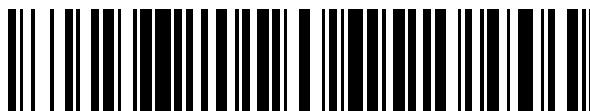


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 557 560**

51 Int. Cl.:

A23L 1/236 (2006.01)

A23L 2/60 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2011** **E 11781699 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2015** **EP 2667732**

54 Título: **Mezclas de estevia que contienen rebaudiósido B**

30 Prioridad:

28.01.2011 US 201161437390 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.01.2016

73 Titular/es:

**TATE & LYLE INGREDIENTS AMERICAS LLC
(100.0%)
5450 Prairie Stone Parkway
Hoffmann Estates IL 60192, US**

72 Inventor/es:

**BRIDGES, JOHN R.;
CARLSON, ALFRED y
PATTON, PENELOPE A.**

74 Agente/Representante:

RIZZO, Sergio

ES 2 557 560 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

Mezclas de estevia que contienen rebaudiósido B

Antecedentes

[0001] Los edulcorantes naturales calóricos, tales como la sacarosa, la glucosa y la fructosa, poseen unas características deseables de sabor, pero aumentan el contenido calórico de los productos. Por tanto, existe un gran interés por parte del consumidor en edulcorantes no calóricos o bajos en calorías que se consideran alternativas más saludables. Son conocidos los edulcorantes no calóricos, naturales y sintéticos de alta intensidad, pero en la mayoría de casos poseen perfiles de sabor que no resultan tan deseables para los consumidores como los azúcares. Por consiguiente, es deseable desarrollar edulcorantes no calóricos que puedan sustituir al azúcar y que presenten un perfil de sabor más deseable.

[0002] La especie *Stevia rebaudiana* («*Stevia*») es fuente de determinados glicósidos de esteviol dulces de origen natural. Se ha realizado una investigación y desarrollo considerables para evaluar el uso de glicósidos de esteviol dulces de *Stevia* como edulcorantes no calóricos. Los glicósidos de esteviol dulces que puede que se extraigan de *Stevia* incluyen los seis rebaudiósidos (es decir, rebaudiósido A a F), esteviósido (el glicósido predominante en extractos de *Stevia* natural) y dulcósidos.

[0003] Los edulcorantes comerciales no calóricos o bajos en calorías a base de rebaudiósido A y otros glicósidos de esteviol tienden a tener regustos amargos y a regaliz. Dichas características son especialmente notables en concentraciones por encima de los 300 ppm. En aplicaciones alimentarias, los niveles preferidos de uso (valores de equivalencia con el azúcar de 8-10 %) son normalmente de 500 ppm a 1000 ppm, por encima del rango en el que se perciben inicialmente los sabores. Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad de edulcorantes de contenido calórico reducido, bajos en calorías y/o no calóricos que comprendan glicósidos de esteviol dulces que presenten perfiles de sabor sin amargor o de amargor reducido, sabores no deseables (por ejemplo, regaliz) o perfiles de dulzor más similares a los edulcorantes calóricos naturales, o combinaciones de dichas propiedades. Los documentos WO2011094423 y WO2012/068457 (ambos citables de conformidad con el Artículo 54(3) CPE y, respectivamente, exentos del alcance de protección de acuerdo con las condiciones (a) y (b)), respectivamente, se refieren a métodos de purificación de mezclas de glicósidos y a métodos para el enriquecimiento de rebaudiósido B y/o rebaudiósido D en composiciones de glicósidos derivados de la estevia.

Sumario de la invención

[0004] La presente invención se refiere a un extracto de *Stevia* que comprende rebaudiósido B en una concentración que se encuentra en el rango de 10 a 60 % en peso de los compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia*, con la salvedad de que no están incluidas las composiciones mencionadas en las condiciones de la reivindicación 1.

[0005] La presente invención también se refiere a una composición edulcorante que comprende compuestos de glicósidos de esteviol dulces, donde los compuestos de glicósidos de esteviol dulces comprenden rebaudiósido B en una concentración que está en el rango de 10 % a 60 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces de la composición edulcorante, con la salvedad de que no están incluidas las composiciones mencionadas en las condiciones de la reivindicación 6.

[0006] La presente invención también se refiere a bienes fungibles tales como bebidas, alimentos, productos para la higiene oral, productos del tabaco, productos farmacéuticos y productos nutracéuticos que comprenden las anteriores composiciones edulcorantes y métodos de edulcorado de las mismas por medio de una composición edulcorante que comprende compuestos de glicósidos de esteviol dulces, donde los compuestos de glicósidos de esteviol dulces comprenden rebaudiósido B en una concentración que está en el rango de 10 % a 60 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces de la composición edulcorante.

Breve descripción de los dibujos

[0007]

La Figura 1 es un gráfico que muestra la solubilidad del rebaudiósido B en tampón de ácido cítrico a un pH de 3 en función de las concentraciones de rebaudiósido A y esteviósido.

La Figura 2 muestra las estructuras de glicósidos de esteviol.

La Figura 3 es un gráfico que muestra el efecto del contenido de rebaudiósido B (en una solución que contiene rebaudiósido A y rebaudiósido B añadido para obtener una concentración total de 900 ppm en agua) sobre diversos atributos de sabor calificados por evaluadores del sabor.

Descripción detallada

I. Definiciones

[0008] Como se usa en la presente memoria, la expresión «compuestos de glicósidos de esteviol dulces» se refiere a cualquiera de un número de compuestos de origen natural con una estructura general del sistema de anillo de diterpeno de esteviol con uno o más residuos sacáridos químicamente ligados al anillo.

II. Resumen

[0009] Se ha descubierto de manera inesperada que la inclusión y/o control de la concentración de rebaudiósido B en extractos de *Stevia* y composiciones edulcorantes que comprenden glicósidos de esteviol dulces tiende a reducir o eliminar características de sabor que generalmente se consideran negativas, tales como el amargor, el regusto a regaliz, o bien da lugar a un perfil de dulzor más similar al de los edulcorantes naturales calóricos, o combinaciones de dichas propiedades. Específicamente, se ha descubierto que las ventajas anteriormente mencionadas puede que se logren al seleccionar una concentración relativamente alta de rebaudiósido B con respecto a la concentración total de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* y composiciones edulcorantes (por ejemplo, que sea rebaudiósido B al menos un 10 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces).

[0010] Los extractos de *Stevia* y las composiciones edulcorantes anteriormente mencionados de la presente invención resultan de utilidad como edulcorantes de contenido calórico reducido, bajos en calorías o no calóricos en alimentos, es decir, composiciones comestibles o masticables tales como comida, bebidas, medicamentos, dulces, goma de mascar y similares. Se ha descubierto que el extracto de *Stevia* y las composiciones edulcorantes de la presente invención pueden poseer un perfil de dulzor que es más similar al del azúcar, con un regusto amargo más reducido y mayor disminución del mal sabor (por ejemplo, regaliz) que otras mezclas de glicósidos de esteviol dulces, tales como las combinaciones y mezclas de glicósidos de esteviol disponibles en el mercado. Los ensayos han demostrado que, en la mayoría de casos, los sujetos del ensayo prefieren las composiciones edulcorantes de la presente invención en lugar de composiciones que comprenden un 97 % de rebaudiósido A, cuando se someten a ensayo en la misma concentración. Se espera que la adición a comidas y bebidas de extracto de *Stevia* y composiciones edulcorantes de la presente invención dé lugar a comidas y bebidas con mejor sabor en comparación con las preparadas con extractos de *Stevia* y composiciones edulcorantes conocidos que contienen glicósidos de esteviol dulces, tales como las composiciones que presentan un 97 % de rebaudiósido A.

[0011] También se contempla que el rebaudiósido B puede que se añada a otros edulcorantes de alta intensidad. Ejemplos representativos de edulcorantes de alta intensidad adecuados para formas de realización de la invención incluyen edulcorantes naturales de alta intensidad tales como:

dulcósido A, dulcósido B (también conocido como rebaudiósido C), rubosósido, siamenósido, monatina y sus sales (monatina SS, RR, RS, SR), curculina, ácido glicirrico y sus sales, taumatina, monellina, mabinlina, brazzeína, hernandulcina, filodulcina, glicifilina, ploridzina, esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, estevia, esteviolmonósidos y esteviolbiósidos;

y edulcorantes artificiales de alta intensidad tales como:

sacarina, aspartamo, sucralosa, neotamo, acesulfamo de potasio. Asimismo, un experto en la materia reconocerá que el rebaudiósido B puede añadirse a edulcorantes calóricos como azúcares (por ejemplo, jarabe de maíz rico en fructosa, sacarosa, fructosa, etc.) y polioles (por ejemplo, sorbitol, xilitol, lactitol, etc.) u otros edulcorantes bajos en calorías para producir composiciones edulcorantes que sean de valor calórico reducido.

[0012] La extracción simple de glicósidos de esteviol de plantas da lugar por lo general a extractos que son menos preferibles en términos de sabor que los extractos purificados con un contenido mayor de rebaudiósido A. No obstante, los extractos simples son más sencillos de producir y, por lo general, son más baratos de producir que el rebaudiósido A de alta pureza. Por tanto, una ventaja adicional de la presente invención puede que sea una combinación de un extracto simple o de un producto parcialmente purificado y rebaudiósido B, a fin de

obtener una mezcla glicosídica que sea más barata de producir que el rebaudiósido A purificado, pero que posea unas características de sabor similares o superiores. También se contempla que los flujos de tratamiento de los glicósidos de esteviol que hayan perdido glicósidos de buen sabor durante la purificación del rebaudiósido A puedan mejorar su sabor al aumentar el contenido de rebaudiósido B.

[0013] Las composiciones que contienen rebaudiósido B puede que se modifiquen adicionalmente mediante tecnología conocida para modificar el tamaño de las partículas, como la aglomeración, el secado por pulverización, el secado por tambor y otras formas de tratamiento físico que se apliquen comúnmente para ajustar el tamaño de las partículas con el fin de presentar unas mejores propiedades de flujo, hidratación o disolución.

[0014] Las composiciones que contienen rebaudiósido B puede que se modifiquen adicionalmente mediante tecnología conocida para proporcionar formas líquidas con conservantes para una mayor facilidad de uso en aplicaciones específicas.

[0015] Las composiciones que contienen rebaudiósido B puede que se modifiquen adicionalmente mediante técnicas conocidas para el procesado conjunto con agentes de carga como maltodextrinas y compuestos similares para presentar productos con unas propiedades controladas de dulzor, dosificación, potencia y manipulación. Asimismo, cabe destacar que el rebaudiósido B y/o combinaciones de este y otros glicósidos de esteviol pueden combinarse con otros ingredientes que puede que sea deseable su inclusión en una composición edulcorante. Por ejemplo, el rebaudiósido B puede impregnarse por pulverización o aglomerarse por pulverización en el rebaudiósido A o en otros glicósidos de esteviol y/o con otros materiales como maltodextrinas, sacarosa u otro vehículo funcional deseado.

III. Extractos de *Stevia* y composiciones edulcorantes que comprenden rebaudiósido B

[0016] Se ha descubierto que el sabor de las mezclas y combinaciones de glicósidos de esteviol dulces (por ejemplo, mezclas y combinaciones de glicósidos de esteviol) puede mejorar mediante el control y/o aumento de las concentraciones de rebaudiósido B en composiciones de glicósidos de esteviol de acuerdo con la presente invención. Se cree que la mejora del sabor se hace patente en valores de pH de pH 2 a pH 8.

[0017] Se determinaron los límites de solubilidad del rebaudiósido B (véase el Ejemplo 5). Por ejemplo, los resultados experimentales hasta la fecha indican (i) que el rebaudiósido B presenta una solubilidad relativamente alta en una solución de pH neutro y (ii) que la solubilidad del rebaudiósido B está limitada en un tampón cítrico de pH 3. Resultados experimentales adicionales hasta la fecha indican que la presencia de rebaudiósido A en una solución aumenta la solubilidad del rebaudiósido B. Por otro lado, los resultados experimentales hasta la fecha indican que la presencia de esteviósido reduce ligeramente la solubilidad del rebaudiósido B. Esta información relativa a la solubilidad puede que se considere a la hora de formular soluciones de rebaudiósido B y mezclas de rebaudiósidos.

[0018] El rebaudiósido B para mezclar con otros edulcorantes puede obtenerse de diversas formas. Por ejemplo, el rebaudiósido B puede aislarse de extractos vegetales mediante cromatografía, precipitación o cristalización. De manera alternativa, el rebaudiósido B puede que se obtenga al tratar el rebaudiósido A con diversos hidróxidos de cationes monovalentes, divalentes y trivalentes sometido a condiciones apropiadas de temperatura y pH. La mezcla de rebaudiósido B y rebaudiósido A residual puede usarse para aumentar la cantidad de rebaudiósido B en otra mezcla, o bien puede aislarse el rebaudiósido B de la mezcla de rebaudiósido A/rebaudiósido B mediante cromatografía, precipitación o cristalización selectiva. El rebaudiósido B también puede obtenerse de manera similar mediante el tratamiento del rebaudiósido D con los mismos compuestos de hidróxido mencionados anteriormente para el rebaudiósido A. La mezcla de producto o el rebaudiósido B aislado puede usarse para preparar las mezclas de glicósidos de esteviol con sabor mejorado anteriormente mencionadas. Otra alternativa es que el rebaudiósido B se produzca enzimáticamente a partir de rebaudiósido A o rebaudiósido D.

[0019] En determinadas formas de realización, un extracto de *Stevia* o composición edulcorante comprende rebaudiósido B y uno o varios compuestos adicionales de glicósidos dulces. Ejemplos representativos de compuestos de glicósidos dulces incluyen rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C (dulgósido B), rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, estevia, esteviósido, dulcósido A y rubosósido. En determinadas formas de realización, los uno o varios glicósidos dulces puede que sean glicósidos de esteviol dulces, lo que incluye esteviolbiósidos y esteviolmonósidos. Más particularmente, ejemplos representativos de glicósidos de esteviol dulces incluyen rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F y esteviósido. Por ejemplo, las extracciones parcialmente purificadas de glicósidos de esteviol de plantas a menudo comprenden una mezcla de rebaudiósido B y glicósidos de esteviol adicionales.

[0020] En determinadas formas de realización, en los casos en que un extracto de *Stevia* o composición edulcorante comprenda rebaudiósido B y uno o varios compuestos adicionales de glicósidos de esteviol dulces, la cantidad de rebaudiósido B se encuentra en una concentración que es al menos un 10 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización, el rebaudiósido B se encuentra en una concentración que es al menos un 15 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización, el rebaudiósido B se encuentra en una concentración que es al menos un 20 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización, el rebaudiósido B se encuentra en una concentración que es al menos un 25 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización, el rebaudiósido B se encuentra en una concentración que es al menos un 30 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización, el rebaudiósido B se encuentra en una concentración que es al menos un 35 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización, el rebaudiósido B se encuentra en una concentración que es al menos un 40 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización, el rebaudiósido B se encuentra en una concentración que es al menos un 45 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización, el rebaudiósido B se encuentra en una concentración que es al menos un 50 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante.

[0021] En determinadas formas de realización, en los casos en que un extracto de *Stevia* o composición edulcorante comprenda rebaudiósido B y uno o varios compuestos adicionales de glicósidos de esteviol dulces, y en los casos en que la concentración de rebaudiósido B esté a una concentración coherente con cualquiera de las formas de realización anteriormente descritas (el término «coherente» descarta potenciales combinaciones en las que se seleccione un límite inferior de un rango desde arriba que sea mayor que un límite superior de un rango desde abajo), puede que la concentración de rebaudiósido B se encuentre en una concentración que no sea mayor que el 60 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización en las que la concentración de rebaudiósido B se encuentra en una concentración coherente con cualquiera de las formas de realización anteriormente descritas, la concentración de rebaudiósido B no es superior al 50 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización en las que la concentración de rebaudiósido B se encuentra en una concentración coherente con cualquiera de las formas de realización anteriormente descritas, la concentración de rebaudiósido B no es superior al 40 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización en las que la concentración de rebaudiósido B se encuentra en una concentración coherente con cualquiera de las formas de realización anteriormente descritas, la concentración de rebaudiósido B no es superior al 35 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización en las que la concentración de rebaudiósido B se encuentra en una concentración coherente con cualquiera de las formas de realización anteriormente descritas, la concentración de rebaudiósido B no es superior al 30 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización en las que la concentración de rebaudiósido B se encuentra en una concentración coherente con cualquiera de las formas de realización anteriormente descritas, la concentración de rebaudiósido B no es superior al 25 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante.

[0022] En determinadas formas de realización, el uno o los varios compuestos de glicósidos de esteviol dulces comprenden rebaudiósido A. Por ejemplo, las extracciones parcialmente purificadas de glicósidos de esteviol puede que comprendan una mezcla de rebaudiósido B y rebaudiósido A, o puede que el rebaudiósido B se incorpore en preparaciones purificadas de rebaudiósido A. En determinadas formas de realización que comprenden rebaudiósido A, la cantidad de rebaudiósido A en el extracto de *Stevia* o la composición edulcorante se encuentra en una concentración que es al menos un 1 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización, la cantidad de rebaudiósido A es al menos un 5 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización, la cantidad de rebaudiósido A es al menos un 10 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización, la cantidad de rebaudiósido A es al menos un 20 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de

realización, la cantidad de rebaudiósido A es al menos un 30 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización, la cantidad de rebaudiósido A es al menos un 40 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización, la cantidad de rebaudiósido A es al menos un 50 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización, la cantidad de rebaudiósido A es al menos un 60 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización, la cantidad de rebaudiósido A es al menos un 70 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización que comprenden rebaudiósido A en las que la concentración de rebaudiósido A está en una concentración coherente con cualquiera de las formas de realización anteriormente descritas, el rebaudiósido A está en una concentración que no es superior a un 95 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización que comprenden rebaudiósido A en las que la concentración de rebaudiósido A está en una concentración coherente con cualquiera de las formas de realización anteriormente descritas, el rebaudiósido A está en una concentración que no es superior a un 90 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización que comprenden rebaudiósido A en las que la concentración de rebaudiósido A está en una concentración coherente con cualquiera de las formas de realización anteriormente descritas, el rebaudiósido A está en una concentración que no es superior a un 85 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización que comprenden rebaudiósido A en las que la concentración de rebaudiósido A está en una concentración coherente con cualquiera de las formas de realización anteriormente descritas, el rebaudiósido A está en una concentración que no es superior a un 80 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización que comprenden rebaudiósido A en las que la concentración de rebaudiósido A está en una concentración coherente con cualquiera de las formas de realización anteriormente descritas, el rebaudiósido A está en una concentración que no es superior a un 75 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización que comprenden rebaudiósido A en las que la concentración de rebaudiósido A está en una concentración coherente con cualquiera de las formas de realización anteriormente descritas, el rebaudiósido A está en una concentración que no es superior a un 70 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización que comprenden rebaudiósido A en las que la concentración de rebaudiósido A está en una concentración coherente con cualquiera de las formas de realización anteriormente descritas, el rebaudiósido A está en una concentración que no es superior a un 65 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización que comprenden rebaudiósido A en las que la concentración de rebaudiósido A está en una concentración coherente con cualquiera de las formas de realización anteriormente descritas, el rebaudiósido A está en una concentración que no es superior a un 60 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización que comprenden rebaudiósido A en las que la concentración de rebaudiósido A está en una concentración coherente con cualquiera de las formas de realización anteriormente descritas, el rebaudiósido A está en una concentración que no es superior a un 55 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización que comprenden rebaudiósido A en las que la concentración de rebaudiósido A está en una concentración coherente con cualquiera de las formas de realización anteriormente descritas, el rebaudiósido A está en una concentración que no es superior a un 50 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante.

[0023] Aunque las composiciones edulcorantes de la invención puede que comprendan mezclas de diversos tipos de edulcorantes en diversas cantidades, en determinadas formas de realización una composición edulcorante con rebaudiósido B y uno o varios compuestos adicionales de glicósidos de esteviol dulces consiste fundamentalmente en compuestos de glicósidos de esteviol dulces. Por ejemplo, en dichas formas de realización, la concentración total de rebaudiósido B y el resto de compuestos de glicósidos de esteviol dulces presentes en ellas proporcionan fundamentalmente la totalidad de la funcionalidad de dulzor de la composición edulcorante. La cantidad de otros compuestos edulcorantes que podría incluirse en composiciones edulcorantes que consisten fundamentalmente en rebaudiósido y compuestos de glicósidos de esteviol dulces dependerá del tipo de otro compuesto edulcorante en cuestión y de su concentración de umbral de dulzor, por debajo del cual se cree que no contribuye de manera notable al dulzor de una composición edulcorante. Asimismo, en determinadas formas de realización, una composición edulcorante con rebaudiósido B y uno o varios compuestos de glicósidos de esteviol dulces consiste en compuestos de glicósidos de esteviol dulces.

[0024] En determinadas formas de realización, el extracto de *Stevia* o composición edulcorante que comprende rebaudiósido B y uno o varios compuestos adicionales de glicósidos de esteviol dulces comprende esteviósido. En determinadas formas de realización, la concentración de esteviósido es al menos un 1 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización, la concentración de esteviósido es al menos un 5 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización, la concentración de esteviósido es al menos un 10 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización, la concentración de esteviósido es al menos un 20 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización, la concentración de esteviósido es al menos un 30 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización, la concentración de esteviósido es al menos un 40 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización, la concentración de esteviósido no es superior a un 95 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización, la concentración de esteviósido no es superior a un 90 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización, la concentración de esteviósido no es superior a un 80 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización, la concentración de esteviósido no es superior a un 70 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante. En determinadas formas de realización, la concentración de esteviósido no es superior a un 60 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de *Stevia* o la composición edulcorante.

IV. Productos que comprenden edulcorantes de alto contenido en rebaudiósido B

[0025] Determinadas formas de realización de la invención están dirigidas a alimentos que comprenden extracto de *Stevia* o composiciones edulcorantes con altas concentraciones de rebaudiósido B. Un experto en la materia reconocerá que cualquier composición comestible o masticable puede edulcorarse de acuerdo con la presente invención, como por ejemplo alimentos (por ejemplo, aperitivos, productos horneados, sopas, salsas, carnes procesadas, frutas en conserva, verduras en conserva, productos lácteos, confituras heladas, tartas, galletas, barritas y otros artículos de repostería dulce, cereales, barritas de cereales, yogur, bebidas que contienen yogur, barritas energéticas, barritas de muesli, caramelos duros, caramelos blandos, dulces de chocolate y otras confituras dulces); bebidas (por ejemplo, refrescos gaseosos, téis listos para tomar, bebidas isotónicas, bebidas lácteas, bebidas alcohólicas, bebidas energéticas, cafés, aguas de sabores, bebidas vitamínicas, bebidas de frutas, zumos de frutas, refrescos en polvo), medicamentos o productos farmacéuticos (por ejemplo, comprimidos, pastillas para chupar, suspensiones, etc.), productos nutracéuticos (por ejemplo, complementos, vitaminas, etc.), dulces o confiterías; gomas de mascar, productos del tabaco (por ejemplo, tabaco de mascar); y similares. La adición a alimentos de rebaudiósido B o extractos de *Stevia* o composiciones edulcorantes que comprenden rebaudiósido B y otros edulcorantes opcionales es un proceso que dependerá del alimento y de su preparación. Dicha preparación es conocida para los expertos en la materia de preparar alimentos. Preferiblemente, la composición edulcorante se incluye en una cantidad eficaz que proporciona la cantidad deseada de dulzor al alimento. Un experto en la materia reconocerá que es una práctica habitual determinar la cantidad preferida de edulcorante para añadir en la preparación de alimentos.

[0026] En determinadas formas de realización, el alimento contiene una composición edulcorante que comprende rebaudiósido B y uno o varios compuestos adicionales de glicósidos de esteviol dulces del modo descrito en la presente memoria. En determinadas formas de realización, los glicósidos de esteviol de la composición edulcorante están en una concentración total que es inferior a su umbral de dulzor (que se cree que es 40 ppm). En una forma de realización de dicho tipo, se cree que en cantidades tan bajas los glicósidos de esteviol dulces funcionan a modo de aromatizante o potenciador del sabor en lugar de como edulcorante. En determinadas formas de realización, los glicósidos de esteviol dulces de la composición edulcorante se encuentran en una concentración total que es de al menos 50 ppm. En determinadas formas de realización, los glicósidos de esteviol dulce de la composición edulcorante se encuentran en una concentración total que es de al menos 200 ppm, o en una concentración que es de al menos 500 ppm, o en una concentración que es de al menos 1500 ppm.

[0027] En determinadas formas de realización, el alimento es una bebida que contiene una composición edulcorante que comprende rebaudiósido B y uno o varios compuestos adicionales de glicósidos de esteviol dulces del modo descrito en la presente memoria. En determinadas formas de realización, el pH de la bebida es de al menos un pH 2 (y preferiblemente al menos un pH 4) y no superior a un pH 8. En determinadas formas de realización, los glicósidos de esteviol dulces de la composición edulcorante se encuentran en una concentración total que es de al menos 50 ppm. En determinadas formas de realización, los glicósidos de esteviol dulces de la

composición edulcorante se encuentran en una concentración total que es de al menos 200 ppm, o de al menos 500 ppm o de al menos 1500 ppm.

V. Producción de composiciones edulcorantes

5

[0028] Las composiciones edulcorantes de acuerdo con los principios expuestos en la presente memoria puede que se produzcan según cualquier método apropiado, de los que existen diversos. Uno de dichos métodos se refiere a la mezcla de determinadas cantidades de rebaudiósido B con uno o varios compuestos adicionales de glicósidos de esteviol dulces como el rebaudiósido A y/o otros compuestos de glicósidos de esteviol dulces. Por ejemplo, una mezcla de rebaudiósido B y rebaudiósido A purificados y/o otros compuestos de glicósidos de esteviol dulces puede que se elabore al mezclar polvos secos de los componentes. De manera alternativa, puede que se prepare una mezcla de compuestos de glicósidos de esteviol dulces en una solución o suspensión y se sequen de manera conjunta para producir un polvo.

10

15

[0029] El rebaudiósido A es un material disponible en el mercado que normalmente se caracteriza por ser, por ejemplo, > 80 % rebaudiósido A, > 95 % rebaudiósido A o ≥ 97 % de rebaudiósido A. Dicha forma purificada de rebaudiósido A se logra normalmente al reducir las cantidades de otros glicósidos de esteviol por medio de recristalización de disolventes, resinas de adsorción o fraccionamiento cromatográfico.

20

[0030] El rebaudiósido B puede que se obtenga de acuerdo con diversos medios. Por ejemplo, el rebaudiósido B puede que se recupere de flujos de tratamiento asociados al tratamiento y purificación del rebaudiósido A por medio de, por ejemplo, precipitación, recristalización, fraccionamiento cromatográfico, resinas de adsorción. De manera adicional, el rebaudiósido B puede que se obtenga mediante la hidrólisis alcalina o ácida de rebaudiósido A tal y como dio a conocer Kohda, *et. al.*, *Phytochemistry*, vol. 15, págs. 981-983 (1975) y el documento JP52083731A. El rebaudiósido B también puede que se produzca por medio de la hidrólisis enzimática del rebaudiósido A tal y como dio a conocer Mizukani, H., *et al.*, *Phytochem* vol. 21, págs. 1927-1930 (1982).

25

30

[0031] Dado que el rebaudiósido B puede que se forme a partir de rebaudiósido A, los extractos de estevia puede que aumenten su contenido de rebaudiósido B por medio de, por ejemplo, la modificación de los parámetros de proceso asociados a la extracción de glicósidos de esteviol de la planta de estevia. Por ejemplo, puede que se aumente la cantidad de rebaudiósido B por medio del control del pH de un flujo de tratamiento, de la temperatura de un flujo de tratamiento, del aumento de la duración del tratamiento o de una combinación de dichas modificaciones.

35

[0032] Si se desea, el rebaudiósido B puede que se separe de otros glicósidos de esteviol y compuestos relacionados por medio de cualquier método apropiado. Por ejemplo, el rebaudiósido B puede que se precipite a partir de soluciones al disminuir el pH de la solución. El rebaudiósido B se transforma normalmente en su forma fundamentalmente insoluble y protonada en agua a temperatura ambiente con valores de pH inferiores a 4,5.

40

[0033] Tras la precipitación del rebaudiósido B, puede que se separe de la solución que comprende compuestos solutos mediante cualquiera de los medios habituales de purificación de una suspensión. El precipitado puede centrifugarse y eliminarse el sobrenadante. El precipitado puede separarse por filtrado como por ejemplo filtrado al vacío o mediante el uso de un filtro prensa. Las fases solubles e insolubles pueden separarse mediante el uso de membranas. La torta de filtración, el sedimento de centrifugado o el concentrado membranoso pueden purificarse adicionalmente mediante un lavado con agua. De manera alternativa, el precipitado parcialmente purificado y recuperado puede volverse a disolver en agua con un pH mayor que 7,7, volverse a precipitar por medio de la adición de ácido para disminuir el pH hasta por debajo de 4,5 y separarse de nuevo de la fase líquida que contiene impurezas por medio de cualquiera de las técnicas anteriores.

45

50

[0034] De manera alternativa, el rebaudiósido B puede que se precipite mediante la adición de un disolvente en el que el rebaudiósido B presenta una solubilidad limitada o es insoluble. Preferiblemente, el disolvente específico, la cantidad añadida y la temperatura se seleccionan de modo que solo precipite el rebaudiósido B fundamentalmente, y no otros compuestos.

55

[0035] A un pH neutro en agua, el rebaudiósido B soluble puede que se separe de otros compuestos solubles mediante fraccionamiento cromatográfico, recristalización, filtración a través de membrana mediante una membrana de un tamaño de poro apropiado que retenga los rebaudiósidos pero que permita el paso de moléculas más pequeñas, o tratamiento con resinas adsorbentes que o bien absorban todas las impurezas, eluyendo los rebaudiósidos, o que absorban los rebaudiósidos y eluyan todas las impurezas. A continuación, la resina se lavaría con un eluyente que presente afinidad por el material adsorbido, para regenerar la resina (en el primer caso) o recuperar los rebaudiósidos (en el segundo caso).

60

[0036] El rebaudiósido B separado puede que se seque por medio de cualquier método apropiado y aparato asociado, como por medio de secado por cinta, secado por tambor, secado en bandejas, secado por pulverización, liofilización, secado por flash o secado con lecho fluido. De manera alternativa, en lugar de secar el rebaudiósido B y después mezclar el rebaudiósido B seco con rebaudiósido A y/u otros compuestos de esteviósido dulce, se puede mezclar el mismo mientras se encuentra en la solución y después secar la composición.

EJEMPLOS

[0037] Las siguientes formas de realización dadas a conocer son meramente representativas de la invención, la cual puede que se plasme de diversas formas. Por consiguiente, los detalles estructurales, funcionales y de procedimiento dados a conocer en los siguientes ejemplos no deben interpretarse como limitativos.

Ejemplo 1 – Prueba de preferencia de mezclas comerciales de glicósidos de esteviol y mezclas de glicósidos ricas en rebaudiósido B

[0038] Una mezcla comercial de un glicósido de esteviol se disolvió en tampón de ácido cítrico 0,0056 M pH 3,1. Se preparó de manera similar una solución que contenía una composición edulcorante disponible en el mercado con contenido de 97 % de rebaudiósido A.

Tabla 1. 97 % de rebaudiósido A y composiciones de mezclas comerciales

Glicósido	97 % rebaudiósido A, mg	Mezcla comercial, mg/l
Rebaudiósido A	473	437
Esteviósido	1	35
Rebaudiósido B	14	17
Rebaudiósido C	0	9
Rebaudiósido D	0	20
Total	498	518

[0039] Treinta y un trabajadores de Tate & Lyle participaron en pruebas de comparación a pares para medir el dulzor y la preferencia. Los productos se elaboraron en tampón de ácido cítrico con pH 3,1 (0,9 gramos de ácido cítrico anhidro (Tate & Lyle, Decatur, IL) y 0,26 gramos de dihidrato de citrato sódico (Tate & Lyle, Decatur, IL) por litro y se sometieron a prueba a temperatura ambiente en recipientes para suflé de 2 onzas (60 ml) etiquetados con códigos de tres dígitos al azar. Se rotó el orden de presentación. Se les pidió a los evaluadores que identificaran la solución que fuera más dulce y la que les gustara más. La votación se presentó y los datos se recopilaron con el *software* sensorial SIMS (Sensory Computer Systems, LLC, Morristown, NJ). Se proporcionó agua embotellada, una solución de sacarosa al 2 % y galletitas sin sal para que los participantes se aclararan el paladar antes y durante la prueba.

[0040] Los resultados de las preguntas sobre el dulzor y las preferencias se analizaron con la prueba estadística binomial y se calculó el *d'* thurstoniano. El valor *p* para una prueba estadística binomial unilateral se calcula de este modo

$$1 - \sum_{k=0}^c \binom{n}{k} p_0^k (1 - p_0)^{n-k}$$

donde *c* es el número de *aciertos*, *n* es el número de intentos y *p*₀ es la probabilidad de azar. Una prueba se considera estadísticamente significativa cuando el valor *p* es inferior al riesgo alfa determinado *a priori*. El valor *p* bilateral es el doble del valor *p* unilateral del modo calculado anteriormente.

[0041] El *d'* thurstoniano es una medida lineal de diferencia psicofísica. Una *d'* de 1 se considera por lo general una diferencia perceptible (JND) en la que un estímulo se juzgará con mayor intensidad en el 75 % de los intentos. El *d'* thurstoniano es independiente del método de prueba y para las pruebas de comparación a pares se calcula de este modo

$$p_c = \Phi(d' / \sqrt{2})$$

donde p_c es la proporción de aciertos y $\Phi(\bullet)$ es la función de distribución acumulativa de la distribución normal tipificada. Estos términos estadísticos se encuentran definidos con mayor detalle en libros de texto estándar sobre el asunto, tales como *Sensory Discrimination Tests and Measurements*, Jian Bi (Blackwell Publishing, 2006).

[0042] Las instrucciones de la prueba de comparación a pares fueron las siguientes:

- (i) Es importante enjuagarse antes y entre las muestras.
- (ii) Aclárese el paladar con un bocado de galletita. A continuación, enjuáguese con el agua azucarada. Finalmente, enjuáguese con agua normal.
- (iii) Pruebe las muestras en el orden presentado, de izquierda a derecha.
- (iv) Pruebe al menos la mitad de la primera muestra y tome nota del dulzor.
- (v) Enjuáguese con el agua azucarada seguida de un enjuague con agua normal.
- (vi) A continuación, pruebe al menos la mitad de la segunda muestra.
- (vii) No vuelva a probar la primera muestra.
- (viii) Evalúe las muestras por preferencia y dulzor. Escoja la muestra que le guste más y escoja la muestra que es más dulce. Puede que se trate de la misma muestra o no. Si no está seguro o no tiene una preferencia, entonces escoja cualquiera de las dos.

[0043] Las preguntas para la prueba de comparación a pares fueron las siguientes:

- (i) ¿Cuál de las dos muestras le gusta más?
- (ii) ¿Cuál de las dos muestras es más dulce?

[0044] Los resultados de esta prueba y del valor d' psicofísico se muestran a continuación en la Tabla 2.

Tabla 2. Mezcla comercial frente a 97 % de rebaudiósido B

Muestra	n.º preferida	n.º más dulce
Mezcla comercial	11	16
97 % rebaudiósido A	20	15
Totales	31	31
Valor p binomial, bilateral	0,07	0,72
Valor d'	-0,53	0,16

[0045] Los resultados muestran que la mezcla comercial se prefirió ligeramente menos y era aproximadamente tan dulce como la de 97 % de rebaudiósido A.

[0046] En una prueba posterior llevada a cabo del mismo modo, se añadió rebaudiósido B a la mezcla comercial anterior para realizar una combinación de glicósidos que es una forma de realización de la presente invención que presenta una concentración de rebaudiósido B relativa a la cantidad total de glicósidos de esteviol dulces de alrededor de un 21 % y una razón entre rebaudiósido A y rebaudiósido B de alrededor de 3:1.

[0047] La mezcla glicosídica de un glicósido de esteviol se disolvió en tampón de ácido cítrico 0,0056 M pH 3,1. Se preparó de manera similar una solución que contenía una composición edulcorante disponible en el mercado con contenido de 97 % de rebaudiósido A.

Tabla 3. 97 % de rebaudiósido A y composiciones de mezclas glicosídicas

Glicósido	97 % rebaudiósido A, mg	Mezcla, mg/l
Rebaudiósido A	473	350
Esteviósido	1	32
Rebaudiósido B	14	104
Rebaudiósido C	0	10
Rebaudiósido D	0	0
Total	498	496

[0048] Las dos soluciones se presentaron a un grupo de trabajadores de Tate & Lyle y se les pidió que identificaran la solución que fuera más dulce y la que les gustara más siguiendo las mismas instrucciones y preguntas expuestas anteriormente. Los resultados de las preguntas sobre el dulzor y la preferencia se analizaron con la prueba estadística binomial y se calculó el d' thurstoniano tal y como se ha expuesto anteriormente. Los resultados y el valor d' psicofísico se presentan a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4. Mezcla de rebaudiósido B frente a 97 % de rebaudiósido A

Muestra	n.º preferida	n.º más dulce
Mezcla de rebaudiósido B	27	27
97 % rebaudiósido A	11	11
Totales	38	38
Valor p binominal, bilateral	<0,01	<0,01
valor d'	0,79	0,79

[0049] La mezcla de rebaudiósido B fue tanto la preferida como la más dulce en lugar de la de 97 % de rebaudiósido A.

Ejemplo 2 – Prueba de preferencia de mezclas de 800 ppm de rebaudiósido A o B mezclados con esteviósido

[0050] Se le pidió a un grupo de evaluadores del sabor que compararan una mezcla comercial de rebaudiósido A y esteviósido con una muestra de 500 ppm de 97 % de rebaudiósido A. La mezcla glicosídica de glicósidos de esteviol se disolvió en tampón de ácido cítrico 0,0056 M pH 3,1. Se preparó de manera similar una solución que contenía una composición edulcorante disponible en el mercado con contenido de 97 % de rebaudiósido A. Se rotó la presentación de las muestras y las muestras de las dos soluciones (a temperatura ambiente) se presentaron a un grupo de trabajadores de Tate & Lyle, a los que se les pidió que identificaran la solución que fuera más dulce y la que les gustara más siguiendo las mismas instrucciones y preguntas que en el Ejemplo 1. Los resultados de las preguntas sobre el dulzor y la preferencia se analizaron con la prueba estadística binomial y se calculó el d' thurstoniano como en el Ejemplo 1.

Tabla 5. 97 % de rebaudiósido A y composiciones de mezcla de rebaudiósido A y esteviósido

Glicósido	97 % rebaudiósido A, mg	Mezcla, mg/l
Rebaudiósido A	473	374
Esteviósido	1	403
Rebaudiósido B	14	11
Rebaudiósido C	0	0
Rebaudiósido D	0	0
Total	498	789

[0051] A otro grupo se le pidió comparar una mezcla de rebaudiósido B y esteviósido. La mezcla glicosídica de glicósidos de esteviol se disolvió en tampón de ácido cítrico 0,0056 M pH 3,1. Se preparó de manera similar una solución que contenía una composición edulcorante disponible en el mercado con contenido de 97 % de rebaudiósido A. Las dos soluciones se presentaron a un grupo de trabajadores de Tate & Lyle y se les pidió que identificaran la solución que fuera más dulce y la que les gustara más siguiendo las mismas instrucciones y preguntas que en el Ejemplo 1.

Tabla 6. 97 % de rebaudiósido A y composiciones de mezcla de rebaudiósido B y esteviósido

Glicósido	97 % rebaudiósido A, mg	Mezcla, mg/l
Rebaudiósido A	473	4
Esteviósido	1	397
Rebaudiósido B	14	400
Rebaudiósido C	0	0
Rebaudiósido D	0	0
Total	498	801

[0052] Los resultados de las preguntas sobre el dulzor y la preferencia se analizaron con la prueba estadística binomial y el d' thurstoniano calculado como en el Ejemplo 1. Los resultados de los dos grupos y los valores d' psicofísicos se muestran en la Tabla 7 y Tabla 8 respectivamente.

5

Tabla 7. Mezcla de rebaudiósido A y esteviósido frente a 97 % de rebaudiósido A

Muestra	n.º preferida	n.º más dulce
Rebaudiósido A y esteviósido	4	22
97 % rebaudiósido A	37	19
Totales	41	41
Valor p binomial, bilateral	<0,01	0,27
Valor d'	-1,83	0,13

[0053] Los resultados muestran que la mezcla de rebaudiósido A y esteviósido fue menos preferida en comparación con la de 97 % de rebaudiósido A y se observó que era casi del mismo dulzor.

10

Tabla 8. Mezcla de rebaudiósido B y esteviósido frente a 97 % de rebaudiósido A

Muestra	n.º preferida	n.º más dulce
Rebaudiósido B y esteviósido	21	30
97 % rebaudiósido A	22	13
Valor p binomial, bilateral	0,38	<0,01
Totales	43	43
Valor d'	-0,04	0,73

[0054] Los resultados muestran que la mezcla de rebaudiósido B y esteviósido se prefirió tanto como la de 97 % de rebaudiósido A (500 ppm) y se observó que la mezcla de rebaudiósido B y esteviósido era más dulce que la de 97 % de rebaudiósido A.

15

Ejemplo 3 – Prueba de preferencia de mezclas de rebaudiósido A o B

[0055] Se le pidió a un grupo de evaluadores del sabor que compararan una mezcla comercial de rebaudiósido A y rebaudiósido B y una muestra de 900 ppm de 97 % de rebaudiósido A. Trabajadores de Tate & Lyle participaron en pruebas de comparación a pares para medir el dulzor y la preferencia. Las muestras se sometieron a prueba a temperatura ambiente en recipientes para suflé de 2 onzas (60 ml) etiquetadas con códigos de tres dígitos al azar. El orden de presentación no se rotó debido a la transferencia del mal sabor de rebaudiósido A a 900 ppm. El evaluador valoró primero la muestra de prueba y después la muestra de control de 900 ppm de rebaudiósido A. Se ordenó a los evaluadores que no volvieran a probar las muestras. De manera adicional, se requirió que los evaluadores esperaran un minuto entre muestra y muestra, y se les pidió que se aclararan el paladar con una solución de sacarosa al 2 %, una galletita sin sal y agua embotellada. Se les pidió a los evaluadores que identificaran la solución que fuera más dulce y la que les gustara más. La votación se presentó y los datos se recopilaron con el *software* sensorial SIMS (Sensory Computer Systems, LLC, Morristown, NJ).

30

Tabla 9. 97 % de rebaudiósido A y composiciones de mezcla de rebaudiósido A y rebaudiósido B

Ingrediente	Prueba	Control
Agua mineral Hinkley	98,88	98,88
Rebaudiósido A	0,0536	0,0900
Rebaudiósido B	0,0310	0,0000
Ácido fosfórico, 85 %	0,0361	0,0361
Total	100	100

[0056] Las instrucciones de la prueba de comparación a pares fueron las siguientes:

- (i) Es importante enjuagarse antes y entre las muestras.
- (ii) Aclárese el paladar con un bocado de galletita. A continuación, enjuáguese con el agua azucarada. Finalmente, enjuáguese con agua normal.
- (iii) Pruebe las muestras en el orden presentado, de izquierda a derecha.
- (iv) Pruebe al menos la mitad de cada muestra y tome nota del dulzor.
- (v) Enjuáguese con el agua azucarada seguida de un enjuague con agua normal.
- (vi) Evalúe las muestras por preferencia y dulzor. Escoja la muestra que le guste más y escoja la muestra que es más dulce. Puede que se trate de la misma muestra o no. Si no está seguro o no tiene una preferencia, entonces escoja cualquiera de las dos.
- (vii) A continuación, pruebe la muestra de la izquierda.
- (viii) Espere un minuto antes de probar la siguiente muestra (inicio de cronómetro de 60 segundos en SIMS)
- (ix) A continuación, pruebe la muestra de la derecha.

[0057] Las preguntas para la prueba de comparación a pares fueron las siguientes:

- (i) ¿Cuál de las dos muestras le gusta más? Compruebe atentamente el código de 3 dígitos antes de seleccionar la respuesta. Es posible que no aparezcan en el mismo orden en que se presentaron las muestras.
- (ii) ¿Cuál de las dos muestras es más dulce?

(Se inició un cronómetro de 120 segundos en SIMS entre pruebas). Se analizaron los resultados de las preguntas sobre el dulzor y la preferencia con la prueba estadística binomial y se calculó el d' thurstoniano como en el Ejemplo 1.

[0058] Los resultados de los dos grupos de evaluadores y de los valores d' psicofísicos se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Rebaudiósido A y rebaudiósido B frente a 97 % de rebaudiósido A

	dulzor	Valor p bilateral	d'	preferencia	Valor p unilateral	d'
Prueba 1 536 ppm Reb A 310 ppm Reb B	23	0,14	0,38	36	<0,01	2,29
control 900 ppm Reb A	15			2		

[0059] Los resultados muestran que la mezcla de rebaudiósido A y rebaudiósido B se prefirió en comparación con la de 97 % de rebaudiósido A y se observó que era prácticamente del mismo dulzor.

Ejemplo 4 – Prueba de preferencia de mezclas de glicósidos de esteviol

[0060] Este estudio se llevó a cabo para determinar la preferencia de mezclas de rebaudiósido A y rebaudiósido B en comparación con solo rebaudiósido A con un dulzor de aproximadamente 10 SEV y se modificó la metodología sensorial para reducir la confusión de los evaluadores con la votación, además de que se les pidió a los evaluadores participantes que ingirieran aproximadamente 2 onzas (60 ml) de cada muestra.

[0061] Los participantes se sometieron a pruebas de comparación a pares para medir el dulzor y la preferencia. Los productos se sometieron a prueba a temperatura refrigerada en recipientes para suflé de 2 onzas (60 ml) etiquetados con códigos de tres dígitos al azar. Las muestras se vertieron inmediatamente antes de presentarse. A los evaluadores se les pidió que identificaran la bebida que fuera más dulce y la que les gustara más. Hubo agua embotellada, una solución de sacarosa al 2 % y galletitas sin sal a disposición de los evaluadores para que se aclararan el paladar antes y durante la prueba.

[0062] Los evaluadores valoraron primero la muestra de prueba y después en segundo lugar la muestra de control de 900 ppm de rebaudiósido A. El orden de presentación de esta prueba no se rotó debido a la transferencia del mal sabor de rebaudiósido A a 900 ppm. Se ordenó a los evaluadores que ingirieran todas las muestras y que no volvieran a probar las muestras. Se alertó a los evaluadores de que el orden de las muestras en la votación puede que no fuera el mismo que el orden en que se presentaron las muestras. Se ordenó a los participantes que marcaran la muestra que preferían con una nota adhesiva y se compararon estos resultados con los de las votaciones. Hubo un descanso obligatorio de un minuto entre muestras y de dos minutos entre pruebas, en el que se ordenó a los participantes que se aclararan el paladar con sacarosa al 2 %, galletita y agua.

[0063] Los productos sometidos a prueba fueron refrescos gaseosos de lima limón que comprendían una parte de jarabe y cuatro partes de agua gaseosa, en los que los jarabes presentaban las composiciones expuestas a continuación en la Tabla 12.

Tabla 12. Preparaciones de jarabe

Ingrediente	Prueba 1	Control
Agua mineral Hinkley	98,20	98,18
Benzoato sódico	0,10	0,10
REB A	0,268	0,450
REBB	0,155	0,000
Dihidrato de citrato sódico	0,15	0,15
Ácido cítrico anhidro	0,63	0,63
Aromatizante natural de limón de Givaudan n.º 881337	0,50	0,50
Total	100	100

[0064] Los resultados se analizaron con la prueba estadística binomial con un riesgo alfa de 0,05 en forma de prueba unilateral para la preferencia y de prueba bilateral para el dulzor. Los resultados de la prueba están expuestos a continuación en la Tabla 13.

Tabla 13. Prueba 1 bebida en comparación con la bebida de control

	dulzor	valor p bilateral	d'	preferencia	valor p unilateral	d'
Prueba 1 536 ppm RebA 310 ppm RebB	20	0,76	-0,04	26	0,03	0,48
control 900 ppm RebA	21			15		

[0065] Las pruebas muestran que los dos refrescos gaseosos de lima limón de la prueba no difirieron significativamente en dulzor del refresco gaseoso de lima limón edulcorado con rebaudiósido A y se prefirieron significativamente al refresco gaseoso de lima limón edulcorado con rebaudiósido A.

[0066] El análisis sugiere que una mezcla de rebaudiósido A y rebaudiósido B sería más agradable que solo el rebaudiósido A, especialmente en niveles de dulzor más elevados.

Ejemplo 5 – Solubilidad

[0067] Para determinar la solubilidad del rebaudiósido A y el rebaudiósido B en determinadas soluciones, se prepararon cuatro soluciones madre. Se preparó una solución tampón madre de 10x ácido cítrico concentrado/citrato sódico pH 3 disolviendo 0,9 g de ácido cítrico anhidro y 0,26 g de dihidrato de citrato sódico en agua para elaborar 100 mL de tampón (ácido cítrico 0,047 M + citrato sódico 0,0088 M). Se preparó una solución (nominal) de 2500 ppm de rebaudiósido A disolviendo 0,125 g de GLG RA 97 para elaborar 50 mL de solución. Se preparó una solución (nominal) de 2500 ppm de esteviósido disolviendo 0,125 g de GLG STV 97 para elaborar 50 mL de solución. Se preparó una solución (nominal) de 1000 ppm de rebaudiósido B diluyendo 56 mL de una solución sometida a ensayo a 1790 ppm para elaborar 100 mL de solución.

[0068] Estas soluciones se mezclaron como cantidades totales de 1 mL al pipetear con micropipeta los volúmenes, en microlitros, en tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, como muestra la Tabla 14. En la Tabla 14 también se enumeran las concentraciones nominales resultantes de cada uno de los tres glicósidos, en ppm.

Tabla 14. Resumen de las soluciones de prueba

Tubo	Microlitros de solución madre añadidos					PPM (nominal)		
	10X ácido cítrico	Agua	2500 ppm Reb A	2500 ppm esteviósido	1000 ppm RebB	Reb A	esteviósido	RebB
1	100	200	0	200	500	0	500	500
2	100	250	0	150	500	0	375	500
3	100	300	0	100	500	0	250	500
4	100	350	0	50	500	0	125	500
5	100	400	0	0	500	0	0	500

	Microlitros de solución madre añadidos							
			2500 ppm	2500 ppm	1000 ppm	PPM (nominal		
Tubo	10X ácido cítrico	Agua	Reb A	estevisido	RebB	Reb A	estevisido	RebB
6	100	150	50	200	500	125	500	500
7	100	200	50	150	500	125	375	500
8	100	250	50	100	500	125	250	500
9	100	300	50	50	500	125	125	500
10	100	350	50	0	500	125	0	500
11	100	100	100	200	500	250	500	500
12	100	150	100	150	500	250	375	500
13	100	200	100	100	500	250	250	500
14	100	250	100	50	500	250	125	500
15	100	300	100	0	500	250	0	500
16	100	50	150	200	500	375	500	500
17	100	100	150	150	500	375	375	500
18	100	150	150	100	500	375	250	500
19	100	200	150	50	500	375	125	500
20	100	250	150	0	500	375	0	500
21	100	0	200	200	500	500	500	500
22	100	50	200	150	500	500	375	500
23	100	100	200	100	500	500	250	500
24	100	150	200	50	500	500	125	500
25	100	200	200	0	500	500	0	500

[0069] Inmediatamente tras la mezcla, todas las soluciones eran claras (frente a turbias) y no mostraron precipitación alguna. A continuación, los tubos se dejaron inalterados a temperatura ambiente en el laboratorio (~25°C) durante alrededor de 100 horas, y transcurrido dicho tiempo todas mostraron algo de precipitación. Tras reposar durante cinco días (~100 horas), los tubos se agitaron en una microcentrífuga de banco superior para aglomerar el precipitado. El sobrenadante limpio se utilizó para muestras en viales y se sometió a ensayo para glicósidos por medio de un método de gradiente de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de fase inversa con detección UV (módulo de separación Waters 2695 equipado con un detector de absorbancia Waters 2487 Dual λ o una instrumentación equivalente) que está resumido en la Tabla 15. Las condiciones de HPLC fueron las siguientes:

columna - Waters Atlantis T3 4,6 x 250 mm; 4 μ con un cartucho de seguridad Phenomenex Security Guard AQ C18, 4 x 3,0 mm;
 tampón -0,0284 % acetato de amonio; 0,0116 % de ácido acético;
 velocidad de flujo – 1,0 mL/min;
 detector – detector UV con análisis a 203 nm;
 vol. inyec. - 20 μ L o como se desee para alcanzar la concentración estándar; y
 temp. col. - 40 °C.

Tabla 15. Método de gradiente de HPLC: fase móvil: gradiente de acetonitrilo/tampón

Tiempo (min)	% agua	% tampón	Curva Waters
0	70	30	na
15	65	35	6
20	65	35	6
25	20	80	6
30	20	80	1
35	70	30	1

- 5 **[0070]** Los datos del sobrenadante recopilados de la HPLC se procesaron por medio del *software* DESIGN EXPERT 8. En resumen, los datos se introdujeron en el programa como datos “factor” como un diseño factorial general de 2 factores y 5 niveles como los datos nominales, los cuales se convirtieron a continuación en datos numéricos y se sustituyeron por los resultados reales de la HPLC. A continuación, el *software* seleccionó un modelo que predijo la concentración (solubilidad) de rebaudiósido B en función de la concentración de rebaudiósido A y esteviósido en el sobrenadante. El *software* calculó asimismo un número de factores estadísticos que indicaron la importancia de los parámetros modelo. En este caso, el modelo indicó que los modelos con y sin un pequeño parámetro de interacción de rebaudiósido A – esteviósido eran aproximadamente igual de válidos, con lo que se seleccionó el modelo más sencillo (sin interacción) para su procesamiento adicional. El análisis de varianza (ANOVA) para este modelo obtenido del programa se muestra en la Tabla 16.

Tabla 16. Resultados del ANOVA - Design Expert

Respuesta 1 Reb B						
ANOVA para el análisis de modelo lineal superficial de respuesta de la tabla de varianza [Suma parcial de cuadrados - Tipo III]						
Fuente	Suma de cuadrados	Grado libertad	Cuadrado de la media	Valor F	Valor p Prob>F	
Modelo	61253,89	2	30626,95	443,84	<0,0001	
A-Reb A	61056,01	1	61056,01	884,81	<0,0001	
B-Esteviósido	363,55	1	363,55	5,27	0,0316	
Residual	1518,11	22	69,00			
Cor total	62772,00	24				
Desv. estándar	8,31		R-cuadrado	0,9758		
Media	301,80		R-cuadrado ajustado	0,9736		
C.V.%	2,75		R-cuadrado predicho	0,9691		
PRESS	1939,25		Precisión adecuada	52,665		

Factor	Coeficiente Valor estimado	Grado libertad	Estándar Error	95% IC Bajo	95% IC Alto	FIV
Intercept	297,61	1	1,67	294,15	301,08	
A-Reb A	78,09	1	2,63	72,65	83,54	1,00
B-Esteviósido	-5,66	1	2,47	-10,78	-0,55	1,00

Ecuación final en términos de factores codificados:						
	Reb B	=				
	+297,61					
	+78,09	*A				
	-5,66	*B				

Ecuación final en términos de factores reales:						
	Reb B	=				
	+225,17918					
	+0,31238	*Reb A				
	-0,02264	*Esteviósido				

[0071] La Tabla 17 muestra las composiciones determinadas experimentalmente de los sobrenadantes de cada una de las soluciones para la prueba.

Tabla 17. Datos brutos de ensayo de la HPLC

Concentraciones de glicósidos sometidas a ensayo por ppm de HPLC				
Tubo	Reb A	esteviósido	Reb B	esteviolbiónido
1	38,8	478	234	4,39
2	38,5	351	231	3,61
3	37,6	241	229	2,28
4	36,2	112	233	1,59
5	34,9	0	226	0,73
6	154	480	265	5,03
7	154	360	255	3,35
8	151	241	284	2,86
9	149	121	273	2,03
10	146	0	271	0,77
11	274	476	300	5,1
12	273	363	293	4,51
13	269	248	305	3,38
14	260	119	286	1,49
15	260	0	308	0
16	375	473	336	4,87
17	381	357	344	3,78
18	372	245	340	2,61
19	370	125	342	2
20	365	0	342	0
21	487	475	361	4,74
22	477	356	363	4,35
23	481	245	358	2,72
24	498	120	375	1,25
25	484	0	391	0

[0072] El rebaudiósido B usado en este estudio contenía alrededor de un 6-7 % de rebaudiósido A, lo que explica el rebaudiósido A encontrado en los tubos 1-5. También resulta evidente a partir de los datos que las concentraciones de esteviósido y rebaudiósido A en las muestras son coherentes con la creencia de que dichos componentes son completamente solubles en este tampón a esta concentración, es decir, que únicamente el rebaudiósido B estaba precipitando en el experimento. Los datos mostrados en la Tabla 17 se introdujeron en DESIGN EXPERT 8 y se generó un modelo de regresión lineal de dos factores, que se expone a continuación en la Ecuación 1.

$$ConcB = 225,18 + 0,312*concA - 0,02264*concSs \quad (Ec. 1)$$

[0073] La ecuación muestra que la concentración de B en el sobrenadante (*concB*, es decir, el límite de solubilidad) estuvo influida tanto por la concentración de rebaudiósido A (*concA*) como por la concentración de esteviósido (*concSs*). La solubilidad de rebaudiósido B aumentó de manera sustancial mediante un incremento de la concentración de rebaudiósido A, y disminuyó ligeramente por los incrementos de la concentración de esteviósido.

[0074] El modelo lineal-lineal representado por la Ecuación 1 está trazado en forma de plano en un gráfico en 3-D, como muestra la Figura 1. El plano representa la solubilidad máxima del rebaudiósido B en tampón de ácido cítrico (pH 3,1), que oscila de un mínimo de alrededor de 225 ppm en 478 ppm de esteviósido (según el modelo) a alrededor de 380 ppm en 480 ppm de rebaudiósido A.

[0075] Por medio del límite de solubilidad (Ecuación 1) y de la restricción de que la suma de los porcentajes en peso debe sumar 1, se puede encontrar una ecuación que relacione el porcentaje en peso del rebaudiósido B (X_B) en el límite de solubilidad con el porcentaje en peso del rebaudiósido A (X_A), la concentración total de rebaudiósido (rebaudiósido B + rebaudiósido A + esteviósido = C_{tot}), y los coeficientes ($\alpha_0 = 225,18$ ppm, $\alpha_1 = 0,312$, $\alpha_2 = -0,0226$) de la ecuación de regresión (Ecuación 2, a continuación).

$$X_B = \frac{\left[\frac{\alpha_0}{C_{tot}} + \alpha_2 \right]}{(1 + \alpha_2)} + \left[\frac{\alpha_1 - \alpha_2}{1 + \alpha_2} \right] X_A \quad (\text{Ec. 2})$$

[0076] Por tanto, se cree que la Ecuación 2 define el borde de la región estable de solubilidad de la solución en mezclas ternarias de rebaudiósido A, esteviósido y rebaudiósido B. Por consiguiente, el tamaño de la región estable dependerá de la concentración total (C_{tot}).

[0077] Este estudio muestra claramente que la solubilidad del rebaudiósido B está limitada en tampón cítrico de pH 3, aun cuando el rebaudiósido B presente una solubilidad alta en soluciones de pH neutro. Asimismo, la presencia de rebaudiósido A aumenta la solubilidad del rebaudiósido B, pero la presencia de esteviósido reduce ligeramente la solubilidad de rebaudiósido B. Esta información sobre la solubilidad debería tenerse en cuenta a la hora de tratar de preparar soluciones de rebaudiósido B y mezclas de rebaudiósidos.

Ejemplo 6 – Evaluación del sabor del edulcorante en función del contenido de rebaudiósido B

[0078] Un grupo de evaluadores descriptivo se usó para cuantificar los atributos de sabor y las intensidades de distintos niveles de rebaudiósido B añadidos a rebaudiósido A (que era puro al 97 % y contenía 0,62 % de rebaudiósido B). Específicamente, los edulcorantes fueron valorados por los evaluadores en soluciones de 900 ppm de rebaudiósido A + rebaudiósido B, donde la cantidad de rebaudiósido B añadido fue tal que el contenido total de rebaudiósido B fue de 0,6 %; 3,6 %; 6,5 %, 11,4 %, 22,3 %, 37,5 % y 52 %. Una solución de sacarosa al 8 % como control. Las soluciones se prepararon en agua con pH neutro. Otros edulcorantes de alta intensidad incluidos en la prueba fueron aspartamo a 500 ppm, ASK a 750 ppm, sucralosa a 250 ppm y estevia a 500 ppm.

[0079] Antes de llevar a cabo la prueba, los diez evaluadores se formaron en profundidad en el uso de vocabulario estandarizado para describir la apariencia, aroma, sabor y textura de una amplia variedad de productos con el fin de calificar las muestras por dulzor, amargor, mal sabor, sabor a edulcorante químico o artificial, anís y sensación de revestimiento en la boca. Cada atributo de este tipo se evaluó en un primer y segundo sorbos y en el regusto. La prueba comenzó con una sesión de orientación de los evaluadores, en la que probaron las muestras y comentaron las características del sabor. Asimismo, probaron y comentaron referencias de «dulce», «amargo» y «anís». Las definiciones de términos relacionados con el sabor están expuestas a continuación en la Tabla 18.

Tabla 18. Definiciones

Término	Definición
Sabor total	Intensidad plena de todos los aromas o sabores del producto.
Dulce	Uno de los cuatro sabores básicos, que se percibe principalmente en la punta de la lengua; común en la sacarosa y otros azúcares.
Sabor total no deseable	Todos los sabores de la muestra que no son dulces y que se considerarían no intencionados en la muestra.
Edulcorante artificial/químico	Sabor que recuerda a edulcorantes artificiales o gustos químicos que no se pretendía que se encontraran en alimentos y bebidas en la muestra.
Amargor verdadero	Uno de los cuatro sabores básicos, que se percibe principalmente en la parte trasera de la lengua; común en la cafeína y la quinina.
Anís	Sabor total que recuerda al anís o al regaliz.
Revestimiento en la boca	Sensación de tener cualquier tipo de recubrimiento en los tejidos blandos de la boca.

[0080] En el segundo y tercer día de prueba, los participantes evaluaron las muestras por los diversos atributos y los calificaron en una escala de ninguno a extremo que comprende todos los productos de los ingredientes alimentarios, no solo los edulcorantes. Los productos y soluciones expuestos en la Tabla 19 se usaron para «fijar» al participante a las escalas.

Tabla 19. Fijación de valores del sabor

Sabor	Valor escala	Referencia
Anís	NR	Anís en secante
Dulce	5,0	Sacarosa al 5 % en agua
	10,0	Sacarosa al 10 % en agua
Amargo	2,0	Cafeína al 0,025 % en agua
	5,0	Cafeína al 0,04 % en agua

[0081] Se evaluaron ocho muestras por sesión. Se concedió un descanso de 7 minutos entre cada muestra y se concedió un descanso de 15 minutos después de haber evaluado las 4 primeras muestras. Se obtuvieron dos evaluaciones (es decir, duplicados) de cada evaluador por cada producto; por tanto, se obtuvieron un total de 20 valoraciones por cada producto. En el transcurso de la recopilación de datos, se pidió a los evaluadores que indicaran la intensidad de cada característica sensorial colocando una barra vertical en escalas lineales de 15 cm. Se equilibró el orden de servir, disponiéndose los productos aproximadamente el mismo número de veces en cada posición posible. En la sala de espera se proporcionó agua potable Alhambra a temperatura ambiente, galletitas sin sal y apio para aclararse el paladar entre muestras.

[0082] Las marcas de barras en las escalas lineales se convirtieron a números que oscilaban de 1 a 15 por medio de SIMS, el sistema informático de recopilación de datos sensoriales. Las intensidades medias se calcularon para cada característica sensorial. El análisis de varianza y el test de rango múltiple de Duncan, si procedía, se emplearon para determinar diferencias significativas entre las muestras por cada atributo. Cuando las interacciones de evaluador y producto eran significativas, se usó el cuadrado de la media del término de interacción, en lugar del cuadrado de la media del término de error, para calcular los valores F del producto. Los resultados se exponen a continuación en las Tablas 20 y 21.

Tabla 20. EVALUACIONES CUANTITATIVAS Y DESCRIPTIVAS DE ENMASCARADORES DEL SABOR

AMARGO n=18 (9 evaluadores, 2 evaluaciones cada uno)

	Saca-rosa	0,6 % Reb B	3,6 % RebB	6,5 % RebB	11,4 % RebB	22,3 % Reb B	37,5 % RebB	52 % Reb B	Valor p	Nivel conf.
SABOR TOTAL:										
1 ^{er} sorbo	d 8,67	abc 9,94	a 10,16	ab 10,04	bc 9,69	bc 9,61	abc 9,76	c 9,47	0,0008	**
2 ^o sorbo	c 7,86	ab 8,62	a 8,79	ab 8,56	bc 8,28	c 8,07	c 8,00	c 7,97	0,0047	**
Regus-to	d 4,32	ab 5,96	a 6,34	bc 5,77	bc 5,59	bc 5,80	c 5,45	bc 5,63	0,0001	**
DULCE:										
1 ^{er} sorbo	d 8,06	abc 9,15	ab 9,34	a 9,56	abc 9,13	bc 9,01	abc 9,21	c 8,80	0,0057	**
2 ^o sorbo	7,43	7,27	7,66	7,36	7,40	6,92	6,91	7,02	0,2088	NDS
Regus-to	c 3,92	bc 4,44	a 5,15	ab 4,70	ab 4,58	ab 5,01	ab 4,61	ab 4,75	0,0184	**
MAL SABOR TOTAL:										
1 ^{er} sorbo	e 0,89	ab 7,69	a 7,79	abc 7,34	cd 6,83	cd 6,72	bcd 6,98	d 6,48	0,0001	**
2 ^o sorbo	c 0,49	a 7,01	a 7,02	a 6,88	b 6,09	b 5,67	b 5,83	b 5,68	0,0001	**
EDULCORANTE ARTIFICIAL/QUÍMICO:										
1 ^{er} sorbo	d 0,59	a 7,74	ab 7,45	ab 7,37	c 6,67	c 6,54	bc 6,87	c 6,52	0,0001	**
2 ^o sorbo	c 0,41	a 6,79	a 6,88	a 6,71	b 5,73	b 5,31	b 5,48	b 5,64	0,0001	**

Regus- to	f 0,12	ab 5,00	a 5,22	bc 4,66	cd 4,39	de 3,99	e 3,79	de 3,91	0,0001	**
--------------	--------	---------	--------	---------	---------	---------	--------	---------	--------	----

• Niveles de confianza de análisis de varianza: *= 90 %, **= 95 %
• NDS: No difiere de manera significativa con niveles de confianza de un 90 % o superior.
• Las valoraciones medias con diferentes superíndices difieren de manera significativa en el nivel de confianza del 90 % (test de rango múltiple de Duncan).

Tabla 21. EVALUACIONES CUANTITATIVAS Y DESCRIPTIVAS DE ENMASCARADORES DEL SABOR
(continuación) n=18 (9 evaluadores, 2 evaluaciones cada uno)

	Saca- rosa	0,6 % Reb B	3,6 % RebB	6,5 % RebB	11,4 % RebB	22,3 % Reb B	37,5 % RebB	52 % Reb B	Valor p	Nivel conf.
AMARGOR VERDADERO:										
1 ^{er} sorbo	e 0,29	a 3,78	ab 3,63	abc 3,28	ab 3,37	cd 2,80	bc 3,11	d 2,49	0,0001	**
2 ^o sorbo	d 0,24	a 3,89	ab 3,71	ab 3,46	b 3,36	c 2,81	c 2,62	c 2,74	0,0001	**
Regus- to	e 0,15	a 3,39	a 3,45	b 2,78	bc 2,57	bcd 2,26	cd 2,08	d 1,89	0,0001	**
ANÍS:										
1 ^{er} sorbo	c 0,52	ab 1,73	ab 1,73	ab 1,45	a 1,79	ab 1,59	ab 1,58	b 1,34	0,0001	**
2 ^o sorbo	b 0,41	a 1,53	a 1,64	a 1,36	a 1,62	a 1,34	a 1,36	a 1,29	0,0001	**
Regus- to	d 0,13	a 1,42	a 1,46	abc 1,27	ab 1,34	c 0,98	abc 1,12	bc 1,03	0,0001	**
REVESTIMIENTO EN LA BOCA:										
1 ^{er} sorbo	c 0,76	b 1,47	b 1,48	b 1,40	a 1,74	b 1,49	b 1,49	b 1,37	0,0001	**
2 ^o sorbo	b 0,69	a 1,48	a 1,46	a 1,29	a 1,56	a 1,42	a 1,40	a 1,42	0,0001	**

• Niveles de confianza de análisis de varianza: *= 90 %, **= 95 %
• NDS: No difiere de manera significativa con niveles de confianza de un 90 % o superior.
• Las valoraciones medias con diferentes superíndices difieren de manera significativa en el nivel de confianza del 90 % (test de rango múltiple de Duncan).

- 5 **[0083]** La Figura 3 muestra la magnitud de las respuestas medias de los evaluadores de cada atributo de sabor para el que se midieron diferencias estadísticamente significativas en función del contenido de rebaudiosido B. Dado que la escala empleada abarca «el universo», la magnitud de diferencias entre la solución de 97 % de rebaudiosido A y el aumento de los niveles de rebaudiosido B no es tan grande como determinaron otras pruebas informales. Por ejemplo, algunas pruebas informales consideraban que la adición de aproximadamente un 20 % de rebaudiosido A reducía el amargor en un 80 % aproximadamente, mientras que los resultados del grupo de evaluadores anteriormente descrito demostraron que la adición de aproximadamente un 20 % de rebaudiosido A reducía el amargor en un 30 % aproximadamente.
- 10
- 15 **[0084]** Los atributos de sabor también se compararon entre las muestras. Un atributo se denomina «mayor» o «menor» si el atributo de la muestra era significativamente mayor o menor que el resto de las muestras. Un atributo se denomina «alto» o «bajo» si el atributo de la muestra era el mayor o menor, respectivamente, pero no significativamente mayor o menor que el resto de las muestras. Se observó que los atributos tratados en la presente memoria eran significativos en el nivel de confianza del 95 %.
- 20 **[0085]** En comparación con las muestras de edulcorante de alta intensidad, la sacarosa fue el menor en lo siguiente: sabor total (aunque no significativamente en el segundo sorbo frente a 22,3 %, 37,5 % y 52 % de rebaudiosido B); dulzor en el primer sorbo y en el regusto (aunque no significativamente menor que en el control de amargor); mal sabor total; edulcorante artificial/químico; amargor verdadero; anís y revestimiento en la boca.

[0085] En comparación con las muestras de edulcorante de alta intensidad, la sacarosa fue la menor en lo siguiente: sabor total (aunque no significativamente en el segundo sorbo frente a 22,3 %, 37,5 % y 52 % de rebaudiósido B); dulzor en el primer sorbo y en el regusto (aunque no significativamente menor que en el control de amargor); sabor total no deseable; edulcorante artificial/químico; amargor verdadero; anís y revestimiento en la boca.

[0086] Entre las muestras de edulcorante de alta intensidad, el 97 % de rebaudiósido con 0,6 % de rebaudiósido B era alto en lo siguiente: mal sabor total en el segundo sorbo; edulcorante artificial/químico en el primer y segundo sorbos; amargor verdadero y anís en el regusto.

[0087] Entre las muestras de edulcorante de alta intensidad, la muestra con una adición de 3,6 % de rebaudiósido B era alta en lo siguiente: sabor total; dulzor en el regusto; mal sabor total; edulcorante artificial/químico en el segundo sorbo y en el regusto; amargor verdadero en el regusto y anís en el regusto.

[0088] Entre las muestras de edulcorante de alta intensidad, la muestra con una adición de 6,5 % de rebaudiósido B era alta en lo siguiente: dulzor en el primer sorbo; mal sabor total en el segundo sorbo; y edulcorante artificial/químico en el segundo sorbo.

[0089] Entre las muestras de edulcorante de alta intensidad, la muestra con una adición de 11,4 % de rebaudiósido B era baja en mal sabor total en el segundo sorbo y en edulcorante artificial/químico en el primer y segundo sorbos y alta en anís en el primer sorbo y en revestimiento en la boca en el primer sorbo.

[0090] Entre las muestras de edulcorantes de alta intensidad, la muestra con una adición de 22,3 % de rebaudiósido B era baja en lo siguiente: sabor total en el segundo sorbo; mal sabor total en el segundo sorbo; edulcorante artificial/químico en el primer y segundo sorbos; amargor verdadero en el segundo sorbo; y anís en el regusto.

[0091] Entre las muestras de edulcorante de alta intensidad, la muestra con una adición de 37,5 % de rebaudiósido B era baja en lo siguiente: sabor total en el segundo sorbo y en el regusto; mal sabor total en el segundo sorbo; edulcorante artificial/químico en el segundo sorbo y en el regusto, y amargor verdadero en el segundo sorbo.

[0092] Entre las muestras de edulcorante de alta intensidad, la muestra con una adición de 52 % de rebaudiósido B era baja en lo siguiente: sabor total en el primer y segundo sorbos; dulce en el primer sorbo; mal sabor total en el primer y sorbos; edulcorante artificial/químico en el primer y segundo sorbos; amargor verdadero y anís en el primer sorbo.

[0093] Los resultados indican que la adición de 3,6 % de rebaudiósido B dio lugar a unos atributos de sabor peores y la adición de 6,5 % de rebaudiósido B no tuvo gran impacto en el mal sabor total y en el sabor a edulcorante artificial/químico. La adición de mayores cantidades de rebaudiósido B tendía a dar lugar a que las muestras tuvieran una puntuación más cercana a la sacarosa en la mayoría de las características con un descenso del mal sabor, en concreto el amargor. Dicho esto, los resultados muestran que los aumentos del contenido de rebaudiósido B por encima de un 20 % aproximadamente tenían poco impacto adicional sobre los atributos de sabor no deseables. De manera sorprendente, el dulzor no se vio muy afectado por el contenido de rebaudiósido B, lo que contradice informes anteriores con respecto al rebaudiósido B que observaron que era de un medio a dos tercios de dulce como el rebaudiósido A. Aunque el dulzor y el sabor total de las soluciones edulcorantes de alta intensidad fueron similares a los de la solución de sacarosa al 8 %, y similares entre sí, los sabores a edulcorante artificial/químico fueron mucho mayores que los de la solución de sacarosa, con una mayor extensión entre las muestras de edulcorante de alta intensidad, lo que indica que la concentración de rebaudiósido B tuvo un impacto significativo sobre dichos sabores.

[0094] De manera ventajosa, la presente invención puede que se utilice para producir composiciones edulcorantes de alta intensidad que pueden usarse para proporcionar el dulzor «pleno» necesario para muchas aplicaciones, que normalmente no se puede lograr solo con rebaudiósido A debido a su amargor en concentraciones por encima de 200 ppm. Más específicamente, dado que la presente invención permite la producción de edulcorantes de alta intensidad que puede que se añadan a bienes fungibles de modo que los bienes fungibles comprendan de 800 a 1000 ppm de rebaudiósidos sin que el bien fungible presente niveles inaceptables de amargor, las composiciones edulcorantes de la presente invención puede que se usen para proporcionar el dulzor completo necesario para muchos bienes fungibles (aplicaciones alimentarias).

REIVINDICACIONES

1. Extracto de estevia que comprende rebaudiósido B en una concentración que se encuentra en el rango de 10 % a 60 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de estevia, donde las siguientes condiciones (a) y (b) por separado enumeran composiciones que no están abarcadas:

(a) composiciones que comprenden según un % en peso de glicósidos:

Rebaudiósido A/ % en peso	Rebaudiósido B/ % en peso	Rebaudiósido D/ % en peso	Esteviósido/ % en peso	Rebaudiósido C/ % en peso	Rebaudiósido o F/ % en peso	Dulcósido A/ % en peso	Esteviolsido/ % en peso	Rubosósido/ % en peso	Otros % en peso
49	19	0,36							31,64
74	11	2,6							12,4
73	17	7,7							2,3
22,3	13,7	2,4	19,2	4,9	0,9	0,6	5,7	2,3	28
63,8	18,8	6,4	1,7		0,8	0,1			8,4
67,4	15,7	7,2	1,3	0,2	0,9	0,1			7,2

y

- 5 (b) soluciones que comprenden, sobre una base glicosídica, de 25 a 90 % en peso de rebaudiósido A, de 10 a 50 % en peso de rebaudiósido D y hasta un 20 % en peso de rebaudiósido B o de 25 a 60 % en peso de rebaudiósido A, de 10 a 50 % en peso de rebaudiósido D y hasta un 20 % en peso de rebaudiósido B.
- 10 2. Extracto de estevia según la reivindicación 1, donde la concentración de rebaudiósido B se encuentra en el rango de 20 % a 40 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de estevia.
- 15 3. Extracto de estevia según la reivindicación 1, donde la concentración de rebaudiósido B se encuentra en el rango de 20 % a 25 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de estevia.
- 20 4. Extracto de estevia según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde una concentración de rebaudiósido A se encuentra en el rango de 20 % a 90 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de estevia.
- 25 5. Extracto de estevia según la reivindicación 4, donde la concentración de rebaudiósido A se encuentra en el rango de 40 % a 80 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces del extracto de estevia.
- 30 6. Composición edulcorante que comprende compuestos de glicósidos de esteviol dulces, donde los compuestos de glicósidos de esteviol dulces comprenden rebaudiósido B en una concentración que se encuentra en el rango de 10 % a 60 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces de la composición edulcorante, donde las siguientes condiciones (a) y (b) por separado enumeran composiciones que no están abarcadas:
- (a) composiciones que comprenden según un % en peso de glicósidos:

Rebaudiósido A/ % en peso	Rebaudiósido B/ % en peso	Rebaudiósido D/ % en peso	Esteviósido/ % en peso	Rebaudiósido C/ % en peso	Rebaudiósido F/ % en peso	Dulcósido A/ % en peso	Esteviolsido/ % en peso	Rubosósido/ % en peso	Otros % en peso
49	19	0,36							31,64
74	11	2,6							12,4
73	17	7,7							2,3
22,3	13,7	2,4	19,2	4,9	0,9	0,6	5,7	2,3	28
63,8	18,8	6,4	1,7		0,8	0,1			8,4
67,4	15,7	7,2	1,3	0,2	0,9	0,1			7,2

y

5

(b) soluciones que comprenden, sobre una base glicosídica, de 25 a 90 % en peso de rebaudiósido A, de 10 a 50 % en peso de rebaudiósido D y hasta un 20 % en peso de rebaudiósido B o de 25 a 60 % en peso de rebaudiósido A, de 10 a 50 % en peso de rebaudiósido D y hasta un 20 % en peso de rebaudiósido B.

7. Composición edulcorante según la reivindicación 6, donde el rebaudiósido B se encuentra en una concentración que es de 20 % a 40 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces de la composición edulcorante.
- 5 8. Composición edulcorante según la reivindicación 7, donde el rebaudiósido B se encuentra en una concentración que está en el rango de 20 % a 25 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces de la composición edulcorante.
- 10 9. Composición edulcorante según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, donde la composición edulcorante comprende rebaudiósido A y la concentración de rebaudiósido A está en el rango de 20 % a 90 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces de la composición edulcorante.
- 15 10. Composición edulcorante según la reivindicación 9, donde la concentración de rebaudiósido A está en el rango de 40 % a 80 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces de la composición edulcorante.
- 20 11. Bien fungible que comprende una composición edulcorante que comprende compuestos de glicósidos de esteviol dulces, donde los compuestos de glicósidos de esteviol dulces comprenden rebaudiósido B en una concentración que se encuentra en el rango de 10 % a 60 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces de la composición edulcorante.
- 25 12. Bien fungible según la reivindicación 11, donde los glicósidos de esteviol dulces se encuentran en una concentración total que está en el rango de 50 ppm a 2000 ppm y el rebaudiósido B se encuentra en una concentración total de al menos 20 ppm.
- 30 13. Bien fungible según la reivindicación 12, donde el rebaudiósido B se encuentra en una concentración total de al menos alrededor de 200 ppm y que no sobrepasa alrededor de 300 ppm.
- 35 14. Bien fungible según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, donde el bien fungible se selecciona del grupo que consiste en una bebida seleccionada del grupo que consiste en refrescos gaseosos, refrescos en polvo, té listos para tomar, bebidas isotónicas, bebidas lácteas, bebidas que contienen yogur, bebidas alcohólicas, bebidas energéticas, aguas de sabores, bebidas vitamínicas, bebidas de frutas y zumos de frutas; un alimento seleccionado del grupo que consiste en productos horneados, sopas, salsas, carnes procesadas, frutas en conserva, verduras en conserva, productos lácteos, confituras heladas, confituras, gomas de mascar, tartas, galletas, barritas y otros artículos de repostería dulce, cereales, barritas de cereales, yogur, barritas energéticas, barritas de muesli, caramelos duros, caramelos blandos, dulces de chocolate y otras confituras dulces; un producto para la higiene oral seleccionado del grupo consistente en pastas de dientes, colutorios y enjuagues bucales; un producto del tabaco seleccionado del grupo consistente en rapé y tabaco de mascar; un producto farmacéutico seleccionado del grupo consistente en comprimidos, pastillas para chupar y suspensiones; un producto nutracéutico seleccionado del grupo consistente en complementos y vitaminas.
- 40 15. Método de edulcorado de un bien fungible, comprendiendo el método la inclusión de una cantidad eficaz de una composición edulcorante que comprende compuestos de glicósidos de esteviol dulces, donde los compuestos de glicósidos de esteviol dulces comprenden rebaudiósido B en una concentración que está en el rango de 10 % a 60 % en peso de la cantidad total de compuestos de glicósidos de esteviol dulces de la composición edulcorante del bien fungible.
- 45

Figura 1
Solubilidad de Reb B en función de concentraciones de Reb A y
esteviósido, en tampón de ácido cítrico/citrato pH 3

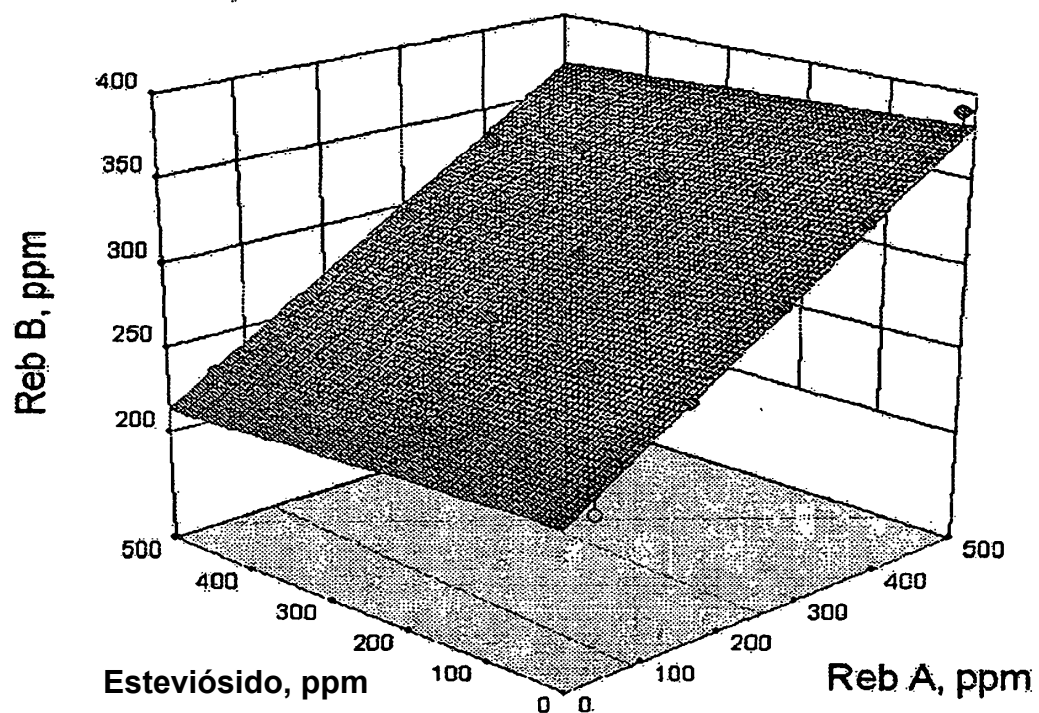
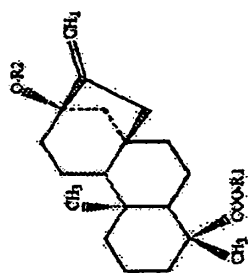


Figura 2



	Nombre compuesto	N.º C.A.S.	R1	R2
1	Esteviol	471-80-7	H	H
2	Esteviolbiónido	41093-60-1	H	β -Glc- β -Glc(2→1)
3	Esteviónido	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)
5	Rebaudiósido B	58543-17-2	H	β -Glc(3→1)
6	Rebaudiósido C (dulcósido B)	63550-99-2	β -Glc	β -Glc(3→1)
7	Rebaudiósido D	63279-13-0	β -Glc- β -Glc(2→1)	β -Glc- α -Rha(2→1)
8	Rebaudiósido E	63279-14-1	β -Glc- β -Glc(2→1)	β -Glc(3→1)
9	Rebaudiósido F	438045-89-7	β -Glc	β -Glc- β -Xyl(2→1)
10	Rubusósido	63849-39-4	β -Glc	β -Glc(3→1)
11	Dulcósido A	64432-06-0	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2→1)

Figura 3

