

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 592 377**

51 Int. Cl.:

**A23L 27/30** (2006.01)

**C07H 15/256** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2009 PCT/JP2009/067585**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.04.2010 WO10038911**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2009 E 09817935 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016 EP 2350110**

54 Título: **Nuevos glucósidos de esteviol**

30 Prioridad:

**03.10.2008 JP 2008258617**

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

**29.11.2016**

73 Titular/es:

**MORITA KAGAKU KOGYO CO., LTD. (100.0%)  
19-18, 1-chome, Inadauemachi  
Higashi Osaka, Osaka 577-0002, JP**

72 Inventor/es:

**MORITA, TOYOSHIGE;  
FUJITA, ISAO;  
MATSUURA, FUMITO y  
OTA, MASAYA**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**Observaciones:**

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

**ES 2 592 377 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

Nuevos glucósidos de esteviol

## 5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un nuevo glucósido de esteviol, un edulcorante que contiene rebaudiósido A y el nuevo glucósido de esteviol, que está incluido en la variedad *Stevia Rebaudiana Bertonii* que contiene un alto contenido de rebaudiósido A, un método de fabricación de alimentos, productos farmacéuticos, productos no farmacéuticos y cosméticos, confirmación de variedades de estevia y método analítico del nuevo glucósido de esteviol.

Técnica anterior

15 La estevia es una planta perenne de la familia *Asteraceae* que crece en Paraguay, Sudamérica. Su nombre científico es *Stevia Rebaudiana Bertonii*. La estevia contiene componentes, cuyo dulzor es 300 veces o más el de la sacarosa, y se plantea usarla como un edulcorante natural después de extraer los componentes dulces.

20 El esteviósido ( $C_{38}H_{60}O_{18}$ ), rebaudiósido A ( $C_{44}H_{70}O_{23}$ ), rebaudiósido C, D y E, dulcósido A etc. se han conocido como componentes dulces de la estevia. En la variedad de estevia generalmente plantada, el esteviósido (en lo sucesivo en este documento ST) es el componente principal entre los componentes dulces mencionados anteriormente, con una cantidad de rebaudiósido A contenida (en lo sucesivo en este documento RA) de aproximadamente 40 % en peso del contenido y la de rebaudiósido C es ligeramente menor. Pero dependiendo de la variedad hay diversos tipos, tales como aquellos en los que el rebaudiósido C es el componente principal.

25 Debido a que el ST tiene un grado de dulzor de 300 veces el de la sacarosa, se ha usado ampliamente en la industria alimentaria como un edulcorante natural. Su dulzor es relativamente similar al del azúcar, pero se sabe que, en comparación con el RA, permanece en la boca un sabor desagradable de amargor. En comparación con esto, el RA tiene una buena calidad de dulzor, con un grado de dulzor de 1,3 a 1,5 veces el del ST, por lo que en general un edulcorante de estevia con una alta relación de contenido de RA es deseable más que uno de ST. Los inventores de la presente invención llevaron a cabo citomejoramiento por repetición de fertilizaciones cruzadas selectivas de variedades convencionales, obteniendo así únicamente variedades de estevia con muy pocas cantidades de ST en comparación con RA, desarrollando edulcorantes de estas variedades (véase la bibliografía de patente 1, por ejemplo).

35 Sin embargo, entre los sabores tales como amargor, astringencia y suavidad para la lengua, el sabor suave es bastante delicado. Esta suavidad delicada no depende de la proporción entre ST y RA únicamente. Cuando se añade glucosa a la estructura química de los diversos componentes dulces contenidos en la estevia, el sabor suave mejora, y se ha desarrollado un método para mejorar los sabores suave y fuerte añadiendo estructuralmente glucosa a los componentes dulces de la estevia (bibliografía de patente 2 y 3).

40 De esta manera, incluso si la cantidad de contenido es pequeña, es muy importante analizar los componentes desconocidos contenidos en la estevia, en particular para conocer los componentes en los cuales la glucosa se añade estructuralmente más que el ST, y es extremadamente importante ejecutar un examen cuidadoso de la glucosa añadida estructuralmente a los mismos desde una perspectiva del sabor-control de calidad.

45 Simultáneamente, puesto que la calidad del sabor está influida por los componentes dulces incluidos en las propias plantas como materia prima, es importante sujetar minuciosamente los componentes dulces para desarrollar excelentes variedades de estevia y usarlas. De ahora en adelante, la mejora del cultivo de la planta como materia prima probablemente se hará muy popular, pero será posible conocer en detalle los resultados del mejoramiento del cultivo especificando de forma diligente los componentes dulces contenidos en las plantas desarrolladas.

50 Por otro lado, los inventores de la presente invención desarrollaron un método para establecer una variedad para variedades vegetales recién desarrolladas usando genes (bibliografía de patente 4 y 5), pero actualmente no hay medios de especificar las plantas de materia prima respecto al edulcorante extraído y procesado de estas plantas de materia prima y los productos que hacen uso de las mismas.

60 [Bibliografía de patente 1] Publicación de patente abierta a inspección pública JP2002-262822 Gazette  
 [Bibliografía de patente 2] Publicación de patente JP1957-18779 Gazette  
 [Bibliografía de patente 3] Publicación de patente abierta a inspección pública JP1997-107913 Gazette  
 [Bibliografía de patente 4] Publicación de patente abierta a inspección pública JP2003-009878, Gazette  
 [Bibliografía de patente 5] Publicación de patente internacional del tratado de cooperación en materia de patentes PCT WO06/093229 Gazette

65 El documento EP 1 856 967 se refiere a una planta que pertenece a la variedad *Stevia Rebaudiana Bertonii* que contiene 4 partes en peso o más de rebaudiósido A con respecto a una parte en peso de esteviósido y permite que

pueda producirse un endulzamiento de una buena calidad.

5 El documento EP 2 298 084 se refiere a una mezcla aromatizante que comprende una o más sustancias con sabor dulce seleccionadas del grupo de sustancias de sabor dulce de origen natural y sus sales fisiológicamente aceptables, sin filodulcina y sus sales fisiológicamente aceptables. Kobayashi et al. *Phytochemistry*, Pergamon Press, vol. 16, enero 1977, páginas 1405-1408 se refiere a los dulcósidos A y B, nuevos glucósidos de diterpeno de Stevia Rebaudiana.

10 Shintaro Kamiya *et al*, *Agricultural and Biological Chemistry*, Japan Soc. For Bioscience, Biotechnology and Agrochem, vol. 43, n.º 9, 1 enero 1979, páginas 1863-1879, se refiere a la síntesis y sabor de algunos análogos de esteviósido.

Divulgación de la invención

15 Problemas que se deben resolver

20 Se han analizado y normalizado cinco componentes del edulcorante estevia (ST, RA, rebaudiósido A, dulcósido A y biósido de esteviol), pero no existe conocimiento sobre los otros componentes desconocidos. Además, no hay manera de confirmar su presencia ni siquiera para los componentes dulces ya conocidos, puesto que no se ha establecido un método analítico. Sin embargo, recientemente, se ha establecido la norma JECFA para 7 de los componentes de glucósidos de esteviol, los edulcorantes conocidos en la estevia se han confirmado y los componentes desconocidos se han aclarado, junto con la conciencia de la importancia de conocer la influencia del sabor delicado de estos componentes.

25 El fin de la presente invención es definir la estructura de los edulcorantes presentes en pequeña cantidad contenidos en la variedad estevia y confirmar su influencia sobre el sabor del edulcorante de estevia.

30 También el otro fin es proporcionar las medidas para especificar la planta de estevia que resulta como materia prima respecto al edulcorante de estevia y los productos que usa este.

35 Los inventores de la presente invención han buscado nuevos glucósidos de esteviol contenidos en la variedad estevia, cuyo componente principal es RA, y descubrieron 10 componentes de los nuevos glucósidos de esteviol que pueden tener una sutil influencia sobre la calidad del sabor. Después completaron la presente invención descubriendo que había una diferencia en el contenido en volumen de estos componentes entre las variedades y que ciertos componentes estaban presentes únicamente en las variedades de estevia especificadas que tenían RA como su componente principal, seguido de la confirmación de que era posible usar este como un marcador del edulcorante originado en tales plantas.

40 Efectos de la invención

Los glucósidos de esteviol de la presente invención tienen estructuras en las cuales se añade más glucosa que en ST o RA y, por lo tanto, proporcionan un edulcorante de estevia que tiene un excelente sabor fuerte.

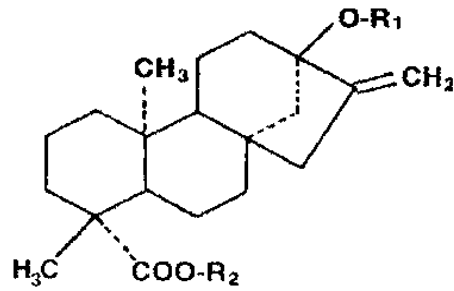
45 Aparte, es posible suponer el origen de la materia prima confirmando el glucósido de esteviol X en el extracto o los cristales, y el análisis del producto final permite juzgar si la planta de materia prima se opone a los derechos tales como patentes y otros.

(El mejor modo para llevar a cabo la invención)

50 La variedad de estevia con RA como componente principal mencionado en la presente invención es una variedad que contiene mayor contenido de RA que de ST, y que se describe en las solicitudes de patente JP2001-200944 y JP2007-506004; el extracto obtenido de las hojas secas tiene un mayor contenido de RA que de ST y también contiene rebaudiósido D (R-D), glucósido de esteviol III, V, VI, VII y X, haciendo posible obtener un edulcorante excelente de sabor fuerte que contiene el componente en el cual se añaden estructuralmente más glucosas que en el ST y/o RA.

55 Además, es posible obtener eficazmente un edulcorante de RA altamente puro que contiene una cantidad traza de ST y glucósido de esteviol X por recristalización.

60 La primera realización de la presente invención es glucósido de esteviol de fórmula III para x, donde los compuestos que no caen dentro de las reivindicaciones se consideran ejemplos de referencia útiles para el entendimiento de la invención:



III - X

en la que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son una cadena de azúcar definida en la siguiente tabla;

N.º (glucósido de esteviol)	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
III (Rebaudiósido I)	$\begin{array}{c} \beta\text{-glc}\text{-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow 1) \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \beta\text{-glc}(3\rightarrow 1) \end{array}$	B-glc-B-glc(3→1)
IV (Rebaudiósido H)	$\begin{array}{c} \beta\text{-glc}\text{-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow 1)\text{-}\beta\text{-glc}(3\text{-}1) \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \beta\text{-glc}(3\text{-}1) \end{array}$	B-glc
V (Rebaudiósido L)	$\begin{array}{c} \beta\text{-glc}\text{-}\beta\text{-glc}(2\text{-}1) \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \beta\text{-glc}(3\text{-}1) \end{array} \left. \vphantom{\begin{array}{c} \beta\text{-glc}\text{-}\beta\text{-glc}(2\text{-}1) \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \beta\text{-glc}(3\text{-}1) \end{array}} \right\} \beta\text{-glc}(6\text{-}1)$	B-glc
VI (Rebaudiósido K)	$\begin{array}{c} \beta\text{-glc}\text{-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow 1) \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \beta\text{-glc}(3\rightarrow 1) \end{array}$	Bglc-B-glc(2→1)
VII (Rebaudiósido J)	$\begin{array}{c} \beta\text{-glc}\text{-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow 1) \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \beta\text{-glc}(3\rightarrow 1) \end{array}$	B-glc- $\alpha$ -rha(2→1)
VIII (Rebaudiósido M)	$\begin{array}{c} \beta\text{-glc}\text{-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow 1) \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \beta\text{-glc}(3\rightarrow 1) \end{array}$	$\begin{array}{c} \beta\text{-glc}\text{-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow 1) \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \beta\text{-glc}(3\rightarrow 1) \end{array}$
IX (Rebaudiósido N)	$\begin{array}{c} \beta\text{-glc}\text{-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow 1) \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \beta\text{-glc}(3\rightarrow 1) \end{array}$	$\begin{array}{c} \beta\text{-glc}\text{-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow 1) \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \beta\text{-glc}(3\rightarrow 1) \end{array}$
X (Rebaudiósido O)	$\begin{array}{c} \beta\text{-glc}\text{-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow 1) \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \beta\text{-glc}(3\rightarrow 1) \end{array}$	$\begin{array}{c} \beta\text{-glc}\text{-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow 1)\text{-}\beta\text{-glc}(3\rightarrow 1) \\ \quad \quad \quad \diagdown \\ \quad \quad \quad \beta\text{-glc}(3\rightarrow 1) \end{array}$

5

Los símbolos en la fórmula son los azúcares a continuación:

glc: D-glucopiranosilo

10

rha: L-ramnopiranosilo

xyl: xilopiranosilo

15

Puede obtenerse un extracto que contiene glucósido de esteviol X (rebaudiósido O) extrayendo un cuerpo de planta de *Estevia Rebaudiana* Bertoni, una planta de la familia de *Asteraceae*, o sus hojas secas, como un componente principal del cual es rebaudiósido A, con agua o un disolvente que contiene agua.

Un método para obtener rebaudiósido A muy puro que contiene el glucósido de esteviol X (rebaudiósido 0) puede proporcionarse mediante la recristalización del extracto mencionado anteriormente.

5 Puede proporcionarse un método de fabricación para productos alimentarios, en el cual el extracto del extracto anterior se añade al alimento en una cantidad igual a o menor del 1 % del alimento.

Puede proporcionarse un método de fabricación de productos alimentarios, en el cual el rebaudiósido A altamente puro obtenido en el método anterior se añade al alimento en una cantidad igual a o menor del 1 % del alimento.

10 En el extracto obtenido de la variedad de materia prima, cuyo componente principal es ST, no hay glucósido de esteviol X, sino el extracto obtenido de las variedades de materia prima, cuyo componente principal es RA, tiene el glucósido X, es posible juzgar la variedad de materia prima respecto a si el componente principal es ST o RA. Es decir, puesto que no hay glucósido X en el extracto que contiene RA como un componente principal, que se obtiene eliminando ST por cristalización a través del extracto obtenido de las variedades cuyo componente principal es ST, o  
15 en los productos de alta pureza obtenidos a partir de su recristalización, es posible confirmar las variedades de materia prima. La sexta realización de la presente invención es el método para confirmar las variedades de estevia por el glucósido de esteviol X.

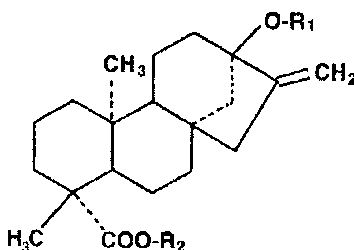
20 Puede proporcionarse un método analítico de los glucósidos de esteviol III-X mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (en lo sucesivo en este documento HPLC).

25 Para conseguir estos objetivos, los inventores de la presente invención estudiaron exhaustivamente los componentes dulces incluidos en las variedades cuyo componente principal es RA y las variedades de las solicitudes JP2001-200944 y JP2007-506004, encontraron nuevos componentes dulces y determinaron su estructura química. Además, confirmaron la utilidad de estos componentes como edulcorantes y completaron el método analítico y el método de confirmación de las variedades a través de estas variedades.

30 La confirmación de los nuevos componentes se ejecutó por extracción con agua o un disolvente que contenía agua de las variedades cuyos componentes principales eran RA como en el Ejemplo 1 (en lo sucesivo en este documento denominada Variedad A) y las hojas secas de las solicitudes JP2001-200944 (en lo sucesivo en este documento denominada Variedad B) y 2007-506004 (en lo sucesivo en este documento denominada Variedad C).

35 Después de esto, la solución de extracto se concentra directamente o, si fuera necesario, las impurezas iónicas se retiran con una resina de intercambio iónico o una resina de intercambio catiónico o carbono activado, se permite que los componentes edulcorantes se absorban en una resina de absorción, seguido de la elución con un disolvente hidrófilo, y si fuera necesario, el eluido se concentra y se seca y el eluyente se vuelve a tratar con una resina de intercambio iónico o una resina de intercambio catiónico, o carbono activado, y puede confirmarse el extracto obtenido de esta manera o el extracto obtenido por medios de purificación apropiados de la técnica convencional tales como decoloración.

40 Los glucósidos de esteviol del extracto de RA-C obtenido del Ejemplo 1 (1) descrito anteriormente en este documento se separaron y analizaron mediante un dispositivo de cromatografía líquida de alto rendimiento y espectrometría de masas (HPLC-MS) de acuerdo con el Ejemplo 5 y cada glucósido tenía la estructura I-X:



I - X

45 en la que R<sup>1</sup> y R<sup>2</sup> son, respectivamente, un átomo de hidrógeno, y se determinó la cadena de azúcar mencionada anteriormente.

50 El glucósido de esteviol I (Dulcósido B) es un glucósido con una estructura de peso molecular 788, según se confirmó en un tiempo de retención (en lo sucesivo en este documento T.R.) de aproximadamente 13 minutos en el cromatógrafo de la HPLC en la Figura 1.

55 El glucósido de esteviol II (Rebaudiósido G) es un glucósido con una estructura de peso molecular 804, según se confirmó en un T.R. de aproximadamente 15 minutos de HPLC en la Figura 1.

El glucósido de esteviol III (Rebaudiósido I) es un glucósido con una estructura de peso molecular 1128, según se confirmó en un T.R. de aproximadamente 28 minutos de HPLC en la Figura 1.

5 El glucósido de esteviol IV (Rebaudiósido H) es un glucósido con una estructura de peso molecular 1112, según se confirmó en un T.R. de aproximadamente 29 minutos de HPLC en la Figura 1.

El glucósido de esteviol V (Rebaudiósido L) es un glucósido con una estructura de peso molecular 1128, según se confirmó en un T.R. de aproximadamente 34 minutos de HPLC en la Figura 1.

10 El glucósido de esteviol VI (Rebaudiósido K) es un glucósido con una estructura de peso molecular 1112, según se confirmó en un T.R. de aproximadamente 34 minutos de HPLC en la Figura 1.

15 El glucósido de esteviol VII (Rebaudiósido J) es un glucósido con una estructura de peso molecular 1112, según se confirmó en un T.R. de aproximadamente 34 minutos de HPLC en la Figura 1.

El glucósido de esteviol VIII (Rebaudiósido M) es un glucósido con una estructura de peso molecular 1290, según se confirmó duplicando el Rebaudiósido D en un T.R. de aproximadamente 34 minutos de HPLC en la Figura 1.

20 El glucósido de esteviol IX (Rebaudiósido N) es un glucósido con una estructura de peso molecular 1274, según se confirmó en un T.R. de aproximadamente 43 minutos de HPLC en la Figura 1.

El glucósido de esteviol X (Rebaudiósido O) es un glucósido con una estructura de peso molecular 1436, según se confirmó en un T.R. de aproximadamente 51 minutos de HPLC en la Figura 1.

25 Sin embargo, cualquier experto en la materia entenderá que el T.R. de análisis mencionado anteriormente usando elución en gradiente es variable.

Como se ha mencionado anteriormente, esto proporciona una importante información para la identificación de la variedad de materia prima y si el glucósido de esteviol X está presente o no en el producto final.

30 Simultáneamente, puesto que es posible confirmar estos glucósidos de esteviol por HPLC, incluso en el caso de que se usen como edulcorantes, la calidad y el sabor pueden controlarse totalmente con facilidad por el análisis de HPLC.

35 El extracto o los cristales obtenidos pueden usarse como edulcorantes en caramelos, gelatinas, bebidas en polvo, sopas de fideos instantáneas, mermeladas, frutas congeladas, chicles, dulces japoneses, alimentos saludables, chocolate, edulcorantes de mesa, dulces fritos, delicias, alimentos hervidos en agua, bebidas lácticas fermentadas, bebidas de café, bebidas de cacao, bebidas de té, licores, vinos, sorbetes, cereales, alimentos que contienen fibra vegetal, salsas, salsa de soja, pasta de soja, vinagres, aderezos, mayonesas, ketchup, curry, sopas, dulces de arroz, arare, panes, bizcochos, galletas tipo craker, mezclas para crepes, frutas en lata, verduras en lata, productos cárnicos, productos fabricados con pasta de pescado hervida, alimentos salados, escabeches, condimentos combinados, alimentos de lujo, productos cosméticos, etc., dando como resultado una disminución de calorías, reducción de la sacarosa, disminución del punto de fusión, mejora de la calidad del dulce y efecto de enmascarado, entre otros, siendo posible también añadir a otros edulcorantes y disolventes naturales y artificiales.

#### 45 Ejemplos

Ejemplo 1 Fabricación de extracto de RA

##### 50 (1) Extracto

100 g de hojas secas obtenidas de las variedades A, B o C, cuyo componente principal es RA, se extrajeron varias veces con 20 veces la cantidad de agua en peso hasta que el dulzor no pudo saborearse. El extracto se hizo pasar a través de una columna rellena con 300 ml de resina de absorción (Diaion HP-20) y los componentes dulces del extracto se absorbieron en la resina, que se lavó suficientemente con agua, y los componentes se eluyeron con 900 ml de metanol. El eluato se hizo pasar a través de una columna rellena con 200 ml de resina de intercambio iónico (Diaion WA-30), se añadieron 10 g de carbono activado al eluato y se agitaron. La mezcla se filtró, el filtrado se concentró y el residuo se secó para dar 13,0 g del extracto de RA-A, cuyo componente principal es rebaudiósido A amarillo claro (ST 35,4 %, RA 41,7 % y RC 9,8 %), 11,5 g del extracto de RA-B (ST 19,5 %, RA 58,1 % y RC 8,8 %) y 12 g del extracto RA-C (ST 5,4 %, RA 72,3 % y RC 8,1 %), respectivamente.

##### 60 (2) Recristalización de RA

Cada 5 g del extracto de RA-B y el extracto de RA-C mencionados anteriormente se disolvieron en 10 veces el peso de metanol al 90 % con calentamiento, y se dejó reposar a 4 °C durante seis días. Los cristales resultantes se separaron, se lavaron con metanol y se secaron a presión reducida para dar 3,9 g de cristales de RA-B blancos (ST

## ES 2 592 377 T3

0,2 %, RA 95,0 % y RC 0,2 %) y 4,5 g de cristales de RA-C (ST 0,2 %, RA 95,6 % y RC 0,1 %) respectivamente.  
Ejemplo 2 Fabricación de extracto de ST

5 Para fines de comparación, se llevó a cabo el mismo procedimiento con respecto a la variedad, cuyo componente principal es ST, para dar 11,3 g de extracto de ST (ST 51,9 %, RA 23,7 % y RC 7,4 %).

Ejemplo 3 Aguas madre de RA-A, aguas madre de ST

10 Cada 10 g del extracto de RA-A y el extracto ST mencionados anteriormente se disolvieron en 10 veces el peso de metanol al 90 % con calentamiento, y se dejó reposar a 4 °C durante seis días. Los cristales resultantes se separaron, se lavaron con metanol al 98 % frío y se secaron a presión reducida para dar 2,1 g de cristales de RA-ST, que son cristales blancos de esteviósido y 3,8 g de cristales de ST-ST, respectivamente.

15 Cada 8,8 g de las aguas madre de RA-A (ST 15,7 %, RA 43,8 % y RC 6,9 %) y 6,1 g de las aguas madre de ST (ST 20,0 %, RA 37,1 % y RC 11,2 %), cuyo componente principal es RA, se concentran y secan para dar un polvo del agua madre, cuyo componente principal era un RA amarillo pálido, respectivamente.

Ejemplo 4 Cristal de RA-A, cristal de ST-RA

20 Cada uno del polvo de aguas madre del Ejemplo 3 se disolvió en 10 veces el peso de metanol al 90 % con calentamiento y se dejó reposar a 4 °C durante seis días. Los cristales resultantes se separaron, se lavaron con metanol al 98 % frío y se secaron a presión reducida para dar 2,2 g de cristales de RA-A blancos (ST 1,6 %, RA 90,4 % y RC 1,4 %) y 1,2 g de cristales de ST- RA (ST 1,6 %, RA 96,9 % y RC 1,4 %), respectivamente.

25 Ejemplo 5 Determinación estructural de glucósidos de esteviol

30 Como se describe a continuación, se realizó un análisis usando HPLC. La separación de los glucósidos de esteviol incluidos en cada extracto se llevó a cabo usando HPLC de Shimazu LC-10Advp usando una columna de TSKgel Amide-80 (4,6 x 250 mm Tosoh). Se usó acetonitrilo-agua como disolvente y se llevó a cabo una elución en gradiente en la cual la proporción de acetonitrilo:agua se cambió de 82:18 a 66:34 en 60 minutos. El caudal era de 0,65 ml/min, la temperatura de la columna era de 40 °C y la detección se realizó a una absorción ultravioleta de 210 nm.

35 En la medición del peso molecular, se usaron un sistema de HPLC Waters' Alliance 2695 y un micro Waters' Quattro (triple cuadrupolo de masa) equipado con ionización de electronebulización (ESI)-espectrómetro de masas. Respecto a la HPLC, la columna era una TSKgel Amide-80 (2,0 x 250 mm, Tosoh), se usó acetonitrilo-agua como un disolvente y se llevó a cabo una elución en gradiente en la cual la proporción de acetonitrilo:agua se cambió de 82:18 a 66:34 en 60 minutos. El caudal era de 0,2 ml/min, la temperatura de la columna era 40 °C, el nitrógeno gas se usó como un gas de desolvatación y se usó gas argón como un gas de colisión. Como una tensión capilar, se usaron 15,0 kV en el análisis del glucósido de esteviol en el modo negativo y en el análisis de ABEE-oligosacáridos se usaron 13,5 kV en el modo positivo. Se usó una tensión de 10 V a 80 V como la tensión de cono y la tensión de colisión en el momento del análisis MS/MS. La temperatura de la fuente y la temperatura de desolvatación eran de 100 °C y 400 °C respectivamente, y el volumen de flujo del gas de cono y el gas de desolvatación era de 50 l/h y 900 l/h respectivamente.

Los resultados del análisis de HPLC respecto a cada extracto y cristal se ilustran en las Figuras 1-10.

50 Los resultados analíticos de cada pico cromatográfico mostrados en las Figuras 2-10 se muestran en las siguientes Tablas 1-9.

[Tabla 1] - Cristales de RA-A

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
1	1	4,857	6932	486			0,2192	Stev mono
	2	8,817	1467	107				
	3	9,603	2029	124			0,0642	Rubuso
	4	10,244	3630	214				
	5	11,065	12106	605				
	6	14,763	14947	397			0,4726	Rebau B
	7	16,782	58617	2320			1,8535	Stev
	8	18,901	35984	1440			1,1379	Rebau C
	9	19,984	23401	820			0,7400	Rebau F
	10	23,334	2971977	97370			93,9772	Rebau A
	11	28,648	4872	191			0,1541	Rebau E+III+IV
	12	34,608	5912	174			0,1869	V+VI+VII
	13	35,531	28131	892	V		0,8895	Rebau D+VIII

ES 2 592 377 T3

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
	14	37,222	5390	185				
	15	42,731	6943	222			0,2195	IX
	16	51,166	2700	88			0,0854	X
	TOT		3185038	105635			100,0000	

[Tabla 2] - Cristales de RA-B

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
1	1	2,098	1307	246				
	2	2,309	675	139	V			
	3	2,833	7713	1426				
	4	4,775	3286	244				
	5	13,518	91704	3965			2,8021	I
	6	14,834	14854	462			0,4539	Rebau B
	7	16,077	1125	54				
	8	16,8	747	88				
	9	17,034	9460	352	V		0,2891	Stev
	10	18,601	2647	110				
	11	19,157	7685	314	V		0,2348	Rebau C
	12	20,268	20421	652			0,6240	Rebau F
	13	23,663	3106124	102260			94,9097	Rebau A
	14	27,533	2882	95				
	15	29,043	5444	210			0,1663	III + Rebau E+IV
	16	31,461	2828	91			0,0864	
	17	35,959	8128	282			0,2484	Rebau D+V+VI+VII
	18	37,696	6165	183				
	19	43,225	4259	120			0,1301	IX
	20	51,644	1807	53			0,0552	X
	TOT		3299261	111346			100,0000	

[Tabla 3] - Cristales de RA-C

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
1	1	2,335	15257	2745				
	2	3,398	2074	247				
	3	4,436	3292	209				
	4	9,657	51969	2355			1,6822	Rubuso
	5	14,351	4502	107			0,1457	Rebau B
	6	16,175	5072	189			0,1642	Stev
	7	18,192	2634	88			0,0853	Rebau C
	8	19,366	13008	474			0,4211	Rebau F
	9	22,682	3002254	98794			97,1825	Rebau A
	10	34,744	4564	160			0,1477	V+VI+Rebau D+VII+VIN
	11	36,455	3018	96			0,0977	
	12	41,927	1880	67			0,0609	IX
	13	50,485	393	17			0,0127	X
	TOT		3109917	105548			100,0000	

5

[Tabla 4] - Extracto de RA-A

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
1	1	2,646	12581	1924				
	2	3,502	1786	313				
	3	3,715	5140	389	V			
	4	4,411	36010	2058	V			
	5	4,64	18976	2043	V			
	6	4,904	94086	5839	V		1,3702	Stev mono
	7	5,683	42933	1608	V			
	8	6,108	9264	666	V			
	9	6,642	30742	778	V			
	10	7,192	23108	906	V			
	11	7,736	52867	2210	V		0,7699	Stev bio
	12	8,292	22402	750	V			
	13	8,831	44958	2378	V			



ES 2 592 377 T3

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
	14	9,615	104428	4765	V		1,5208	Rubuso
	15	10,262	92646	4531	V			
	16	10,917	33787	1420	V			
	17	12,778	63372	2978			0,9229	Dulco A
	18	13,466	12776	658	V		0,1861	I
	19	14,821	47594	1672			0,6931	Rebau B
	20	16,812	2795705	107308			40,7133	Stev
	21	18,95	683621	23300	V		9,9554	Rebau C
	22	20,017	130330	3792	V		1,8980	Rebau F
	23	22,017	4444	192				
	24	23,385	2759980	90911			40,1931	Rebau A
	25	26,082	15240	516				
	26	28,592	5443	144			0,0793	
	27	29,425	6048	234	V		0,0881	III + Rebau E
	28	30,066	29426	961	V		0,4285	IV
	29	33,96	10732	419			0,1563	V+VI+VII
	30	35,559	51215	1667			0,7458	Rebau D+VIII
	31	42,755	15644	462			0,2278	IX
	32	51,175	3535	108			0,0515	X
	TOT		7260819	267900			100,0000	

[Tabla 5] - Extracto de RA-B

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
1	1	2,136	1244	231				
	2	2,862	8119	1484				
	3	4,411	37288	2536				
	4	4,634	25374	2584	V			
	5	4,889	113717	7669	V		3,2793	Stev mono
	6	5,766	57184	1940	V			
	7	6,666	16138	503	V			
	8	7,319	34921	927	V		0,3964	Stev bio
	9	7,917	13888	628	V			
	10	8,533	19410	741	V			
	11	8,887	44852	2585	V			
	12	9,35	16370	1111	V		0,4751	Rubuso
	13	9,71	81099	3752	V			
	14	10,339	81250	3739	V			
	15	12,183	4543	172				
	16	12,941	26992	1213	V		0,5187	Dulco A
	17	13,658	35796	1693	V		0,7239	I
	18	15,012	62182	2088			0,8928	II
	19	17,039	1579831	61299			26,2115	Stev
	20	19,212	630967	21477	V		9,1836	Rebau C
	21	20,303	129387	3817	V		1,6322	Rebau F
	22	23,721	3953586	128495	S		54,9446	Rebau A
	23	26,44	11802	359	T			
	24	29,088	9888	346				
	25	29,817	9663	299	V			
	26	30,449	17347	602	V		0,2574	Rebau E+III+IV
	27	32,984	10425	255				
	28	34,415	15693	537				
	29	35,159	18016	574	V		0,2454	V+VI+VII
	30	36,025	68454	2067	V		0,8839	Rebau D+VIII
	31	37,749	4538	157				
	32	43,275	20100	626			0,2677	IX
	33	51,757	7320	205			0,0877	X
	TOT		7167384	256711			100,0000	

[Tabla 6] - Extracto de RA-C

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
1	1	2,183	616	134				
	2	2,597	10175	1537				
	3	3,437	1414	323				

ES 2 592 377 T3

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
	4	4,46	13740	1017				
	5	4,642	6308	820	V			
	6	4,906	54449	4098	V		0,8853	Stev mono
	7	5,721	9947	485	V			
	8	6,06	3281	277	V			
	9	8,264	25348	701				
	10	8,844	16133	1093	V			
	11	9,66	34116	1479				
	12	10,275	34888	1821	V		0,5673	Rubuso
	13	10,799	10225	529	V			
	14	11,829	144125	5701				
	15	12,826	9263	377	V		0,1506	Dulco A
	16	14,874	129304	2644			2,1024	Rebau B
	17	16,871	437696	17109	V		7,1167	Stev
	18	19,001	472663	16510			7,6852	Rebau C
	19	20,078	99978	2988	V		1,6256	Rebau F
	20	23,439	4700591	156131			76,4290	Rebau A
	21	26,161	6575	216				
	22	28,759	19933	692				
	23	29,523	16030	496	V		0,2606	Rebau E
	24	30,192	4314	195	V		0,0701	III+IV
	25	32,915	22341	361			0,0000	
	26	34,044	20210	662	V		0,3286	V
	27	34,784	37467	1171	V		0,6092	VI+VII
	28	35,637	82080	2479	V		1,3346	Rebau D+VIII
	29	42,833	32965	977			0,5360	IX
	30	51,265	18371	536			0,2987	X
	TOT		6474546	223559			100,0000	

[Tabla 7] - Extracto de ST

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
1	1	2,626	7139	1183				
	2	3,325	824	127				
	3	3,683	3069	423	V			
	4	3,836	9867	1104	V			
	5	4,1	20804	2418	V			
	6	4,432	158950	6323	V			
	7	4,898	244425	14003	V		3,2613	Stev mono
	8	5,679	171018	7277	V			
	9	6,067	36443	2486	V			
	10	6,567	84143	3356	V			
	11	6,833	59479	3255	V			
	12	7,702	364999	10439	V		4,8701	Stev bio
	13	8,831	50633	2395	V			
	14	9,622	121367	5308	V		1,6194	Rubuso
	15	10,283	61202	2776	V			
	16	10,651	82679	3615	V			
	17	12,789	172505	7512			2,3017	Dulco A
	18	13,476	39377	1734	V		0,5254	I
	19	14,117	9126	325	V			
	20	14,843	56080	1517	V		0,7483	Rebau B
	21	15,883	18828	574	V		0,2512	II
	22	16,837	4190811	160109	SV		55,9165	Stev
	23	18,317	837	72	T			
	24	18,961	471940	16634	V		6,2969	Rebau C
	25	20,03	96159	2847	V		1,2830	Rebau F
	26	22,021	11777	430				

ES 2 592 377 T3

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
	27	23,407	1635704	52768	SV		21,8246	Rebau A
	28	26,087	18075	573	T			
	29	30,114	37321	1256			0,4980	Rebau E+III+IV
	30	34,028	11847	362			0,1581	V+VI+VII
	31	35,633	28790	851	V		0,3841	Rebau D+VIII
	32	42,867	4616	125			0,0616	IX
		TOT	8280834	314177			100,0000	

[Tabla 8] - Cristales de ST-ST

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
1	1	2,64	20368	3347				
	2	3,342	792	150				
	3	8,16	199715	8553				
	4	9,579	28792	1602			0,7198	Rubuso
	5	13,436	6892	362			0,1723	I
	6	16,763	3809949	146224	S		95,2514	Stev
	7	19,017	1413	63	T		0,0353	C
	8	21,883	3078	108			0,0770	Rebau F
	9	23,323	138456	4564	V		3,4615	A
	10	26,007	6455	215				
	11	30,02	11309	367			0,2827	Rebau E+III+IV
		TOT	4227219	165555			100,0000	

[Tabla 9] - Cristales de ST-RA

CH	PKNO	T	A	H	MK	IDNO	CONC	N
1	1	2,567	11398	2039				
	2	3,19	846	174				
	3	11,629	43279	1893				
	4	14,703	13970	400			0,4290	Rebau B
	5	15,927	1715	79				
	6	16,885	7321	220			0,2248	Stev
	7	18,961	4537	192			0,1393	Rebau C
	8	20,055	9706	413			0,2981	Rebau F
	9	23,428	3204919	106088			98,4203	Rebau A
	10	28,744	5579	170			0,1713	Rebau E+III+IV
	11	33,32	4707	121			0,1445	V+VI+VII
	12	35,603	4198	146			0,1289	Rebau D+VIII
	13	42,8	1422	45			0,0437	IX
		TOT	33313597	111980			100,0000	

5

Las abreviaturas usadas en las tablas son las siguientes:

- PKNO: Número de pico
- T: Tiempo (minutos)
- 10 A: Área de pico
- H: Altura de pico
- CONC: Concentración (%)
- N: Nombre del glucósido
- TOT: Total
- 15 Stev mono: Monóxido de esteviol
- Stev bio: Biósido de esteviol
- Rebuso: Rebusósido
- Rebau: Rebaudiósido
- Stev: Esteviósido
- 20 Dulco: Dulcósido

La concentración se calcula a partir del área total del espectro de absorción ultravioleta a 210 nm, y es necesario corregir el peso molecular para medir el volumen contenido. De I a X en el cuadro cromatográfico indican el nuevo glucósido de esteviol I a X.

5 Ejemplo 6 Evaluación de la calidad del sabor

Una solución acuosa al 0,05 % de cada extracto y una solución acuosa al 0,03 % de los cristales fueron evaluadas por 10 personas familiarizadas con un ensayo sensorial de estevia y los resultados de la evaluación promedio se muestran en la Tabla 10 a continuación:

10 Evaluación 5: excelente, 4: buena, 3: normal, 2: mala, 1: peor

[Tabla 10]

Materia objeto del ensayo sensorial	1)	2)	3)	4)	5)	6)
Extracto de RA-A	4,1	3,8	4,1	4,9	3,4	3,8
Cristal de RA-A	5,0	4,9	4,9	3,2	4,9	4,9
Extracto de RA-B	4,2	3,8	4,1	4,9	3,5	3,7
Cristal de RA-B	5,0	5,0	4,9	3,5	4,9	4,9
Extracto de RA-C	4,2	4,0	4,5	4,8	3,5	3,8
Cristal de RA-C	5,0	5,0	5,0	3,8	5,0	5,0
Extracto de ST	1,2	1,3	1,2	4,0	2,0	2,0
Cristal de ST-RA	4,8	4,6	4,6	3,0	4,8	4,3
1) Calidad de dulzor 2) Sabor que queda en la boca 3) Astringencia 4) Sabor delicado 5) Sensación refrescante 6) Dulzor al acabarlo						

15 Los tres tipos de extracto de RA que contienen los glucósidos de esteviol II a X (Rebaudiósido G a O) son excelentes respecto a un sabor delicado en comparación con los tres tipos de cristales de RA, pero los cristales de RA son excelentes en las otras evaluaciones. Excepto por la evaluación de sabor delicado, el extracto de ST es inferior al de los cristales de ST-RA. A partir de este resultado, se verifica que los glucósidos de esteviol II-X influyen en el sabor delicado.

20 Ejemplo 7 Determinación de la variedad

25 De acuerdo con el análisis de HPLC de cada extracto y/o cristal, el extracto obtenido de las variedades que contienen RA como un componente principal (en lo sucesivo en este documento Variedad RA) incluyen más rebaudiósido D, y también incluyen el glucósido de esteviol X (rebaudiósido O) en comparación con el extracto obtenido de las variedades que contienen ST como un componente principal (en lo sucesivo en este documento Variedad ST). Además, se ha encontrado que el glucósido de esteviol X también se incluye en los cristales de RA obtenidos por purificación del extracto de las variedades de RA, aunque en cantidades traza.

30 Por otro lado, no hay glucósido de esteviol X en el extracto obtenido a partir de las variedades ST. Naturalmente, el glucósido de esteviol X no se encuentra en los cristales de ST-RA obtenidos de las variedades ST y, por lo tanto, es posible confirmar que el extracto o el cristal se obtienen a partir de la variedad RA, si se confirma la presencia del glucósido de esteviol X.

35 Ejemplo 8 El método analítico del glucósido de esteviol

De acuerdo con la condición de HPLC descrita en el Ejemplo 5, es posible confirmar cada glucósido de esteviol I-X. En principio, es posible confirmar la presencia de glucósido de esteviol a partir del T.R. en el cuadro analítico de HPLC, pero cada glucósido de esteviol I-X puede confirmarse midiendo el peso molecular después del aislamiento preparativo de cada glucósido.

40 Ejemplo 9 Azúcar de mesa

- 45
- 1) Se preparó el azúcar de mesa mezclando 1 g de cristales de RA-A y 99 g de azúcar en polvo.
  - 2) Se preparó el azúcar de mesa mezclando 1 g de cristales de RA-B y 99 g de eritritol.
  - 3) Se preparó el azúcar de mesa mezclando 1 g de cristales de RA-C y 99 g de jarabe de maíz de alto contenido en fructosa.

Ejemplo 10 Caramelos

Se preparó caramelo a partir de 0,3 g de extracto de RA-C, 100 g de palatinit y un volumen apropiado de especias.

5 Ejemplo 11 Gelatina de leche

Se preparó gelatina de leche a partir de 15 g de azúcar, 0,08 g de extracto de RA-B, 250 g de leche, 5 g de gelatina y un volumen apropiado de aroma de leche.

Ejemplo 12 Bebidas deportivas

10 Se preparó una bebida deportiva a partir de 0,075 % de cristales de RA-B, 0,11 % de lactato de calcio, 0,045 % de ácido cítrico, 0,03 % de citrato trisódico, 0,015 % de cloruro de magnesio, 0,0055 % de ácido glutámico y 99,72 % de agua.

15 Ejemplo 13 Bebidas carbonatadas

Se preparó una bebida carbonatada añadiendo 0,012 % de cristales de RA-B, 8,4 % de fructosa, 0,6 % de ácido cítrico, 0,12 % de arginina, 0,1 % de inositol, 0,0025 % de cafeína, 0,0034 % de pantotenato de calcio, 0,003 % de niacinamida, 0,002 % de vitamina B6, 0,00009 % de vitamina B2, 0,000002 % de vitamina B12, y los volúmenes apropiados de especias y agua para ajustar el 100 % del total de ingredientes, y después introduciendo dióxido de carbono gaseoso.

Aplicabilidad industrial

25 Por análisis de HPLC de los nuevos glucósidos de esteviol proporcionados por la presente invención, es posible fabricar edulcorantes y otros productos alimentarios con un cierto grado de dulzor y calidad y sabor delicado. También posibilita suponer las variedades de materia prima y la invención ayuda a juzgar lo correcto de la indicación de origen, área de cultivo de las variedades de estevia o la infracción de derechos.

30 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el cuadro de análisis de HPLC para el extracto de RA-C.

35 La Figura 2 muestra el cuadro de análisis de HPLC para los cristales de RA-A.

La Figura 3 muestra el cuadro de análisis de HPLC para los cristales de RA-B.

La Figura 4 muestra el cuadro de análisis de HPLC para los cristales de RA-C.

40 La Figura 5 muestra el cuadro de análisis de HPLC para el extracto de RA-A.

La Figura 6 muestra el cuadro de análisis de HPLC para el extracto de RA-B.

La Figura 7 muestra el cuadro de análisis de HPLC para el extracto de RA-C.

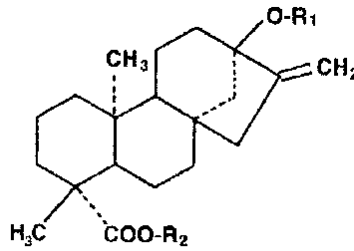
45 La Figura 8 muestra el cuadro de análisis de HPLC para el extracto de ST.

La Figura 9 muestra el cuadro de análisis de HPLC para los cristales de ST-ST.

50 La Figura 10 muestra el cuadro de análisis de HPLC para los cristales de ST-RA.

REIVINDICACIONES

1. Un glucósido de esteviol de la fórmula III, VII, VIII, IX y X:



5 en la que R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> son una cadena de azúcar definida en la siguiente tabla;

N.º	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
III	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow 1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow 1)$	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(3\rightarrow 1)$
VII	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow 1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow 1)$	$\beta\text{-glc-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow 1)$
VIII	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow 1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow 1)$	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow 1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow 1)$
IX	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow 1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow 1)$	$\beta\text{-glc-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow 1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow 1)$
X	$\beta\text{-glc-}\beta\text{-glc}(2\rightarrow 1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow 1)$	$\beta\text{-glc-}\alpha\text{-rha}(2\rightarrow 1)\text{-}\beta\text{-glc}(3\rightarrow 1)$ $\beta\text{-glc}(3\rightarrow 1)$

2. Glucósido de esteviol de la fórmula III de acuerdo con la reivindicación 1.

10 3. Glucósido de esteviol de la fórmula VII de acuerdo con la reivindicación 1.

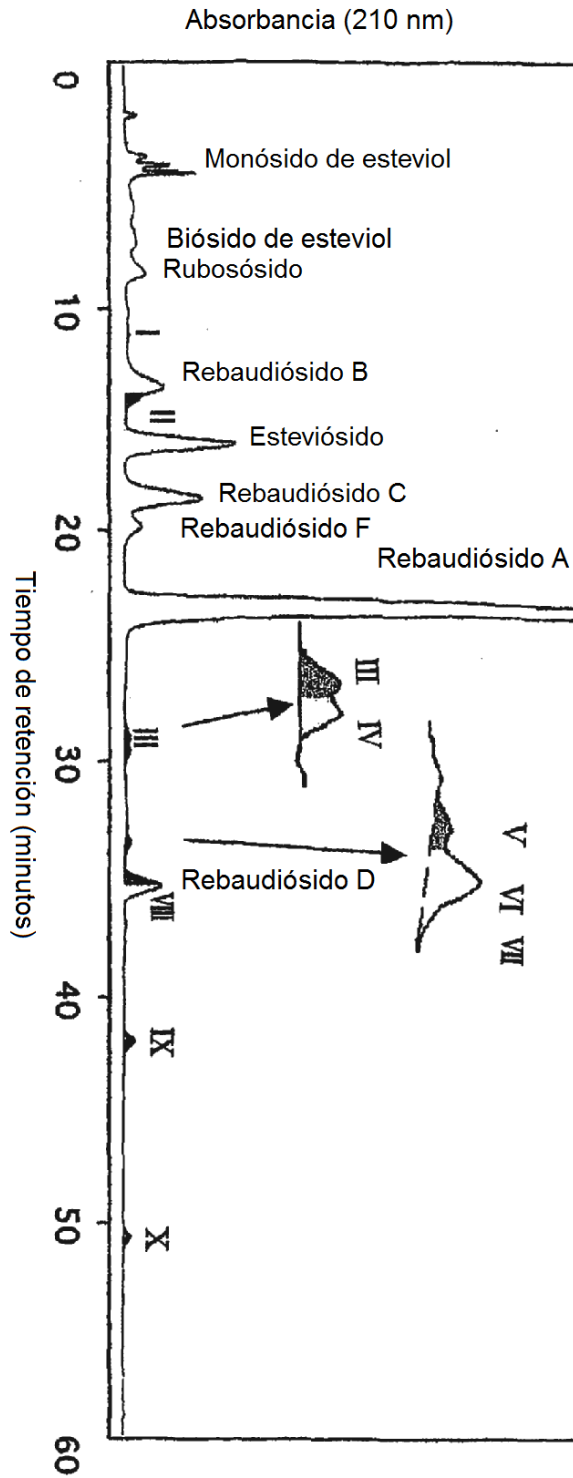
4. Glucósido de esteviol de la fórmula VIII de acuerdo con la reivindicación 1.

5. Glucósido de esteviol de la fórmula IX de acuerdo con la reivindicación 1.

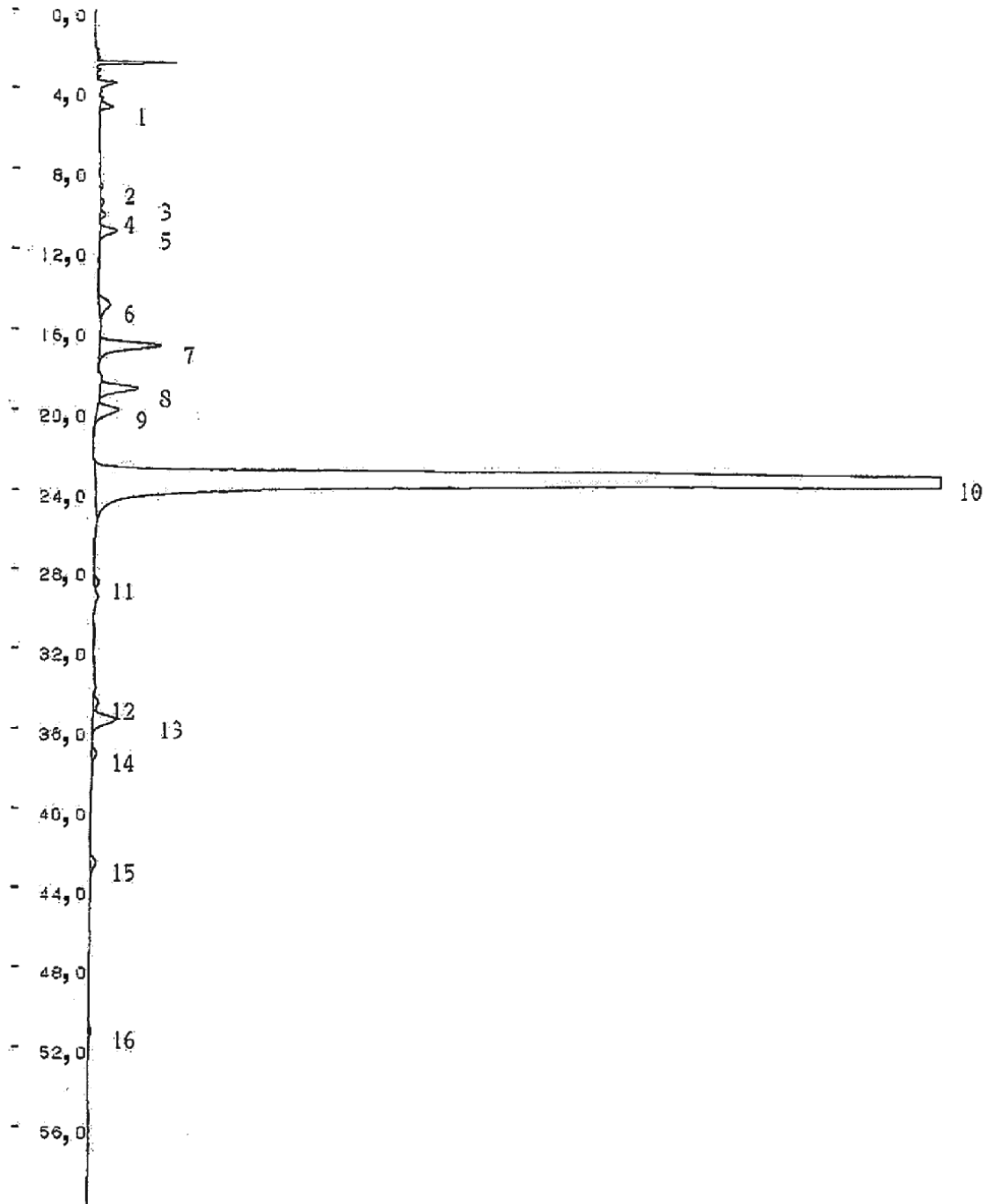
15

6. Glucósido de esteviol de la fórmula X de acuerdo con la reivindicación 1.

[Fig. 1]

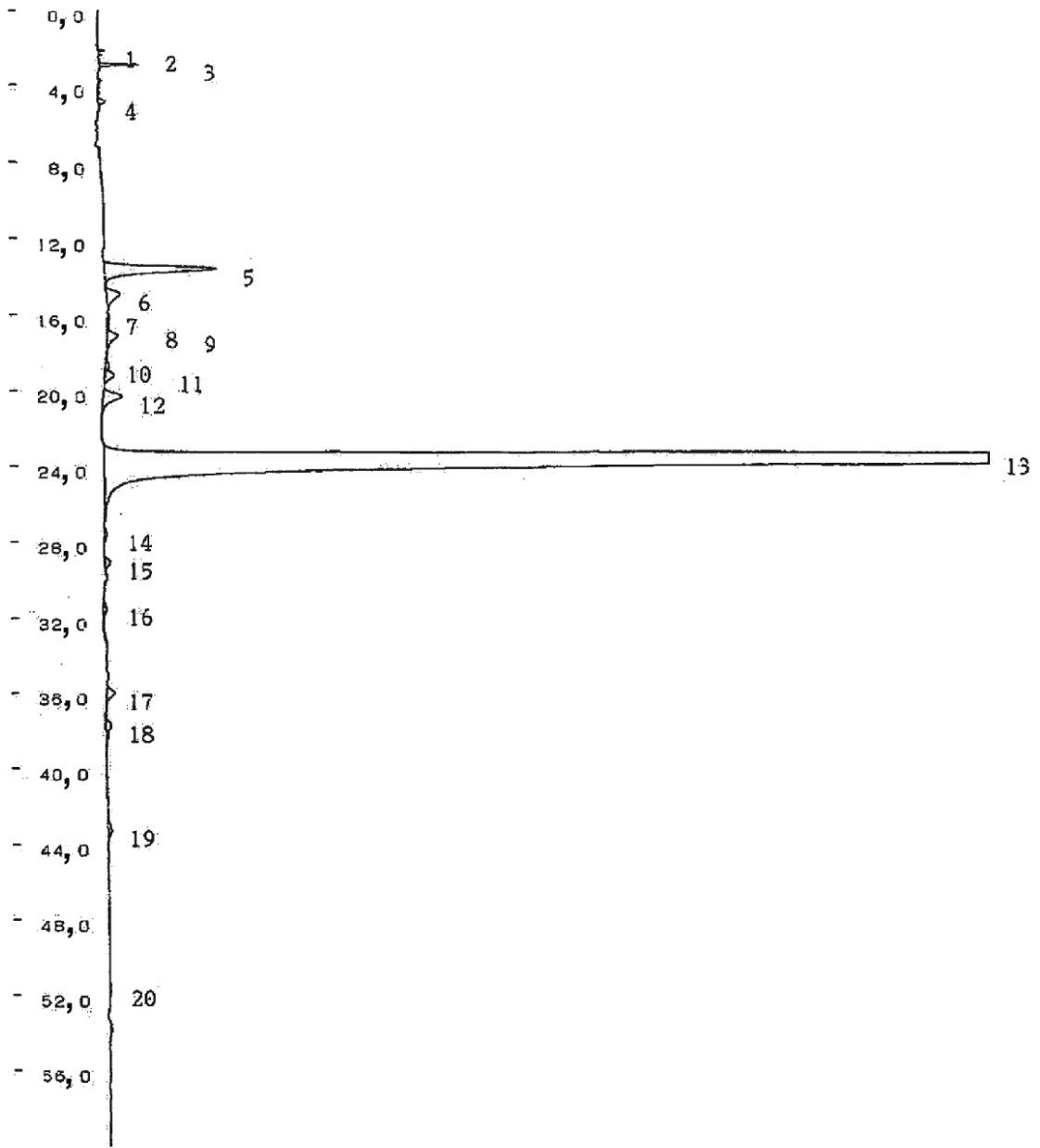


[Fig. 2]

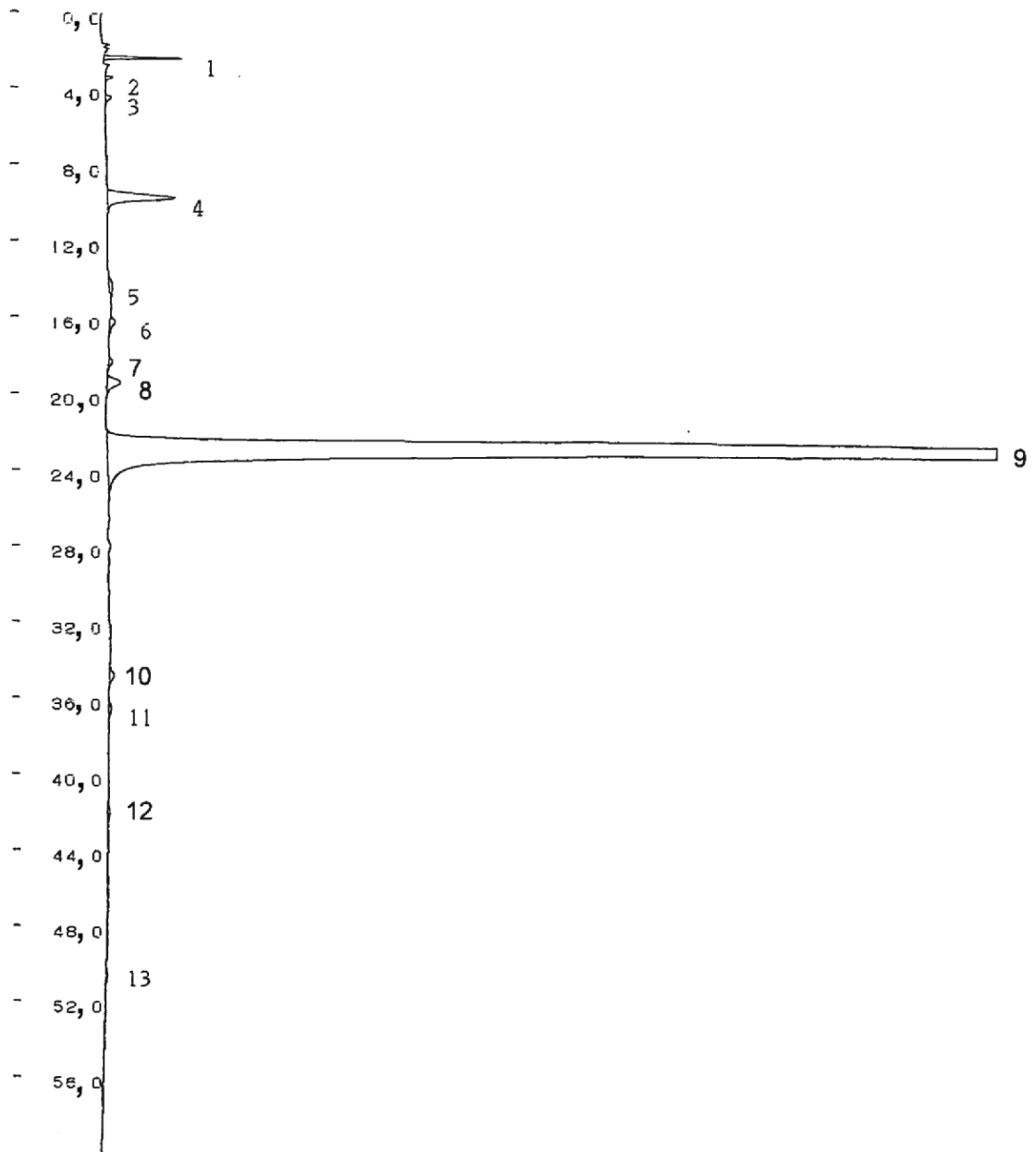




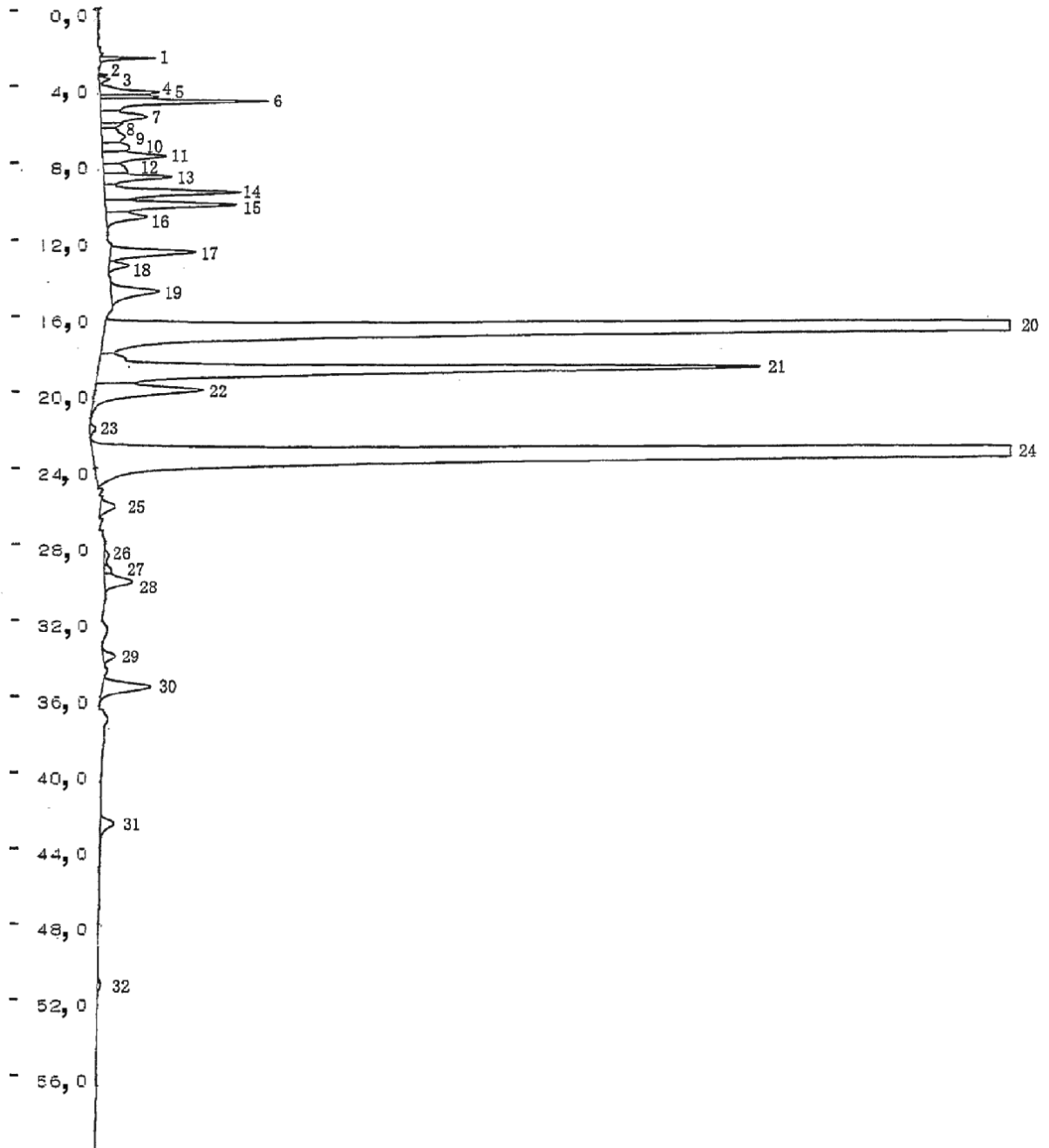
[Fig. 3]



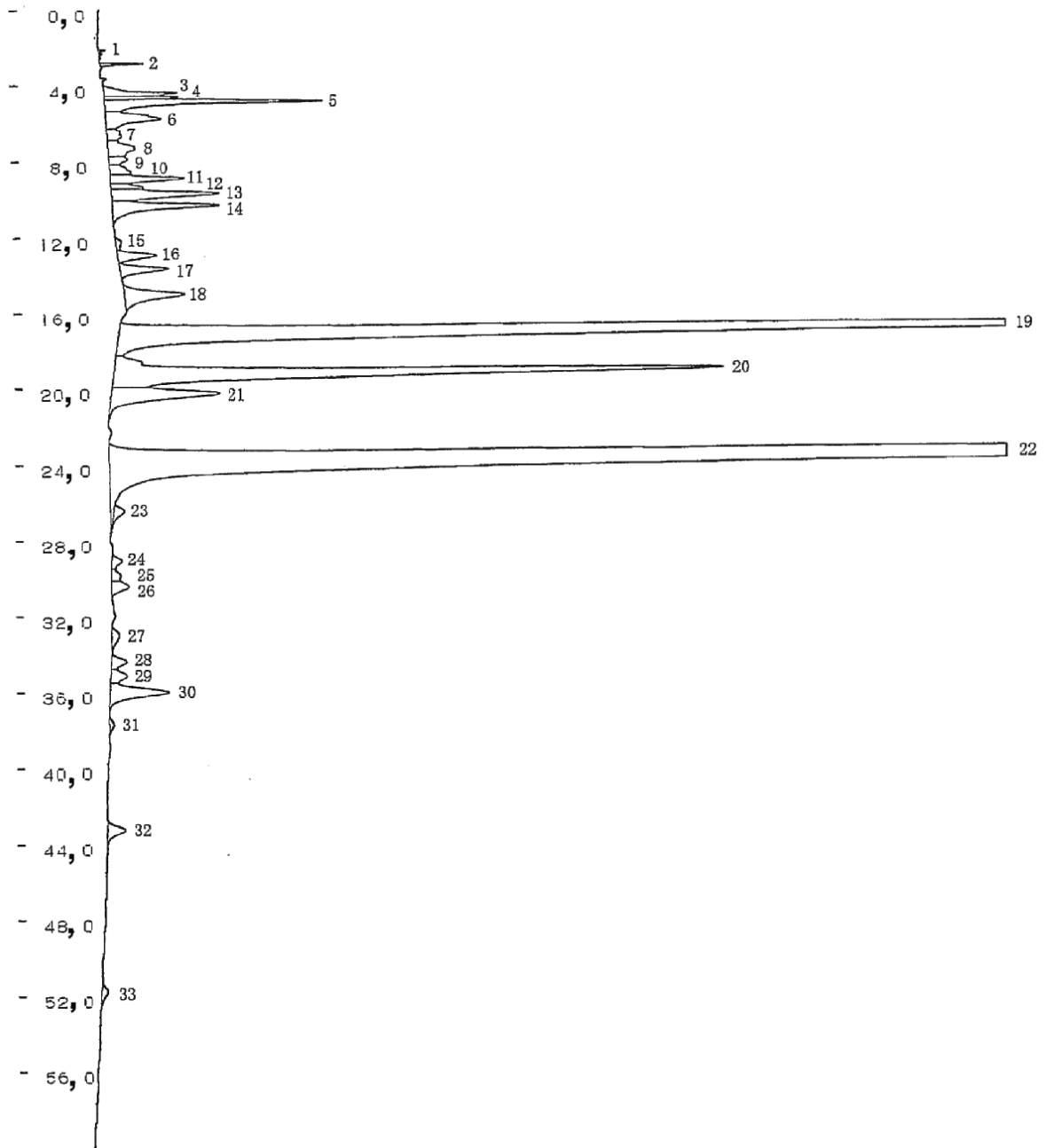
[Fig. 4]



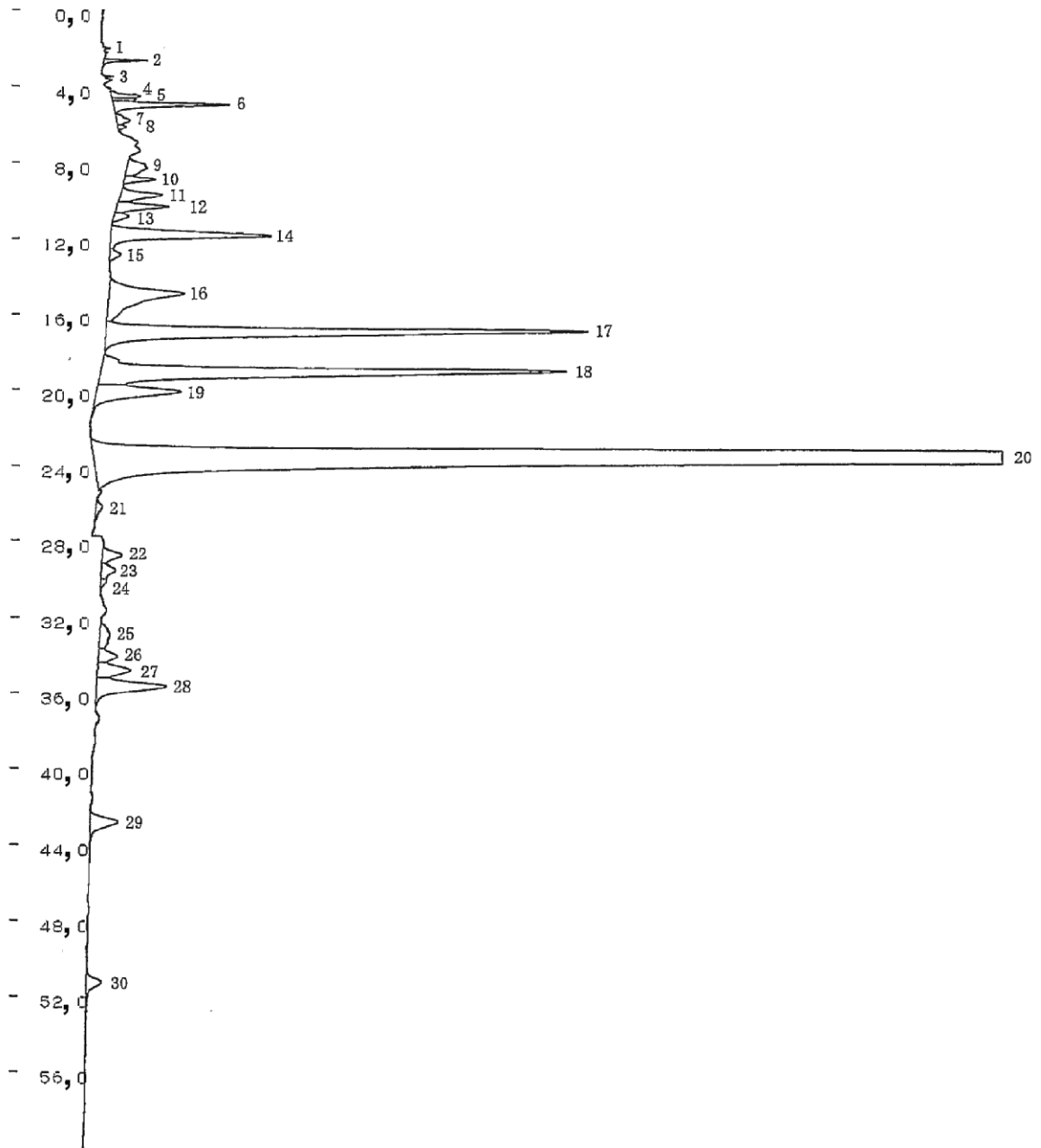
[Fig. 5]



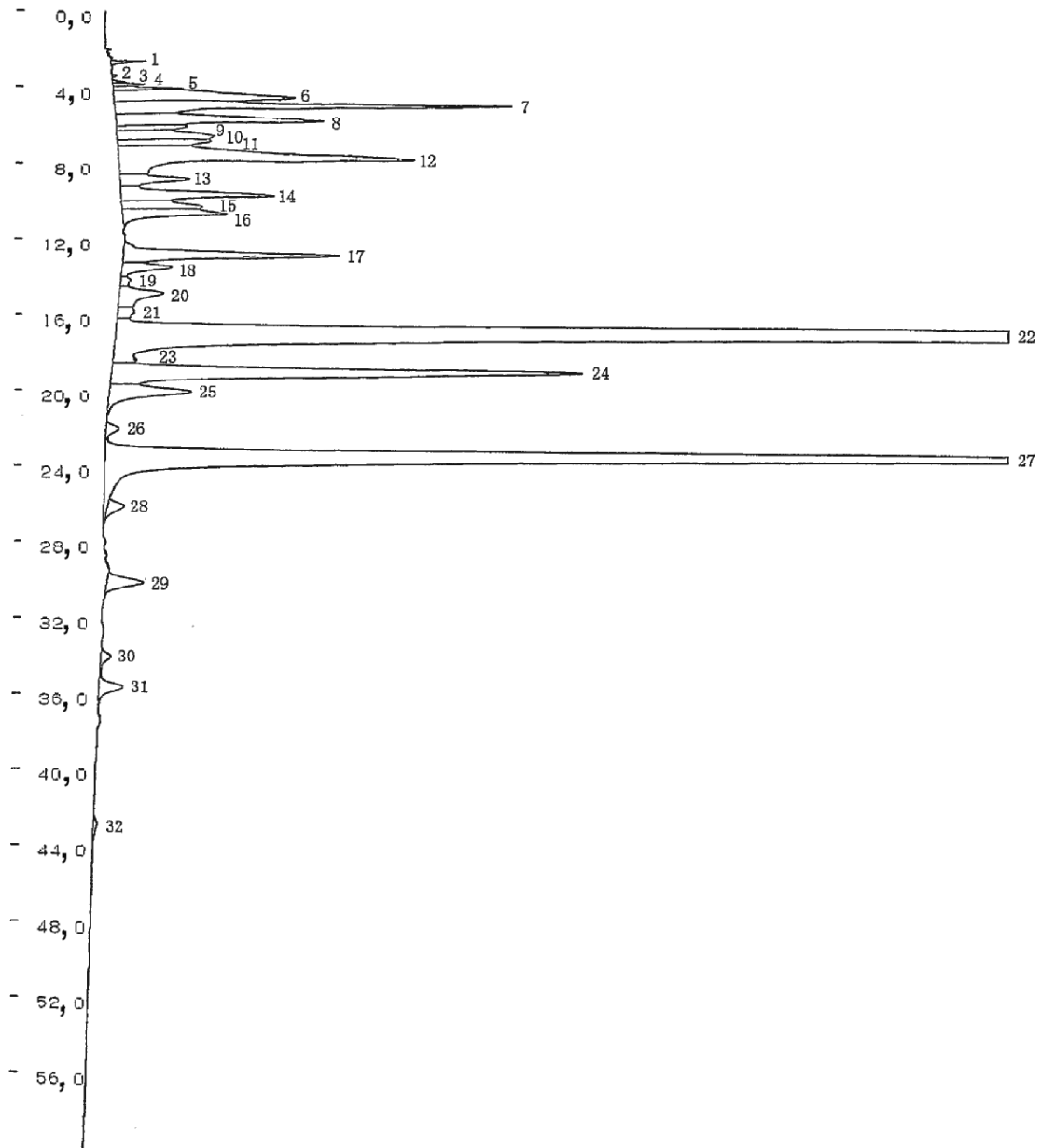
[Fig. 6]



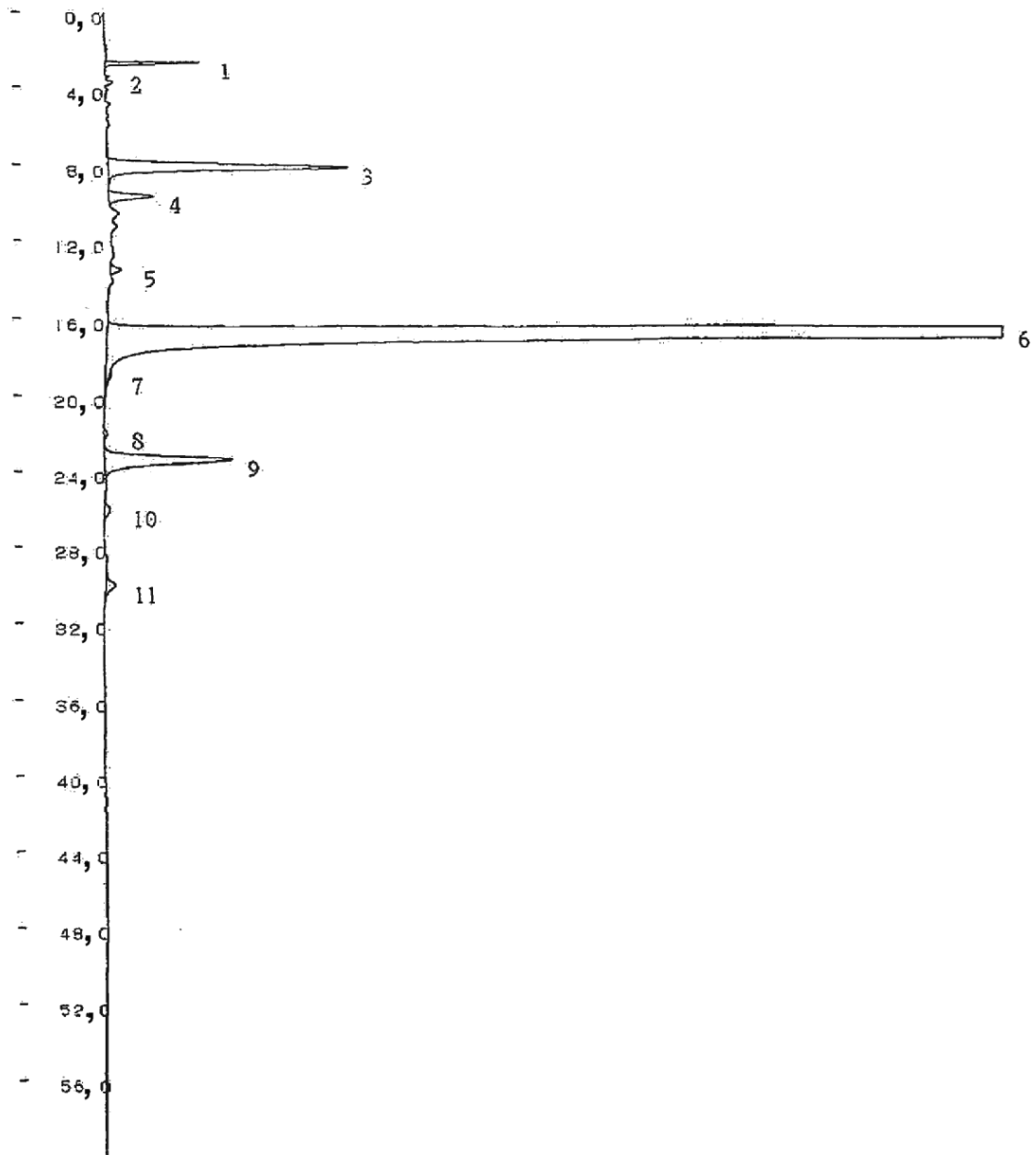
[Fig. 7]



[Fig. 8]



[Fig. 9]



[Fig. 10]

