

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 794 563**

51 Int. Cl.:

A23L 27/10 (2006.01)

A23L 27/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.01.2012 E 16181751 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.04.2020 EP 3111781**

54 Título: **Método de purificación de un extracto de Luo Han Guo**

30 Prioridad:

28.01.2011 US 201161437399 P

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

18.11.2020

73 Titular/es:

**TATE & LYLE INGREDIENTS AMERICAS LLC
(100.0%)
5450 Prairie Stone Parkway
Hoffmann Estates, IL 60192, US**

72 Inventor/es:

**BRIDGES, JOHN R.;
CARLSON, ALFRED;
POHRTE, BRIAN, TIMOTHY;
QUINLAN, MARY;
SCHUNK, TIMOTHY, C.;
TEJADA, ELBER, F. y
ZHOU, SHELLY, YUQING**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o
Bemerkungen) en el folleto original publicado por
la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 794 563 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

Método de purificación de un extracto de Luo Han Guo

5 La presente solicitud es una solicitud divisional de la EP12702707.6.

Antecedentes

10 Los edulcorantes calóricos naturales, como sacarosa, glucosa y fructosa, poseen características de sabor deseables, pero se añaden al contenido calórico de los productos. Por lo tanto, existe un gran interés entre los consumidores por edulcorantes con un bajo contenido calórico o que no sean calóricos, considerados como alternativas más saludables. Se conocen edulcorantes muy potentes sintéticos y naturales no calóricos, sin embargo, la mayoría de ellos poseen un perfil de sabor que no es tan deseable para los consumidores como los azúcares. Por tanto, es deseable desarrollar edulcorantes no calóricos que puedan sustituir al azúcar y que presenten un perfil de sabor más deseable.

15 La especie *Stevia rebaudiana* ("estevia") es la fuente de determinados glucósidos de esteviol dulces de origen natural. Se ha realizado una cantidad considerable de investigación y desarrollo para evaluar el uso de los glucósidos de esteviol dulces de *Stevia* como edulcorantes no calóricos. Los glucósidos de esteviol dulces que se pueden extraer de *Stevia* incluyen los seis rebaudiósidos (es decir, rebaudiósidos A a F), esteviósido (el glucósido predominante en extractos derivados de *Stevia* de tipo silvestre), esteviolsida, rubusosida y dulcosidos.

20 Los edulcorantes con bajo contenido calórico o que no son calóricos comerciales a base de rebaudiósido A y otros glucósidos de esteviol dulces suelen tener un regusto amargo y a regaliz. Dichas características son especialmente perceptibles a concentraciones por encima de 300 ppm. En las aplicaciones alimentarias, los niveles preferentes de uso (8-10 % valores de equivalencia de azúcar) son normalmente de aproximadamente 500 ppm a aproximadamente 1000 ppm, por encima del intervalo en el que se empiezan a percibir los sabores desagradables. Por tanto, sigue existiendo la necesidad de contar con edulcorantes que incluyan glucósidos de esteviol dulces con un contenido calórico reducido, bajo y/o que no sean calóricos, que tengan perfiles de un sabor menos amargo o en absoluto amargo no deseable (p.ej., regaliz) o con perfiles de dulzor más similares a los edulcorantes calóricos naturales o combinaciones de estas propiedades.

25 Los documentos CN 101327244 A, EP 0945074 A2, CN 101167539 A y JP 3547553 B2 se refiere a la producción de extracto de Luo Han Guo.

35

Sumario de la invención

40 En un primer aspecto, la invención proporciona un método de purificación de un extracto de Luo Han Guo que comprende el contacto del extracto de Luo Han Guo con carbón activado, en donde el extracto de Luo Han Guo que se pone en contacto es uno que contiene al menos el 40 % en peso de Mogrósido V en una base sólida seca y se ha puesto previamente en contacto con al menos una de una resina adsorbente polimérica macroporosa y una resina de intercambio iónico y que contiene glucósidos aromáticos y compuestos orgánicos semi-volátiles; y en donde el extracto de Luo Han Guo está en la forma de una solución acuosa cuando se pone en contacto con el carbón activado;

45 la solución acuosa se pasa a través de una columna de carbón activado a un caudal que varía de 1 a 10 volúmenes de lecho por hora para obtener un efluente, y el efluente se concentra posteriormente; el carbón activado tiene un área superficial de más de 100 m²/g; y se utiliza al menos el 6 % en peso de carbón activado en relación con el extracto de Luo Han Guo en una base sólida para reducir los niveles de glucósidos aromáticos y compuestos orgánicos semi-volátiles presentes en el extracto de Luo Han Guo.

50

55 En otro aspecto más, la invención proporciona un método para preparar una composición de edulcorante, en donde un extracto de Luo Han Guo obtenido de acuerdo con el método del primer aspecto se combina con uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en un extracto de Rebaudiósido A, Rebaudiósido B, Rebaudiósido D, Glucósido de Esteviol y Estevia purificada y después se seca.

60

Breve descripción de los dibujos

60 La Figura 1 presenta el análisis HPLC de un ejemplo de extracto deshidratado de Luo Han Guo y el análisis del mismo material que ha sido tratado con carbón de acuerdo con la invención, en los cromatogramas superior e inferior, respectivamente.

La Figura 2 presenta vistas en aumento de los cromatogramas presentados en la Figura 1.

La Figura 3 presenta los cromatogramas de la cromatografía gaseosa de compuestos orgánicos semi-volátiles presentes en una muestra de Luo Han Guo, uno tomado antes del tratamiento con carbón activado y el otro después del tratamiento con carbón activado de acuerdo con la invención.

65

La Figura 4 presenta un cromatograma de HPLC una fracción de Luo Han Guo que contiene componentes que producen un sabor rancio.

La Figura 5 presenta un espectro ATR-FTIR de una fracción de Luo Han Guo que presenta bandas características en correspondencia con la presencia de un glucósido aromático.

La Figura 6 presenta un Espectro de Masas preciso con tiempo de vuelo (ToF) para el componente principal en la Figura 4.

5

Descripción detallada de la invención

Definiciones

10 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "glucósido de esteviol dulce" significa cualquier compuesto de origen natural que tenga la estructura general del sistema de anillo del diterpeno de esteviol con uno o más radicales sacáridos químicamente unidos al anillo.

15 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "componente rebaudiósido" significa el total de rebaudiósido A, B, y D presente, entendiéndose que solamente pueden estar presentes de hecho uno o dos de ellos.

Composiciones edulcorantes que incluyen mezclas de rebaudiósido-mogrósido V

20 A continuación, se divulga que las mezclas de mogrósido V con un componente rebaudiósido que consiste en uno o más rebaudiósidos A, B y D proporcionan características de sabor superiores, en muchos casos superiores a las del componente rebaudiósido o el mogrósido V en solitario, cuando se comparan a un nivel de dulzor equivalente. En algunos sistemas, el sabor mejorado es evidente sobre todo a valores de pH de aproximadamente pH 2 a aproximadamente pH 8.

25 El mogrósido V puede obtenerse de extractos de Luo Han Guo, disponibles en el mercado desde una serie de fuentes. En la patente estadounidense No. 5.411.755 y la publicación estadounidense No. 2006/0003053, se describen ejemplos de métodos para producir dichos extractos. Luo Han Guo se extrae del fruto de *Siraitia grosvenorii*, una vid perenne herbácea propia del sur de China y el norte de Tailandia. Es una de las cuatro especies del género *Siraitia*. Entre los sinónimos botánicos se incluyen *Momordica grosvenorii* y *Thladiantha grosvenorii*. El extracto es aproximadamente 200-300 veces más dulce que la sacarosa.

30 Normalmente, mogrósido V es el componente mogrósido simple más abundante del extracto de Luo Han Guo, en combinación con otros mogrósidos como los mogrósidos I, II, III, IV y VI así como otros materiales extraídos como polifenoles, flavonoides, melanoidinas, terpenos, proteínas, azúcares, glucósidos aromáticos y compuestos orgánicos semi-volátiles. En ciertas realizaciones de la invención, se proporciona el mogrósido V en forma de un extracto de Luo Han Guo (en bruto o purificado y/o concentrado para aumentar el contenido en mogrósido). El mogrósido V constituye al menos 40 % en peso del extracto o en algunas realizaciones, al menos 45 % en peso o al menos 50 % en peso. Normalmente, constituirá como máximo 95 % en peso del extracto, como máximo 85 % en peso del extracto, como máximo 75 % en peso del extracto, como máximo, 70 % en peso del extracto o, como máximo, 65 % en peso o, como máximo, 60 % en peso.

35 En algunas composiciones edulcorantes preparadas mediante el método de acuerdo con la invención, la relación en peso entre el mogrósido V y el componente rebaudiósido es al menos 1:1 o, al menos, 1,3:1 o, al menos, 1,5:1. La relación en peso es normalmente como máximo 5:1 o, como máximo, 4:1, o, como máximo, 3,5:1 o, como máximo, 3:1 o, como máximo, 2,5:1 o, como máximo, 2:1 o, como máximo, 1,9:1 o, como máximo, 1,8:1 o, como máximo, 1,7:1

40 El componente rebaudiósido consiste en uno o más entre rebaudiósido A, B y/o D. El componente rebaudiósido constituye normalmente al menos 65 % en peso del total de glucósidos de esteviol dulces presentes o, al menos, 70 % en peso o, al menos, 75 % en peso o, al menos, 80 % en peso o, al menos, 90 % en peso o, al menos, 97 % en peso. El resto de glucósidos de esteviol dulces, si los hay, puede incluir uno o más entre rebaudiósidos C, E y/o F, esteviósido y cualquier otro glucósido de esteviol dulce que no forme parte del componente rebaudiósido. Normalmente, el rebaudiósido A constituirá al menos 50 % en peso de los glucósidos de esteviol dulces presentes o, al menos, 60 % en peso o, al menos, 70 % en peso o, al menos, 80 % en peso o, al menos, 90 % en peso o, al menos, 95 % en peso. El rebaudiósido A, B y D se puede obtener de extractos de *Stevia rebaudiana*, disponible en el mercado a partir de una serie de fuentes. Se conocen y han sido descritos en la bibliografía muchos métodos diferentes para producir dichos extractos y obtener rebaudiósidos A, B o D relativamente puros desde extractos. En un proceso típico, se deshidratan las plantas de estevia y se someten a un proceso de extracción en agua. Este extracto en bruto contiene aproximadamente 50 % de rebaudiósido A. Se separan las distintas moléculas de glucósido en el extracto a través de técnicas de cristalización, normalmente, utilizando etanol o metanol como disolvente, dando cabida al aislamiento de rebaudiósido A, B y D puros. A continuación, pueden utilizarse los glucósidos individuales purificados en combinación para proporcionar los componentes de rebaudiósido útiles en la presente invención.

65 Aunque las composiciones edulcorantes preparadas mediante el método de la invención pueden incluir mezclas de varios tipos de edulcorantes en distintas cantidades, en algunas realizaciones, la composición consiste

esencialmente en un extracto de Luo Han Guo opcionalmente purificado y/o concentrado y un extracto de estevia opcionalmente purificado y/o concentrado.

Eliminación del sabor desagradable de los componentes de Luo Han Guo

5 Tras exhaustivos estudios, se ha observado ahora que la presencia de ciertas impurezas en los extractos de Luo Han Guo tiene como resultado un sabor desagradable que algunos de los examinadores describieron como "rancio". En particular, se han identificado los glucósidos aromáticos y los compuestos orgánicos semi-volátiles como causantes de dicho sabor no deseable, si bien pueden estar presentes otros componentes del sabor desagradable o rancio. Un glucósido aromático en particular tiene un peso molecular de 502 Daltons y, según parece, es el causante del sabor rancio en particular. Dicho compuesto tiene la fórmula $C_{26}H_{30}O_{10}$ y, en algunas realizaciones de acuerdo con la invención, se limitan todos los compuestos en total que presenten dicha fórmula molecular. Cualquier medio para conseguir un nivel suficientemente bajo de este compuesto es adecuado para los fines de la invención. Una manera adecuada es pasar a través de una columna de carbón activo granulado una solución acuosa del mogrósido V, por ejemplo, en forma de un extracto de Luo Han Guo, opcionalmente, purificado y/o concentrado. Se pueden utilizar también otras formas de carbón activado, como por ejemplo polvos. El tratamiento con carbón elimina también normalmente otros componentes de sabor desagradable o rancio, así como restos de plaguicidas y otras sustancias similares, que por lo general no son deseables en los ingredientes destinados al consumo humano. Normalmente, el único vehículo presente durante el tratamiento con carbón es agua y no se añade ningún disolvente orgánico. En algunas realizaciones, se trata el extracto de Luo Han Guo con una resina adsorbente polimérica macroporosa, una resina de intercambio iónico y el carbón activado. Normalmente, los tratamientos se realizarán en ese orden, pero no necesariamente. Un ejemplo de resina polimérica macroporosa es la distribuida en el mercado por Rohm and Haas, Filadelfia, PA con el nombre comercial AMBERLITE® XAD1180N. Un ejemplo de resina de intercambio iónico adecuada es una resina aniónica disponible con la marca comercial AMBERLITE® FPA90 CL, también de Rohm and Haas.

En el tratamiento se debe emplear una cantidad suficiente de carbón activado y debe tener lugar durante un período de contacto suficientemente prolongado para reducir el nivel de impurezas del uno o más glucósidos aromáticos y el compuesto orgánico semi-volátil hasta un nivel aceptable. En algunas realizaciones de la invención la composición edulcorante comprende de 0 a 13 % en peso en total de glucósidos aromáticos o de 0 a 11 % en peso o de 0 a 10 % en peso o de 0 a 9 % en peso, todos ellos en relación con el mogrósido V. Los glucósidos aromáticos pueden ser glucósidos de fenilo o, más específicamente glucósidos fenólicos, o pueden ser glucósidos de cumarina o, más específicamente glucósidos de furanocumarina. Estos mismos límites pueden ser también apropiados en algunas realizaciones para los compuestos de masa molecular 502 y, más específicamente para compuestos de acuerdo con la fórmula $C_{26}H_{30}O_{10}$, en cada caso en lo que se refiere a la cantidad total de todos los compuestos de masa 502 o de fórmula $C_{26}H_{30}O_{10}$.

En algunas realizaciones de la invención la composición edulcorante comprende de 0 a 15 ppm en peso en el total de los compuestos orgánicos semi-volátiles, o de 0 a 11 ppm en peso, o de 0 a 7 ppm en peso, o de 0 a 3 ppm en peso, todos ellos en relación con el mogrósido V. El término "semi-volátil" tal como se utiliza en el presente documento significa compuestos que tienen un peso molecular que excede 120 Daltons y un punto de ebullición a 1 presión atmosférica por encima de 150 °C y hasta 350 °C. Dichos compuestos orgánicos semi-volátiles pueden comprender, pero sin limitarse a ellos, los compuestos enumerados en la Tabla 7. Los compuestos orgánicos semi-volátiles pueden incluir por ejemplo furanos alifáticos, alifáticos insaturados, ésteres, hidrocarburos policíclicos y/o terpenoides.

Se puede tratar con carbón activado extracto de fruta en polvo de Luo Han Guo disponible en el mercado, normalmente con un contenido de al menos 40 % de mogrósido V (b.s.s) del siguiente modo. Se disuelve el extracto deshidratado en agua desionizada a una concentración de al menos aproximadamente 1 % en peso y, normalmente, como máximo aproximadamente 70 % en peso. Se calienta al agua a una temperatura suficiente para favorecer la disolución del material en polvo, normalmente, en un intervalo comprendido entre temperatura ambiente y 71,1 °C (160 °F), y, opcionalmente, se filtra utilizando una membrana de microfiltración o utilizando un papel de filtro con un coadyuvante de filtración no reactivo. El fin de la microfiltración es eliminar las proteínas y/o microorganismos insolubles que pudieran deteriorar el producto. Se somete el filtrado resultante a adsorción con carbón activado (también conocido como carbón activo). El carbón puede ser cualquier forma de carbón activado disponible y puede derivarse por ejemplo de madera, carbón bituminoso, carbón de lignito, coco, carbón animal o cualquier otra fuente. En una realización, el carbón activado que se utiliza es un carbón activado producido por activación con vapor de carbón de lignito. Normalmente, el carbón se presenta en forma de granulado, si bien se pueden emplear también otras formas físicas, tales como carbón activado en polvo o en perlas. Por lo general, resultará ventajoso utilizar un carbón activado que sea muy poroso y que tenga una alta área superficial (p.ej., por encima de 100 m²/g, por encima de 200 m²/g o por encima de 300 m²/g). Los componentes no deseables que causan el sabor desagradable (así como otras sustancias no deseables, como plaguicidas) son adsorbidos en el carbón, pero el material de sabor mejorado no es adsorbido y eluye de forma continua. El método permite rendimientos de recuperación (sobre la base de la sustancia seca) comprendidos entre 50 % y 99,9%. La cantidad de carbón activado utilizada puede variar entre 0,05 % y 150 % (como porcentaje de la sustancia deshidratada presente en la solución acuosa de extracto de fruta Luo Han Guo) y es al menos el 6% en peso de acuerdo con el primer aspecto de la invención. Para conseguir

niveles suficientemente bajos de los componentes de sabor desagradable, se utiliza al menos el 6% en peso de carbón activado en relación con el extracto de fruta Luo Han Guo sobre la base de los sólidos. En ciertas realizaciones, al menos 10 % en peso da los mejores resultados. Normalmente, se utilizará como máximo 15 % en peso.

5 En un proceso típico, se carga una columna con la cantidad deseada de carbón activado (normalmente, en forma granulada) y se hace correr el agua desionizada a través de la columna desde arriba hasta abajo o desde abajo hasta arriba (dirección de flujo descendente o flujo ascendente) a un caudal comprendido entre 1 y 10 volúmenes de lecho por hora. La cantidad de agua que pase podría variar de 2 a 5 volúmenes de lecho. El agua puede estar a una temperatura elevada (p.ej., 57,2 °C (135 °F) a 85 °C (185 °F)) cuando se pone en contacto con el carbón activo, lo que ayuda a reducir la lixiviación de sustancias no deseables, tales como metales pesados del carbón cuando se pasa posteriormente la solución acuosa del extracto de fruta de Luo Han Guo a través de la columna. Una vez que el agua ha desplazado el aire que queda y algunas partículas finas del carbón, se introduce en la columna la solución acuosa del extracto de fruta Luo Han Guo a un caudal que oscila entre 1 y 10 volúmenes de lecho por hora. La columna deberá estar enchaquetada y se deberá mantener la temperatura de la cubierta a la misma temperatura que la solución de alimentación que será normalmente en un intervalo comprendido entre la temperatura ambiente y 71°C. Inicialmente, el material de alimentación desplaza el agua en la columna. Una vez que el efluente de la columna presenta signos de la presencia de material, se recoge el efluente como material con el sabor mejorado. Se puede evaluar la presencia de sólidos en el efluente midiendo el índice de refracción (IR). Para este fin, se construye normalmente una correlación entre el IR y la sustancia deshidratada.

25 Se introduce el extracto de fruta Luo Han Guo en la columna hasta alcanzar el nivel de tratamiento ivo. Una vez terminada la alimentación, se atrapa el extracto de fruta Luo Han Guo restante que sigue presente en la columna con agua de ósmosis inversa o desionizada, desplazando el material Luo Han Guo. Se continúa la recogida del efluente hasta que el índice de refracción del efluente se acerca al del agua sola.

30 Opcionalmente, se puede concentrar el material de sabor mejorado recuperado para aumentar el % SD (sustancia deshidratada) a cualquier nivel adecuado para posterior deshidratación, si se desea. La concentración se puede completar por evaporación o membranas o a través de cualquier otro método adecuado. La concentración con membrana se puede realizar utilizando una membrana de nanofiltración (200 Da. M.W.C.O.) o con una membrana de ósmosis inversa (con un ensayo de rechazo a la sal >98%). Se pueden utilizar ambas membranas por separado sin perder una cantidad significativa de mogrósidos para el permeado. A continuación, se deshidrata el material utilizando una unidad de secado por pulverización convencional o empleando una unidad de aglomeración por pulverización convencional u otros medios. O se puede utilizar el material como tal. En una realización, se combina el material con mejor sabor recuperado con uno o más componentes distintos, como rebaudiósido A, B y/o D o un extracto de estevia purificado que contiene glucósidos de esteviol dulces antes de la deshidratación.

Uso de las composiciones edulcorantes que incluyen mezclas de rebaudiósido-mogrósido V

40 Las composiciones que contienen mezclas de rebaudiósido-mogrósido V se pueden procesar aplicando métodos conocidos para modificar el tamaño de partícula y la forma física. Se pueden aplicar métodos como aglomeración, secado por pulverización, secado con tambor y otras formas de procesados físicos para ajustar el tamaño de partícula con el fin de proporcionar unas mejores propiedades de flujo, hidratación o disolución. Las composiciones se pueden proporcionar en forma líquida, opcionalmente, con contenido en uno o más conservantes y/o coadyuvantes de procesado para facilitar su utilización en aplicaciones concretas. Se pueden procesar conjuntamente las composiciones que contienen mezclas de rebaudiósido-mogrósido V con agentes para aumentar el volumen como maltodextrinas y compuestos similares para proporcionar a los productos propiedades controladas de dulzor, dosificación, potencia y tratamiento.

50 Las composiciones edulcorantes preparadas por el método de la presente invención son útiles como edulcorantes con un reducido contenido calórico, bajo contenido calórico o sin contenido calórico en alimentos, es decir, composiciones comestibles o que se pueden masticar, tales como comidas, bebidas, medicinas, caramelos, chicles y similares. Se ha descubierto que las composiciones edulcorantes preparadas por el método de la presente invención pueden presentar un perfil de dulzor que es más parecido al del azúcar y tienen un menor regusto amargo y un menor sabor desagradable (p.ej., regaliz) que los edulcorantes que incluyen solamente glucósidos de esteviol dulces. Los ensayos han demostrado que en la mayoría de los casos las personas examinadoras prefieren las composiciones edulcorantes de la presente invención por encima de las composiciones que incluyen 97 % de rebaudiósido A, en las pruebas en las que se utiliza una concentración que proporciona un dulzor equivalente. En particular, las composiciones edulcorantes proporcionan tanto un dulzor inmediato como un dulzor retardado, con el resultado de un sabor más satisfactorio. Es de esperar que la adición de las composiciones edulcorantes preparadas por el método de la presente invención a las comidas y las bebidas tenga como resultado comidas y bebidas con mejor sabor que las preparadas con la composición edulcorante conocida que contiene glucósidos de esteviol dulces, como por ejemplo composiciones que tienen un 97 % de rebaudiósido A como edulcorante.

65 Las composiciones edulcorantes preparadas por el método de acuerdo con la invención pueden incluir, además de la mezcla rebaudiósido-mogrósido V, otros edulcorantes de alta potencia. Por ejemplo, se pueden incluir glucósidos

de esteviol dulces. Entre los ejemplos concretos de edulcorantes con alta potencia adecuados se incluyen edulcorantes de alta potencia naturales como:

dulcósido A, dulcósido B (también conocido como rebaudiósido C), rubusósido,

mogrósido III, mogrósido IV, mogrósido VI, siamenósido, monatin y sus sales (monatin SS, RR, RS, SR), curculina, ácido glicirrícico y sus sales, taumatina, monelina, mabinlina, braceína, hernandulcina, filodulcina, glicifilina y floridzina;

y edulcorantes de alta potencia artificiales, como

sacarina, aspartamo, sucralosa, neotame, ciclamato y acesulfamo potásico.

De acuerdo con la invención, las mezclas de rebaudiósido-mogrósido V pueden combinarse también con edulcorantes calóricos como azúcares (p.ej., sirope de maíz con alto contenido en fructosa, sacarosa, fructosa, etc.) y polioles (p.ej., sorbitol, xilitol, lactitol, etc.) y/u otros edulcorantes con bajo contenido en calorías para producir composiciones edulcorantes con un reducido valor calórico.

En algunas realizaciones, la invención proporciona alimentos que incluyen las composiciones edulcorantes con altas concentraciones de las mezclas de rebaudiósido-mogrósido V. Esencialmente, se puede edulcorar cualquier composición comestible o masticable de acuerdo con la invención. Entre los ejemplos no exhaustivos se incluyen alimentos (p.ej., artículos horneados, sopas, salsas, carnes procesadas, frutas embotadas, verduras embotadas, productos lácteos, dulces escarchados); bebidas (p.ej., refrescos carbonatados, té listos para beber, bebidas deportivas, bebidas lácteas, bebidas alcohólicas, bebidas energéticas, aguas aromatizadas, bebidas vitaminadas, bebidas de frutas y zumos de frutas, refrescos en polvo), medicinas o productos farmacéuticos (p.ej., comprimidos, grajeas, suspensiones, etc.), productos nutracéuticos (p.ej., suplementos, vitaminas, etc.), caramelos o golosinas; chiches; productos de tabaco (p.ej. tabaco masticable) y similares. La composición edulcorante se incluye en una cantidad eficaz para impartir la cantidad de dulzor deseada al producto edulcorado. En algunas realizaciones, el pH del producto edulcorado es al menos aproximadamente 2 y no más de aproximadamente 8.

En algunas realizaciones, el alimento contiene una composición edulcorante que incluye las mezclas de rebaudiósido-mogrósido V y uno o más glucósidos de esteviol dulce adicionales tal como se ha descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición edulcorante incluyendo el componente rebaudiósido, componentes adicionales de glucósidos de esteviol y el mogrósido V está presente en el alimento en una concentración total de al menos aproximadamente 50 ppm o al menos aproximadamente 200 ppm o al menos aproximadamente 500 ppm o al menos aproximadamente 1000 ppm o al menos aproximadamente 1500 ppm o al menos aproximadamente 3500 ppm o al menos aproximadamente 5000 ppm.

Ejemplos

Ejemplo 1 – Pruebas de preferencia de mezclas de estevia-mogrósido V frente a rebaudiósido A

Se compararon mezclas de un extracto sólido de Luo Han Guo que contenía 50 % en peso mogrósido V con un producto de estevia que contenía sobre todo rebaudiósido A en cuanto al dulzor y la preferencia por parte de un panel de examinadores frente a 97 % en peso de rebaudiósido. El extracto de Luo Han Guo fue una versión purificada de un producto comercial distribuido por Biovittoria (Guilin, República Popular de China) con el nombre comercial Fruit Sweetness™, en el que se había realizado la purificación por tratamiento con carbón activado tal como se ha descrito a lo largo del presente documento, para eliminar los glucósidos aromáticos y los compuestos orgánicos semi-volátiles, que producen sabores desagradables. En adelante, se identifica este producto como Muestra A. El producto estevia fue un producto comercial distribuido por GLG Life Tech Corporation of Vancouver, B.C., Canadá con el nombre comercial BlendSure™ 7.5, que consiste en aproximadamente 75 % en peso de rebaudiósido A y 25 % en peso de esteviósido.

Prueba de preferencia

Se llevó a cabo la prueba de comparación por pares para el dulzor y la preferencia de las muestras de BlendSure 7.5 y la Muestra A con un dulzor equivalente a 97 % de rebaudiósido A en un tampón cítrico pH 3 (0,045 % ácido cítrico y 0,013 % citrato sódico) con la participación de un panel de examinadores del sabor. Se llevaron a cabo las pruebas como diseños de bloque completo con entre 24 y 46 evaluaciones. Se rotó el orden de presentación. Se sirvieron las soluciones en copas de suflé de 60 cc (2 onzas) etiquetadas con códigos de 3 dígitos a temperatura ambiente. Se dio instrucciones al panel de examinadores para que consumieran al menos la mitad de cada muestra. Se obligó a mantener un minuto de espera entre una prueba y otra para que el panel de examinadores se aclarara el paladar. Se pidió al panel de examinadores que identificaran la solución que era más dulce y cuál preferían. Se facilitó a los examinadores agua embotellada, solución de sacarosa al 2 % y galletas cracker sin sal para aclararse el paladar antes de la prueba y durante ella. Se analizó el dulzor como pruebas de dos colas con un riesgo alfa de 0,05 con la prueba binomial que se muestra a continuación.

Se analizaron los resultados de las preguntas sobre el dulzor y la preferencia con la prueba binomial y se calculó la d' de Thurston. El valor p para una prueba binomial de una cola se calcula como

$$1 - \sum_{k=0}^c \binom{n}{k} p_0^k (1 - p_0)^{n-k}$$

5 en la que c es el número de aciertos, n es el número de pruebas y p_0 es la probabilidad de la posibilidad. Una prueba se considera estadísticamente significativa cuando el valor p es menor que el riesgo alfa establecido a priori. El valor p de dos colas es el doble del valor p de una cola calculado.

10 La d' de Thurston es una medida lineal de la diferencia psicofísica. Una $d' = 1$ se considera generalmente como una diferencia solo perceptible (JND por sus siglas en inglés) en la que se juzgará un estímulo más fuerte en un 75 % de las pruebas. La d' de Thurston es independiente del método de ensayo y para las pruebas de comparación por pares se calcula como

$$p_c = \Phi(d' / \sqrt{2})$$

15 en la que p_c es la proporción de aciertos y $\Phi(\cdot)$ es la función de distribución acumulativa de la distribución normal patrón. Se puede encontrar un tratamiento completo de estos cálculos estadísticos en los manuales convencionales sobre el tema (Bi J., "Sensory Discrimination Tests and Measurements," Blackwell Publishing, 2006, capítulos 2 y 9).

En la Tabla 1, a continuación, se muestran los resultados de ensayo replicados combinados.

Tabla 1

Muestras				Preferencia			Dulzor		
Ppm mezcla Muestra A	Ppm mezcla BlendSure	Fración Muestra A	Ppm control Reb A	Reb A Recuento	Mezcla Recuento	valor -p una cola	Reb a Recuento	Mezcla Recuento	valor p- dos colas
444	296	0,60	605	22	18	0,68	16	24	0,15
547	365	0,60	705	13	27	0,01	15	25	0,08
547	365	0,60	800	22	46	<0,01	24	44	0,01
547	365	0,60	900	28	40	0,06	45	23	0,00
660	440	0,60	900	17	27	0,05	15	29	0,02
660	440	0,60	1000	18	26	0,09	23	21	0,65
675	225	0,75	900	9	31	<0,01	24	16	0,15
750	250	0,75	1000	12	28	<0,01	26	14	0,04
825	275	0,75	1000	8	38	<0,01	24	22	0,66

20 En tampón de ácido cítrico pH 3 y a niveles de dulzor que no fueron significativamente diferentes (valor -p >0,05 dos colas), estos datos indican una preferencia por las mezclas que contenían relaciones entre mogrósidó V y rebaudiósido A dentro de determinados intervalos. Específicamente, se puede observar lo siguiente.

25 Se prefirió de manera significativa una mezcla de 675 ppm de Muestra A y 225 de BlendSure 7.5 (75% Muestra A, 900 ppm total) por encima de 900 ppm de 97 % rebaudiósido A.

30 Se prefirió de manera significativa una mezcla de 825 ppm de Muestra A y 275 de BlendSure 7.5 (75 % Muestra A, 1100 ppm total) por encima de 1000 ppm 97 % de rebaudiósido A.

Una mezcla de 444 ppm de Muestra A y 296 de BlendSure 7.5 (60 % Muestra A, 740 ppm total) no fue significativamente diferente de 605 ppm 97 % de rebaudiósido A.

35 Se prefirió de manera significativa una mezcla de 547 ppm de Muestra A y 365 de BlendSure 7.5 (60 % Muestra A, 912 ppm total) por encima de 705 ppm de 97 % rebaudiósido A.

Una mezcla de 660 ppm de Muestra A y 440 BlendSure 7.5 (60 % Muestra A, 1100 ppm total) no fue significativamente diferente en cuanto a la preferencia con respecto a 1000 ppm 97 % de rebaudiósido A.

40 Las mezclas de la Muestra A y BlendSure 7.5 que contenía 75% de Muestra A presentaron un mejor comportamiento que las mezclas que contenían 60 % de Muestra A frente a 97 % de rebaudiósido A.

Se prefirieron más las mezclas de la Muestra A y BlendSure 7.5 con respecto a 97% de rebaudiósido A a medida que aumentó el nivel de dulzor.

Ejemplo 2 – Prueba de preferencia de mezclas de estevia-mogrósido V frente a estevia

Se compararon mezclas de un extracto sólido de Luo Han Guo que contenía 50 % en peso de mogrósido V con un producto de estevia que contenía sobre todo rebaudiósido A en un tampón de ácido cítrico pH 3 (0,045% ácido cítrico y 0,013 % citrato sódico) en cuanto al dulzor y la preferencia con la participación de un panel de examinadores frente a un producto de estevia. Las mezclas y el producto de estevia han sido descritas en el ejemplo 1. Se puede detectar sinergia por la formación de isobolas (curvas de iso-efecto) cuando se representan las concentraciones de dos sustancias que tienen un efecto equivalente, en este caso dulzor en un gráfico en el que el eje es la concentración de las sustancias. Las isobolas lineales aparecen cuando no hay sinergia entre las dos sustancias. Aparece una isobola con una curvatura descendente cuando hay una sinergia entre las dos sustancias. Se puede encontrar una explicación completa sobre las isobolas y la sinergia en Berenbaum, "What is Synergy", Pharmacological Reviews, Vol. 1989, No. 41 páginas 93 - 129. Se predijeron las mezclas de BlendSure 7.5 y la Muestra A que tenían un dulzor equivalente a 500 ppm, 700 ppm y 900 ppm de BlendSure 7.5 a partir de las isobolas lineales presuponiendo que no hubo sinergia de dulzor.

Se llevaron a cabo pruebas de comparación por pares sobre el dulzor y la preferencia de las mezclas de BlendSure 7.5 y la muestra A que son igual de dulces a niveles de 500 ppm, 700 ppm y 900 ppm de BlendSure 7.5 con la participación de un panel de examinadores del sabor. Se llevaron a cabo las pruebas como diseños de bloque completos con entre 34 y 44 evaluaciones. Se rotó el orden de presentación. Se sirvieron las soluciones en copas de suflé de 60 cc (2 onzas) etiquetadas con códigos de 3 dígitos a temperatura ambiente. Se dio instrucciones al panel de examinadores para que consumieran al menos la mitad de cada muestra. Se obligó a mantener un minuto de espera entre una prueba y otra para que el panel de examinadores se aclarara el paladar. Se pidió al panel de examinadores que identificaran la solución que era más dulce y cuál preferían. Se facilitó a los examinadores agua embotellada, solución de sacarosa al 2 % y galletas cracker sin sal para aclararse el paladar antes y durante la prueba. Se analizaron los resultados como en el ejemplo 1, y se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2

Muestras				Preferencia			Dulzor		
Ppm muestra A	Ppm mezcla BlendSure	Fración Muestra A	Ppm control BlendSure	BlendSure Recuento	Mezcla Recuento	valor -p una cola	BlendSure Recuento	Mezcla Recuento	valor -p dos colas
133	399	0,25	500	38	43	0,51	44	37	0,37
284	284	0,50	500	32	49	0,04	41	40	0,82
458	153	0,75	500	13	31	<0,01	20	24	0,45
660	0	1,00	500	29	52	0,01	35	46	0,18
179	537	0,25	700	33	46	0,11	50	29	0,01
367	367	0,50	700	23	56	<0,01	33	46	0,11
563	188	0,75	700	23	46	<0,01	38	41	0,65
770	0	1,00	700	32	47	0,07	43	36	0,37
226	679	0,25	900	24	48	<0,01	39	33	0,41
455	455	0,50	900	22	50	<0,01	34	38	0,56
686	229	0,75	900	23	49	<0,01	40	32	0,29
920	0	1,00	900	19	53	<0,01	37	35	0,72

Tal como se puede observar a partir de estos datos, no hubo evidencia de sinergia del dulzor entre BlendSure 7.5 y la Muestra A. Sin embargo, la preferencia por la mezcla de BlendSure 7.5 y la Muestra A por encima de BlendSure 7.5 en solitario aumento al aumentar la relación de la Muestra A con respecto a BlendSure 7.5 y también al aumentar el dulzor.

Ejemplo 3 – Eliminación de glucósidos aromáticos y compuestos orgánicos semi-volátiles de extracto de Luo Han Guo

Se cargó una columna de vidrio enchaquetada de 3' x 1/2" DI (Ace glass incorporated) de aproximadamente 115 ml de capacidad con aproximadamente 57 g de carbón activado granulada virgen (CAL 12x40 de Calgon Corporation) recién lavado con agua en ebullición. Se calentó la cubierta de la columna a 60 °C y se mantuvo a esa temperatura durante el transcurso del experimento. Después de cargar la columna, se pasaron aproximadamente 500 ml de agua desionizada a través del lecho de carbón a un caudal de 2,5 ml/min para desplazar y eliminar los finos de carbón. Se preparó una solución de 27 % en peso de Biovittoria Fruit Sweetness™ (aproximadamente 50 % en peso de mogrósido V sobre la base de los sólidos secos (bss) disolviendo 1,241 kg de Biovittoria Fruit Sweetness™ en 3,318 kg de agua Milli-Q (agua obtenida mediante un sistema de purificación de agua por ósmosis inversa Milli-Q, distribuida por Millipore Corp.). A continuación se calentó la solución a 60 °C, se pasó a través de un filtro con cartucho hidrófilo con membrana Optiseal Millipore de 0,22 µm a un frasco de alimentación estéril y se mantuvo a 60°C durante el ciclo.

Se pasó la solución a través de la columna a una velocidad de 2,6 g/min (equivalente a 1,25 volúmenes de lecho por hora) utilizando un sistema de tubos MASTERFLEX® 13 y una bomba peristáltica (bomba MASTERFLEX®). Se recogió el efluente en fracciones de 90 minutos, con una masa media de 234 gramos por fracción. Tras la fracción 5 19 (tiempo transcurrido del ciclo: 28,5 horas), se degustó el efluente y se determinó de manera informal que el efluente tenía un sabor significativamente mejor al del material de alimentación. A continuación, se disolvieron 355,5 g más de Biovittoria Fruit Sweetness™ en 945,3 g de agua Milli-Q, se llevaron a 60°C, se pasaron a través de un filtro de cartucho hidrófilo con membrana Optiseal Durapore de Millipore de 0,22 µm y se añadieron al frasco de alimentación. Al cabo de 37,5 horas, se comenzó el despeje del dulzor (se entiende por la expresión “despeje del 10 dulzor” el lavado de la columna para desplazar los restos de la solución de Fruit Sweetness™) cambiando el material de alimentación de la columna por agua Milli-Q (@ 60°C). Se dejó que despejara el dulzor durante 6 horas hasta que el índice de refracción del efluente fue similar al del agua. El material recogido en todas las fracciones se correspondió con un rendimiento en masa global de aproximadamente 98 % en peso del material deshidratado introducido en el aparato. Se calculó el nivel de tratamiento del total de material de alimentación en el aparato (1241 15 g + 335 g) en 3,61 % en peso. Una rueda de ocho examinadores con experiencia compararon la aceptabilidad en lo que se refiere a la reducción del sabor desagradable comparando las soluciones acuosas de Fruit Sweetness™, material compuesto de las fracciones 1 a 5, material compuesto de las fracciones 1 a 10, material compuesto de las fracciones 1 a 15, material compuesto de las fracciones 1 a 20 y material compuesto de las fracciones 1 a 25. Se observó que los materiales compuestos de 1 a 5, 1 a 10 y 1 a 15 presentaron un nivel de mejora del sabor 20 significativo con respecto al material de alimentación Fruit Sweetness™. Un material compuesto de las fracciones 1 a 15 tuvo un contenido en masa deshidratada de 947 g, correspondiendo así al nivel de tratamiento con carbón de 6,0 % en peso. El material compuesto de las fracciones 1 a 15 fue identificado en adelante como MUESTRA A (286683).

25 Se utilizó HPLC para determinar la composición de glucósido aromático del material de alimentación Biovittoria Fruit Sweetness™ y el efluente Luo Han Guo de mejor sabor tras el tratamiento con carbón. Se equipó un Módulo de Separación de Waters 2695 con un Detector de Absorbancia Dual λ 2487 de Waters y una columna Gemini C18 de Phenomenex, 5 mm, 150 x 4,6 mm con un cartucho con guarda de seguridad Gemini C18 de Phenomenex, 4 x 3 mm. Se utilizó el gradiente acetonitrilo/agua indicado a continuación como fase móvil y un caudal de 1,0 ml/min y 30 una temperatura de columna de 40 °C. Se utilizó detección de UV a 203 nm y el volumen de inyección de 40 µl.

Fase móvil: gradiente de segmento lineal acetonitrilo/agua % en volumen

Tiempo [min]	Acetonitrilo	H ₂ O
0	20	80
15	30	70
20	50	50
25	50	50
30	20	80

35 Se utilizó un mogróside V puro patrón (ChomaDex, Inc.) para la cuantificación calibrada de todos los componentes detectados a 203 nm. En la Tabla 3 se resumen los % en peso de los componentes sobre la base de los sólidos secos (b.s.s) como mogróside V. Se observó una significativa reducción de los glucósidos aromáticos que eluyeron de la columna de HPLC en el intervalo de 3,5 a 4,5 minutos en las condiciones antes definidas entre el material de alimentación Biovittoria Fruit Sweetness™ y el efluente de carbón y esta reducción se correspondió a la significativa 40 mejora del sabor, tal como se percibió.

Tabla 3

Muestra ID	% en peso Mog V del total de la muestra bss	% en peso glucósidos aromáticos del total de la muestra como Mog V	% en peso glucósidos aromáticos en relación con Mog V
Material de alimentación Biovittoria Fruit Sweetness™ (284178)	49,1%	7,3%	14,8%
Luo Han Guo Muestra A (286683)	50,9%	4,2%	8,3%

45 Se utilizó la técnica Headspace GC con detección de ionización de llama (DIL), tal como se define según las siguientes condiciones, para determinar la composición de los compuestos orgánicos semi-volátiles en el material de alimentación de Luo Han Guo y el Luo Han Guo de mejor sabor recuperado tras el tratamiento con carbón.

Transmisor de muestras Combi PAL

50 Modo: Headspace
 Volumen de inyector: 1 ml
 Temperatura de inyector: 85 °C

ES 2 794 563 T3

Temperatura de agitador: 80 °C
Tiempo de pre-incubación: 30 minutos
Velocidad de agitador de pre-incubación: 500 rpm (5 s conexión, 2 s desconexión)
Velocidad de rellenado del émbolo: 200 µl/s
5 Retardo de viscosidad: 12 s
Retardo de pre-inyección: 0 s
Velocidad de inyección de émbolo: 100 µl/s
Retraso post-inyección: 10 s
10 Tiempo de descarga de inyector: 3 min
Tiempo del ciclo CG: 54 min

Varian 3800 GC

Horno:

15 Temperatura inicial: 40 °C
Tiempo de retención inicial: 5 minutos
Rampa: 7,5 °C/min
20 Temperatura final: 235°C
Tiempo de retención final: 14 minutos

Entrada frontal (1177):

25 Temperatura: 250 °C
Modo: Splitless

Columna:

30 Tipo: Rtx-624 (30 m x 0,25 mm x 1,4 mm) - Restek Cat # 10968
Modo: Flujo constante
Flujo: 1,0 ml/min (Helio)

Horno de válvula central:

35 Temperatura: 250 °C

DIL Varian 4000

40 Temperatura: 250 °C
Composición de gas: 2 ml/min (He)
Flujo H₂: 40 ml/min
Flujo de aire: 450 ml/min

EM Varian 4000 Atrapamiento iónico

45 Tipo de exploración: Completa
Intervalo de masa: 25-275 m/z
Tiempo de exploración: 0,00 a 45.00 minutos
Tipo de ionización: EI
50 TIC objetivo: 20000 recuentos
Tiempo Ion Max: 25000 µs
Corriente de emisión: 10 µamps
Media de exploraciones: 3 µexploraciones (0,60 s/exploración)
Velocidad de datos: 1,67 Hz
55 Intervalo de multiplicadora: 0 V

Se utilizó un patrón D-limoneno puro (Sigma-Aldrich) para la cuantificación calibrada de todos los componentes el compuesto orgánico semi-volátil que se muestran en la Figura 3. En la Tabla 4 se resume el total ppm en peso de componentes de los compuestos orgánicos semi-volátiles sobre la base de sólidos secos (bss) como D-limoneno. Se observa una significativa reducción de los compuestos orgánicos semi-volátiles del material de alimentación Biovittoria Fruit Sweetness™ (284178) para Luo Han Guo tratado con carbón (Muestra A 286683) en correspondencia con la mejora significativa del sabor de Luo Han Guo.

65

Tabla 4

ID Muestra	% en peso Mog V del total de muestra bss	ppm en peso compuestos orgánicos semi-volátiles como D-limoneno del total de la muestra	ppm en peso compuestos orgánicos semi-volátiles en relación con Mog V
Material de alimentación Biovittoria Fruit Sweetness™ (284178)	49,1%	8,9	18
Luo Han Guo Muestra A (286683)	50,9%	0,6	1,2

Ejemplo 4 – Identificación de componentes de sabor desagradable en extracto de Luo Han Guo

5 Según la evaluación sensorial se observó que el material Luo Han Guo que había pasado a través de carbón en solución acuosa tenía un sabor mejor y más aceptable que el material de alimentación Luo Han Guo. El análisis de HPLC de un ejemplo de extracto deshidratado de Luo Han Guo que tenía un contenido en mogrósido de aproximadamente 50 % en peso (Biovittoria Fruit Sweetness™) y el análisis del mismo material que había sido tratado con carbón y secado por pulverización, se muestra en los cromatogramas superior e inferior respectivamente en la Figura 1. Los parámetros del método de HPLC fueron como los del Ejemplo 3 con el siguiente gradiente de segmento lineal modificado.

10 Fase móvil: gradiente lineal acetonitrilo/agua % en volumen

Tiempo [min]	Acetonitrilo	H ₂ O
0	10	90
10	10	90
20	20	80
25	20	80
30	30	70
35	30	70
55	95	5
65	5	5
75	10	90

15 El análisis de HPLC demostró que el perfil de los isómeros de mogrósido permanecía esencialmente sin cambios tras el tratamiento con carbón. En la Figura 2 se muestra una vista en aumento de la región más polar de los cromatogramas de la Figura 1, en que el producto tratado presentado en el cromatograma presenta picos en la proximidad de 21 min (marcado con una flecha), muy por debajo de los del producto sin tratar en el cromatograma superior. Para determinar la relación de(l) los componente(s) que eluyeron cerca de los 21 min y la disminución del sabor desagradable "rancio", se aplicaron una serie de etapas de extracción y purificación para gastar el carbón que había sido utilizado para tratar Luo Han Guo de manera similar a la del Ejemplo 3. Después de cada etapa de extracción y purificación a lo largo de este estudio, un panel de expertos en degustación evaluó las muestras de Luo Han Guo tratado con carbón que se habían elevado ~5-10X con respecto al nivel original de los componentes recuperados con el fin de identificar las muestras que presentaron el característico sabor desagradable "rancio" de Fruit Sweetness™.

20 Para recuperar los componentes separados por el tratamiento con carbón de la solución de Luo Han Guo acuosa, se extrajeron aproximadamente 500 g del carbón gastado que había sido utilizado en el refinamiento de Luo Han Guo con varias partes alícuotas de 350 ml de disolventes tras el lavado con agua. Se utilizó etanol y luego acetona para lavar el carbón. Se filtraron los extractos a través de filtros de nilón de 0,45 µm y se evaporaron a sequedad bajo una corriente de nitrógeno a temperatura ambiente para recuperar aproximadamente 2,0 g de sólido. El panel de expertos en degustación anterior observó que el residuo del extracto en acetona tenía el característico sabor desagradable "significativamente" rancio" de Fruit Sweetness™. Se confirmó que el componente de HPLC de 21 min (Figuras 1 y 2) estaba contenido en la fracción de acetona y también en todas las fracciones de sabor desagradable "rancias" subsiguientes, tal como se describe a continuación.

35 Se aplicó una extracción líquido-líquido entre 50 ml de agua y 50 ml de cloroformo a la fracción extraída con acetona inicial después de deshidratación completa. El sabor desagradable "rancio" permaneció con la fracción hidrosoluble (aproximadamente 1,8 g de sólido recuperado). Posteriormente, se aplicó una extracción en fase sólida (EFS) utilizando cuatro cartuchos EFS apilados Sep-Pak C18 de Waters (Waters Corp., WAT020515) para fraccionar aún más el residuo de sabor desagradable. Se cargaron en los cartuchos de 10 ml aproximadamente 10 mg/ml de residuo en agua al mismo tiempo después de acondicionar las extracciones en fase sólida con 5 ml de metanol y 10 ml de agua Milli-Q. A continuación, se obtuvieron fracciones recuperadas utilizando una serie de lavados de EFS de 40 10 ml del siguiente modo: 100 % agua, 2 % acetonitrilo (MeCN)/98 % agua, 5 % MeCN, 10 % MeCN, 20 % MeCN, 45 25% MeCN, 30 % MeCN, 40 % MeCN, 50 % MeCN y 100 % MeCN. Se secaron todos los extractos bajo una

corriente de nitrógeno y fueron evaluados por un panel de degustadores. Se repitió este procedimiento de aislamiento entero del carbón gastado a través del fraccionamiento de EFS tres veces con los mismos resultados sensoriales.

- 5 Se determinó que el característico sabor desagradable “rancio” se concentraba significativamente en los aproximadamente 250 mg de sólidos recuperados de la fracción EFS eluida 20 % MeCN/80 % agua (288054) tal como lo verificó un panel de expertos degustadores cuando se elevó en una solución acuosa de Luo Han Guo tratada con carbón. La HPLC de esta fracción presentó una vez más el componente de elución de 21 min, Figura 4.
- 10 Se llevaron a cabo los análisis químicos de los componentes primarios de este aislado en relación con una muestra en blanco de EFS (10 ml agua + 10 ml 50 % MeCN + 10 ml 100 % MeCN) utilizando nitrógeno total Antek, ensayo calorimétrico fenólico Folin-Ciocalteu, ensayo colorimétrico de ninhidrina para proteína, análisis de aminoácido con cromatografía de iones de un digesto ácido, ATR-FTIR de sólido deshidratado, CL-EM y RMN. Los resultados se resumen en las tablas 5 y 6 y se corresponden con una clase de glucósido aromático de los compuestos.

15 **Tabla 5**

Prueba	288054 - EFS 20 % MeCN
Fenólicos Folin-Ciocalteu expresados como equivalentes en ácido gálico	17,6 mg/ml
Prueba de color de ninhidrina para proteína	amarillo (proteína animal)
Nitrógeno total Antek	0,4 % en peso
Aminoácidos IC	2,4 % peso como proteína
ATR-FTIR	Figura 5
CL-EM	Figura 6
H-RMN, ¹³ C-RMN, COSY-45, DEPT-135	Tabla 5

- La Figura 5 presenta el espectro ATR-FTIR corregido basal de la fracción 288054. Se pueden observar bandas características para absorancias de OH, CH alifático, CO y fenilo débil todas ellas en correspondencia con la presencia un glucósido aromático. No se observa absorancia C=O. en la figura 6 se muestra el espectro de masa preciso tiempo de vuelo (ToF) para el componente principal que corresponde a la muestra 288054 en la Figure 4 con un tiempo de retención de 21,0 minutos. La tabla insertada en la Figura 6 indica la fórmula estequiométrica más probable para ion de masa 503 Daltons. Se demuestra que la masa precisa más probable con 1,6 ppm de precisión de masa es un compuesto de carga neutra C₂₆H₃₀O₁₀.
- 20

25 **Tabla 6**

Medida de RMN para muestra 288054	Resonancias de desplazamiento RMN	Información sub-unidad estructural
¹ H-RMN	5,6 ppm y 5,1 ppm dupletes típicos en protones anoméricos; resonancias múltiples entre 3,9 ppm y 3,3 ppm	Subunidades glucósido
¹ H-RMN	resonancias múltiples entre 6,85 y 7.10 ppm	Anillos aromáticos sustituidos
COSY-45		Conectividades correspondientes a resonancia de protón glucosídico
COSY-45	3,75,3,8 ppm	Subunidades metoxi
¹³ C /DEPT-135	resonancias para metinas 101, 75 a 70 ppm; y metilenos 61 a 63 ppm	subunidades glucósido
¹³ C/DEPT-135	resonancias para metinas 119, 116, 111 ppm; resonancia fenoxi metilo 53,7 ppm	anillos aromáticos sustituidos; subunidades metoxi aromáticas

- Se evaluó la distribución y la identidad sugerida de diversos componentes semi-volátiles utilizando la técnica headspace de soluciones acuosas al 5 % por cromatografía de gases con detección espectrométrica de masas (CG-EM) tal como se define en el Ejemplo 3. En la Figura 3 se muestra una comparación del perfil del componente semi-volátil del material de alimentación Fruit Sweetness™ (284178) y la muestra A. En la Tabla 7 se muestra una lista de los mejores ajustes de la biblioteca de EM para 28 compuestos orgánicos semi-volátiles que corresponden a los marcados en la Figura 3. Se enumeran las respuestas organolépticas de sabor y olor conocidas para estos compuestos con fines comparativos (véase por ejemplo Mosciano, G., Perfumer and Flavorist 25, No. 6, 26, (2000).
- 30

35 **Tabla 7**

Ref. pico (Fig.3)	Nombre de componente (CAS#)	Respuesta organoléptica conocida
A	2-pentil-furano (3777-69-3)	Verde, ceroso con un matiz a caramelo quemado amargo

(continuación)

Ref. pico (Fig.3)	Nombre de componente (CAS#)	Respuesta organoléptica conocida
B	butanoato de butilo (109-21-7)	Dulce, fresco, afrutado, ligeramente graso
C	D-limoneno (5989-27-5)	Dulce, naranja, de cítricos y terpenos
D	t-butilbenceno (98-06-6)	---
E	Gamma-terpineno (99-85-4)	Terpeno, cítrico, de tipo lima, oleoso, verde con un matiz de fruta tropical
F	Butenoato de butilo (7299-91-4)	---
G	Terpinoleno (586-62-9)	Cítrico, lima, piña, plástico
	Nonanal (75718-12-6)	---
H	Durene (95-93-2)	---
I	1,3,8-p-mentatrieno (21195-59-5)	---
J	p-cimeno (99-87-6)	Terpeno y rancio con un toque cítrico oxidado ligeramente leñoso
K	Butirato de hexilo (2639-63-6)	Manzana, afrutado, verde, jabonoso, dulce
L	1,1,5,6-Tetrametilindane (942-43-8)	---
M	Azuleno (275-51-4)	---
N	α -ioneno (475-03-6)	---
O	1-metil-naftaleno (90-12-0)	De tipo naftilo con un matiz medicinal
P	2-metil-naftaleno (91-57-6)	---
Q	dehidro-ar-ionene (30364-38-6)	Regaliz
R	(-)- α -cedreno (469-61-4)	Madera de cedro
S	Z- β -farneseno (28973-97-9)	Verde cítrico
T	(+)- β -cedreno (546-28-1)	---
U	Trans- α -bergamoteno (13474-59-4)	Madera
V1	cis- α -bisaboleno (29837-07-8)	---
V2	α -farneseno (502-61-4)	Vegetal verde fresco, con matiz de apio y heno y en cierto modo graso y con un toque de fruta tropical
W	(-)- β -bisaboleno (495-61-4)	Balsámico
X	(+)- α -Longipineno (5989-08-2)	---
Y	2-hexil-1-dodecanol (2425-77-6)	---
Z	(E)-Nerolidol (40716-66-3)	Verde floral, madera, afrutado, cítrico, melón

Ejemplo 5

- 5 Se disolvió una cantidad de 40 g de Fruit Sweetness™ en 200 g de agua Milli-Q en un vaso de precipitados de 500 ml y se añadieron 30 g de carbón activado (BG-HHM de Calgon Carbon Corporation) a la solución de Fruit Sweetness™. Se agitó la suspensión espesa de carbón activado durante 2 horas, al mismo tiempo que se tomaban muestras de 50 μ l de la solución filtrada estéril al cabo de 0, 5, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos. Se diluyeron las muestras 20 veces en agua Milli-Q y se analizaron por HPLC en cuanto a la abundancia relativa de mogrósidos entre los intervalos de tiempo. Al cabo de 2 horas, se filtró la suspensión espesa de carbón activado a través de un papel de filtro Whatman n°2 y se introdujo el filtrado esterilizado en un frasco de liofilizado calibrado. Una vez liofilizado el filtrado estéril, se registró su masa y se analizó por HPLC en cuanto a su contenido en mogrósido. Se designó el material liofilizado Muestra B. A continuación, se sometieron a ensayo 550 ppm de una solución de agua de pH neutro de Fruit Sweetness™ tratado con suspensión espesa de carbón frente a 500 ppm Reb A 97 en agua de pH neutro en cuanto a la preferencia del gusto con la participación de un panel de 48 a 50 examinadores. Con fines comparativos, se examinó también Fruit Sweetness™ frente a 500 ppm Reb A 97 en cuanto a la preferencia en agua de pH neutro. Se llevaron a cabo las pruebas como un diseño de bloque completo. Se rotó el orden de presentación. Se sirvieron las soluciones en copas de suflé de 60 cc (2 onzas) a temperatura ambiente. Se dio instrucciones a los examinadores para que consumieran toda la muestra. No se permitió a los examinadores volver a degustar las muestras. Se pidió al panel de examinadores que identificaran la solución que era más dulce y cuál preferían. Se puso a disposición de los examinadores del panel agua embotellada, 2 % de solución de sacarosa y galletas cracker sin sal para que se aclararan el paladar antes de la prueba y durante ella.

25 Se analizaron los datos con una prueba binomial con un riesgo alfa de 0,05 como prueba de dos colas para el dulzor y una prueba de una cola para la preferencia.

Tabla 8

	Preferencia		Dulzor	
	Recuento	valor-p una cola	Recuento	valor-p dos colas
500 ppm Reb A 97	22	0,24	22	0,47
550 ppm Fruit Sweetness™	26		26	

Tabla 9

	Preferencia		Dulzor	
	Recuento	valor-p una cola	Recuento	valor-p una cola
500 ppm Reb A 97 6	6	<0,01	21	0,20
550 ppm Muestra B	44		29	

5 En la Tabla 8 se demuestra que el producto comercial Fruit Sweetness™ no fue significativamente preferido con respecto a Reb A a un nivel de dulzor equivalente. Sin embargo, la muestra B de Fruit Sweetness™ tratada con carbón en suspensión espesa resultó significativamente preferido frente a BlendSure 7.5 a un nivel de dulzor equivalente (Tabla 9).

10 Aunque la invención se ilustra y se describe en el presente documento con referencia a las realizaciones específicas, la invención no pretende estar limitada a los detalles mostrados. Más bien, se pueden hacer varias modificaciones en los detalles dentro del alcance de las reivindicaciones sin apartarse de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Un método de purificar un extracto de Luo Han Guo, que comprende poner en contacto el extracto de Luo Han Guo con carbono activado, en donde el extracto de Luo Han Guo que se pone en contacto es uno que contiene al menos el 40 % en peso de Mogrósido V en una base sólida seca y se ha puesto previamente en contacto con al menos uno de una resina adsorbente polimérica macroporosa y una resina de intercambio iónico y que contiene glucósidos aromáticos y compuestos orgánicos semi-volátiles, y en donde el extracto de Luo Han Guo está en la forma de una solución acuosa cuando se pone en contacto con el carbón activado; se pasa la solución acuosa a través de una columna de carbón activado a un caudal que varía de 1 a 10 volúmenes de lecho por hora para obtener un efluente, y posteriormente se concentra el efluente; el carbón activado tiene un área superficial de más de 100 m²/g; y al menos el 6 % en peso en relación con el extracto de Luo Han Guo en una base sólida se utiliza para reducir los niveles de glucósidos aromáticos y compuestos orgánicos semi-volátiles presentes en el extracto de Luo Han Guo.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el carbón activado está en la forma de polvo, gránulos o perlas.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el extracto de Luo Han Guo que se pone en contacto es uno que se ha puesto previamente en contacto con dicha resina adsorbente polimérica macroporosa.
4. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el extracto de Luo Han Guo que se puso en contacto con el carbón activado se ha preparado disolviendo un extracto en polvo seco de fruta Luo Han Guo en agua para obtener un extracto disuelto, en donde preferentemente el extracto disuelto se somete a microfiltración.
5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde no se usa más del 15 % en peso de carbón activado en relación con el extracto de Luo Han Guo en una base sólida.
6. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el efluente se concentra posteriormente mediante evaporación o concentración con membrana, en donde la concentración con membrana opcionalmente usa una membrana de nanofiltración o una membrana de ósmosis inversa.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde, tras la concentración, se seca el efluente.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el efluente se seca usando una unidad de secado por pulverización o una unidad de aglomeración por pulverización.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el agua es el único vehículo presente durante la puesta en contacto del extracto de Luo Han Guo con el carbón activado.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la resina de intercambio iónico es una resina aniónica.
11. Un método para preparar una composición edulcorante, en donde un extracto de Luo Han Guo obtenido de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, 9 y 10 se combina con uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en extracto de Rebaudiósido A, Rebaudiósido B, Rebaudiósido D, Glucósido de Esteviol y Estevia purificada y después se seca.

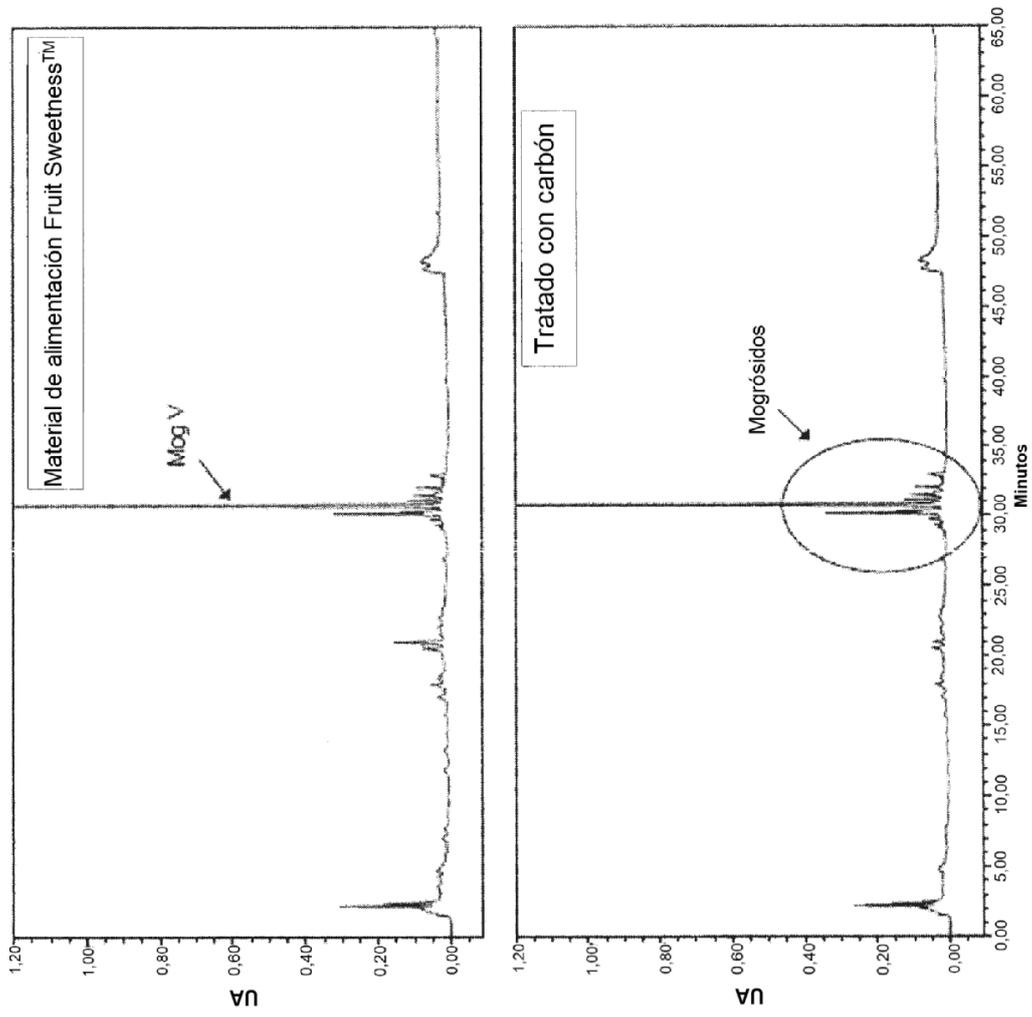


FIG. 1

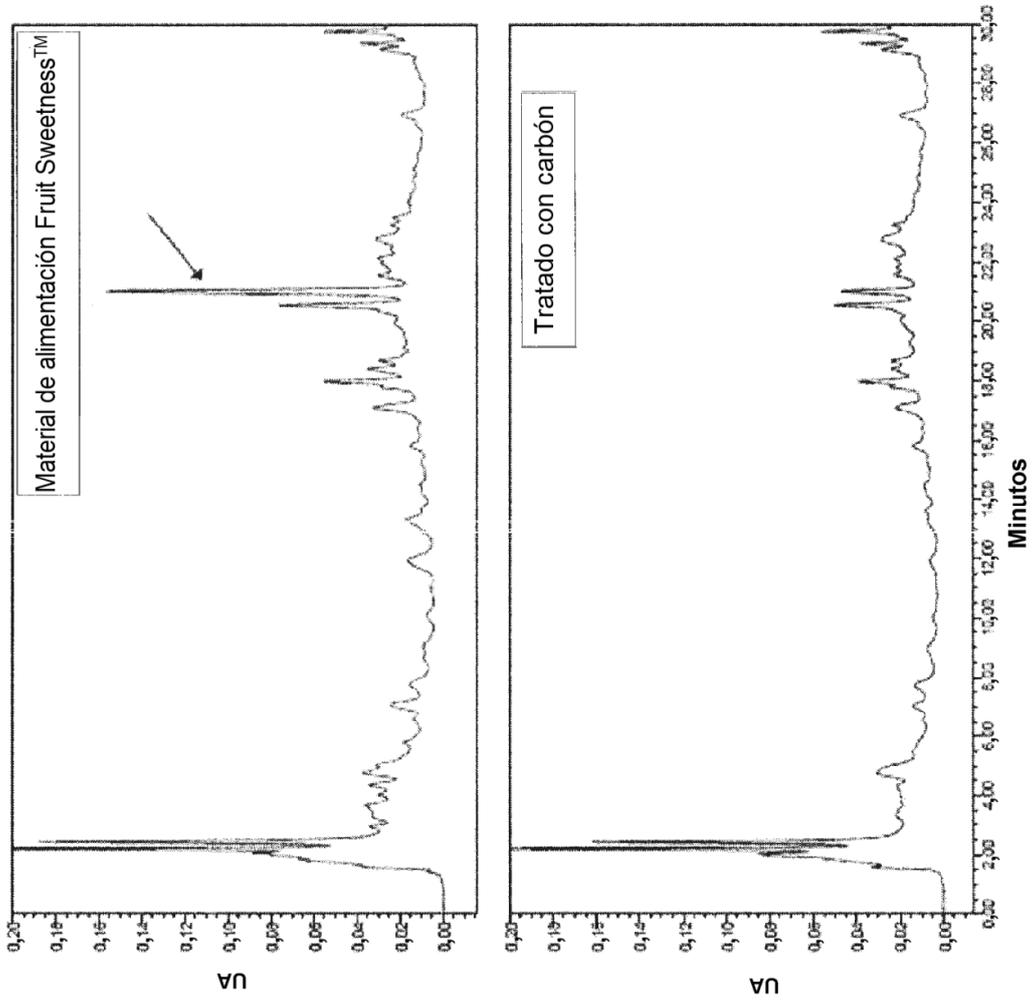


FIG. 2

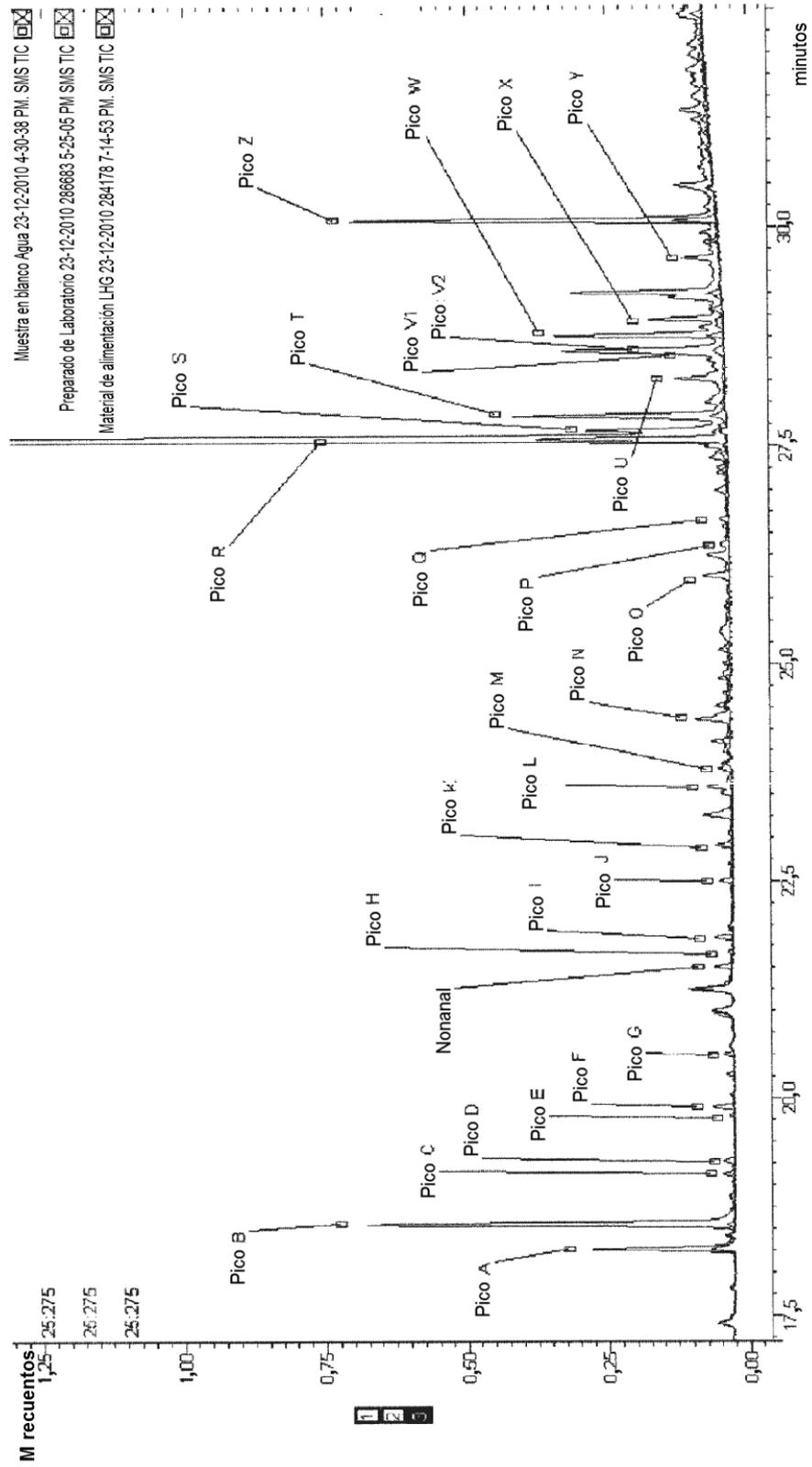


FIG. 3

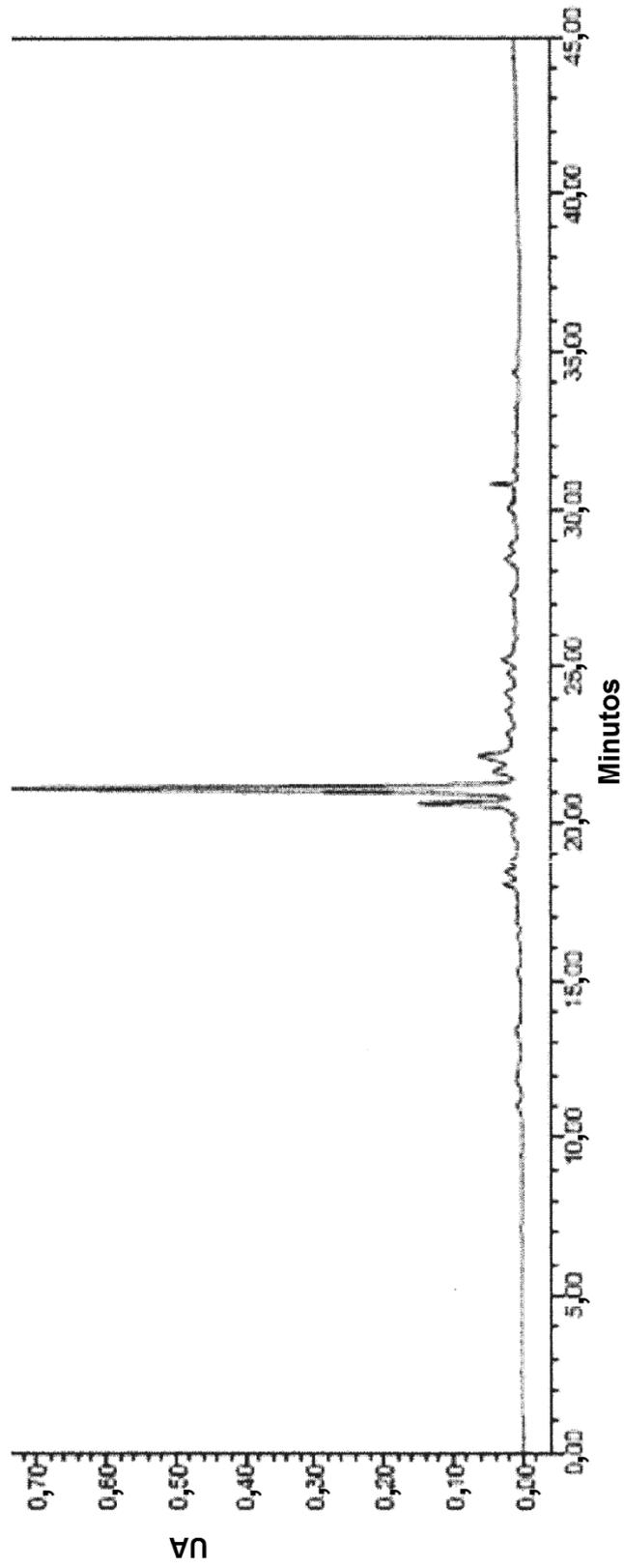


FIG. 4

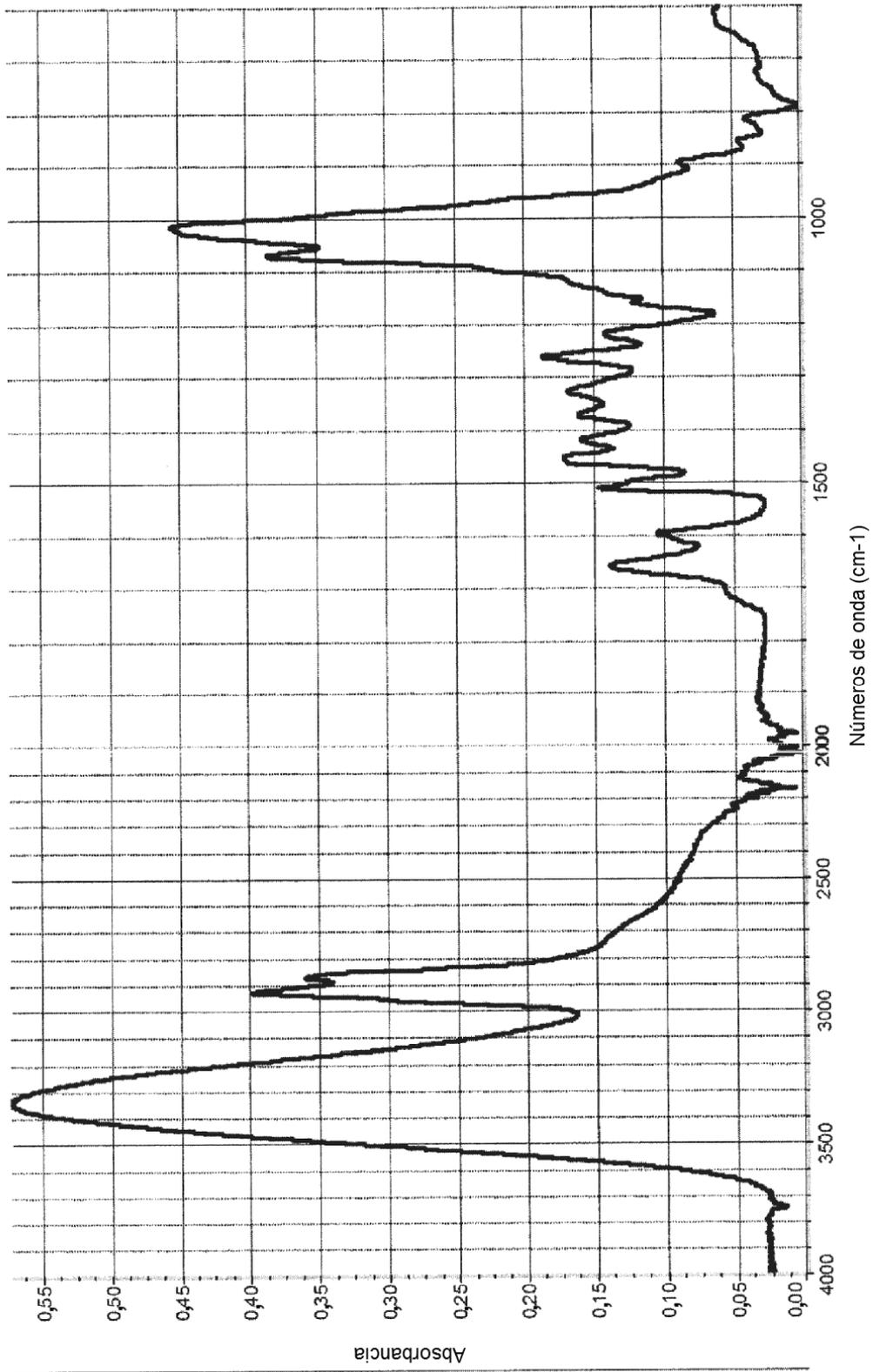


FIG. 5

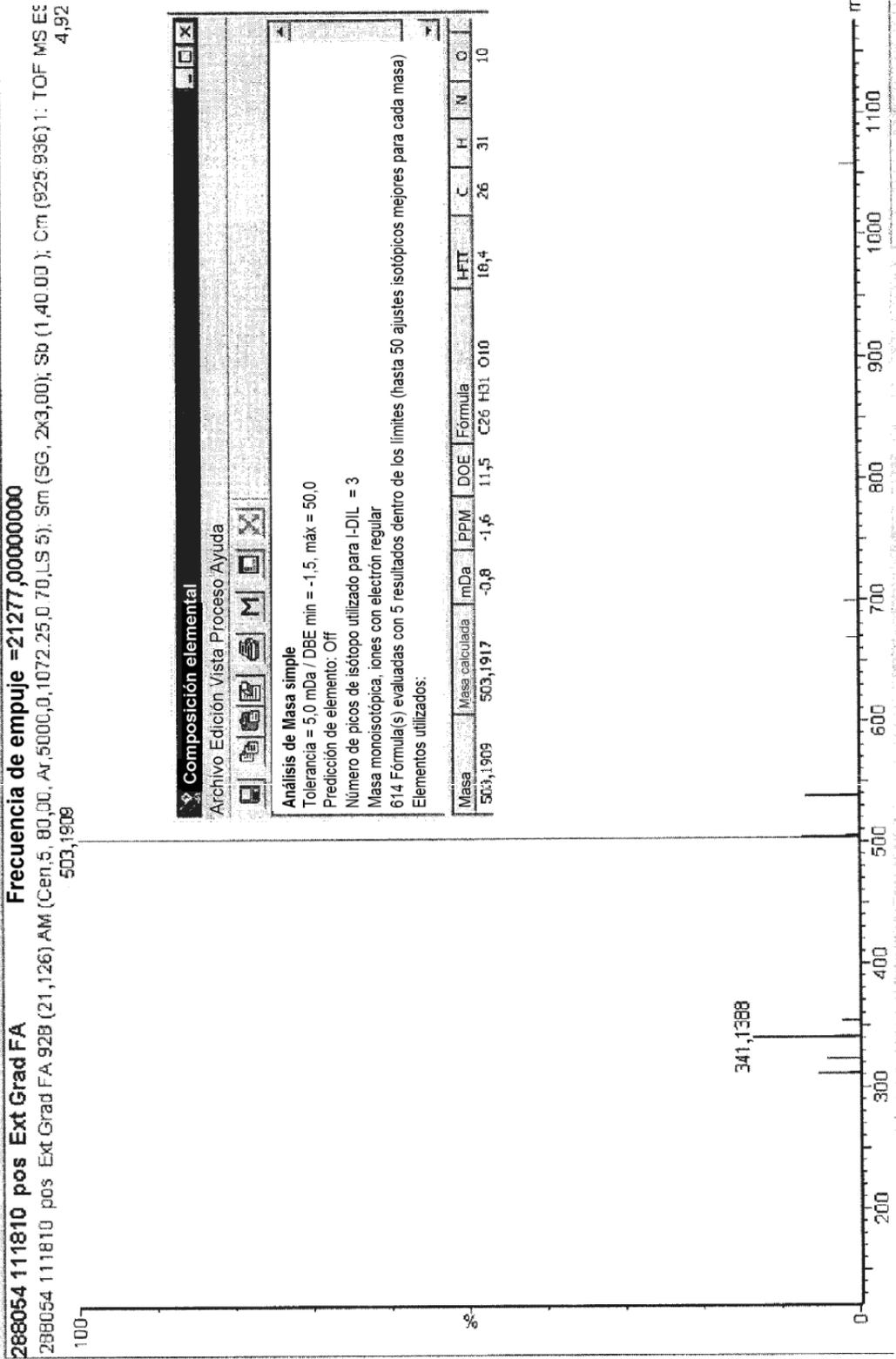


FIG. 6