La composición puede ser una combinación de RA y RD solos o en combinación con un producto mariscos,

40 En otro ejemplo adicional, el método de la presente invención puede utilizarse para proporcionar una composición de estevia en la cual el porcentaje en peso de rebaudiósido A a rebaudiósido D es 98,5:1,5, 98:2 ó 97,5:2,5 en peso. La composición puede ser una combinación de RA y RD solos o en combinación con un producto mariscos,

45 Las composiciones RA/RD o RD (solo) pueden utilizarse en bebidas, caldos, y preparaciones de bebida seleccionadas del grupo que comprende productos carbonatados, no carbonatados, congelados, semicongelados ("lodos"), no congelados, listos para beber, concentrados (en polvo, congelados o en jarabe), lácteos, no lácteos, herbales, no herbales, con cafeína, descafeinados, alcohólicos, no alcohólicos, aromatizados, no aromatizados, basados en hortalizas, basados en frutos, basados en raíz/tubérculo/bulbo, basados en nuez, basados en otras plantas, basados en cola, basados en chocolate, basados en carne, basados en alimentos marinos, basados en otros animales, basados en algas, enriquecidos en calorías, bajos en calorías, y sin calorías, suministrados opcionalmente en envases abiertos, botes, botellas u otros recipientes. Tales bebidas y preparaciones para beber pueden encontrarse en forma lista para beber, lista para cocinar, lista para mezclar, cruda, o de ingrediente y pueden utilizar el RD como edulcorante único o como co-edulcorante.

55 El RD puede utilizarse en alimentos y preparaciones de alimentos (v.g. edulcorantes, sopas, salsas, aromatizantes, especias, aceites, grasas, y condimentos) a base de productos de base láctea, de base cereal, horneados, basados en hortalizas, basados en frutas, basados en raíz/tubérculo/bulbo, basados en nuez, basados en otras plantas, basados en huevo, basados en carne, basados en mariscos, basados en otros animales, basados en algas, procesados (v.g. pastas para untar), conservados (v.g. raciones de alimentos preparados), y sintetizados (v.g. geles). Tales alimentos y preparaciones alimenticias pueden encontrarse en forma preparada, lista para cocinar, lista para mezclar, cruda, o en forma de ingrediente y puede utilizar el RD como edulcorante único o como co-edulcorante.

65 El RD puede utilizarse en caramelos, dulces, postres, y tentempiés seleccionados del grupo que comprende productos de base láctea, de base cereal, basados en hortalizas, basados en frutos, basados en raíz/tubérculo/bulbo, basados en nuez, basados en chicle, basados en otras plantas, basados en huevo, basados en carne, basados en mariscos, basados en otros animales, basados en algas, procesados (v.g. pastas para untar),

conservados (v.g. raciones de comida listas para comer), y sintetizados (v.g. geles). Tales caramelos, dulces, postres, y tentempiés pueden encontrarse en forma lista para comer, lista para cocinar, lista para mezclar, cruda, o de ingrediente y pueden utilizar el RD como edulcorante único o como co-edulcorante.

5 El RD puede utilizarse en productos farmacéuticos de venta con y sin receta, ensayos, kits de diagnóstico, y terapias seleccionadas del grupo que comprende productos para control del peso, suplemento nutricional, vitaminas, dieta para niños, dieta para diabéticos, dieta para atletas, dieta geriátrica, dieta baja en carbohidratos, dieta baja en grasas, dieta baja en proteínas, dieta rica en carbohidratos, dieta rica en grasas, dieta rica en proteínas, dieta baja en calorías, dieta no calórica, productos de higiene oral (v.g. pasta dentífrica, bucal, enjuagados, seda dental, cepillos de dientes, otros implementos), productos para cuidado personal, (v.g. jabones, champúes, enjuagados, lociones, bálsamos, pomadas, ungüentos, artículos de papel, perfumes, lápiz de labios, otros cosméticos), productos profesionales de odontología en los cuales el sabor o el olor es un factor (v.g. líquidos, gomas de mascar, inhalables, inyectables, pomadas, resinas, enjuagados, tampones, seda dental, implementos), productos médicos, veterinarios, y quirúrgicos en los cuales el sabor o el olor es un factor (v.g. líquidos, goma de mascar, productos inhalables, inyectables, pomadas, resinas, enjuagados, tampones, seda dental, implementos), y composiciones farmacéuticas que incluyen cargas, jarabes, cápsulas, geles, y productos de recubrimiento.

20 El RD puede utilizarse en materiales de empaquetado de artículos para el consumidor y recipientes seleccionados del grupo que comprende film plástico, resina termoendurecible y termoplástica, chicle, papel metalizado, papel ordinario, botellas, cajas, tintes, pinturas, adhesivos, y productos de recubrimiento de envases.

25 El RD puede utilizarse en artículos que incluyen edulcorantes, co-edulcorantes, barras de edulcorante recubiertas, barras de dulces congeladas, cucharadas de medicamentos, (usos humano y veterinario), instrumentos dentales, servicio de mesa y utensilios desechables previamente edulcorados; bolsitas, bolsitas comestibles, flores secas aromáticas, flores secas aromáticas comestibles, flores artificiales, flores artificiales comestibles, dulces, dulces comestibles, aceites para masaje, y aceites para masaje comestibles.

30 El RD puede utilizarse también con "edulcorantes artificiales". Los edulcorantes artificiales son aquéllos, distintos de la sacarosa, tales como ciclamatos y sales de los mismos, sucralosa, aspartamo, sacarina y sales de la misma, estevia (Truvia™), rebaudiósido A, xilitol, acesulfamo-K y análogos. El RD enmascara, reduce o elimina el sabor residual asociado con el edulcorante artificial, de tal modo que el sabor se asemeja al del azúcar común.

35 Los párrafos que siguen enumerados consecutivamente de 1 a 4 proporcionan diversos aspectos de la presente invención. En una realización, en un primer párrafo (1), la presente invención proporciona un método para reducir o eliminar el sabor residual en un edulcorante, que comprende el paso de añadir al menos 0,5% de rebaudiósido D en peso al edulcorante.

40 2. Un método para reducir o eliminar el sabor residual en una composición edulcorada artificialmente, que comprende el paso de añadir al menos 0,5% de rebaudiósido D en peso a la composición.

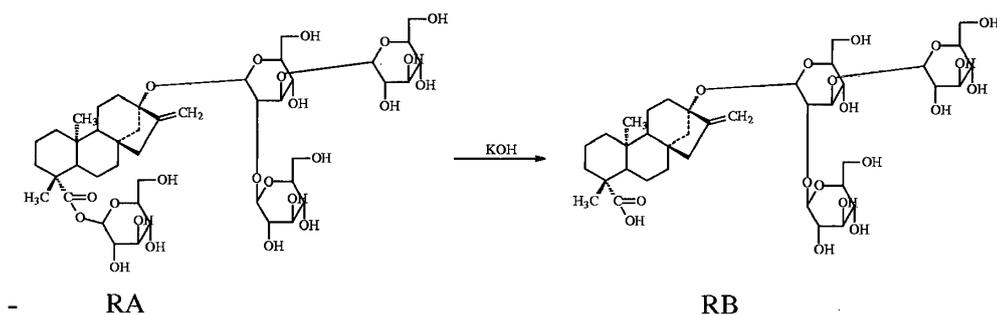
3. El método del párrafo 1 ó 2, en el que el edulcorante o edulcorante artificial es un producto de estevia.

4. El método del párrafo 3, en el que el producto de estevia es rebaudiósido A.

45 La invención se describirá a continuación con referencia a los ejemplos no limitantes que siguen. Será evidente para los expertos en la técnica que pueden hacerse muchos cambios en las realizaciones descritas sin desviarse del alcance de la presente invención. Por tanto, el alcance de la presente invención no debería estar limitado por las realizaciones descritas en esta solicitud, sino únicamente por las realizaciones descritas por las expresiones lingüísticas de las reivindicaciones y los equivalentes de dichas realizaciones. A no ser que se indique otra cosa, todos los porcentajes se expresan en peso.

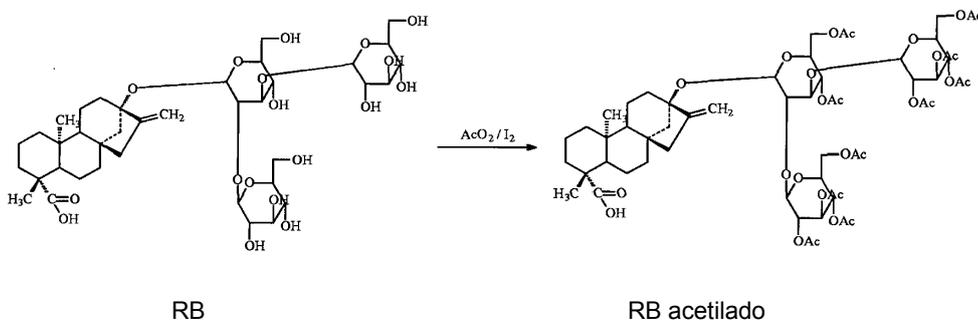
EJEMPLOS

55 Rebaudiósido A como material de partida: Rebaudiósido A (RA) y rebaudiósido D (RD) tienen las estructuras moleculares análogas, con el mismo grupo en la posición C-13. En la posición C-19, rebaudiósido A tiene glucosa, y RD lleva soforosa (2-O-β-D-glucopiranosil-D-glucosa). RA se convirtió de RA en rebaudiósido B (RB):



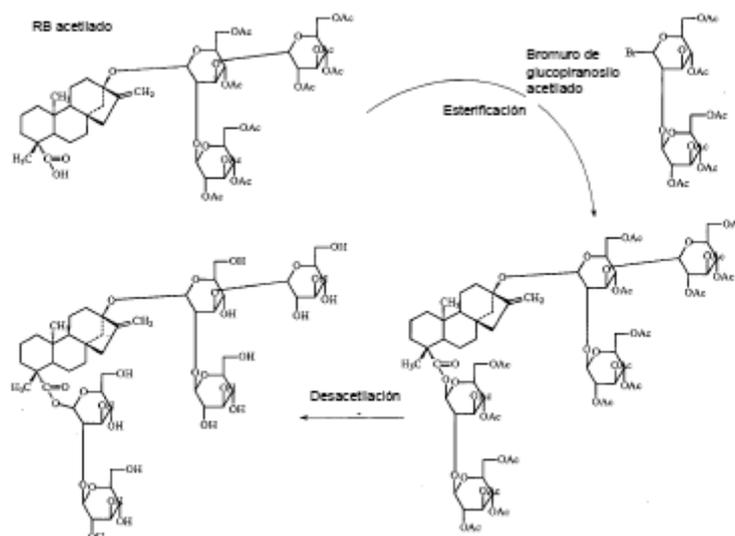
5 9,15 g de RA (pureza 99%; producto comercial), 200 ml de KOH al 10% y 200 ml de metanol se mezclaron en un matraz, y la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 1,5 horas antes de enfriarla a 0°C. La solución de reflujo se ajustó a pH = 3 con ácido sulfúrico al 10% y se concentró. El residuo se recrystalizó con agua para dar 7,5 g de RB, con 99% de pureza. La pureza se determinó por HPLC. El análisis HPLC se realizó como sigue: SHIMADZU 20A, columna: inertsil NH₂, 5 µm, 4,6 x 150 mm; fase móvil: acetonitrilo:agua = 85:15 (v/v); caudal: 2 ml/min; longitud de onda: 210 nm.

10 Protección acetilada de RB:



15 Se mezclaron 5,0 g de RB con 50 ml de anhídrido acético para formar una suspensión, y se añadieron 0,2 g de I₂ a la suspensión con agitación. La mezcla se hizo reaccionar a la temperatura ambiente durante 5-30 minutos hasta que la reacción adquirió un color pardo y transparente, lo que indicaba el final de la reacción de acetilación. La mezcla de reacción se diluyó con 300 ml de dicloruro de metileno (DCM), y se lavó sucesivamente con agua y hielo (120 ml x 2), NaHCO₃ acuoso saturado (100 ml x 2) y tiosulfato de sodio acuoso (Na₂S₂O₃, 0,4 mol/l, 100 ml x 2). La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró luego. El filtrado se evaporó por evaporación rotativa para proporcionar un sólido blanco. El sólido blanco se recrystalizó con éter y éter de petróleo para producir cristales blancos. El rendimiento fue 87-96% en peso. El producto se caracterizó en las condiciones HPLC indicadas anteriormente.

25 Esterificación y desacetilación para producir rebaudiósido D (RD):



Se disolvieron 2,0 g de RB acetilado en 50 ml de dicloroetano. Se añadió diatomita absorbida con carbonato de plata a la solución y se calentó luego a reflujo. Bajo agitación energética, se añadieron por lotes 3 g de bromuro de glicopiranosilo acetilado, y se hizo reaccionar luego a 75-80°C durante 2 horas. La reacción debería evitar exposición a la luz. Después del final de la reacción, la mezcla de reacción se enfrió y se filtró luego. El filtrado se evaporó por evaporación rotativa. Se añadió metilato de sodio 0,1 N al residuo con agitación a la temperatura ambiente durante 24 horas para realizar la desacetilación. La solución resultante se neutralizó con resina catiónica y se filtró luego. El filtrado se evaporó por evaporación rotativa y el residuo se disolvió en una pequeña cantidad de piridina. Se realizó una separación cromatográfica en columna por elución con cloroformo:metanol:agua (65:30:10). Las fracciones que contenían RD se reunieron y se secaron. Después de recrystalización en agua, se produjeron 0,15 g de un polvo blanco (RD) y el rendimiento fue 8,1%.

Ejemplo 2

Esteviósido como material de partida:

Conforme a la Solicitud de Patente Coreana 20040026747, se seleccionó β -1,3-glucosidasa de *E. coli*, *Bacillus subtilis*, o levadura. Con Pachyman como donante de glucosa y esteviósido como sustrato, en solución tampón de acetato (pH = 6,05), la mezcla de reacción se mantuvo a 50°C durante 24 horas. La mezcla resultante se sometió a filtración, concentración y recrystalización para proporcionar RA, caracterizado por HPLC en las condiciones arriba indicadas.

Conforme al Ejemplo 1, se sintetizó luego RD a partir del RA.

Comparación de la mejora de sabor RA/RD.

Muestra:

- Rebaudiósido A (RA) (pureza 98%, fuente comercial);
- RA más rebaudiósido D (RD), siendo la ratio RA:RD 98:2 en peso;
- RA más RD, siendo la ratio RA:RD 95:5 en peso.

Procedimiento:

Un panel sensorial de expertos saboreará las muestras, y dará su impresión en cuanto a las semejanzas de las características.

El panel de examinadores puede entrenarse utilizando el Método de Análisis Descriptivo Spectrum™ (Meilgaard et al, Sensory Evaluation Techniques, 3ª edición, capítulo 11).

Con objeto de asegurar la exactitud y reproducibilidad de los resultados, cada examinador repitió la medida de la reducción del dulzor persistiendo 3 veces por muestra, realizando al menos una interrupción de 5 minutos entre cada repetición y/o muestra y enjuagándose bien con agua para limpiar la boca.

5 Generalmente, el método de medida del dulzor comprendía tomar una muestra acuosa de 10 ml (concentración de 200 ppm) en la boca, retener la muestra en la boca durante 5 segundos y agitar suavemente la muestra en la boca, evaluar la intensidad de dulzor percibida al cabo de 5 segundos, expectorar la muestra (sin tragar después de la expectoración de la muestra), enjuagarse con un trago de agua (v.g. moviendo el agua enérgicamente en la boca como si se tratara de un elixir bucal) y expectorar el agua de enjuagado, evaluar la intensidad de dulzor percibida
10 inmediatamente después de expectorar el agua de enjuagado, esperar 45 segundos y, mientras se dejan transcurrir dichos 45 segundos, identificar el momento de intensidad de dulzor máxima percibida y evaluar la intensidad de dulzor durante dicho momento (moviendo la boca normalmente y tragando en caso necesario), evaluar la intensidad de dulzor después de otros 10 segundos, evaluar la intensidad de dulzor después de otros 60 segundos, (120 segundos acumulados después del enjuagado), y evaluar la intensidad de dulzor después de otros 60 segundos más (180 segundos acumulados después del enjuagado). Entre las muestras se hace una pausa de 5 minutos, enjuagando bien con agua para limpiar la boca.

20 Un sabor dulce mejorado (característico semejante al del azúcar común) debería incluir respuesta máxima (intensidad de dulzor), perfil de aroma, perfil temporal (importante), sensación gustativa, interacciones aroma/gusto dulce, y efectos de temperatura. El examinador consideraría dichos diversos factores y evaluaría el sabor dulce, después de lo cual identificaría la muestra óptima. Todos los resultados utilizan análisis estadístico para llegar a una conclusión final.

Escenario de comparación:

25 Teniendo en cuenta el efecto de interferencia entre diversas muestras, cada grupo incluye únicamente dos muestras para comparación.

30 Grupo 1: RA frente a RA/RD (98:2)

Grupo 2: RA/RD (98:2) frente a RA/RD (95:5)

Resultados:

35 Grupo 1: 9 personas de 16 examinadores (56,25%) emiten un juicio inmediato de que RA/RD (98:2) es mejor que RA.

40 Grupo 2: 6 personas de 10 examinadores (60%) tienen un juicio inmediato de que RA/RD (95:5) es mejor que RA/RD (98:2).

Conclusión:

45 Rebaudiósido B juega un papel importante para mejorar el sabor y/o la sensación gustativa de rebaudiósido A. Hablando en términos generales, con el aumento de porcentaje de RD en la muestra, el sabor indeseable de RA se reduce sensiblemente.

Análisis sensorial de 3 muestras de glicósidos de esteviol

50 Marca de test:

Panel entrenado de 6 personas de tests.

Se prepararon muestras como soluciones de 200 ppm en agua (a la misma temperatura).

55 Cada persona de test recibió 3 vasos iguales con 100 ml de la muestra preparada. Los vasos se designaron con números de 3 dígitos aleatorios.

La pregunta formulada fue: "¿Puede usted apreciar una diferencia de sabor entre las muestras y, en caso afirmativo, describir por favor la diferencia en texto claro?".

60 Después del periodo de saboreo, el panel intercambió las opiniones individuales y llegó a la conclusión siguiente (la naturaleza de la muestra se mantuvo oculta hasta que se llegó a la conclusión):

65 R-A > 99%: ligeramente menos dulce que las otras dos muestras, sabor residual levemente amargo

R-A/R-D 98/2: muy similar a R-A, ausencia de sabor residual amargo, ligeramente más dulce que R-A, en general "más consistente" en sabor, con sabor "natural"

5 R-A/R-D 95/5: más dulce que las otras dos muestras, en la primera fase del test finalmente un poco excesivamente dulce.

Observación general: Las 3 muestras son bastante similares en el perfil de dulzor (tiempo de comienzo, duración de la sensación dulce, disminución de intensidad después de tragarlas varias veces).

10 Aunque la presente invención se ha descrito con referencia a realizaciones preferidas, las personas expertas en la técnica reconocerán que pueden hacerse cambios en forma y detalle sin desviarse del alcance de la invención. Los expertos en la técnicas reconocerán, o podrán determinar, utilizando simplemente experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas específicamente en esta memoria. Tales equivalentes deben considerarse abarcados dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes.

15

REIVINDICACIONES

1. Un método para reducir o eliminar el sabor residual en un edulcorante o una composición edulcorada artificialmente, que comprende el paso de añadir al menos 0,5% de rebaudiósido D en peso al edulcorante o la composición.
5
2. El método de la reivindicación 1, en donde el edulcorante o edulcorante artificial es un producto de estevia tal como rebaudiósido A.