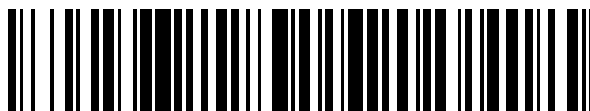


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 779 252**

51 Int. Cl.:

**A23G 3/00** (2006.01)

**A23L 27/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.05.2013 PCT/US2013/041609**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2014 WO14185931**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2013 E 13884677 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 2996486**

54 Título: **Procedimiento para obtener una composición de estevia**

30 Prioridad:

**15.05.2013 US 201313885591**

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

**14.08.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**MARKOSYAN, AVETIK**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 779 252 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

Procedimiento para obtener una composición de estevia

**Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

- 5 La invención se define mediante las reivindicaciones. Se refiere a un procedimiento para producir una composición de estevia que comprende rebaudiósido B tal como se define mediante las reivindicaciones.

**Descripción de la técnica relacionada**

10 Las alternativas al azúcar están recibiendo una atención creciente debido a la concienciación sobre muchas enfermedades asociadas con el consumo de alimentos y bebidas con alto contenido de azúcar. Sin embargo, muchos edulcorantes artificiales tales como dulcina, ciclamato de sodio y sacarina se han prohibido o restringido en algunos países debido a la preocupación sobre su seguridad. Como resultado, los edulcorantes no calóricos de origen natural se están volviendo cada vez más populares. La hierba dulce *Stevia rebaudiana* Bertoni produce varios glicósidos de diterpeno que presentan un dulzor de alta intensidad y propiedades organolépticas superiores a las de muchos otros edulcorantes de alta potencia.

15 Los glicósidos dulces mencionados anteriormente, tienen una aglicona común, esteviol, y difieren en el número y tipo de residuos de hidratos de carbono en las posiciones C13 y C19. Las hojas de estevia pueden acumular hasta el 10-20% (en base de peso seco) de glicósidos de esteviol. Los principales glicósidos encontrados en las hojas de 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 en niveles mucho menores (aproximadamente el 0-0,2%).

20 Dos glicósidos principales, esteviósido y rebaudiósido A (reb A), se estudiaron de manera extensa y se caracterizaron en cuanto a su idoneidad como edulcorantes de alta intensidad comerciales. Los estudios de estabilidad en bebidas con gas confirmaron su estabilidad al calor y al 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 Los glicósidos de esteviol difieren entre sí no sólo en sus estructuras moleculares, sino también por sus propiedades de gusto. Habitualmente, se encuentra que el esteviósido es de 110-270 veces más dulce que la sacarosa, el rebaudiósido A entre 150 y 320 veces más dulce que la sacarosa y el rebaudiósido C entre 40-60 veces más dulce que la sacarosa. El dulcósido A es 30 veces más dulce que la sacarosa. El rebaudiósido A tiene el regusto menos astringente, el menos amargo y el menos persistente, poseyendo así los atributos organolépticos más favorables en 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). La estructura química del rebaudiósido A se muestra en la figura 1.

30 Se describen métodos para la extracción y purificación de glicósidos dulces de la planta de *Stevia rebaudiana* usando agua o disolventes orgánicos en, por ejemplo, las patentes estadounidenses números 4.361.697; 4.082.858; 4.892.938; 5.972.120; 5.962.678; 7.838.044 y 7.862.845.

35 Sin embargo, incluso en un estado muy purificado, los glicósidos de esteviol todavía poseen atributos de gusto indeseables tales como amargor, regusto dulce, sabor a regaliz, etc. Uno de los principales obstáculos para la comercialización exitosa de edulcorantes de estevia son estos atributos de gusto indeseables. Se demostró que estas notas de sabor se vuelven más prominentes 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.).

40 El rebaudiósido B (n.º de CAS: 58543-17-2), o reb B, también denominado esteviósido A<sub>4</sub> (Kennelly E.J. (2002) Constituents of *Stevia rebaudiana* In *Stevia: The genus Stevia*, Kinghorn A.D. (Ed), Taylor & Francis, Londres, pág. 71), es uno de los glicósidos dulces encontrados en *Stevia rebaudiana*. Las evaluaciones organolépticas muestran que el reb B era aproximadamente 300-350 veces más dulce que la sacarosa, mientras que para el reb A este valor era de aproximadamente 350-450 (Crammer, B. e Ikan, R. (1986) Sweet glycosides from the Stevia plant. Chemistry in Britain 22, 915-916, y 918). La estructura química del rebaudiósido B se muestra en la figura 2.

45 Se cree que el reb B se forma a partir de la hidrólisis parcial del rebaudiósido A durante el procedimiento de extracción (Kobayashi, M., Horikawa, S., Degrandi, I.H., Ueno, J. y Mitsuhashi, H. (1977) Dulcosides A y B, new diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*. Phytochemistry 16, 1405-1408). Sin embargo, una investigación adicional ha demostrado que el reb B se produce de manera natural en las hojas de *Stevia rebaudiana* y es actualmente uno de los nueve glicósidos de esteviol reconocidos por el FAO/JECFA (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura/Informe conjunto del Comité de Expertos sobre aditivos alimentarios) en el cálculo de contenido total de glicósidos de esteviol en preparaciones de glicósidos de esteviol comerciales (FAO

JECFA (2010) Steviol Glycosides, Compendium of Food Additive Specifications, FAO JECFA Monographs 10, 17-21).

Sólo se describen unos pocos métodos en la bibliografía para preparar reb B.

5 Kohda *et al.*, (1976) prepararon reb B por hidrólisis de reb A con hesperidinas. Reb B también se preparó mediante saponificación alcalina de reb A. Dicha saponificación se realizó en hidróxido de potasio al 10%-etanol. Se acidificó la disolución con ácido acético, y se extrajo con n-butanol. Se lavó la fase de butanol con agua y se concentró a baja temperatura a vacío. Se cristalizó el residuo del metanol para dar reb B. (Kohda, H., Kasai, R., Yamasaki, K., Murakami, K. y Tanaka, O. (1976) New sweet diterpene glucosides from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry* 15, 981-983). Los procedimientos descritos pueden ser adecuados para la preparación a escala de laboratorio de reb B, pero  
10 no son adecuados para ninguna preparación de reb B comercial o a gran escala. Tal como se da a conocer en el documento WO 2012/166164, pueden prepararse composiciones de estevia que comprenden reb B a partir de composiciones que comprenden reb A usando biocatalizadores que pueden hidrolizar enlaces de ésteres beta-glucosílicos, entre las que se dan a conocer hesperidinas y beta-glucosidasas.

15 Ahmed *et al.*, usaron hidrólisis alcalina suave de reb A para preparar reb B. Según el procedimiento descrito, reb A se hidrolizó para dar reb B sometiendo a reflujo con KOH acuoso al 10% a 100°C durante 1 h. Después de la neutralización con ácido acético glacial, se recristalizó la sustancia precipitada dos veces a partir de metanol (Ahmed M.S., Dobberstein R.H., y Farnsworth N.R. (1980) *Stevia rebaudiana*: I. Use of p-bromophenacyl bromide to enhance ultraviolet detection of watersoluble organic acids (steviolbioside and rebaudioside B) in high-performance liquid chromatographic analysis, *J. Chromatogr.*, 192, 387-393).

20 El uso de metanol como medios de recristalización tal como se describe en la bibliografía requerirá su retirada posterior del producto. Se indica que la manipulación de sustancias tóxicas tales como metanol requiere instalaciones de fabricación especializadas y, cuando se aplica en el procesamiento de alimentos, medidas de seguridad alimentaria sofisticadas.

25 También se indica que no se ha realizado un trabajo significativo para determinar el potencial de reb B como edulcorante o componente alimenticio. Además, reb B se visualiza a menudo como un artificio del procedimiento y una impureza innecesaria en las preparaciones de glicósidos de esteviol comerciales. No se ha realizado una evaluación significativa de la influencia de reb B sobre el perfil de sabor global de preparaciones de glicósidos de esteviol.

30 La solubilidad en agua de reb B se notifica que es aproximadamente del 0,1% (Kinghorn A.D. (2002) *Constituents of Stevia rebaudiana* In *Stevia: The genus Stevia*, Kinghorn A.D. (Ed), Taylor & Francis, Londres, pág. 8). En muchos procedimientos alimentarios en los que se usan componentes muy concentrados, será necesaria una forma muy soluble de reb B.

35 Considerando los hechos mencionados anteriormente, existe la necesidad de evaluar el reb B como edulcorante y componente alimenticio y de desarrollar un procedimiento simple y eficiente para preparaciones de reb B de calidad alimenticia adecuado para alimentos y otras aplicaciones.

Dentro de la descripción de esta invención se demostrará que, cuando se aplica de una manera específica, el reb B puede incidir sobre el perfil de sabor y ofrecer ventajas significativas para el uso de edulcorantes de estevia en diversas aplicaciones.

### Sumario

40 La presente invención se define mediante las reivindicaciones. Por consiguiente, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir una composición de estevia que comprende rebaudiósido B, que comprende las etapas de: proporcionar un edulcorante de estevia que comprende rebaudiósido A; proporcionar un biocatalizador que puede hidrolizar los enlaces de los ésteres  $\beta$ -glucosílicos en el edulcorante de estevia, en el que el biocatalizador es lactasa; disolver el edulcorante de estevia y añadir el biocatalizador para elaborar una mezcla de  
45 reacción; incubar la mezcla de reacción durante aproximadamente de 12 a 48 horas para hidrolizar al menos parcialmente los enlaces de los ésteres  $\beta$ -glucosílicos en el edulcorante de estevia; enfriar la mezcla hasta aproximadamente 10-30°C y ajustar el pH con ácido a aproximadamente pH 3,0-4,0; incubar la mezcla a baja temperatura para obtener un precipitado; separar el precipitado y lavar el precipitado con agua; y secar el precipitado lavado para obtener la composición de estevia. La invención se dirige a superar las desventajas de los edulcorantes  
50 de estevia existentes. También se describe en el presente documento un procedimiento para producir un componente alimenticio de alta pureza a partir del extracto de la planta de *Stevia rebaudiana* Bertoni y el uso del mismo en diversos productos alimenticios y bebidas como modificador del dulzor y el sabor.

55 La divulgación, en parte, se refiere a un componente que comprende glicósidos de esteviol de la planta de *Stevia rebaudiana* Bertoni. Los glicósidos de esteviol se seleccionan del grupo que consiste en esteviósido, rebaudiósido A (figura 1), rebaudiósido B (figura 2), rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, dulcósido A, esteviolbiosido, rubusósido, así como otros glicósidos de esteviol encontrados en la planta de *Stevia rebaudiana* Bertoni y mezclas de los mismos.

La divulgación, en parte, se refiere a un procedimiento para producir un componente que contiene rebaudiósido *B* y esteviósido, rebaudiósido *A*, rebaudiósido *C*, rebaudiósido *D*, rebaudiósido *E*, rebaudiósido *F*, dulcósido *A*, esteviolbiósido, rubusósido, así como otros glicósidos de esteviol encontrados en la planta de *Stevia rebaudiana* Bertoni y mezclas de los mismos.

- 5 En el presente documento, puede usarse rebaudiósido *A* comercializado por PureCircle Sdn. Bhd. (Malasia), que contiene, rebaudiósido *A* (aproximadamente el 95-100%), esteviósido (aproximadamente el 0-1%), rebaudiósido *C* (aproximadamente el 0-1%), rebaudiósido *F* (aproximadamente el 0-1%), rebaudiósido *B* (aproximadamente el 0,1-0,8%), rebaudiósido *D* (aproximadamente el 0-1%), y otros glicósidos que ascienden a un contenido total de glicósidos de esteviol de al menos el 95%, como material de partida. Alternativamente, pueden usarse extractos de  
10 estevia con diferentes razones de glicósidos de esteviol como materiales de partida.

El material de partida se somete a una conversión completa o parcial para dar reb *B* usando un biocatalizador que puede hidrolizar enlaces de los ésteres  $\beta$ -glucosílicos. Las mezclas de glicósidos obtenidas pueden usarse "tal cual" así como recuperando reb *B* de la mezcla y usándolo como un componente puro.

El reb *B* de baja solubilidad puede someterse a un tratamiento térmico adicional para aumentar la solubilidad.

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

Se entenderá que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son explicativas y están destinadas a proporcionar una explicación adicional de la invención tal como se reivindica.

## 20 **Breve descripción de los dibujos**

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

La figura 1 muestra la estructura química del rebaudiósido *A*.

- 25 La figura 2 muestra the estructura química del rebaudiósido *B*

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

## **Descripción detallada**

- 30 Las ventajas de la presente invención resultarán más evidentes a partir de la descripción detallada dada a continuación en el presente documento.

- Puede usarse rebaudiósido *A* comercializado por PureCircle Sdn. Bhd. (Malasia), que contiene, rebaudiósido *A* (aproximadamente el 95-100%), esteviósido (aproximadamente el 0-1%), rebaudiósido *C* (aproximadamente el 0-1%), rebaudiósido *D* (aproximadamente el 0-1%), rebaudiósido *F* (aproximadamente el 0-1%), rebaudiósido *B* (aproximadamente el 0,1-0,8%) y otros glicósidos que ascienden a un contenido total de glicósidos de esteviol de al  
35 menos aproximadamente el 95%, como material de partida. Alternativamente, pueden usarse extractos de estevia con diferentes razones de glicósidos de esteviol como materiales de partida.

- El análisis de HPLC de los productos y materiales de partida puede realizarse en un cromatógrafo de líquidos Agilent Technologies 1200 Series (EE.UU.), equipado con una columna Phenomenex Prodigy ODS3, 5  $\mu$ m (4,6X250mm) a 40°C. La fase móvil era una mezcla 32:68 de acetonitrilo y tampón de fosfato de sodio 10 mmol/l (aproximadamente  
40 pH 2,6) a 1 ml/min. Un detector por red de diodos fijado a 210 nm puede usarse como detector. Un ejemplo de un cromatograma de HPLC obtenido así se muestra en la figura 3.

Tal como se usa en el presente documento, a menos que se especifique adicionalmente, "reb *B*" y "composición de reb *B*" se usarán de manera intercambiable para referirse a rebaudiósido *B* purificado o rebaudiósido *B* en combinación con cualquier otra entidad química.

- 45 **Preparación de Reb B**

### 1. Conversión biocatalítica

- En un aspecto descrito en el presente documento, reb *A* se dispersa en agua para formar una disolución. La concentración de reb *A* es de aproximadamente el 0-50% (p/v) preferiblemente de aproximadamente el 10-25%. Una  
50 preparación de enzimas seleccionadas del grupo de esterasas, lipasas, celulasas, hemicelulasas, hesperidinasas, lactasas y  $\beta$ -glucosidasas, o cualquier enzima que pueda hidrolizar enlaces de los ésteres  $\beta$ -glucosílicos, o células libres o inmovilizadas, o cualquier otro biocatalizador que pueda hidrolizar enlaces de los ésteres  $\beta$ -glucosílicos (las

preparaciones de enzimas, enzimas, células libres o inmovilizadas, y otros biocatalizadores a continuación en el presente documento se denominan de manera colectiva “biocatalizadores”) se añaden a una disolución de reb A para formar la mezcla de reacción. Se incuba la mezcla a aproximadamente 10-150°C, preferiblemente de aproximadamente 30-100°C, durante un periodo de aproximadamente 0,5-72 h, preferiblemente de aproximadamente 1-48 h. Como resultado, el reb A se hidroliza para dar reb B. El rendimiento molar de la conversión de reb B es de aproximadamente el 5-100%, preferiblemente de aproximadamente el 90-100%.

Después de la reacción, se inactiva el biocatalizador mediante calentamiento o retirada de la mezcla de reacción. Se ajusta el pH de la mezcla obtenida mediante un ácido, preferiblemente mediante ácido sulfúrico o ácido ortofosfórico, hasta que se alcanza un pH de aproximadamente 3,0-5,0, hasta que se alcanza preferiblemente un pH de aproximadamente 3,0-4,0. Tras la acidificación, se forma un precipitado. Se separa el precipitado mediante cualquier método conocido en la técnica tal como filtración o centrifugación y se lava con agua hasta que el agua alcanza un pH de aproximadamente 4,0-5,0. Se seca el material cristalino obtenido a vacío a aproximadamente 60-105°C para proporcionar una mezcla de reb A y reb B que tiene una razón de aproximadamente el 1%:99% a aproximadamente el 99%:1% (p/p), preferiblemente de aproximadamente el 5%:95% a aproximadamente el 1%:99% (p/p).

## 2. Purificación opcional tras la conversión

Para obtener reb B purificado, puede suspenderse el precipitado separado descrito anteriormente en agua y se somete la mezcla a agitación continua a lo largo de aproximadamente 0,5-24 h, preferiblemente de aproximadamente 1-3 horas, a aproximadamente 50-100°C, preferiblemente de aproximadamente 60-80°C. La razón de precipitado con respecto a agua (p/v) es de aproximadamente 1:5 a aproximadamente 1:20, preferiblemente de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:15. Se separan los cristales lavados y se secan a vacío a aproximadamente 60-105°C para proporcionar reb B con aproximadamente el 99% de pureza.

## 3. Mejora opcional de la solubilidad tras la conversión

El siguiente procedimiento puede usarse para aumentar la solubilidad en agua de reb B o cualquier composición de reb B. Las composiciones obtenidas tienen generalmente una solubilidad en agua de menos de aproximadamente el 0,2% (p/v). Para aumentar la solubilidad de estas composiciones, se combinaron las composiciones con el agua a una razón de aproximadamente 1:1 (p/p) y se sometió adicionalmente la mezcla obtenida a un tratamiento térmico en gradiente que dio como resultado una disolución de alta estabilidad y alta concentración. El gradiente de aproximadamente 1°C por minuto se usó en el calentamiento de la mezcla. Se calentó la mezcla hasta la temperatura de aproximadamente 110-140°C, preferiblemente de aproximadamente 118-125°C y se mantuvo a temperatura máxima durante aproximadamente 0-120 min, preferiblemente de aproximadamente 50-70 min. Después del tratamiento térmico, se enfrió la disolución hasta temperatura ambiente a un gradiente de aproximadamente 1°C por minuto. Se secó por pulverización la disolución mediante un secador por pulverización de laboratorio que funcionaba a temperaturas de entrada de aproximadamente 175°C y de salida de aproximadamente 100°C. Se obtuvo una forma amorfa de la composición con más de aproximadamente el 20% de solubilidad en agua a temperatura ambiente.

### Uso de composiciones de reb B

Las composiciones de reb B descritas anteriormente pueden usarse como potenciador del dulzor, potenciador del sabor y/o edulcorante en diversos productos alimenticios y de bebidas. Los ejemplos no limitativos de productos alimenticios y de bebidas incluyen refrescos con gas, bebidas listas para beber, bebidas energéticas, bebidas isotónicas, bebidas bajas en calorías, bebidas con cero calorías, bebidas deportivas, té, zumos de frutas y vegetales, bebidas de zumo, bebidas lácteas, bebidas de yogur, bebidas alcohólicas, bebidas en polvo, productos de pastelería, galletas, pastas, mezclas de horneado, cereales, dulces, golosinas, caramelos, chicle, productos lácteos, leche con sabor, yogures, yogures con sabor, leche fermentada, salsa de soja y otros productos a base de soja, aderezos de ensalada, mayonesa, vinagre, postres helados, productos cárnicos, productos de carne de pescado, alimentos embotellados y enlatados, edulcorantes de mesa, frutas y verduras.

De manera adicional las composiciones pueden usarse en preparaciones de fármacos o farmacéuticas y cosméticos, que incluyen, pero no se limitan a, dentífrico, colutorio, jarabe para la tos, comprimidos masticables, pastillas para chupar, preparaciones de vitaminas, y similares.

Las composiciones pueden usarse “tal cual” o en combinación con otros edulcorantes, agentes saborizantes y componentes alimenticios.

Los ejemplos no limitativos de edulcorantes incluyen glicósidos de esteviol, esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, dulcósido A, esteviolbiónido, rubusósido, así como otros glicósidos de esteviol encontrados en la planta de *Stevia rebaudiana* Bertoni y 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, fructo-oligosacáridos, inulina, inulo-oligosacáridos, azúcar de acoplamiento, malto-oligosacáridos, maltodextrinas, sólidos de jarabe de maíz, glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa, aspartamo, sacarina, sucralosa, alcoholes de azúcar.

Los ejemplos no limitativos de agentes saborizantes incluyen agentes saborizantes de limón, naranja, fruta, plátano, uva, pera, piña, almendra amarga, cola, canela, azúcar, algodón de azúcar, vainilla.

5 Los ejemplos no limitativos de otros componentes alimenticios incluyen agentes saborizantes, acidulantes, ácidos minerales, orgánicos y aminoácidos, agentes colorantes, esponjantes, almidones modificados, gomas, texturizadores, conservantes, antioxidantes, emulsionantes, estabilizadores, espesantes, agentes de gelificación.

Los siguientes ejemplos ilustran diversas realizaciones de la invención. Se entenderá que la invención no se limita a los materiales, proporciones, condiciones y procedimientos expuestos en los ejemplos, que son sólo ilustrativos.

#### Ejemplo 1 Preparación de composición de estevia

10 Se disolvió 1 g de rebaudiósido A producido por PureCircle Sdn. Bhd. (Malasia), que contenía, el 98,1% de rebaudiósido A, el 0,3% de esteviósido, 0,2 de rebaudiósido C, el 0,2% de rebaudiósido F, el 0,4% de rebaudiósido B y el 0,6% de rebaudiósido D en 10 ml de tampón fosfato 0,1 M (pH 7,0) y se le añadieron aproximadamente 0,1 ml de preparación de lactasa comercial (Maxilact® obtenido de DSM Food Specialties B.V. (Países Bajos). Se incubó la mezcla a 37°C durante 36 horas. Luego se llevó a ebullición la mezcla a 100°C durante 15 min y se filtró a través de la capa de carbón activo. Se ajustó la temperatura del filtrado hasta 20°C y se ajustó el pH hasta pH 4,0 con ácido orto-fosfórico. Se mantuvo la disolución en condiciones de agitación moderada durante 4 horas y se formó un precipitado. Se filtró el precipitado y se lavó sobre el filtro con 2000 ml de agua. Se secaron los cristales lavados a vacío para proporcionar 0,9 g de material que contenía aproximadamente el 80% de reb A y el 20% de reb B. La solubilidad en agua (a 25°C) del material obtenido era aproximadamente del 0,16% (p/v).

#### Ejemplo 2 Preparación de biocatalizador

20 Se inoculó una cepa de *Kluyveromyces lactis* St-3010 (PureCircle Sdn Bhd, Colección de Microorganismos Industriales, Malasia) en 8 litros de medio de cultivo esterilizado que contenía el 1,5% de lactosa, el 0,5% de rebaudiósido A, el 1,0% de peptona, el 0,5% de extracto de almidón y el 0,5% de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (pH 6,0) a 28°C durante 48 h con aireación continua (8 l/min) y agitación (300 rpm). Se centrifugó el caldo de cultivo obtenido a 4.500 g durante 20 min en una centrífuga Sigma 3-16 K (Alemania) para separar las células. Se lavaron posteriormente las células con agua desionizada para obtener 250 ml de biocatalizador.

#### Ejemplo 3 Preparación de composición de estevia

30 Se disolvió 1 g de rebaudiósido A producido por PureCircle Sdn. Bhd. (Malasia), que contenía, el 98,1% de rebaudiósido A, el 0,3% de esteviósido, 0,2 de rebaudiósido C, el 0,2% de rebaudiósido F, el 0,4% de rebaudiósido B y el 0,6% rebaudiósido D en 10 ml de tampón fosfato 0,1 M (pH 7,0) y se le añadieron aproximadamente 0,5 ml de biocatalizador preparado según el ejemplo 2. Se incubó la mezcla a 37°C durante 36 horas. Luego se llevó a ebullición la mezcla a 100°C durante 15 min y se filtró a través de la capa de carbón activo. Se ajustó la temperatura del filtrado hasta 20°C y se ajustó el pH hasta pH 4,0 con ácido orto-fosfórico. Se mantuvo la disolución en condiciones de agitación moderada durante 4 horas y se formó un precipitado. Se filtró el precipitado y se lavó sobre el filtro con 2000 ml de agua. Se secaron los cristales lavados a vacío para proporcionar aproximadamente 0,79 g de material que contenía aproximadamente el 2% de reb A y aproximadamente el 98% de reb B. La solubilidad en agua (a 25°C) del material obtenido era aproximadamente del 0,1% (p/v).

#### Ejemplo 4 Preparación de composición de estevia soluble

40 Se mezclaron 50 g del material preparado según el ejemplo 1 con 50 g de agua y se incubaron en baño termostático de aceite. Se aumentó la temperatura a 1°C por minuto hasta 121°C. Se mantuvo la mezcla a 121°C durante 1 hora y luego se disminuyó la temperatura hasta temperatura ambiente (25°C) a 1°C por minuto. Se secó la disolución usando un secador por pulverización de laboratorio YC-015 (Shanghai Pilottech Instrument & Equipment Co. Ltd., China) que funcionaba a temperaturas de entrada de 175°C y de salida de 100°C. Se obtuvo aproximadamente 45 g de un polvo amorfo con aproximadamente el 25% (p/v) de solubilidad en agua (a 25°C).

#### Ejemplo 5 Preparación de composición de estevia soluble

45 Se mezclaron 42 g de reb A producido por PureCircle Sdn. Bhd. (Malasia) con pureza del 99,2% (base seca) y 8 g de reb B preparado según el ejemplo 3 con 50 g de agua y se incubaron en un baño termostático de aceite. Se aumentó la temperatura a 1°C por minuto hasta 121°C. Se mantuvo la mezcla a 121°C durante 1 hora y luego se disminuyó la temperatura hasta temperatura ambiente (25°C) a 1°C por minuto. Se secó la disolución usando un secador por pulverización de laboratorio YC-015 (Shanghai Pilottech Instrument & Equipment Co. Ltd., China) que funcionaba a temperaturas de entrada de 175°C y de salida de 100°C. Se obtuvo aproximadamente 47 g de un polvo amorfo con aproximadamente el 1,5% (p/v) de solubilidad en agua (a 25°C).

#### Ejemplo 6 Bebida de zumo de naranja baja en calorías

Se combinaron concentrado de naranja (35%), ácido cítrico (0,35%), ácido ascórbico (0,05%), color rojo anaranjado (0,01%), sabor de naranja (0,20%) y el 0,05% composición de estevia, y se disolvieron completamente en agua

(hasta el 100%) y se pasteurizaron. La composición de estevia se seleccionó de un extracto de estevia comercial (que contenía el 26% de esteviósido, el 55% de rebaudiósido A y el 16% de otros glicósidos), un rebaudiósido A comercial (que contenía el 98,2% de reb A) o un material obtenido según el ejemplo 5.

- 5 Las evaluaciones sensoriales de las muestras se resumen en la tabla 1. Los datos muestran que los mejores resultados pueden obtenerse usando la composición obtenida según el ejemplo 5. Particularmente, las bebidas preparadas con dicha composición presentaban una sensación en boca y un perfil de sabor desarrollados y completos.

Tabla 1 Evaluación de muestras de bebida de zumo de naranja

Muestra	Comentarios		
	Sabor	Regusto	Sensación en boca
Extracto de estevia	Dulce, notas de regaliz	Amargor y regusto	No aceptable
Reb A	Dulce, ligeras notas de regaliz	Ligero amargor y regusto	No aceptable
Ejemplo 5	Dulzor de alta calidad, sabor agradable similar a la sacarosa, sabor desarrollado y equilibrado	Limpio, sin amargor ni regusto	Completa

- 10 El mismo método puede usarse para preparar zumos y bebidas de zumo a partir de otras frutas, tales como manzanas, limones, albaricoques, cerezas, piñas, mangos, etc.

Ejemplo 7 Bebida con gas con cero calorías

Se prepararon bebidas con gas según las fórmulas presentadas en la tabla 2.

Tabla 2 Fórmulas de bebidas con gas

Componentes	Cantidad, %		
	Extracto de estevia	Reb A	Ejemplo 5
Sabor a cola	0,340	0,340	0,340
Ácido orto-fosfórico	0,100	0,100	0,100
Citrato de sodio	0,310	0,310	0,310
Benzoato de sodio	0,018	0,018	0,018
Ácido cítrico	0,018	0,018	0,018
Composición de estevia	0,050	0,050	0,050
Agua con gas	hasta 100	hasta 100	hasta 100

Se evaluaron las propiedades sensoriales por 20 especialistas. Los resultados se resumen en la tabla 3.

- 15 Tabla 3 Evaluación de muestras de bebidas carbonatadas sin calorías

Atributo de sabor	Número de especialistas que detectaron el atributo		
	Extracto de estevia	Reb A	Ejemplo 5
Gusto amargo	15	10	0
Gusto astringente	16	9	0
Regusto	14	12	0
Comentarios			
Calidad de gusto dulce	Regusto amargo (15 de 20)	Regusto amargo (10 de 20)	Limpio (20 de 20)
Evaluación global	Satisfactorio (1 de 20)	Satisfactorio (5 de 20)	Satisfactorio (20 de 20)

Los resultados anteriores muestran que las bebidas preparadas usando la composición obtenida según el ejemplo 5 poseían las mejores características organolépticas.

Ejemplo 8 Galletas dietéticas

5 Se amasaron bien harina (50,0%), margarina (30,0%) fructosa (10,0%), maltitol (8,0%), leche entera (1,0%), sal (0,2%), levadura en polvo (0,15%), vanillina (0,1%) y diferentes composiciones de estevia (0,03%) en una máquina de amasadora. Se moldeó la masa obtenida y se horneó en un horno a 200°C durante 15 minutos. Las composiciones de estevia se seleccionaron de extracto de estevia comercial (que contenía el 26% de esteviósido, el 55% de rebaudiósido A y el 16% de otros glicósidos), un rebaudiósido A comercial (que contenía el 98,2% de reb A) y el material obtenido según el ejemplo 5.

Se evaluaron las propiedades sensoriales por 20 especialistas. Los mejores resultados se obtuvieron en muestras que contenían la composición obtenida según el ejemplo 5. Los especialistas notificaron una sensación en boca y un perfil de sabor desarrollados y completos.

10 Ejemplo 9 Yogur

15 Se disolvieron diferentes composiciones de estevia (0,03%) y sacarosa (4%) en leche de bajo contenido graso. Las composiciones de estevia se seleccionaron de un extracto de estevia comercial (que contenía el 26% de esteviósido, el 55% de rebaudiósido A y el 16% de otros glicósidos), un rebaudiósido A comercial (que contenía el 98,2% de reb A) y el material obtenido según el ejemplo 5. Después de pasteurizar a 82°C durante 20 minutos, se enfrió la leche hasta 37°C. Se añadió un cultivo iniciador (3%) y se incubó la mezcla a 37°C durante 6 horas luego a 5°C durante 12 horas.

Se evaluaron las propiedades sensoriales por 20 especialistas. Los mejores resultados se obtuvieron en muestras que contenían la composición obtenida según el ejemplo 5. Los especialistas indicaron una sensación en boca y un perfil de sabor desarrollados y completos.

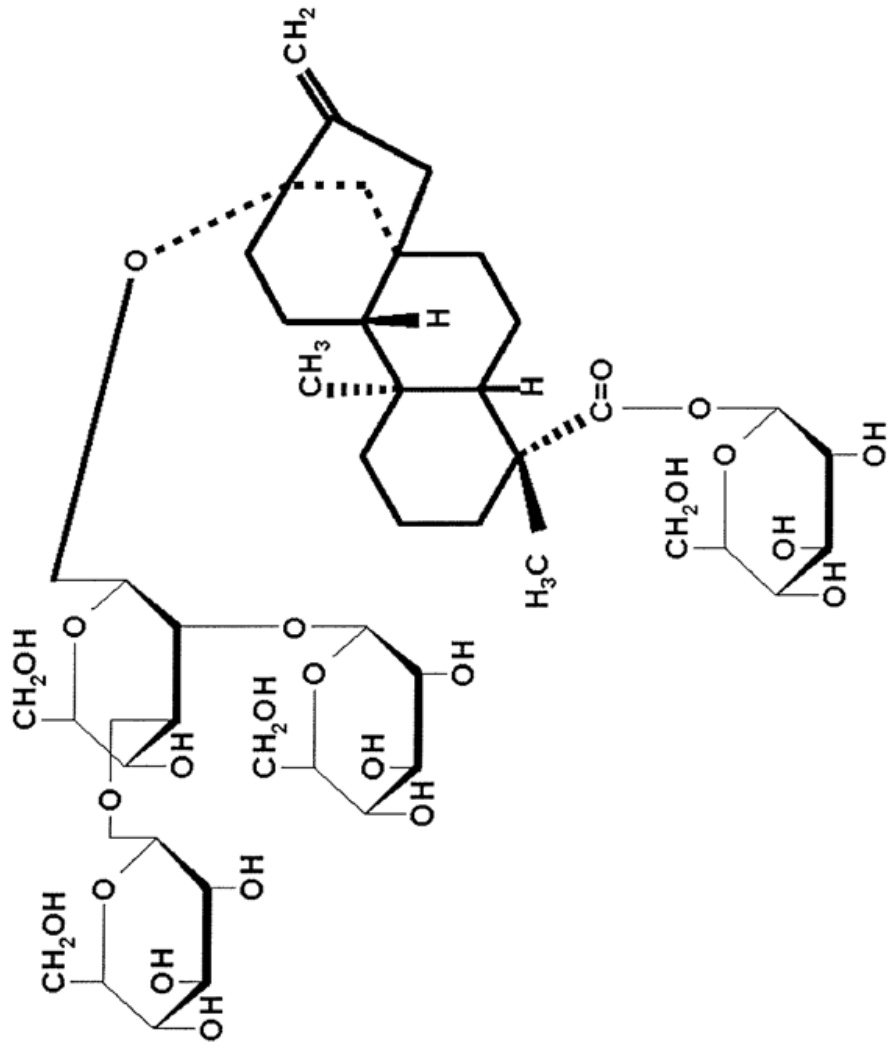
20



**REIVINDICACIONES**

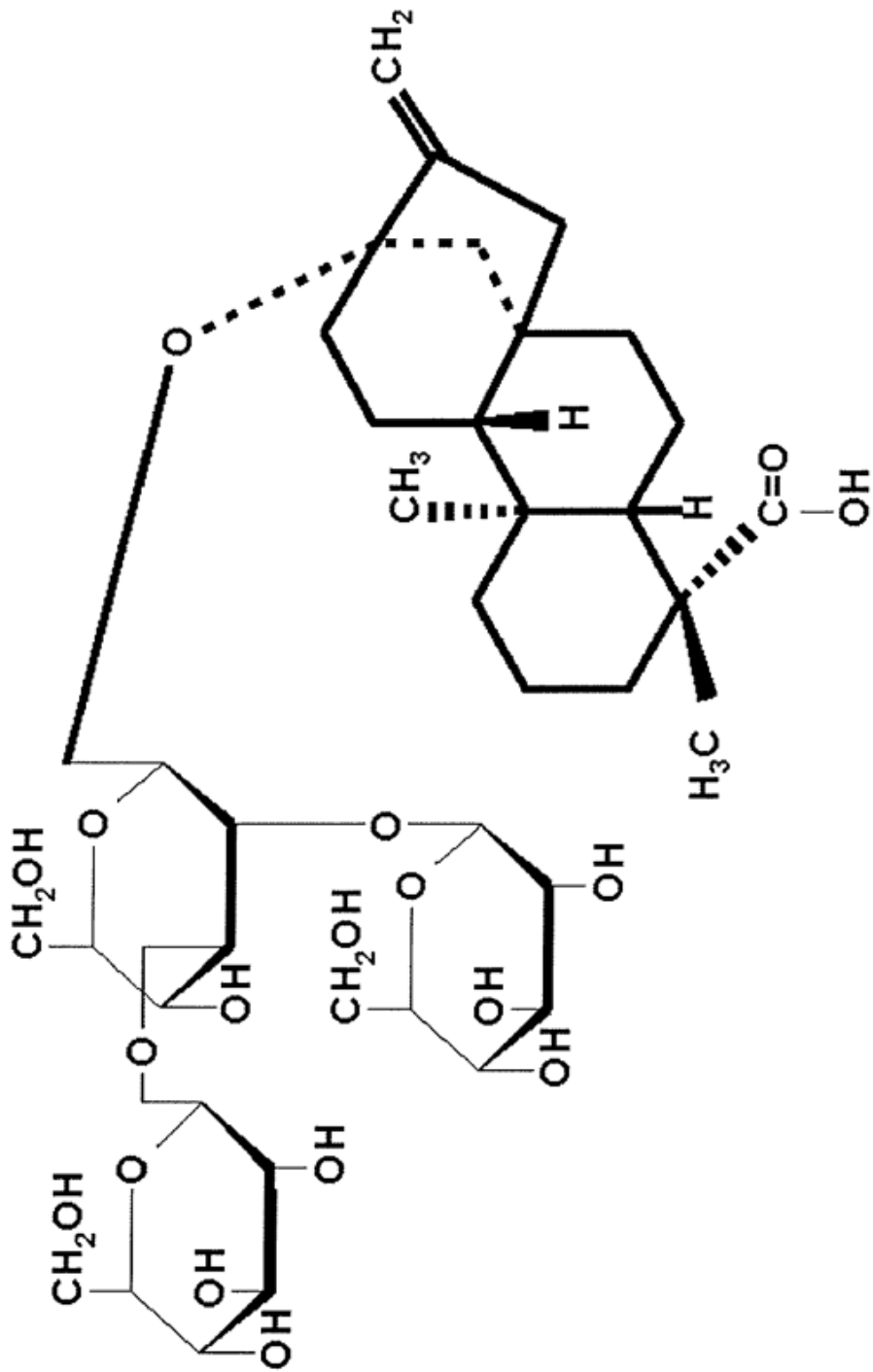
1. Procedimiento para producir una composición de estevia que comprende rebaudiósido *B*, que comprende las etapas de:
  - proporcionar un edulcorante de estevia que comprende rebaudiósido *A*;
- 5      proporcionar un biocatalizador que puede hidrolizar los enlaces de los ésteres  $\beta$ -glucosílicos en el edulcorante de estevia, en el que el biocatalizador es lactasa;
  - disolver el edulcorante de estevia y añadir el biocatalizador para elaborar una mezcla de reacción;
  - incubar la mezcla de reacción durante aproximadamente de 12 a 48 horas para hidrolizar al menos parcialmente los enlaces de los ésteres  $\beta$ -glucosílicos en el edulcorante de estevia;
- 10     enfriar la mezcla hasta aproximadamente 10-30°C y ajustar el pH con ácido a aproximadamente pH 3,0-4,0;
  - incubar la mezcla a baja temperatura para obtener un precipitado;
  - separar el precipitado y lavar el precipitado con agua; y
  - secar el precipitado lavado para obtener la composición de estevia.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, que comprende además las etapas de:
- 15     suspender la composición de estevia en agua e incubar a una temperatura elevada durante aproximadamente 1-3 horas; y
  - separar la composición de estevia del agua y secar la composición de estevia para obtener una composición de estevia purificada que comprende rebaudiósido *B* que tiene una pureza de más de aproximadamente el 99%.
- 20     3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, que comprende además las etapas de:
  - suspender la composición de estevia en agua para formar una suspensión;
  - aumentar la temperatura de la suspensión mediante un método de calentamiento en gradiente;
  - mantener la suspensión a una temperatura elevada;
  - disminuir la temperatura de la suspensión mediante un método de enfriamiento en gradiente para obtener
- 25     una disolución de composición de estevia de alta estabilidad y alta concentración; y
  - secar por pulverización la disolución de composición de estevia de alta estabilidad y alta concentración para proporcionar una composición de estevia muy soluble.

FIG. 1



Rebaudiósido A

FIG. 2



Rebaudiósido B

FIG. 3

