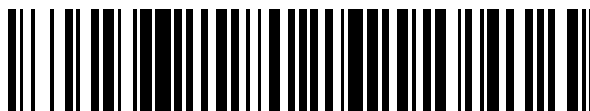


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 006**

51 Int. Cl.:

A23L 2/60 (2006.01)

A61K 8/33 (2006.01)

A23L 33/10 (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: **03.08.2011 E 11006390 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 2486806**

54 Título: **Composición de la estevia**

30 Prioridad:

10.02.2011 US 441443 P

11.05.2011 WO PCT/US2011/036063

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

18.06.2019

73 Titular/es:

**PURECIRCLE USA (100.0%)
200 West Jackson Boulevard, Suite 800
Chicago, IL 60606, US**

72 Inventor/es:

MARKOSYAN, AVETIK A.

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 717 006 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

Composición de la estevia

5 Antecedentes

Campo de la invención

10 La invención se refiere a un proceso de producción de una composición de rebaudiósido B a partir del extracto de la planta de *Stevia rebaudiana* Bertoni, como se caracteriza por las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de la técnica relacionada

15 En la presente memoria descriptiva, se citan varios documentos que incluyen solicitudes de patente y manuales del fabricante.

20 En la actualidad, las alternativas de azúcar están recibiendo una atención cada vez mayor debido al conocimiento de muchas enfermedades en relación con el consumo de alimentos y bebidas con alto contenido de azúcar. Sin embargo, muchos edulcorantes artificiales como la dulcina, el ciclamato de sodio y la sacarina fueron prohibidos o restringidos en algunos países debido a preocupaciones sobre su seguridad. Por lo tanto, los edulcorantes no calóricos de origen natural son cada vez más populares. La hierba dulce *Stevia rebaudiana* Bertoni, produce una serie de glucósidos diterpénicos que presentan un dulzor de alta intensidad y propiedades sensoriales superiores a las de muchos otros edulcorantes de alta potencia.

25 Los glucósidos dulces mencionados anteriormente, tienen un aglicón común, el esteviol, y difieren en el número y tipo de residuos de carbohidratos en las posiciones C13 y C19. Las hojas de estevia pueden acumular hasta un 10-20 % (en peso seco) de glucósidos de esteviol. Los principales glucósidos encontrados en las hojas de estevia son rebaudiósido A (2-10 %), esteviósido (2-10 %) y rebaudiósido C (1-2 %). Otros glucósidos tales como el rebaudiósido B, D, E y F, el esteviolbósido y el rubusósido se encuentran en niveles mucho más bajos (aproximadamente 0-0,2 %).

30 Dos glucósidos principales, el esteviósido y el rebaudiósido A (reb A), se estudiaron y caracterizaron exhaustivamente en términos de su idoneidad como edulcorantes comerciales de alta intensidad. Los estudios de estabilidad en bebidas carbonatadas confirmaron su estabilidad térmica y de pH (Chang SS, Cook, J.M. (1983) Stability studies of stevioside and rebaudioside A in carbonated beverages. J. Agric. Food Chem. 31:409-412)

35 Los glucósidos de esteviol difieren entre sí no solo por su estructura molecular, sino también por sus propiedades de sabor. Generalmente, se encuentra que el esteviósido es 110-270 veces más dulce que la sacarosa, el rebaudiósido A entre 150 y 320 veces, y el rebaudiósido C entre 40-60 veces más dulce que la sacarosa. El dulcósido A es 30 veces más dulce que la sacarosa. El rebaudiósido A tiene el regusto menos astringente, el menos amargo y el menos persistente, por lo que posee los atributos sensoriales más favorables en los principales glucósidos de esteviol (Tanaka O. (1987) Improvement of taste of natural sweeteners. Pure Appl. Chem. 69:675-683; Phillips K.C. (1989) Stevia: steps in developing a new sweetener. en: Grenby T.H. ed. Developments in sweeteners, vol. 3. Elsevier Applied Science, Londres. 1-43) La estructura química del rebaudiósido A se muestra en la Figura 1.

45 Los métodos para la extracción y purificación de glucósidos dulces de la planta de *Stevia rebaudiana* usando agua o disolventes orgánicos se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos números 4.361.697; 4.082.858; 4.892.938; 5.972.120; 5.962.678; 7.838.044 y 7.862.845.

50 Sin embargo, incluso en un estado altamente purificado, los glucósidos de esteviol aún poseen atributos de sabor indeseables tales como amargor, regusto dulce, sabor a regaliz, etc. Uno de los principales obstáculos para la comercialización exitosa de edulcorantes de estevia son estos atributos de sabor indeseables. Se demostró que estas notas de sabor se vuelven más prominentes a medida que aumenta la concentración de glucósidos de esteviol (Prakash I., DuBois G.E., Clos J.F., Wilkens K.L., Fosdick L.E. (2008) Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener. Food Chem. Toxicol., 46, S75-S82.).

55 El rebaudiósido B (n.º CAS: 58543-17-2) o reb B, también conocido como esteviósido A₄ (Kennelly E.J. (2002) Constituents of Stevia rebaudiana In Stevia: The genus Stevia, Kinghorn A.D. (Ed), Taylor & Francis, Londres, pág. 71), es uno de los glucósidos dulces que se encuentran en la *Stevia rebaudiana*. Las evaluaciones sensoriales muestran que el reb B fue aproximadamente 300-350 veces más dulce que la sacarosa, mientras que para el reb A este valor fue de aproximadamente 350-450 (Crammer, B. e Ikan, R. (1986) Sweet glycosides from the Stevia plant. Chemistry in Britain 22, 915-916, y 918). La estructura química del rebaudiósido B se muestra en la Figura 2.

65 Se creía que el reb B se forma a partir de la hidrólisis parcial del rebaudiósido A durante el proceso de extracción (Kobayashi, M., Horikawa, S., Degrandi, I.H., Ueno, J. y Mitsuhashi, H. (1977) Dulcosides A y B, new diterpene glycosides from Stevia rebaudiana. Phytochemistry 16, 1405-1408). Sin embargo, investigaciones adicionales muestran que el reb B se produce naturalmente en las hojas de *Stevia rebaudiana* y actualmente es uno de los nueve

glucósidos de esteviol reconocidos por la FAO/JECFA (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Comité Conjunto de Expertos en Aditivos Alimentarios) en el cálculo del contenido de glucósidos totales de esteviol en preparados comerciales de glucósidos de esteviol (FAO JECFA (2010) Glucósidos de esteviol, compendio de especificaciones de aditivos alimentarios, FAO JECFA Monografías 10, 17-21).

Sólo se describen algunos métodos en la bibliografía para preparar el reb B.

Kohda *et.al.*, (1976) prepararon reb B por hidrólisis de reb A con hesperidinas. También se preparó reb B por saponificación alcalina de reb A. Dicha saponificación se realizó en KOH-EtOH al 10 %. La solución se acidificó con AcOH y se extrajo con n-BuOH. La capa de BuOH se lavó con agua y se concentró a baja temperatura al vacío. El residuo se cristalizó en MeOH para proporcionar reb B. (Kohda, H., Kasai, R., Yamasaki, K., Murakami, K. y Tanaka, O. (1976) New sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry* 15, 981-983). Los procesos descritos pueden ser adecuados para la preparación a escala de laboratorio de reb B, pero son poco adecuados para cualquier preparación a gran escala o de reb comercial B.

Ahmed *et.al.*, usaron una hidrólisis alcalina suave de reb A para preparar reb B de acuerdo con el procedimiento descrito, se hidrolizó reb A hasta reb B, por reflujo con KOH acuoso al 10 % a 100 °C durante 1 hora. Después de la neutralización con ácido acético glacial, la sustancia precipitada se recrystalizó dos veces en metanol (Ahmed M.S., Dobberstein R.H., y Farnsworth N.R. (1980) *Stevia rebaudiana*: I. Use of p-bromophenacyl bromide to enhance ultraviolet detection of water-soluble organic acids (steviolbioside and rebaudioside B) in high-performance liquid chromatographic analysis, *J. Chromatogr.*, 192, 387-393). El uso de metanol como medio de recrystalización requerirá su posterior eliminación del producto. Se observa que el manejo de sustancias tóxicas tales como el metanol requiere instalaciones de fabricación especializadas y, cuando se aplica en el procesamiento de alimentos, medidas de seguridad alimentaria sofisticadas.

El documento US 2007/0116836 describe composiciones edulcorantes funcionales para el tratamiento y/o prevención de la osteoporosis. El documento US 2010/0316782 describe composiciones que incluyen rebaudiósido D, procesos para producir rebaudiósido D y formulaciones que proporcionan proporciones de rebaudiosido A a rebaudiósido D para disminuir el regusto del rebaudiósido A. El documento US 2010/0112154 describe el esteviósido altamente purificado y el rebaudiósido A preparados a partir de extractos de glucósidos dulces obtenidos de las hojas de *Stevia rebaudiana* Bertoni.

También se observa que no se ha realizado ningún trabajo significativo para determinar el potencial de reb B como edulcorante o ingrediente alimentario. Además, el reb B a menudo se considera un artefacto del proceso y una impureza innecesaria en las preparaciones comerciales de glicósidos de esteviol. No se ha realizado ninguna evaluación significativa de la influencia del reb B en el perfil de sabor general de las preparaciones de glucósidos de esteviol.

Por otro lado, se informa que la solubilidad en agua del reb B es aproximadamente del 0,1 % (Kingham A.D. (2002) *Constituents of Stevia rebaudiana* In *Stevia: The genus Stevia*, Kinghorn A.D. (Ed), Taylor & Francis, Londres, pág. 8). En muchos procesos alimentarios en los que se usan ingredientes altamente concentrados, será necesaria una forma altamente soluble de reb B.

Teniendo en cuenta los hechos mencionados anteriormente, es necesario evaluar el reb B como edulcorante e ingrediente alimentario y desarrollar un proceso simple y eficiente para preparaciones de reb B de calidad alimentaria adecuadas para aplicaciones alimentarias.

Dentro de la presente descripción, los investigadores mostrarán que, cuando se aplica de manera específica, el reb B puede afectar el perfil de sabor y ofrecer ventajas significativas para el uso de edulcorantes de estevia en diversas aplicaciones.

Sumario

La presente invención está dirigida a superar las desventajas de los edulcorantes de estevia existentes. La invención describe un proceso de producción de una composición de rebaudiósido B a partir del extracto de la planta de *Stevia rebaudiana* Bertoni, como se caracteriza por las reivindicaciones adjuntas.

En el presente documento también se describe un ingrediente que comprende glucósidos de esteviol de la planta de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Los glucósidos de esteviol se seleccionan del grupo que consiste en esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, dulcósido A, esteviolbiosido, rubusósido, así como otros glucósidos de esteviol que se encuentran en la planta de *Stevia rebaudiana* Bertoni y mezclas de los mismos.

También se describe en el presente documento un proceso de producción de un ingrediente que contiene rebaudiósido B, y esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, dulcósido A,

esteviolbósido, rubusósido, así como otros glucósidos de esteviol que se encuentran en la planta de *Stevia rebaudiana* Bertoni y mezclas de los mismos.

En la invención, el rebaudiósido A comercializado por PureCircle Sdn. Bhd. (Malasia), que contiene, rebaudiósido A (aproximadamente 95-100 %), esteviósido (aproximadamente 0-1 %), rebaudiósido C (aproximadamente 0-1 %), rebaudiósido F (aproximadamente 0-1 %), rebaudiósido B (aproximadamente 0,1-0,8 %), rebaudiósido D (aproximadamente 0-1 %) y otros glucósidos que representan un contenido total de glucósidos de esteviol de al menos el 95 %, se usó como material de partida. Como alternativa, se pueden usar extractos de estevia con diferentes relaciones de glucósidos de esteviol como materiales de partida.

El material de partida se sometió a conversión parcial en reb B en condiciones de pH elevado en medios acuosos libres de cualquier co-disolvente, incluidos los alcoholes tóxicos. Las mezclas de glucósidos obtenidas se usaron "tal como están" y se recuperó el reb B y se usó como un ingrediente puro.

La baja solubilidad reb B y sus mezclas se sometieron a un tratamiento térmico adicional para aumentar la solubilidad.

Los productos obtenidos se aplicaron en diversos alimentos y bebidas como edulcorantes, potenciadores de edulcorantes y modificadores del sabor, incluidos refrescos, helado, galletas, pan, zumos de frutas, productos lácteos, productos horneados y productos de confitería.

Breve descripción de los dibujos

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

La Figura 1 muestra la estructura química del rebaudiósido A.

La Figura 2 muestra la estructura química del rebaudiósido B.

La Figura 3 muestra un cromatograma de HPLC de una composición de estevia que comprende rebaudiósido A y rebaudiósido B.

Descripción detallada de la invención

Las ventajas de la presente invención se harán más evidentes a partir de la descripción detallada que se proporciona en lo sucesivo en este documento.

El rebaudiósido A comercializado por PureCircle Sdn. Bhd. (Malasia), que contiene, rebaudiósido A (aproximadamente 95-100 %), esteviósido (aproximadamente 0-1 %), rebaudiósido C (aproximadamente 0-1 %), rebaudiósido D (aproximadamente 0-1 %), rebaudiósido F (aproximadamente 0-1 %), rebaudiósido B (aproximadamente 0,1-0,8 %) y otros glucósidos que representan un contenido total de glucósidos de esteviol de al menos el 95 %, se usó como material de partida. Como alternativa, se pueden usar extractos de estevia con diferentes relaciones de glucósidos de esteviol como materiales de partida.

El experto en la materia apreciará que el término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, abarca los valores explícitamente mencionados, así como pequeñas desviaciones de los mismos. En otras palabras, un contenido de "aproximadamente el 95 %" no tiene que ser exactamente la cantidad mencionada del 95 %, pero puede diferir en varios porcentajes, por lo que incluye por ejemplo el 92 %, 93 %, 94 %, 96 %, 97 % o 98 %. El experto en la materia es consciente de que dichos valores son valores relativos que no requieren una precisión completa siempre que los valores correspondan aproximadamente a los valores mencionados. En consecuencia, una desviación del valor mencionado, por ejemplo, del 15 %, más preferentemente del 10 %, y lo más preferentemente del 5 %, está abarcada por el término "aproximadamente".

El análisis de HPLC de las materias primas y los productos se realizó en un cromatógrafo de líquidos de la Serie 1200 de Agilent Technologies (EE. UU.), equipado con columna Phenomenex Prodigy ODS3 de 5 µm (4,6 X 250 mm) a 40 °C. La fase móvil fue una mezcla 32:68 de acetonitrilo y 10 mmol/l de tampón de fosfato de sodio (aproximadamente pH 2,6) a 1 ml/min. Se usó un detector de conjunto de diodos a 210 nm como detector.

En la invención, el reb A se dispersó en una solución acuosa alcalina. La concentración de reb A es de aproximadamente 0-50 % (p/v), preferentemente aproximadamente de 10-25 %. El experto en la materia apreciará que estos intervalos incluyen todos los valores que pertenecen a los intervalos explícitamente mencionados, tal como por ejemplo, 5-40 %, 12,5-20 % o 15-17,5 %. Los agentes alcalinos preferentes incluyen KOH y NaOH, sin embargo, también se pueden usar otros agentes capaces de aumentar el pH del medio por encima de aproximadamente pH 7. La concentración de agentes alcalinos fue de aproximadamente 0,05-2,0 M, preferentemente de aproximadamente 0,1-1,0 M. Es evidente para los expertos en la materia que estos intervalos incluyen todos los valores que pertenecen a los intervalos explícitamente mencionados, tal como por ejemplo, 0,15-0,75 M, 0,2-0,5 M o 0,3-0,4 M. La mezcla se incubó a 30-100 °C, durante un período de 0,5-48 horas, preferentemente de aproximadamente 1-24 horas. De nuevo,

los expertos en la materia aprecian que estos intervalos incluyen todos los valores que pertenecen a los intervalos explícitamente mencionados, tal como por ejemplo, 40-80 °C o 55-75 °C así como, por ejemplo, 1-40 horas, 2-35 horas, 5-30 horas, 10-25 horas pero también 12-48 horas, 20-48 horas, 30-48 horas y 1-24 horas, 1-12 horas, 1-6 horas etc. Como resultado, reb A se hidroliza a reb. B. El rendimiento molar de conversión de reb B es de aproximadamente 5-100 %, preferentemente de aproximadamente 10-90 %.

Después de la reacción, el agente alcalino se neutraliza con un ácido, preferentemente con ácido sulfúrico o ácido ortofosfórico hasta que se alcanza un pH de 3,0-4,0. Antes de ajustar el pH, o simultáneamente, la mezcla se enfría a aproximadamente 10-30 °C, incluyendo este intervalo, por ejemplo, 15-25 °C y 18-22 °C. Tras la neutralización, se forma un precipitado. El precipitado se separa mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como filtración o centrifugación, y se lava con agua hasta que el agua alcanza un pH de aproximadamente 4,0-5,0. El material cristalino obtenido se seca al vacío a aproximadamente 60-105 °C para producir una mezcla de reb A y reb B con una relación de aproximadamente 5 %:95 % a aproximadamente 95 %:5 %, preferentemente de aproximadamente 50 %:50 % a aproximadamente 90 %:10 %. De nuevo, los expertos en la materia aprecian que estos intervalos incluyen todos los valores que pertenecen a los intervalos explícitamente mencionados, tal como por ejemplo 70-95 °C o 75-85 °C, así como, por ejemplo, relaciones de 10-80 % a 80-10 % o 20-70 % a 70-20 %, etc.

En otra realización, el precipitado separado se suspende en agua y la mezcla se somete a agitación continua durante aproximadamente 0,5-24 horas, preferentemente aproximadamente 1-3 horas, a aproximadamente 50-100 °C, preferentemente aproximadamente 60-80 °C. La relación de precipitado a agua (p/v) es de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:20, preferentemente de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:15. Los cristales lavados se separan y se secan al vacío a aproximadamente 60-105 °C para producir reb B con una pureza de aproximadamente el 99 %. Estos intervalos incluyen también, por ejemplo, 2-12 horas o 5-10 horas de suspensión; secado al vacío a 70-100 °C u 80-90 °C, etc., como será evidente para el experto en la materia.

En una realización, las composiciones obtenidas tienen una solubilidad en agua inferior a aproximadamente el 0,2 % (p/v). Las composiciones se combinaron con el agua en una relación de aproximadamente 1:1 (p/p) y la mezcla obtenida se sometió adicionalmente a un tratamiento térmico por gradiente que dio como resultado una solución de alta estabilidad y alta concentración. El gradiente de aproximadamente 1 °C por minuto se usó para calentar la mezcla. La mezcla se calentó a la temperatura de aproximadamente 110-140 °C, preferentemente de aproximadamente 118-125 °C y se mantuvo a la temperatura máxima durante aproximadamente 0-120 minutos, preferentemente aproximadamente 50-70 minutos. Después del tratamiento térmico, la solución se enfrió a temperatura ambiente con un gradiente de aproximadamente 1 °C por minuto. De nuevo, el experto en la materia apreciará que el gradiente también puede ser de, por ejemplo, 1,1 °C por minuto o 0,9 °C por minuto, etc. La solución se secó por pulverización mediante un secador de pulverización de laboratorio que funcionaba a una entrada de aproximadamente 175 °C y temperaturas de salida de aproximadamente 100 °C. Se obtuvo una forma amorfa de la composición con más de aproximadamente el 20 % de solubilidad en agua a temperatura ambiente.

Las composiciones se pueden usar como potenciador del dulzor, potenciador del sabor y edulcorante en diversos alimentos y bebidas. Ejemplos no limitantes de alimentos y bebidas incluyen bebidas carbonatadas, bebidas listas para tomar, bebidas energéticas, bebidas isotónicas, bebidas bajas en calorías, bebidas sin calorías, bebidas deportivas, té, zumos de fruta y verdura, zumos, bebidas lácteas, bebidas de yogur, bebidas alcohólicas, bebidas en polvo, productos de repostería, galletas, bollos, mezclas para hornear, cereales, productos de confitería, golosinas, toffees, gomas de mascar, productos lácteos, leche aromatizada, yogures, yogures aromatizados, leche cultivada, salsa de soja y otros productos a base de soja, aderezos para ensaladas, mayonesa, vinagre, postres congelados, productos cárnicos, productos cárnicos de pescado, alimentos embotellados y enlatados, edulcorantes de mesa, frutas y verduras.

Además, las composiciones se pueden usar en preparaciones farmacológicas o farmacéuticas y cosméticos, que incluyen, pero sin limitación, pasta de dientes, enjuague bucal, jarabe para la tos, comprimidos masticables, grageas, preparaciones de vitaminas y similares.

Las composiciones se pueden usar "tal como están" o en combinación con otros edulcorantes, sabores e ingredientes alimentarios.

Ejemplos no limitantes de edulcorantes incluyen glucósidos de esteviol, esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, dulcósido A, esteviolbósido, rubusósido, así como otros glucósidos de esteviol que se encuentran en la planta de *Stevia rebaudiana* Bertoni y mezclas de los mismos, extracto de estevia, extracto de Luo Han Guo, mogrósidos, jarabe de maíz de alto contenido en fructosa, jarabe de maíz, azúcar invertida, fructooligosacáridos, inulina, inulooligosacáridos, azúcar de acoplamiento, maltooligosacáridos, maltodextrinas, sólidos de jarabe de maíz, glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa, aspartamo, sacarina, sucralosa, alcoholes de azúcar.

Ejemplos no limitantes de sabores incluyen limón, naranja, fruta, plátano, uva, pera, piña, almendra amarga, cola, canela, azúcar, algodón de azúcar, sabores de vainilla.

Ejemplos no limitantes de otros ingredientes alimentarios incluyen sabores, acidulantes, compuestos orgánicos y aminoácidos, agentes colorantes, agentes de carga, almidones modificados, gomas, texturizantes, conservantes, antioxidantes, emulsionantes, estabilizantes, espesantes, agentes gelificantes.

5 Los siguientes ejemplos ilustran diversas realizaciones de la invención.

Ejemplo 1

Preparación de la composición de la estevia

10 100 g de rebaudiósido A producido por PureCircle Sdn. Bhd. (Malasia), que contiene, 98,1 % de rebaudiósido A, 0,3 % de esteviósido, 0,2 % de rebaudiósido C, 0,2 % de rebaudiósido F, 0,4 % de rebaudiósido B y 0,6 % de rebaudiósido D se dispersó en 1000 ml de KOH acuoso (1 M) y se incubó a 50 °C durante 2 horas. La temperatura de la mezcla se redujo a 20 °C y el pH se ajustó a pH 4,0 con ácido sulfúrico. La solución se mantuvo en condiciones de agitación moderada durante 4 horas y se formó un precipitado. El precipitado se filtró y se lavó sobre el filtro con 2000 ml de agua. Los cristales lavados se secaron al vacío para producir 86 g de material que contenía aproximadamente un 84 % de reb A y un 16 % de reb B. La solubilidad en agua (a 25 °C) del material obtenido fue de aproximadamente un 0,2 % (p/v).

Ejemplo 2

Preparación de la composición de la estevia

25 100 g de rebaudiósido A producido por PureCircle Sdn. Bhd. (Malasia), que contiene, 98,1 % de rebaudiósido A, 0,3 % de esteviósido, 0,2 % de rebaudiósido C, 0,2 % de rebaudiósido F, 0,4 % de rebaudiósido B y 0,6 % de rebaudiósido D se dispersó en 1000 ml de KOH acuoso (1 M) y se incubó a 80 °C durante 5 horas. La temperatura de la mezcla se redujo a 20 °C y el pH se ajustó a aproximadamente pH 4,0 con ácido sulfúrico. La solución se mantuvo en condiciones de agitación moderada durante 4 horas y se formó un precipitado. El precipitado se filtró y se lavó sobre el filtro con 2000 ml de agua. Los cristales lavados se secaron al vacío para producir 75 g de material que contenía aproximadamente un 9 % de reb A y un 91 % de reb B. La solubilidad en agua (a 25 °C) del material obtenido fue de aproximadamente un 0,1 % (p/v).

Ejemplo 3

Preparación de la composición de la estevia

40 100 g de rebaudiósido A producido por PureCircle Sdn. Bhd. (Malasia), que contiene, 98,1 % de rebaudiósido A, 0,3 % de esteviósido, 0,2 % de rebaudiósido C, 0,2 % de rebaudiósido F, 0,4 % de rebaudiósido B y 0,6 % de rebaudiósido D se dispersó en 1000 ml de KOH acuoso (1 M) y se incubó a 80 °C durante 7 horas. La temperatura de la mezcla se redujo a 20 °C y el pH se ajustó a aproximadamente pH 4,0 con ácido sulfúrico. La solución se mantuvo en condiciones de agitación moderada durante 3-4 horas y se formó un precipitado. El precipitado se filtró y se lavó sobre el filtro con 2000 ml de agua. Los cristales lavados se secaron al vacío para producir aproximadamente 71 g de material que contenía aproximadamente un 99,1 % de reb B. La solubilidad en agua (a 25 °C) del material obtenido fue de aproximadamente un 0,1 % (p/v).

Ejemplo 4

Preparación de la composición de la estevia

50 75 g del material preparado de acuerdo con el Ejemplo 2 se suspendieron en 1000 ml de agua. La temperatura de la mezcla se aumentó a 70 °C. La suspensión se mantuvo en condiciones de agitación moderada durante 4 horas. Los cristales se filtraron y se secaron al vacío para producir aproximadamente 65 g de material que contenía aproximadamente un 99,0 % de reb B. La solubilidad en agua (a 25 °C) del material obtenido fue de aproximadamente un 0,1 % (p/v).

Ejemplo 5

Preparación de la composición de la estevia soluble

60 50 g del material preparado de acuerdo con el Ejemplo 1 se mezclaron con 50 g de agua y se incubaron en un baño de aceite termostatzado. La temperatura se aumentó a 1 °C por minuto hasta 121 °C. La mezcla se mantuvo a 121 °C durante 1 hora y luego la temperatura se redujo a temperatura ambiente (25 °C) a 1 °C por minuto. La solución se secó usando un secador de pulverización de laboratorio YC-015 (Shanghai Pilotech Instrument & Equipment Co. Ltd., China) que funciona a una entrada de 175 °C y una temperatura de salida de 100 °C. Se obtuvieron aproximadamente 65 47 g de un polvo amorfo con una solubilidad en agua (a 25 °C) de aproximadamente un 25 % (p/v).

Ejemplo 6

Preparación de la composición de la estevia soluble

- 5 42 g de reb A producido por PureCircle Sdn. Bhd. (Malasia) con una pureza del 99,2 % (base seca) y 8 g de reb B preparado de acuerdo con el Ejemplo 4 se mezclaron con 50 g de agua y se incubaron en un baño de aceite termostatzado. La temperatura se aumentó a 1 °C por minuto hasta 121 °C. La mezcla se mantuvo a 121 °C durante 1 hora y luego la temperatura se redujo a temperatura ambiente (25 °C) a 1 °C por minuto. La solución se secó usando un secador de pulverización de laboratorio YC-015 (Shanghai Pilotech Instrument & Equipment Co. Ltd., China) que funciona a una entrada de 175 °C y una temperatura de salida de 100 °C. Se obtuvieron aproximadamente 48 g de un polvo amorfo con una solubilidad en agua (a 25 °C) de aproximadamente un 1,5 % (p/v).

Ejemplo 7

- 15 Bebida de zumo de naranja baja en calorías

Concentrado de naranja (35 %), ácido cítrico (0,35 %), ácido ascórbico (0,05 %), color rojo anaranjado (0,01 %), sabor a naranja (0,20 %) y 0,05 % de composición de estevia, se mezclaron y disolvieron completamente en agua (hasta el 100 %) y se pasteurizó. La composición de estevia se seleccionó de un extracto de estevia comercial (que contiene 26 % de esteviósido, 55 % de rebaudiósido A y 16 % de otros glucósidos), un rebaudiósido A comercial (que contiene 98,2 % de reb A) o el material obtenido de acuerdo con el Ejemplo 5.

Las evaluaciones sensoriales de las muestras se resumen en la Tabla 1. Los datos muestran que los mejores resultados se pueden obtener usando la composición obtenida de acuerdo con el Ejemplo 5. En particular, las bebidas preparadas con dicha composición mostraron un perfil de sabor y sensación en boca redondeados y completos.

Tabla 1

Evaluación de las muestras de zumo de naranja			
Muestra	Comentarios		
	Sabor	Regusto	Sensación en boca
Extracto de estevia	Dulce, notas de regaliz	Amargor y regusto	Inaceptable
Reb A	Dulce, ligeras notas de regaliz	Ligero amargor y regusto	Inaceptable
Ejemplo 5	Dulzor de alta calidad, sabor agradable similar a la sacarosa, sabor redondeado y equilibrado	Limpio, sin amargor y sin regusto	Completa

El mismo método se puede usar para preparar zumos y bebidas de zumo de otras frutas, tal como manzanas, limones, albaricoques, cerezas, piñas, mangos, etc.

Ejemplo 8

Bebida carbonatada sin calorías

- 35 Se preparó una bebida carbonatada de acuerdo con la fórmula presentada a continuación.

Ingredientes	Cantidad, %		
	Extracto de estevia	Reb A	Ejemplo 5
Sabor a cola	0,340	0,340	0,340
Ácido ortofosfórico	0,100	0,100	0,100
Citrato de sodio	0,310	0,310	0,310
Benzoato de sodio	0,018	0,018	0,018
Ácido cítrico	0,018	0,018	0,018
Composición de la estevia	0,050	0,050	0,050
Agua carbonatada	hasta el 100	hasta el 100	hasta el 100

Las propiedades sensoriales fueron evaluadas por 20 expertos. Los resultados se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2

Evaluación de muestras de bebidas carbonatadas sin calorías			
Atributo del sabor	Número de expertos que detectaron el atributo		
	Extracto de estevia	Reb A	Ejemplo 5
Sabor amargo	15	10	0
Sabor astringente	16	9	0
Regusto	14	12	0
Comentarios			
Calidad del sabor dulce	Regusto amargo (15 de 20)	Regusto amargo (10 de 20)	Limpio (20 de 20)
Evaluación global	Satisfactorio (1 de 20)	Satisfactorio (5 de 20)	Satisfactorio (20 de 20)

Los resultados anteriores muestran que las bebidas preparadas usando la composición obtenida de acuerdo con el Ejemplo 5 poseían las mejores características organolépticas.

5

Ejemplo 9

Galletas dietéticas

10 Harina (50,0 %), margarina (30,0 %), fructosa (10,0 %), maltitol (8,0 %), leche entera (1,0 %), sal (0,2 %), levadura en polvo (0,15 %), vainilla (0,1 %) y diferentes composiciones de estevia (0,03 %) se amasaron bien en una máquina mezcladora de masa. La masa obtenida se moldeó y se coció en horno a 200 °C durante 15 minutos. Las composiciones de estevia se seleccionaron de un extracto de estevia comercial (que contiene 26 % de esteviósido, 55 % de rebaudiósido A y 16 % de otros glucósidos), un rebaudiósido A comercial (que contiene 98,2 % de reb A) y material obtenido de acuerdo con el Ejemplo 5.

15

Las propiedades sensoriales fueron evaluadas por 20 expertos. Los mejores resultados se obtuvieron en muestras que contenían la composición obtenida de acuerdo con el Ejemplo 5. Los expertos notaron un perfil de sabor redondeado y completo y una sensación en boca.

20

Ejemplo 10

Yogur

25 Diferentes composiciones de estevia (0,03 %) y sacarosa (4 %) se disolvieron en leche baja en grasa. Las composiciones de estevia se seleccionaron de un extracto de estevia comercial (que contiene 26 % de esteviósido, 55 % de rebaudiósido A y 16 % de otros glucósidos), un rebaudiósido A comercial (que contiene 98,2 % de reb A) y el material obtenido de acuerdo con el Ejemplo 5. Después de pasteurizar a 82 °C durante 20 minutos, la leche se enfrió a 37 °C. Se añadió un cultivo iniciador (3 %) y la mezcla se incubó a 37 °C durante 6 horas y luego a 5 °C durante 12 horas.

30

Las propiedades sensoriales fueron evaluadas por 20 expertos. Los mejores resultados se obtuvieron en muestras que contenían la composición obtenida de acuerdo con el Ejemplo 5. Los expertos notaron un perfil de sabor redondeado y completo y una sensación en boca.

35

REIVINDICACIONES

1. Un proceso de producción de una composición de rebaudiósido B, que comprende las etapas de:

- 5 proporcionar un edulcorante de estevia que comprende rebaudiósido A;
proporcionar una solución acuosa alcalina libre de cualquier co-disolvente;
hidrolizar el rebaudiósido A a rebaudiósido B dispersando el edulcorante de estevia en la solución alcalina e
incubando durante 0,5 a 48 horas a 30-100 °C para formar una mezcla;
enfriar la mezcla a 10-30 °C y ajustar el pH con ácido a pH 3,0-4,0;
10 incubar la mezcla a baja temperatura para obtener un precipitado;
separar el precipitado y lavarlo con agua;
secar el precipitado lavado para obtener la composición de rebaudiósido B.

2. El proceso de la reivindicación 1, que comprende además las etapas de:

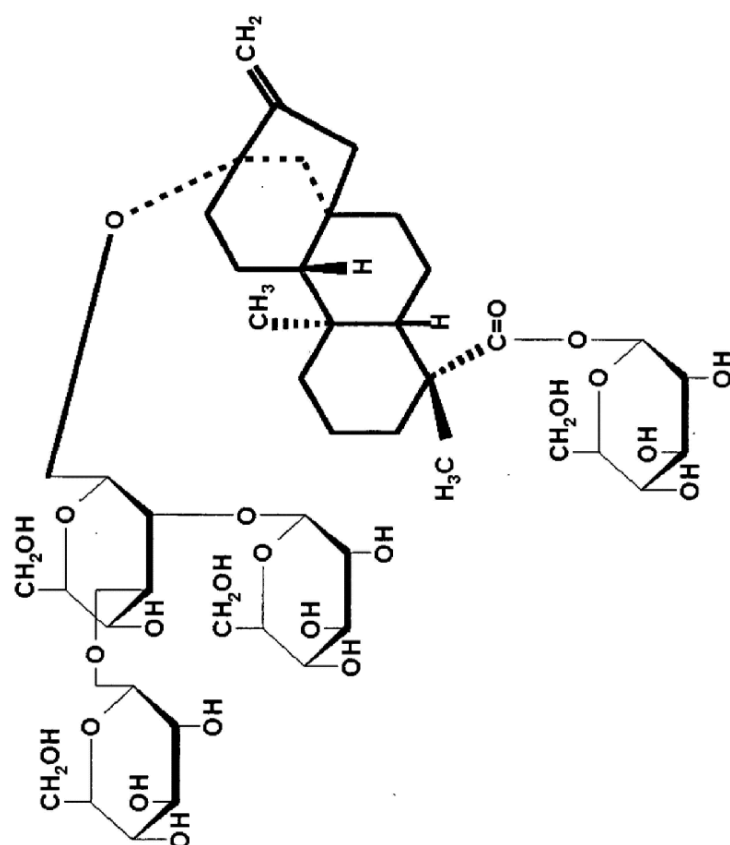
- 15 suspender la composición de rebaudiósido B en agua e incubar a 50-100 °C durante 0,5-24 horas;
separar la composición de rebaudiósido B del agua y secar la composición de rebaudiósido B para obtener una
composición de rebaudiósido B purificada;
en el que la composición de rebaudiósido B purificada comprende rebaudiósido B con una pureza superior al 99
20 %.

3. El proceso de la reivindicación 1 o 2, que comprende además las etapas de:

- 25 suspender la composición de rebaudiósido B en agua para formar una suspensión;
aumentar la temperatura de la suspensión mediante un método de calentamiento por gradiente;
mantener la suspensión a 110-140 °C;
disminuir la temperatura de la suspensión mediante un método de enfriamiento por gradiente para obtener una
solución de composición de rebaudiósido B de alta estabilidad y alta concentración; y
secar por pulverización la solución de composición de rebaudiósido B de alta estabilidad y alta concentración para
30 proporcionar un polvo de composición de rebaudiósido B amorfo y altamente soluble.

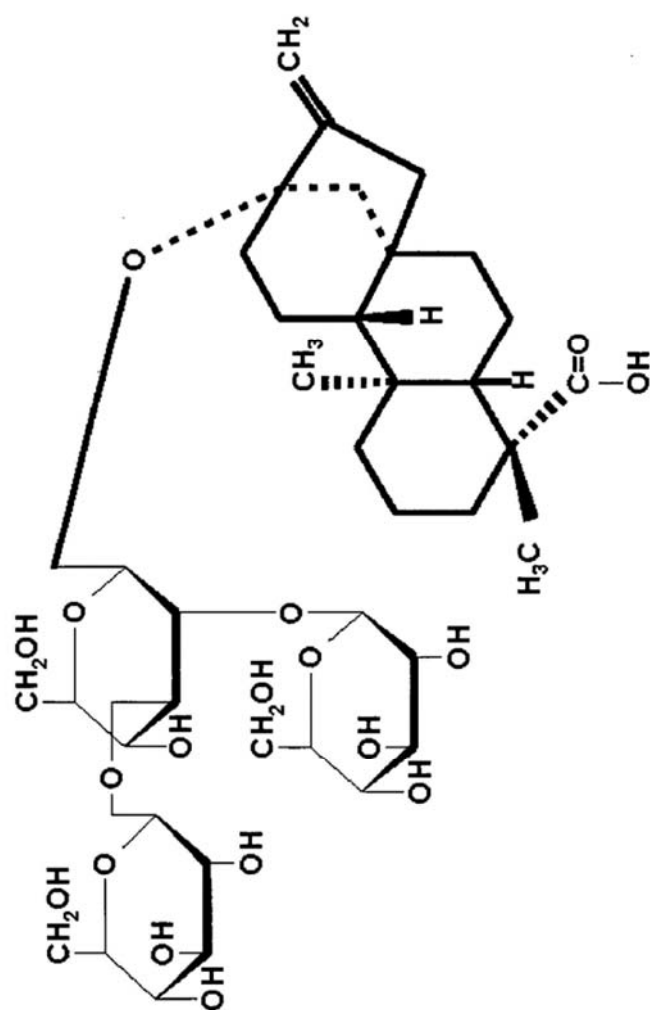
4. El proceso de la reivindicación 3, en el que la composición de rebaudiósido B comprende una mezcla de rebaudiósido A y rebaudiósido B en una relación de 5 %:95 % a 95 %:5 % (p/p).

FIG. 1



Rebaudiósido A

FIG. 2



Rebaudiósido B

FIG. 3

