

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 491**

51 Int. Cl.:

A23L 27/30

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2011 PCT/US2011/033737**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012 WO12134502**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2011 E 11862580 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 2690972**

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

30 Prioridad:

29.03.2011 US 201113074179

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

07.03.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

MARKOSYAN, AVETIK

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 604 491 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 **Solicitudes relacionadas**

Esta solicitud es una solicitud de continuación en parte de y reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de patente en EE UU con No. de serie 13/029.263, presentada el 17 de febrero, 2011.

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

La invención se refiere a un proceso para producir un ingrediente alimenticio muy purificado del extracto de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni y su uso en varios productos alimenticios y bebidas.

Descripción de la técnica relacionada

Actualmente las alternativas al azúcar están recibiendo atención creciente debido a la conciencia de muchas enfermedades en combinación con el consumo de alimentos y bebidas de alto contenido en azúcar. Sin embargo, muchos edulcorantes artificiales, tales como dulcina, ciclamato sódico y sacarina se han prohibido o restringido en algunos países debido a preocupaciones sobre su seguridad. Por tanto, los edulcorantes no calóricos de origen natural se están volviendo crecientemente populares. La hierba dulce *Stevia rebaudiana* Bertoni produce un número de glucósidos diterpénicos que presentan dulzor de alta intensidad y propiedades sensoriales superiores a las de muchos otros edulcorantes de alta potencia.

Los glucósidos dulces mencionados anteriormente, tienen una aglucona común, esteviol, y se diferencian por el número y tipo de residuos glucídicos en las posiciones C13 y C19. Las hojas de *Stevia* son capaces de acumular hasta el 10-20% (en base de peso seco) de glucósidos de esteviol. Los principales glucósidos encontrados en las hojas de *Stevia* son rebaudiósido A (2-10%), esteviósido (2-10%) y rebaudiósido C (1-2%). Otros glucósidos tal como rebaudiósido B, D, E y F, esteviolbósido y rubusósido se encuentran a niveles muchos menores (aprox. 0-0,2%).

Dos glucósidos principales – esteviósido y rebaudiósido A, se estudiaron extensamente y caracterizaron en términos de su idoneidad como edulcorantes comerciales de alta intensidad. Los estudios de estabilidad en bebidas carbonatadas confirmaron su estabilidad al calor y 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).

Los glucósidos de esteviol se diferencian entre sí no solo por la estructura molecular, sino también por sus propiedades de sabor. Habitualmente se encuentra que el esteviósido es 110-270 veces más dulce que la sacarosa, el rebaudiósido A entre 150 y 320 veces, y el rebaudiósido C entre 40-60 veces más dulce que la glucosa. El glucósido A es 30 veces más dulce que la sacarosa. El rebaudiósido tiene el regusto menos astringente, menos amargo y menos persistente poseyendo de esta manera los atributos sensoriales más favorables en 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*. En: Grenby T.H. ed. *Developments in sweeteners*, vol. 3. Elsevier Applied Science, Londres. 1-43).

Los métodos para la extracción y purificación de glucósidos dulces de la planta *Stevia rebaudiana* usando agua o solventes orgánicos se describen en, por ejemplo, las patentes en EE UU números 4.361.697, 4.082.585, 4.892.938, 5.972.120, 5.962.678, 7.838.044 y 7.862.845.

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

Algunas de estas propiedades indeseables se pueden reducir o eliminar sometiendo los glucósidos de esteviol a la reacción de transglucosilación intermolecular, cuando nuevos residuos glucídicos se unen a la molécula inicial en las posiciones C13 y C19. Dependiendo del número de residuos glucídicos en estas posiciones la calidad y potencia del sabor de los compuestos variará.

Se han usado pululanasa, isomaltasa (Lobov S.V., Jasai R., Ohtani K., Tanaka O. Yamasaki K. (1991) Enzymatic production of sweet stevioside derivatives: transglycosylation by glucosidases. *Agric. Biol. Chem.* 55: 2959-2965), β -galactosidasa (Kitahata S., Ishikawa S., Miyata T., Tanaka O. (1989) Production of rubusoside derivatives by transglycosylation of various β -galactosidase. *Agric. Biol. Chem.* 53: 2923-2928), y dextrano sacarasa (Yamamoto

K., Yoshikawa K., Okada S. (1994) Effective production of glucosyl-stevioside by α -1,6-transglucosylation of dextran dextranase. *Biosci. Biotech. Biochem.* 58: 1657-1661) como enzimas de transglucosilación, junto con pululano, maltosa, lactosa y almidón parcialmente hidrolizado, respectivamente, como donantes de residuos glucosídicos.

- 5 La transglucosilación de glucósidos de esteviol también se realizó por acción de ciclodextrina glucanotransferasas (CGTasa) producidas por *Bacillus stearothermophilus* (patentes en EE UU números 4.219.571 y 7.807.206) como resultado se formaron derivados α -1,4-glucosilo con un grado de polimerización de hasta 10.

10 Se mostró que el perfil de sabor y poder de dulzor de los derivados glucosilo dependen mucho del número de derivados glucosilo adicionales, es decir, el grado de polimerización de la cadena de α -1,4-glucosilo. El aumento en el número de residuos α -1,4-glucosilo mejoró la calidad de sabor, pero al mismo tiempo redujo el nivel de dulzor. El tratamiento del esteviósido transglucosilado con β -amilasa produjo un producto que consiste en derivados mono- o di- α -1,4-glucosilo con mejor perfil de sabor y nivel de dulzor óptimo (Tanaka, 1987). Sin embargo, en tal proceso el producto resultante contiene un nivel alto de glucósidos iniciales sin reaccionar (sin modificar) (generalmente >20%) que lo hace no conforme con requisitos reguladores de menos el 15% de glucósidos sin reaccionar (α -Glucosyltransferase Treated Stevia, *Japan's Specifications and Standards for Food Additives*, VIII edición, 2009, p.257). Por tanto, se usan pasos adicionales para la separación cromatográfica de glucósidos de esteviol sin reaccionar para reducir el contenido inicial en glucósidos sin reaccionar (sin modificar). Sin embargo, las técnicas de separación cromatográfica generalmente implican alto coste y no son adecuadas para la producción a gran escala.

20 Se debe indicar también que muchos productos de glucosil estevia contienen hasta el 20% de dextrinas residuales que no poseen propiedades funcionales significativas y reducen el contenido de los glucósidos de esteviol en el producto.

- 25 Por tanto, es necesario desarrollar un proceso sencillo de preparación de productos de glucosil estevia de alta pureza con longitud de cadena α -1,4-glucosilo óptima y bajo nivel de glucósidos sin reaccionar.

30 El documento US 2007/082102 describe un proceso que hace uso de la enzima CGTasa, sin la adición de amilasas, para obtener una suspensión de almidón licuado, que después se combina con esteviósidos para preparar esteviósidos α -glucosilados.

El documento US 4 917 916 describe un método para obtener cristales no higroscópicos del compuesto maltitol altamente higroscópico. El documento US 4 219 571 describe la producción de un edulcorante haciendo uso de o bien CGTasa o α -amilasa, pero no de ambas juntas.

35 **Compendio de la invención**

La presente invención se dirige a superar las desventajas de edulcorantes de estevia existentes. La invención describe un proceso para producir un ingrediente alimenticio de alta pureza a partir del extracto de la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni como se caracteriza en las reivindicaciones adjuntas.

40 La invención se refiere a un proceso para producir un ingrediente que contiene formas glucosiladas de esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, dulcósido A, esteviolbósido, rubusósido, así como otros glucósidos de esteviol encontrados en la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni. El proceso es un proceso de transglucosilación enzimática usando CGTasas producidas por cultivos de *Bacillus stearothermophilus*. El proceso incluye además el paso de acortar las cadenas de glucosilo por β -amilasa. El proceso también tiene los pasos de decolorar, desalar y eliminar maltooligosacáridos y glucósidos de esteviol sin modificar (sin reaccionar). La decoloración se puede realizar usando carbón activo. El desalado se realiza pasando a través de resinas de intercambio iónico. La eliminación de maltooligosacáridos se realiza pasando por resina polimérica macroporosa. La eliminación de glucósidos de esteviol sin modificar (sin reaccionar) se realiza resuspendiendo el producto en alcohol acuoso.

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

60 El material de partida se sometió a la transglucosilación enzimática por acción de ciclodextrina glucosiltransferasa (CGTasa) en presencia de almidón como donante de glucosa. Como resultado se formaron derivados α -1,4-glucosilo con un grado de polimerización de hasta 10. A continuación, los derivados formados se sometieron a tratamiento con β -amilasa para producir derivados α -1,4-glucosilo que poseen un grado de polimerización de hasta 2.

65 Los oligosacáridos de la mezcla de reacción obtenida se eliminaron por resina Amberlite XAD7 HP, y después se decoloraron, desionizaron, concentraron y secaron por rociado.

Los glucósidos de esteviol sin reaccionar se eliminaron posteriormente resuspendiendo el producto seco en solvente orgánico y separando los sólidos suspendidos que contienen nivel disminuido de glucósidos de esteviol, sin reaccionar.

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

Breve descripción de las figuras

Las figuras acompañantes se incluyen para proporcionar un entendimiento adicional de la invención. Las figuras ilustran formas de realización de la invención y junto con la descripción sirven para explicar los principios de las formas de realización de la invención.

La figura 1 muestra un cromatograma de cromatografía líquida de alta resolución de extracto de *Stevia* transglucosilado purificado sin tratamiento con β -amilasa que contiene derivados α -1,4-glucosilo de cadena larga con hasta nueve residuos de α -1,4-glucosilo;

La figura 2 muestra un gráfico de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del producto tratado con β -amilasa que contiene derivados mono- y di- α -1,4-glucosilo de glucósidos de esteviol, así como nivel alto de glucósido de esteviol sin reaccionar;

La figura 3 muestra un gráfico de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) del producto tratado con β -amilasa que contiene derivados mono- y di- α -1,4-glucosilo de glucósidos de esteviol, así como nivel bajo de glucósidos de esteviol sin reaccionar.

Descripción detallada de la invención

Las ventajas de la presente invención serán más aparentes de la descripción detallada dada de aquí en adelante.

Se usó el extracto de estevia comercializado por PureCircle (JiangXi) Co., Ltd. (China), que contiene esteviósido (28-30%), rebaudiósido A (50-55%), rebaudiósido C (9-12%), rebaudiósido F (1-3%) y otros glucósidos (de aquí en adelante colectivamente, "glucósidos de esteviol") que suman un contenido total en glucósidos de esteviol de al menos el 95%, como material de partida. Alternativamente, se pueden usar extractos de estevia con diferente proporción de glucósidos de esteviol, así como glucósidos de esteviol muy purificados tal como rebaudiósido A, esteviósido, rebaudiósido D, rubusósido, etc., como materiales de partida.

El análisis por HPLC de las materias primas y productos se realizó en un cromatógrafo líquido Agilent Technologies 1200 Series (EE UU), equipado con columna Zorbax-NH₂ (4,6 x 250 mm). La fase móvil era un gradiente de acetonitrilo-agua de 80:20, v/v (0-2 min) a 50:50, v/v (2-70 min). Se usó un detector de haz de diodo ajustado a 210 nm como el detector.

La transglucosilación se logró por ciclodextrina glucosiltransferasas (CGTasas; EC 2.4.1.19) producidas por *Bacillus stearothermophilus* St-100 (PureCircle Sdn Bhd Collection of Industrial Microorganisms – Malasia). Sin embargo, cualquier otra CGTasa o enzima que posea actividad de transglucosilación intermolecular se puede aplicar también. La enzima puede estar en forma de un caldo de cultivo sin células, caldo de cultivo sin células líquido concentrado, caldo de cultivo sin células secado por rociado o liofilizado, o proteína de alta pureza. Se pueden usar preparaciones de enzima libre e inmovilizada.

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

Se pueden usar almidones de diferente origen como donantes de unidades de glucosilo tal como, derivado de trigo, maíz, patata, tapioca y sagú.

El almidón se sometió a hidrólisis parcial (licuación) antes de la reacción de transglucosilación. El equivalente de dextrosa del almidón parcialmente hidrolizado puede estar en el intervalo de aproximadamente 10-25, preferiblemente aproximadamente 12-16. Según la invención, se usan mezclas de CGTasa y α -amilasa como enzimas licuantes.

La actividad α -amilasa se expresa en unidades kilo novo de α -amilasa (KNU). 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.

La mezcla de licuación contiene aproximadamente 0,001-0,2 KNU, preferiblemente aproximadamente 0,05-0,1 KNU de α -amilasa por una unidad de CGTasa.

El uso de α -amilasa en la licuación permite alcanzar mayores rendimientos en filtración de carbono activo adicional. Cuando se usa la CGTasa como la única enzima licuante la velocidad de filtración es aproximadamente 10-15 l/h por 1 m² de superficie de filtro. En el caso de mezcla de enzimas de licuación (que comprende α -amilasa y CGTasa) la velocidad de filtración es dos veces más rápida – aproximadamente 20-30 l/h por 1 m² de superficie de filtro.

La proporción de almidón y CGTasa en la mezcla de licuación es aproximadamente 0,1-0,5 unidades por un gramo de almidón, preferiblemente aproximadamente 0,2-0,4 unidades por gramo.

La concentración de almidón en la mezcla de licuación es aproximadamente el 15-40% (p/p), preferiblemente aproximadamente 20-30%.

La licuación se realiza a aproximadamente 70-90°C durante aproximadamente 0,5-5 horas, preferiblemente aproximadamente 1-2 horas.

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

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

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

Tras completar la reacción de transglucosilación, se añadieron aproximadamente 30-50 unidades por gramo de sólidos de β -amilasa y la reacción siguió durante aproximadamente 12-16 horas a aproximadamente 35-55°C, preferiblemente aproximadamente 45°C. Se usó β -amilasa producida por *Bacillus polymyxa* St-3504 (PureCircle Sdn Bhd Collection of Industrial Microorganisms – Malasia) en esta fase. Sin embargo, también se pueden usar β -amilasas, y otras enzimas que hidrolizan almidón derivadas de cualquier otra fuente incluyendo soja, cebada, bacteriana, fúngica y otras.

Se define la unidad de actividad β -amilasa (1 AUN) como la actividad que libera 100 μ g de azúcar reductor (expresado por equivalente de dextrosa) por minuto en las siguientes condiciones: 1 ml de solución de enzima se mezcla con 5 ml de solución de almidón al 1,2% (pH 5,5, M/20 tampón acetato) y se mantiene durante 20 min a 40°C.

La reacción se paró calentando a aproximadamente 95°C durante aproximadamente 15 minutos para inactivar las enzimas, y la solución se trató con carbón activo, para obtener una mezcla de reacción decolorada. La cantidad de carbón activo fue aproximadamente 0,02-0,4 gramos por gramo de sólidos, preferiblemente aproximadamente 0,05-0,2 gramos por gramo de sólidos.

La mezcla de reacción decolorada se desaló pasando a través de resinas de intercambio iónico, tal como Amberlite FPC23 (tipo H⁺) y Amberlite FPA51 (tipo OH⁻). Se pueden usar otros métodos apropiados de decolorar y desalar, tal como filtración en membrana, u otros métodos conocidos en la técnica.

La mezcla de reacción desalada se concentró adicionalmente por evaporador al vacío y se secó por medio de un secador por rociado. Se pueden usar otros métodos de concentración y secado apropiados, tal como filtración en membrana, liofilización, u otros métodos conocidos en la técnica.

El polvo seco se resuspendió en alcohol acuoso. La proporción de polvo respecto a alcohol acuoso (p/vol) fue de 1:1 a 1:20, preferiblemente de 1:3 a 1:10. El alcohol acuoso contenía el 0-50% (vol), preferiblemente el 1-10% de agua. La suspensión se agita a 30-100°C, preferiblemente 50-85°C durante 1-24 horas, preferiblemente 2-15 horas. Después los sólidos suspendidos se separan por medio de filtración. Se puede usar cualquier otro método conocido en la técnica adecuado para separar sólidos suspendidos de líquido tal como centrifugación, decantación, etc. Los sólidos obtenidos se secan en un secador al vacío de tambor giratorio. También se puede usar cualquier otro secador conocido en la técnica. Alternativamente, los sólidos separados se pueden disolver en agua, evaporar de vestigios de alcohol y secar por rociado.

Los alcoholes empleados en la invención se pueden seleccionar del grupo que consiste en alcanos, y se seleccionan preferiblemente del grupo que incluye metanol, etanol, n-propanol, 2-propanol, 1-butanol y 2-butanol.

El producto resultante contiene nivel bajo de glucósidos sin modificar, derivados de cadena corta (que contienen dos o menos residuos de α -1,4-glucosilo) y una mezcla de maltooligosacáridos (muestra 1). Como se usa en el presente documento, las expresiones “nivel bajo de glucósidos sin modificar” o “nivel bajo de glucósidos sin reaccionar” se refiere a niveles de glucósidos de menos de aproximadamente el 20%, y preferiblemente menos de aproximadamente el 15%, en una base anhidrida. En algunas formas de realización, se puede alcanzar un nivel de glucósido sin reaccionar de aproximadamente el 12%, aproximadamente el 10% o incluso menor usando este método.

Para preparar un producto con mayor contenido de glucósidos dulces totales (la suma de glucósidos glucosilados y no glucosilados), los maltooligosacáridos se eliminaron usando Amberlite XAD7 HP antes del tratamiento de desalado. Los glucósidos de esteviol y sus derivados glucosilados se adsorbieron en la resina y posteriormente se eluyeron por etanol acuoso. El eluato en etanol acuoso resultante, que contiene glucósidos de glucosil esteviol, se decoloró y desaló posteriormente como se ha descrito anteriormente y la solución de glucósidos, después de la evaporación del solvente de elución, se pulverizó por secado por rociado. El polvo seco se resuspendió en alcohol acuoso y se procesó como se ha descrito anteriormente para eliminar glucósidos de esteviol sin modificar (sin reaccionar). El producto resultante contiene bajo nivel de glucósidos sin modificar, y derivados de cadena corta (que contienen dos o menos residuos de α -1,4-glucosilo) (muestra 2).

Las formas de realización de la invención ejemplificadas por las muestras 1 y 2 están libres o sustancialmente libres de derivados glucosilados superiores que tienen más de 2 residuos de glucosilo. Según esta invención, la composición de glucosil estevia muy purificada preferiblemente contiene más de aproximadamente el 50% en peso de glucósidos esteviol mono- y diglucosilo.

Usando un proceso similar como para la muestra 2, con la exclusión de las fases de tratamiento con β -amilasa y alcohol acuoso, se preparó un producto que contenía glucósidos no modificados y derivados de α -1,4-glucosilo de cadena larga (con hasta nueve residuos de α -1,4-glucosilo) (muestra 3).

Usando un proceso similar como para la muestra 2, con la exclusión de la fase de tratamiento con alcohol acuoso, se preparó un producto que contenía un alto nivel de glucósidos no modificados y derivados de cadena corta (que contienen dos o menos residuos de α -1,4-glucosilo) (muestra 4). La composición de las muestras se resume en la tabla 1.

Tabla 1
Composición de muestras de glucósidos de glucosil esteviol

Compuestos	Contenido, %			
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
Esteviósido	2,4	3,2	3,1	13,2
Rebaudiósido C	0,7	1,0	1,0	3,0
Rebaudiósido A	5,6	7,5	6,1	12,3
Monoglucosil-esteviósido (EstevG1)	16,2	21,9	7,5	22,2
Monoglucosil-rebaudiósido A (RebAG1)	20,9	28,1	11,2	22,4
Diglucosil-esteviósido (EstevG2)	10,1	13,6	8,5	8,9
Diglucosil-rebaudiósido A (RebAG2)	13,8	18,6	9,7	11,4
Derivados glucosilados superiores	1,3	1,7	48,8	1,8
Contenido total de glucósidos sin reaccionar	8,7	11,7	10,2	28,5
Contenido total de glucósidos	71,0	95,5	95,8	95,3

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

Tabla 2
Evaluación sensorial de muestras en sistema acuoso

Juicio	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
La más deseable	6	10	1	3
La más indeseable	1	0	12	7
Poder de dulzor	150	160	110	160
Comentarios	Dulce, ligero, suave, redondo, placentero, casi similar a sacarosa, sin regusto persistente, el inicio del dulzor es rápido	Dulce, ligero, suave, redondo, placentero, casi similar a sacarosa, sin regusto persistente, el inicio del dulzor es rápido	Dulce, ligeramente amargo, astringente, regusto ligeramente persistente, el inicio del dulzor es moderado	Dulce, ligeramente amargo, astringente, regusto ligeramente persistente, el inicio del dulzor es lento

Como es aparente de los resultados en la tabla 2, la calidad de dulzor de las muestras 1 y 2 se valoró como la más superior. En conjunto las muestras con derivados de cadena corta (que contienen dos o menos residuos de α -1,4-glucosilo) y bajo nivel de glucósidos sin reaccionar (muestras 1 y 2) poseían mejores perfiles de sabor comparadas con muestras con derivados de glucosilo de cadena larga (muestra 3) y derivados de cadena corta (que contienen dos o menos residuos de α -1,4-glucosilo) y alto nivel de glucósidos sin reaccionar (muestra 4).

Las muestras 1 y 2 muestran poder de dulzor comparable (150-160 veces más dulce comparado con una solución de sacarosa al 5%) con la muestra 4 control (160 veces); sin embargo, su perfil de sabor era claramente superior a la muestra 4 control.

Las composiciones se pueden usar como potenciadores del dulzor, potenciadores de sabor y edulcorantes en varios productos alimenticios y de bebida. Los ejemplos no limitantes de productos alimenticios y bebidas incluyen refrescos carbonatados, bebidas listas para beber, bebidas energéticas, bebidas isotónicas, bebidas bajas en calorías, bebidas con cero calorías, bebidas deportivas, té, zumos de fruta y hortalizas, bebidas de zumos, bebidas lácteas, bebidas de yogur, bebidas alcohólicas, bebidas en polvo, productos de panadería, galletas, bizcochos, mezclas para hornear, cereales, pasteles, caramelos, tofes, chicle, productos lácteos, leche con sabores, yogures, yogures de sabores, productos lácteos fermentados, salsa de soja y otros productos basados en soja, aliños de ensaladas, mayonesa, vinagre, postres helados, productos cárnicos, productos de pescado-carne, alimentos embotellados y enlatados, edulcorantes de mesa, frutas y hortalizas.

Las composiciones además se pueden usar en fármacos o preparaciones farmacéuticas y cosméticos, incluyendo, pero no limitado a dentífrico, colutorio, jarabe para la tos, comprimidos masticables, pastillas, preparaciones de vitaminas, y similares.

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

Los ejemplos no limitantes 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 encontrados en la planta *Stevia rebaudiana* Bertoni y mezclas de los mismos, extracto de estevia, extracto de Luo Han Guo, mogrósidos, jarabe de maíz de alta fructosa, jarabe de maíz, azúcar invertido, fructooligosacáridos, inulina, inulinooligosacáridos, azúcar acoplante, maltooligosacáridos, maltodextrinas, sólidos de jarabe de maíz, glucosa, maltosa, sacarosa, lactosa, aspartamo, sacarina, sucralosa y polialcoholes.

Los ejemplos no limitantes de sabores incluyen sabores de limón, naranja, a fruta, plátano, uva, pera, piña, almendra amarga, cola, canela, azúcar, algodón dulce, vainilla.

Los ejemplos no limitantes de otros ingredientes alimenticios incluyen sabores, acidulantes, ácidos orgánicos y aminoácidos, agentes colorantes, agentes de carga, almidones modificados, gomas, texturizantes, conservantes, antioxidantes, emulsionantes, estabilizantes, espesantes, agentes de gelificación.

Los siguientes ejemplos ilustran varias formas de realización de la invención.

Ejemplo 1

Preparación de CGTasa

Se inoculó una cepa de *Bacillus stearothermophilus* St-100 en 2.000 litros de medio de cultivo esterilizado que contenía almidón al 1,0%, extracto de maíz al 0,25%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 0,5%, y CaCO_3 al 0,2% (pH 7,0-7,5) a 56°C durante 24 horas con aeración continua (2.000 l/min) y agitación (150 rpm). El caldo de cultivo obtenido se filtró usando membrana cerámica Kerasep 0,1 μm (Novasep, Francia) para separar las células. El permeado sin células se concentró adicionalmente 2 veces en ultrafiltros Persep 10 kDa (Orelis, Francia). La actividad de la enzima se determinó según Hale, Rawlins (1951). Se obtuvo una preparación de enzima cruda con actividad de aproximadamente 2 unidades/ml.

Ejemplo 2

Preparación de β -amilasa

Se inoculó una cepa de *Bacillus polymyxa* St-3504 en 2.000 litros de medio de cultivo esterilizado que contenía almidón al 1,0%, peptona al 0,5%, extracto de maíz al 0,5%, NaCl al 0,5%, MnSO_4 al 0,02% y CaCO_3 al 0,1% (pH 7,0-7,5) a 32°C durante 24 h con aeración continua (2.000 l/min) y agitación (150 rpm). El caldo de cultivo obtenido se filtró usando membrana cerámica Kerasep 0,1 μm (Novasep, Francia) para separar las células. Se añadió el 10% de glucosa al permeado sin células que se concentró adicionalmente en ultrafiltros Persep 10 kDa (Orelis, Francia) y se secó usando una unidad liofilizadora Alpha 1-4 LSC (Christ, Alemania) para obtener un polvo con actividad de

20.000 AUN/g. Se definió la unidad de actividad β -amilasa (1 AUN) como la actividad que libera 100 μ g de azúcar reductor (expresado por equivalente de dextrosa) por minuto en las siguientes condiciones: 1 ml de solución de enzima se mezcla con 5 ml de solución de almidón al 1,2% (pH 5,5, M/20 tampón acetato) y se mantiene durante 20 min a 40°C.

5

Ejemplo 3

Preparación de composición de estevia con glucosilo de cadena corta

10 Se resuspendieron 100 g de almidón de tapioca en 300 ml de agua (pH 6,5). Se añadieron 2 KNU de α -amilasa (Termamyl Classic, Novozymes, Dinamarca) y 30 unidades de CGTasa obtenida según el ejemplo 1, y la licuación del almidón se llevó a cabo a 80°C durante aproximadamente una hora hasta un equivalente de dextrosa de aproximadamente 15. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a pH 2,8 por ácido clorhídrico y la mezcla se hirvió a 100°C durante 5 minutos para inactivar las enzimas. Después de enfriar a 65°C, el pH se ajustó a pH 6,0 con solución de hidróxido de sodio. Se añadieron 100 g de extracto de estevia producido por PureCircle (JiangXi) Co., Ltd. (China), que contiene esteviósido al 29,2%, rebaudiósido A al 54,3%, rebaudiósido C al 9,0%, rebaudiósido F (1,7%) y otros glucósidos que suman un contenido total en glucósidos de esteviol de aproximadamente el 96,4% al almidón licuado y se agitó hasta que se obtuvo una solución homogénea. Se añadieron 200 unidades de CGTasa a la solución y la mezcla se mantuvo a una temperatura de 65°C durante 24 horas con agitación continua. Después la temperatura se redujo a 45°C, y se añadieron 8.000 unidades de β -amilasa obtenida según el ejemplo 2 a la mezcla de reacción. La reacción siguió 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 activo y la mezcla se calentó a 75°C y se mantuvo durante 30 minutos. La mezcla se filtró y el filtrado se diluyó con agua hasta un contenido en sólidos del 5% y se pasó a través de columnas empaquetadas con resinas de intercambio iónico Amberlite FPC23 (H^+) y Amberlite FPA51 (OH^-). La solución desalada se concentró a 60°C al vacío, y se secó a una forma en polvo usando un secador por rociado de laboratorio. El polvo seco se resuspendió en 5 volúmenes de etanol acuoso al 95%. La suspensión se agitó a 80°C durante 12 horas. Después los sólidos suspendidos se separaron por filtración. Los sólidos obtenidos se secaron en un secador de vacío a 90°C durante 5 horas. Se obtuvieron 170 gramos del producto (muestra 1).

Ejemplo 4

Preparación de composición de estevia con glucosilo de cadena corta altamente purificada

35 Se resuspendieron 100 g de almidón de tapioca en 300 ml de agua (pH 6,5). Se añadieron 2 KNU de α -amilasa (Termamyl Classic, Novozymes, Dinamarca) y 30 unidades de CGTasa obtenida según el ejemplo 1, y la licuación del almidón se llevó a cabo a 80°C durante aproximadamente una hora hasta un equivalente de dextrosa de aproximadamente 15. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a pH 2,8 por ácido clorhídrico y la mezcla se hirvió a 100°C durante 5 minutos para inactivar las enzimas. Después de enfriar a 65°C, el pH se ajustó a pH 6,0 con solución de hidróxido de sodio. Se añadieron 100 g de extracto de estevia producido por PureCircle (JiangXi) Co., Ltd. (China), que contiene esteviósido al 29,2%, rebaudiósido A al 54,3%, rebaudiósido C al 9,0%, rebaudiósido F (1,7%) y otros glucósidos que suman un contenido total en glucósidos de esteviol de aproximadamente el 96,4% al almidón licuado y se agitó hasta que se obtuvo una solución homogénea. Se añadieron 200 unidades de CGTasa a la solución y la mezcla se mantuvo a una temperatura de 65°C durante 24 horas con agitación continua. Después la temperatura se redujo a 45°C, y se añadieron 8.000 unidades de β -amilasa obtenida según el ejemplo 2 a la mezcla de reacción. La reacción siguió 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 activo y la mezcla se calentó a 75°C y se mantuvo durante 30 minutos. La mezcla se filtró y el filtrado se diluyó con agua hasta un contenido en sólidos del 5% y se pasó a través de columnas cada una empaquetadas con 400 ml de resina adsorbente macroporosa Amberlite XAD 7 HPD. Las columnas se lavaron con 5 volúmenes de agua y 2 volúmenes de etanol al 20% (v/v). Los glucósidos adsorbidos se eluyeron con etanol al 50%. El eluato obtenido se pasó por columnas empaquetadas con resinas de intercambio iónico Amberlite FPC23 (H^+) y Amberlite FPA51 (OH^-). El etanol se evaporó y la solución acuosa desalada y decolorada se concentró a 60°C al vacío, después se secó a una forma en polvo usando un secador por rociado de laboratorio. El polvo seco se resuspendió en 5 volúmenes de etanol acuoso al 95%. La suspensión se agitó a 80°C durante 12 horas. Después los sólidos suspendidos se separaron por filtración. Los sólidos obtenidos se secaron en un secador de vacío a 90°C durante 5 horas. Se obtuvieron 121 gramos del producto (muestra 2).

Ejemplo 5

60 Preparación de composición de estevia con glucosilo de cadena larga altamente purificada

Se resuspendieron 100 g de almidón de tapioca en 300 ml de agua (pH 6,5). Se añadieron 2 KNU de α -amilasa (Termamyl Classic, Novozymes, Dinamarca) y 30 unidades de CGTasa obtenida según el ejemplo 1, y la licuación del almidón se llevó a cabo a 80°C durante aproximadamente una hora hasta un equivalente de dextrosa de aproximadamente 15. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a pH 2,8 por ácido clorhídrico y la mezcla se hirvió a 100°C durante 5 minutos para inactivar las enzimas. Después de enfriar a 65°C, el pH se ajustó a pH 6,0 con

solución de hidróxido de sodio. Se añadieron 100 g de extracto de estevia producido por PureCircle (JiangXi) Co., Ltd. (China), que contiene esteviósido al 29,2%, rebaudiósido A al 54,3%, rebaudiósido C al 9,0%, rebaudiósido F (1,7%) y otros glucósidos que suman un contenido total en glucósidos de esteviol de aproximadamente el 96,4% al almidón licuado y se agitó hasta que se obtuvo una solución homogénea. Se añadieron 200 unidades de CGTasa a la solución y la mezcla se mantuvo a una temperatura de 65°C durante 24 horas con agitación continua. La mezcla de reacción obtenida se calentó a 95°C durante 15 minutos para inactivar la enzima. Se añadieron 20 gramos de carbón activo y la mezcla se calentó a 75°C y se mantuvo durante 30 minutos. La mezcla se filtró y el filtrado se diluyó con agua hasta un contenido en sólidos del 5% y se pasó a través de columnas cada una empaquetada con 400 ml de resina adsorbente macroporosa Amberlite XAD 7 HPD. Las columnas se lavaron con 5 volúmenes de agua y 2 volúmenes de etanol al 20% (v/v). Los glucósidos adsorbidos se eluyeron con etanol al 50%. El eluato obtenido se pasó por columnas empaquetadas con resinas de intercambio iónico Amberlite FPC23 (H⁺) y Amberlite FPA51 (OH⁻). El etanol se evaporó y la solución acuosa desalada y decolorada se concentró a 60°C al vacío, después se secó a una forma en polvo usando un secador por rociado de laboratorio. Se obtuvieron 165 gramos del producto (muestra 3).

Ejemplo 6

Preparación de composición de estevia con glucosilo de cadena corta altamente purificada

Se resuspendieron 100 g de almidón de tapioca en 300 ml de agua (pH 6,5). Se añadieron 2 KNU de α -amilasa (Termamyl Classic, Novozymes, Dinamarca) y 30 unidades de CGTasa obtenida según el ejemplo 1, y la licuación del almidón se llevó a cabo a 80°C durante aproximadamente una hora hasta un equivalente de dextrosa de aproximadamente 15. El pH de la mezcla de reacción se ajustó a pH 2,8 por ácido clorhídrico y la mezcla se hirvió a 100°C durante 5 minutos para inactivar las enzimas. Después de enfriar a 65°C, el pH se ajustó a pH 6,0 con solución de hidróxido de sodio. Se añadieron 100 g de extracto de estevia producido por PureCircle (JiangXi) Co., Ltd. (China), que contiene esteviósido al 29,2%, rebaudiósido A al 54,3%, rebaudiósido C al 9,0%, rebaudiósido F (1,7%) y otros glucósidos que suman un contenido total en glucósidos de esteviol de aproximadamente el 96,4% al almidón licuado y se agitó hasta que se obtuvo una solución homogénea. Se añadieron 200 unidades de CGTasa a la solución y la mezcla se mantuvo a una temperatura de 65°C durante 24 horas con agitación continua. Después la temperatura se redujo a 45°C, y se añadieron 8.000 unidades de β -amilasa obtenida según el ejemplo 2 a la mezcla de reacción. La reacción siguió 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 activo y la mezcla se calentó a 75°C y se mantuvo durante 30 minutos. La mezcla se filtró y el filtrado se diluyó con agua hasta un contenido en sólidos del 5% y se pasó a través de columnas cada una empaquetada con 400 ml de resina adsorbente macroporosa Amberlite XAD 7 HPD. Las columnas se lavaron con 5 volúmenes de agua y 2 volúmenes de etanol al 20% (v/v). Los glucósidos adsorbidos se eluyeron con etanol al 50%. El eluato obtenido se pasó por columnas empaquetadas con resinas de intercambio iónico Amberlite FPC23 (H⁺) y Amberlite FPA51 (OH⁻). El etanol se evaporó y la solución acuosa desalada y decolorada se concentró a 60°C al vacío, después se secó a una forma de polvo usando un secador por rociado de laboratorio. Se obtuvieron 154 gramos del producto (muestra 4).

Ejemplo 7

Bebida de zumo de naranja baja en calorías

Se mezclaron concentrado de naranja (35%), ácido cítrico (0,35%), ácido ascórbico (0,05%), color rojo naranja (0,01%), sabor de naranja (0,20%), rebaudiósido A (0,003%) y diferentes composiciones de glucosil estevia (0,03%) y se disolvieron por completo en agua (hasta el 100%) y se pasteurizaron. Las composiciones de glucosil estevia estaban representadas por las muestras 1, 2, 3 y 4, obtenidas según los ejemplos 3, 4, 5 y 6, respectivamente.

Las evaluaciones sensoriales de las muestras se resumen en la tabla 3. Los datos muestran que los mejores resultados se pueden obtener usando las composiciones de estevia con glucosilo de cadena corta (que contienen dos o menos residuos de α -1,4-glucosilo y glucósidos de esteviol sin reaccionar bajos) de alta pureza (muestras 1 y 2). Particularmente las bebidas preparadas con las muestras 1 y 2 mostraron un perfil de sabor y textura en boca redondo y completo.

Tabla 3
Evaluación de muestras de bebida de zumo de naranja

Muestra	Comentarios		
	Sabor	Regusto	Textura en boca
No. 1	Dulzor de alta calidad, gusto agradable similar a sacarosa, sabor redondo y equilibrado	Limpio, casi sin amargor, sin regusto	Completa
No. 2	Dulzor de alta calidad, gusto agradable similar a sacarosa, sabor redondo y equilibrado	Limpio, sin amargor y sin regusto	Completa

No. 3	Dulzor de alta calidad, gusto agradable casi similar a sacarosa, sabor redondo y equilibrado	Limpio, casi sin amargor, sin regusto	Casi aceptable
No. 4	Dulce, notas de regaliz	Ligeramente amargo y regusto	No aceptable

El mismo método se puede usar para preparar zumos y bebidas de zumos de otras frutas, tal como manzanas, limones, albaricoques, piñas, mangos, etc.

5 Ejemplo 8

Bebida carbonada baja en calorías

Se preparó una bebida carbonada según la fórmula presentada a continuación

10

Ingredientes	Cantidad, %
Sacarosa	5,5
Sabor a cola	0,340
Ácido orto-fosfórico	0,100
Citrato de sodio	0,310
Benzoato de sodio	0,018
Ácido cítrico	0,018
Rebaudiósido A	0,003
Composición de glucosil estevia	0,05
Agua con gas	hasta 100

Las propiedades sensoriales las evaluaron 20 panelistas. Los resultados se resumen en la tabla 4.

Tabla 4

15

Evaluación de muestras de bebida carbonada baja en calorías

Atributo de sabor	Número de panelistas que detectaron el atributo			
	Muestra No. 1	Muestra No. 2	Muestra No. 3	Muestra No. 4
Sabor amargo	0	0	10	12
Sabor astringente	1	0	15	15
Regusto	1	0	13	18
Comentarios				
Calidad del sabor dulce	Limpio (18 de 20)	Limpio (20 de 20)	Limpio (14 de 20)	Regusto amargo (10 de 20)
Evaluación global	Satisfactorio (19 de 20)	Satisfactorio (20 de 20)	Satisfactorio (11 de 20)	Satisfactorio (9 de 20)

Los resultados anteriores muestran que las bebidas preparadas usando las muestras 1 y 2 poseían las mejores características organolépticas.

20 Ejemplo 9

Galletas dietéticas

25 Se amasaron bien harina (50,0%), margarina (30,0%), fructosa (10,0%), maltitol (8,0%), leche entera (1,0%), sal (0,2%), levadura en polvo (0,15%), vainillina (0,1%) y diferentes composiciones de glucosil estevia (0,03%) en una máquina mezcladora de masa. La masa obtenida se moldeó y horneó en el horno a 200°C durante 15 minutos. Las composiciones de glucosil estevia estaban representadas por las muestras 1, 2, 3 y 4 obtenidas según los ejemplos 3, 4, 5 y 6, respectivamente.

30 Las propiedades sensoriales las evaluaron 20 panelistas. Los mejores resultados se obtuvieron en muestras preparadas por derivados de composiciones de estevia con glucosilo de cadena corta (que contenían dos o menos residuos de α -1,4-glucosilo) de alta pureza (muestras 1 y 2). Los panelistas notaron perfil de sabor y textura en boca redondo y completo en galletas preparadas con las muestras 1 y 2.

35 Ejemplo 10

Yogur

40 Se disolvieron diferentes composiciones de glucosil estevia (0,03%) y sacarosa (4%) en leche desnatada. Las composiciones de glucosil estevia estaban representadas por las muestras 1, 2, 3 y 4 obtenidas según los ejemplos

3, 4, 5 y 6, respectivamente. Después de pasteurizar a 82°C durante 20 minutos, la leche se enfrió a 37°C. Se añadió un cultivo iniciador (3%) y la mezcla se incubó a 37°C durante 6 horas después a 5°C durante 12 horas.

- 5 Las propiedades sensoriales las evaluaron 20 panelistas. Los mejores resultados se obtuvieron en muestras preparadas por derivados de composiciones de estevia con glucosilo de cadena corta (que contenían dos o menos residuos de α -1,4-glucosilo) de alta pureza (muestras 1 y 2). Los panelistas notaron perfil de sabor y textura en boca redondo y completo en las muestras preparadas con las muestras 1 y 2.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir una composición de glucosil estevia altamente purificada, que comprende los pasos de:
 - añadir almidón a agua para formar una suspensión de almidón;
 - añadir una mezcla de α -amilasa y CGTasa a la suspensión de almidón e incubar durante aproximadamente de 0,5 a 2 horas a aproximadamente 75-80°C, lo que produce una suspensión de almidón licuado;
 - inactivar la α -amilasa por tratamiento a bajo pH con calor;
 - enfriar la suspensión de almidón licuado y ajustar el pH a aproximadamente 5,5 a 7,0;
 - añadir glucósidos de esteviol a la suspensión de almidón licuado, lo que produce una mezcla de reacción;
 - añadir un segundo lote de CGTasa a la mezcla de reacción e incubar durante aproximadamente 12 a 48 horas a aproximadamente 55-75°C.
 - añadir β -amilasa a la mezcla de reacción e incubar durante aproximadamente 12-24 horas a aproximadamente 35-55°C;
 - inactivar las enzimas en la mezcla de reacción por tratamiento con calor;
 - decolorar la mezcla de reacción;
 - eliminar los compuestos no diterpénicos poniendo en contacto la mezcla de reacción decolorada con resina adsorbente macroporosa y posteriormente eluir los glucósidos diterpénicos adsorbidos con etanol acuoso para producir un eluato de etanol acuoso que contiene glucósidos;
 - desalar el eluato de etanol acuoso que contiene glucósidos con resinas de intercambio iónico;
 - eliminar el etanol del eluato de etanol acuoso, lo que produce un eluato acuoso;
 - concentrar y secar el eluato acuoso para obtener la composición de glucosil estevia seca;
 - resuspender la composición de glucosil estevia seca en etanol acuoso para formar una suspensión,
 - eliminar los glucósidos de esteviol sin modificar de la suspensión, y separar y secar la composición de glucosil estevia altamente purificada;
 - en donde la composición de glucosil estevia altamente purificada comprende derivados de glucósido de esteviol de cadena corta que tienen dos o menos residuos de α -1,4-glucosilo, y menos de aproximadamente el 15% de glucósidos de esteviol no modificados.
2. El proceso según la reivindicación 1, en donde la mezcla de α -amilasa y CGTasa contiene aproximadamente 0,001-0,2 KUN de α -amilasa por una unidad de CGTasa.
3. El proceso según la reivindicación 1 o 2, en donde el peso de glucósidos de esteviol añadido es aproximadamente igual al del almidón.
4. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde los glucósidos de esteviol añadidos se seleccionan del grupo que consiste en esteviósido, rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, dulcósido A, esteviolbiósido, rubusósido, así como otros glucósidos de esteviol encontrados en plantas de *Stevia rebaudiana* Bertoni, y mezclas de los mismos.
5. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la CGTasa está producida por cultivos de *Bacillus stearothermophilus*.
6. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el segundo lote de CGTasa tiene aproximadamente 0,2-4 unidades de CGTasa por gramo de sólidos.
7. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde la β -amilasa deriva de una o más fuentes seleccionadas del grupo que consiste en fuentes animales, vegetales, bacterianas y fúngicas.
8. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la β -amilasa está producida por cultivos de *Bacillus polymyxa*.
9. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde la β -amilasa se añade a aproximadamente 30-50 unidades por gramo de sólidos totales, y el tratamiento se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 40-60°C, durante una duración de aproximadamente 3-16 horas.
10. El proceso según la reivindicación 1, en donde en lugar de añadir β -amilasa a la mezcla de reacción, una enzima hidrolizante de oligo- o polisacáridos, derivada de una o más fuentes seleccionadas del grupo que consiste en fuentes animales, vegetales, bacterianas y fúngicas, se añade a la mezcla de reacción.
11. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde la decoloración se realiza usando carbón activo, o usando resinas de intercambio iónico o membranas, dichas membranas se seleccionan del grupo que consiste en membranas de ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa.

- 5
12. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde eliminar los compuestos no diterpénicos se realiza con una pluralidad de columnas secuencialmente conectadas empaquetadas con una resina adsorbente macroporosa, seguido por lavar las columnas con agua, después lavar con etanol aproximadamente al 10-50% (v/v), desconectar las columnas, y después eluir cada columna individualmente con etanol al 30-100%.
- 10
13. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el desalado se realiza pasando el eluato a través de columnas empaquetadas con resinas de intercambio iónico o membranas, dichas membranas se seleccionan del grupo que consiste en membranas de ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa.
14. El proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el alcohol acuoso comprende desde aproximadamente el 0-50% (vol), agua, y que comprende además los pasos de agitar la suspensión a aproximadamente 30-100°C, durante un periodo de aproximadamente 1-24 horas antes de separar la composición de glucosil estevia altamente purificada.

FIG. 1

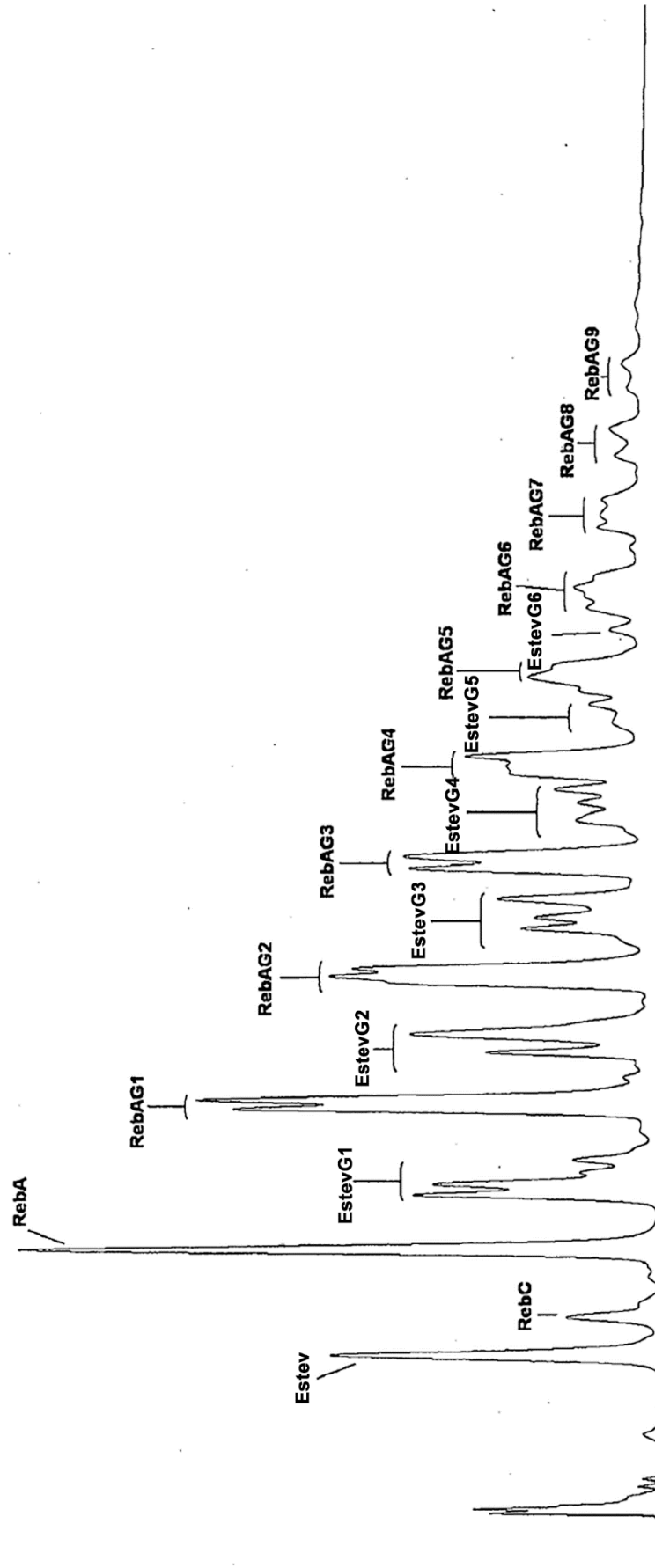


FIG. 2

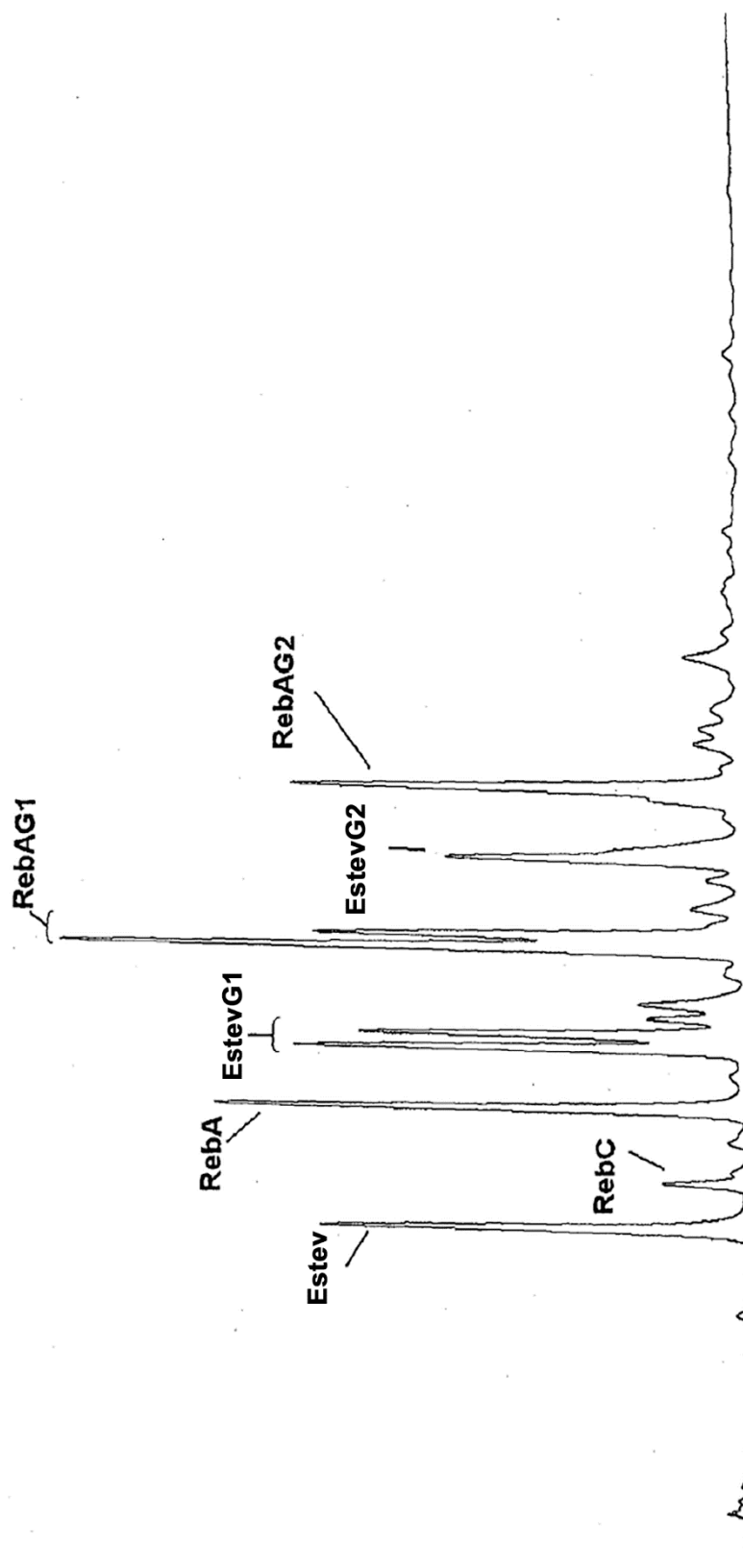


FIG. 3

