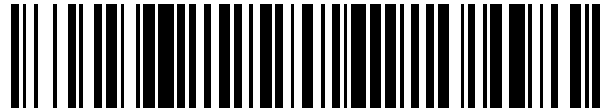


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 727 268**

51 Int. Cl.:

A61K 36/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.08.2012 PCT/US2012/052665**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013 WO13058871**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2012 E 12841259 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2019 EP 2768320**

54 Título: **Composición de glucosil estevia**

30 Prioridad:

19.10.2011 US 201161548818 P
26.12.2011 US 201161580274 P
06.08.2012 US 201213567707

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.10.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MARKOSYAN, AVETIK

74 Agente/Representante:

PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén

ES 2 727 268 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 glucosil estevia

5 **Campo De La Invención**

La invención se refiere a un proceso para producir un ingrediente alimenticio altamente purificado a partir del extracto de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni. El ingrediente alimenticio altamente purificado se usa en diversos productos alimentarios y bebidas.

10

Descripción De La Técnica Relacionada

En la actualidad, las alternativas de los azúcares están recibiendo una atención creciente debido al conocimiento de numerosas enfermedades relacionadas con el consumo de alimentos y bebidas de alto contenido en azúcares. Sin embargo, en algunos países se han prohibido o restringido numerosos edulcorantes artificiales tales como dulcina, ciclamato sódico, y sacarina debido a preocupaciones sobre su seguridad. Por lo tanto, los edulcorantes no calóricos de origen natural están ganando una popularidad creciente. La hierba dulce *Stevia rebaudiana* Bertoni produce una diversidad de glicósidos de diterpeno que presentan una dulzura de alta intensidad y propiedades sensoriales superiores con respecto a las de muchos otros edulcorantes de alta potencia.

15

20

Los glicósidos dulces mencionados anteriormente tienen una aglicona común, el esteviol, y difieren en el número y el tipo de restos de carbohidrato en las posiciones C13 y C19. Las hojas de la estevia son capaces de acumular hasta un 10-20 % (basado en el peso en seco) de glicósidos de esteviol. Los principales glicósidos encontrados en las hojas de la estevia son Rebaudiósido A (2-10 %), Esteviósido (2-10 %), y Rebaudiósido C (1-2 %). Otros glicósidos tales como Rebaudiósido B, D, E, y F, Esteviolbósido y Rubusósido se encuentran a niveles mucho menores (aprox. 0-0,2 %).

25

Dos glicósidos principales - Esteviósido y Rebaudiósido A, se han estudiado y caracterizado exhaustivamente en lo que respecta a su idoneidad como edulcorantes de alta intensidad comerciales. Estudios de estabilidad en bebidas carbonatadas han confirmado su estabilidad térmica y de pH (Chang S.S., Cook, J.M. (1983) Stability studies of stevioside and Rebaudioside A in carbonated beverages. J. Agric. Food Chem. 31: 409-412).

30

Los glicósidos de esteviol difieren entre sí no solo en su estructura molecular, sino también en sus propiedades de sabor. Habitualmente, se ha descubierto 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 Rebaudiósido A es 30 veces más dulce que la sacarosa. El Rebaudiósido A tiene el regusto menos astringente, menos amargo, y menos persistente, poseyendo de ese modo los atributos sensoriales más favorables de los principales glicósidos 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).

35

40

Se describen métodos para la extracción y purificación de glicósidos dulces de la planta *Stevia rebaudiana* usando agua o disolventes orgánicos, por ejemplo, en los documentos de Patente de Estados Unidos con números 4.361.697; 4.082.858; 4.892.938; 5.972.120; 5.962.678; 7.838.044 y 7.862.845.

45

Sin embargo, incluso en un estado altamente purificado, los glicósidos de esteviol todavía poseen atributos de sabor indeseables tales como amargura, regusto dulce, sabor a regaliz, etc. Uno de los principales obstáculos para la comercialización con éxito de los edulcorantes de estevia son estos atributos de sabor indeseables. Se ha mostrado que estas notas de sabor se vuelven más destacadas a medida que aumenta la concentración de glicósidos 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).

50

Algunas de estas propiedades indeseables se pueden reducir o eliminar sometiendo los glicósidos de esteviol a una reacción de transglicosilación intermolecular, cuando se unen nuevos restos de carbohidrato a la molécula inicial en las posiciones C13 y C19. La calidad y la potencia del sabor de los compuestos variarán dependiendo del número de restos de carbohidrato en estas posiciones.

55

Se han usado pululanasa, isomaltasa (Lobov S.V., Jasai R., Ohtani K., Tanaka O. Yamasaki K. (1991) Enzymatic production of sweet stevioside derivatives: transglycosylation by glucosidases. Agric. Biol. Chem. 55: 2959-2965), β -galactosidasa (Kitahata S., Ishikawa S., Miyata T., Tanaka O. (1989) Production of rubusoside derivatives by transglycosylation of various β -galactosidase. Agric. Biol. Chem. 53: 2923-2928), y dextrano sacarasa (Yamamoto K., Yoshikawa K., Okada S. (1994) Effective production of glucosyl-stevioside by α -1,6-transglucosylation of dextran dextranase. Biosci. Biotech. Biochem. 58: 1657-1661) como enzimas de transglicosilación, junto con pululano, maltosa, lactosa y almidón parcialmente hidrolizado, respectivamente, como dadores de restos glicosídicos.

60

65

La transglicosilación de glicósidos de esteviol también se ha llevado a cabo por acción de ciclodextrina

glucanotransferasas (CGTasas) producidas por *Bacillus stearothermophilus* (documentos de Patente de Estados Unidos con números 4.219.571 y 7.807.206) y como resultado se han formado α -1,4-glucosil derivados con un grado de polimerización de hasta 10.

5 Además, se ha de observar que numerosos productos de glucosil estevia contienen hasta un 20 % de dextrinas e impurezas residuales, tales como diversos compuestos polifenólicos, compuestos flavonoides y sus glucosil derivados, etc. Estas mezclas no poseen propiedades funcionales significativas, reducen el contenido de glicósidos de esteviol en el producto, y algunas de ellas afectan al perfil de sabor de la preparación final.

10 La retirada de estas impurezas usando resinas adsorbentes poliméricas produce habitualmente productos con un contenido total de glicósidos de esteviol de hasta un 90 %, lo que significa que la técnica convencional de adsorción-desorción puede conseguir únicamente un aumento parcial del contenido total de glicósidos de esteviol. Las mezclas remanentes todavía afectan a las características sensoriales del producto final, lo que limita su uso en aplicaciones alimentarias.

15 Por lo tanto, es necesario desarrollar productos de glucosil estevia altamente purificados con el menor contenido de mezclas, que proporcionen la mejor combinación de potencia de dulzura y perfil de sabor.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

20 La presente invención tiene como objeto superar las desventajas de los edulcorantes de estevia existentes. La invención describe un proceso para producir un ingrediente alimenticio de alta pureza a partir del extracto de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni. El ingrediente alimenticio altamente purificado se usa en diversos productos alimentarios y bebidas como modificador de la dulzura y el sabor. Se describe un ingrediente que comprende
25 derivados glucosilados de glicósidos de esteviol de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni. Los glicósidos de esteviol se seleccionan entre el grupo que consiste en esteviósido, Rebaudiósido A, Rebaudiósido B, Rebaudiósido C, Rebaudiósido D, Rebaudiósido E, Rebaudiósido F, dulcósido A, esteviolbiósido, rubusósido, así como otros glicósidos de esteviol que se encuentran en la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni y las mezclas de los mismos.

30 La invención, en parte, se refiere a un proceso para producir un ingrediente que contiene formas glucosiladas de esteviósido, Rebaudiósido A, Rebaudiósido B, Rebaudiósido C, Rebaudiósido D, Rebaudiósido E, Rebaudiósido F, dulcósido A, esteviolbiósido, rubusósido, así como otros glicósidos de esteviol que se encuentran en la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni. El proceso puede ser un proceso de transglucosilación enzimática que usa CGTasas producidas por cultivos de *Bacillus stearothermophilus*. El proceso también puede tener una etapa de tratamiento enzimático
35 posterior a la transglucosilación que usa diversas glucosidasas. El proceso también puede tener las etapas de decolorar, desalar y retirar dextrinas y diversas impurezas. La decoloración se puede llevar a cabo usando carbón activado. La desalación se puede llevar a cabo mediante paso a través de resinas de intercambio iónico y/o filtros de membrana. La retirada de dextrinas e impurezas se puede llevar a cabo mediante paso a través de resina polimérica macroporosa.

40 En la invención, se usó como material de partida extracto de estevia comercializado por PureCircle (JiangXi) Co., Ltd. (China), que contiene esteviósido (28-30 %), Rebaudiósido A (50-55 %), Rebaudiósido C (9-12 %), Rebaudiósido F (1-3 %) y otros glicósidos que suman un contenido total de glicósidos de esteviol de al menos un 95 %. Alternativamente, se pueden usar como materiales de partida extractos de estevia con una proporción
45 diferente de glicósidos de esteviol, así como glicósidos de esteviol altamente purificados tales como Rebaudiósido A, esteviósido, Rebaudiósido D, rubusósido, etc.

50 El material de partida se sometió a la transglucosilación enzimática por acción de ciclodextrina glicosiltransferasa (CGTasa) en presencia de almidón como dador de glucosa. Como resultado, se formaron α -1,4-glucosil derivados del glicósido de esteviol inicial. A continuación, la mezcla de reacción se sometió a tratamiento con una α -amilasa para reducir el número de impurezas capaces de adsorberse en una resina adsorbente macroporosa en etapas de procesamiento adicionales.

55 Las impurezas de la mezcla de reacción obtenida se retiraron mediante la resina Amberlite XAD7 HP, y a continuación la mezcla de reacción purificada se decoloró, se desionizó, se concentró y se secó por pulverización.

Los productos obtenidos se aplicaron a diversos alimentos y bebidas como edulcorantes, potenciadores de edulcorante y modificadores de sabor, incluyendo helado, galletas, pan, zumos de fruta, productos lácteos, productos horneados y productos de confitería.

60 Se ha de entender que tanto la descripción general precedente como la descripción detallada siguiente son a modo de ejemplo y explicación y pretenden proporcionar una explicación adicional de la invención que se reivindica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

65 Sin dibujos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 Las ventajas de la presente invención serán más evidentes a partir de la descripción detallada que se ofrece en lo sucesivo en el presente documento.

10 Se usó como material de partida extracto de estevia comercializado por PureCircle (JiangXi) Co., Ltd. (China), que contiene esteviósido (28-30 %), Rebaudiósido A (50-55 %), Rebaudiósido C (9-12 %), Rebaudiósido F (1-3 %) y otros glicósidos (en lo sucesivo en el presente documento, colectivamente "glicósidos de esteviol") que suman un contenido total de glicósidos de esteviol de al menos un 95 %. Alternativamente, se pueden usar como materiales de partida extractos de estevia con una proporción diferente de glicósidos de esteviol, así como glicósidos de esteviol altamente purificados tales como Rebaudiósido A, esteviósido, Rebaudiósido D, rubusósido, etc.

15 El análisis por HPLC de las materias primas y los productos se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos Serie 1200 de Agilent Technologies (EE. UU.), equipado con una columna Zorbax-NH₂ (4,6 x 250 mm). La fase móvil fue un gradiente de acetonitrilo-agua de 80:20, v/v (0-2 min) a 50:50, v/v (2-70 min). Se usó como detector un detector de matriz de diodos ajustado a 210 nm.

20 El contenido total de glicósidos de esteviol se determinó de acuerdo con "α-Glucosyltransferase Treated Stevia", Japan's Specifications and Standards for Food Additives, 8ª edición, 2009. Pág. 257-258.

25 La transglucosilación se consiguió con ciclomaltodextrina glucanotransferasas (CGTasas; EC 2.4.1.19) producidas por *Bacillus stearothermophilus* St-88 (PureCircle Sdn Bhd Collection of Industrial Microorganisms - Malasia). Sin embargo, también se puede aplicar cualquier otra CGTasa o enzima que posea actividad de transglucosilación intermolecular. La enzima puede estar en forma de un caldo de cultivo sin células, un caldo de cultivo sin células líquido concentrado, un caldo de cultivo sin células secado por pulverización o liofilizado, o una proteína de alta pureza. Se pueden usar preparaciones enzimáticas libres e inmovilizadas.

30 La actividad de las preparaciones de CGTasa se determinó de acuerdo con el procedimiento descrito en Hale W.S., Rawlins LC. (1951) Amylase of *Bacillus macerans*. Cereal Chem. 28, 49-58.

Se pueden usar almidones de diferente origen como dadores de unidades glucosilo, tales como los obtenidos a partir de trigo, almidón, patata, tapioca, y sagú.

35 El almidón se sometió a hidrólisis parcial (licuefacción) antes de la reacción de transglucosilación. El equivalente en dextrosa del almidón parcialmente hidrolizado puede estar en el intervalo de aproximadamente 10-25, de forma preferente aproximadamente 12-16. Cualquier enzima capaz de hidrolizar almidón se puede usar para la licuefacción, tal como α-amilasas, β-amilasas, etc. En una realización, son preferentes las mezclas de CGTasa y α-amilasa como enzimas de licuefacción.

40 La actividad de α-amilasa se expresa en Unidades Kilo Novo (KNU) de α-amilasa. Una KNU es la cantidad de α-amilasa que, en condiciones estándar (pH 7,1; 37 °C), dextriniza 5,26 g de sustancia seca de almidón por hora.

45 La mezcla de licuefacción contiene aproximadamente 0,001-0,2 KNU, de forma preferente aproximadamente 0,05-0,1 KNU de α-amilasa por unidad de CGTasa.

50 El uso de α-amilasa en la licuefacción permite conseguir una mayor producción en la filtración con carbón activado adicional. Cuando la CGTasa se usa como la única encima de licuefacción, la velocidad de filtración es aproximadamente 10-15 l/h por m² de superficie de filtro. En el caso una mezcla de enzimas de licuefacción (que comprende α-amilasa y CGTasa), la velocidad de filtración es el doble de rápida - aproximadamente 20-30 l/h por m² de superficie de filtro.

55 La proporción de almidón y CGTasa en la mezcla de licuefacción es aproximadamente 0,1-0,5 unidades por gramo de almidón, de forma preferente aproximadamente 0,2-0,4 unidades por gramo.

La concentración de almidón en la mezcla de licuefacción es aproximadamente un 15-40 % (p/p), de forma preferente aproximadamente un 20-30 %.

60 La licuefacción se lleva a cabo a aproximadamente 70-90 °C durante aproximadamente 0,5-5 horas, de forma preferente aproximadamente 1-2 horas.

65 Después de la licuefacción, la mezcla de reacción se somete a inactivación térmica de α-amilasa en condiciones de pH bajo. El intervalo de pH preferente para la inactivación es aproximadamente de pH 2,5 a pH 3,0 y la temperatura preferente es aproximadamente 95-105 °C. La duración de la inactivación térmica es aproximadamente 5-10 minutos.

Después de la inactivación, el pH de la mezcla de reacción se ajusta a aproximadamente pH 5,5-6,5 y los glicósidos de esteviol se añaden a la mezcla y se disuelven. La proporción preferente de glicósidos de esteviol con respecto a almidón (kg de glicósidos de esteviol por kg de almidón) es aproximadamente 0,5-1,5, de forma preferente aproximadamente 0,8-1,2.

5 Se añade una segunda porción de preparación de CGTasa y la reacción de transglucosilación se lleva a cabo a aproximadamente 65 °C durante aproximadamente 24-48 horas. La cantidad de la segunda porción de CGTasa es aproximadamente 0,2-4 unidades de CGTasa por gramo de sólidos, de forma preferente aproximadamente 0,5-1,2 unidades por gramo de sólidos.

10 Tras la finalización de la reacción de transglucosilación, la reacción se detiene por calentamiento a aproximadamente 95 °C durante aproximadamente 15 minutos para inactivar la CGTasa, y la solución se trató con una segunda porción de α -amilasa de aproximadamente 0,01-0,2 KNU, se añadieron de forma preferente aproximadamente 0,05-0,1 KNU por gramo de sólidos y la reacción se continuó durante aproximadamente 12-16 horas a aproximadamente 55-95 °C, de forma preferente aproximadamente 65 °C. Se usó α -amilasa obtenida a partir de *Bacillus licheniformis* St-3501 (PureCircle Sdn Bhd Collection of Industrial Microorganisms - Malasia) en esta etapa. Sin embargo, también se pueden usar α -amilasas y otras glucosidasas obtenidas a partir de cualquier otra fuente.

20 Posteriormente, la mezcla de reacción se sometió a inactivación térmica de α -amilasa en condiciones de pH bajo. El intervalo de pH preferente para la inactivación es aproximadamente de pH 2,5 a pH 3,0 y la temperatura preferente es aproximadamente 95-105 °C. La duración de la inactivación térmica es aproximadamente 5-10 minutos. A continuación, la solución se trató con carbón activado para obtener una mezcla de reacción decolorada. La cantidad de carbón activado fue aproximadamente 0,02-0,4 gramos por gramo de sólidos, de forma preferente aproximadamente 0,05-0,2 gramos por gramo de sólidos.

La mezcla de reacción decolorada se desaló por paso a través de resinas de intercambio iónico, tales como Amberlite FPC23 (tipo H⁺) y Amberlite FPA51 (tipo OH⁻). Se pueden usar otros métodos de decoloración y desalación apropiados, tales como filtración con membrana, u otros métodos conocidos en la técnica.

30 La mezcla de reacción desalada se concentró además mediante un evaporador de vacío y se secó por medio de un secador por pulverización. Se pueden usar otros métodos de concentración y secado apropiados, tales como filtración con membrana, liofilización, u otros métodos conocidos en la técnica. El producto resultante contiene glicósidos no modificados, alfa-1,4-glucosil derivados e impurezas (Muestra 1).

35 Con el fin de preparar un producto con mayor contenido de glicósidos dulces totales (suma de glicósidos glicosilados y no glicosilados), se retiraron las impurezas usando Amberlite XAD7 HP antes del tratamiento de desalación. Los glicósidos de esteviol y sus derivados glicosilados se adsorbieron sobre la resina y posteriormente se eluyeron con etanol acuoso. El eluato de etanol acuoso resultante, que contenía los glicósidos de glucosil esteviol, se decoloró y se desaló posteriormente como se ha descrito anteriormente y la solución de glicósidos, después de la evaporación del disolvente de elución, se convirtió en polvo mediante secado por pulverización. El producto de glucosil estevia altamente purificado resultante contiene glicósidos no modificados, y α -1,4-glucosil derivados (Muestra 2).

45 Usando un proceso similar al de la Muestra 2, con la exclusión de la etapa de tratamiento de α -amilasa posterior a la transglucosilación, se preparó otro producto de glucosil estevia de alta pureza, que contenía glicósidos no modificados y α -1,4-glucosil derivados (Muestra 3).

La composición de las muestras se resume en la Tabla 1.

50

Tabla 1

Composición de muestras de glicósidos de glucosil esteviol			
Compuestos	Contenido, %		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Esteviósido	1,7	2,1	1,9
Rebaudiósido C	0,9	1,1	1,0
Rebaudiósido A	3,9	4,7	4,4
Monoglucosil-esteviósido (StevG1)	8,9	10,8	10,1
Monoglucosil-Rebaudiósido A (RebAG1)	11,8	14,3	13,2
Diglucozil-esteviósido (StevG2)	7,6	9,2	8,5

Diglucosil-Rebaudiósido A (RebAG2)	9,9	12,1	11,1
Triglucosil-esteviósido (StevG3)	6,1	7,3	6,7
Triglucosil-Rebaudiósido A (RebAG3)	7,2	8,5	7,9
Tetraglucosil-esteviósido (StevG4)	3,3	3,9	3,7
Tetraglucosil-Rebaudiósido A (RebAG4)	5,2	6,2	5,8
Derivados glucosilados superiores	13,9	16,9	15,6
Contenido total de glicósidos	80,4	97,1	89,9

La evaluación sensorial de las muestras se llevó a cabo usando soluciones acuosas, con 20 expertos. Basándose en la aceptación global, se eligieron las muestras más deseable y más indeseable. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

5

Tabla 2

Evaluación sensorial de muestras en sistema acuoso			
Juicio	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
La más deseable	2	13	5
La más indeseable	13	0	7
Potencia de dulzura	120	160	140
Comentarios	Dulce, ligeramente amarga, astringente, regusto persistente ligero, la aparición de la dulzura es lenta	Dulce, ligera, suave, redonda, agradable, similar a sacarosa, sin regusto persistente, la aparición de la dulzura es rápida	Dulce, ligeramente amarga, astringente, sin regusto persistente, la aparición de la dulzura es moderada

Como resulta evidente a partir de los resultados de la Tabla 2, la calidad de la dulzura de la Muestra 2 se calificó como la más superior. En general, las muestras con mayor contenido total de glicósidos de esteviol tuvieron un mejor perfil de sabor.

10

La Muestra 2 tuvo la mayor potencia de dulzura (160 veces más dulce en comparación con una solución de sacarosa al 5 %).

15

Las composiciones obtenidas se pueden usar como potenciadores de dulzura, potenciadores de sabor y edulcorantes en diversos productos alimentarios y bebidas. Algunos ejemplos de productos alimentarios y bebidas incluyen refrescos carbonatados, bebidas listas para beber, bebidas energéticas, bebidas isotónicas, bebidas bajas en calorías, bebidas con cero calorías, bebidas para deportistas, tés, zumos de frutas y verduras, bebidas de zumo, productos lácteos, bebidas de yogur, bebidas alcohólicas, bebidas en polvo, productos de panadería, galletas, magdalenas, mezclas de repostería, cereales, confitería, dulces, tofes, chicle, productos lácteos, leche de sabores, yogures, yogures de sabores, leche cultivada, salsa de soja y otros productos basados en soja, aderezo para ensaladas, mayonesa, vinagre, postres congelados, productos cárnicos, productos de carne de pescado, alimentos embotellados y enlatados, edulcorantes de mesa, frutas y verduras.

20

25

Además, las composiciones se pueden usar en preparaciones farmacológicas o farmacéuticas y cosméticos, incluyendo pasta dental, lavado bucal, jarabe para la tos, comprimidos masticables, grageas, preparaciones de vitaminas.

30

Las composiciones se pueden usar "como tales" o en combinación con otros edulcorantes, sabores e ingredientes alimenticios.

35

Algunos ejemplos de edulcorantes incluyen glicósidos de esteviol, esteviósido, Rebaudiósido A, Rebaudiósido B, Rebaudiósido C, Rebaudiósido D, Rebaudiósido E, Rebaudiósido F, dulcósido A, esteviolbósido, rubusósido, así como otros glicósidos de esteviol que se encuentran en la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni y las mezclas de los mismos, extracto de estevia, extracto de Luo Han Guo, mogrósidos, jarabe de maíz con alto contenido en fructosa, jarabe de maíz, azúcar invertido, fructooligosacáridos, inulina, inulooligosacáridos, azúcar de acoplamiento, maltooligosacáridos, maltodextrinas, sólidos de jarabe de maíz, glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa, aspartamo, sacarina, sucralosa, azúcares alcohólicos.

Algunos ejemplos de sabores incluyen sabores de limón, naranja, fruta, plátano, uva, pera, piña, almendra amarga, cola, canela, azúcar, dulce de algodón, vainilla.

- 5 Algunos ejemplos de otros ingredientes alimenticios incluyen sabores, acidulantes, ácidos orgánicos y aminoácidos, agentes colorantes, agentes de carga, almidones modificados, gomas, texturizantes, conservantes, antioxidantes, emulgentes, estabilizantes, espesantes, agentes gelificantes.

- 10 Los siguientes ejemplos ilustran diversas realizaciones de la invención. Se ha de entender que la invención no se limita a los materiales, proporciones, condiciones y procedimientos expuestos en los ejemplos, que son solo ilustrativos.

EJEMPLO 1

- 15 Preparación de CGTasa

Se inoculó una cepa de *Bacillus stearothermophilus* St-88 en 2.000 litros de medio de cultivo esterilizado que contenía un 1,0 % de almidón, un 0,25 % de extracto de maíz, un 0,5 % de (NH₄)₂SO₄, y un 0,2 % de CaCO₃ (pH 7,0-7,5) a 56 °C durante 24 h con aireación (2.000 l/min) y agitación (150 rpm) continuas. El caldo de cultivo obtenido se filtró usando una membrana cerámica Kerasep de 0,1 µm (Novasep, Francia) para separar las células. El permeato sin células se concentró adicionalmente 2 veces en ultrafiltros Persep de 10 kDa (Orelis, Francia). La actividad de la enzima se determinó de acuerdo con Hale, Rawlins (1951). Se obtuvo una preparación enzimática en bruto con una actividad de aproximadamente 2 unidades/ml.

- 25 EJEMPLO 2

Preparación de α-amilasa

30 Se inoculó una cepa de *Bacillus licheniformis* St-3501 en 400 litros de medio de cultivo esterilizado que contenía un 1,0 % de almidón, un 1,0 % de extracto de maíz, un 0,5 % de NaCl, un 0,1 % de CaCO₃, y un 0,002 % de MnSO₄ (pH 7,2-7,3) a 56 °C durante 24 h con aireación (400 l/min) y agitación (250 rpm) continuas. El caldo de cultivo obtenido se filtró usando una membrana cerámica Kerasep de 0,1 µm (Novasep, Francia) para separar las células. El permeato sin células se concentró adicionalmente 100 veces en ultrafiltros Persep de 10 kDa (Orelis, Francia). Se obtuvo una preparación enzimática en bruto con una actividad de aproximadamente 100 KNU/ml.

- 35 EJEMPLO 3

Preparación de composición de glucosil estevia

40 Se suspendieron 100 g de almidón de tapioca en 300 ml de agua (pH 6,5). Se añadieron 2 KNU de α-amilasa obtenida de acuerdo con el EJEMPLO 2 y 30 unidades de CGTasa obtenida de acuerdo con EJEMPLO 1, y se llevó a cabo la licuefacción del almidón a 80 °C durante aproximadamente una hora hasta un equivalente en dextrosa de aproximadamente 15. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a pH 2,8 con ácido clorhídrico y la mezcla se hirvió a 100 °C durante 5 minutos para inactivar las enzimas. Después de enfriar a 65 °C, el pH se ajustó a pH 6,0 con solución de hidróxido sódico. Se añadieron 100 g de extracto de estevia producido por PureCircle (JiangXi) Co., Ltd. (China), que contenía un 29,2 % de esteviósido, un 54,3 % de Rebaudiósido A, un 9,0 % de Rebaudiósido C, Rebaudiósido F (1,7 %) y otros glicósidos para sumar un contenido total de glicósidos de esteviol de aproximadamente un 96,4 %, al almidón licuado y se agitaron hasta que se obtuvo una solución homogénea. Se añadieron 200 unidades de CGTasa a la solución y la mezcla se mantuvo a una temperatura de 65 °C durante 24 horas con agitación continua. La mezcla de reacción obtenida se calentó a 95 °C durante 15 minutos para inactivar la enzima, y se añadieron 14 KNU de α-amilasa obtenida de acuerdo con el EJEMPLO 2. La reacción se continuó durante otras 12 horas a 65 °C. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a pH 2,8 con ácido clorhídrico y la mezcla se hirvió a 100 °C durante 5 minutos para inactivar la enzima. Después de enfriar a 65 °C, el pH se ajustó a pH 6,0 con solución de hidróxido sódico. Se añadieron 20 gramos de carbón activado y la mezcla se calentó a 75 °C y se mantuvo durante 30 minutos. La mezcla se filtró y el filtrado se diluyó con agua hasta un contenido de sólidos de un 5 % y se hizo pasar a través de columnas empaquetadas con las resinas de intercambio iónico Amberlite FPC23 (H⁺) y Amberlite FPA51 (OH⁻). La solución desalada se concentró a 60 °C al vacío, y se secó en forma de polvo usando un secador por pulverización de laboratorio. Se obtuvieron 190 gramos de producto (Muestra 1).

- 60 EJEMPLO 4

Preparación de composición de glucosil estevia altamente purificada

65 Se suspendieron 100 g de almidón de tapioca en 300 ml de agua (pH 6,5). Se añadieron 2 KNU de α-amilasa obtenida de acuerdo con el EJEMPLO 2 y 30 unidades de CGTasa obtenida de acuerdo con EJEMPLO 1, y se llevó a cabo la licuefacción del almidón a 80 °C durante aproximadamente una hora hasta un equivalente en dextrosa de

aproximadamente 15. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a pH 2,8 con ácido clorhídrico y la mezcla se hirvió a 100 °C durante 5 minutos para inactivar las enzimas. Después de enfriar a 65 °C, el pH se ajustó a pH 6,0 con solución de hidróxido sódico. Se añadieron 100 g de extracto de estevia producido por PureCircle (JiangXi) Co., Ltd. (China), que contenía un 29,2 % de esteviósido, un 54,3 % de Rebaudiósido A, un 9,0 % de Rebaudiósido C, Rebaudiósido F (1,7 %) y otros glicósidos para sumar un contenido total de glicósidos de esteviol de aproximadamente un 96,4 %, al almidón licuado y se agitaron hasta que se obtuvo una solución homogénea. Se añadieron 200 unidades de CGTasa a la solución y la mezcla se mantuvo a una temperatura de 65 °C durante 24 horas con agitación continua. La mezcla de reacción obtenida se calentó a 95 °C durante 15 minutos para inactivar la enzima, y se añadieron 14 KNU de α -amilasa obtenida de acuerdo con el EJEMPLO 2. La reacción se continuó durante otras 12 horas a 65 °C. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a pH 2,8 con ácido clorhídrico y la mezcla se hirvió a 100 °C durante 5 minutos para inactivar la enzima. Después de enfriar a 65 °C, el pH se ajustó a pH 6,0 con solución de hidróxido sódico. Se añadieron 20 gramos de carbón activado y la mezcla se calentó a 75 °C y se mantuvo durante 30 minutos. La mezcla se filtró y el filtrado se diluyó con agua hasta un contenido de sólidos de un 5 % y se hizo pasar a través de columnas empaquetadas cada una con 4000 ml de resina adsorbente macroporosa Amberlite XAD 7HP. Las columnas se lavaron con 5 volúmenes de agua y 2 volúmenes de etanol al 20 % (v/v). Los glicósidos adsorbidos se eluyeron con etanol al 50 %. El eluato obtenido se hizo pasar a través de columnas empaquetadas con las resinas de intercambio iónico Amberlite FPC23 (H⁺) y Amberlite FPA51 (OH⁻). El etanol se evaporó y la solución acuosa desalada y decolorada se concentró a 60 °C al vacío, y a continuación se secó en forma de polvo usando un secador por pulverización de laboratorio. Se obtuvieron 149 gramos de producto (Muestra 2).

EJEMPLO 5

Preparación de composición de glucosil estevia purificada

Se suspendieron 100 g de almidón de tapioca en 300 ml de agua (pH 6,5). Se añadieron 2 KNU de α -amilasa obtenida de acuerdo con el EJEMPLO 2 y 30 unidades de CGTasa obtenida de acuerdo con EJEMPLO 1, y se llevó a cabo la licuefacción del almidón a 80 °C durante aproximadamente una hora hasta un equivalente en dextrosa de aproximadamente 15. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a pH 2,8 con ácido clorhídrico y la mezcla se hirvió a 100 °C durante 5 minutos para inactivar las enzimas. Después de enfriar a 65 °C, el pH se ajustó a pH 6,0 con solución de hidróxido sódico. Se añadieron 100 g de extracto de estevia producido por PureCircle (JiangXi) Co., Ltd. (China), que contenía un 29,2 % de esteviósido, un 54,3 % de Rebaudiósido A, un 9,0 % de Rebaudiósido C, Rebaudiósido F (1,7 %) y otros glicósidos para sumar un contenido total de glicósidos de esteviol de aproximadamente un 96,4 %, al almidón licuado y se agitaron hasta que se obtuvo una solución homogénea. Se añadieron 200 unidades de CGTasa a la solución y la mezcla se mantuvo a una temperatura de 65 °C durante 24 horas con agitación continua. La mezcla de reacción obtenida se calentó a 95 °C durante 15 minutos para inactivar la enzima. Se añadieron 20 gramos de carbón activado y la mezcla se calentó a 75 °C y se mantuvo durante 30 minutos. La mezcla se filtró y el filtrado se diluyó con agua hasta un contenido de sólidos de un 5 % y se hizo pasar a través de columnas empaquetadas cada una con 4000 ml de resina adsorbente macroporosa Amberlite XAD 7HP. Las columnas se lavaron con 5 volúmenes de agua y 2 volúmenes de etanol al 20 % (v/v). Los glicósidos adsorbidos se eluyeron con etanol al 50 %. El eluato obtenido se hizo pasar a través de columnas empaquetadas con las resinas de intercambio iónico Amberlite FPC23 (H⁺) y Amberlite FPA51 (OH⁻). El etanol se evaporó y la solución acuosa desalada y decolorada se concentró a 60 °C al vacío, y a continuación se secó en forma de polvo usando un secador por pulverización de laboratorio. Se obtuvieron 166 gramos de producto (Muestra 3).

EJEMPLO 6

Bebida de zumo de naranja baja en calorías

Se mezclaron concentrado de naranja (35 %), ácido cítrico (0,35 %), ácido ascórbico (0,05 %), color rojo naranja (0,01 %), sabor de naranja (0,20 %), Rebaudiósido A (0,003 %) y diferentes composiciones de glucosil estevia (0,03 %) y se disolvieron completamente en agua (hasta un 100 %) y se pasteurizaron. Las composiciones de glucosil estevia estaban representadas por las Muestras 1, 2, y 3, obtenidas de acuerdo con los EJEMPLOS 3, 4, y 5, respectivamente.

Las evaluaciones sensoriales de las muestras se resumen en la Tabla 3. Los datos muestran que los mejores resultados se pueden obtener usando la composición de glucosil estevia altamente purificada (Muestra 2). En particular, las bebidas preparadas con la Muestra 2 exhibieron un perfil de sabor y una sensación en la boca redondos y completos.

Tabla 3

Evaluación de muestras de bebida de zumo de naranja			
Muestra	Comentarios		
	Sabor	Regusto	Sensación en la

ES 2 727 268 T3

			boca
N.º 1	Dulce, notas de regaliz	Amargor y regusto ligeros	No aceptable
N.º 2	Dulzura de alta calidad, sabor agradable similar a sacarosa, sabor redondo y equilibrado	Limpio, sin amargor ni regusto	Completo
N.º 3	Dulzura de alta calidad, sabor agradable casi similar a sacarosa, sabor redondo y equilibrado	Limpio, casi sin amargor, sin regusto	Bastante aceptable

Se puede usar el mismo método para preparar zumos y bebidas de zumo a partir de otras frutas, tales como manzanas, limones, albaricoques, cerezas, piñas, mangos, etc.

5 EJEMPLO 7

Bebida carbonatada baja en calorías

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

10

Ingredientes	Cantidad, %
Sacarosa	5,5
Sabor de cola	0,340
Ácido ortofosfórico	0,100
Citrato sódico	0,310
Benzoato sódico	0,018
Ácido cítrico	0,018
Rebaudiósido A	0,003
Composición de glucosil estevia	0,05
Agua carbonatada	hasta 100

Las propiedades sensoriales fueron evaluadas por 20 expertos. Los resultados se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4

Evaluación de muestras de bebida carbonatada baja en calorías			
Atributo de sabor	Número de expertos que detectaron el atributo		
	Muestra n.º 1	Muestra n.º 2	Muestra n.º 3
Sabor amargo	17	0	5
Sabor astringente	16	0	7
Regusto	18	0	4
Comentarios			
Calidad del sabor dulce	Regusto amargo (16 de 20)	Limpia (20 de 20)	Limpia (11 de 20)
Evaluación general	Satisfactoria (1 de 20)	Satisfactoria (20 de 20)	Satisfactoria (9 de 20)

15

Los resultados anteriores muestran que la bebida preparada usando las Muestras 2 tuvieron las mejores características organolépticas.

EJEMPLO 8

20

Galletas dietéticas

Se amasaron bien harina (50,0 %), margarina (30,0 %) fructosa (10,0 %), maltitol (8,0 %), leche entera (1,0 %), sal (0,2 %), polvo para hornear (0,15 %), vainillina (0,1 %) y diferentes composiciones de glucosil estevia (0,03 %) en

una máquina mezcladora de masa. La masa obtenida se moldeó y se coció al horno a 200 °C durante 15 minutos. Las composiciones de glucosil estevia fueron las representadas por las Muestras 1, 2, y 3, obtenidas de acuerdo con los EJEMPLOS 3, 4, y 5, respectivamente.

- 5 Las propiedades sensoriales fueron evaluadas por 20 expertos. Los mejores resultados se obtuvieron en las muestras preparadas con composición de glucosil estevia altamente purificada (Muestra 2). Los expertos anotaron un perfil de sabor y una sensación en la boca redondos y completos en las galletas preparadas con la Muestra 2.

EJEMPLO 9

- 10 Yogur

- 15 Se disolvieron diferentes composiciones de glucosil estevia (0,03 %) y sacarosa (4 %) en leche con bajo contenido en grasa. Las composiciones de glucosil estevia fueron las representadas por las Muestras 1, 2, y 3, obtenidas de acuerdo con los EJEMPLOS 3, 4, y 5, respectivamente. 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 a continuación a 5 °C durante 12 horas.

- 20 Las propiedades sensoriales fueron evaluadas por 20 expertos. Los mejores resultados se obtuvieron en las muestras preparadas con composición de glucosil estevia altamente purificada (Muestra 2). Los expertos anotaron un perfil de sabor y una sensación en la boca redondos y completos en la muestra preparada con la Muestra 2.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir una composición de glucosil estevia altamente purificada, que comprende las etapas de:
 - añadir almidón a agua para formar una suspensión de almidón;
 - añadir una mezcla de α -amilasa y ciclodextrina glicosiltransferasa (CGTasa) a la suspensión de almidón e incubar durante aproximadamente 0,5 a 2 horas a aproximadamente 75-80 °C, para dar como resultado una suspensión de almidón licuada;
 - inactivar la α -amilasa por tratamiento térmico a pH bajo;
 - enfriar la suspensión de almidón licuada y ajustar el pH a aproximadamente 5,5 a 7,0;
 - añadir glicósidos de esteviol a la suspensión de almidón licuada, para dar como resultado una mezcla de reacción;
 - añadir un segundo lote de CGTasa a la mezcla de reacción e incubar durante aproximadamente 12 a 48 horas a aproximadamente 55-75 °C;
 - añadir un segundo lote de α -amilasa a la mezcla de reacción e incubar durante aproximadamente 12-16 horas a aproximadamente 55-95 °C;
 - inactivar el segundo lote de α -amilasa por tratamiento térmico a pH bajo;
 - ajustar el pH a aproximadamente 5,5 a 7,0;
 - decolorar la mezcla de reacción;
 - retirar las impurezas poniendo en contacto la mezcla de reacción decolorada con resina adsorbente macroporosa y eluir posteriormente los glicósidos de diterpeno adsorbidos con etanol acuoso para dar como resultado un eluato de etanol acuoso que contiene glicósidos;
 - desalar el eluato de etanol acuoso que contiene glicósidos con resinas de intercambio iónico;
 - retirar el etanol del eluato de etanol acuoso, para dar como resultado un eluato acuoso; y
 - concentrar y secar el eluato acuoso para obtener la composición de glucosil estevia altamente purificada, en el que la composición de glucosil estevia altamente purificada comprende α -1,4-glucosil derivados, y glicósidos de esteviol sin modificar.
2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la mezcla de α -amilasa y CGTasa contiene aproximadamente 0,001-0,2 KNU de α -amilasa por unidad de CGTasa.
3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el peso de glicósidos de esteviol añadidos es aproximadamente igual al del almidón.
4. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los glicósidos de esteviol añadidos se seleccionan entre el grupo que consiste en esteviósido, Rebaudiósido A, Rebaudiósido B, Rebaudiósido C, Rebaudiósido D, Rebaudiósido E, Rebaudiósido F, dulcósido A, esteviolbiósido, rubusósido, así como otros glicósidos de esteviol que se encuentran en la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni y las mezclas de los mismos.
5. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la CGTasa se produce mediante cultivos de *Bacillus stearothermophilus*.
6. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el segundo lote de CGTasa tiene aproximadamente 0,2-4 unidades de CGTasa por gramo de sólidos.
7. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la α -amilasa se produce mediante cultivos de *Bacillus licheniformis*.
8. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el segundo lote de α -amilasa se añade a razón de aproximadamente 0,01-0,2 KNU, de forma preferente aproximadamente 0,05-0,1 KNU por gramo de sólidos, y el tratamiento se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 55-95 °C, para una duración de aproximadamente 12-16 horas.
9. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la decoloración se lleva a cabo usando carbón activado, o usando resinas de intercambio iónico o membranas, seleccionándose dichas membranas entre el grupo que consiste en membranas de ultrafiltración, nanofiltración, y ósmosis inversa.
10. El proceso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la retirada de impurezas se lleva a cabo con una pluralidad de columnas conectadas secuencialmente empaquetadas con una resina adsorbente macroporosa, seguido de lavado de las columnas con agua, a continuación lavado con etanol aproximadamente al 10-50 % (v/v), desconexión de las columnas, y a continuación elución de cada columna individualmente con etanol al 30-100 %.
11. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la desalación se lleva a cabo haciendo pasar el eluato a través de columnas empaquetadas con resinas de intercambio iónico o membranas, seleccionándose dichas membranas entre el grupo que consiste en membranas de ultrafiltración, nanofiltración, y ósmosis inversa.

12. El proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la composición de glucosil estevia altamente purificada tiene al menos aproximadamente un 95 % de glicósidos de esteviol totales sobre base anhidra.