

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 836**

51 Int. Cl.:

A23L 33/10 (2006.01)

A23L 27/00 (2006.01)

A23L 27/10 (2006.01)

A23L 27/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2014** **E 14003288 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.08.2018** **EP 3000334**

54 Título: **Modificación enzimática de hojas de zarzamora dulce**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.11.2018

73 Titular/es:

ADM WILD EUROPE GMBH & CO. KG (100.0%)
Rudolf-Wild-Straße 107-115
69214 Eppelheim, DE

72 Inventor/es:

HEIDEBACH, THOMAS;
DE WITH, AXEL;
SASS, MATTHIAS y
ZEEVAART, JACOB

74 Agente/Representante:

MILTENYI , Peter

ES 2 688 836 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

Modificación enzimática de hojas de zarzamora dulce

La presente invención se refiere a un método de preparación de un extracto de hojas de zarzamora dulce (*Rubus suavissimus*).

5 La transglicosilación por medio de enzimas del grupo de las transglucosidasas es un principio bien conocido para modificar los glicósidos de esteviol al nivel molecular. Los glicósidos de esteviol son un grupo de moléculas con propiedades edulcorantes de intensidad alta. Son hasta 250 veces más dulces que la sacarosa. Los glicósidos de esteviol pueden encontrarse en concentraciones altas de hasta el 10% en hojas de la planta *Stevia rebaudiana*.

10 Los dos glicósidos de esteviol principales encontrados en las hojas de la planta de estevia son esteviósido y rebaudiósido A. Están presentes varios otros glicósidos de esteviol minoritarios, tales como rebaudiósido C, dulcósido, rubusósido, esteviolbiósido, rebaudiósido B, rebaudiósido D, rebaudiósido E y rebaudiósido F. Los glicósidos de esteviol individuales difieren en la intensidad de dulzor y calidad de gusto. La calidad de gusto se asocia a menudo con la intensidad de un regusto de regaliz o amargo.

15 Aislados altamente concentrados de glicósidos de esteviol a partir de extractos de estevia en bruto están aprobados para su uso como edulcorantes de intensidad alta dentro de la UE. Se usan también comercialmente en la preparación de sabores, modificadores del sabor, potenciadores del sabor y potenciadores del dulzor.

Se han usado extractos enriquecidos en glicósidos de esteviol de hojas de *Stevia rebaudiana* en diversos grados de purificación como sustratos para transglicosilación.

20 La transglicosilación conduce a la adición de moléculas de glucosa a las diversas moléculas de glicósido de esteviol y por tanto da como resultado un aumento en su peso molecular. Las unidades de glucosa pueden unirse en dos posiciones diferentes en la molécula de glicósido de esteviol (C-13 o C-19). La cantidad de unidades de glucosa unidas es habitualmente de entre una y cinco y algunas veces incluso más. La cinética exacta de la formación de los glicósidos de esteviol glicosilados individuales durante el procedimiento de transglicosilación enzimática no se entienden completamente aún (Lu *et al.*, 2014: "Transglycosylation specificity of glycosyl donors in transglycosylation of stevioside catalyzed by cyclodextrin glucanotransferase", Food Chem., 159, 151-156). Cada uno de los glicósidos de esteviol glicosilados recién formados puede presentar propiedades diferentes en cuanto a intensidad de dulzor y calidad de gusto debido a la transglicosilación. Estas pueden en general o bien mejorarse o bien deteriorarse en comparación con la molécula de sustrato original. Como consecuencia, en los últimos veinte años ha habido muchos esfuerzos para identificar sustratos y procedimientos que logren una mejora global en la calidad de glicósidos de esteviol mediante glicosilación enzimática con transglucosidasas (Tanaka, O. *et al.*, 1997: "Improvement of taste of natural sweeteners", Pure & Appl. Chem., 69 (4), 675-683; Li *et al.*, 2013: "Transglycosylation of stevioside to improve the edulcorant quality by lower substitution using cornstarch hydrolyzate and CGTase", Food Chem., 138, 2064-2069).

35 La reacción enzimática requiere la presencia de un donador de glucosa como cosustrato. Aunque sólo una cantidad relativamente pequeña de unidades de glucosa se une en una base molecular a los glicósidos de esteviol durante la reacción enzimática, se requiere un exceso del donador de glucosa para mantener el equilibrio de la reacción en el lado de producto. Se usa a menudo maltodextrina como donador de glucosa. Para lograr una conversión eficaz, se ha usado una razón de concentración de glicósido de esteviol con respecto a maltodextrina en el intervalo de 0,5:1 a 2:1. Esto significa, por ejemplo, que en el caso de una razón de 1:1, se añade el 15% en peso de maltodextrina a una disolución acuosa del 15% en peso de glicósidos de esteviol, conduciendo a una disolución de reacción con el 30% en peso de materia seca (documento US20090324793 A1, Li *et al.*, 2013).

45 Otra planta que se sabe que tiene un gusto dulce es la zarzamora dulce, una planta del género *Rubus*, también conocida como zarzamora china. Las hojas de zarzamora dulce se usan comúnmente en tés de hierbas. Las hojas de la zarzamora dulce china (*Rubus suavissimus*, también conocida como *R. chingii* y *R. palmatus*) contienen el glicósido dulce rubusósido (éster β -D-glucosídico de 13-O- β -D-glucosilesteviol) en una cantidad de aproximadamente el 5 al 9% en peso, así como otros glicósidos de esteviol minoritarios. El rubusósido es también un glicósido de esteviol minoritario en *Stevia rebaudiana*.

50 Pueden usarse también extractos de hojas de zarzamora dulce como ingrediente para la preparación de edulcorantes, sabores, modificadores del sabor, potenciador del sabor, potenciadores del dulzor o agentes enmascaradores (documento EP-A-2641479).

55 Se ha mostrado la transglicosilación enzimática de rubusósido aislado de *Rubus suavissimus* por medio de una ciclodextrina glucanotransferasa (Darise *et al.*, "Enzymic Transglucosylation of Rubusoside and the Structure-Sweetness Relationship of Steviol-Bisglycosides", Agric. Biol. Chem., 48 (10), 2483-2488, 1984 y Othani *et al.*, "Further Study on the 1,4- α -Transglucosylation of Rubusoside, a Sweet Steviol-Bisglucoside from *Rubus suavissimus*", Agric. Biol. Chem., 55 (2), 449-453, 1991). En estos estudios, se aisló rubusósido de las hojas de *Rubus suavissimus* y posteriormente se transglicosiló por medio de ciclodextrina glucanotransferasa y almidón como cosustrato a una temperatura de 28 a 40°C durante de 18 a 96 horas en condiciones controladas. Se identificaron

varios glicósidos de esteviol glicosilados recién formados y se caracterizaron según el dulzor individual y la calidad de gusto. Se encontró que algunos derivados de rubusósido tenían propiedades mejoradas y algunos tenían propiedades inferiores en cuanto a dulzor y calidad de gusto en comparación con el rubusósido original, dependiendo de la estructura molecular recién formada.

- 5 En contraste con los glicósidos de esteviol de *Stevia rebaudiana*, que se usan comúnmente en forma de aislados altamente concentrados extraídos de hojas de estevia secadas, las hojas de zarzamora dulce o los extractos de hojas de zarzamora dulce se usan habitualmente sin aislamiento y/o enriquecimiento selectivo del rubusósido contenido.

- 10 Los documentos EP-A-2641479 y EP-A-2236043 describen procedimientos de extracción convencionales de hojas de zarzamora dulce. En general, las hojas de zarzamora dulce se extraen con agua caliente a una temperatura de desde 60°C hasta 100°C durante de 1 a 5 horas a una razón en peso de hojas secas con respecto a agua de 1:5 a 1:15. Después de eso, los sólidos se retiran mediante decantación o centrifugación y el residuo se concentra. Preferiblemente, el concentrado puede enfriarse hasta de 0 a 5°C y de nuevo decantarse y/o centrifugarse. El residuo restante puede además concentrarse y/o pasteurizarse y/o secarse por pulverización hasta un polvo.
- 15 Finalmente, el documento EP-A-2954785, publicado el 13-06-2014, da a conocer los edulcorantes rubusósido y/o alfa-glicosilrubusósido, producidos mediante trans-glicosilación de hojas de zarzamora dulce previamente extraídas (ejemplo 1).

En general, la mejora de la calidad del dulzor de hojas de zarzamora dulce por medio de transglicosilación enzimática se ha descrito hasta ahora sólo mediante:

- 20 1) enriquecimiento selectivo y/o eliminación del rubusósido del extracto de hojas de zarzamora dulce,
- 2) glicosilación de rubusósido aislado en condiciones de procedimiento normalizadas para obtener una mezcla de derivados de rubusósido con propiedades mejoradas. Esto implica la preparación de una disolución acuosa de rubusósido aislado y la adición de una cantidad apropiada de cosustrato.

- 25 Sin embargo, la aplicación principal de las hojas de zarzamora dulce de *Rubus suavissimus* está en forma de un extracto en bruto sin enriquecimiento selectivo de rubusósido dado que dentro de la UE se usan comúnmente hojas de zarzamora dulce como extracto vegetal y no como edulcorante de intensidad alta a base de rubusósido.

Además, el uso de un extracto en bruto en lugar de rubusósido altamente purificado es mucho menos costoso.

Por tanto, hay una demanda alta de una transglicosilación enzimática de rubusósido a partir de hojas de zarzamora dulce sin aislamiento costoso del rubusósido antes del tratamiento enzimático.

- 30 El objeto de la presente invención es proporcionar un edulcorante basándose en rubusósido que tiene propiedades excelentes de dulzor y calidad de gusto.

- Dicho objeto se soluciona mediante un método de producción de un extracto de hojas de zarzamora dulce (*Rubus suavissimus*) que contiene menos del 95% en peso de rubusósido basándose en la materia seca, en el que al menos una parte del rubusósido se glicosila, comprendiendo dicho método una extracción de hojas de zarzamora dulce y una glicosilación enzimática llevada a cabo simultáneamente durante la extracción con una enzima transglucosidasa con adición de un cosustrato como donador de glucosa.
- 35

- La presente memoria descriptiva da a conocer adicionalmente el uso del extracto preparado según la presente invención para la preparación de un edulcorante, un modificador del sabor, un potenciador del sabor, un potenciador del dulzor o un agente enmascarador, así como un producto alimenticio que contiene el extracto preparado según la presente invención como ingrediente.
- 40

En una realización preferida, el extracto preparado según la presente invención contiene del 3 al 50% en peso de rubusósido, basándose en la materia seca. En combinación con las realizaciones anteriores o posteriores, el contenido en rubusósido del extracto es preferiblemente del 5 al 40% en peso, más preferiblemente del 10 al 30% en peso y lo más preferiblemente del 3 al 20% en peso, basándose en la materia seca.

- 45 En una realización adicional preferida, al menos el 20% del rubusósido en el extracto preparado según la presente invención está glicosilado. En combinación con las realizaciones anteriores o posteriores, el porcentaje de rubusósido glicosilado en el extracto es preferiblemente de al menos el 30%, más preferiblemente al menos el 40% y lo más preferiblemente al menos el 50% (por ejemplo entre el 50 y el 70%).

- En otra realización preferida, el rubusósido en el extracto preparado según la presente invención se glicosila con de 1 a 5 unidades de D-glucopiranosilo.
- 50

En una realización adicional preferida, el extracto preparado según la presente invención es un extracto acuoso.

En otra realización preferida, en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, el extracto preparado según la presente invención tiene un Brix de 45 a 80°, preferiblemente de 50 a 70°, más preferiblemente

de 55 a 65°.

5 El término “grados Brix” (°Bx) se refiere a una unidad que representa el contenido sólido soluble en una disolución. Un grado Brix corresponde a 1 g de sacarosa en 100 g de disolución de sacarosa/agua y por tanto representa la concentración de la disolución como porcentaje en peso (% p/p). Una disolución tiene 1°Bx si la densidad de dicha disolución es la misma que una disolución de 1 gramo de sacarosa en 100 gramos de disolución de sacarosa/agua. El °Bx se mide habitualmente por medio de un refractómetro.

En una realización preferida del método según la presente invención, se usa ciclomaltodextrina glucanotransferasa (EC 2.4.1.19) como enzima transglucosidasa.

10 En otra realización preferida del método según la presente invención, se usa maltodextrina como cosustrato. En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, la maltodextrina se obtiene a partir de almidón hidrolizando parcialmente el almidón. En una realización preferida en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, la fuente del almidón son patatas, trigo, maíz, arroz o mandioca.

15 En una realización adicional preferida, el método de la presente invención comprende además la etapa de concentrar el extracto que contiene el rubusósido glicosilado.

La figura 1 muestra la cantidad de rubusósido no glicosilado residual durante la incubación de un extracto de hojas de zarzamora a 80°C tal como se describe en el ejemplo 1.

20 El término “extracto” se usa representativamente para todos los productos que se obtienen a partir de una planta por medio de una extracción con un disolvente, tal como con maceración o percolación. El extracto puede estar en una forma líquida, semisólida o sólida.

Con respecto a la extracción, las partes de la planta se someten o bien en el estado sin procesar o bien secadas a maceración o percolación. En una realización preferida, en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, se usa material vegetal secado.

25 Las partes de la planta pueden romperse en trozos pequeños de una manera adecuada antes de la extracción. Esto puede hacerse, por ejemplo, frotándolas o cortándolas. Alternativamente, las partes de la planta pueden prensarse en el estado sin procesar, por ejemplo directamente después de la cosecha, con el fin de producir un jugo a partir del prensado antes de la extracción.

30 En general, una extracción de las partes de la planta incluyendo hojas, ramas pequeñas y flores se lleva a cabo con un disolvente adecuado. En una realización preferida, en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, el disolvente para la extracción se selecciona de agua, alcoholes tales como metanol, etanol o alcohol isopropílico, o disolventes clorados tales como diclorometano, así como acetona, acetilacetona, acetato de etilo, amoníaco o ácido acético glacial. En una realización preferida adicional, en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, se usa dióxido de carbono supercrítico como disolvente. En otra realización preferida, en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, se usan mezclas de dos o más de los disolventes mencionados anteriormente para la extracción. En una realización preferida, en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, se usa agua como el disolvente para la extracción. En una realización preferida adicional, en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, se usan grasas tales como manteca de cerdo, ceras tales como cera de abejas, o aceites tales como aceite de oliva y aceite de almendra para la extracción.

40 Con el fin de lograr el rendimiento más alto posible, puede extraerse el material vegetal varias veces. En una realización preferida, en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, se repite la extracción de 2 a 6 veces, más preferiblemente 3 veces. En este caso, también es posible usar disolventes diferentes en las diversas etapas de extracción o una extracción con un disolvente puede ir seguida por una extracción con grasa, cera o aceite, o viceversa.

45 En una realización preferida, en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, el procedimiento de maceración se lleva a cabo durante de 5 a 9 días, preferiblemente durante 7 días, a temperatura ambiente con una mezcla de agua y etanol. La mezcla de disolventes se vierte sobre los elementos vegetales y se deja durante el periodo de tiempo anterior.

50 El producto de extracción en bruto puede también concentrarse, secarse y/o procesarse adicionalmente antes de usarse. Para producir un extracto seco, el disolvente puede evaporarse a partir del extracto líquido sin procesar, el extracto concentrado o el extracto limpiado mediante, por ejemplo, secado por pulverización, secado por congelación o secado a vacío. El procesamiento adicional puede incluir etapas de limpieza conocidas por el experto en la técnica, tales como centrifugación, filtración y decantación, con el fin de retirar materiales suspendidos del extracto. En una realización preferida, en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, el producto en bruto se usa sin etapas de purificación adicionales.

Para mejorar la calidad de dulzor del extracto en bruto no enriquecido en rubusósido de hoja de zarzamora dulce, la glicosilación del rubusósido se lleva a cabo preferiblemente durante o directamente después del procedimiento de extracción. El motivo es que los extractos de hojas de zarzamora dulce pueden usarse principalmente como extractos en bruto y no en forma de concentrados de rubusósido aislados.

5 Actualmente, no se conoce ningún procedimiento para la glicosilación enzimática eficaz de rubusósido de *Rubus suavissimus* en un extracto de hojas de zarzamora dulce no enriquecido en rubusósido.

10 Se encontró sorprendentemente que puede lograrse una transglicosilación eficaz, que da como resultado una mejora de la calidad de dulzor global de extractos de hojas de zarzamora dulce, tratando un extracto de hojas de zarzamora dulce con una enzima transglucosidasa tal como ciclodextrina glucanotransferasa (EC 2.4.1.19) y un donador de glucosa como cosustrato durante la extracción. La glicosilación enzimática de extracto en bruto no enriquecido en rubusósido puede llevarse a cabo en condiciones que permiten simultáneamente una extracción eficaz tales como una temperatura de 60-100°C durante de 1 a 5 h.

15 Como donador de glucosa, se usa preferentemente maltodextrina. En una realización preferida, en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, el donador de glucosa es una maltodextrina que tiene un valor de DE (equivalente de dextrosa) de 3 a 20. En combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, el valor de DE de la maltodextrina usada como cosustrato es preferiblemente de 5 a 20, más preferiblemente de 10 a 17 y lo más preferiblemente de 11 a 16 (tal como 12, 13, 14 ó 15).

20 El extracto de hojas de zarzamora dulce glicosilado no enriquecido en rubusósido resultante mostró propiedades mejoradas cuando se usó solo o como ingrediente en un edulcorante, sabor, modificador del sabor, potenciador del sabor, potenciador del dulzor o agente enmascarador.

25 El extracto puede obtenerse usando procedimientos de extracción convencionales conocidos por el experto en la técnica tal como se describió anteriormente. En una realización preferida, en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, se extrajeron hojas de zarzamora dulce con agua con una temperatura de desde 60 hasta 80°C durante de 1 a 5 h. En una realización preferida, en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, la razón en peso de hojas de zarzamora dulce secas con respecto a agua está en el intervalo de 1:5 a 1:15. Después de eso, los sólidos se eliminan preferiblemente mediante decantación o centrifugación y el residuo se concentra.

30 El concentrado puede enfriarse preferiblemente a de 0 a 5°C y de nuevo decantarse y/o centrifugarse. En una realización preferida, en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, el residuo restante se concentra y/o pasteuriza adicionalmente. En otra realización preferida, en combinación con una cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, el extracto se seca por pulverización hasta un polvo.

Las cantidades de los reactantes y las condiciones durante la transglicosilación enzimática tales como el pH y la temperatura pueden variarse con el fin de obtener un extracto con un dulzor y gusto deseados.

35 Los siguientes parámetros puede ajustarlos un experto en la técnica para lograr una velocidad de transglicosilación máxima y una eficacia global:

- Concentración de donador de glucosa
- Concentración de enzima
- pH del medio de reacción/extracción
- Temperatura del medio de reacción/extracción
- 40 • Duración del procedimiento de reacción/extracción
- Materia seca global (Brix) en el medio de reacción/extracción

La tasa de transglicosilación global puede expresarse por comparación de la cantidad de rubusósido en el extracto en bruto antes y después de la reacción enzimática según la tasa de conversión.

45 Tasa de conversión (%) = 100% - (cantidad de rubusósido (p/p) en el extracto después del tratamiento enzimático dividida entre la cantidad de rubusósido (p/p) en el extracto antes del tratamiento enzimático) x 100%

La mejora de la calidad e intensidad de dulzor depende de la tasa de conversión (el porcentaje de rubusósido glicosilado). Sin embargo, no hay un umbral mínimo fijado para una tasa de conversión para lograr un efecto de optimización significativo mínimo cuando se compara con una muestra no tratada. Por este motivo, un experto en la técnica tiene que decidir qué tasa de conversión se desea para lograr una calidad e intensidad de dulzor deseadas.

50 En una realización preferida, en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, se glicosila al menos el 50% del rubusósido en el extracto en bruto.

Sin embargo, el método de la presente invención no se limita a los que dan como resultado más de un 50% de tasa de conversión dado que tasas de conversión menores pueden lograr también una calidad e intensidad de dulzor suficientes.

5 Se encontró sorprendentemente que las condiciones de procedimiento requeridas para una extracción eficaz (descrita anteriormente) también permiten una transglicosilación enzimática eficaz. Por tanto, en una realización preferida del método según la presente invención, en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, el extracto de hojas de zarzamora dulce se obtiene *in situ* durante la transglicosilación enzimática.

10 Por tanto, en una realización preferida del método según la presente invención, en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, la transglicosilación enzimática se lleva a cabo a una temperatura de 60 a 100°C, preferiblemente de 65 a 90°C, lo más preferiblemente a de 70 a 80°C, durante de 1 a 6 h, preferiblemente de 2 a 5 h, con una mezcla de reacción que comprende una enzima transglucosidasa, un cosustrato y hojas de zarzamora dulce secas. En una realización preferida, en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, la razón en peso de hojas de zarzamora dulce secas con respecto a agua está en el intervalo de 1:5 a 1:15, más preferiblemente de 1:7 a 1:13, lo más preferiblemente 1:10.

15 En una realización preferida adicional, en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, la concentración del cosustrato (donador de glucosa) está dentro del intervalo del 0,5 al 50% (p/v), más preferiblemente del 1 al 40% (p/v), lo más preferiblemente del 2 al 30% (p/v), basándose en el volumen total de la mezcla de reacción.

20 En una realización preferida adicional, en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, la concentración de enzima está dentro del intervalo del 0,05 al 5% (p/v), más preferiblemente del 0,1 al 4% (p/v), lo más preferiblemente del 0,5 al 3% (p/v), basándose en el volumen total de la mezcla de reacción.

Se ha encontrado sorprendentemente que la adición de cantidades significativas de materia seca disuelta en forma de un cosustrato y la concentración bastante baja de rubusósido en el extracto en bruto no enriquecido en rubusósido en la disolución de extracción acuosa no afecta negativamente a la eficacia de extracción.

25 El pH de la disolución de sustrato no siempre se ha ajustado para desplazar las condiciones de reacción hacia las condiciones de reacción óptimas para la enzima, dado que el pH natural del extracto puede variar y la reacción avanza en un intervalo de pH amplio. En una realización preferida, en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, el pH está dentro del intervalo de 4 a 8, más preferiblemente de 4,5 a 6, lo más preferiblemente de 5 a 5,5. En una realización preferida adicional, en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, el pH de la mezcla de reacción puede ajustarse mediante la adición de una base adecuada tal como NaOH.

30 En una realización preferida, en combinación con cualquiera de las realizaciones anteriores o posteriores, el extracto de hojas de zarzamora dulce en bruto usado en el método de la presente invención tiene un Brix en el intervalo de 2 a 50°, más preferiblemente de 5 a 40° y lo más preferiblemente de 10 a 30° Brix.

35 Los siguientes ejemplos describen adicionalmente la invención:

Ejemplos:

Ejemplo 1: Preparación de extracto de hojas de zarzamora glicosilado a partir de extracto en bruto

El ejemplo 1 no forma parte de la invención reivindicada y debe considerarse como comparativo con la misma.

40 Se añadieron 100 kg de hojas de zarzamora secadas y troceadas a 1000 kg de agua. Se incubó después la mezcla a 80°C durante 1 h. Posteriormente, se centrifugó la muestra para eliminar sólidos y luego se concentró la disolución restante hasta 60° Brix por medio de un evaporador rotatorio.

45 Se tomó una muestra del extracto concentrado obtenido y se diluyó con agua hasta 15° Brix. A 1000 g de la disolución acuosa así obtenida se le añadieron 150 g de maltodextrina DE 15 y 4 g de ciclodextrina glucanotransferasa (Toruzyme 3.0L, Novozymes) y se incubaron sin agitación durante 1-6 h a 80°C. Se ajustó el pH a 5,5 con NaOH 0,5 mM. Se tomaron muestras durante el tiempo de incubación y se determinó la cantidad de rubusósido no glicosilado residual por medio de HPLC (véase la figura 1).

Puede observarse que después de 75 min de incubación más del 90% del rubusósido estaba ya glicosilado.

Ejemplo 2: Glicosilación durante el procedimiento de extracción de hojas de zarzamora dulce

50 Se disolvieron diversas cantidades de maltodextrina DE 15 (0,1 g/0,5 g/1 g/3 g) en 100 g de agua, respectivamente. Se añadieron posteriormente 10 g de hojas de zarzamora secadas y troceadas y 130 mg de ciclodextrina glucanotransferasa (Toruzyme; Novozymes) a la disolución acuosa. Se preparó una muestra adicional sin adición de enzima y maltodextrina. Se incubaron las mezclas con agitación ligera a 70°C durante 2,5 h. Para inactivar la enzima, se ajustó el pH de las muestras a menos de 3,5 y se incubaron adicionalmente las muestras a 85°C durante

10 min. Después de eso, se enfriaron las muestras hasta temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugaron las muestras (3000 g/5 min) para retirar los sólidos. Se usó el extracto líquido resultante para pruebas adicionales.

Tabla 1: Dependencia del contenido en rubusósido y °Brix resultantes de la adición de maltodextrina.

Maltodextrina (g)	°Brix del extracto líquido resultante	Contenido en rubusósido del extracto líquido resultante (mg/l)	Cantidad residual de rubusósido (%)	Otros glucósidos de esteviol (mg/l) y glicósidos de esteviol glicosilados
0	3,8	3250	-	1700
0,1	4	2840	87,4	2000
0,5	4,4	2240	68,9	3100
1	5	1810	55,7	3500
3	6,9	1070	32,9	4600

5 A partir de la tabla 1 puede observarse que, en el extracto no tratado, están presentes aproximadamente 4950 mg/l de glicósidos de esteviol, de los que el rubusósido es el glucósido de esteviol principal (65%).

La tabla muestra adicionalmente que la presencia de maltodextrina como materia seca en el medio de extracción sorprendentemente no influye negativamente en la eficacia de extracción de las hojas secadas, ya que los °Brix generados por la materia seca disuelta de las hojas de zarzamora es similar para todas las muestras, independiente de la cantidad de maltodextrina añadida.

10 Puede observarse adicionalmente que el grado de glucosilación es dependiente de la concentración del cosustrato (maltodextrina) y se requiere una razón bastante alta de cosustrato con respecto a rubusósido para lograr una tasa de conversión alta tal como al menos el 50%.

15 El agotamiento de rubusósido y por tanto la producción de glicósidos de esteviol glicosilados puede aumentarse adicionalmente en general aumentando la cantidad de enzima, ajustando el pH al intervalo óptimo (para la enzima) de entre 5 y 5,5 o prolongando el tiempo de incubación.

Las tasas de reacción son significativamente más bajas en comparación con el ejemplo 1. El motivo es que el rubusósido disponible sólo se libera durante el procedimiento de extracción y la cantidad global de sustrato y cosustrato disponible es significativamente más baja. Sin embargo, dado que la extracción y la glicosilación enzimática pueden llevarse a cabo simultáneamente, se mejoran la eficacia global y la rentabilidad del método.

20 Ejemplo 3: Preparación de un extracto de hojas de zarzamora modificado enzimáticamente concentrado

25 Se disolvieron 30 g de maltodextrina en 1000 g de agua. Posteriormente, se añadieron 100 g de hojas de zarzamora secadas y troceadas y 1,3 g de ciclodextrina gluconotransferasa (Toruzyme; Novozymes) a la disolución acuosa. Se incubó la mezcla con agitación ligera a 70°C durante 4 h. El pH de la mezcla era de entre 4,7 y 4,9 durante el procedimiento completo y no se ajustó. Para inactivar la enzima, se ajustó el pH de la muestra a menos de 3,5 y se incubó la muestra adicionalmente a 85°C durante 10 min. Después de eso, se enfrió la muestra hasta temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó la muestra (3000 g/5 min) para retirar los sólidos. Después de la centrifugación, la muestra tenía un Brix de 6,9°. Se concentró después por medio de un evaporador rotatorio hasta que se alcanzó un Brix final de 58°. El extracto líquido concentrado resultante contenía 10,2 g/kg de rubusósido y 67 g/kg de otros glucósidos de esteviol (mg/l) incluyendo glicósidos de esteviol glicosilados. Los resultados muestran que la tasa de conversión de rubusósido en rubusósido glicosilado es de más del 50%, dado que una muestra no tratada a 58° Brix tiene un contenido de rubusósido esperado de aproximadamente 50 g/kg. La comparación con el ejemplo 2 muestra que la prolongación del tiempo de extracción no aumenta adicionalmente la cantidad de sólidos extraídos de las hojas de zarzamora dulce pero puede aumentar aún la tasa de conversión.

Se confirmó mediante HPLC que el rubusósido se glicosiló con de 1 a 5 unidades de D-glucopiranosilo.

35 Ejemplo 4: Impacto de la glucosilación sobre la calidad de dulzor del extracto de hojas de zarzamora dulce.

40 Los extractos de hojas de zarzamora dulce glicosilados obtenidos en los ejemplos 1 y 3 se diluyeron cada uno con agua destilada para lograr una concentración de extracto de hojas de zarzamora dulce de 1 g/l. Esta dilución se comparó sensorialmente con el extracto de hojas de zarzamora dulce no glicosilado respectivo, diluido a la misma concentración en agua destilada. Se encontró que en todos los casos aumentaron significativamente tanto la intensidad de dulzor como la calidad de dulzor para el extracto de hojas de zarzamora dulce glicosilado, en comparación con el extracto no glicosilado.

REIVINDICACIONES

1. Método de producción de un extracto de hojas de zarzamora dulce (*Rubus suavissimus*) que contiene menos del 95% en peso de rubusósido basándose en la materia seca, en el que al menos una parte del rubusósido se glicosila, comprendiendo dicho método una extracción de hojas de zarzamora dulce y una glicosilación enzimática llevada a cabo simultáneamente durante la extracción con una enzima transglucosidasa con adición de un cosustrato como donador de glucosa.
5
2. Método según la reivindicación 1, en el que se usa ciclomaltodextrina gluconotransferasa como enzima transglucosidasa.
3. Método según la reivindicación 1 ó 2, en el que se usa maltodextrina como cosustrato.
- 10 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende además la etapa de concentrar el extracto que contiene el rubusósido glicosilado.

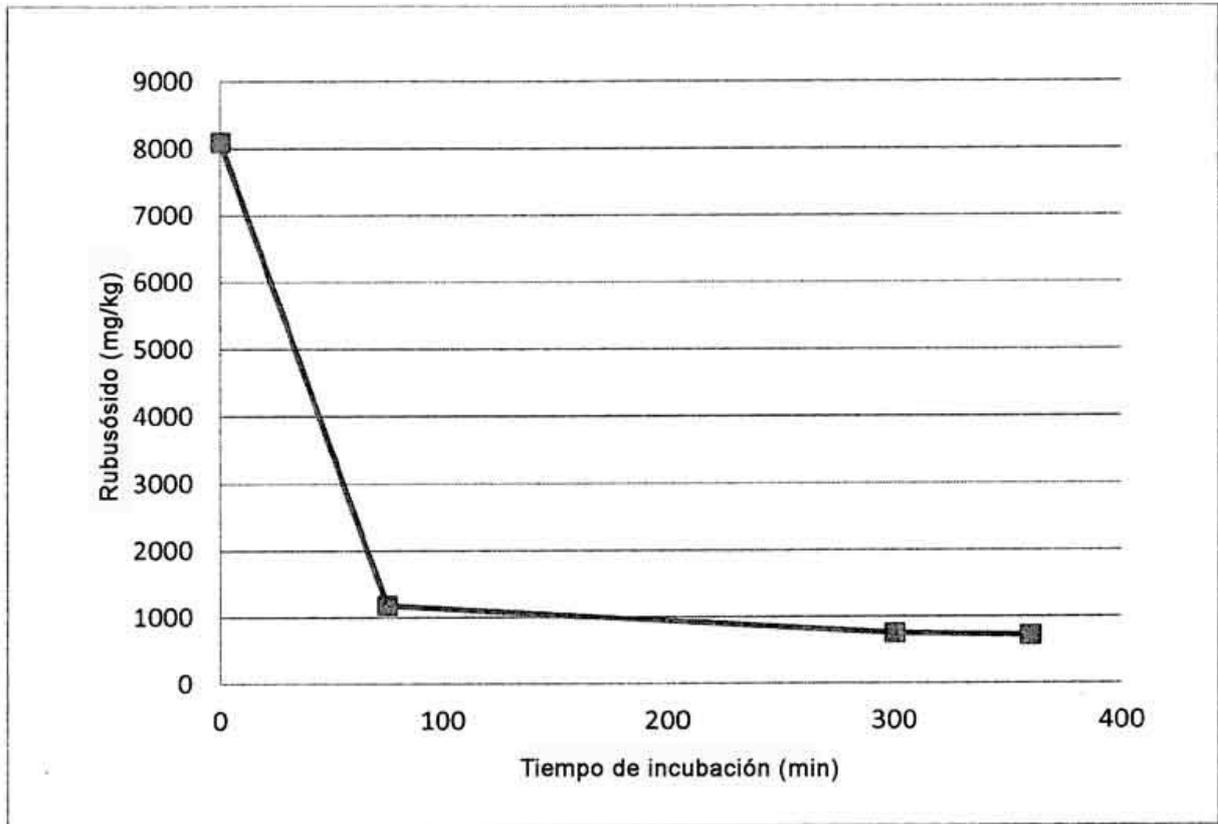


Fig. 1