(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **3 024 947**

(51) Int. Cl.:

C07H 15/256 (2006.01)
C07H 1/00 (2006.01)
C07H 1/08 (2006.01)
A23L 27/30 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.07.2020 PCT/JP2020/029271**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.02.2021 WO21020516**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2020 E 20846188 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.03.2025 EP 4006046**

(54) Título: **Nuevo glucósido de esteviol, método de producción del mismo y composición edulcorante que lo contiene**

(30) Prioridad:

31.07.2019 JP 2019141627

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.06.2025

(73) Titular/es:

SUNTORY HOLDINGS LIMITED (100.00%)
1-40, Dojimahama 2-chome, Kita-ku
Osaka-shi, Osaka 530-8203, JP

(72) Inventor/es:

URAI SOICHIRO;
IWAKI KAZUNARI;
MIYAGAWA KATSURO;
HIRAI TADAYOSHI;
NAGAO KOJI;
YOKOO YOSHIAKI;
WATANABE TAKEHIRO y
FUJIKAWA KOHKI

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

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

Nuevo glucósido de esteviol, método de producción del mismo y composición edulcorante que lo contiene

Campo técnico

La presente invención se refiere a un nuevo glucósido de esteviol, a un método de producción del mismo y a una composición edulcorante que comprende el mismo. Es más, la presente invención también se refiere a un alimento o bebida, a una planta, un extracto de la misma y un agente de control del sabor que comprende el nuevo glucósido de esteviol.

Antecedentes de la técnica

Una hoja de *Stevia rebaudiana* contiene un metabolito secundario llamado esteviol, que es un tipo de diterpenoides, donde los glucósidos de esteviol proporcionan un dulzor casi 300 veces superior al del azúcar, por lo que se utiliza como edulcorante sin calorías en la industria alimentaria. La demanda de edulcorantes sin calorías crece día tras día ya que la obesidad se ha convertido en un grave problema social en todo el mundo y también para promover la salud y reducir los gastos médicos. En la actualidad, el aspartamo y el acesulfamo potásico, es decir, derivados de aminoácidos sintetizados artificialmente, se utilizan como edulcorantes artificiales, pero se espera que los edulcorantes naturales sin calorías, como los glucósidos de esteviol, sean más seguros y tengan más probabilidades de ganarse la aceptación del público.

Los principales glucósidos de esteviol de la estevia se glicosilan en última instancia en un glucósido llamado rebaudiósido A (Reb.A) que tiene cuatro fracciones de azúcar (Figura 1). El esteviósido, en concreto, un glucósido de esteviol triglicosilado que es un precursor del Reb.A, es el glucósido más abundante. Estos dos glucósidos son las principales sustancias responsables del dulzor de la estevia. El esteviósido representa el mayor contenido en una hoja de estevia y se sabe que proporciona un dulzor aproximadamente 250-300 veces superior al del azúcar. El Reb. A es un glucósido de esteviol tetraglucosilado que posee un fuerte dulzor (350-450 veces el del azúcar) con una buena calidad gustativa. Han llamado la atención como edulcorantes sin calorías. Además de ellos, se conoce la existencia de glucósidos que se consideran productos intermedios de reacción y análogos que tienen diferentes tipos de moléculas de azúcar. Por ejemplo, mientras que las cuatro fracciones de azúcar glicosídico de Reb.A son glucosa, se sabe que el rebaudiósido C (Reb. C) tiene ramnosa en lugar de glucosa unida al C-2 de la glucosa en C-13, y que el rebaudiósido F (Reb. F) tiene xilosa unida en la misma posición.

Hasta la fecha, se ha intentado obtener una planta de estevia con un contenido de Reb.A superior al de las plantas de estevia de tipo salvaje mediante la mejora de la variedad, ya que la calidad del sabor de Reb.A, en el que las cuatro fracciones de azúcar glucósido son glucosa, es buena (por ejemplo, bibliografía de patentes 1). Además, también se ha intentado obtener un glucósido de esteviol nuevo descomponiendo un glucósido de esteviol conocido, tal como rebaudiósido M (Reb. M (también denominado Reb. X)), que tiene una buena calidad gustativa, con un ácido (por ejemplo, bibliografía de patentes 2). La bibliografía de patentes 3 describe un compuesto purificado de moléculas de glucósido de esteviol para conferir propiedades de sabor, saporíferos y modificadoras del sabor a los productos consumibles. La bibliografía de patentes 4 describe el aislamiento de un nuevo glucósido de esteviol a partir de una especie que contiene una gran cantidad de Reb. C capaz de influir sobre la calidad del sabor.

Lista de citas

Bibliografía de patentes

[Bibliografía de patentes 1] Patente japonesa N.º 3436317

[Bibliografía de patentes 2] Publicación de solicitud de patente internacional WO2014/146135

[Bibliografía de patentes 3] Publicación de solicitud de patente internacional WO2018/090020

[Bibliografía de patentes 4] Publicación de solicitud de patente internacional WO2018/181515

Sumario de la invención

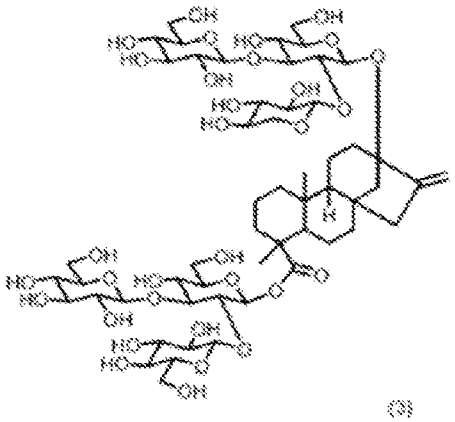
Problema que debe resolver la invención

Dado que el nivel de dulzor y la calidad gustativa de los glucósidos de esteviol pueden variar enormemente en función de la diferencia en el número y el tipo de la fracción de azúcar que se une a la estructura diterpénica que sirve de estructura principal, ha surgido la necesidad de un nuevo glucósido de esteviol.

Medios para resolver los problemas

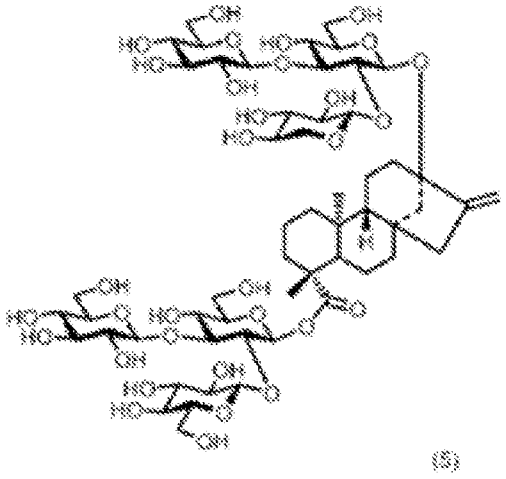
La presente invención proporciona un nuevo glucósido de esteviol que comprende xilosa y una composición edulcorante, un alimento o bebida que comprende el mismo como se muestra a continuación.

En un aspecto, se proporciona un compuesto representado por la Fórmula (3):



(3)

En algunas realizaciones, el compuesto, o una sal o un hidrato del mismo, se representa mediante la Fórmula (5) que figura a continuación:



(5)

En un segundo aspecto, se proporciona un alimento o bebida que comprende el compuesto del primer aspecto.

En algunas realizaciones, el contenido del compuesto del primer aspecto es de 1-600 ppm en masa. En un tercer aspecto, se proporciona una composición edulcorante que comprende el compuesto del primer aspecto.

En algunas realizaciones, el contenido del compuesto del primer aspecto es del 1-99 % en peso.

En algunas realizaciones, la composición edulcorante comprende además uno o más tipos de glucósidos de esteviol seleccionados entre el grupo que consiste en rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, rebaudiósido I, rebaudiósido J, rebaudiósido K, rebaudiósido N, rebaudiósido M, rebaudiósido O, rebaudiósido Q, rebaudiósido R, dulcósido A, dulcósido C, rubusósido, esteviol, monósido de esteviol, biósido de esteviol y estevióside.

En un cuarto aspecto, se proporciona un alimento o bebida que comprende la composición edulcorante del primer aspecto.

En algunas realizaciones, el alimento o bebida es una bebida.

En un quinto aspecto, se proporciona el uso del compuesto del primer aspecto como edulcorante.

Efectos ventajosos de la invención

La presente invención puede proporcionar un nuevo glucósido de esteviol que comprende xilosa, un método para producir el mismo y una composición edulcorante, un alimento o bebida, una planta, un extracto de la misma y un agente de control del sabor que comprende el nuevo glucósido de esteviol. Un glucósido de esteviol en un aspecto preferente de la presente invención tiene una excelente calidad gustativa y un alto nivel de dulzor. Una composición edulcorante en otro aspecto de la presente invención tiene una excelente calidad gustativa.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama que muestra las estructuras y los nombres de los glucósidos de esteviol.
La figura 2 es un diagrama que muestra un cromatograma de iones seleccionado de la variedad cultivada A a m/z de 1097,4.
La figura 3 es un diagrama que muestra un cromatograma de iones seleccionado de la variedad cultivada A a m/z de 1259,5.
La figura 4 es un diagrama que muestra los espectros de masas MS/MS y fragmentados MS^3 del nuevo glucósido de esteviol 1E.
La figura 5 es un diagrama que muestra los espectros de masas MS/MS y fragmentados MS^3 del nuevo glucósido de esteviol 2E.
La figura 6 es un diagrama que muestra un espectro de RMN ^1H del Compuesto de Referencia 15 (400 MHz, Pyr-d5).
La figura 7 es un diagrama que muestra un espectro de RMN ^{13}C del Compuesto de Referencia 15 (100 MHz, Pyr-d5).
La figura 8 es un diagrama que muestra un espectro de RMN ^1H del Compuesto de 17 (400 MHz, Pyr-d5).
La figura 9 es un diagrama que muestra un espectro de RMN ^{13}C del Compuesto de 17 (100 MHz, Pyr-d5).
La figura 10 es un diagrama que muestra cromatogramas de iones extraídos del nuevo glucósido de esteviol 1E (extracto de hoja de estevia) y un producto sintetizado químicamente (forma β del Compuesto de Referencia 15).
La figura 11 es un diagrama que muestra los espectros de masas MS/MS y fragmentados MS^3 del nuevo glucósido de esteviol 1E (extracto de hoja de estevia) y el producto sintetizado químicamente (forma β del Compuesto de Referencia 15).
La figura 12 es un diagrama que muestra cromatogramas de iones extraídos del nuevo glucósido de esteviol 2E (extracto de hoja de estevia) y un producto sintetizado químicamente (forma β del Compuesto 17).
La figura 13 es un diagrama que muestra los espectros de masas MS/MS y fragmentados MS^3 del nuevo glucósido de esteviol 2E (extracto de hoja de estevia) y el producto sintetizado químicamente (forma β del Compuesto 17).
La figura 14 es un diagrama que muestra los resultados de las evaluaciones sensoriales para comparar el glucósido de esteviol A nuevo con azúcar, rebaudiósido A, rebaudiósido D y rebaudiósido M.
La figura 15 es un diagrama que muestra los resultados de las evaluaciones sensoriales para comparar el glucósido de esteviol B nuevo con azúcar, rebaudiósido A, rebaudiósido D y rebaudiósido M.
La figura 16 es un diagrama que muestra los resultados de un análisis de expresión en relación con la identificación de las características genéticas del ejemplo.

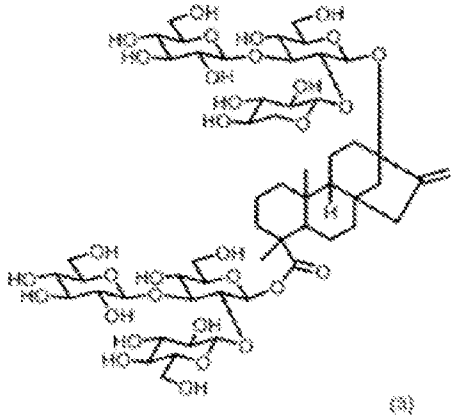
Descripción de realizaciones

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con detalle. La realización siguiente se proporciona para ilustrar la presente invención sin intención alguna de limitar la presente invención únicamente a esta realización. La presente invención puede llevarse a cabo de diversos modos sin apartarse del ámbito de aplicación de la misma. La presente memoria descriptiva incluye el contenido de la memoria descriptiva y los dibujos de la solicitud de patente japonesa n.º 2019-141627, presentada el 31 de julio de 2019, de las cuales la presente solicitud reivindica la prioridad.

Los términos "rebaudiósido", "Reb" y "Reb." como se usan en el presente documento tienen el mismo significado y todos ellos se refieren a "rebaudiósido". De forma similar, el término "dulcósido" como se usa en el presente documento se refiere a "dulcósido".

1. Nuevo glucósido de esteviol

Por primera vez, los presentes inventores identificaron la estructura de un nuevo glucósido de esteviol que contiene xilosa. El nuevo glucósido de esteviol de la presente invención (en el presente documento, también denominado "glucósido de la presente invención") es un compuesto representado por la Fórmula (3) o una sal o un hidrato del mismo:

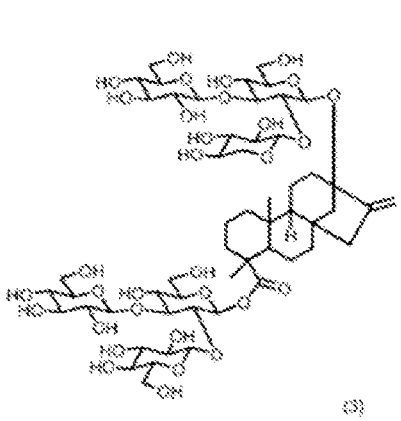


(4)

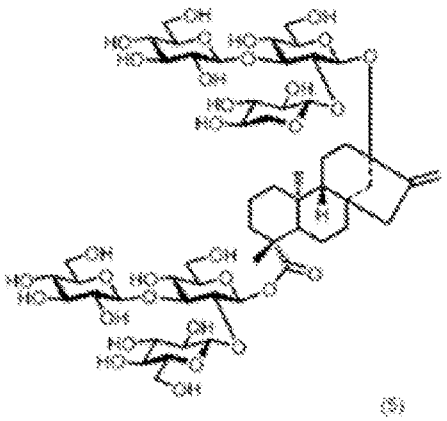
Como se ha representado anteriormente, el glucósido de la presente invención comprende un glucósido de esteviol que tiene una cadena de azúcar que contiene dos fracciones de glucosa y una fracción de xilosa en C-13 de esteviol y una cadena de azúcar que contiene tres fracciones de glucosa en C-19 de esteviol (en el presente documento, también denominado "glucósido B de la presente invención").

Es más, como se usa en el presente documento, Glc representa la glucosa y Xyl representa xilosa. Como se usa en el presente documento, "Glc" puede ser α- o β-glucosa mientras que Xyl puede ser α- o β-xilosa. Como alternativa, como se usa en el presente documento, Glc puede ser α- y β-glucosa mientras que Xyl puede ser α- y β-xilosa. Asimismo, "Glc1-" indica que el átomo de carbono en C-1 de la glucosa está unido al esteviol mediante un enlace glucosídico y "Glc(1-3)-Glc1-" indica que el átomo de carbono en C-3 de la glucosa representado por "Glc1-" está unido a un átomo de carbono en C-1 de otra glucosa mediante un enlace glucosídico. Es más, "Xyl(1-2)-Glc1-" indica que el átomo de carbono en C-2 de la glucosa representado por "Glc1-" está unido al átomo de carbono en C-1 de la xilosa mediante un enlace glucosídico. Es más, "Xyl(1-2)[Glc(1-3)]Glc1-" indica que el átomo de carbono en C-2 de la glucosa representado por "Glc1-" está unido al átomo de carbono en C-1 de la xilosa mediante un enlace glucosídico y el átomo de carbono en C-3 de la glucosa representado por "Glc1-" está unido al átomo de carbono en C-1 de la glucosa mediante un enlace glucosídico.

Entre los ejemplos de glucósido B se incluyen los glucósidos que tienen las estructuras representadas por las fórmulas (3) y (5).



(3)



(5)

En el glucósido B representado por la fórmula (3), la glucosa está unida al grupo hidroxi en C-13 del esteviol mediante un enlace β-glicosídico, otra glucosa está unida a dicha glucosa mediante un enlace β1-3 y la xilosa está unida a dicha glucosa mediante un enlace β1-2. La fórmula (5) representa una estructura con otras conformaciones especificadas del glucósido B representado por la fórmula (3).

El glucósido de la presente invención también comprende isómeros tales como las formas α- y β- como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, el glucósido de la presente invención puede comprender sólo la forma α, sólo la forma β o una mezcla de las formas α y β. La proporción de la forma β en el glucósido de la presente invención es preferentemente del 80 % o más, más preferentemente del 90 % o más, todavía más preferentemente del 95 % o más y de forma más particularmente preferente del 99 % o más. Las formas α- y β- pueden aislarse/purificarse mediante un método conocido, tal como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía líquida de ultra(alto)

rendimiento (UPLC).

El glucósido de la presente invención no sólo puede ser el compuesto representado por la Fórmula (3), sino que también puede ser un derivado, una sal o un hidrato del mismo. El término "derivado", tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un compuesto resultante de un cambio estructural de una fracción menor del compuesto, por ejemplo, un compuesto en el que algunos de los grupos hidroxi están sustituidos por otros sustituyentes. Por lo tanto, los derivados del compuesto representado por la Fórmula (3) incluyen compuestos en los que algunos de los grupos hidroxi contenidos en el compuesto han sido sustituidos con un sustituyente seleccionado entre hidrógeno, un halógeno, un grupo alquilo, un grupo alquenilo, un grupo alquinilo, un grupo arilo, un grupo amino o un grupo ciano. Como se usa en el presente documento, una "sal del compuesto representado por la Fórmula (3)" se refiere a una sal fisiológicamente aceptable, por ejemplo, una sal de sodio, del compuesto representado por la fórmula (3). Es más, un "hidrato del compuesto representado por la Fórmula (3)", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un compuesto resultante de la unión de una molécula de agua al compuesto representado por la Fórmula (3).

Aunque el glucósido de la presente invención no está particularmente limitado, puede ser un producto de origen vegetal, un producto sintetizado químicamente o un producto biosintético. Por ejemplo, puede aislarse y purificarse a partir de una planta rica en el glucósido de la presente invención o puede obtenerse mediante una síntesis química o una biosíntesis. Los detalles de un método para producir el glucósido de la presente invención se describirán más adelante en el presente documento.

El glucósido de la presente invención es más dulce que el azúcar (sacarosa) y puede afectar al dulzor de un alimento o bebida en una pequeña cantidad. Por lo tanto, el glucósido de la presente invención puede utilizarse como un nuevo edulcorante.

Un glucósido de la presente invención es Glucósido B. El glucósido B es más dulce que el azúcar y tiene un amargor más débil que otros glucósidos de esteviol. En consecuencia, el glucósido de esteviol de la presente invención puede utilizarse favorablemente como edulcorante en diversas aplicaciones, como se describirá más adelante.

2. Composición edulcorante que comprende un nuevo glucósido de esteviol

En un aspecto de la presente invención, una composición edulcorante que comprende el compuesto representado por la Fórmula (3) o un derivado, una sal o un hidrato del mismo (en lo sucesivo en el presente documento, también denominada "composición edulcorante de la presente invención"). La composición edulcorante de la presente invención no está particularmente limitada siempre que contenga el compuesto representado por la Fórmula (3) o un derivado, una sal o un hidrato del mismo y puede ser una composición que comprenda un extracto que comprende el compuesto representado por la Fórmula (3) o un derivado, una sal o un hidrato del mismo.

La cantidad del glucósido de la presente invención contenida en la composición edulcorante de la presente invención no está particularmente limitada y puede ser, por ejemplo, 1-99 % en peso, 5-95 % en peso, 10-90 % en peso, 15-85 % en peso, 20-80 % en peso, 25-75 % en peso, 30-70 % en peso, 35-65 % en peso, 40-60 % en peso, 45-55 % en peso, 1-5 % en peso, 1-10 % en peso, 1-15 % en peso, 1-20 % en peso, 1-25 % en peso, 1-30 % en peso, 1-35 % en peso, 1-40 % en peso, 1-45 % en peso o 1-50 % en peso en relación con la cantidad total de la composición edulcorante.

La composición edulcorante de la presente invención puede contener además otros glucósidos de esteviol. Por ejemplo, la composición edulcorante de la presente invención puede contener, además del glucósido de la presente invención, uno o varios tipos de glucósidos de esteviol seleccionados entre el grupo que consiste en rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, rebaudiósido I, rebaudiósido J, rebaudiósido K, rebaudiósido N, rebaudiósido M, rebaudiósido O, rebaudiósido Q, rebaudiósido R, dulcósido A, dulcósido C, rubusósido, esteviol, monósido de esteviol, biósido de esteviol y esteviósido.

En caso de contener otro glucósido de esteviol, la proporción de composición del glucósido de la presente invención y otro glucósido de esteviol puede ser de 1:99 a 99:1, de 5:95 a 95:5, de 10:90 a 90:10, de 15:85 a 85:15, de 20:80 a 80:20, de 25:75 a 75:25, de 30:70 a 70:30, de 35:65 a 65:35, de 40:60 a 60:40, de 45:65 a 65:45 o de 50:50 en una proporción en masa. Asimismo, pueden utilizarse uno o varios tipos de glucósidos de la presente invención.

La composición edulcorante de la presente invención puede contener además un edulcorante distinto de los glucósidos de esteviol. Ejemplos de este tipo de edulcorantes son los edulcorantes naturales tales como fructosa, azúcar, jarabe de fructosa-glucosa, glucosa, maltosa, jarabe rico en fructosa, alcohol de azúcar, oligosacárido, miel, zumo de caña de azúcar prensado (jarabe de azúcar moreno), jarabe de almidón, polvo de Lo Han Kuo *(Siraitia grosvenorii)*, un extracto de Lo Han Kuo *(Siraitia grosvenorii)*, regaliz en polvo, un extracto de regaliz, polvo de semillas de *Thaumatococcus daniellii*, un extracto de semillas de *Thaumatococcus daniellii* y edulcorantes artificiales tales como acesulfamo potásico, sucralosa, neotamo, aspartamo y sacarina. Entre ellos, se utiliza preferentemente un edulcorante natural para conferir un sabor limpio, fácil de beber, sabor natural y gusto moderadamente rico, donde se usan preferentemente fructosa, glucosa, maltosa, sacarosa y azúcar. Pueden utilizarse uno o varios tipos de estos componentes del dulzor.

Un método para producir la composición edulcorante de la presente invención no está particularmente limitado siempre que pueda obtenerse una composición edulcorante que tenga la composición descrita anteriormente. En un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para producir una composición edulcorante de la presente invención, comprendiendo el método las etapas de: obtención de un glucósido de la presente invención; y mezclado del glucósido con otro glucósido de esteviol o un edulcorante distinto de un glucósido de esteviol. La etapa de obtención de un glucósido de la presente invención puede llevarse a cabo por aislamiento/purificación a partir de una planta, una síntesis química o una biosíntesis, donde el glucósido de la presente invención resultante de esta etapa puede obtenerse como mezcla con otro glucósido de esteviol (por ejemplo, Reb. A o Reb. D).

3. Alimento o bebida, agente saporífero y producto farmacéutico que comprende el nuevo glucósido de esteviol

En un aspecto de la presente invención, se proporcionan un alimento o bebida, un agente saporífero y un producto farmacéutico que comprende el compuesto representado por la Fórmula (3) o un derivado, una sal o un hidrato del mismo o la composición edulcorante de la presente invención (en el presente documento, también denominada "alimento o bebida de la presente invención", un "agente saporífero de la presente invención" y un "producto farmacéutico de la presente invención", respectivamente). El alimento o bebida, el agente saporífero y el producto farmacéutico de la presente invención no están particularmente limitados siempre que contengan el compuesto representado por la Fórmula (3), o un derivado, una sal o un hidrato del mismo, y pueden ser un alimento o una bebida, un agente saporífero y un producto farmacéutico que comprende un extracto o una composición edulcorante que comprende el compuesto representado por la Fórmula (3), o un derivado, una sal o un hidrato del mismo. En el presente documento, un alimento o bebida se refiere a bebidas y alimentos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la presente invención proporciona una nueva bebida o alimento y un método para producir dicha bebida o alimento.

Mientras que la cantidad del glucósido de la presente invención contenida en el alimento o bebida, el agente saporífero y el producto farmacéutico de la presente invención difiere en función del alimento o bebida específico, es, preferentemente, de aproximadamente 1-600 ppm en masa, por ejemplo, 20-550 ppm en masa, 25-550 ppm en masa, 30-550 ppm en masa, 35-550 ppm en masa, 40-550 ppm en masa, 45-550 ppm en masa, 50-550 ppm en masa, 55-550 ppm en masa, 20-540 ppm en masa, 25-540 ppm en masa, 30-540 ppm en masa, 35-540 ppm en masa, 40-540 ppm en masa, 45-540 ppm en masa, 50-540 ppm en masa, 55-540 ppm en masa, 20-530 ppm en masa, 25-530 ppm en masa, 30-530 ppm en masa, 35-530 ppm en masa, 40-530 ppm en masa, 45-530 ppm en masa, 50-530 ppm en masa, 55-530 ppm en masa, 20-520 ppm en masa, 25-520 ppm en masa, 30-520 ppm en masa, 35-520 ppm en masa, 40-520 ppm en masa, 45-520 ppm en masa, 50-520 ppm en masa, 55-520 ppm en masa, 20-510 ppm en masa, 25-510 ppm en masa, 30-510 ppm en masa, 35-510 ppm en masa, 40-510 ppm en masa, 45-510 ppm en masa, 50-510 ppm en masa, 55-510 ppm en masa, 20-505 ppm en masa, 25-505 ppm en masa, 30-505 ppm en masa, 35-505 ppm en masa, 40-505 ppm en masa, 45-505 ppm en masa, 50-505 ppm en masa, 55-505 ppm en masa, 20-500 ppm en masa, 25-500 ppm en masa, 30-500 ppm en masa, 35-500 ppm en masa, 40-500 ppm en masa, 45-500 ppm en masa, 50-500 ppm en masa, 55-500 ppm en masa, 20-495 ppm en masa, 25-495 ppm en masa, 30-495 ppm en masa, 35-495 ppm en masa, 40-495 ppm en masa, 45-495 ppm en masa, 50-495 ppm en masa, 55-495 ppm en masa, 20-490 ppm en masa, 25-490 ppm en masa, 30-490 ppm en masa, 35-490 ppm en masa, 40-490 ppm en masa, 45-490 ppm en masa, 50-490 ppm en masa, 55-490 ppm en masa, 100-400 ppm en masa, 150-400 ppm en masa, 200-400 ppm en masa, 250-400 ppm en masa, 300-400 ppm en masa, 100-150 ppm en masa, 100-200 ppm en masa, 100-250 ppm en masa o 100-300 ppm en masa, en el caso de una bebida. El contenido dentro de este intervalo es ventajoso para impartir un dulzor moderado. El contenido dentro de este intervalo es ventajoso para suprimir el regusto persistente. A menos que se especifique otra cosa, "ppm", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a "ppm en masa".

El alimento o bebida, el agente saporífero y el producto farmacéutico de la presente invención pueden contener además otros glucósidos de esteviol. Por ejemplo, la composición edulcorante de la presente invención puede contener, además del glucósido de la presente invención, uno o varios tipos de glucósidos de esteviol seleccionados entre el grupo que consiste en rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, rebaudiósido I, rebaudiósido J, rebaudiósido K, rebaudiósido N, rebaudiósido M, rebaudiósido O, rebaudiósido Q, rebaudiósido R, dulcósido A, dulcósido C, rubusósido, esteviol, monósido de esteviol, biósido de esteviol y esteviósido.

En caso de contener otro glucósido de esteviol, la proporción de composición del glucósido de la presente invención y otro glucósido de esteviol puede ser de 1:99 a 99:1, de 5:99 a 95:5, de 10:90 a 90:10, de 15:85 a 85:15, de 20:80 a 80:20, de 25:75 a 75:25, de 30:70 a 70:30, de 35:65 a 65:35, de 40:60 a 60:40, de 45:65 a 65:45 o de 50:50 en una proporción en masa.

El alimento o bebida, el agente saporífero y el producto farmacéutico de la presente invención pueden contener además un edulcorante distinto de un glucósido de esteviol. Ejemplos de este tipo de edulcorantes son los edulcorantes naturales tales como fructosa, azúcar, jarabe de fructosa-glucosa, glucosa, maltosa, sacarosa, jarabe rico en fructosa, alcohol de azúcar, oligosacárido, miel, zumo de caña de azúcar prensado (jarabe de azúcar moreno), jarabe de almidón, polvo de Lo Han Kuo *(Siraitia grosvenorii)*, un extracto de Lo Han Kuo *(Siraitia grosvenorii)*, regaliz en polvo, un extracto de regaliz, polvo de semillas de *Thaumatococcus daniellii* y un extracto de semillas de

Thhaumatococcus daniellii y edulcorantes artificiales tales como acesulfamo potásico, sucralosa, neotamo, aspartamo y sacarina. Entre ellos, se utiliza preferentemente un edulcorante natural para conferir un sabor limpio, fácil de beber, sabor natural y gusto moderadamente rico, donde se usan preferentemente fructosa, glucosa, maltosa, sacarosa y azúcar. Pueden utilizarse uno o varios tipos de estos componentes del dulzor.

Ejemplos del alimento de la presente invención incluyen, pero sin limitarse particularmente a, un producto de confitería, un pan, harina de cereales, fideos, arroz, un alimento agrícola/silvícola transformado, un producto ganadero procesado, un producto de pesca transformado, un producto de leche/lácteo, un producto de aceite y grasa/procesado de aceite y grasa, condimentos u otros materiales alimentarios.

Ejemplos de la bebida de la presente invención incluyen, pero sin limitarse particularmente a, una bebida carbonatada, una bebida no carbonatada, una bebida alcohólica, una bebida sin alcohol, una bebida con sabor a cerveza, tal como cerveza o cerveza sin alcohol, una bebida de café, una bebida de té, una bebida de cacao, una bebida nutritiva y una bebida funcional.

La bebida de la presente invención puede esterilizarse por calor y envasarse para prepararse como bebida envasada. Los ejemplos de dicho envase incluyen, pero sin limitarse particularmente a, una botella de PET, una lata de aluminio, una lata de acero, un envase de papel, una taza refrigerada y una botella. Si se va a realizar una esterilización por calor, el tipo de esterilización por calor no está particularmente limitado y puede realizarse esterilización por calor, por ejemplo, empleando una técnica común tal como esterilización UHT o esterilización en retorta. Aunque la temperatura durante el proceso de esterilización por calor no está especialmente limitada, es, por ejemplo, 65-130 °C, preferentemente 85-120 °C durante 10-40 minutos. La esterilización, sin embargo, puede llevarse a cabo a una temperatura adecuada durante varios segundos, por ejemplo, 5-30 segundos, sin ningún problema siempre que se pueda obtener un valor esterilizante comparativo al obtenido en las condiciones descritas anteriormente.

El método de producción del alimento o bebida, el agente saporífero y el producto farmacéutico de la presente invención no está particularmente limitado siempre que se trate de un alimento o bebida, un agente saporífero y un producto farmacéutico con los componentes descritos anteriormente. En un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para la producción de un alimento o bebida, un agente saporífero y un producto farmacéutico de la presente invención, comprendiendo el método las etapas de: obtención del extracto, el glucósido o la composición edulcorante de la presente invención; y adición del extracto, el glucósido o la composición edulcorante a un alimento o bebida, un agente saporífero, un producto farmacéutico o una materia prima del mismo. La etapa de obtención del glucósido o de la composición edulcorante de la presente invención y la etapa de obtención del extracto de la presente invención se describen en "2. Composición edulcorante que comprende un nuevo glucósido de esteviol" y "4. Comprendiendo la planta de estevia nuevo glucósido de esteviol y extracto del mismo", respectivamente. La etapa de añadir el extracto, el glucósido o la composición edulcorante de la presente invención a un alimento o bebida, un agente saporífero, un producto farmacéutico o una materia prima del mismo puede llevarse a cabo durante cualquier etapa de producción del alimento o bebida, el agente saporífero y el producto farmacéutico. Por ejemplo, puede realizarse al mezclar las materias primas del alimento o bebida, el agente saporífero o el producto farmacéutico, o en los ajustes finales de la calidad gustativa del alimento o bebida, el agente saporífero o el producto farmacéutico.

4. Planta de estevia con un nuevo glucósido de esteviol y extracto del mismo

En el presente documento se describe una planta de estevia que comprende el compuesto representado por la Fórmula (3), o un derivado, una sal o un hidrato del mismo y un extracto del mismo (en el presente documento, también denominados "la planta descrita en el presente documento y el extracto de la misma"). También se describe un alimento o bebida, un agente saporífero y un producto farmacéutico, preferentemente una bebida, que comprende la planta descrita o el extracto de la misma. Aunque la cantidad del glucósido de la presente invención contenida en la planta descrita en el presente documento no está particularmente limitada, puede ser del 0,001-1,000 % en peso, del 0,005-0,950 % en peso, del 0,008-0,900 % en peso, del 0,010-0,850 % en peso o del 0,015-0,800 % en peso en una hoja seca.

La planta descrita en el presente documento posee al menos una de las características genéticas (1) a (8) que se indican a continuación:

(1) ser homocigoto o heterocigoto para el alelo en donde la base en la posición correspondiente a la posición 298 de la SEQ ID NO:1, la posición 11 de la SEQ ID NO: 3, la posición 21 de la SEQ ID NO:5 o la posición 26 de la SEQ ID NO:7 es T;
(2) ser homocigoto o heterocigoto para el alelo en donde la base en la posición correspondiente a la posición 328 de la SEQ ID NO:1, la posición 11 de la SEQ ID NO: 9, la posición 21 de la SEQ ID NO:11 o la posición 26 de la SEQ ID NO:13 es C;
(3) ser homocigoto o heterocigoto para el alelo en donde la base en la posición correspondiente a la posición 360 de la SEQ ID NO:1, la posición 11 de la SEQ ID NO: 15, la posición 21 de la SEQ ID NO:17 o la posición 26 de la SEQ ID NO:19 es T;
(4) ser homocigoto o heterocigoto para el alelo en donde la base en la posición correspondiente a la posición 386 de la SEQ ID NO:1, la posición 11 de la SEQ ID NO: 21, la posición 21 de la SEQ ID NO:23 o la posición 26 de la

SEQ ID NO:25 es T;
(5) ser homocigoto o heterocigoto para el alelo en donde la base en la posición correspondiente a la posición 393 de la SEQ ID NO:1, la posición 11 de la SEQ ID NO: 27, la posición 18 de la SEQ ID NO:29 o la posición 23 de la SEQ ID NO:31 es T;
(6) ser homocigoto o heterocigoto para el alelo en donde la base en la posición correspondiente a la posición 411 de la SEQ ID NO:1, la posición 11 de la SEQ ID NO: 33, la posición 18 de la SEQ ID NO:35 o la posición 23 de la SEQ ID NO:37 es T;
(7) ser homocigoto o heterocigoto para el alelo en donde la base en la posición correspondiente a la posición 427 de la SEQ ID NO:1, la posición 11 de la SEQ ID NO: 39, la posición 18 de la SEQ ID NO:41 o la posición 23 de la SEQ ID NO:43 es C; y
(8) ser homocigoto o heterocigoto para el alelo en donde la base en la posición correspondiente a la posición 453 de la SEQ ID NO:1, la posición 11 de la SEQ ID NO: 45, la posición 18 de la SEQ ID NO:47 o la posición 23 de la SEQ ID NO:49 es T.

La planta descrita en el presente documento tiene al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete o las ocho características genéticas (1) a (8).

La expresión "posición (o una parte) correspondiente a" se refiere a la posición o la parte (por ejemplo, la posición 298, la posición 328, la posición 360, la posición 386, la posición 393, la posición 411, la posición 427 y la posición 453, etc.) de la secuencia existente en el genoma si dicha secuencia existente en el genoma es idéntica a la secuencia de referencia (por ejemplo, SEQ ID NO:1, etc.). Si ninguna de las secuencias existentes en el genoma es idéntica a la secuencia de referencia, la expresión se refiere a una posición o a una parte de una secuencia existente en el genoma que se correlaciona con la posición o la parte de la secuencia de referencia. Se puede determinar si existe o no en el genoma una secuencia idéntica o correlativa a la secuencia de referencia, por ejemplo, como se indica a continuación: el ADN genómico de la planta de estevia prevista se amplifica con cebadores que pueden amplificar la secuencia de referencia mediante PCR; se secuencia el producto amplificado; y se realiza un análisis de alineación entre la secuencia resultante y la secuencia de referencia. Ejemplos de secuencias correspondientes a la secuencia de referencia incluyen, aunque no de forma limitativa, secuencias de nucleótidos con una identidad de secuencia del 60 % o más, del 70 % o más, del 75 % o más, del 80 % o más, del 81 % o más, del 82 % o más, del 83 % o más, del 84 % o más, del 85 % o más, del 86 % o más, del 87 % o más, del 88 % o más, del 89 % o más, del 90 % o más, del 91 % o más, del 92 % o más, del 93 % o más, del 94 % o más, del 95 % o más, del 96 % o más, del 97 % o más, del 98 % o más, del 98,1 % o más, del 98,4 % o más, del 98,7 % o más, del 99 % o más, del 99,2 % o más, del 99,5 % o más o del 99,8 % o más con la secuencia de referencia. Una posición o una parte de una secuencia existente en el genoma que se correlaciona con la posición o la parte de la secuencia de referencia puede determinarse considerando las secuencias de nucleótidos que preceden y siguen a la posición o la parte de la secuencia de referencia. Por ejemplo, la secuencia de referencia puede alinearse con una secuencia del genoma correspondiente a la secuencia de referencia para determinar la posición o la parte de la secuencia existente en el genoma que se correlaciona con la posición o la parte de la secuencia de referencia.

Por ejemplo, en el caso de "la posición correspondiente a la posición 298 de la SEQ ID NO:1" como en la característica genética (1) de la planta descrita en el presente documento, si el genoma de la planta de estevia tiene una parte consistente en una secuencia de nucleótidos idéntica a la SEQ ID NO:1, "la posición correspondiente a la posición 298 de la SEQ ID NO:1" se refiere a la posición 298 desde el extremo 5' de dicha parte del genoma, que consiste en una secuencia de nucleótidos idéntica a la SEQ ID NO:1. Mientras tanto, si el genoma de la planta de estevia tiene una parte consistente en una secuencia de nucleótidos que no es idéntica pero que corresponde a la SEQ ID NO:1, "la posición correspondiente a la posición 298 de la SEQ ID NO:1" no se refiere necesariamente a la posición 298 a partir del extremo 5' de la parte correspondiente a la SEQ ID NO:1, ya que el genoma no tiene una parte consistente en una secuencia de nucleótidos idéntica a la SEQ ID NO:1, pero "la posición correspondiente a la posición 298 de la SEQ ID NO:1" en dicho genoma de la planta de estevia puede especificarse considerando las secuencias de nucleótidos que preceden o siguen a la posición 298 de la SEQ ID NO:1. Por ejemplo, "la posición correspondiente a la posición 298 de la SEQ ID NO:1" en el genoma de la planta de estevia puede especificarse mediante un análisis de alineamiento entre una secuencia de nucleótidos en el genoma de la planta de estevia, que corresponde a la SEQ ID NO:1 y la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1.

Mientras que las características genéticas mencionadas anteriormente pueden detectarse mediante el método PCR, método de PCR TaqMan, método de secuenciación, método de micromatrices, ensayo Invader, ensayo TILLING, método RAD (ADN polimórfico amplificado al azar), método de polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés), método PCR-SSCP, método AFLP (polimorfismo de longitud de fragmento amplificado), método SSLP (polimorfismo de longitud de secuencia simple), método CAPS (secuencia de polimorfismo amplificado escindido), método dCAPS (secuencia de polimorfismo amplificado escindido derivado), método de oligonucleótidos específicos de alelo (ASO), método de ARMS, método de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE), método CCM (escisión química del desajuste), método de DOL, método MALDI-TOF/MS, método de TDI, ensayo de la sonda de bloqueo, ensayo de baliza molecular, método DASH (hibridación dinámica específica de alelos), método de UCAN, método de ECA, método PINPOINT, método PROBE (extensión de bases de oligo cebador), método VSET (extensión muy corta), ensayo de supervivencia, ensayo de francotirador, ensayo Luminex, método de GOOD, método LCx, Método SNaPshot, ensayo ARRAY de masas, método de

pirosecuenciación, método SNP-IT o análisis de la curva de fusión, el método de detección no se limita a los mismos.

En una descripción, la "parte consistente en una secuencia de nucleótidos correspondiente a la SEQ ID NO: 1" puede incluir, por ejemplo, una parte del genoma de la planta de estevia que pueda amplificarse mediante PCR utilizando un cebador directo que contenga la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:51 y un cebador inverso que contenga la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:52.

En una descripción, un "alelo en donde la base en la posición correspondiente a la posición 298 de la SEQ ID NO:1 es T" incluye la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:4, 6 u 8.

En una descripción, un "alelo en donde la base en la posición correspondiente a la posición 328 de la SEQ ID NO:1 es C" incluye la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:10, 12 o 14.

En una descripción, un "alelo en donde la base en la posición correspondiente a la posición 360 de la SEQ ID NO:1 es T" incluye la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:16, 18 u 20.

En una descripción, un "alelo en donde la base en la posición correspondiente a la posición 386 de la SEQ ID NO:1 es T" incluye la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:22, 24 u 26.

En una descripción, un "alelo en donde la base en la posición correspondiente a la posición 393 de la SEQ ID NO:1 es T" incluye la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:28, 30 u 32.

En una descripción, un "alelo en donde la base en la posición correspondiente a la posición 411 de la SEQ ID NO:1 es T" incluye la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:34, 36 u 38.

En una descripción, un "alelo en donde la base en la posición correspondiente a la posición 427 de la SEQ ID NO:1 es C" incluye la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:40, 42 o 44.

En una descripción, un "alelo en donde la base en la posición correspondiente a la posición 453 de la SEQ ID NO:1 es T" incluye la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO:46, 48 u 50.

Aunque un método para producir la planta descrita en el presente documento no está particularmente limitado, puede crearse mediante cruces o introduciendo una mutación descrita en el presente documento en el genoma de la planta de estevia. La introducción de la variación puede realizarse mediante un enfoque de modificación genética o puede realizarse mediante un enfoque de modificación no genética. Los ejemplos descriptivos del "enfoque de modificación no genética" incluyen un método de inducción de una variación en el gen de una célula hospedadora (o una planta hospedadora) sin transfección con un gen extraño. Los ejemplos descriptivos de tal método incluyen un método para permitir que un mutágeno actúe sobre una célula vegetal. Los ejemplos descriptivos de dicho mutágeno incluyen ácido etilmetanosulfónico (EMS) y azida sódica. Por ejemplo, puede utilizarse ácido etilmetanosulfónico (EMS) a una concentración tal como del 0,1 %, del 0,2 %, del 0,3 %, del 0,4 %, del 0,5 %, del 0,6 %, del 0,7 %, del 0,8 %, del 0,9 % o del 1,0 % para tratar una célula vegetal. El tiempo de tratamiento es de 1 a 48 horas, de 2 a 36 horas, de 3 a 30 horas, de 4 a 28 horas, de 5 a 26 horas, de 6 a 24 horas. Los propios procedimientos del tratamiento son conocidos en la técnica y se pueden realizar mediante la inmersión de una semilla absorbida en agua obtenida a través de un proceso de absorción de agua en una solución de tratamiento que contiene el mutágeno en la concentración descrita anteriormente durante el tiempo de tratamiento descrito anteriormente.

Un ejemplo descriptivo alternativo del enfoque de modificación no genética puede ser un método de irradiación de una célula vegetal con radiación o haz de luz, tal como rayos X, rayos γ o rayos ultravioleta. En este caso, una célula irradiada con una dosis adecuada (intensidad de la lámpara ultravioleta, distancia y tiempo) de rayos ultravioleta se cultiva en un medio selectivo y, a continuación, se puede seleccionar una célula, un callo o una planta que posea el rasgo de interés. En esta operación, la intensidad de irradiación es de 0,01 a 100 Gr, de 0,03 a 75 Gr, de 0,05 a 50 Gr, de 0,07 a 25 Gr, de 0,09 a 20 Gr, de 0,1 a 15 Gr, de 0,1 a 10 Gr, de 0,5 a 10 Gr, de 1 a 10 Gr. La distancia de irradiación es de 1 cm a 200 m, de 5 cm a 100 m, de 7 cm a 75 m, de 9 cm a 50 m, de 10 cm a 30 m, de 10 cm a 20 m, de 10 cm a 10 m. El tiempo de irradiación es de 1 minuto a 2 años, de 2 minutos a 1 año, de 3 minutos a 0,5 años, de 4 minutos a 1 mes, de 5 minutos a 2 semanas o de 10 minutos a 1 semana. La intensidad de la irradiación, la distancia y el tiempo difieren dependiendo del tipo de radiación o el estado del sujeto que se va a irradiar (célula, callo o planta) y puede ser ajustados adecuadamente por parte de aquellos expertos en la materia.

Es más, la expresión "0,050 % en peso o más con respecto a la cantidad del total de glucósidos de esteviol contenidos en la hoja" significa que el glucósido de la presente invención existe en un porcentaje del 0,050 % en peso o más con respecto a la cantidad del total de glucósidos de esteviol existentes en el extracto líquido derivado de la hoja seca de la planta de estevia descrita en el presente documento. En este caso, el total de glucósidos de esteviol no contiene ningún glucósido de esteviol desconocido ni ningún glucósido de esteviol existente en una cantidad inferior al límite de detección. Preferentemente, los glucósidos de esteviol totales consisten en rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, rebaudiósido G, rebaudiósido I, rebaudiósido M, rebaudiósido N, esteviósido, dulcósido A, biósido de esteviol, rubusósido y nuevos glucósidos de esteviol (glucósido

de esteviol de referencia A y/o glucósido de esteviol B nuevo). El contenido de glucósido de esteviol A de referencia o de glucósido de esteviol B nuevo en la hoja de la planta de estevia descrita en el presente documento puede ser del 0,055 % en peso o más, 0,060 % en peso o más, 0,065 % en peso o más, 0,070 % en peso o más, 0,075 % en peso o más, 0,080 % en peso o más, 0,085 % en peso o más, 0,090 % en peso o más, 0,095 % en peso o más, 0,10 % en peso o más, 0,15 % en peso o más, 0,20 % en peso o más, 0,30 % en peso o más, 0,50 % en peso o más, 0,60 % en peso o más, 0,80 % en peso o más, 1,00 % en peso o más, 2,00 % en peso o más, 4,00 % en peso o más, 6,00 % en peso o más, 8,00 % en peso o más o 10,00 % en peso o más y 10,00 % en peso o menos, 8,00 % en peso o menos, 6,00 % en peso o menos, 4,00 % en peso o menos, 2,00 % en peso o menos, 1,00 % en peso o menos, 0,80 % en peso o menos, 0,60 % en peso o menos o 0,30 % en peso o menos, en relación con el total de glucósidos de esteviol.

Como alternativa, el contenido de glucósido de esteviol A de referencia o de glucósido de esteviol B nuevo en la hoja de la planta de estevia descrita en el presente documento puede ser del 0,050 % en peso o más, 0,055 % en peso o más, 0,060 % en peso o más, 0,065 % en peso o más, 0,070 % en peso o más, 0,075 % en peso o más, 0,080 % en peso o más, 0,085 % en peso o más, 0,090 % en peso o más, 0,095 % en peso o más, 0,10 % en peso o más, 0,15 % en peso o más, 0,20 % en peso o más, 0,30 % en peso o más, 0,50 % en peso o más, 0,60 % en peso o más, 0,80 % en peso o más, 1,00 % en peso o más, 2,00 % en peso o más, 4,00 % en peso o más, 6,00 % en peso o más, 8,00 % en peso o más o 10,00 % en peso o más y 10,00 % en peso o menos, 8,00 % en peso o menos, 6,00 % en peso o menos, 4,00 % en peso o menos, 2,00 % en peso o menos, 1,00 % en peso o menos, 0,80 % en peso o menos, 0,60 % en peso o menos o 0,30 % en peso o menos, en relación con el contenido total de rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido F, rebaudiósido N, rebaudiósido M y esteviósido contenidos en la hoja.

En este caso, la hoja seca de la planta descrita en el presente documento se refiere a las obtenidas secando una hoja fresca de la planta descrita en el presente documento para reducir su contenido de agua hasta un 10 % en peso o menos, 7 % en peso o menos, 5 % en peso o menos, 4 % en peso o menos, 3 % en peso o menos, 2 % en peso o menos o 1 % en peso o menos. Preferentemente, el contenido de agua de la hoja seca de la planta descrita en el presente documento es del 3-4 % en peso.

La planta descrita en el presente documento no sólo comprende la planta entera, sino que también puede comprender órganos vegetales (por ejemplo, hoja, pétalo, tallo, raíz, semilla, etc.), tejidos vegetales (por ejemplo, epidermis, floema, parénquima, xilema, haces vasculares, tejido en empalizada, tejido esponjoso, etc.), diversas formas de células vegetales (por ejemplo, células cultivadas en suspensión), un protoplasto, un trozo de hoja y callo.

Además, la planta descrita en el presente documento también puede comprender un cultivo de tejidos o un cultivo de células vegetales. Esto se debe a que dicho cultivo de tejidos o de células vegetales puede cultivarse para regenerar una planta. Los ejemplos descriptivos del cultivo de tejidos o del cultivo de células vegetales de la planta descritos en el presente documento incluyen, aunque no de forma limitativa, un embrión, células meristemáticas, polen, una hoja, una raíz, un ápice de la raíz, un pétalo, un protoplasto, un trozo de hoja y callo.

Un extracto de la planta descrita en el presente documento puede obtenerse dejando reaccionar una hoja fresca o seca de la planta de la presente invención con un disolvente apropiado (un disolvente acuoso como el agua o un disolvente orgánico tal como alcohol, un éter o una acetona). A fin de tener más información sobre las condiciones de extracción, véase el método descrito en el documento WO2016/090460 o el método descrito en el ejemplo siguiente.

Preferentemente, el extracto de la planta descrito en el presente documento contiene el glucósido de la presente invención en un 0,050 % en peso o más en relación con el total de glucósidos de esteviol. El contenido del glucósido de la presente invención puede ser del 0,055 % en peso o más, 0,060 % en peso o más, 0,065 % en peso o más, 0,070 % en peso o más, 0,075 % en peso o más, 0,080 % en peso o más, 0,085 % en peso o más, 0,090 % en peso o más, 0,095 % en peso o más, 0,10 % en peso o más, 0,15 % en peso o más, 0,20 % en peso o más, 0,30 % en peso o más, 0,50 % en peso o más, 0,60 % en peso o más, 0,80 % en peso o más, 1,00 % en peso o más, 2,00 % en peso o más, 4,00 % en peso o más, 6,00 % en peso o más, 8,00 % en peso o más o 10,00 % en peso o más y 10,00 % en peso o menos, 8,00 % en peso o menos, 6,00 % en peso o menos, 4,00 % en peso o menos, 2,00 % en peso o menos, 1,00 % en peso o menos, 0,80 % en peso o menos, 0,60 % en peso o menos o 0,30 % en peso o menos, en relación con el total de glucósidos de esteviol.

Como alternativa, el contenido de glucósido de esteviol A de referencia o de glucósido de esteviol nuevo en el extracto de la planta de descrita en el presente documento puede ser del 0,050 % en peso o más, 0,055 % en peso o más, 0,060 % en peso o más, 0,065 % en peso o más, 0,070 % en peso o más, 0,075 % en peso o más, 0,080 % en peso o más, 0,085 % en peso o más, 0,090 % en peso o más, 0,095 % en peso o más, 0,10 % en peso o más, 0,15 % en peso o más, 0,20 % en peso o más, 0,30 % en peso o más, 0,50 % en peso o más, 0,60 % en peso o más, 0,80 % en peso o más, 1,00 % en peso o más, 2,00 % en peso o más, 4,00 % en peso o más, 6,00 % en peso o más, 8,00 % en peso o más o 10,00 % en peso o más y 10,00 % en peso o menos, 8,00 % en peso o menos, 6,00 % en peso o menos, 4,00 % en peso o menos, 2,00 % en peso o menos, 1,00 % en peso o menos, 0,80 % en peso o menos, 0,60 % en peso o menos o 0,30 % en peso o menos, en relación con el contenido total de rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido F, rebaudiósido N, rebaudiósido M y esteviósido.

En el presente documento se describe un alimento o bebida que comprende el extracto de la planta descrita en el presente documento. Tal como se describe en el presente documento, el alimento o bebida es una bebida. Entre los tipos de alimentos o bebidas se incluyen los mencionados en el apartado "3". Alimento o bebida que comprende un nuevo glucósido de esteviol".

5. Agente de control del sabor que comprende un nuevo glucósido de esteviol

En un aspecto de la presente invención, se proporciona un agente de control del sabor que comprende el compuesto descrito anteriormente representado por la fórmula (3) o un derivado, una sal o un hidrato del mismo. En un aspecto de la presente invención, una composición compuesta como se describe en "2. La composición edulcorante que comprende el glucósido de esteviol nuevo" también puede utilizarse como agente de control del sabor.

En el presente documento, un "agente de control del sabor" se refiere a una sustancia que puede añadirse a un alimento o bebida para controlar el sabor del alimento o bebida. Preferentemente, el agente de control del sabor de la presente invención puede añadirse a un alimento o bebida para controlar el sabor del propio alimento o bebida sin que los consumidores reconozcan el sabor del propio agente de control del sabor. Por ejemplo, ya que el glucósido de esteviol de la presente invención tiene un amargor más débil en comparación con los glucósidos de esteviol convencionales, puede utilizarse como agente de control del sabor para controlar el amargor del alimento o bebida.

Además del compuesto descrito anteriormente representado por la Fórmula (3) o un derivado, una sal o un hidrato del mismo, el agente de control del sabor de la presente invención comprende preferentemente uno o más tipos de otros edulcorantes. Algunos ejemplos de estos edulcorantes incluyen: uno o varios tipos de glucósidos de esteviol seleccionados entre el grupo que consiste en rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, rebaudiósido I, rebaudiósido J, rebaudiósido K, rebaudiósido N, rebaudiósido M, rebaudiósido O, rebaudiósido Q, rebaudiósido R, dulcósido A, dulcósido C, rubusósido, esteviol, monósido de esteviol, biósido de esteviol y estevióside; edulcorantes naturales tales como fructosa, azúcar, jarabe de fructosa-glucosa, glucosa, maltosa, sacarosa, jarabe rico en fructosa, alcohol de azúcar, oligosacárido, miel, zumo de caña de azúcar prensado (jarabe de azúcar moreno), jarabe de almidón, polvo de Lo Han Kuo *(Siraitia grosvenorii)*, un extracto de Lo Han Kuo *(Siraitia grosvenorii)*, regaliz en polvo, un extracto de regaliz, polvo de semillas de *Thaumatococcus daniellii* y un extracto de semillas de *Thaumatococcus daniellii*; y edulcorantes artificiales tales como acesulfamo potásico, sucralosa, neotamo, aspartamo y sacarina.

6. Método de producción de un nuevo glucósido de esteviol

Como se ha descrito anteriormente, el glucósido de esteviol de la presente invención puede producirse por (A) aislamiento/purificación a partir de una planta, (B) una síntesis química o (C) una biosíntesis. En lo sucesivo en el presente documento, se describirá cada uno de ellos.

(A) Aislamiento/purificación a partir de plantas

Se obtiene una planta que contiene el nuevo glucósido de esteviol, por ejemplo, obteniendo una planta con las características genéticas mencionadas anteriormente mediante cualquier método de selección conocido. Después de esto, el nuevo glucósido de esteviol puede aislarse/purificarse a partir de la planta. Una hoja fresca o seca de la planta de la presente invención se deja reaccionar con un disolvente apropiado (un disolvente acuoso como el agua o un disolvente orgánico tal como alcohol, éter o acetona) para extraer el nuevo glucósido de esteviol en estado de extracto líquido. Para las condiciones de extracción y demás, véase el método descrito en el documento WO2016/090460 o el método descrito en el ejemplo siguiente.

Es más, el extracto líquido resultante puede someterse a un método conocido, tal como un gradiente de acetato de etilo u otro disolvente orgánico: agua, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) o cromatografía líquida de ultra (alto) rendimiento (UPLC) para aislar/purificar el nuevo glucósido de esteviol.

El contenido del nuevo glucósido de esteviol en la planta puede determinarse mediante el método descrito en el documento WO2016/090460 o el método descrito en el ejemplo siguiente. Específicamente, el contenido puede determinarse tomando una muestra de una hoja fresca de la planta de la presente invención y sometiendo la hoja a LC-MS/MS.

(2) Síntesis química

El glucósido de esteviol de la presente invención puede sintetizarse mediante una síntesis química conocida, como la descrita en el documento WO2018/181515. Más específicamente, el glucósido de esteviol de la presente invención puede producirse por el método descrito en el ejemplo siguiente.

(3) Biosíntesis

El glucósido de esteviol de la presente invención también puede generarse introduciendo un polinucleótido que codifica

una proteína predeterminada, tal como una enzima de glicosilación, en una célula hospedadora derivada de una bacteria, una planta, un insecto o un mamífero no humano, y utilizando esteviol, un glucósido de esteviol, UDP-glucosa y/o UDP-xilosa como sustrato. El esteviol, un glucósido de esteviol, UDP-glucosa o la UDP-xilosa como sustrato puede proporcionarse o biosintetizarse en la célula.

Preferentemente, el polinucleótido que codifica la proteína predeterminada se introduce en un hospedador mientras se inserta en un vector de expresión apropiado. Dichos polinucleótidos pueden insertarse individualmente en vectores separados.

Un vector de expresión adecuado generalmente se hace que contenga:

(i) un promotor que permite la transcripción en la célula hospedadora;
(ii) un polinucleótido de la presente invención unido a dicho promotor; y
(iii) un casete de expresión que interviene en la terminación de la transcripción y la poliadenilación de las moléculas de ARN y que contiene, como componente del mismo, una señal que funciona en la célula hospedadora.

Los ejemplos de un método para preparar un vector de expresión incluyen, pero sin limitarse particularmente a, un método que utiliza un plásmido, un fago o un cósmido y moléculas de ADN con los componentes necesarios.

El tipo específico del vector no está particularmente limitado y puede seleccionarse adecuadamente cualquier vector que permita la expresión en la célula hospedadora. Específicamente, se selecciona adecuadamente una secuencia promotora según el tipo de célula hospedadora para asegurar la expresión del polinucleótido de la presente invención y se utiliza como vector de expresión un vector obtenido integrando esta secuencia promotora y el polinucleótido de la presente invención en un plásmido.

El vector de expresión incluye regiones de control de la expresión (por ejemplo, un promotor, un terminador y/o un origen de replicación) en función del tipo de hospedador en el que se introduzca. Un promotor utilizado en un vector de expresión bacteriano puede ser un promotor común (por ejemplo, un promotor trc, un promotor tac, un promotor lac, etc.), un promotor utilizado para una levadura puede ser, por ejemplo, un promotor de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, un promotor PH05 o un promotor GAL1/10 y un promotor para hongos filamentosos puede ser, por ejemplo, amilasa o trpC. Asimismo, entre los ejemplos de un promotor para expresar el gen de interés en una célula vegetal se incluye un promotor de ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor, un promotor del gen *rd29A*, un promotor rbcS y un promotor mac-1 en el que la secuencia potenciadora del promotor de ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor se proporciona en el extremo 5' de una secuencia promotora de manopina sintasa derivada de *Agrobacterium*. Un promotor para una célula hospedadora animal puede ser un promotor viral (por ejemplo, un promotor temprano de SV40, un promotor tardío de SV40, etc.). Ejemplos de un promotor que se activa inducciblemente en respuesta a estímulos externos incluyen un promotor del virus del tumor mamario de ratón (MMTV), un promotor sensible a tetraciclina, un promotor de metalotioneína y un promotor de proteína de choque térmico.

Preferentemente, el vector de expresión contiene al menos un marcador seleccionable. Como tal marcador, se pueden usar un marcador auxotrófico (LEU2, URA3, HIS3, TRP1, ura5, niaD), marcadores de resistencia a fármacos (higromicina, zeocina), gen de resistencia a la geneticina (G418r), gen de resistencia al cobre (CUP1) (Marin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 81, pág. 337, 1984), un gen de resistencia a la cerulenina (fas2m, PDR4) (Junji Inokoshi *et al.*, Journal of Japanese Biochemical Society, vol. 64, pág. 660, 1992; y Hussain *et al.*, Gene, vol. 101, pág. 149, 1991, respectivamente).

Como método de transformación de una célula hospedadora, puede emplearse un método generalmente conocido. Por ejemplo, la transformación puede llevarse a cabo empleando un método de electroporación (Mackenxie, D. A. *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., vol. 66, pág. 4655-4661, 2000), un método de administración de partículas (publicación de solicitud de patente japonesa no examinada 2005-287403), un método de esferoplastos (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 75, pág. 1929, 1978), el método del acetato de litio (J. Bacteriology, vol. 153, pág. 163, 1983), y otros métodos descritos en Methods in yeast genetics, 2000 Edición: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual, aunque la presente invención no se limita a ellos.

En cuanto a otros procesos biológicos moleculares generales, véase "Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Vol. 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001, "Methods in Yeast Genetics, A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)".

El transformante no humano obtenido como se ha descrito anteriormente puede cultivarse para permitir que el transformante no humano produzca el glucósido de esteviol. Dicho transformante no humano es preferentemente una levadura. Asimismo, el transformante no humano se cultiva preferentemente en un medio que contiene esteviol. El glucósido de esteviol acumulado puede extraerse/purificarse para obtener el glucósido de esteviol de la presente invención.

Ejemplos

En lo sucesivo en el presente documento, un ejemplo de la presente invención se describirá con detalle, aunque el contenido de la presente invención no debe limitarse al mismo.

[Aislamiento de un nuevo glucósido de esteviol]

Se prepararon dos líneas de nuevas plantas de estevia (Variedad de cultivo A (EM3-4) y Variedad de cultivo B (EM2-27-15)) desarrolladas en el Centro de Innovación Global de Suntory (SIC). Estos cultivos se obtuvieron de la siguiente manera. En primer lugar, se sembraron semillas de estevia disponibles en el mercado y se criaron para someter las semillas resultantes a una modificación genética mediante un tratamiento con 0,2 % (Variedad de cultivo B) o 0,3 % (Variedad de cultivo A) de metanosulfonato de etilo (EMS). Las semillas tratadas con EMS se sembraron en el invernadero del Centro Mundial de Investigación Suntory para obtener la plántula original tratada con EMS (generación M0). No se observaron diferencias en la tasa de germinación entre las concentraciones de tratamiento. El cultivo A procede de un individuo de esta generación M0. Es más, la primera generación de semillas tratamiento (generación M1) obtenidas mediante autofertilización de todos los individuos de la generación M0 se recogieron y se sembraron en el invernadero del Centro Mundial de Investigación Suntory para obtener plántulas de la generación M1. El cultivo B procedía de un individuo de esta generación M1.

Los extractos obtenidos de la hoja de las Variedades de cultivo A y B se sometieron a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) separación-espectrometría de masas (MS) para realizar el análisis de cribado de los glucósidos de esteviol contenidos en las plantas de estevia en función de los pesos moleculares de los glucósidos de esteviol formados por cadenas de azúcares que incluyen D-glucopiranosil (Glc) y/o xilopiranosil (Xyl). En este sentido, las variedades cultivadas A y B eran plantas con las características genéticas 1-8.

Un procedimiento para preparar un líquido de ensayo fue el siguiente: se pesaron 10,0 mg de cada una de las hojas secas liofilizadas de estevia en un vial de vidrio, al que se añadieron 1,0 ml de agua/metanol (1/1 vol/vol) como disolvente de extracción y, a continuación, el resultante se sometió a irradiación ultrasónica en un limpiador ultrasónico (AS ONE, AS52GTU) a una temperatura fija de 25 °C durante 20 minutos, obteniendo así extractos líquidos de glucósidos de esteviol de las hojas de estevia. El resultante se volvió a diluir 10 veces con agua/metanol y se filtró a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm (Nacalai tesque, filtro Cosmonice S (disolvente)) para someterlo a HPLC-MS.

Para la parte HPLC de HPLC-MS, se utilizó Nexera LC-30AD (Shimadzu Corporation) como bomba LC de la unidad de administración de líquidos, y SM-C18 (4,6 x 250 mm) (de Imtakt) como columna de separación. La administración de líquido de la fase móvil de LC se llevó a cabo utilizando agua Milli-Q con ácido acético al 0,2 % como fase móvil A y metanol como fase móvil B, donde el gradiente binario es el siguiente: la concentración de la fase móvil B se mantuvo constantemente al 10 % durante 0-5 minutos, se dejó pasar del 10 % al 70 % en los 15 minutos siguientes, luego se dejó pasar del 70 % al 100 % en los 5 minutos siguientes, y se mantuvo al 100 % durante 5 minutos al final. El caudal de la fase móvil fue de 0,4 ml/min y se inyectaron 5 µl del extracto líquido de hoja de estevia que se había diluido y filtrado con un filtro.

Para la parte de MS, se utilizó un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo LCMS-8030 (Shimadzu Corporation) equipado con una fuente de iones de ionización por electronebulización (ESI). La medición por espectrometría de masas se llevó a cabo en un modo de monitorización de iones seleccionados (SIM) seleccionando el modo de medición de iones negativos y los valores m/z. Los valores m/z se seleccionaron mediante un cálculo basado en los pesos moleculares de los glucósidos de esteviol formados por cadenas de azúcares que incluyen D-glucopiranosil (Glc) y/o xilopiranosil (Xyl). En consecuencia, se seleccionaron m/z = 965,3 (Glc (4)), 1097,4 (Glc (4), Xyl (1)), 1127,4 (Glc (5)), 1259,5 (Glc (5), Xyl (1)) y 1289,5 (Glc (6)). Es más, un reactivo de gran pureza y rebaudiósidos A, D y M que estaban disponibles también se midieron en las mismas condiciones para confirmar los valores m/z de los iones negativos y el tiempo de retención en HPLC. Las áreas de pico (unidad arbitraria) de los glucósidos de esteviol principalmente detectados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Áreas de pico observadas por medición SIM en HPLC-MS

valor m/z	965,3	1097,4	1127,4	1259,5	1289,5
Número de fracciones de azúcar	Gle (4)	Gle (4) Xyl (1)	Gle (5)	Gle (5) Xyl (1)	Gle (6)
Tiempo de retención	29,82	29,05	28,26	29,30	28,90
Nombre del compuesto / Nombre de la muestra	Reb A	Nuevo glucósido de esteviol 1E	Reb D	Nuevo glucósido de esteviol 2E	Reb M

(continuación)

valor m/z	965,3	1097,4	1127,4	1259,5	1289,5
Variedad de cultivo A	103.431.572	101.224	2.683.364	77.724	1.935.022
Variedad de cultivo B	41.706.992	82.333	3.975.990	42.787	2.966.927

La figura 2 muestra un cromatograma de iones seleccionado de la variedad cultivada A a m/z de 1097,4. En el cromatograma de iones seleccionado de un glucósido de esteviol (m/z 1097,4) se observó un pico de un peso molecular del que nunca se había informado, en el que la cadena de azúcar modificada contenía cuatro fracciones de glucosa (Glc) y una fracción de xilosa (Xyl). Específicamente, el pico a Tr 29,05 minutos mostrado en la Figura 2 era una sustancia desconocida. Esta sustancia se denominó provisionalmente "Nuevo glucósido de esteviol 1E". También se detectó un pico similar en la variedad cultivada B.

La figura 3 muestra un cromatograma de iones seleccionado de la variedad cultivada A a m/z de 1259,5. En el cromatograma de iones seleccionado de un glucósido de esteviol (m/z 1259,5) se observó un pico de un peso molecular del que nunca se había informado, en el que la cadena de azúcar modificada contenía cinco fracciones de glucosa (Glc) y una fracción de xilosa (Xyl). Específicamente, el pico a Tr 29,30 minutos mostrado en la Figura 3 era una sustancia desconocida. Esta sustancia se denominó provisionalmente "Nuevo glucósido de esteviol 2E". También se detectó un pico similar en la variedad cultivada B.

[Análisis estructural de nuevos glucósidos de esteviol]

De acuerdo con la presente invención, los análisis estructurales de los nuevos glucósidos de esteviol 1E y 2E detectados en las variedades cultivadas se realizaron mediante el siguiente procedimiento.

(i) Deducción estructural mediante un análisis de fragmentación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)-espectrometría de masas de alta resolución (MS), MS/MS, y fragmentación iónica en tres etapas (fragmentación MS^3).
(ii) Síntesis química de los productos estándar glucósidos de esteviol deducidos mediante reacción química.
(iii) Determinación estructural por coincidencia con el tiempo de retención y el patrón de fragmentación del producto estándar sintetizado químicamente en HPLC-EM de alta resolución y fragmentación MS^3.

En lo sucesivo en el presente documento, cada una de las etapas (i)-(iii) anteriores se describirá con detalle.

(i) Deducción estructural mediante un análisis de fragmentación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)espectrometría de masas de alta resolución (MS), MS/MS y fragmentación iónica en tres etapas (fragmentación MS^3)

Los líquidos de ensayo se prepararon del siguiente modo: se pesaron 10,0 mg de cada una de las hojas secas liofilizadas de estevia en un vial de vidrio, al que se añadieron 1,0 ml de agua/metanol (1/1 vol/vol) como disolvente de extracción y, a continuación, el resultante se sometió a irradiación ultrasónica en un limpiador ultrasónico (AS ONE, AS52GTU) a una temperatura fija de 25 °C durante 20 minutos, obteniendo así extractos líquidos de glucósidos de esteviol de las hojas de estevia. El resultante se volvió a diluir 10 veces con agua/metanol y se filtró a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm (Nacalai tesque, filtro Cosmonice S (sistema de disolvente)) para someterlo a HPLC-MS.

En una configuración de equipo para cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas de alta resolución con ionización por electronebulización (HPLC-ESI-HRMS), el equipo para HPLC se configuró utilizando Prominence LC-20AD (Shimadzu Corporation) como unidad de suministro de líquido bomba LC y SM-C18 (4,6 x 250 mm) (de Imtakt) como columna de separación. La fase móvil de LC se llevó a cabo utilizando agua Milli-Q con ácido acético al 0,2 % como fase móvil A y metanol como fase móvil B, donde el gradiente binario fue el siguiente: la concentración de la fase móvil B se mantuvo constantemente al 10 % durante 0-5 minutos, a continuación, se dejó pasar del 10 % al 70 % en los 15 minutos siguientes, y se dejó pasar del 70 % al 100 % en los 5 minutos siguientes. Al final, la concentración de la fase móvil B se mantuvo al 100 % durante 5 minutos. El caudal de la fase móvil fue de 0,4 ml/min y se inyectaron 20 µl del extracto líquido de hoja de estevia que se había diluido y filtrado después con un filtro. Para la parte de espectrometría de masas, se utilizó la MS Orbitrap Elite (de Thermo Fisher Scientific) equipada con una fuente de iones ESI. La medición por espectrometría de masas se llevó a cabo en un modo de medición de iones negativos a m/z en un intervalo de 150-2000 con una resolución fijada en 60.000. La medición MS/MS se llevó a cabo seleccionando el m/z objetivo de 1095,4 o 1257,5 y en un modo CID en el que la fragmentación se indujo por colisión con un gas inerte. El ion de mayor intensidad en el espectro MS/MS se seleccionó para MS^3. La irradiación de la energía necesaria para la fragmentación se realizó a la energía de colisión estándar exclusiva del aparato, es decir, 35.

Para estudiar los patrones de fragmentación de los nuevos glucósidos de esteviol 1E y 2E, muestras patrón, es decir, rebaudiósidos A, D y M, con estructuras conocidas se sometieron a análisis de patrones de MS/MS y fragmentación

MS^3. Como resultado, la MS/MS de los nuevos glucósidos de esteviol arrojó datos que mostraban que la mayor intensidad iónica aparecía en el pico en el que se liberaban todas las cadenas de azúcar unidas a C-19 mediante un enlace éster. Este resultado representa el peso molecular total de las cadenas de azúcar unidas al carbono de C-19 mediante un enlace éster.

Los espectros de masas MS/MS y fragmentados MS^3 del nuevo glucósido de esteviol 1E (correspondiente a m/z 1097,4, Tr: 29,05) se muestran en la figura 4. En el espectro MS/MS del nuevo glucósido de esteviol, el pico principal se detectó a m/z de 803,37 correspondiente a la liberación de una fracción de Glc y una fracción de Xyl. A partir de este resultado, el número de cadenas de azúcar unidas al carbono de C-19 mediante un enlace éster resultó ser de una fracción de Glc y una fracción de Xyl. Para obtener más información estructural, se adquirió un espectro MS^3 fragmentando el pico principal a m/z de 803,4 obtenido por MS/MS. Como resultado, se adquirió un espectro con el mismo patrón de picos que el espectro MS^3 del rebaudiósido A (965,4→803,4→). En consecuencia, se supuso que las cadenas de azúcar unidas a C-13 eran las mismas que las del rebaudiósido A. La estructura deducida se muestra en la Figura 4.

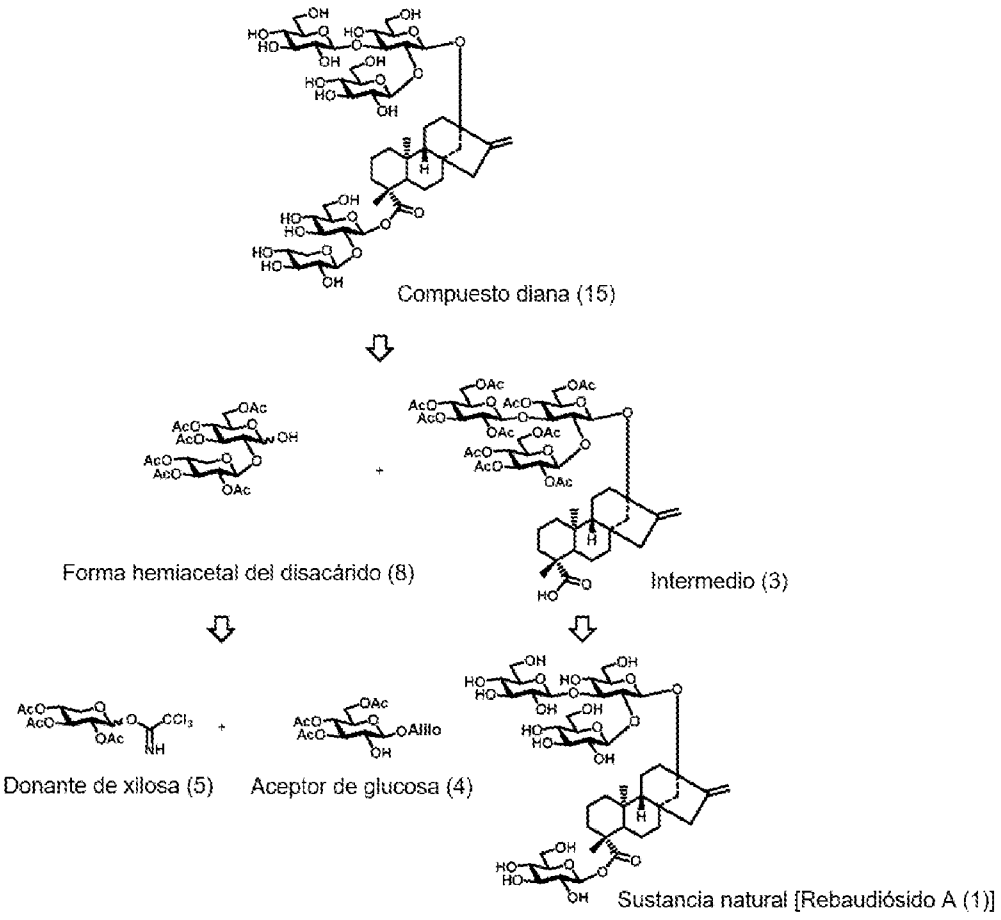
Los espectros de masas MS/MS y fragmentados MS^3 del nuevo glucósido de esteviol 2E (correspondiente a m/z 1259,5, Tr: 29,30) se muestran en la figura 5. En el espectro MS/MS del nuevo glucósido de esteviol, el pico principal se detectó a m/z de 773,36, correspondiente a la liberación de tres moléculas de Glc. A partir de este resultado, el número de cadenas de azúcar unidas al carbono de C-19 mediante un enlace éster resultó ser de tres fracciones de Glc. Para obtener más información estructural, se adquirió un espectro MS^3 fragmentando el pico principal a m/z de 773,4 obtenido por MS/MS. Como resultado, se adquirió un espectro que tiene el mismo patrón de picos que el espectro MS^3 del rebaudiósido F (935,4→773,4→). En consecuencia, se supuso que las cadenas de azúcar unidas a C-13 eran las mismas que las del rebaudiósido F. La estructura deducida se muestra en la Figura 5.

(ii) Síntesis química de los productos estándar de glucósidos de esteviol deducidos (nuevos glucósidos de esteviol 1S y 2S) mediante reacción química

[Síntesis del nuevo glucósido de esteviol 1S]

(1) Esquema de las vías de síntesis

Esquema 1: Estrategia de síntesis del nuevo glucósido de esteviol 1S



Como puede apreciarse a partir del Esquema 1, para la síntesis del nuevo glucósido de esteviol 1S (compuesto de referencia 15), el intermediario (3) y la forma hemiacetal del disacárido (8) se condensaron mediante una reacción de Mitsunobu para obtener la columna vertebral del nuevo glucósido de esteviol 1S (compuesto de referencia 15). Para la síntesis del intermediario (3), el enlace éster en C-19 del esteviol de la sustancia natural conocida, es decir, rebaudiósido A (1), se sometió a hidrólisis alcalina y, a continuación, los grupos hidroxi de la cadena de azúcares se protegieron con grupos acetilo (Ac) para obtener el intermedio (3). Para la síntesis de la forma hemiacetal del disacárido (8), se produjo una estructura principal del disacárido mediante una reacción de condensación entre un aceptor de glucosa (4) adecuadamente protegido y un donante de xilosa (5), y se desprotegió el grupo protector en el carbono anomérico del extremo reductor para dar la forma hemiacetal del disacárido (8). El intermedio resultante (3) y la forma hemiacetal del disacárido (8) se sometieron a condensación mediante una reacción de Mitsunobu, donde la reacción se produjo con un rendimiento de hasta el 79 % (sólo β) con una selectividad β completa. Se desprotegieron los grupos protectores del compuesto resultante, obteniendo así el nuevo glucósido de esteviol 1S (compuesto de referencia 15).

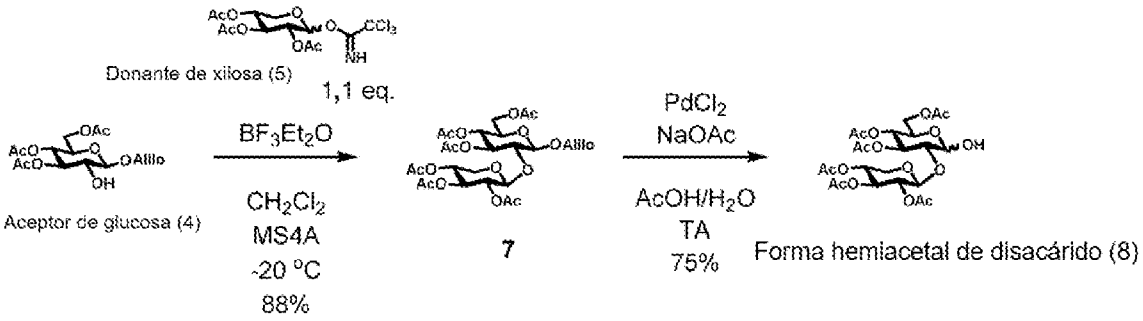
A continuación, se describirá cada una de las etapas de la síntesis.

(2) Síntesis del intermedio (3)

El intermedio (3) se sintetizó según el método descrito en el documento WO2018/181515.

(3) Síntesis de la forma hemiacetal del disacárido

Esquema 2: Síntesis de la forma hemiacetal del disacárido (8)



Como puede apreciarse a partir del Esquema 2, para la síntesis de la forma hemiacetal del disacárido (8), se disolvieron un aceptor de glucosa (4) (40,0 g, 115 mmol), un donante de xilosa (5) (53,4 g, 127 mmol) y tamices moleculares de 4Å (60 g) en diclorometano (1.2 L), al que se añadió un complejo de trifluoruro de boro y éter dietílico (1,46 ml, 11,5 mmol) a -20 °C, y el resultante se agitó a -20 °C durante una hora. Tras confirmar la finalización de la reacción mediante TLC (acetato de etilo/hexano = 1/1, valor Rf = 0,2), el resultante se neutralizó con trietilamina (2,0 ml) (pH 8), y los tamices moleculares de 4Å se eliminaron por filtración. El resultante se concentró a presión reducida para obtener jarabe, que se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice para dar el Compuesto 7 (61,2 g, 88 %) en el eluido (acetato de etilo/hexano = 1/1).

Los espectros de RMN se determinaron para RMN ^{1}H y RMN ^{13}C utilizando el "espectrómetro AVANCE III HD 400" fabricado por Bruker. El disolvente y las frecuencias utilizados para las determinaciones fueron los siguientes. Se utilizó el mismo aparato para determinar los espectros de RMN de otros compuestos descritos a continuación.

[Compuesto 7]

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 2,01-2,10 (complejo, 18H, OAc), 3,35 (dd, 1H), 3,68 (m, 1H), 3,73 (t, 1H), 4,13-4,27 (complejo, 4H), 4,38 (m, 1H), 4,48 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 4,74 (d, J = 6,4 Hz, 1H), 4,86 (t, 1H), 4,90-4,99 (complejo, 2H), 5,09 (t, 1H), 5,35 (d, 1H), 5,91 (m, 1H); RMN^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 20,6× 2, 20,7× 2, 20,8× 2, 61,9, 62,0, 68,7, 68,9, 70,5, 70,7, 71,2, 71,5, 74,5, 98,9, 100,3, 117,8, 133,4, 169,4, 169,7, 170,0, 170,7.

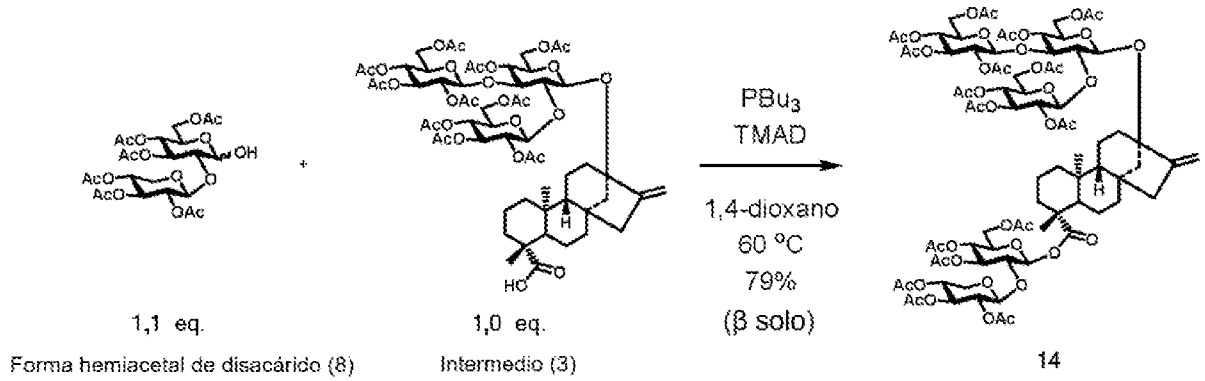
El compuesto 7 (2,3 g, 3,8 mmol) se disolvió en ácido acético (100 ml) y agua (10 ml), a lo que se añadió cloruro de paladio (1,2 g, 6,8 mmol) a temperatura ambiente, y el resultante se agitó en atmósfera de argón a temperatura ambiente durante 18 horas. Tras confirmar la finalización de la reacción mediante TLC (cloroformo de/ acetato de etilo = 2/1, valor Rf = 0,2), el cloruro de paladio se eliminó por filtración. El resultante se concentró a presión reducida para obtener jarabe, que se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice para dar la forma hemiacetal del disacárido (8) (1,6 g, 75 %) en el eluido (cloroformo/acetato de etilo = 2/1).

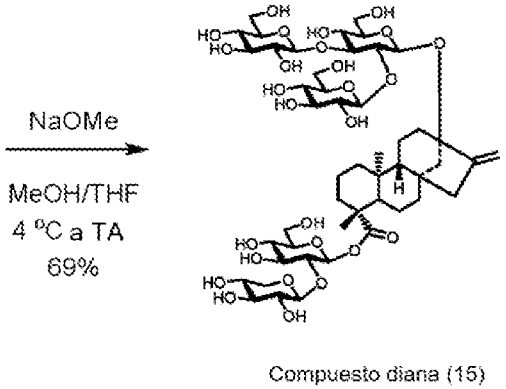
[Forma hemiacetal del disacárido (8)]

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 2,00-2,15 (complejo, 27H, OAc), 3,31-3,39 (complejo, 2H), 3,53-3,79 (complejo, 3H), 3,86 (d, J = 2,8 Hz, 1H), 4,06-4,33 (complejo, 6H), 4,58 (d, J = 7,2 Hz, 1H), 4,83-5,06 (complejo, 5H), 5,09-5,22 (complejo, 2H), 5,35 (m, 1H), 5,45 (t, 1H); RMN^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 20,4, 20,5, 20,6× 2, 20,7× 2, 61,9, 62,2, 67,2, 68,3×2, 68,5, 68,7, 70,7, 71,4, 71,5, 76,7, 92,0, 101,6, 169,5, 169,7, 169,8×2, 170,1, 170,7.

(4) Síntesis del compuesto de referencia 15

Esquema 3: Síntesis del nuevo glucósido de esteviol 1S





Como puede apreciarse a partir del Esquema 3, para la síntesis del compuesto 14, la forma hemiacetal del disacárido (8) (9,4 g, 16,7 mmol) y el intermedio (3) (18,6 g, 15,1 mmol) se disolvieron en 1,4-dioxano (150 ml), al que se añadieron tributilfosfina (14,9 ml, 60,6 mmol) y 1,1 -azobis(N,N'-dimetilformamida) (TMAD) (10,4 g, 60,6 mmol) a temperatura ambiente y el resultante se agitó a 60 °C durante una hora. Tras confirmar la finalización de la reacción mediante TLC (tolueno/acetato de etilo = 3/2, valor Rf = 0,2), el resultante se diluyó con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua, una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y solución salina saturada, y se seca con sulfato de magnesio. El sulfato de magnesio se eliminó por filtración. El resultante se concentró a presión reducida para obtener jarabe, que se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice para dar el Compuesto 14 (21,1 g, 79 %) en el eluido (tolueno/acetato de etilo = 3/2).

[Compuesto 14]

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 0,75-1,32 (complejo, 13H), 1,37-2,32 (complejo, 77H), 3,36 (t, 1H), 3,50-3,72 (complejo, 4H), 3,75-4,29 (complejo, 14H), 4,41 (m, 1H), 4,52-4,65 (complejo, 2H), 4,77-5,27 (complejo, 20H), 5,62 (d, J = 7,6 Hz, 1H); RMN-^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 16,3, 19,3, 20,3, 20,4, 20,5×2, 20,6×3, 20,7×3, 20,9, 21,2, 21,3, 28,9, 36,5, 36,8, 39,3, 40,3, 41,1, 42,6, 43,3, 43,8, 45,1, 47,2, 53,5, 57,3, 60,3, 61,1, 61,7, 62,0, 62,6, 67,9, 68,0, 68,1, 68,3, 68,7, 70,6, 71,4, 71,6, 71,7, 71,8, 72,1, 72,9, 73,0, 74,7, 80,1, 85,8, 85,9, 91,2, 96,2, 98,9, 99,2, 100,9, 104,5, 125,2, 128,1, 128,7, 152,7, 168,9, 169,2, 169,3×2, 169,6, 169,7, 169,9, 170,0×2, 170,3×2, 170,5, 170,7, 174,5.

El compuesto (14) (20,0 g, 11,3 mmol) se disolvió en metanol (100 ml) y THF (100 ml), a los que se añadió metóxido sódico (0,5M en metanol) (25 ml) a 4 °C y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante una hora. Tras confirmar la finalización de la reacción mediante TLC (cloroformo/metanol/agua = 5/ 4/0,1, valor Rf = 0,1), el resultante se neutralizó añadiendo Amberlite 120B (H). El resultante se concentró a presión reducida para obtener jarabe, que se sometió a columna de filtración en gel (GE Healthcare, Sephadex LH-20, etanol) para dar el Compuesto de

Referencia 15 (10,2 g, 69 %).

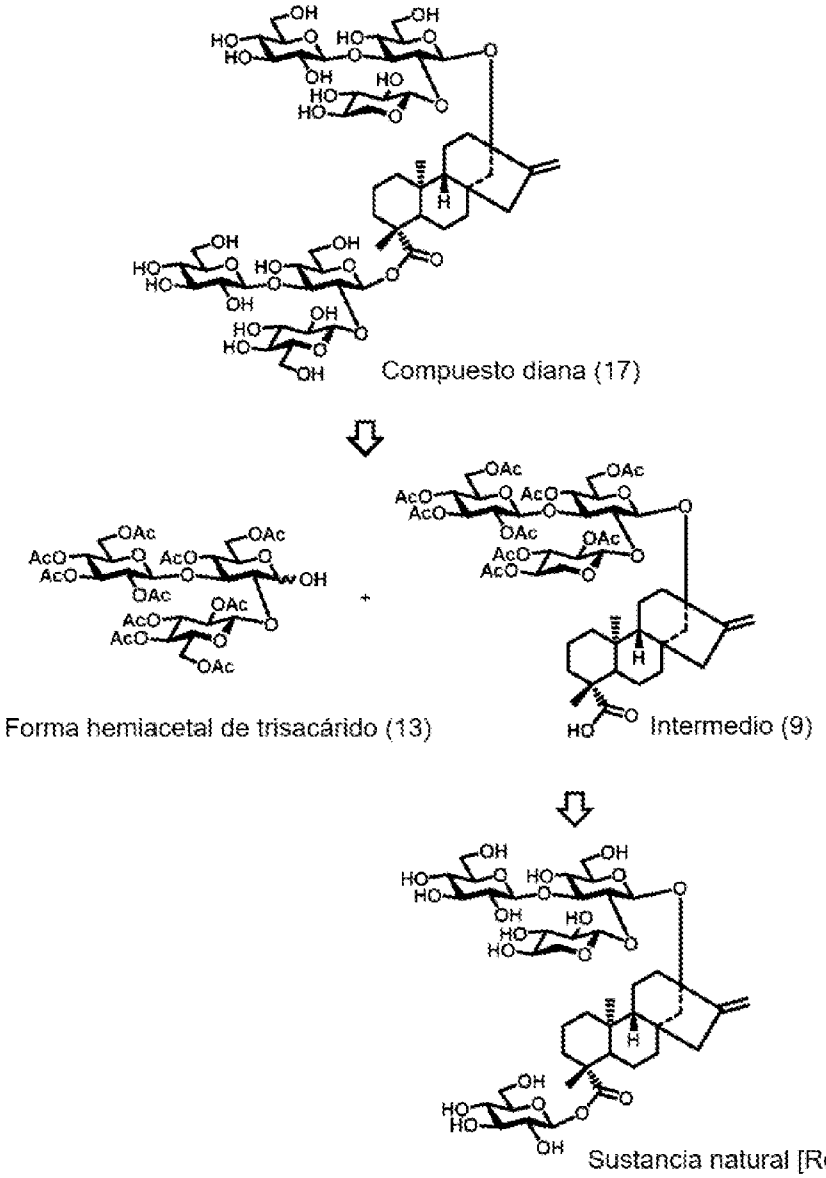
[Compuesto de referencia 15]

RMN ^{1}H (piridina-d5, 400 MHz) δ 0,70 (m, 1H), 0,88 (m, 1H), 0,91-1,40 (complejo, 10H), 1,51-2,21 (complejo, 14H), 2,43-2,55 (complejo, 2H), 3,59-3,70 (complejo, 2H), 3,77-4,51 (complejo, 36H), 4,91 (s, 1H), 5,03 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 5,20 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 5,35 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 5,52 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 5,61 (m, 1H), 6,16 (d, J = 7,6 Hz, 1H); RMN ^{13}C (piridina-d5, 100 MHz) δ 17,1, 20,4, 21,0, 22,9, 29,4, 38,1, 38,6, 40,2, 41,1, 42,3, 42,6, 44,4, 44,8, 45,9, 48,2, 54,5, 57,9, 62,6, 62,8×2, 63,8, 67,9, 70,4, 71,3, 71,6, 72,1, 72,8, 75,9, 76,3, 76,9, 77,9, 78,5, 78,7, 78,8, 79,0, 79,1, 79,5, 81,5, 82,3, 87,3, 88,6, 94,1, 98,2, 105,0, 105,1, 105,3, 107,1, 154,4, 176,4.

[Síntesis del nuevo glucósido de esteviol 2S]

(1) Esquema de las vías de síntesis

Esquema 4: Estrategia de síntesis del nuevo glucósido de esteviol 2S



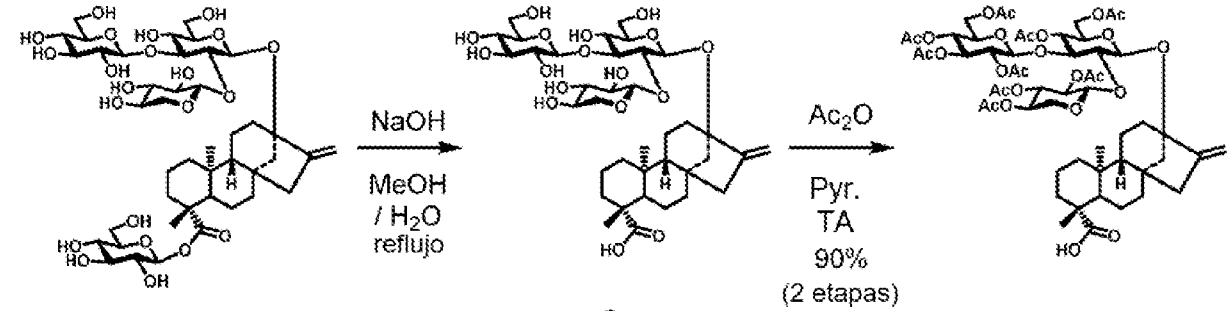
Como puede apreciarse a partir del Esquema 4, para la síntesis del nuevo glucósido de esteviol 2S (17), el intermedio (9) y la forma hemiacetal del trisacárido (13) se condensaron mediante una reacción de Mitsunobu para obtener la estructura principal del nuevo glucósido de esteviol 2S (17). Para la síntesis del intermediario (9), el enlace éster en C-19 del esteviol de la sustancia natural conocida, es decir, rebaudiósido F (2), se sometió a hidrólisis alcalina y, a continuación, los grupos hidroxi de la cadena de azúcares se protegieron con grupos acetilo (Ac) para obtener el

intermedio (9). El intermedio resultante (9) y la forma hemiacetal del trisacárido (13) se sometieron a condensación mediante una reacción de Mitsunobu, donde la reacción se produjo con un rendimiento de hasta el 53 % (sólo β) con una selectividad β completa. Se desprotegieron los grupos protectores del compuesto resultante, obteniendo así el nuevo glucósido de esteviol 2S (17).

A continuación, se describirá cada una de las etapas de la síntesis.

(2) Síntesis del intermedio (9)

Esquema 5: Síntesis del intermedio (9)



Sustancia natural [Rebaudiósido F (2)] 6 Intermedio (9)

Como puede apreciarse a partir del Esquema 5, para la síntesis del intermedio (9), el rebaudiósido F (2) (1,8 g, 1,9 mmol) se disolvió en metanol (20 ml) y agua (10 ml), a lo que se añadió hidróxido sódico 2 mol/l (10 ml) a temperatura ambiente, y el resultante se sometió a reflujo a 100 °C durante 3 horas. Tras confirmar la finalización de la reacción mediante TLC (cloroformo/metanol = 4/1, valor Rf = 0,2), la solución de reacción se neutralizó con Amberlite 120B (H) (pH 7). Una vez eliminada la resina por filtración, el resultante se concentró a presión reducida para dar el Compuesto 6 (2,1 g)

El compuesto 6 (2,1 g) se disolvió en piridina (20 ml), a la que se añadió anhídrido acético (3,6 ml) a temperatura ambiente, y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 24 horas. Tras confirmar la finalización de la reacción mediante TLC (cloroformo/metanol = 50/1, valor Rf = 0,2), se añadió una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato sódico (40 ml) a 0 °C y se repitió la extracción tres veces con acetato de etilo. La capa orgánica se concentró a presión reducida para obtener jarabe, que se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice para dar el intermedio 9 (2,0 g, 90 % (2 etapas)) en el eluido (cloroformo/metanol = 50/1).

[Intermedio 9]

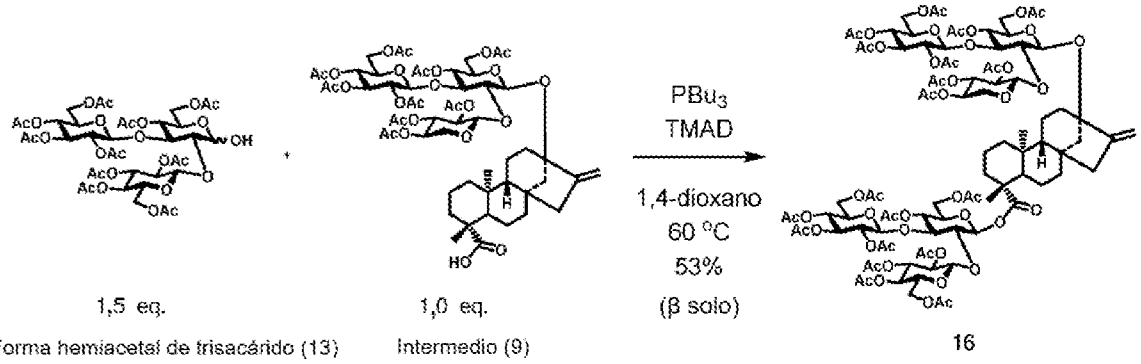
RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 0,81 (s, 1H), 0,89-1,12 (complejo, 8H), 1,22 (s, 3H), 1,41-2,22 (complejo, 50H), 3,49 (dd, 1H), 3,58 (m, 1H), 3,65 (m, 1H), 3,85 (t, 1H), 3,96-4,15 (complejo, 4H), 4,42 (m, 2H), 4,56 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 4,81-4,94 (complejo, 6H), 5,00 (t, 1H), 5,04-5,14 (complejo, 3H), 5,25 (t, 1H); RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 16,0, 17,3, 19,1, 20,5, 20,6, 20,7, 20,8×2, 20,9, 21,8, 29,1, 29,8, 37,9, 38,0, 39,5, 40,7, 41,5, 42,2, 43,8, 44,0, 48,4, 53,8, 56,8, 61,7, 63,1, 66,8, 68,0, 68,7, 68,8, 69,7, 71,0, 71,6, 71,9, 72,4, 72,8, 81,3, 87,3, 96,6, 96,8, 99,2, 105,6, 151,9, 169,0, 169,5, 169,6, 170,1×2, 170,3, 170,6, 170,9, 171,0, 182,5.

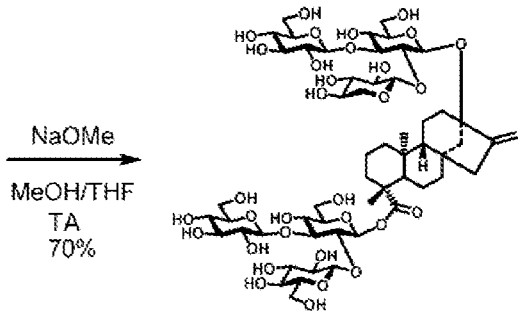
(3) Síntesis de la forma hemiacetal del trisacárido

La forma hemiacetal del trisacárido se sintetizó según el método descrito en el documento WO2018/181515.

(4) Síntesis del compuesto 17

Esquema 6: Síntesis del nuevo glucósido de esteviol 2S (compuesto 17)





Compuesto diana (17)

Como puede apreciarse a partir del Esquema 6, para la síntesis del compuesto 16, la forma hemiacetal del trisacárido (13) (2,4 g, 2,6 mmol) y el intermedio (9) (2,0 g, 1,7 mmol) se disolvieron en 1,4-dioxano (20 ml), al que se añadieron tributilfosfina (4,3 ml, 17,3 mmol) y 1,1 -azobis(N,N'-dimetilformamida) (TMAD) (3,0 g, 17,3 mmol) a temperatura ambiente y el resultante se agitó a 60 °C durante 2 horas. Tras confirmar la finalización de la reacción mediante TLC (acetato de etilo/ heptano = 2/1, valor Rf = 0,1), el resultante se diluyó con acetato de etilo. La capa orgánica se lavó con agua, una solución acuosa saturada de hidrogenocarbonato de sodio y solución salina saturada, y se seca con sulfato de magnesio. El sulfato de magnesio se eliminó por filtración. El resultante se concentró a presión reducida para obtener jarabe, que se sometió a cromatografía en columna de gel de sílice para dar el Compuesto 16 (1,9 g, 53 %, sólo β) en el eluido (acetato de etilo/ heptano = 2/1).

[Compuesto 16]

RMN ^{1}H ($CDCl_3$, 400 MHz) δ 0,78-1,05 (complejo, 9H), 1,25 (t, 4H), 1,36-2,31 (complejo, 86H), 3,51 (dd, 1H), 3,59 (m, 1H), 3,61-3,78 (complejo, 4H), 3,81 (t, 1H), 3,91-4,21 (complejo, 11H), 4,31 (dd, 1H), 4,40-4,59 (complejo, 4H), 4,73-5,29 (complejo, 21H), 5,60 (d, J = 7,2 Hz, 1H); RMN-^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz) δ 16,8, 17,5, 19,5, 20,5, 20,7×3, 20,8×3, 20,9×3, 21,0, 21,1×2, 21,5, 29,2, 37,4, 37,5, 39,6, 40,5, 41,6, 42,5, 43,8, 44,2, 48,1, 53,8, 57,4, 61,7, 62,0, 62,1, 62,3, 63,1, 66,7, 67,4, 68,0, 68,3, 68,4, 68,6, 68,8, 69,7, 71,1, 71,5, 71,8, 71,9, 72,0, 72,2, 72,3, 72,4, 72,9, 73,1, 75,0, 80,1, 81,5, 86,8, 91,3, 96,4, 97,0, 99,2, 99,3, 99,6, 104,9, 152,8, 169,0, 169,1, 169,3, 169,5×2, 169,6, 170,1×2, 170,2× 3, 170,5, 170,6, 170,9, 174,8.

El compuesto (16) (2,2 g, 1,1 mmol) se disolvió en metanol (10 ml) y THF (10 ml), a los que se añadió metóxido sódico (0,5M en MeOH) (2,5 ml) a temperatura ambiente y el resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 horas. Tras confirmar la finalización de la reacción mediante TLC (cloroformo/metanol/agua = 5/ 4/1, valor Rf = 0,4), el resultante se neutralizó con Amberlite 120B (H) (pH 7). Una vez eliminada la resina por filtración, el resultante se concentró a presión reducida, que se disolvió en MeCN/H_2O = 1/2 y se liofilizó para dar el Compuesto 17 (1,0 g, 70 %).

[Compuesto 17]

RMN ^{1}H (piridina-d5, 400 MHz) δ 0,78 (m, 1H), 0,91 (m, 1H), 1,08 (m, 1H), 1,31-1,48 (complejo, 9H), 1,62-1,80 (complejo, 3H), 1,81-1,89 (complejo, 3H), 2,00-2,06 (complejo, 2H), 2,29 (m, 3H), 2,47 (m, 1H), 2,69 (m, 1H), 2,80 (m, 1H), 3,41 (t, 1H), 3,81 (m, 1H), 3,90-4,41 (complejo, 33H), 4,53-4,61 (complejo, 2H), 4,70 (m, 1H), 4,88-5,22 (complejo, 14H), 5,30 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 5,37 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 5,51-5,57 (complejo, 2H), 5,61 (s, 1H), 5,77 (s, 2H), 5,84 (d, J = 7,6 Hz, 1H), 6,46 (d, J = 8,0 Hz, 1H); RMN ^{13}C (piridina-d5, 100 MHz) δ 18,3, 21,2, 21,7, 25,1, 29,8, 39,9, 41,3, 41,7, 42,5, 44,2, 44,7, 45,8, 47,9, 55,9, 58,9, 63,3, 63,5, 63,6, 64,2, 65,6, 68,5, 71,7, 72,2, 72,6, 72,9, 75,2, 76,9, 77,0, 77,2,

78,4, 79,2, 79,3, 79,4, 79,5, 79,6, 79,9, 80,0, 80,6, 83,7, 89,2, 89,5, 90,2, 96,5, 97,7, 105,4, 105,7, 105,9, 106,4, 107,3, 154,9, 178,5.

(iii) Determinación estructural por coincidencia con el tiempo de retención y el patrón de fragmentación del producto estándar sintetizado químicamente en HPLC-EM de alta resolución y fragmentación MS^3

El producto sintetizado químicamente del nuevo glucósido de esteviol 1 (forma β del compuesto de referencia 15) y el extracto líquido de hoja de estevia se compararon mediante HPLC-alta resolución MS/MS y fragmentación MS^3 utilizando Orbitrap Elite MS (de Thermo Fisher Scientific) equipado con una fuente de iones HPLC-ESI en las condiciones descritas en (i). Como resultado, los picos del producto sintetizado químicamente y del extracto líquido de hoja de estevia se detectaron en el tiempo de retención de 29,34 y 29,37 minutos, respectivamente (figura 10). En este caso, los picos en el tiempo de retención de 29,34 y 29,37 minutos en la Figura 10 correspondían al pico en el tiempo de retención de 29,05 minutos en la Figura 2, lo que se confirmó determinando el tiempo de retención del producto sintetizado químicamente con el aparato utilizado en la Figura 2 (LCMS-8030). Asimismo, también coincidían en los respectivos espectros de masas MS/MS y fragmentados MS^3 (Figura 11). A partir de este resultado, se confirmó que el nuevo glucósido de esteviol 1E obtenido del extracto líquido de la planta tenía la misma estructura que la forma β del compuesto de referencia 15.

Es más, el producto sintetizado químicamente del nuevo glucósido de esteviol 2 (forma β del compuesto de referencia 17) y el extracto líquido de hoja de estevia se compararon mediante HPLC-alta resolución MS/MS y fragmentación MS^3 utilizando Orbitrap Elite MS (de Thermo Fisher Scientific) equipado con una fuente de iones HPLC-ESI en las condiciones descritas en (i). Como resultado, los picos del producto sintetizado químicamente y del extracto líquido de hoja de estevia se detectaron en el tiempo de retención de 29,67 y 29,68 minutos, respectivamente (figura 12). En este caso, los picos en el tiempo de retención de 29,67 y 29,68 minutos en la Figura 12 correspondían al pico en el tiempo de retención de 29,30 minutos en la Figura 3, lo que se confirmó determinando el tiempo de retención del producto sintetizado químicamente con el aparato utilizado en la Figura 3 (LCMS-8030). Asimismo, también coincidían en los respectivos espectros de masas MS/MS y fragmentados MS^3 (Figura 13). A partir de este resultado, se confirmó que el nuevo glucósido de esteviol 2E obtenido del extracto líquido de la planta tenía la misma estructura que la forma β del compuesto 17.

Evaluación del nivel de dulzor de nuevos glucósidos de esteviol

Para evaluar los niveles de dulzor de los nuevos glucósidos de esteviol A y B, las muestras se prepararon añadiendo azúcar al agua pura para obtener Brix de 3,0 a 5,0 en incrementos de 0,5. El compuesto de referencia 15 y el compuesto 17 obtenidos mediante síntesis química se utilizaron como glucósido de esteviol de referencia A y glucósido de esteviol nuevo B, respectivamente, donde 48 mg de cada muestra se disolvieron en 400 ml de agua pura a ensayar. Además, las muestras también se prepararon para comparar disolviendo 48 mg de cada uno de Reb.A, Reb.D y Reb.M en 400 ml de agua pura.

(1) Evaluación del nivel de dulzor del glucósido de esteviol A de referencia

La evaluación se llevó a cabo eligiendo una muestra añadida con azúcar que tuviera una intensidad de dulzor equivalente a la de la muestra añadida con el glucósido de esteviol de referencia, donde la evaluación sensorial corrió a cargo de panelistas que habían recibido formación sobre los atributos sensoriales de los edulcorantes (7 miembros). Como resultado, se descubrió que el glucósido de esteviol A de referencia tenía un nivel de dulzor aproximadamente 354 veces superior de media al del azúcar.

Tabla 2: Evaluación del nivel de dulzor del glucósido de esteviol A de referencia

Nivel de dulzor	Glucósido de esteviol A de referencia	Reb A	Reb D	Reb M
Más bajo	319,0	243,0	253,5	286,0
Más alto	415,8	398,9	398,0	352,2
Promedio	354,1	312,0	317,9	341,1

(2) Evaluación del nivel de dulzor del glucósido de esteviol B nuevo

El nivel de dulzor se evaluó de la misma manera que el glucósido de esteviol A de referencia. Como resultado, se descubrió que el glucósido de esteviol B nuevo de la presente invención tenía un nivel de dulzor que era aproximadamente 250 veces superior de media al del azúcar. Los resultados se muestran en la tabla a continuación.

Tabla 3: Evaluación del nivel de dulzor del glucósido de esteviol B nuevo

Nivel de dulzor	Glucósido de esteviol B nuevo	Reb A	Reb D	Reb M
Más bajo	223,6	239,5	241,1	236,5
Más alto	299,2	329,2	393,6	373,4
Promedio	249,6	288,3	310,3	323,6

Evaluación sensorial del glucósido de esteviol A de referencia (Compuesto de referencia 15)

Para evaluar la calidad gustativa de diversos glucósidos de esteviol, Reb. A, Reb. D, Reb. M, azúcar y el glucósido de esteviol A de referencia (compuesto de referencia 15) se añadieron al agua pura para preparar muestras de bebida. Todas las muestras de bebida se ajustaron para tener un nivel final de dulzor (Brix) de 5 en términos de azúcar (sacarosa), y por tanto los niveles de dulzor de Reb. A, Reb. D, Reb. M y el glucósido de esteviol A de referencia (Compuesto 15 de referencia) fueron 312, 317, 341 y 354, respectivamente.

Las muestras de bebida resultantes se sometieron a una evaluación sensorial para calificar los atributos, que eran la dulzura en el momento, regusto dulce persistente, amargor y regusto amargo persistente. Los panelistas que habían recibido formación sobre los atributos sensoriales de los edulcorantes (7 miembros) evaluaron basándose en los siguientes criterios de evaluación. Para cada elemento de evaluación, los glucósidos de esteviol se puntuaron en incrementos de 0,5 siempre que la puntuación del azúcar fuera 3. Una puntuación más alta representa un dulzor en el momento más rápido, regusto dulce persistente más corto, menos amargor y regusto amargo persistente más breve. Los resultados se muestran en la Figura 14. Las puntuaciones de evaluación que figuran en el diagrama son las puntuaciones promedio de las puntuaciones de los 8 panelistas. Como resultado de las evaluaciones sensoriales, se observó que el glucósido de esteviol de referencia A tenía menos dulzor y un regusto amargo más breve que otros glucósidos, y menos amargor que otros componentes, incluido el azúcar.

Evaluación sensorial del glucósido de esteviol B nuevo (compuesto 17)

Para evaluar la calidad gustativa de diversos glucósidos de esteviol, Reb. A, Reb. D, Reb. M, azúcar y el glucósido de esteviol B nuevo (compuesto de referencia 17) se añadieron al agua pura para preparar muestras de bebida. Todas las muestras de bebida se ajustaron para tener un nivel final de dulzor (Brix) de 5 en términos de azúcar (sacarosa), y por tanto los niveles de dulzor de Reb. A, Reb. D, Reb. M y el glucósido de esteviol B nuevo (compuesto 17) fueron 288, 310, 324 y 250, respectivamente.

Las muestras de bebida resultantes se sometieron a una evaluación sensorial para calificar los atributos, que eran la dulzura en el momento, regusto dulce persistente, amargor y regusto amargo persistente. Los panelistas que habían recibido formación sobre los atributos sensoriales de los edulcorantes (7 miembros) evaluaron basándose en los siguientes criterios de evaluación. Para cada elemento de evaluación, los glucósidos de esteviol se puntuaron en incrementos de 0,5 siempre que la puntuación del azúcar fuera 3. Una puntuación más alta representa un dulzor en el momento más rápido, regusto dulce persistente más corto, menos amargor y regusto persistente más breve. Los resultados se muestran en la Figura 15. Las puntuaciones de evaluación que figuran en el diagrama son las puntuaciones promedio de las puntuaciones de los 6 panelistas. Como resultado de las evaluaciones sensoriales, Se observó que el glucósido de esteviol B nuevo era menos amargo que otros glucósidos.

Identificación de las características genéticas de la planta que contiene los glucósidos de esteviol de referencia A y el glucósido de esteviol B nuevo

Líneas ricas en glucósidos de esteviol de referencia A y en el glucósido de esteviol B nuevo (Mutantes: Variedades de cultivo líneas A y B) y líneas con contenidos reducidos de glucósidos de esteviol de referencia A y glucósidos de esteviol de referencia B (tipo silvestre: Variedades de cultivo líneas X e Y) se utilizaron para identificar las características genéticas específicas de las líneas ricas en glucósidos de esteviol de referencia A y el glicósido de esteviol B nuevo. Cuando se secuenciaron los genomas de las líneas respectivas, las líneas ricas en glucósidos de esteviol de referencia A y el glucósido de esteviol B nuevo presentaban sustituciones en las bases 298ª, 328ª, 360ª, 386ª, 393ª, 411ª, 427ª y 453ª de SEQ ID NO:1, inserción de 15 bases entre las bases 90ª y 91ª de la SEQ ID NO:57, y sustituciones en las bases 98ª, 102ª, 111ª, 113ª, 116ª, 119ª y 122ª de la SEQ ID NO:59 con respecto a los tipos silvestres (las secuencias de nucleótidos de las líneas mutantes correspondientes a las SEQ ID NOS:1, 57 y 59 se muestran como SEQ ID NOS:2, 58 y 60, respectivamente). Además, se observó que las sustituciones en la SEQ ID NO:1, la inserción en la SEQ ID NO:57 y las sustituciones en la SEQ ID NO:59 existían en los intrones de los genes que codifican la proteína que incluye las secuencias de aminoácidos representadas por SEQ ID NOS:53, 61 y 63, respectivamente, en el presente documento, a veces denominados P1, P2 y P3). Posteriormente, se examinó si estas mutaciones afectaban o no al nivel de expresión de cada gen. Después de 100 mg de las hojas expandidas de las variedades cultivadas A, B, X (SR001) e Y (SS075-49) se trituraron criogénicamente con nitrógeno líquido, el ARN total se extrajo con el RNAeasy Plant mini kit de QIAGEN siguiendo el protocolo del fabricante. Se utilizaron 500 ng del ARN total extraído para la transcripción inversa. Para la transcripción inversa, el ADNc se sintetizó utilizando

SuperScript IV VILO fabricado por Thermo Fisher Scientific de acuerdo con el protocolo del fabricante. Se realizó una PCR semicuantitativa utilizando 1 µl de una dilución 10 veces mayor de la solución de reacción de transcripción inversa. La PCR semicuantitativa se llevó a cabo con Ampdirect fabricado por Shimadzu Corporation siguiendo el protocolo del fabricante. La reacción de PCR se realizó por desnaturalización térmica a 95 °C durante 10 minutos, seguido de 32, 33 y 28 ciclos de reacciones a 94 °C durante 30 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 25 segundos, para "P3", "P1 y P2" y "actina y ubiquitina como controles", respectivamente. La reacción de PCR fue seguida de electroforesis utilizando LabChip GX Touch fabricado por PerkinElmer según el protocolo del fabricante.

Se utilizaron los siguientes cebadores para la PCR semicuantitativa.

C1

Directo: CCTGTTCATTACAAATTCAACCCG (SEQ ID NO:55)
Inverso: AACCCTAACATGTTCAATGTCCCTA (SEQ ID NO:56)

P2

Directo: ATCAGATTTATCATCTTGCATGCCC (SEQ ID NO:65)
Inverso: TGCCAATTACATTCGTCTTAATCGT (SEQ ID NO:66)

P3

Directo: AAAAGTTGCTGGTTGAAGTTGATCA (SEQ ID NO:67)
Inverso: CACACTAAATATGCTTGGTCTTGC (SEQ ID NO:68)

Actina

Directo: CGCCATCCTCCGTCTTGATCTTGC (SEQ ID NO:69)
Inverso: CCGTTCGGCGGTGGTGGTAA (SEQ ID NO:70)

Ubiquitina

Directo: TCACTCTTGAAGTGGAGAGTTCCGA (SEQ ID NO:71)
Inverso: GCCTCTGTTGGTCCGGTGGG (SEQ ID NO:72)

Los resultados del análisis de expresión se muestran en la Figura 16 y en la Tabla 4. Los valores numéricos mostrados en la Tabla 4 son las intensidades de banda relativas de los genes P1-P3 con respecto a la intensidad de banda del gen de la ubiquitina, es decir, 100, en la imagen de electroforesis mostrada en la Figura 16.

Tabla 4: Niveles de expresión de los genes P1-P3 en cada cultivo

Nombre de la muestra	C1	P2	P3
Variedad de cultivo A	146,27	126,23	99,01
Variedad de cultivo B	124,57	107,76	93,79
Variedad de cultivo X	0,20	72,14	40,23
Variedad de cultivo Y	0,13	94,66	77,95

A partir de estos resultados, se confirmó que el gen P1 estaba altamente expresado en las dos líneas que incluían los glucósidos de esteviol de referencia A y el glucósido de esteviol B nuevo. Las mutaciones encontradas en el gen P1 existen en los intrones y la existencia de una o más de estas mutaciones parecía aumentar el nivel de expresión de P1, mediante el cual se promovió en la planta la síntesis de los glucósidos de esteviol de referencia A y del glucósido de esteviol B nuevo.

Identificación del contenido del glucósido A de referencia en plantas con características genéticas 1-8

Se tomaron muestras de cantidades adecuadas de hojas frescas de individuos de las variedades cultivadas A, B, X e Y que se utilizaron en la "Identificación de las características genéticas de la planta que contiene glucósidos de esteviol de referencia A y el glucósido de esteviol B nuevo " descrita anteriormente para cuantificar las concentraciones de los componentes del dulzor mediante LC/MS-MS (Shimadzu LCMS8050). Específicamente, se liofilizó una cantidad prescrita de hojas frescas y los trozos secos triturados se introdujeron en agua pura. El resultante se sometió a un tratamiento ultrasónico durante 20 minutos para su extracción, se centrifugó y filtró para obtener 5 ml de extracto líquido. Este extracto líquido se sometió a un análisis LC/MS-MS con LCMS8050 en modo iónico (Shimadzu LCMS8050) para cuantificar las concentraciones de Reb. A, Reb. B, Reb. C, Reb. D, Reb. E, Reb. F, Reb. G, Reb. I,

Reb. M, Reb. N, esteviósido, dulcósido A, biósido de esteviol, rubusósido y el glucósido de esteviol A nuevo. El total del mismo se consideró la concentración de los componentes del dulzor (cantidad de glucósidos de esteviol totales (GET) de este ejemplo). Todo el contenido de agua de las hojas secas era inferior al 3 % aproximadamente. Los resultados se muestran en la Tabla 5-9. Los valores de los resultados siguientes son los valores medios de dos mediciones.

Tabla 5: Cantidad de TSG en hojas secas de cada variedad de cultivo

Nombre de la muestra	Peso de las hojas de estevia (g)	Concentración de TSG (mg/l)	Cantidad de TSG (mg)	Índice de TSG (%)
Variedad de cultivo A	0,0565	1617,35	8,087	14,3 %
Variedad de cultivo B	0,0501	905,42	4,527	9,0 %
Variedad de cultivo X	0,0445	1142,40	5,712	12,9 %
Variedad de cultivo Y	0,0576	1267,14	6,336	11,1 %

Tabla 6: Proporción de cada glucósido de esteviol en la TSG contenida en las hojas secas de cada cultivo

	Porcentaje de cada glucósido de esteviol en la TSG									
Nombre de la muestra	Reb A	Reb B	Reb C	Reb D	Esteviósido	Reb F	Reb M	Reb N	Nuevo glucósido de esteviol A	Total*
Variedad de cultivo A	40,4 %	0,2 %	36,6 %	0,7 %	11,0 %	7,9 %	0,2 %	0,2 %	0,061 %	100 %
Variedad de cultivo B	64,6 %	0,6 %	11,8 %	7,7 %	5,5 %	4,0 %	2,3 %	1,3 %	0,205 %	100 %
Variedad de cultivo X	24,1 %	0,1 %	6,1 %	0,5 %	62,4 %	1,2 %	0,0 %	0,1 %	0,017 %	100 %
Variedad de cultivo Y	38,9 %	0,2 %	6,5 %	1,9 %	47,9 %	1,7 %	0,1 %	0,4 %	0,045 %	100 %
*: El contenido total incluye Reb A, Reb B, Reb C, Reb D, Reb E, Reb F, Reb G, Reb I, Reb M, Reb N, esteviósido, dulcósido A, biósido de esteviol, rubusósido y glucósido de esteviol A de referencia.										

Tabla 7: Índice del glucósido A de referencia en relación con ocho tipos de los principales glucósidos de esteviol[*1]

Nombre de la muestra	Índice de glucósido de esteviol A
Variedad de cultivo A	0,063 %
Variedad de cultivo B	0,210 %
Variedad de cultivo X	0,018 %
Variedad de cultivo Y	0,046 %
[*1]: Reb A, Reb B, Reb C, Reb D, Reb F, Reb M, Reb N y esteviósido citados en la Tabla 6	

Tabla 8: Porcentaje de cada glucósido de esteviol contenido en las hojas secas de cada cultivo

	Contenido de cada glucósido de esteviol en hojas secas									
Nombre de la muestra	Reb A	Reb B	Reb C	Reb D	Esteviósido	Reb F	Reb M	Reb N	Nuevo glucósido de esteviol A	TSG
Variedad de cultivo A	5,8 %	0,0 %	5,2 %	0,1 %	1,6 %	1,1 %	0,0 %	0,0 %	0,009 %	14,3 %
Variedad de cultivo B	5,8 %	0,1 %	1,1 %	0,7 %	0,5 %	0,4 %	0,2 %	0,1 %	0,019 %	9,0 %
Variedad de cultivo X	3,1 %	0,0 %	0,8 %	0,1 %	8,0 %	0,1 %	0,0 %	0,0 %	0,002 %	12,9 %
Variedad de cultivo Y	4,3 %	0,0 %	0,7 %	0,2 %	5,3 %	0,2 %	0,0 %	0,0 %	0,005 %	11,1 %

Tabla 9: Porcentaje del glucósido de esteviol de referencia A en relación con cada glucósido de esteviol contenido en las hojas secas de cada cultivo

	Índice del glucósido de esteviol A de referencia en relación con cada glucósido de esteviol contenido en hojas secas								
Nombre de la muestra	**Reb A**	**Reb B**	**Reb C**	**Reb D**	**Estevióside**	**Reb F**	**Reb M**	**Reb N**	**Reb A+ Estevióside**
Variedad de cultivo A	0,15 %	30,00 %	0,16 %	8,57 %	0,55 %	0,76 %	30,00 %	30,00 %	0,12 %
Variedad de cultivo B	0,33 %	35,00 %	1,78 %	2,73 %	3,82 %	5,25 %	9,13 %	16,15 %	0,30 %
Variedad de cultivo X	0,08 %	20,00 %	0,33 %	4,00 %	0,03 %	1,67 %	-	20,00 %	0,02 %
Variedad de cultivo Y	0,13 %	25,00 %	0,77 %	2,63 %	0,10 %	2,94 %	50,00 %	12,50 %	0,06 %

Identificación del contenido del glucósido B nuevo en plantas con características genéticas 1-8

Se tomaron muestras de cantidades adecuadas de hojas frescas de los individuos de los cultivares B y X que se utilizaron en la "Identificación de las características genéticas de la planta que contiene glucósidos de esteviol de referencia A y el glucósido de esteviol B nuevo " para cuantificar las concentraciones de los componentes del dulzor mediante LC/MS-MS (Shimadzu LCMS8050). Específicamente, se liofilizó una cantidad prescrita de hojas frescas y los trozos secos triturados se introdujeron en agua pura. El resultante se sometió a un tratamiento ultrasónico durante 20 minutos para su extracción, se centrifugó y filtró para obtener 5 ml de extracto líquido. Este extracto líquido se sometió a un análisis LC/MS-MS con LCMS8050 en modo iónico (Shimadzu LCMS8050) para cuantificar las concentraciones de Reb. A, Reb. B, Reb. C, Reb. D, Reb. E, Reb. F, Reb. G, Reb. I, Reb. M, Reb. N, estevióside, dulcósido A, biósido de esteviol, rubusósido y el glucósido de esteviol B nuevo. El total del mismo se consideró la concentración de los componentes del dulzor (cantidad de glucósidos de esteviol totales (GTS) de este ejemplo). Todo el contenido de agua de las hojas secas era inferior al 3 % aproximadamente. Los resultados se muestran en la Tabla 10-14.

Tabla 10: Cantidad de TSG en hojas secas de cada variedad de cultivo

Nombre de la muestra	**Peso de las hojas de estevia (g)**	**Concentración de TSG (mg/l)**	**Cantidad de TSG (mg)**	**Índice de TSG (%)**
Variedad de cultivo B	0,0524	777,42	3,887	7,4 %
Variedad de cultivo X	0,0553	1672,45	8,362	15,1 %

Tabla 11: Proporción de cada glucósido de esteviol en la TSG contenida en las hojas secas de cada cultivo

	Porcentaje de cada glucósido de esteviol en la TSG									
Nombre de la muestra	**Reb A**	**Reb B**	**Reb C**	**Reb D**	**Estevióside**	**Reb F**	**Reb M**	**Reb N**	**Glucósido de esteviol B nuevo**	**Total***
Variedad de cultivo B	66,6 %	0,7 %	7,2 %	10,0 %	4,1 %	2,2 %	4,9 %	1,9 %	1,328 %	100 %
Variedad de cultivo X	30,8 %	0,1 %	6,0 %	0,8 %	58,0 %	1,1 %	0,0 %	0,1 %	0,000 %	100 %
*: El contenido total incluye Reb A, Reb B, Reb C, Reb D, Reb E, Reb F, Reb G, Reb I, Reb M, Reb N, estevióside, dulcósido A, biósido de esteviol, rubusósido y el glucósido de esteviol B nuevo.										

Tabla 12: Índice del glucósido B nuevo en relación con ocho tipos de los principales glucósidos de esteviol[*1]

Nombre de la muestra	Índice de glucósido de esteviol B
Variedad de cultivo B	1,360 %
Variedad de cultivo X	0,000 %
*[1]: Reb A, Reb B, Reb C, Reb D, Reb F, Reb M, Reb N y estevióside citados en la Tabla 11	

Tabla 13: Porcentaje de cada glucósido de esteviol contenido en las hojas secas de cada cultivo

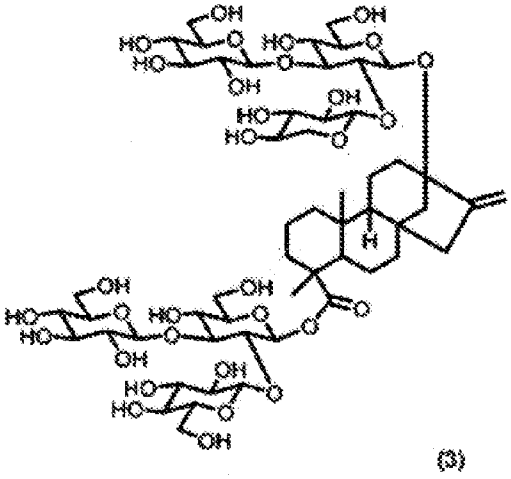
	Contenido de cada glucósido de esteviol en hojas secas									
Nombre de la muestra	**Reb A**	**Reb B**	**Reb C**	**Reb D**	**Estevióside**	**Reb F**	**Reb M**	**Reb N**	**Glucósido de esteviol B nuevo**	**TSG**
Variedad de cultivo B	4,9 %	0,1 %	0,5 %	0,7 %	0,3 %	0,2 %	0,4 %	0,1 %	0,099 %	7,4 %
Variedad de cultivo X	4,7 %	0,0 %	0,9 %	0,1 %	8,8 %	0,2 %	0,0 %	0,0 %	0,000 %	15,1 %

Tabla 14: Índice del glucósido de esteviol B nuevo en relación con cada glucósido de esteviol contenido en las hojas secas de cada cultivo

	Índice del glucósido de esteviol B nuevo en relación con cada glucósido de esteviol contenido en las hojas secas								
Nombre de la muestra	**Reb A**	**Reb B**	**Reb C**	**Reb D**	**Estevióside**	**Reb F**	**Reb M**	**Reb N**	**Reb A+ Estevióside**
Variedad de cultivo B	1,99 %	178,85 %	18,32 %	13,29 %	32,22 %	59,12 %	27,25 %	71,02 %	1,88 %

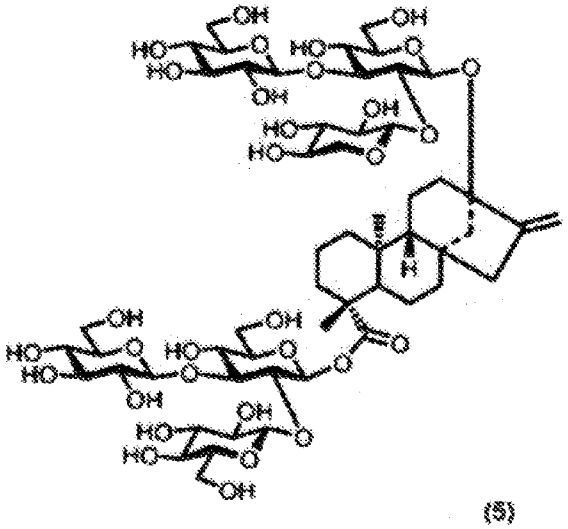
REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula (3), o una sal o un hidrato del mismo:



(3)

2. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, o una sal o un hidrato del mismo, en donde el compuesto está representado por la fórmula (5) a continuación:



(5)

3. Un alimento o una bebida que comprende el compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2.

4. El alimento o la bebida de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el contenido del compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 es de 1-600 ppm en masa.

5. Una composición edulcorante que comprende el compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2.

6. La composición edulcorante de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el contenido del compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 es de 1-99 % en peso.

7. La composición edulcorante de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6, que comprende además uno o varios tipos de glucósidos de esteviol seleccionados entre el grupo que consiste en rebaudiósido A, rebaudiósido B, rebaudiósido C, rebaudiósido D, rebaudiósido E, rebaudiósido F, rebaudiósido I, rebaudiósido J, rebaudiósido K, rebaudiósido N, rebaudiósido M, rebaudiósido O, rebaudiósido Q, rebaudiósido R, dulcósido A, dulcósido C, rubusósido, esteviol, monósido de esteviol, biósido de esteviol y estevióside.

8. Un alimento o una bebida que comprende la composición edulcorante de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.

9. El alimento o la bebida de acuerdo con la reivindicación 8, que es una bebida.

10. Uso del compuesto de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2 como edulcorante.

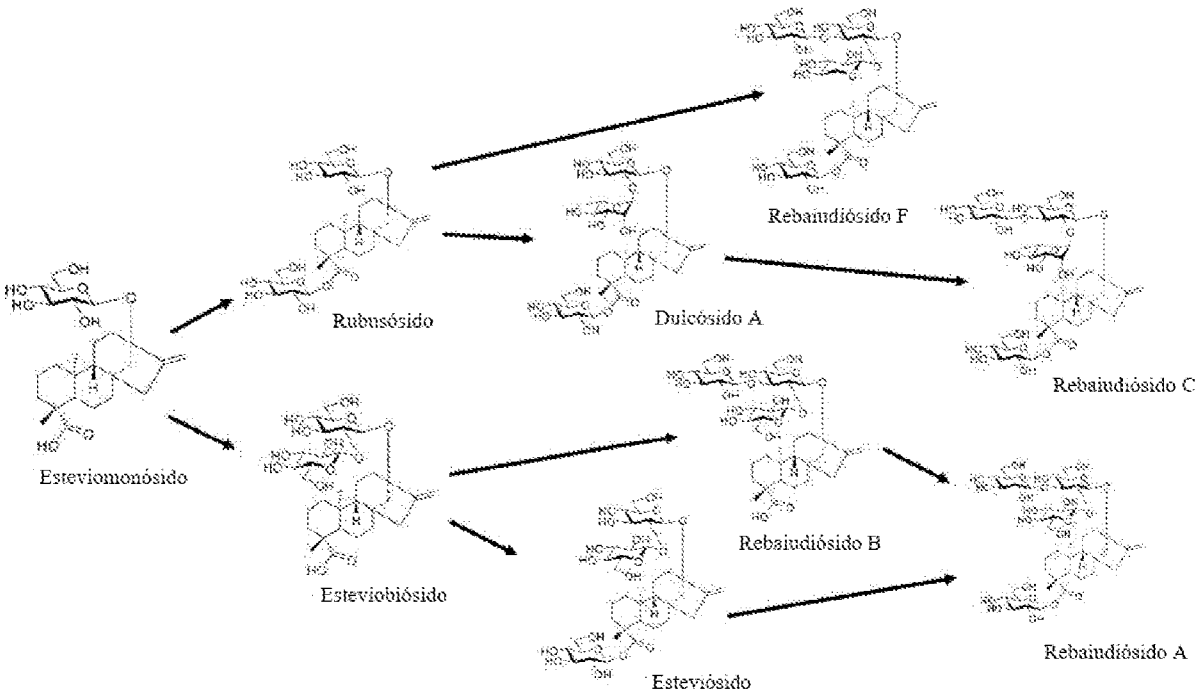


Figura 1

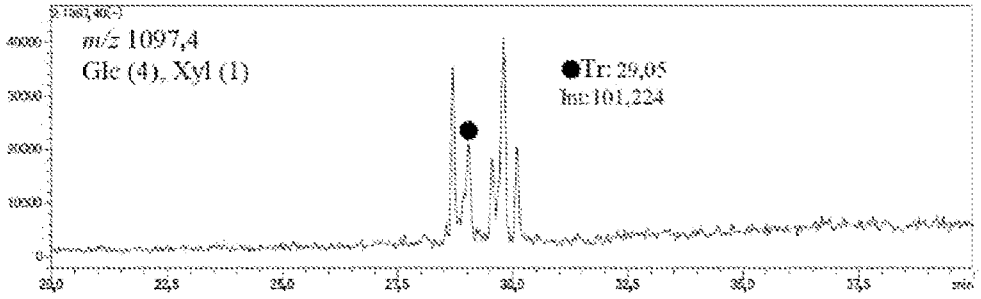


Figura 2: Cromatograma iónico seleccionado de nueva planta de estevia (Variedad cultivada A) a *m/z* 1097,4

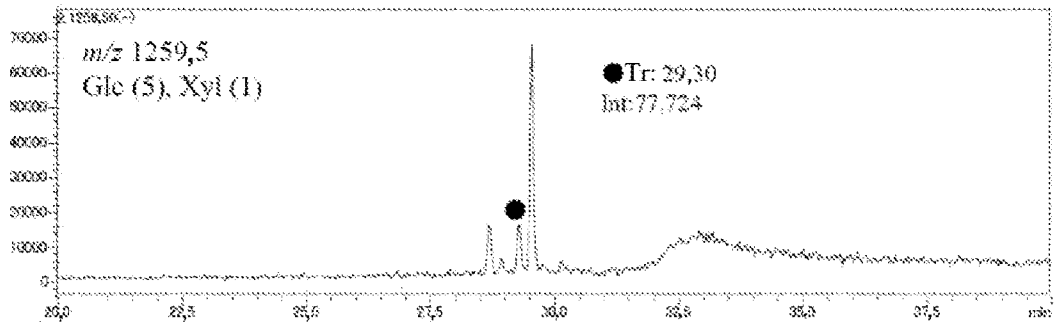


Figura 3: Cromatograma iónico seleccionado de nueva planta de estevia (Variedad cultivada A) a *m/z* 1259,5

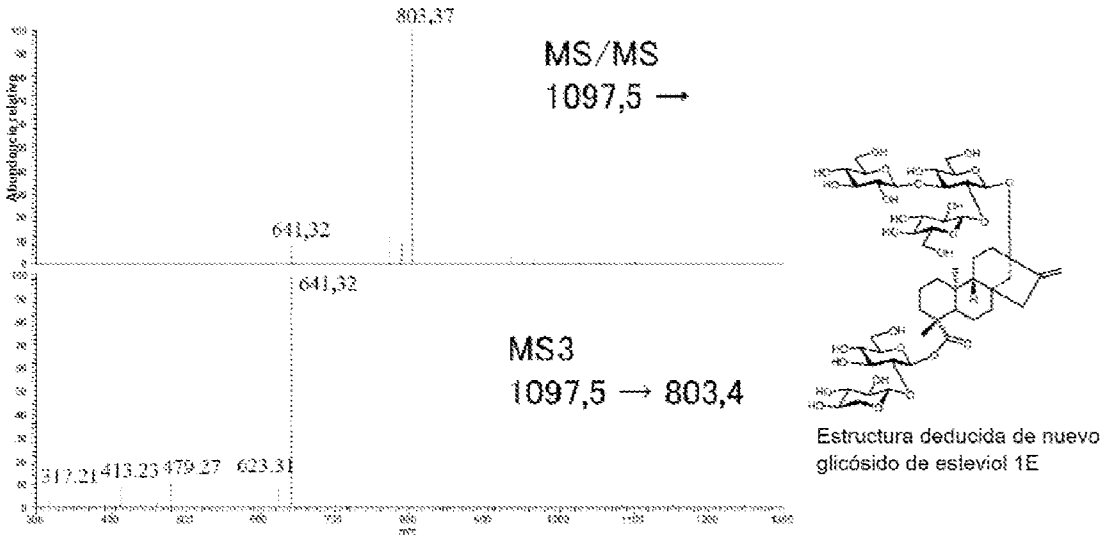


Figura 4: Espectros MS/MS y de masa fragmentada-MS^3 de nuevo glucósido de esteviol 1E (correspondiente a *m/z* 1097,4, Tr: 29,05)

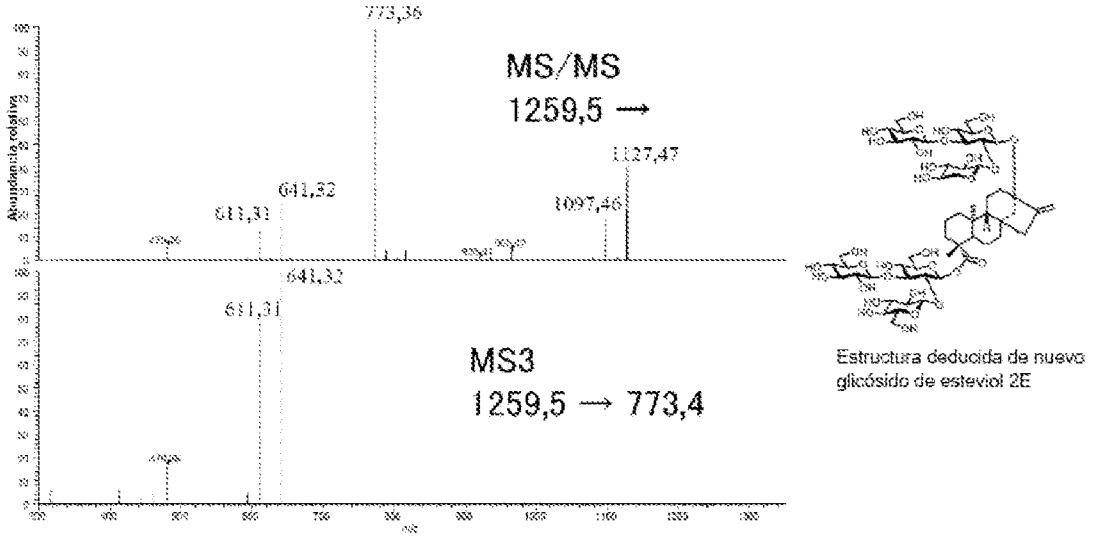


Figura 5: Espectros MS/MS y de masa fragmentada-MS3 de nuevo glucósido de esteviol 2E (correspondiente a *m/z* 1259,5, Tr: 29,68)

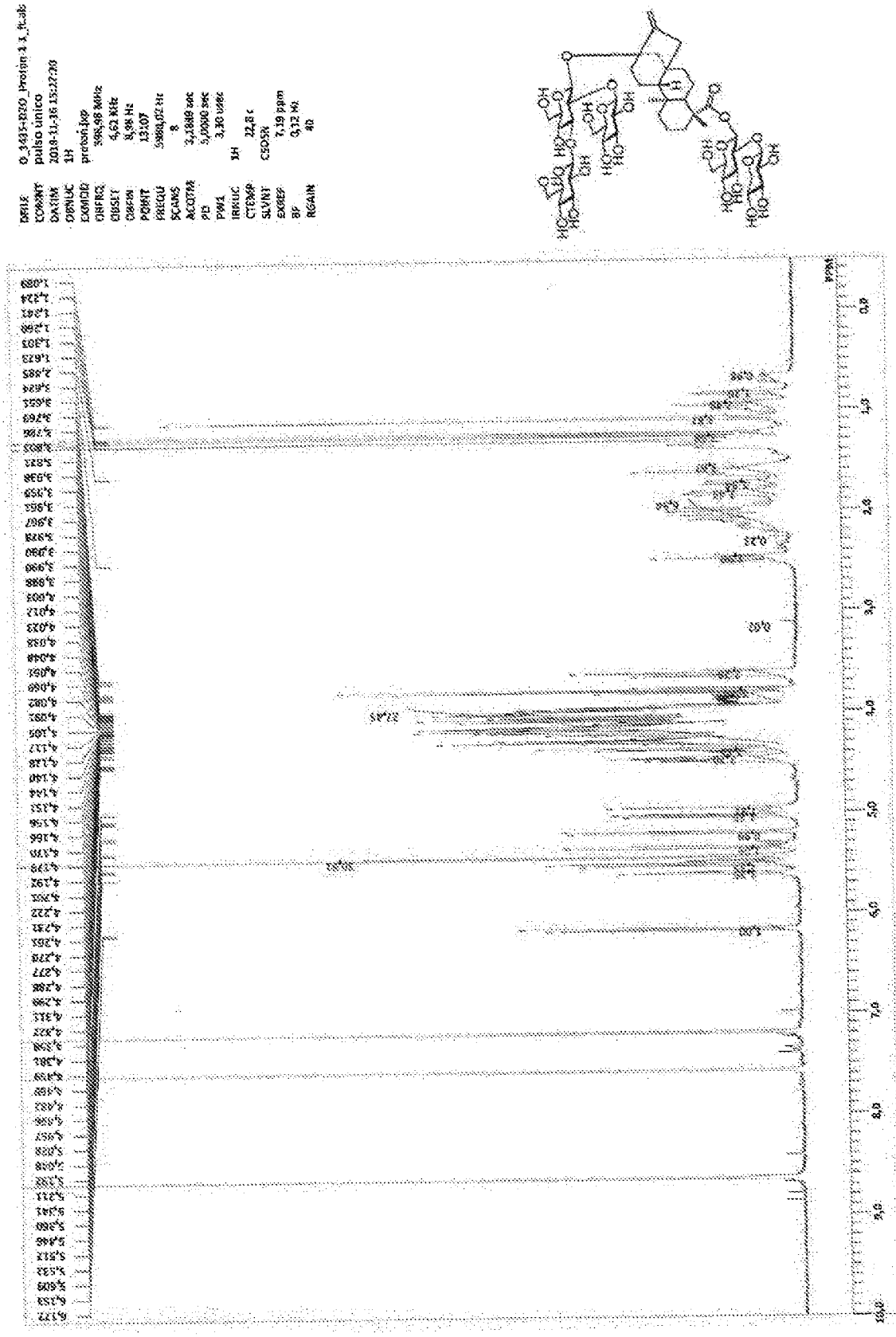


Figura 6: Espectro de RMN ^{1}H del compuesto 15 (400 MHz, Pyr-d5)

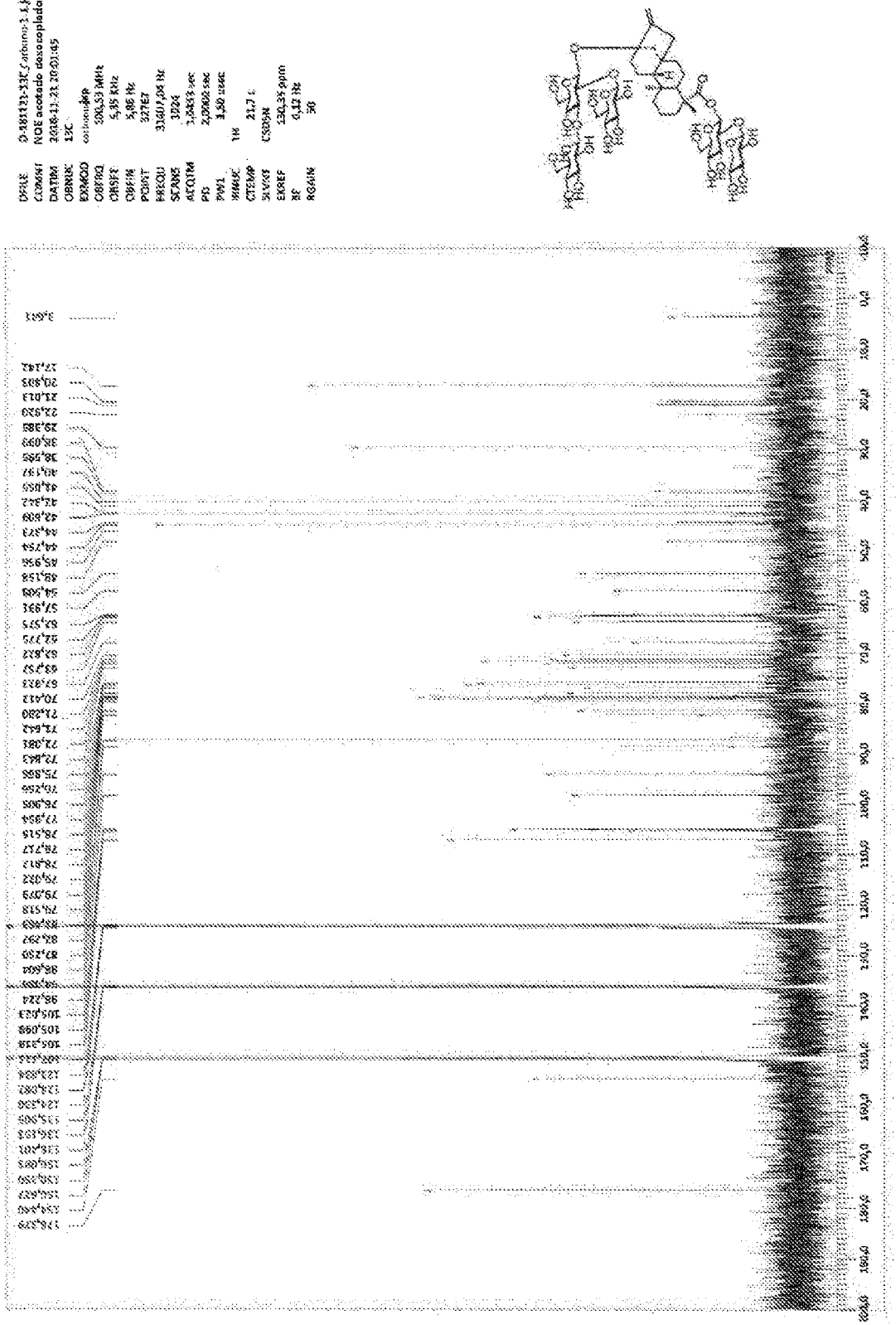


Figura 7: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 15 (100 MHz, Pyr-d5)

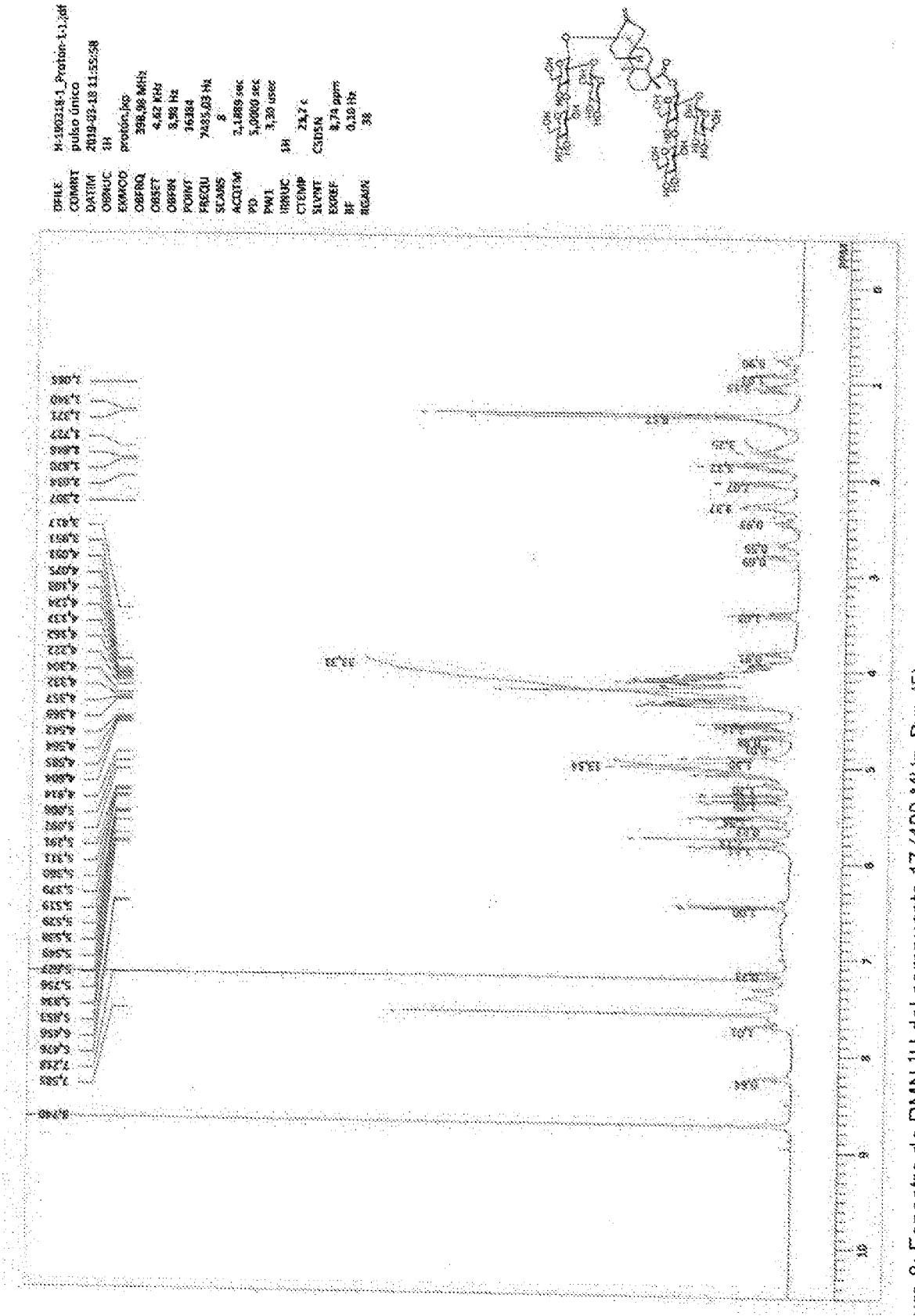


Figura 8: Espectro de RMN ^{1}H del compuesto 17 (400 MHz, Pyr-d5)

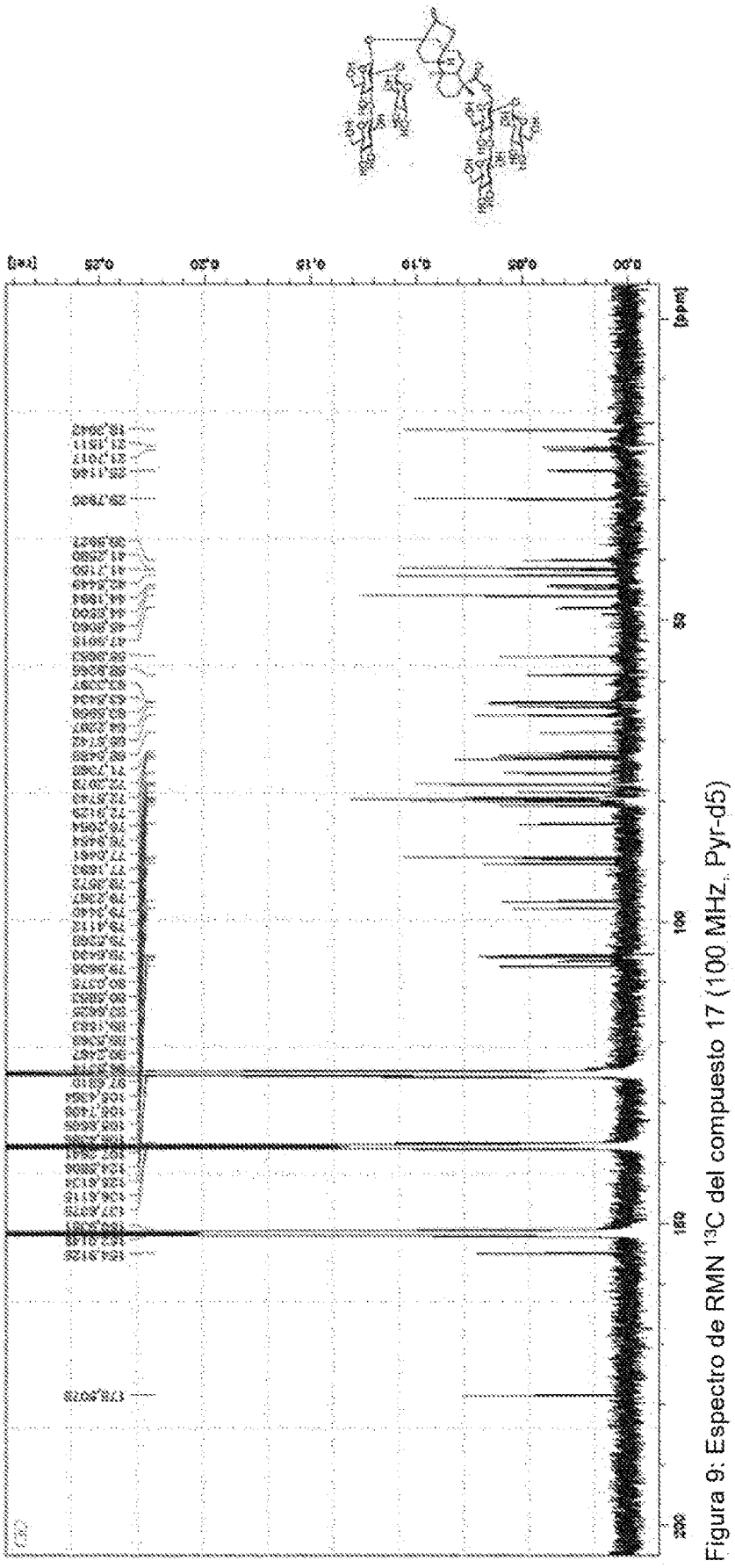


Figura 9: Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 17 (100 MHz, Pyr-d5)

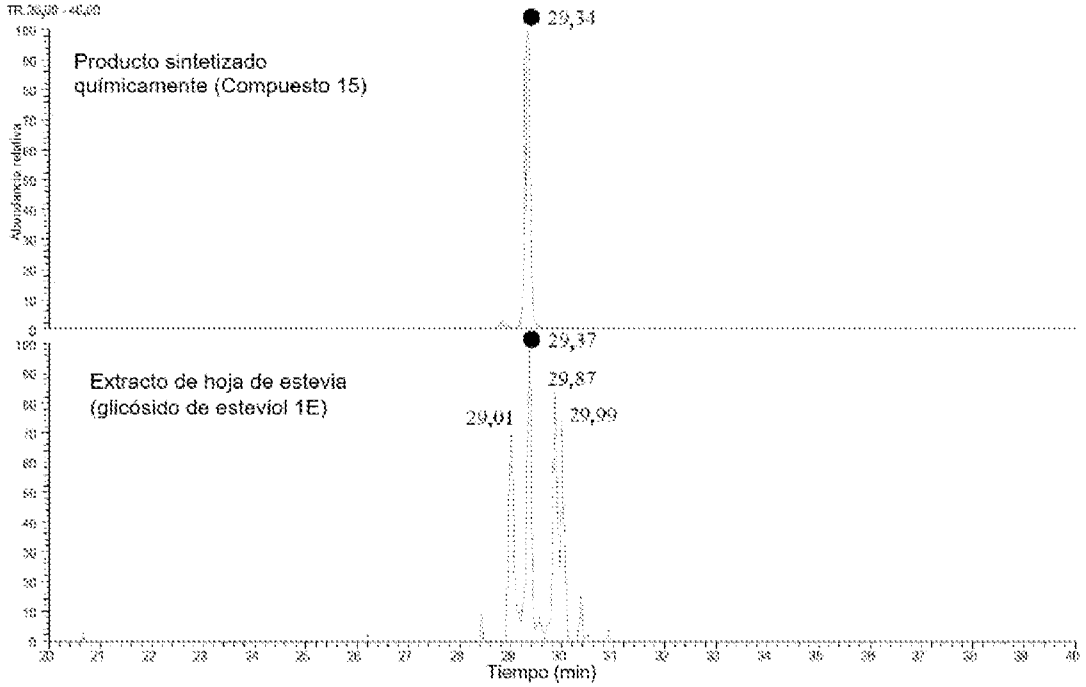


Figura 10: Cromatogramas iónicos extraídos del nuevo glicósido de esteviol 1E (extracto de hoja de estevia) y producto sintetizado químicamente (forma beta del compuesto 15)

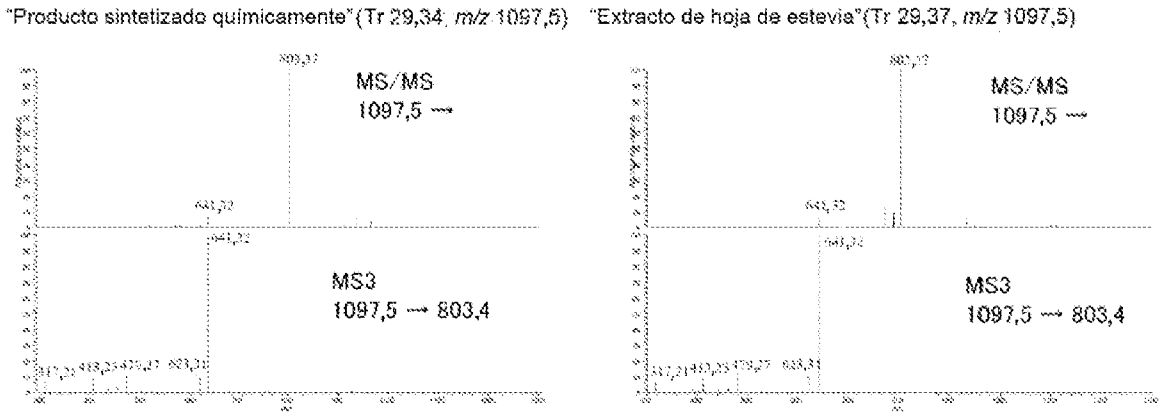


Figura 11: Espectros de masas MS/MS y fragmentados MS3 del nuevo glicósido de esteviol 1E (extracto de hoja de estevia) y producto sintetizado químicamente (forma beta del compuesto 15)

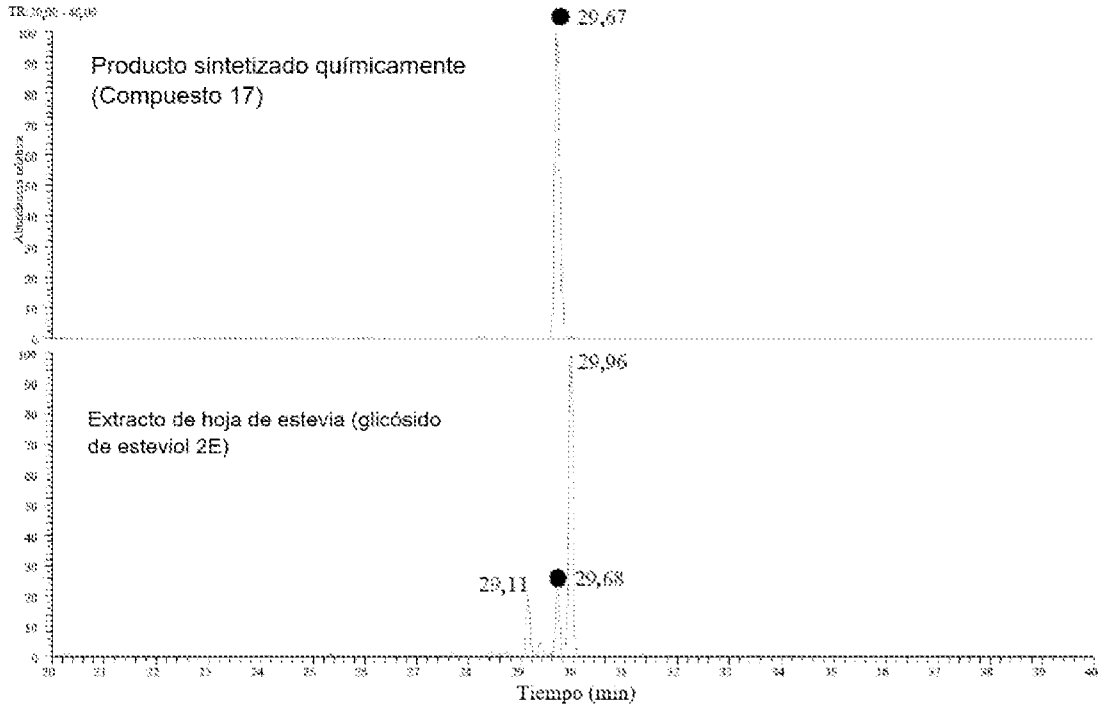


Figura 12: Cromatogramas iónicos extraídos del nuevo glicósido de esteviol 2E (extracto de hoja de estevia) y producto sintetizado químicamente (forma beta del compuesto 17)

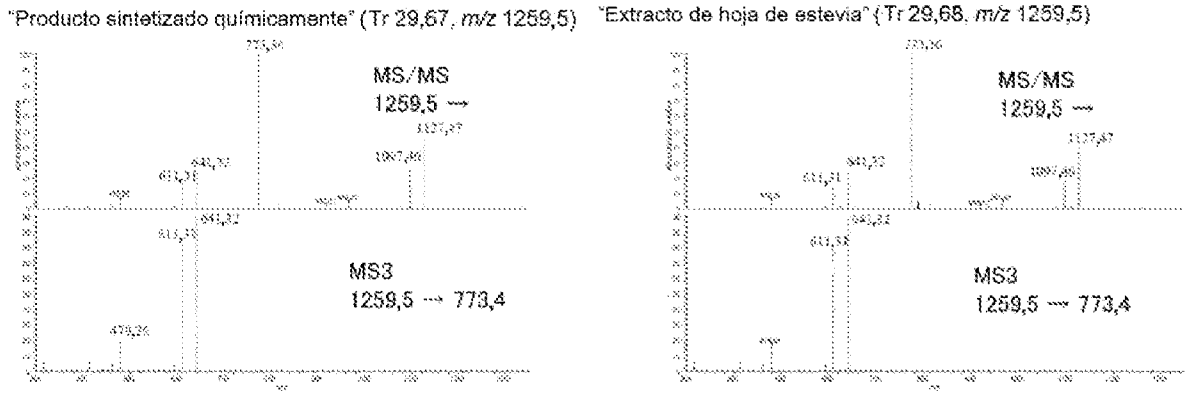


Figura 13: Espectros de masas MS/MS y fragmentados MS^3 del nuevo glicósido de esteviol 2E (extracto de hoja de estevia) y producto sintetizado químicamente (forma beta del compuesto 17)

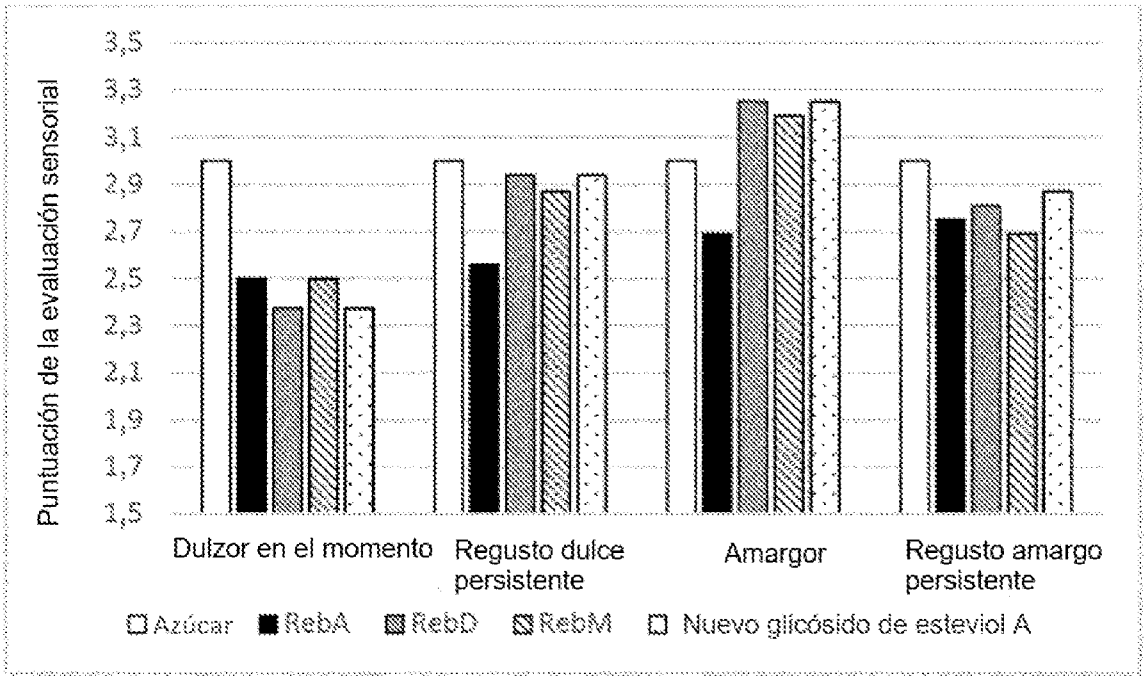


Figura 14: Resultados de las evaluaciones sensoriales respecto al glicósido de esteviol A nuevo

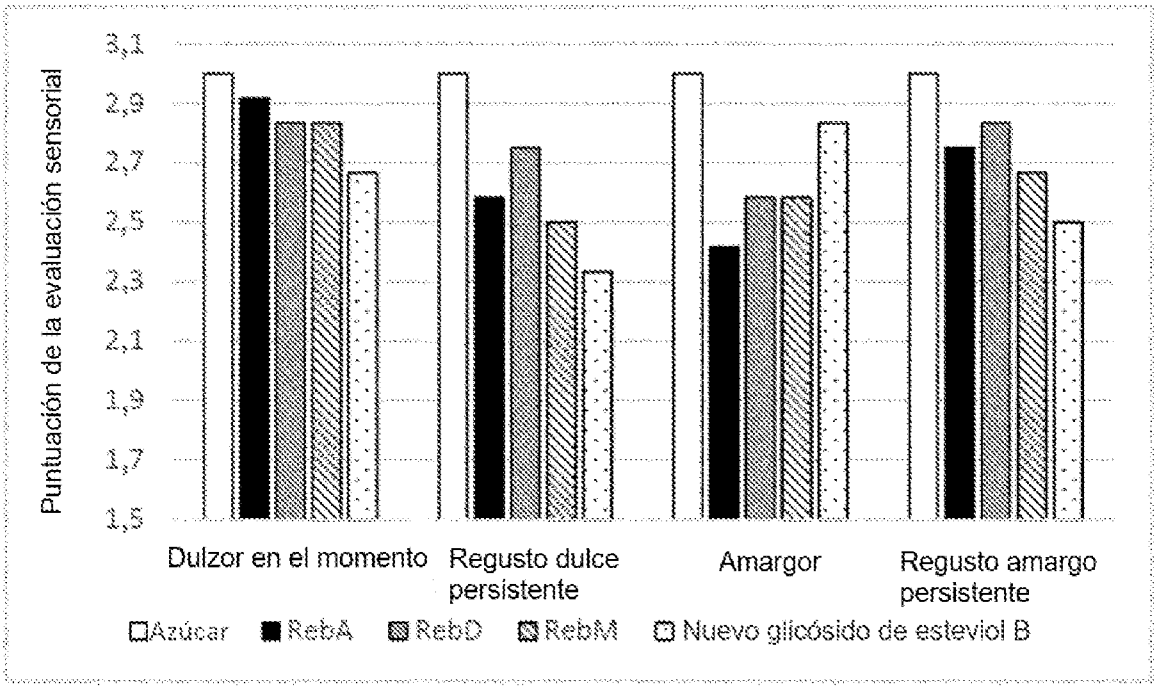


Figura 15: Resultados de las evaluaciones sensoriales respecto al glicósido de esteviol B nuevo

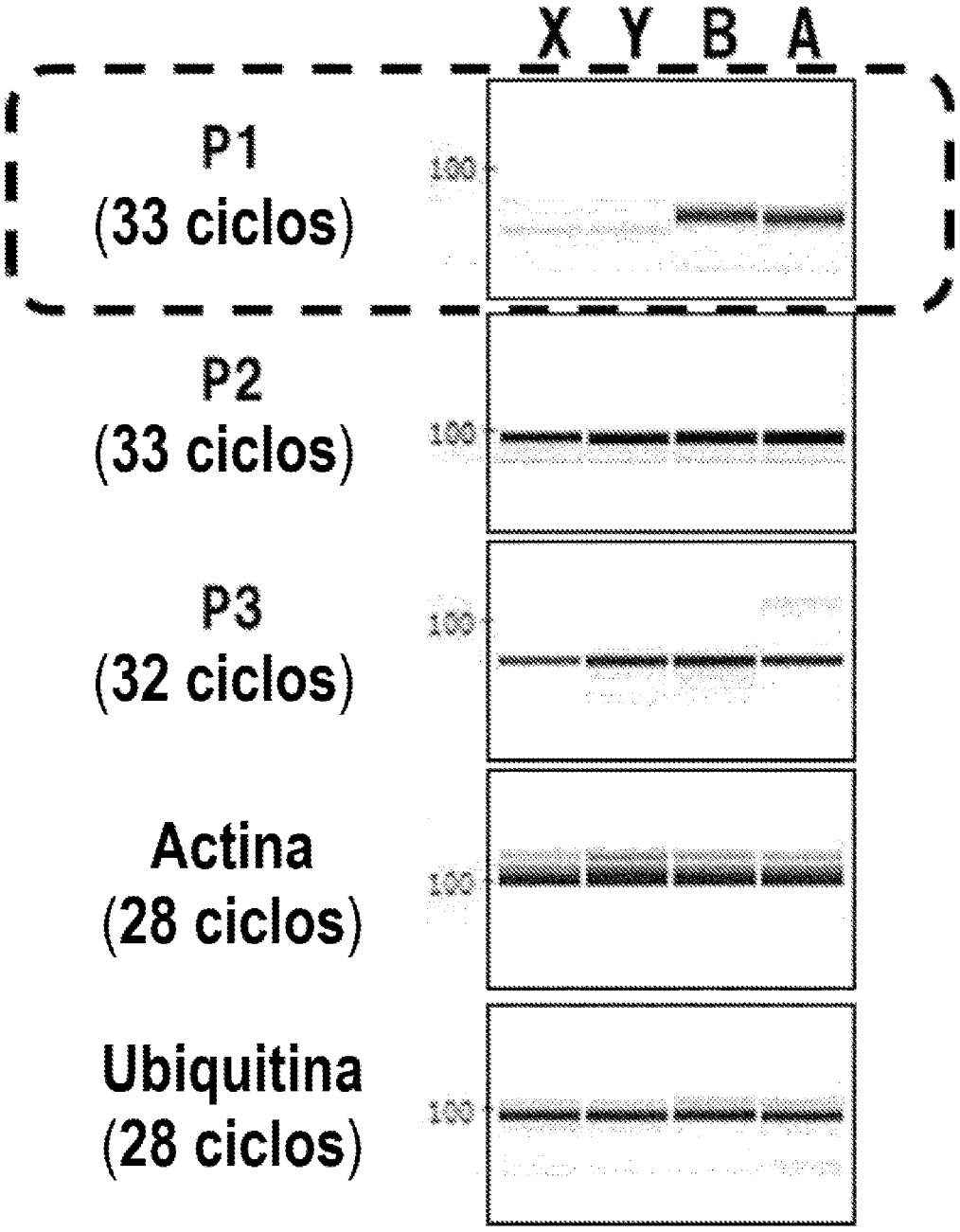


Figura 16: Resultados del análisis de la expresión