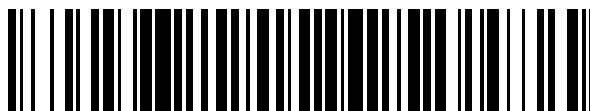


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 234**

51 Int. Cl.:

A23L 27/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2011 PCT/US2011/035173**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2012 WO12112180**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2011 E 11858867 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 2675294**

54 Título: **Composición glicosilada a base de estevia**

30 Prioridad:

29.03.2011 US 201113074179
17.02.2011 US 201113029263

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.10.2019

73 Titular/es:

PURECIRCLE USA (100.0%)
915 Harger Road Suite 250
Oak Brook, IL 60523-1492, US

72 Inventor/es:

MARKOSYAN, AVETIK

74 Agente/Representante:

URÍZAR BARANDIARAN, Miguel Ángel

ES 2 728 234 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 glicosilada a base de estevia.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Objeto de la invención

5 **[0001]** La presente invención se refiere a un proceso para producir un ingrediente alimentario de gran pureza a partir del extracto de la planta *Stevia rebaudiana Bertoni* y a su uso en diversos alimentos y bebidas.

Descripción de la técnica relacionada

10 **[0002]** Hoy en día las alternativas al azúcar reciben cada vez más atención debido a la concienciación sobre muchas enfermedades relacionadas con el consumo de alimentos y bebidas ricos en azúcar. Sin embargo, muchos edulcorantes artificiales como la dulcina, el ciclamato de sodio y la sacarina se han prohibido o restringido en algunos países debido a la preocupación por su salubridad. Por tanto, los edulcorantes no calóricos de origen natural se están haciendo cada vez más populares. La hierba dulce *Stevia rebaudiana Bertoni* produce cierta cantidad de glucósidos diterpénicos que aportan un dulzor de gran intensidad y unas propiedades organolépticas superiores a las de otros muchos edulcorantes de gran potencia.

15 **[0003]** Los glucósidos dulces mencionados anteriormente contienen una aglucona común, el esteviol, y difieren por el número y el tipo de residuos de carbohidratos en las posiciones C13 y C19. Estos glucósidos se acumulan en las hojas de estevia y suponen aproximadamente entre el 10 % y el 20 % del peso total en seco. Los principales glucósidos que se encuentran en las hojas de estevia son el rebaudiósido A (2-10 %), el esteviósido (2-10 %) y el rebaudiósido C (1-2 %). Otros glucósidos que se han identificado en concentraciones mucho menores (aprox. 0-0,2 %) incluyen los rebaudiósidos B, D, E y F, el esteviolbósido y el rubusósido.

20 **[0004]** Se han estudiado y analizado ampliamente dos de los glucósidos principales (el esteviósido y el rebaudiósido A) en relación con su idoneidad como edulcorantes comerciales de alta intensidad. Las pruebas de estabilidad en las bebidas carbonatas 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).

25 **[0005]** Los glucósidos de esteviol difieren entre sí no solo por su estructura molecular, sino también por sus propiedades edulcorantes. Normalmente el esteviósido es entre 110 y 270 veces más dulce que la sacarosa, el rebaudiósido A entre 150 y 320 veces, y el rebaudiósido C entre 40 y 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 las propiedades organolépticas más favorables entre 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». In: Grenby T.H. ed. «Developments in sweeteners», vol. 3. Elsevier Applied Science, Londres. 1-43).

30 **[0006]** Los métodos para la extracción y la purificación de los glucósidos dulces de la planta *Stevia rebaudiana* usando agua o solventes orgánicos se describen en, por ejemplo, las patentes estadounidenses número 4.361.697, 4.082.858, 4.892.938, 5.972.120, 5.962.678, 7.838.044 y 7.862.845.

[0007] Sin embargo, incluso en un estado altamente puro, los glucósidos de esteviol aún tienen propiedades saborizantes indeseables, como el amargor, el regusto dulce, el sabor a regaliz, etc. Uno de los principales obstáculos

para la comercialización exitosa de edulcorantes a base de estevia son esas propiedades saborizantes indeseables. Se ha demostrado que esas notas de sabor se hacen más notables 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).

5 **[0008]** Algunas de estas propiedades indeseables pueden reducirse o eliminarse sometiendo los glucósidos de esteviol a la reacción de la transglicosilación intermolecular, cuando nuevos residuos de carbohidratos se unen a la molécula inicial en las posiciones C13 y C19. Dependiendo del número de residuos de carbohidratos en esas posiciones, la calidad y la potencia saborizante de los compuestos diferirá.

10 **[0009]** La pululanosa, la 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), la β -galactosidasa (Kitahata S., Ishiwaka S., Miyata T., Tanaka O. (1989) «Production of rubusoside derivatives by transglycosylation of various β -galactosidase». Agric. Biol. Chem. 53: 2923-2928), y la dextransacarasa (Yamamoto K., Yoshiwaka K., Okada S. (1994) «Effective production of glucosyl-stevioside by α -1,6-transglucosylation of dextran dextranase». Biosci. Biotech. Biochem. 58: 1657-1661) se han usado como enzimas transglicosiladas, junto con el
15 pululano, la maltosa, la lactosa y el almidón parcialmente hidrolizado, respectivamente, como productoras de residuos glicosídicos.

[0010] La transglicosilación de los glucósidos de esteviol se llevó también a cabo por la acción de ciclodextrina-glucanotransferasas (CGTasa) producidas por el *Bacillus stearothermophilus* (patentes estadounidenses números 4.219.571 y 7.807.206); en consecuencia, se formaron derivados de α -1,4-glicosil con un grado de polimerización de
20 hasta 10.

[0011] Se ha demostrado (Tanaka O. (1987) «Improvement of taste of natural sweeteners». Pure Appl. Chem. 69:675-683) que el perfil de sabor y el poder edulcorante de los derivados de glicosil dependen en gran parte de un número de derivados de α -1,4-glicosil, es decir, el grado de polimerización de la cadena α -1,4-glicosil. Sin embargo, en la mayoría de los productos de estevia transglicosilados el grado de polimerización suele estar por debajo de nueve. Como con
25 cualquier otra reacción, la reacción de transglicosilación queda inhibida por sus productos y el aumento adicional de los residuos de α -1,4-glicosil queda inhibido también por los productos de la reacción, especialmente los maltooligosacáridos de cadena corta.

[0012] KR100888694 B1 muestra un método para producir estevia modificada enzimáticamente para mejorar el dulzor de la estevia y usarla como un edulcorante, un potenciador del sabor, un modificador del sabor y un reactivo.

30 **[0013]** Por tanto, resulta necesario desarrollar un proceso sencillo de preparación de productos de estevia con gran pureza de glicosil, una cadena α -1,4-glicosil más larga y mejor perfil de sabor.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0014] La presente invención tiene el objetivo de superar las desventajas de los edulcorantes existentes a base de estevia. La invención describe un proceso para producir un ingrediente con alto grado de pureza del extracto de la
35 planta *Stevia rebaudiana Bertoni* y para usarlo en diversos alimentos y bebidas como edulcorante y modificador del sabor.

[0015] En consecuencia, la presente invención se dirige a un proceso para producir el compuesto de glicosil de estevia de alta pureza descrito en la reivindicación 1. En las subreivindicaciones 2 a 11 se describen ventajas adicionales.

5 **[0016]** La invención emplea un ingrediente que comprende derivados glicosilados de glucósidos de esteviol de la planta *Stevia rebaudiana Bertoni*. Los glucósidos de esteviol se pueden seleccionar del grupo formado por el esteviósido, el rebaudiósido A, el rebaudiósido B, el rebaudiósido C, el rebaudiósido D, el rebaudiósido E, el rebaudiósido F, el dulcósido A, el esteviolbiósido, el rubusósido, además de otros glucósidos de esteviol que se extraen de la planta *Stevia rebaudiana Bertoni* y mezclas de estos.

10 **[0017]** La invención describe un proceso para producir un ingrediente que contenga formas glicosiladas de esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, dulcósido A, esteviolbiósido, rubusósido, además de otros glucósidos de esteviol que se extraen de la planta *Stevia rebaudiana Bertoni*. El procedimiento es un proceso de transglicosilación enzimática usando CGTasas producidas por cultivos de *Bacillus stearothermophilus*. El proceso incluye los pasos de decolorar, desalinizar y eliminar los maltooligosacáridos. La decoloración puede hacerse usando carbón activo. La desalinización puede hacerse mediante resinas de intercambio iónico o filtros de membrana. La eliminación de los maltooligosacáridos puede hacerse mediante resina polimérica macroporosa.

15 **[0018]** En la invención, el 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 glucósidos que conjuntamente suponen un contenido total de glucósidos de esteviol de al menos el 95 %, se usó como material inicial. Opcionalmente se pueden usar extractos de estevia con distintas proporciones de glucósidos de esteviol así como de glucósidos de esteviol de gran pureza como el rebaudiósido A, el esteviósido, el rebaudiósido D, el rubusósido, etc.

20 **[0019]** El material inicial se sometió a una transglicosilación enzimática por la acción de la ciclodextrina-glucanotransferasa (CGTasa) en presencia de almidón como aportador de glucosa. Como resultado, se formaron derivados de α -1,4-glicosil con un grado de polimerización de hasta 9. Luego, los maltooligosacáridos de la mezcla de la reacción obtenida se eliminaron mediante resina Amberlite XAD7 HP. La mezcla resultante de derivados de α -1,4-glicosil (con un grado de polimerización de hasta 9) se sometió a una segunda transglicosilación enzimática mediante
25 CGTasa en presencia de almidón como aportador de glucosa. Como resultado de la segunda glicosilación se formaron derivados de α -1,4-glicosil con un grado de polimerización de hasta 20. Los maltooligosacáridos obtenidos durante la segunda glicosilación se eliminaron mediante la resina Amberlite XAD7 HP. Después, la mezcla obtenida de derivados de α -1,4-glicosil (con un grado de polimerización de hasta 20) se decoloró, se desionizó, se concentró y se secó por pulverización.

30 **[0020]** Los productos obtenidos se agregaron a diversos alimentos y bebidas como edulcorantes, potenciadores del dulzor y modificadores del sabor, como helados, galletas, pan, zumos, productos lácteos, bollería y pasteles.

[0021] Se debe entender que tanto la descripción general precedente como la descripción detallada que sigue son explicativas y a modo de ejemplo, y se pretende que proporcionen explicaciones adicionales de la invención tal y como se reivindica.

35 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

[0022] Los dibujos adjuntos se incluyen para proporcionar mayor comprensión sobre la invención. Los dibujos ilustran realizaciones de la invención y junto con las descripciones sirven para explicar los principios de las realizaciones de la invención.

ES 2 728 234 T3

El DIB. 1 muestra un cromatograma de líquidos de alto rendimiento del extracto transglicosilado de estevia que contiene los derivados de α -1,4-glicosil con hasta nueve residuos de α -1,4-glicosil.

El DIB. 2 muestra un cromatograma de líquidos de alto rendimiento del extracto transglicosilado de estevia que contiene los derivados de α -1,4-glicosil con hasta veinte residuos de α -1,4-glicosil.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0023] Las ventajas de la presente invención serán más evidentes a partir de la descripción detallada que se da a continuación. Sin embargo, debería entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican las realizaciones preferentes de la invención, se proporcionan únicamente con fines ilustrativos, ya que quienes estén versados en la técnica seguramente idearán diversos cambios y modificaciones dentro del ámbito de la invención a partir de esta descripción detallada.

[0024] Como material inicial se usó el 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 glucósidos (en adelante, todos juntos, «los glucósidos de esteviol») que conjuntamente suponen un contenido total de glucósidos de esteviol de al menos el 95 %. Opcionalmente se pueden usar extractos de estevia con distintas proporciones de glucósidos de esteviol así como de glucósidos de esteviol de gran pureza como el rebaudiósido A, el esteviósido, el rebaudiósido D, el rubusósido, etc.

[0025] El análisis de cromatografía de líquidos de alto rendimiento de las materias primas y de los productos fue realizado en un cromatógrafo de líquidos de Agilent Technologies serie 1200 (EE. UU.) equipado con una columna Zorbax-NH₂ (4.6X250 mm). La fase móvil fue un gradiente acetonitrilo-agua de 80:20, v/v (0-2 min) a 50:50, v/v (2-70 min). Como detector se usó un detector de haz de diodos fijado a 210 nm.

[0026] La transglicosilación se consiguió mediante ciclodextrina-gluconotransferasas (CGTasas; EC 2.4.1.19) producidas por el *Bacillus stearothermophilus* St-100 (PureCircle Sdn Bhd Collection of Industrial Microorganisms [Colección de Microorganismos Industriales] - Malasia). No obstante, puede usarse también cualquier otra CGTasa o enzima que muestre actividad de transglicosilación intermolecular. La enzima puede ser en forma de caldo de cultivo sin células, un caldo de cultivo líquido y concentrado sin células, un caldo de cultivo sin células secado por pulverización o liofilizado, o proteína de alta pureza. Se pueden usar preparaciones de enzimas libres e inmovilizadas.

[0027] La actividad de las preparaciones de CGTasas se determinó según el procedimiento descrito en Hale W.S., Rawlins L.C. (1951) «Amylase of Bacillus macerans». Cereal Chem. 28, 49-58.

[0028] Se pueden usar almidones de distintas procedencias como aportadores de unidades de glicosil como los derivados del trigo, del maíz, de la patata, de la tapioca y del sago.

[0029] El almidón se sometió a una hidrólisis parcial (licuefacción) antes de la reacción de transglicosilación. El equivalente a la dextrosa del almidón parcialmente hidrolizado puede estar en el rango de en torno a 10-25, preferentemente en torno a 12-16. Toda enzima capaz de producir la hidrólisis del almidón puede usarse para la licuefacción, como las α -amilasas, las β -amilasas, etc. En una forma de realización, se prefieren las mezclas de CGTasa y de α -amilasa como enzimas licuefactivas.

[0030] La actividad de la α -amilasa se expresa en Unidades Kilo Novo (KNU) de α -amilasa. Un KNU es la cantidad de α -amilasa que, en condiciones normales (pH 7.1; 37 °C), dextriniza 5,26 g de almidón seco por hora.

ES 2 728 234 T3

- [0031] La mezcla de la licuefacción contiene alrededor de 0,001-0,2 KNU, preferentemente alrededor de 0,05-0,1 KNU de α -amilasa por cada unidad de CGTasa.
- [0032] El uso de la α -amilasa en la licuefacción permite obtener mayor rendimiento en la filtración por carbón activo adicional. Cuando se use la CGTasa como la única enzima licuefactiva, el índice de filtración será de aproximadamente 10-15 L/hr por 1 m² de superficie de filtro. En caso de mezcla de enzimas de licuefacción (compuesta de α -amilasa y CGTasa), el índice de filtración será dos veces más rápido, de aproximadamente 20-30 L/hr por 1 m² de superficie de filtro.
- [0033] La proporción de almidón y CGTasa en la mezcla de licuefacción era de alrededor de 0,1-0,5 unidades por gramo de almidón, preferentemente sobre 0,2-0,4 unidades por gramo.
- 10 [0034] La concentración de almidón en la mezcla de licuefacción era de alrededor del 15-40 % (wt/wt), preferentemente de alrededor del 20-30 %.
- [0035] La licuefacción se realizó a entre 70 y 90 °C durante un período comprendido entre media hora y cinco horas, y preferentemente de entre una y dos horas.
- [0036] Tras la licuefacción, la mezcla de la reacción se sometió a la inactivación térmica de la α -amilasa en condiciones de pH bajo. El nivel preferido de pH para la inactivación está entre 2.5 y 3.0 pH, y la temperatura preferida está entre 95 y 100 °C. La inactivación térmica dura entre 5 y 10 minutos.
- [0037] Tras la inactivación, el pH de la mezcla de la reacción se ajustó a alrededor de 5.5 y 6.5 pH y los glucósidos de esteviol se añadieron a la mezcla y se disolvieron en ella. La proporción preferida de glucósidos de esteviol en relación con el almidón (kg de glucósidos de esteviol por 1 kg de almidón) es de en torno a 0,5-1,5 y preferentemente de en torno a 0,8 y 1,2.
- 20 [0038] Se añadió una segunda porción de la preparación de CGTasa y se llevó a cabo la primera reacción de transglicosilación a unos 65 °C durante entre 24 y 48 horas. La cantidad de la segunda porción de CGTasa fue de alrededor de 0,2-4 unidades de CGTasa por gramo de sólidos, preferentemente de en torno a 0,5-1,2 unidades por gramo de sólidos.
- 25 [0039] Tras completar la transglicosilación, se detuvo la reacción calentando a unos 95 °C durante unos 15 minutos para inactivar la enzima. Como resultado, se obtuvo una mezcla de derivados de α -1,4-glicosil con un grado de polimerización de hasta 9. Para eliminar los maltooligosacáridos de cadena corta, los cuales inhiben el alargamiento adicional de la cadena de α -1,4-glicosídicos, la mezcla de la reacción se pasó por una columna llena de resina macroporosa absorbente Amberlite XAD7 HP. Los glucósidos de esteviol y sus derivados glicosilados fueron absorbidos por la resina y posteriormente se eluyeron con etanol acuoso. El eluato de etanol acuoso resultante, que contenía glucósidos de esteviol glicosídico, se evaporó, se concentró y se secó por pulverización para obtener extracto de estevia transglicosilado que contenía derivados de glicosídicos con hasta nueve residuos de α -1,4-glicosil.
- 30 [0040] Una segunda porción de almidón se sometió a hidrólisis parcial (licuefacción) tal y como se describe arriba.
- [0041] Tras la licuefacción, se añadió el extracto transglicosilado de estevia obtenido durante la primera glicosilación (con hasta nueve residuos de α -1,4-glicosil). La proporción preferida del extracto transglicosilado de estevia con respecto al almidón (kg de extracto transglicosilado de estevia por 1 kg de almidón) es de en torno a 0,5-1,5 y preferentemente de en torno a 0,8 y 1,2.
- 35

ES 2 728 234 T3

[0042] Se añadió una segunda porción de la preparación de CGTasa y se llevó a cabo la segunda reacción de transglicosilación a unos 65 °C durante entre 24 y 48 horas. La cantidad de esta porción de CGTasa fue de alrededor de 0,2-4 unidades de CGTasa por gramo de sólidos, preferentemente de en torno a 0,5-1,2 unidades por gramo de sólidos.

5 [0043] Tras completar la transglicosilación, se detuvo la reacción calentando a unos 95 °C durante unos 15 minutos para inactivar la enzima. Como resultado, se obtuvo una mezcla de derivados de α -1,4-glicosil con un grado de polimerización de hasta 20.

10 [0044] Se eliminaron los maltooligosacáridos de la mezcla de la reacción usando la resina Amberlite XAD7 HP tal y como se explica más arriba. Los glucósidos de esteviol y sus derivados glicosilados fueron absorbidos por la resina y posteriormente se eluyeron con etanol acuoso. El eluato de etanol acuoso resultante, que contenía glucósidos de esteviol glicosídico, se trató con carbón activo para obtener una mezcla de reacción decolorada. La cantidad de carbón activo era de en torno a 0,02-0,4 gramos por cada gramo de sólidos, y preferentemente de en torno a 0,05-0,2 gramos por cada gramo de sólidos. La solución decolorada se desalinizó también pasándola por resinas de intercambio iónico, como Amberlite FPC23 (tipo H⁺) y Amberlite FPA51 (tipo OH⁻). Se pueden usar otros métodos de decoloración y desalinización, como la filtración por membrana, y otros métodos conocidos en la técnica.

15 [0045] La mezcla desalinizada de la reacción se concentró además mediante un evaporador de vacío y se secó por pulverización. Se pueden emplear también otros métodos apropiados de concentración y de secado, como la filtración por membrana, la liofilización y otros métodos conocidos en la técnica.

[0046] El producto resultante fue un extracto de estevia transglicosilado que contenía derivados de α -1,4-glicosil con hasta 20 residuos de α -1,4-glicosil (muestra 2).

20 [0047] El extracto de estevia transglicosilado se puede purificar adicionalmente eliminando los glucósidos de esteviol que no hayan reaccionado. El polvo seco de extracto transglicosilado de estevia se suspende en alcohol acuoso. La proporción de polvo y alcohol acuoso (wt/vol) puede variar de 1:1 a 1.20, preferentemente de 1:3 a 1:10. El alcohol acuoso contiene 0-50 % (vol) de agua, preferentemente 1-10 %. La suspensión se agita a 30-100 °C, preferentemente a 50-85 °C durante 1-24 horas, preferentemente 2-15 horas. Después, los sólidos en suspensión se separan mediante
25 filtración. Se puede usar cualquier otra técnica conocida y apta para separar sólidos suspendidos del líquido, como la centrifugación, la decantación, etc. Los sólidos obtenidos se secan en un secador de vacío de tambor rotatorio. Se puede emplear también cualquier otro secador conocido en la técnica. Opcionalmente, los sólidos separados se pueden disolver en agua, se puede evaporar cualquier rastro de alcohol y se pueden secar por pulverización.

30 [0048] Los alcoholes empleados en este paso opcional pueden seleccionarse del grupo consistente en los alcanoles, y preferentemente se seleccionarán del grupo que incluye el metanol, el etanol, el n-propanol, el 2-propanol, el 1-butanol y el 2-butanol.

[0049] El producto resultante contiene un nivel bajo de glucósidos no modificados, incluso sin el paso opcional de eliminación de los glucósidos de esteviol. Tal y como se usan en este documento, las expresiones «glucósidos no modificados de bajo nivel» y «glucósidos de bajo nivel que no han reaccionado» se referirán a los niveles de glucósidos
35 de menos del 20 %, y preferentemente de menos del 15 % en forma anhidra. En algunas realizaciones, puede alcanzarse un nivel de glucósidos que no hayan reaccionado de menos del 12 %, de menos del 10 % o incluso menor usando este método. Completar el paso opcional de eliminación del glucósido de esteviol resulta en niveles incluso menores de glucósidos de esteviol que no hayan reaccionado en el producto final.

ES 2 728 234 T3

[0050] Una pequeña parte del extracto purificado transglicosilado de estevia que contenga derivados de α -1,4-glicosil con hasta nueve residuos de α -1,4-glicosil (obtenidos tal y como se describen anteriormente) se separó y se sometió adicionalmente a un tratamiento de decoloración y de desalinización (similar a la muestra 2) para producir la muestra 1.

5 **[0051]** El proceso usado para preparar la muestra 2 se repitió sin eliminar los maltooligosacáridos de la primera mezcla transglicosilada (que contiene derivados de α -1,4-glicosil con hasta nueve residuos de α -1,4-glicosil). Este proceso produjo la muestra 3.

[0052] El análisis de la composición de cada muestra (tabla 1) muestra una composición similar para las muestras 1 y 3, mientras que la muestra 2 tenía una mayor concentración de derivados con mucho glicosil (que contenían hasta 20 residuos de α -1,4-glicosil).

10

Tabla 1

Composición de las muestras de glucósidos de esteviol de glicosil			
Compuestos	Contenido %		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Esteviósido	3.1	1.6	2.9
Rebaudiósido C	1.0	0.4	1.0
Rebaudiósido A	6.1	2.8	5.8
Monoglucosil-esteviósido (StevG1)	7.4	3.7	7.5
Monoglucosil-rebaudiósido A (RebAG1)	11.1	4.5	11.5
Diglucosil-esteviósido (StevG2)	8.4	4.8	8.8
Diglucosil-rebaudiósido A (RebAG2)	9.6	5.3	9.7
Derivados altamente glicosilados hasta G9	48.4	57.5	49.3
Derivados altamente glicosilados de G9 a G20	-	15.6	-
Contenido total de glucósidos que no han reaccionado.	10.2	4.8	9.7
Contenido total de glucósidos	95.8	96.2	96.5

[0053] La evaluación organoléptica de las muestras se realizó usando soluciones acuosas con 20 participantes. Las muestras más deseables y las menos deseables se eligieron en base a la aceptación general. Los resultados se indican en la tabla 2.

ES 2 728 234 T3

Tabla 2

Evaluación organoléptica de las muestras en agua			
Juicio	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
La más deseable	1	18	1
Poder edulcorante	120	80	120
Comentarios	Dulce, ligeramente amarga, regusto duradero, el dulzor aparece lentamente.	Dulce, ligera, suave, plena, agradable, similar a la sacarosa, sin regusto duradero, el dulzor aparece rápidamente.	Dulce, ligeramente amarga, regusto duradero, el dulzor aparece lentamente.

[0054] Tal y como se deduce de los resultados de la tabla 2, la muestra 2 se calificó como la que mejor dulzor presentaba.

5 **[0055]** El compuesto de estevia glicosilada representado por la muestra 2 muestra un poder edulcorante comparable (80 veces más dulce comprado con una solución de sacarosa del 5 %) con las muestras de control 1 y 3 (120 veces); sin embargo, su perfil de sabor era claramente superior al de las muestras de control.

10 **[0056]** El compuesto puede usarse como intensificador del dulzor, potenciador del sabor y edulcorante en diversos alimentos y bebidas. Entre los ejemplos no limitativos de alimentos y bebidas se incluyen los refrescos carbonatados, las bebidas listas para tomar, las bebidas energéticas, las bebidas isotónicas, las bebidas bajas en calorías, las bebidas sin calorías, las bebidas para deportistas, los téis, los zumos de frutas y verduras, los jugos, las bebidas lácteas, el yogur bebido, las bebidas alcohólicas, las bebidas en polvo, los productos de bollería, las galletas, las pastas, las mezclas para hornear, los cereales, los productos de pastelería, los dulces, los tofes, los chicles, los productos lácteos, la leche de sabores, los yogures, los yogures de sabores, la leche agria, la salsa de soja y otros productos a base de soja, los aliños de ensalada, la mayonesa, el vinagre, los postres congelados, los productos cárnicos, los productos a base de
15 pescado, los alimentos embotellados y enlatados, los edulcorantes de mesa, las frutas y las verduras.

[0057] Además, el compuesto se puede usar en preparados de medicamentos o farmacia, e incluso cosméticos incluyéndose, sin carácter restrictivo, la pasta de dientes, el enjuague bucal, el jarabe para la tos, los comprimidos masticables, las píldoras, los preparados vitamínicos y similares.

20 **[0058]** El puesto puede usarse tal cual o en combinación con otros edulcorantes, saborizantes e ingredientes alimentarios.

[0059] Entre los ejemplos no limitativos de edulcorantes se incluyen los glucósidos de esteviol, el esteviósido, el rebaudiósido A, el rebaudiósido B, el rebaudiósido C, el rebaudiósido D, el rebaudiósido E, el rebaudiósido F, el dulcósido A, el esteviolbiósido, el rubusósido, así como otros glucósidos de esteviol que se encuentran en la planta
25 *Stevia rebaudiana Bertoni* y mezclas de esta, en el extracto de estevia, en el extracto de Luo Han Guo, los mogrósidos, el jarabe de maíz rico en fructosa, el jarabe de maíz, el azúcar invertido, los fructooligosacáridos, la inulina, los

ES 2 728 234 T3

inulooligosacáridos, el azúcar de enlace, los maltooligosacáridos, las maltodextrinas, los sólidos de jarabe de maíz, la glucosa, la maltosa, la sacarosa, la lactosa, el aspartamo, la sacarina, la sucralosa y los alcoholes de azúcar.

[0060] Entre los ejemplos no limitativos de sabores se incluyen el limón, la naranja, el afrutado, el plátano, la uva, la pera, la piña, la almendra amarga, la cola, la canela, el azúcar, el algodón de azúcar y la vainilla.

5 **[0061]** Entre los ejemplos no limitativos de otros ingredientes alimentarios se incluyen los saborizantes, los acidulantes, los aminoácidos y orgánicos, los colorantes, los coagulantes, los almidones modificados, las gomas, los texturizantes, los conservantes, los antioxidantes, los emulsionantes, los estabilizantes, los espesantes y los gelificantes.

[0062] El siguiente ejemplo ilustra varias realizaciones de la invención. Se deberá entender que la invención no se limita a los materiales, las proporciones, las condiciones ni los procedimientos explicados en los ejemplos, que son solo a
10 título ilustrativo.

EJEMPLO 1

Preparación de CGTasa

[0063] Se inoculó una cepa de *Bacillus stearothermophilus* St-100 en 2000 litros de medio de cultivo esterilizado que contenía 1,0 % de almidón, 0,25 % de extracto de maíz, 0,5 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y 0,2 % de CaCO_3 (pH 7.0-7.5) a 56 °C
15 durante 24 horas con ventilación continua (2000 L/min) y agitándose sin parar (150 rpm). El caldo de cultivo obtenido se filtró usando la membrana cerámica de 0,1 μm de Kerasep (Novasep, Francia) para separar las células. El permeado libre de células se concentró en 2 capas de ultrafiltros 10kDa de Persep (Orelis, Francia). La actividad de la enzima se determinó según Hale, Rawlins (1951). Se obtuvo una preparación enzimática en bruto con actividad de unas 2 unidades/mL.

20 EJEMPLO 2

Preparación del compuesto glicosilado de estevia

[0064] Se suspendieron 100 g de almidón de tapioca en 300 mL de agua (pH 6.5). Se añadieron 2 KNU de α -amilasa (Termamyl Classic, Novozymes, Dinamarca) y 30 unidades de CGTasa obtenida según el EJEMPLO 1, y la licuefacción del almidón a dextrosa se realizó a 80 °C durante una hora equivalente a 15. El pH de la mezcla de la reacción se ajustó
25 a 2.8 con ácido clorhídrico y la mezcla se hirvió a 100 °C durante 5 minutos para inactivar las enzimas. Tras enfriarla a 65 °C, se ajustó el pH a 6.0 con una solución de hidróxido de sodio. Al almidón licuado se le 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, un 1,7 % de rebaudiósido F y otros glucósidos que en conjunto suponían un 96,4 % de contenido en glucósidos. Esta mezcla se removió hasta obtener una solución homogénea. Se añadieron
30 200 unidades de CGTasa a la solución y la mezcla se mantuvo a una temperatura de 65 °C durante 24 horas agitándose continuamente. La mezcla de la reacción obtenida se calentó a 95 °C durante 15 minutos para inactivar las enzimas. Se añadieron 20 gramos de carbón activo y la mezcla se calentó a 75 °C y se dejó reposar durante 30 minutos. Luego se filtró la mezcla y el filtrado se diluyó en agua con un 5 % de sólidos y se pasó por columnas, cada una de ellas con 4000 mL de resina macroporosa absorbente Amberlite XAD 7HP. Las columnas se lavaron con 5 volúmenes de agua y 2
35 volúmenes de etanol al 20 % (v/v). Los glucósidos absorbidos se eluyeron con etanol al 50 %. El eluato obtenido se pasó por columnas llenas de las resinas de intercambio iónico Amberlite FPC23 (H^+) y Amberlite FPA51 (OH^-). El etanol se evaporó y la solución de agua desalinizada y decolorada se concentró a 60 °C en vacío para después secarse en forma de polvo mediante el secado por pulverización en laboratorio. Se obtuvieron 151 gramos de producto (muestra 1).

EJEMPLO 3

Preparación del compuesto glicosilado de estevia

[0065] Se suspendieron 100 g de almidón de tapioca en 300 mL de agua (pH 6.5). Se añadieron 2 KNU de α -amilasa (Termamyl Classic, Novozymes, Dinamarca) y 30 unidades de CGTasa obtenida según el EJEMPLO 1, y la licuefacción del almidón a dextrosa se realizó a 80 °C durante una hora equivalente a 15. El pH de la mezcla de la reacción se ajustó a 2.8 con ácido clorhídrico y la mezcla se hirvió a 100 °C durante 5 minutos para inactivar las enzimas. Tras enfriarla a 65 °C, se ajustó el pH a 6.0 con una solución de hidróxido de sodio. Al almidón licuado se le añadieron 100 g de extracto de estevia transglicosilado obtenido según el EJEMPLO 2. Esta mezcla se removió hasta obtener 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 agitándose continuamente. La mezcla de la reacción obtenida se calentó a 95 °C durante 15 minutos para inactivar las enzimas. Se añadieron 20 gramos de carbón activo y la mezcla se calentó a 75 °C y se dejó reposar durante 30 minutos. Luego se filtró la mezcla y el filtrado se diluyó en agua con un 5 % de sólidos y se pasó por columnas, cada una de ellas con 4000 mL de resina macroporosa absorbente Amberlite XAD 7HP. Las columnas se lavaron con 5 volúmenes de agua y 2 volúmenes de etanol al 20 % (v/v). Los glucósidos absorbidos se eluyeron con etanol al 50 %. El eluato obtenido se pasó por columnas llenas de las resinas de intercambio iónico Amberlite FPC23 (H⁺) y Amberlite FPA51 (OH⁻). El etanol se evaporó y la solución de agua desalinizada y decolorada se concentró a 60 °C en vacío para después secarse en forma de polvo mediante el secado por pulverización en laboratorio. Se obtuvieron 140 gramos de producto (muestra 2).

EJEMPLO 4

Preparación del compuesto glicosilado de estevia

[0066] Se suspendieron 100 g de almidón de tapioca en 300 mL de agua (pH 6.5). Se añadieron 2 KNU de α -amilasa (Termamyl Classic, Novozymes, Dinamarca) y 30 unidades de CGTasa obtenida según el EJEMPLO 1, y la licuefacción del almidón a dextrosa se realizó a 80 °C durante una hora equivalente a 15. El pH de la mezcla de la reacción se ajustó a 2.8 con ácido clorhídrico y la mezcla se hirvió a 100 °C durante 5 minutos para inactivar las enzimas. Tras enfriarla a 65 °C, se ajustó el pH a 6.0 con una solución de hidróxido de sodio. Al almidón licuado se le 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, un 1,7 % de rebaudiósido F y otros glucósidos que en conjunto suponían un 96,4 % de contenido en glucósidos. Esta mezcla se removió hasta obtener 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 agitándose continuamente. La mezcla de la reacción obtenida se calentó a 95 °C durante 15 minutos para inactivar las enzimas. Se añadieron 20 gramos de carbón activo y la mezcla se calentó a 75 °C y se dejó reposar durante 30 minutos. Luego se filtró la mezcla y el filtrado se pasó por columnas llenas de las resinas de intercambio iónico Amberlite FPC23 (H⁺) y Amberlite FPA51 (OH⁻). Se obtuvieron 195 gramos de producto.

EJEMPLO 5

Preparación del compuesto glicosilado de estevia

[0067] Se suspendieron 100 g de almidón de tapioca en 300 mL de agua (pH 6.5). Se añadieron 2 KNU de α -amilasa (Termamyl Classic, Novozymes, Dinamarca) y 30 unidades de CGTasa obtenida según el EJEMPLO 1, y la licuefacción del almidón a dextrosa se realizó a 80 °C durante una hora equivalente a 15. El pH de la mezcla de la reacción se ajustó a 2.8 con ácido clorhídrico y la mezcla se hirvió a 100 °C durante 5 minutos para inactivar las enzimas. Tras enfriarla a

ES 2 728 234 T3

65 °C, se ajustó el pH a 6.0 con una solución de hidróxido de sodio. Al almidón licuado se le añadieron 100 g de extracto de estevia transglicosilado obtenido según el EJEMPLO 4. Esta mezcla se removió hasta obtener 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 agitándose continuamente. La mezcla de la reacción obtenida se calentó a 95 °C durante 15 minutos para inactivar las enzimas. Se añadieron 20 gramos de carbón activo y la mezcla se calentó a 75 °C y se dejó reposar durante 30 minutos. Luego se filtró la mezcla y el filtrado se diluyó en agua con un 5 % de sólidos y se pasó por columnas, cada una de ellas con 4000 mL de resina macroporosa absorbente Amberlite XAD 7HP. Las columnas se lavaron con 5 volúmenes de agua y 2 volúmenes de etanol al 20 % (v/v). Los glucósidos absorbidos se eluyeron con etanol al 50 %. El eluato obtenido se pasó por columnas llenas de las resinas de intercambio iónico Amberlite FPC23 (H⁺) y Amberlite FPA51 (OH⁻). El etanol se evaporó y la solución de agua desalinizada y decolorada se concentró a 60 °C en vacío para después secarse en forma de polvo mediante el secado por pulverización en laboratorio. Se obtuvieron 105 gramos de producto (muestra 3).

EJEMPLO 5

Zumo de naranja bajo en calorías

- 15 **[0068]** Se mezcló y disolvió totalmente en agua (hasta el 100 %) concentrado de zumo de naranja (35 %), ácido cítrico (0,35 %), colorante naranja (0,01 %), saborizante de naranja (0,20 %), rebaudiósido A (0,003 %) y distintos compuestos glicosilados de estevia (0,03 % para las muestras 1 y 3, y 0,04 % para la muestra dos), todo lo cual se pasteurizó posteriormente. Los compuestos glicosilados de estevia estaban representados por las muestras 1, 2 y 3, obtenidas según los EJEMPLOS 2, 3 y 5, respectivamente.
- 20 **[0069]** Las valoraciones organolépticas de las muestras se resumen en la tabla 3. Los datos muestran que los mejores resultados se pueden obtener usando el compuesto glicosilado de estevia de gran pureza (que contiene hasta 20 residuos de α -1,4-glicosil) (muestra 2). Específicamente, las bebidas preparadas con la muestra dos mostraron un perfil de sabor y una sensación en boca plenos y completos.

Tabla 3

Evaluación de las muestras de zumo			
Muestra	Comentarios		
	Sabor	Regusto	Sensación en boca
Núm. 1	Dulce, notas de regaliz	Ligero amargor y regusto	No aceptable
Núm. 2	Dulzor de gran calidad, sabor agradable parecido a la sacarosa, sabor pleno y equilibrado	Limpio, sin amargor ni regusto	Llena
Núm. 3	Dulce, notas de regaliz	Ligero amargor y regusto	No aceptable

25

ES 2 728 234 T3

[0070] Se puede usar el mismo método para preparar zumos y refrescos de otras frutas, como manzana, limón, albaricoque, cereza, piña, mango, etc.

EJEMPLO 7

Bebida carbonatada baja en calorías

5 **[0071]** Se preparó una bebida carbonatada según la fórmula que se presenta a continuación.

Ingredientes	Cantidad, %		
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
Sacarosa	5,5	5,5	5,5
Saborizante de 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
Rebaudiósido A	0,003	0,003	0,003
Compuesto glicosilado de estevia	0,05	0,05	0,05
Agua carbonatada	a 100	a 100	a 100

[0072] 20 participantes evaluaron sus propiedades organolépticas. Los resultados se resumen en la tabla 4.

Tabla 4

Evaluación de las muestras de bebidas carbonatadas bajas en calorías			
Característica de sabor	Número de participantes que han detectado la característica.		
	Muestra núm. 1	Muestra núm. 2	Muestra núm. 3
Sabor amargo	10	0	11
Sabor astringente	12	0	10
Regusto	14	0	14
Comentarios			

ES 2 728 234 T3

Calidad del sabor dulce	Regusto amargo (10 de 20)	Limpio (20 de 20)	Regusto amargo (12 de 20)
Evaluación global	Satisfactoria (3 de 20)	Satisfactoria (20 de 20)	Satisfactoria (4 de 20)

[0073] Los resultados anteriores muestran que las bebidas preparadas usando la muestra 2 poseían las mejores características organolépticas.

EJEMPLO 8

5 Galletas dietéticas

[0074] En una máquina de amasar se mezcló bien harina (50,0 %), margarina (30,0 %), fructosa (10,0 %), maltitol (8,0 %), leche entera (1,0 %), sal (0,2 %), levadura artificial (0,15 %), vanillina (0,1 %) y distintos compuestos glicosilados de estevia (0,03 % para las muestras 1 y 3, y 0,04 % para la muestra 2). La masa obtenida se moldeó y horneó a 200 °C durante 15 minutos. Los compuestos glicosilados de estevia estaban representados por las muestras 1, 2 y 3, obtenidas según los EJEMPLOS 2, 3 y 5, respectivamente.

[0075] 20 participantes evaluaron sus propiedades organolépticas. Los mejores resultados se obtuvieron en las muestras en las que se usó el compuesto glicosilado de estevia de gran pureza que contiene derivados con hasta 20 residuos de α -1,4-glicosil (muestra 2). Los participantes indicaron que el perfil de sabor y la sensación en boca de las galletas preparadas con la muestra 2 eran plenos y completos.

15 EJEMPLO 9

Yogur

[0076] Se disolvieron distintos compuestos glicosilados de estevia (0,03 % para las muestras 1 y 3, y 0,04 % para la muestra 2) y sacarosa (4 %) en leche con bajo contenido en grasa. Los compuestos glicosilados de estevia estaban representados por las muestras 1, 2 y 3, obtenidas según los EJEMPLOS 2, 3 y 5, respectivamente. Tras pasteurizar la mezcla a 82 °C durante 20 minutos, la leche se enfrió a 37 °C. Se añadió un cultivo de inicio (3 %) y se incubó la mezcla a 37 °C durante 6 horas, y después a 5 °C durante 12 horas.

[0077] 20 participantes evaluaron sus propiedades organolépticas. Los mejores resultados se obtuvieron en las muestras en las que se usó el compuesto glicosilado de estevia de gran pureza que contiene derivados con hasta 20 residuos de α -1,4-glicosil (muestra 2). Los participantes indicaron que el perfil de sabor y la sensación en boca de los yogures preparados con la muestra 2 eran plenos y completos.

[0078] Debe entenderse que las descripciones precedentes y las realizaciones específicas que se exponen en este documento se proporcionan únicamente con fines ilustrativos del mejor modo de uso de la invención y de sus principios, y que quienes estén versados en la técnica podrán idear fácilmente modificaciones y adiciones dentro del ámbito de la invención, que por tanto se entiende limitado únicamente en el ámbito de las reivindicaciones anexas.

30

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir un compuesto glicosilado de estevia de gran pureza, que comprende los siguientes pasos:

echar almidón en agua para conseguir una suspensión de almidón;

5 añadir una mezcla de α -amilasa y CGTasa a la suspensión de almidón e incubarla entre media hora y dos horas a unos 75-80 °C, lo que resultará en una primera suspensión licuada de almidón;

inactivar la α -amilasa mediante un tratamiento térmico de bajo pH;

enfriar la primera suspensión licuada de almidón y ajustar el pH a entre 5.5 y 7.0;

añadir glucósidos de esteviol en la primera suspensión licuada de almidón, lo que resulta en una primera mezcla de reacción;

10 añadir CGTasa en la primera mezcla de reacción e incubarla entre 12 y 48 horas a unos 55-75 °C;

eliminar los maltooligosacáridos no reactivos aplicando la primera mezcla de reacción a resina macroporosa absorbente y posteriormente eluyendo los glucósidos diterpénicos absorbidos con etanol acuoso para obtener un primer eluato de etanol acuoso que contiene glucósidos;

eliminar el etanol del primer eluato de etanol acuoso, lo que resulta en un primer eluato acuoso;

15 concentrar y secar el primer eluato acuoso para obtener el primer compuesto seco glicosilado de estevia;

preparar una segunda suspensión licuada de almidón del mismo modo que la primera;

añadir el primer compuesto seco glicosilado de estevia la segunda suspensión licuada de almidón, lo que resulta en la segunda mezcla de reacción;

añadir CGTasa en la segunda mezcla de reacción e incubarla entre 12 y 48 horas a unos 55-75 °C;

20 inactivar la enzima en la segunda mezcla de reacción mediante tratamiento término;

decolorar la segunda mezcla de reacción;

eliminar los compuestos no diterpénicos aplicando la segunda mezcla de reacción decolorada con resina macroporosa absorbente y posteriormente eluyendo los glucósidos diterpénicos absorbidos con etanol acuoso para obtener un segundo eluato de etanol acuoso que contiene glucósidos;

25 desalinizar el segundo eluato de etanol acuoso que contiene glucósidos con resinas de intercambio iónico;

eliminar el etanol del segundo eluato de etanol acuoso para obtener el compuesto glicosilado de estevia de gran pureza;

el compuesto glicosilado de estevia de gran pureza incluye glucósidos de esteviol y sus derivados con hasta veinte residuos de α -1,4-glicosil.

ES 2 728 234 T3

2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la mezcla de α -amilasa y CGTasa contiene entre 0,001-0,2 KNU de α -amilasa por cada unidad de CGTasa.
3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el peso de los glucósidos de esteviol añadidos es igual al del almidón usado para preparar la primera suspensión licuada de almidón.
- 5 4. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que los glucósidos de esteviol añadidos se seleccionan del grupo formado por el esteviósido, el rebaudiósido A, el rebaudiósido B, el rebaudiósido C, el rebaudiósido D, el rebaudiósido E, el rebaudiósido F, el dulcósido A, el esteviolbiósido, el rubusósido y otros glucósidos de esteviol que se encuentran en la planta de *Stevia rebaudiana Bertoni* y mezclas de esta.
- 10 5. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el peso del primer compuesto glicosilado seco de estevia es igual al del almidón empleado para preparar la segunda suspensión licuada de almidón.
6. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el primer compuesto glicosilado seco de estevia incluye el esteviósido, el rebaudiósido A, el rebaudiósido B, el rebaudiósido C, el rebaudiósido D, el rebaudiósido E, el rebaudiósido F, el dulcósido A, el esteviolbiósido, el rubusósido y derivados de α -1,4-glicosil con hasta nueve residuos de α -1,4-glicosil.
- 15 7. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la CGTasa es producida por cultivos de *Bacillus stearothermophilus*.
8. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la CGTasa se añade en una proporción de unas 0,2-4 unidades por gramo de sólidos.
9. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la eliminación de los maltooligosacáridos y de los compuestos no diterpénicos se realiza con diversas columnas conectadas secuencialmente y rellenas de resina macroporosa absorbente, para después lavar las columnas con agua, seguida de etanol al 10-50 % (v/v), desconectar las columnas y finalmente eluir cada columna individualmente con etanol al 30-100 %.
- 20 10. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el compuesto glicosilado de estevia de gran pureza tiene al menos un 95 % de glucósidos de esteviol en forma anhidra.
- 25 11. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el compuesto glicosilado de estevia de gran pureza tiene menos del 10 % de glucósidos de esteviol no reactivos en forma anhidra.

FIG. 1

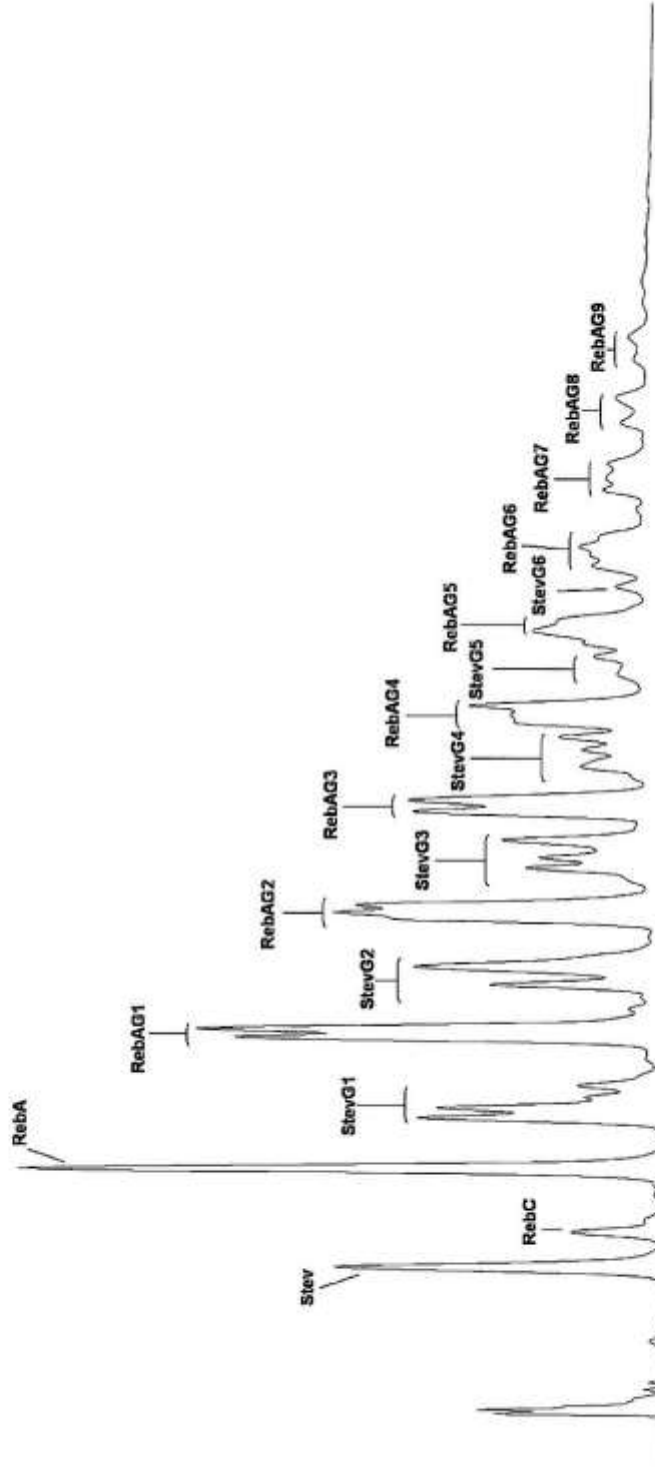
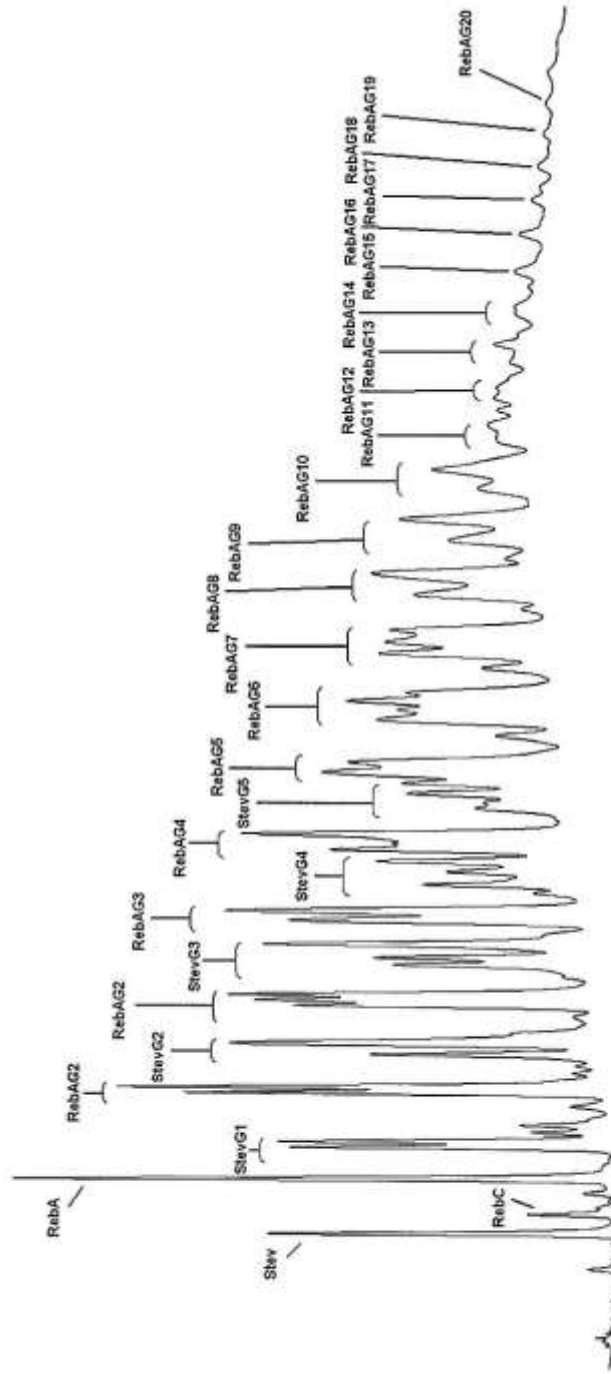


FIG. 2



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

Esta lista de referencias citadas por el solicitante quiere únicamente ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto un gran cuidado en su concepción, no se pueden excluir errores u omisiones y la OEB declina toda responsabilidad a este respecto.

5 Documentos de-patente citados en la descripción

- US 4361697 A [0006]
- US 4082858 A [0006]
- US 4892938 A [0006]
- US 5972120 A [0006]
- US 5962678 A [0006]
- US 7838044 B [0006]
- US 7862845 B [0006]
- US 4219571 A [0010]
- US 7807206 B [0010]
- KR 100888694 B1 [0012]

Literatura no-patente que se cita en la descripción

- **S.S., COOK, J.M.** Stability studies of stevioside and Rebaudioside A in carbonated beverages. *J. Agric. Food Chem.*, 1983, vol. 31, 409-412 [0004]
- **TANAKA O.** Improvemet of taste of natural sweet-ners. *Pure Appl.Chem.*, 1987,vol.69,675-683[0005][0011]
- Stevia: steps in developing a new sweetener. **PHIL-LIPS K.C.** Developments in sweeteners. Elsevier Aplied Science, 1989, vol.3, 1-43 [0005]
- **PRAKASH I.; DUBOIS G.E.; CLOS J.F.; WILKENS K.L.; FOSDICK L.E.** Developments of rebiana, a natural , non-caloric sweetener. *Food Chem. Toxicol.*, 2008, vol. 46, S75-S82 [0007]
- **LOBOV S.V.; JASAIR.; OHTANIK.;TANAKA O.;YAMASAKI K.** Enzymatic production of sweet stevioside derivatives;transglycosylation by glucosidasses. *Agric. Biol. Chem.*, 1991, vol.55, 2959-2965 [0009]
- **KITAHATA S.; ISHIKAWA S.; MIYATA T.; TANAKA O.** Production of rubusoside derivatives by transglycosylation of various β -galactosidase. *Agric. Biol. Chem.* 1989, vol. 53, 2923-2928 [0009]
- **YAMAMOTO K.; YOSHIKAWA K.; OKADA S.** Efective production of glucosyl-stevioside by α -1,6 transglucosylation of dextran dextranase. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 1994, vol. 58, 1657-1661[0009]
- **HALE W.S.;RAWLINS L.C.** Amylase of Bacillus macerans. *Cereal Chem.*,1951,vol.28,49-58[0027]