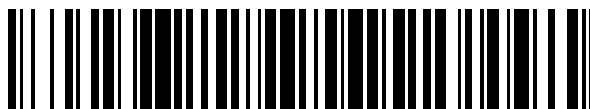


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 799 200**

51 Int. Cl.:

C12P 19/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2011 PCT/US2011/033734**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2012 WO12112177**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2011 E 11858693 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.03.2020 EP 2675909**

54 Título: **Proceso para producir una composición de glucosil estevia**

30 Prioridad:

17.02.2011 US 201113029263

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

15.12.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MARKOSYAN, AVETIK

74 Agente/Representante:

URÍZAR BARANDIARAN, Miguel Ángel

ES 2 799 200 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

Proceso para producir una composición de glucosil estevia

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

[0001] La invención hace referencia a un proceso para producir un ingrediente alimentario altamente purificado a partir del extracto de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni y su uso en diversos productos alimenticios y bebidas.

Descripción de la técnica relacionada

10 **[0002]** En la actualidad, las alternativas al azúcar están recibiendo cada vez más atención debido a la concienciación con respecto a diversas enfermedades relacionadas con el consumo de alimentos y bebidas de alto contenido en azúcar. Sin embargo, se ha prohibido o restringido el uso de muchos edulcorantes artificiales como la dulcina, el ciclamato sódico y la sacarina en algunos países por la preocupación sobre su seguridad. Así pues, los edulcorantes no calóricos de origen natural han comenzado a ser cada vez más populares. La *Stevia rebaudiana* Bertoni, o «hierba dulce», produce diversos glucósidos diterpénicos de intenso dulzor y marcadas propiedades sensoriales, superiores a 15 las de cualquier otro edulcorante de gran potencia.

[0003] Dichos glucósidos dulces poseen una aglicona común, el esteviol, y difieren en el número y el tipo de residuos de carbohidrato en las posiciones C13 y C19. Las hojas de *Stevia* pueden acumular hasta un 10-20 % (en base al peso seco) de glucósidos de esteviol. Los principales glucósidos encontrados en las hojas de *Stevia* son el rebaudiósido A (2-10 %), el esteviósido (2-10 %) y el rebaudiósido C (1-2 %). Otros glucósidos como los rebaudiósidos B, D, E, y F, esteviolbósido y rubusósido se encuentran en niveles muy inferiores (aprox. 0-0,2 %).

[0004] Dos glucósidos principales, el esteviósido y el rebaudiósido A, se estudiaron en profundidad y se caracterizaron en términos de su idoneidad como edulcorantes comerciales de gran intensidad. Los estudios de estabilidad en bebidas carbonatadas 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.)

[0005] Los glucósidos de esteviol difieren entre sí solo en cuanto a su estructura molecular, pero también en cuanto a sus propiedades de sabor. Normalmente, el esteviósido es 110-270 veces más dulce que la sacarosa, el rebaudiósido A es unas 150 y 320 veces más dulce que la sacarosa, y el rebaudiósido C es unas 40-60 veces más dulce que la sacarosa. El glucósido A es 30 veces más dulce que la sacarosa. El rebaudiósido A tiene el regusto menos astringente, menos amargo y menos persistente de todos, poseyendo así los atributos sensoriales más favorables de entre todos los principales glucósidos de esteviol (Tanaka O. (1987) Improvement of taste of natural sweeteners. Pure Appl. Chem. 69:675-683; Phillips K.C. (1989) *Stevia*: steps in developing a new sweetener. In: Grenby T.H. ed. Developments in sweeteners, vol. 3. Elsevier Applied Science, London. 1-43.)

[0006] Los métodos para extraer y purificar glucósidos dulces de la planta *Stevia rebaudiana* empleando agua o disolventes orgánicos se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses número 4,361,697; 4,082,858; 4,892,938; 5,972,120; 5,962,678; 7,838,044 y 7,862,845.

[0007] Con todo, incluso en estado altamente purificado, los glucósidos de esteviol siguen teniendo atributos de sabor no deseados como amargor, regusto dulce, sabor a regaliz, etc. Uno de los principales obstáculos para el éxito de la comercialización de los edulcorantes a base de *Stevia* son estos atributos de sabor no deseados. Se demostró que estas notas de sabor se vuelven más prominentes a medida que aumenta la concentración de glucósidos de esteviol (Prakash I., DuBois G.E., Clos J.F., Wilkens K.L., Fosdick L.E. (2008) Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener. Food Chem. Toxicol., 46, S75-S82.)

[0008] Por otro lado, sustituir grandes cantidades de azúcar en las formulaciones da lugar a problemas como una menor sensación en boca, un perfil de sabor incompleto, etc. Por lo que la aplicación de edulcorantes de gran intensidad bajos en calorías debe proporcionar soluciones a estos problemas.

[0009] Así, si una sola composición pudiera proporcionar dulzor y a la vez poseyera propiedades de intensificación del sabor y corrigiera la sensación en boca incompleta asociada a la eliminación de la sacarosa de las formulaciones de bebidas y alimentos, será ciertamente ventajosa en comparación con otros edulcorantes de gran intensidad conocidos en la técnica.

50 **[0010]** Algunas de estas propiedades no deseadas pueden reducirse o eliminarse aplicando a los glucósidos de esteviol una reacción de transglucosilación intermolecular, cuando los nuevos residuos de carbohidratos se unen a la molécula inicial en las posiciones C13 y C19. La calidad y la potencia del sabor de los compuestos variarán según la cantidad de residuos de carbohidratos en estas posiciones.

- [0011]** La pululanasa, la isomaltosa (Lobov S.V., Jasai R., Ohtani K., Tanaka O. Yamasaki K. (1991) Enzymatic production of sweet stevioside derivatives: transglycosylation by glucosidases. Agric. Biol. Chem. 55: 2959-2965), la β -galactosidasa (Kitahata S., Ishikawa S., Miyata T., Tanaka O. (1989) Production of rubusoside derivatives by transglycosylation of various β -galactosidase. Agric. Biol. Chem. 53: 2923-2928), y la dextrano-sacarasa (Yamamoto K., Yoshikawa K., Okada S. (1994) Effective production of glucosyl-stevioside by α -1,6-transglucosylation of dextran dextranase. Biosci. Biotech. Biochem. 58: 1657-1661) se han empleado como enzimas transglicosiladoras, junto con el pululano, la maltosa, la lactosa y el almidón parcialmente hidrolizado, respectivamente como donantes de residuos glicosídicos.
- [0012]** La transglicosilación de los glucósidos de esteviol también se realizó mediante la acción de la ciclodextrina glucanotransferasa (CGTasa) producida por el *Bacillus stearothermophilus* (patente estadounidense número 4,219,571, y 7,807,206) como resultado, se formaron derivados α -1,4- glucosil con un grado de polimerización de hasta 10.
- [0013]** El tratamiento del esteviósido transglicosilado con β -amilasa produjo un producto que constaba en derivados mono- o di- α -1,4-glucosil (Tanaka, 1987).
- [0014]** Se demostró que el perfil de sabor y el poder endulzante de los derivados glucosil dependen en gran medida del número de derivados adicionales del glucosil, esto es, del grado de polimerización de la cadena α -1,4-glucosil. El aumento del número de residuos α -1,4-glucosil mejoró la calidad del sabor, reduciendo, al tiempo, el nivel de dulzor (Tanaka, 1987). **[0015]** También se observó que muchos productos a base de glucosil estevia contienen hasta un 20 % de dextrinas residuales que no poseen propiedades funcionales significativas y reducen el contenido de glucósidos de esteviol en el producto.
- [0016]** Por lo tanto, es necesario desarrollar productos de gran pureza con una longitud de cadena α -1,4-glucosil óptima que proporcionen la mejor combinación de potencia de dulzor y perfil de sabor.
- [0017]** Kochikyan V.T. et al, "Combined enzymatic modification of stevioside and rebaudioside A", Applied Biochemistry and Microbiology, Vol. 42, No. 1, Pages 31-37 and US 2006/134292 A1 proponen procesos para producir composiciones de glucosil estevia altamente purificadas.
- 25 **RESUMEN DE LA INVENCION**
- [0018]** La presente invención tiene por finalidad solventar las desventajas de los edulcorantes a base de Stevia existentes. Así pues, la presente invención va dirigida a un proceso para producir una composición de glucosil estevia altamente purificada según se describe en la Reivindicación 1. Se describen más características ventajosas en las subreivindicaciones 2 a 11. La invención describe un proceso para producir un ingrediente alimentario de alta pureza a partir del extracto de la planta Stevia rebaudiana Bertoni y para usar dicho extracto en diversos productos alimentarios y bebidas como modificador del dulzor y del sabor.
- [0019]** La invención hace referencia a un ingrediente que comprende derivados glicosilados de glucósidos de esteviol de la planta Stevia rebaudiana Bertoni. Los glucósidos de esteviol se seleccionan del grupo que consta de esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, dulcósido A, esteviolbiósido, rubusósido y otros glucósidos de esteviol que se encuentran en la planta Stevia rebaudiana Bertoni y en las mezclas a base de la misma.
- [0020]** Ventajosamente, la presente invención está relacionada con un proceso para producir un ingrediente que contiene formas glicosiladas de rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, dulcósido A, esteviolbiósido, rubusósido, y otros glucósidos de esteviol que se encuentran en la planta Stevia rebaudiana Bertoni. Este es un proceso enzimático de transglicosilado empleando preferentemente CGTasas producidas por cultivos de *Bacillus stearothermophilus*. El proceso incluye el paso de acortamiento de las cadenas glucosil mediante β -amilasa. El proceso también cuenta con los pasos de decoloración, desalinización y eliminación de los maltooligosacáridos. La decoloración puede realizarse empleando carbón activado. La desalinización se lleva a cabo mediante filtrado a través de resinas de intercambio iónico. La eliminación de los maltooligosacáridos se lleva a cabo mediante filtrado a través de resinas macroporosas, preferentemente poliméricas.
- [0021]** En la invención, se empleó como material de partida el extracto de Stevia comercializado por PureCircle (JiangXi) Co., Ltd. (China), que contiene esteviósido (28-30 %), rebaudiósido A (50-55 %), rebaudiósido C (9-12 %), rebaudiósido F (1-3 %) y otros glucósidos hasta un contenido total de glucósidos de esteviol de, al menos, un 95 %. Alternativamente, pueden emplearse como material de partida los extractos de estevia con distintos ratios de glucósidos de esteviol y glucósidos de esteviol altamente purificados como el rebaudiósido A, el esteviósido, el rebaudiósido D, el rubusósido, etc.
- [0022]** El material de partida estaba sujeto a la transglicosilación enzimática por acción de la ciclodextrina glicosiltransferasa (CGTasa) en presencia de almidón como donante de glucosa. Como resultado, se formaron derivados α -1,4-glucosil con un grado de polimerización de hasta 10. A continuación, los derivados formados se trataron con β -amilasa para producir derivados α -1,4-glucosil con una polimerización específica.

[0023] Los oligosacáridos de la mezcla de reacción obtenida se extrajeron usando resina Amberlite XAD7 HP, y a continuación se decoloraron, desionizaron, concentraron y se secaron por aspersión.

5 [0024] Los productos obtenidos se aplicaron como edulcorantes, potenciadores del dulzor y modificadores del sabor a diversos alimentos y bebidas, entre ellos, helados, galletas, pan, zumos de fruta, lácteos, productos horneados y productos de repostería.

[0025] La descripción general anterior y la descripción detallada que sigue tienen carácter explicativo y tienen por finalidad proporcionar una explicación más detallada de la invención reivindicada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10 [0026] Los dibujos adjuntos se incluyen para facilitar la comprensión 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 Fig. 1 muestra una tabla de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) de un producto comercial tratado con β -amilasa que contiene solo derivados mono- y di- α -1,4-glucosil de glucósidos de esteviol;

15 La FIG. 2 muestra una Cromatografía Líquida de Alta Resolución de extracto de *Stevia* transglicosilado purificado sin tratamiento con β -amilasa que contiene derivados α -1,4-glucosil de cadena larga con hasta nueve residuos α -1,4-glucosil;

La Fig. 3 muestra una Cromatografía Líquida de Alta Resolución del extracto de *Stevia* transglicosilado purificado tras el tratamiento con β -amilasa derivados de cadena corta (con cuatro o menos residuos α -1,4-glucosil) de esteviósido y rebaudiósido A.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 [0027] Las ventajas de la presente invención se harán evidentes a partir de la descripción detallada incluida a continuación. Con todo, si bien la descripción detallada y los ejemplos específicos indican realizaciones preferidas de la invención, ambos se incluyen a modo meramente ilustrativo, puesto que los diversos cambios y modificaciones llevados a cabo dentro del espíritu y el alcance de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción detallada.

25 [0028] Se empleó como material de partida el extracto de *Stevia* comercializado por PureCircle (JiangXi) Co., Ltd. (China), que contiene esteviósido (28-30 %), rebaudiósido A (50-55 %), rebaudiósido C (9-12 %), rebaudiósido F (1-3 %) y otros glucósidos (en adelante, colectivamente «glucósidos de esteviol») hasta un contenido total de glucósidos de esteviol de, al menos, un 95 %. Alternativamente, pueden emplearse como material de partida los extractos de *Stevia* con distintos ratios de glucósidos de esteviol y glucósidos de esteviol altamente purificados como el rebaudiósido A, el esteviósido, el rebaudiósido D, el rubusósido, etc.

35 [0029] El análisis por HPLC de las materias primas y los productos se llevó a cabo en un cromatógrafo líquido Agilent Technologies 1200 Series (USA), equipado con columna Zorbax-NH2 (4,6X250 mm). La fase móvil fue un gradiente agua-acetonitrilo de 80:20, v/v (0-2 min) a 50:50, v/v (2-70 min). Se empleó un conjunto detector de matriz de diodos a 210 nm como detector. [0030] La transglicosilación se llevó a cabo mediante ciclodextrina glucanotransferasas (CGTasas; EC 2.4.1.19) producidas por *Bacillus stearothermophilus* St-88 (PureCircle Sdn Bhd Collection of Industrial Microorganisms - Malasia). Pero puede aplicarse cualquier otra CGTasa o enzima que posea actividad de transglicosilación intermolecular.

40 La enzima puede encontrarse en forma de caldo de cultivo acelular, caldo de cultivo acelular líquido concentrado, caldo de cultivo acelular secado por congelación o por aspersión, o proteína de alta pureza. Pueden emplearse preparaciones enzimáticas inmovilizadas y libres.

[0031] La actividad de las preparaciones CGTasa se determinó en base al procedimiento descrito en Hale W.S., Rawlins L.C. (1951) Amylase of *Bacillus macerans*. Cereal Chem. 28, 49-58.

[0032] Pueden emplearse como donantes de unidades glucosil almidones de distinto origen, como trigo, maíz, tapioca y sagú.

45 [0033] El almidón fue objeto de una hidrólisis parcial (licuefacción) antes de la reacción de transglicosilación. La dextrosa equivalente del almidón parcialmente hidrolizado puede encontrarse en un rango de aproximadamente 10-25, preferentemente de aproximadamente 12-16. Puede emplearse para la licuefacción cualquier enzima capaz de realizar la hidrólisis del almidón, como las α -amilasas, β -amilasas, etc. En una realización, se prefieren las mezclas de CGTasa y α -amilasa como enzimas de licuefacción.

ES 2 799 200 T3

[0034] Se expresa la actividad de la α -amilasa en Unidades Kilo Novo (KNU) de α -amilasa. Una KNU es la cantidad de α -amilasa que, en condiciones estándar (pH 7.1; 37 °C), dextriniza 5,26 g de sustancia seca de almidón por hora.

[0035] La mezcla de licuefacción contiene aproximadamente 0,001-0,2 KNU, preferentemente aproximadamente 0,05-0,1 KNU de α -amilasa por unidad de CGTasa.

5 **[0036]** El uso de α -amilasa en la licuefacción permite obtener un mayor rendimiento en la filtración por carbón activado posterior. Cuando se emplea CGTasa como única enzima de licuefacción, la tasa de filtración es de aproximadamente 10-15 L/hr por 1m² de superficie de filtrado. En caso de mezcla de enzima de licuefacción (que comprende α -amilasa y CGTasa), la tasa de filtración es el doble de rápida, aproximadamente 20-30 L/hr por 1m² de superficie de filtrado.

10 **[0037]** El ratio de almidón y CGTasa en la mezcla de licuefacción es de aproximadamente 0,1-0,5 unidades por gramo de almidón, preferentemente de aproximadamente 0,2-0,4 unidades por gramo.

[0038] La concentración de almidón en la mezcla de licuefacción es de aproximadamente 15-40 % (wt/wt), preferentemente de aproximadamente un 20-30 %.

[0039] La licuefacción se lleva a cabo a aproximadamente 70-90 °C durante unas 0,5-5 horas, preferentemente, aproximadamente unas 1-2.

15 **[0040]** Tras la licuefacción, la mezcla de reacción se somete a inactivación térmica de α -amilasa en condiciones de pH bajo. El rango de pH preferido para la inactivación es de entre, aproximadamente, pH 2.5 y 3.0 y la temperatura preferida es de aproximadamente 95-105 °C. La duración de la inactivación térmica es de aproximadamente 5-10 minutos.

20 **[0041]** Tras la inactivación, el pH de la mezcla de reacción se ajusta aproximadamente a pH 5.5-6.5 y los glucósidos de esteviol se añaden a la mezcla y se disuelven. El ratio preferido de glucósidos de esteviol-almidón (kg de glucósidos de esteviol por cada 1 kg de almidón) es de aproximadamente 0,5-1,5, preferentemente de 0,8-1,2.

25 **[0042]** Se añade una segunda porción de preparación de CGTasa y se lleva a cabo la reacción de transglicosilación a unos 65 °C durante aproximadamente 24-48 horas. La cantidad de segunda porción de CGTasa es de aproximadamente 0,2-4 unidades de CGTasa por gramo de sólidos, preferentemente de aproximadamente 0,5-1,2 unidades por gramo de sólidos.

[0043] Tras completar la reacción de transglicosilación, se añadieron aproximadamente 30-50 unidades por gramo de sólidos de β -amilasa y continuó la reacción durante unas 12-16 horas a unos 35-55 °C, preferentemente a unos 45 °C. En esta fase se empleó β -amilasa de soja. Sin embargo, pueden emplearse también β -amilasas derivadas de cualquier otra fuente, incluidas la cebada, las β -amilasas de origen bacteriano y fúngico y otras.

30 **[0044]** La unidad de actividad de la β -amilasa (1 AUN) se define como la actividad que libera 100 μ g de azúcar reductor (expresado por la dextrosa equivalente) por minuto en las siguientes condiciones: Se mezcló 1mL de solución enzimática con 5mL de solución de almidón al 1,2 % (pH 5.5, M / 20 tampón acetato) y se guardó durante 20 min. A 40 °C.

35 **[0045]** La reacción se paró calentándola a aproximadamente 95 °C durante unos 15 minutos para inactivar las enzimas, y la solución se trató con carbón activado, para obtener una mezcla de reacción decolorada. La cantidad de carbón activado empleada fue aproximadamente 0,02-0,4 gramos por gramo de sólidos, preferentemente aproximadamente 0,05-0,2 gramos por gramo de sólidos.

40 **[0046]** La mezcla de reacción decolorada se desalinizó haciéndola pasar por resinas de intercambio iónicas, como Amberlite FPC23 (tipo H+) y Amberlite FPA51 (tipo OH-). Pueden emplearse otros métodos de decoloración y desalinización adecuados, como la filtración por membrana, u otros métodos conocidos en la técnica.

45 **[0047]** La mezcla de reacción desalinizada se concentró posteriormente empleando un evaporador de vacío y se secó mediante un secador por aspersión. Pueden emplearse otros métodos de concentración y secado adecuados, como la filtración por membrana, el secado por congelación u otros métodos conocidos en la técnica. El producto resultante contiene glucósidos no modificados, derivados de cadena corta (que contienen cuatro o menos residuos α -1,4-glucosil) y una mezcla de maltooligosacáridos (Muestra 1).

50 **[0048]** Para preparar un producto con mayor contenido de glucósidos dulces totales (la suma de los glucósidos glicosilados y no glicosilados), los maltooligosacáridos se extrajeron empleando Amberlite XAD7 HP antes del tratamiento desalinizador. Los glucósidos de esteviol y sus derivados glicosilados fueron absorbidos en la resina y a continuación eluidos con etanol acuoso. El eluato con etanol acuoso resultante, que contiene glucosil glucósidos de esteviol, se decoloró y desalinizó a continuación tal y como se describe más arriba, y la solución de glucósidos, tras evaporar el disolvente eluyente, se pulverizó mediante secado por aspersión. El producto resultante contiene glucósidos no modificados y derivados de cadena corta (que contienen cuatro o menos residuos α -1,4-glucosil) (Muestra 2).

ES 2 799 200 T3

[0049] Las realizaciones de la invención ejemplificadas mediante las Muestras 1 y 2 están libres o sustancialmente libres de derivados altamente glicosilados con más de 4 residuos glucosil. De acuerdo con esta invención, la composición glucosil estevia altamente purificada comprende, preferentemente, más de un 25 % en peso de di-, tri- y tetraglucosil rebaudiósido A, y más de un 9 % en peso de tri- y tetraglucosil esteviósidos.

- 5 **[0050]** Empleando un proceso similar al empleado para la Muestra 2, excluida la fase de tratamiento de β -amilasa, se preparó un producto que contiene glucósidos no modificados y derivados α -1,4-glucosil de cadena larga (con hasta nueve residuos α -1,4-glucosil) (Muestra 3).

- 10 **[0051]** Como control, se empleó un producto comercial tratado con β -amilasa que contenía glucósidos no modificados, y derivados de cadena corta (que contenían dos o menos residuos α -1,4-glucosil) (Muestra 4). La composición de las muestras se resume en la Tabla 1.

Tabla 1

Composición de muestras de glucósidos de esteviol glucosil				
Compuestos	Contenido, %			
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
Esteviósido	2,5	3,0	3,1	9,5
Rebaudiósido C	0,9	1,0	1,0	0,4
Rebaudiósido A	5,2	6,1	6,0	2,8
Monoglucosil-esteviósido (StevG1)	11,0	13,2	7,4	34,9
Monoglucosil-rebaudiósido A (RebAG1)	14,6	17,5	11,1	6,3
Diglucosil-esteviósido (StevG2)	10,4	12,4	8,4	26,4
Diglucosil-rebaudiósido A (RebAG2)	15,6	18,6	9,6	-
Triglucosil-esteviósido (StevG3)	5,8	7,0	6,3	-
Triglucosil-rebaudiósido A (RebAG3)	7,9	9,5	7,7	-
Tetraglucosil-esteviósido (StevG4)	3,7	4,4	5,6	-
Tetraglucosil-rebaudiósido A (RebAG4)	2,9	3,4	6,1	-
Derivados altamente glicosilados	-	-	22,7	-
Contenido total de glucósidos	80,5	96,1	95,0	80,3

- 15 **[0052]** La evaluación sensorial de las muestras se llevó a cabo empleando soluciones acuosas, con 20 panelistas. Considerando la aceptación general, se eligieron las muestras más deseables y las menos deseables. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Evaluación sensorial de las muestras en el sistema de aguas				
Juicio	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
Más deseable	5	11	1	2

ES 2 799 200 T3

(continuación)

Menos deseable	1	0	7	12
Poder endulzante	150	160	120	150
Comentarios	Dulce, ligero, suave, redondo, agradable, casi similar a la sacarosa, sin regusto persistente, dulzor inicial rápido	Dulce, ligero, suave, redondo, agradable, casi similar a la sacarosa, sin regusto persistente, dulzor inicial rápido	Dulce, ligeramente amargo, astringente, sin regusto persistente, dulzor inicial moderado	Dulce, ligeramente amargo, astringente, regusto levemente persistente, dulzor inicial bajo

5 **[0053]** Como se sigue de los resultados de la Tabla 2, la calidad del dulzor de las Muestras 1 y 2 se evaluó como la mejor. En general, las muestras con derivados de cadena corta (que contenían cuatro o menos residuos α -1,4-glucosil) (n.º 1 y n.º 2) poseían mejores perfiles de sabor en comparación con las muestras con derivados glucosil de cadena larga (n.º 3) y dos o menos residuos α -1,4-glucosil con derivados de cadena corta (n.º 4).

[0054] Las Muestras 1 y 2 muestran un poder endulzante comparable (150-160 veces más dulce en comparación a una solución con sacarosa al 5 %) con la Muestra 4 de control (150 veces); aunque su perfil de sabor era claramente superior al de la muestra de control.

10 **[0055]** Las composiciones pueden emplearse como potenciadores del dulzor, potenciadores del sabor y edulcorantes en diversos productos alimentarios y bebidas. Los ejemplos no limitativos de productos alimentarios y bebidas incluyen refrescos carbonatados, bebidas listas para consumir, bebidas energéticas, bebidas isotónicas, bebidas bajas en calorías, bebidas cero calorías, bebidas deportivas, té, zumos de fruta y verdura, bebidas a base de zumo, bebidas lácteas, bebidas a base de yogur, bebidas alcohólicas, bebidas instantáneas en polvo, productos de panadería, galletas, bizcochos, mezclas panificables, cereales, golosinas, caramelos, tofes, chicle, productos lácteos, leche de sabores, yogures, yogures de sabores, leche cultivada, salsa de soja y otros productos a base de soja, salsas para ensaladas, mayonesa, vinagre, postres congelados, productos cárnicos, productos a base de carne-pescado, alimentos enlatados y embotellados, edulcorantes de mesa, frutas y verduras.

20 **[0056]** Adicionalmente, las composiciones pueden emplearse en preparaciones medicamentosas o farmacéuticas y cosméticas, incluidas, sin límite, la pasta de dientes, el enjuague bucal, el jarabe para la tos, las tabletas masticables, las pastillas, los preparados vitamínicos y similares.

[0057] Las composiciones pueden emplearse "tal cual" o en combinación con otros edulcorantes, sabores e ingredientes alimentarios.

25 **[0058]** Los ejemplos no limitativos de edulcorantes incluyen glucósidos de esteviol, esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, dulcósido A, esteviolbósido, rubusósido, así como otros glucósidos de esteviol que se encuentran en la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni y en las mezclas a base de la misma, el extracto de estevia, el extracto Luo Han Guo, los mogrósidos, el jarabe de maíz con alto contenido en fructosa, el jarabe de maíz, el azúcar invertido, los fructooligosacáridos, la inulina, los inulooligosacáridos, el azúcar de enlace (coupling sugar), los maltooligosacáridos, las maltodextrinas, los sólidos a base de jarabe de maíz, 30 la glucosa, la maltosa, la sacarosa, la lactosa, el aspartamo, la sacarina, la sucralosa, los alcoholes de azúcar.

[0059] Los ejemplos no limitativos de sabores incluyen limón, naranja, afrutado, plátano, uva, pera, piña, almendra amarga, cola, canela, azúcar, algodón de azúcar, sabores de vainilla.

35 **[0060]** Los ejemplos no limitativos de otros ingredientes alimentarios incluyen saborizantes, acidulantes, ácidos orgánicos y amino, agentes colorantes, agentes incrementadores del volumen, almidones modificados, gomas, texturizadores, conservantes, antioxidantes, emulsionantes, estabilizadores, espesantes, gelificantes.

[0061] Los siguientes ejemplos ilustran varias realizaciones de la invención. La invención no se limita a los materiales, las proporciones, las condiciones ni los procedimientos establecidos en los ejemplos, que tienen mero valor ilustrativo.

EJEMPLO 1

Preparación de la CGTasa

40 **[0062]** Se inoculó una cepa de *Bacillus stearothermophilus* St-88 en 2.000 litros de medio de cultivo esterilizado que contenía 1,0 % de almidón, 0,25 % de extracto de maíz, 0,5 % de (NH₄)₂SO₄, y 0,2 % de CaCO₃ (pH 7.0-7.5) a 56 °C

ES 2 799 200 T3

durante 24 horas con aeración continua (2.000 L/min) y agitación (150rpm). El caldo de cultivo obtenido se filtró empleando una membrana cerámica Kerasep (Novasep, Francia) de 0,1 mm para separar las células. El permeado celular se concentró al doble posteriormente en ultrafiltros Persep 10kDa (Orelis, Francia). La actividad de la enzima se determinó de acuerdo con Hale, Rawlins (1951). Se obtuvo una preparación enzimática cruda con actividad de aproximadamente 2 unidades/mL.

EJEMPLO 2

Preparación de la composición de glucosil estevia de cadena corta

[0063] Se suspendieron 100 g de almidón de tapioca en 300 mL de agua (pH 6.5). Se añadieron 2 KNU de α -amilasa (Termamyl Classic, Novozymes, Dinamarca) y 30 unidades de CGTasa obtenidos de acuerdo con el EJEMPLO 1, y se llevó a cabo la licuefacción del almidón a 80 °C durante aproximadamente una hora a aproximadamente 15 de dextrosa equivalente. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a pH 2.8 con ácido clorhídrico y la mezcla se hirvió a 100 °C durante 5 minutos para inactivar las enzimas. Tras enfriarla a 65 °C, el pH se ajustó a pH 6.0 con una solución de hidróxido sódico. Se añadieron al almidón líquido 100 g de extracto de estevia producidos por PureCircle (JiangXi) Co., Ltd. (China), que contienen esteviósido al 29,2%, rebaudiósido A al 54,3 %, rebaudiósido C al 9,0 %, rebaudiósido F (al 1,7 %) y otros glucósidos con un contenido total de glucósidos de esteviol de aproximadamente 96,4 % y se removieron hasta obtener una solución homogénea. Se añadieron 200 unidades de CGTasa a la solución y la mezcla se mantuvo a una temperatura de 65 °C durante 24 horas con agitación continua. A continuación, se redujo la temperatura a 45 °C, y se añadieron a la mezcla de reacción 8.000 unidades de β -amilasa de soja (#1500S, Nagase Chemtex Corp., Japón). La reacción continuó durante otras 12 horas. La mezcla de reacción obtenida se calentó a 95 °C durante 15 minutos para inactivar las enzimas. Se añadieron 20 gramos de carbón activado y la mezcla se calentó a 75 °C, manteniéndola durante 30 minutos. La mezcla se filtró y el filtrado se diluyó con agua al 5 % de contenido en sólidos y se hizo pasar por columnas de resinas de intercambio iónico Amberlite FPC23 (H+) y Amberlite FPA51 (OH-). La solución desalinizada se concentró a 60 °C en vacío, y se secó en forma de polvo empleando un secador por aspersión de laboratorio. Se obtuvieron 196 gramos de producto (Muestras 1).

EJEMPLO 3

Preparación de composición de glucosil estevia de cadena corta altamente purificada

[0064] Se suspendieron 100 g de almidón de tapioca en 300 mL de agua (pH 6.5). Se añadieron 2 KNU de α -amilasa (Termamyl Classic, Novozymes, Dinamarca) y 30 unidades de CGTasa obtenidos de acuerdo con el EJEMPLO 1, y se llevó a cabo la licuefacción del almidón a 80 °C durante aproximadamente una hora a aproximadamente 15 de dextrosa equivalente. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a pH 2.8 con ácido clorhídrico y la mezcla se hirvió a 100 °C durante 5 minutos para inactivar las enzimas. Tras enfriarla a 65 °C, el pH se ajustó a pH 6.0 con una solución de hidróxido sódico. Se añadieron al almidón líquido 100 g de extracto de estevia producidos por PureCircle (JiangXi) Co., Ltd. (China), que contienen esteviósido al 29,2%, rebaudiósido A al 54,3 %, rebaudiósido C al 9,0 %, rebaudiósido F (al 1,7 %) y otros glucósidos con un contenido total de glucósidos de esteviol de aproximadamente 96,4 % y se removieron hasta obtener una solución homogénea. Se añadieron 200 unidades de CGTasa a la solución y la mezcla se mantuvo a una temperatura de 65 °C durante 24 horas con agitación continua. A continuación se redujo la temperatura a 45 °C, y se añadieron a la mezcla de reacción 8.000 unidades de β -amilasa de soja (#1500S, Nagase Chemtex Corp., Japón). La reacción continuó durante otras 12 horas. La mezcla de reacción obtenida se calentó a 95 °C durante 15 minutos para inactivar las enzimas. Se añadieron 20 gramos de carbón activado y la mezcla se calentó a 75 °C, manteniéndola durante 30 minutos. La mezcla se filtró y el filtrado se diluyó con agua al 5 % de contenido en sólidos y se hizo pasar por columnas llenas de 4000 mL de resina macroporosa absorbente Amberlite XAD 7HP. Las columnas se lavaron con 5 volúmenes de agua y 2 volúmenes al 20 % (v/v) de etanol. Los glucósidos absorbidos se eluyeron con un 50 % de etanol. El eluato obtenido se pasó por columnas llenas de resina de intercambio iónico Amberlite FPC23 (H+) y Amberlite FPA51 (OH-). El etanol se evaporó y la solución acuosa desalinizada se concentró a 60 °C en vacío, y luego se secó en forma de polvo empleando un secador por aspersión de laboratorio. Se obtuvieron 151 gramos de producto (Muestras 2).

EJEMPLO 4

Preparación de composición de glucosil estevia de cadena larga altamente purificada

[0065] Se suspendieron 100 g de almidón de tapioca en 300 mL de agua (pH 6.5). Se añadieron 2 KNU de α -amilasa (Termamyl Classic, Novozymes, Dinamarca) y 30 unidades de CGTasa obtenidos de acuerdo con el EJEMPLO 1, y se llevó a cabo la licuefacción del almidón a 80 °C durante aproximadamente una hora a aproximadamente 15 de dextrosa equivalente. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a pH 2.8 con ácido clorhídrico y la mezcla se hirvió a 100 °C durante 5 minutos para inactivar las enzimas. Tras enfriarla a 65 °C, el pH se ajustó a pH 6.0 con una solución de hidróxido sódico. Se añadieron al almidón líquido 100 g de extracto de estevia producidos por PureCircle (JiangXi) Co., Ltd. (China), que contienen esteviósido al 29,2%, rebaudiósido A al 54,3 %, rebaudiósido C al 9,0 %, rebaudiósido F (al 1,7 %) y otros glucósidos con un contenido total de glucósidos de esteviol de aproximadamente 96,4 % y se removieron hasta obtener una solución homogénea. Se añadieron 200 unidades de CGTasa a la solución y la mezcla se mantuvo a una temperatura de 65 °C durante 24 horas con agitación continua. La mezcla de reacción obtenida se calentó a 95 °C

ES 2 799 200 T3

5 durante 15 minutos para inactivar la enzima. Se añadieron 20 gramos de carbón activado y se calentó la mezcla a 75 °C, manteniéndola durante 30 minutos. La mezcla se filtró y el filtrado se diluyó con agua al 5 % de contenido en sólidos y se hizo pasar por columnas llenas de 4000 mL de resina macroporosa absorbente Amberlite XAD 7HP. Las columnas se lavaron con 5 volúmenes de agua y 2 volúmenes al 20 % (v/v) de etanol. Los glucósidos absorbidos se eluyeron con un 50 % de etanol. El eluato obtenido se pasó por columnas llenas de resina de intercambio iónico Amberlite FPC23 (H+) y Amberlite FPA51 (OH-). El etanol se evaporó y la solución acuosa desalinizada se concentró a 60 °C en vacío, y luego se secó en forma de polvo empleando un secador por aspersión de laboratorio. Se obtuvieron 166 gramos de producto (Muestras 3).

EJEMPLO 5

10 Bebida a base de zumo de naranja baja en calorías

15 **[0066]** Se mezclaron concentrado de naranja (35 %), ácido cítrico (0,35 %), ácido ascórbico (0,05 %), colorante rojo anaranjado (0,01 %), sabor de naranja (0,20 %), rebaudiósido A (0,003 %) y distintas composiciones de glucosil estevia (0,03 %) y se disolvieron completamente en agua (hasta el 100 %) y se pasteurizaron. Las composiciones de glucosil estevia están representadas por las Muestras 1, 2, y 3, obtenidas de acuerdo con los EJEMPLOS 2, 3, y 4, respectivamente; y la Muestra 4 representa un producto comercial tratado con β -amilasa (que contiene solo derivados mono- y di- α -1,4-glucosil de glucósidos de esteviol).

20 **[0067]** Las evaluaciones sensoriales de las muestras se resumen en la Tabla 3. Los datos muestran que se pueden obtener los mejores resultados empleando los derivados de composiciones de glucosil estevia de cadena corta altamente purificadas (que contienen cuatro o menos residuos α -1,4-glucosil) (Muestras 1 y 2). Concretamente, las bebidas preparadas con las Muestras 1 y 2 mostraron una sensación en boca y un perfil de sabor completo y redondo.

Tabla 3

Evaluación de las muestras a base de zumo de naranja			
	Comentarios		
Muestra	Sabor	Regusto	Sensación en boca
N. ° 1	Dulzor de gran calidad, sabor agradable similar a la sacarosa, sabor equilibrado y redondo	Limpio, casi sin amargor, sin regusto	Plena
N. ° 2	Dulzor de gran calidad, sabor agradable similar a la sacarosa, sabor equilibrado y redondo	Limpio, sin amargor y sin regusto	Plena
N. ° 3	Dulzor de gran calidad, sabor agradable similar a la sacarosa, sabor equilibrado y redondo	Limpio, casi sin amargor, sin regusto	Casi aceptable
N. ° 4	Dulce, notas de regaliz	Ligero amargor y regusto	Casi aceptable

[0068] El mismo método puede emplearse para preparar zumos y bebidas a base de zumo a partir de otras frutas, como manzana, limón, albaricoque, cereza, piña, mango, etc.

25 EJEMPLO 6

Bebida carbonatada baja en calorías

[0069] Se preparó una bebida carbonatada de acuerdo con la fórmula presentada a continuación.

Ingredientes	Cantidad, %
Sacarosa	5,5
Sabor a cola	0,340
Ácido orto-fosfórico	0,100

(continuación)

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

[0070] 20 panelistas evaluaron las propiedades sensoriales. Los resultados se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4

Evaluación de muestras de bebidas carbonatadas bajas en calorías				
Atributo de sabor	Número de panelistas que detectaron el atributo			
	Muestra n.º 1	Muestra n.º 2	Muestra n.º 3	Muestra n.º 4
Sabor amargo	0	0	2	20
Sabor astringente	1	0	3	20
Regusto	1	0	2	20
Comentarios				
Calidad del sabor dulce	Limpio (19 de 20)	Limpio (20 de 20)	Limpio (17 de 20)	Regusto amargo (5 de 20)
Evaluación general	Satisfactorio (18 de 20)	Satisfactorio (20 de 20)	Satisfactorio (15 de 20)	Satisfactorio (3 de 20)

- 5 **[0071]** Los resultados anteriores muestran que las bebidas preparadas empleando las Muestras 1 y 2 poseían las mejores características organolépticas.

EJEMPLO 7

Galletas dietéticas

- 10 **[0072]** Se mezclaron bien en una amasadora harina (50,0 %), margarina (30,0 %) fructosa (10,0 %), maltitol (8,0 %), leche entera (1,0 %), sal (0,2 %), levadura (0,15 %), vainillina (0,1 %) y distintas composiciones de glucosil estevia (0,03 %). Se dio forma a la masa obtenida y se hornearon las galletas a 200 °C durante 15 minutos. Las composiciones de glucosil estevia están representadas por las Muestras 1, 2 y 3, obtenidas de acuerdo con los EJEMPLOS 2, 3 y 4, respectivamente; tratándose la Muestra 4 de un producto comercial tratado con β -amilasa (que contiene solo derivados mono- y di- α -1,4-glucosil de glucósidos de esteviol);
- 15 **[0073]** 20 panelistas evaluaron las propiedades sensoriales. Los mejores resultados se obtuvieron en las muestras preparadas con derivados de composiciones de glucosil estevia de cadena corta altamente purificadas (que contienen cuatro o menos residuos α -1,4-glucosil) (Muestras 1 y 2). Los panelistas percibieron una sensación en boca y un perfil de sabor completo y redondo y en las galletas preparadas con las Muestras 1 y 2.

EJEMPLO 8

Yogur

- 5 **[0074]** Se disolvieron las composiciones de glucosil estevia (0,03 %) y sacarosa (4 %) en leche semidesnatada. Las composiciones de glucosil estevia están representadas por las Muestras 1, 2, y 3, obtenidas de acuerdo con los EJEMPLOS 2, 3, y 4, respectivamente; y la Muestra 4 representa un producto comercial tratado con β -amilasa (que contiene solo derivados mono- y di- α -1,4-glucosil de glucósidos de esteviol). Tras pasteurizar la leche a 82 °C durante 20 minutos, se enfrió a 37 °C. Se le añadió un cultivo starter (3 %) y la mezcla se incubó a 37 °C durante 6 horas y luego a 5 °C durante 12 horas.
- 10 **[0075]** 20 panelistas evaluaron las propiedades sensoriales. Los mejores resultados se obtuvieron en las muestras preparadas con derivados de composiciones de glucosil estevia de cadena corta altamente purificadas (que contienen cuatro o menos residuos α -1,4-glucosil) (Muestras 1 y 2). Los panelistas percibieron una sensación en boca y un perfil de sabor completo y redondo y en las muestras preparadas con las Muestras 1 y 2.
- 15 **[0076]** Las anteriores descripciones y las realizaciones específicas aquí incluidas ilustran simplemente el mejor modo de la invención y los principios de la misma, y el hecho de que los expertos en la técnica pueden realizar fácilmente modificaciones y adiciones sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir una composición de glucosil estevia altamente purificada, que comprende los pasos siguientes:
añadir almidón al agua para formar una suspensión de almidón;
5 añadir una mezcla de α -amilasa y CGTasa a la suspensión de almidón e incubar durante 0,5 a 2 horas a 75-80 °C para obtener una suspensión de almidón líquido;
inactivar la α -amilasa mediante tratamiento con calor a pH bajo; enfriar la suspensión de almidón líquido y ajustar el pH a 5.5 a 7.0;
añadir glucósidos de esteviol a la suspensión de almidón líquido para obtener una mezcla de reacción;
10 añadir un segundo lote de CGTasa a la mezcla de reacción e incubar durante 12 a 48 horas a 55-75 °C;
añadir β -amilasa a la mezcla de reacción e incubar durante 12-24 horas a 35-55 °C;
inactivar las enzimas de la mezcla de reacción mediante tratamiento con calor;
decolorar la mezcla de reacción;
15 extraer los compuestos no diterpénicos poniendo en contacto la mezcla de reacción decolorada con resina absorbente macroporosa y a continuación eluir los glucósidos diterpénicos absorbidos con etanol acuoso para obtener un eluato de etanol acuoso que contiene glucósido;
desalinizar el eluato de etanol acuoso que contiene glucósidos con resinas de intercambio iónico;
extraer el etanol del eluato de etanol acuoso, para obtener un eluato acuoso; y concentrar y secar el eluato acuoso para obtener la composición de glucosil estevia altamente purificada, donde la composición de glucosil estevia altamente purificada comprende derivados de glucósido de esteviol de cadena corta con cuatro o menos
20 residuos α -1,4-glucosil, y glucósidos de esteviol no modificados.
2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la mezcla de α -amilasa y CGTasa contiene 0,001-0,2 KNU de α -amilasa por unidad de CGTasa.
3. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el peso de los glucósidos de esteviol añadidos es
25 aproximadamente igual al del almidón.
4. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde los glucósidos de esteviol añadidos se seleccionan del grupo que consta de esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, dulcósido A, esteviolbiósido, rubusósido y otros glucósidos de esteviol que se encuentran en la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni y en las mezclas a base de la misma.
- 30 5. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la CGTasa se produce mediante cultivos de *Bacillus stearothermophilus*.
6. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el segundo lote de CGTasa tiene 0,2-4 unidades de CGTasa por gramo de sólidos.
7. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la β -amilasa se produce a partir de una fuente
35 seleccionada del grupo que consta de soja y cebada.
8. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde se añade β -amilasa a 30-50 unidades por gramo de sólidos totales, y el tratamiento se lleva a cabo a una temperatura de 40-60 °C, durante 3-16 horas.
9. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde tras el tratamiento con β -amilasa, los derivados glicosilados de cadena corta de esteviósido y rebaudiósido A poseen cuatro o menos residuos α -glucosil.
- 40 10. Un proceso de la reivindicación 1, donde se lleva a cabo la extracción de los compuestos no diterpénicos mediante varias columnas conectadas secuencialmente llenas de una resina absorbente macroporosa, y a continuación se lavan las columnas con agua, y luego se lavan con etanol al 10-50 % (v/v), desconectando las columnas y eluyendo a continuación cada columna individualmente con etanol al 30-100 %.
11. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la composición de glucosil estevia altamente purificada
45 posee al menos un 95 % de glucósidos de esteviol totales en una base anhidra.

FIG. 1

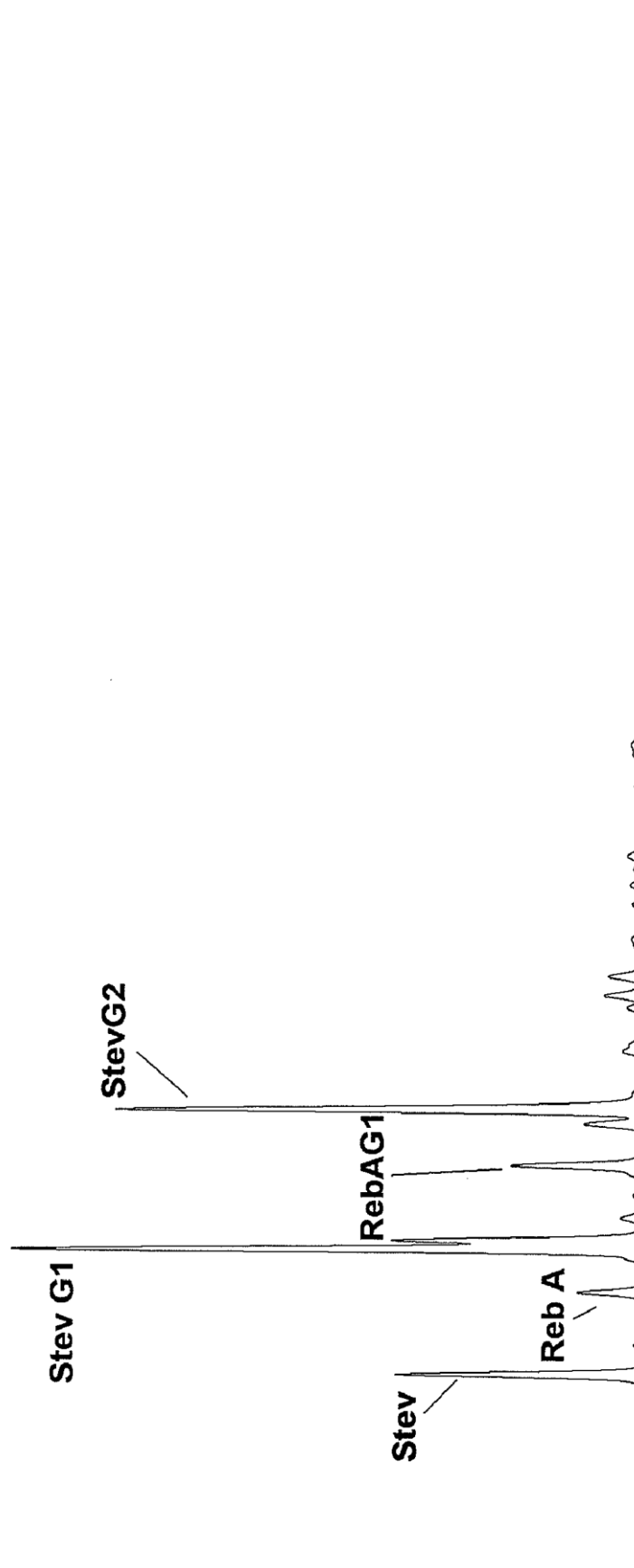


FIG. 2

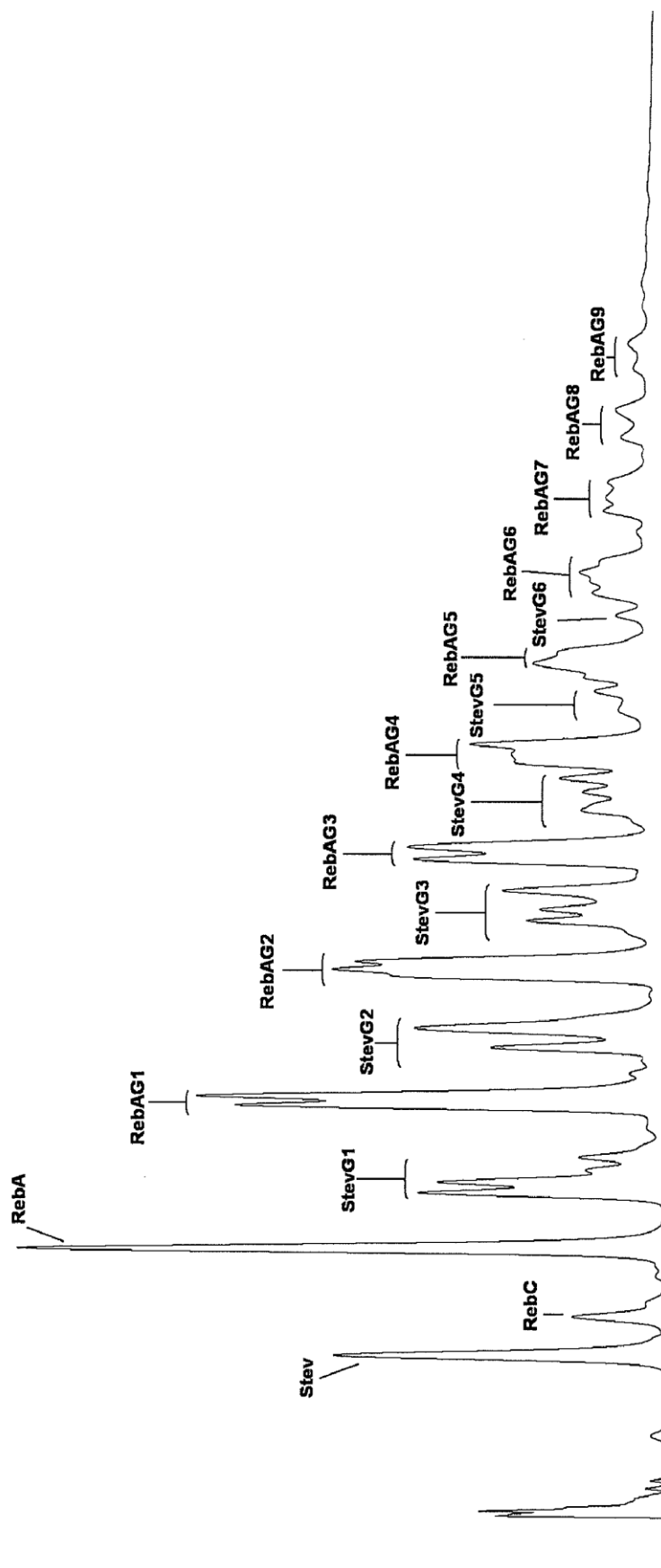
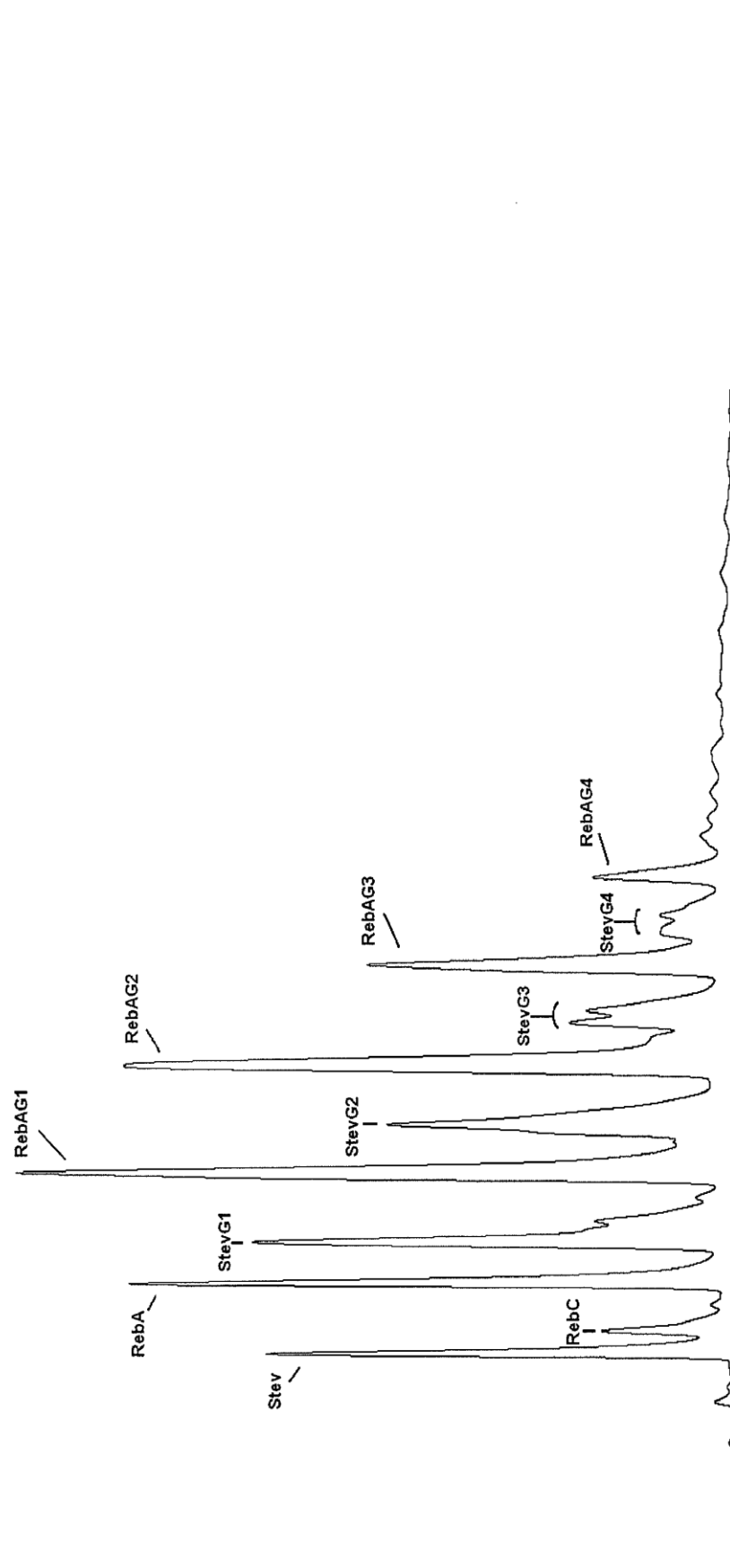


FIG. 3



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

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

5 Documentos de patente citados en la descripción

- US 4361697 A [0006]
- US 4082858 A [0006]
- US 4892938 A [0006]
- US 5972120 A [0006]
- US 5962678 A [0006]
- US 7838044 B [0006]
- US 7862845 B [0006]
- US 4219571 A [0012]
- US 7807206 B [0012]
- US 2006134292 A1 [0017]

Literatura no-patente que se cita en la descripción

- **CHANG S.S.; COOK, J.M.** Stability studies of stevioside and Rebaudioside A in carbonated beverages. *J. Agric. Food Chem.*, 1983, vol. 31, 409-412 [0004]
- **TANAKA O.** Improvement of taste of natural sweeteners. *Pure Appl. Chem.*, 1987, vol. 69, 675-683 [0005]
- **Stevia: steps in developing a new sweetener. PHILLIPS K.C.** Developments in sweeteners. Elsevier Applied Science, 1989, vol. 3, 1-43 [0005]
- **PRAKASH I. ; DUBOIS G.E. ; CLOS J.F. ; WILKENS K.L. ; FOSDICK L.E.** Development of rebiana, a natural, non-caloric sweetener. *Food Chem. Toxicol.*, 2008, vol. 46, S75-S82 [0007]
- **LOBOV S.V. ; JASAI R. ; OHTANI K. ; TANAKA O. ; YAMASAKI K.** Enzymatic production of sweet stevioside derivatives: transglycosylation by glucosidases. *Agric. Biol. Chem.*, 1991, vol. 55, 2959-2965 [0011]
- **KITAHATA S.; ISHIKAWA S.; MIYATA T.; TANAKA O.** Production of rubusoside derivatives by transglycosylation of various β -galactosidase. *Agric. Biol. Chem.*, 1989, vol. 53, 2923-2928 [0011]
- **YAMAMOTO K.; YOSHIKAWA K.; OKADA S.** Effective production of glucosyl-stevioside by α -1,6-transglucosylation of dextran dextranase. *Bio-sci Biotech. Biochem.*, 1994, vol. 58, 1657-1661 [0011]
- **KOCHIKYAN V.T. et al.** Combined enzymatic modification of stevioside and rebaudioside A. *Applied Biochemistry and Microbiology*, vol. 42 (1), 31-37 [0017]
- **HALE W.S. ; RAWLINS L.C.** Amylase of *Bacillus macerans*. *Cereal Chem.*, 1951, vol. 28, 49-58 [0031]