

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 806 139**

51 Int. Cl.:

C07H 15/04 (2006.01)
A23F 5/10 (2006.01)
A23F 5/14 (2006.01)
A23F 5/24 (2006.01)
A23F 5/36 (2006.01)
A23F 5/46 (2006.01)
C07H 13/04 (2006.01)
A23L 27/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.10.2014** **PCT/JP2014/076522**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.04.2015** **WO15050240**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2014** **E 14850777 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.06.2020** **EP 3064505**

54 Título: **Glicósido de ácido orgánico contenido en los granos de café**

30 Prioridad:

03.10.2013 JP 2013208667

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.02.2021

73 Titular/es:

SUNTORY HOLDINGS LIMITED (100.0%)
1-40 Dojimahama 2-chome Kita-ku
Osaka-shi, Osaka 530-8203, JP

72 Inventor/es:

NAKAHARA, KOICHI y
IWASA, KEIKO

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 806 139 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Glicósido de ácido orgánico contenido en los granos de café

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un glicósido de ácido orgánico novedoso y a usos del mismo.

Técnica anterior

10 Siempre ha habido un considerable interés en los componentes aromáticos volátiles del café. Se ha informado de que una parte de los componentes aromáticos volátiles existe en el fruto del café o en los granos de café verde como unión de glicósidos a azúcar. Puesto que el glicósido es un precursor de aroma, el componente aromático volátil se libera para proporcionar aroma en respuesta a la madurez o al daño físico. Ha habido informes de
15 glicósidos en el fruto del café o los granos de café verde como precursores de aroma, pero la mayoría de los informes se refieren a glicósidos que tienen compuestos de monoterpene o diterpene como agliconas. El Documento No Relacionado con Patentes 1 describe que 3(S)-linalool-3-O-β-D-glucopiranosil-β-D-apiofuranósido y 3(S)-linalool-3-O-β-D-glucopiranosil-β-D-arabinofuranósido existe en los granos de café verde como precursor del aroma de monoterpene. Además, los Documentos No Relacionado con Patentes 2 y 3 describen que la 3'-O-β-D-glucopiranosil-2'-O-isovaleril-2-O-β-D-glucopiranosil-atractilogenina, la 2-O-β-D-glucopiranosil-atractilogenina y la 2'-O-isovaleril-β-D-glucopiranosil-antranilogenina existen en los granos de café como precursor de aroma de diterpene o precursor de aroma de ácido isovalérico. También se informa de que existe un glicósido que tiene ácido metilcrotónico o ácido isovalérico como aglicona en frutos de café o granos de café verde (Documento No
20 Relacionado con Patentes 4). El Documento No Relacionado con Patentes 4 describe 3-metilbutanoil-1-O-β-D-glucopiranosil-β-D-apiofuranósido, 3-metilbutanoil-6-O-α-D-glucopiranosil-β-D-fructofuranósido y 3-metilbut-2-enoil-1-O-β-D-glucopiranosil-β-D-apiofuranósido.
25 El Documento de Patente 1 describe una composición de alimentos o bebidas que comprende al menos 0,1% de sólidos de café y al menos 20 miligramos de arabinogalactanos por gramo de sólidos de café, en donde al menos 80% de dichos sólidos de café son solubles en agua, y al menos 92% de dichos sólidos de café son sólidos de café sin tostar.
30

El Documento de Patente 2 se refiere a un método para purificar un extracto de café, que comprende poner en contacto microorganismos con un extracto de disolvente acuoso de granos de café para eliminar contaminantes.

35 El Documento de Patente 3 se refiere a un mejorador de heces específico que comprende extracto de grano de café.

Lista de referencias**Documentos No Relacionados con Patentes**

40 Documento No Relacionado con Patentes 1: B. Weckerle, G. Toth, P. Schreire, Eur Food Res Technol (2003) 216:6-10
Documento No Relacionado con Patentes 2: Hans Gerhard Maier, Helga Wewetzer, Z. Lebensm. Unters Forsch, 167, 105-107 (1978)
45 Documento No Relacionado con Patentes 3: Bradbury A.G.W., Balzer H. H., Colloq. 18^a Sci. En t. Cafe, (1999) 71-77
Documento No Relacionado con Patentes 4: Bernhard Weckerle, Tamas Gati, Gabor Toth, Peter Schreier, Phytochemistry 60 (2002) 409-414

50 Documentos de Patente

Documento de Patente 1: WO 2010/124936
Documento de Patente 2: JP 2004-081053
Documento de Patente 3: JP 2003-212782

55 Compendio de la invención**Problema técnico**

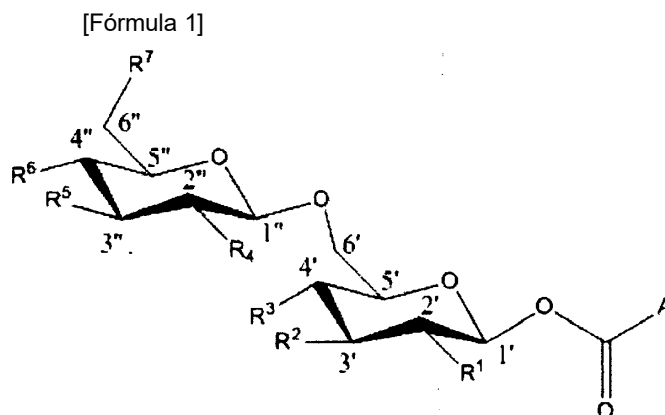
60 Sin embargo, no se conoce la existencia de glicósidos que tienen ácido metilcrotónico o ácido isovalérico como agliconas en los frutos de café o granos de café verde, excepto por las divulgaciones en los documentos No Relacionado con Patentes 2, 3 y 4. El objetivo de la presente invención es proporcionar un glicósido ácido orgánico novedoso existente en el café y usos del mismo.

Solución al problema

Para resolver el problema anterior, los autores de la presente invención iniciaron estudios sobre café que recibió altas calificaciones de sabor en la evaluación sensorial. Después de extensos estudios, sorprendentemente, encontraron que existe un glicósido desconocido en granos de café de alta calidad. Los autores de la presente invención completaron la presente invención basándose en este hallazgo.

La presente invención se define como en las reivindicaciones. Mientras tanto, la presente descripción se puede resumir en los siguientes apartados (1) a (10):

(1) Un compuesto que tiene una estructura representada por la fórmula 1:



en donde, cada uno de R^1 a R^7 se selecciona independientemente entre un grupo que consiste en H, OH, NH_2OCH_3 , OC(O)CH_3 y NHCOCH_3 ;

A se selecciona entre alquilo C_1 a C_6 o alquenoilo C_1 a C_6 y el alquilo C_1 a C_6 o alquenoilo C_1 a C_6 pueden estar sustituidos con metilo o etilo.

(2) El compuesto según el apartado (1), en donde R^1 a R^7 es OH; y

A se selecciona entre un grupo que consiste en metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, etenilo, propenilo, butenilo y pentenilo, y el etilo, propilo, butilo, pentilo, propenilo, butenilo y pentenilo pueden estar sustituidos con metilo o etilo.

(3) El compuesto según los apartados (1) o (2), en donde A es propilo o propenilo, y el propilo o propenilo puede estar sustituido con metilo.

(4) El compuesto según uno cualquiera de los apartados (1) a (3) seleccionado entre 3-metil-2-butenoil- β -gentiobiosido o 3-metil-butanoil- β -gentiobiosido.

(5) Una composición que comprende un compuesto según uno cualquiera de los apartados (1) a (4).

(6) La composición según el apartado (5) para utilizar en la mejora del sabor de los granos de café o extractos obtenidos a partir de granos de café.

(7) La composición según los apartados (5) o (6) que se mezcla con granos de café o extractos obtenidos a partir de granos de café.

(8) Un método para mejorar el sabor de los extractos obtenidos a partir de granos de café que comprende: mezclar granos de café o extractos obtenidos a partir de granos de café con un compuesto según uno cualquiera de los apartados (1) a (4) o una composición según uno cualquiera de los apartados (5) a (7).

(9) Un método para evaluar la calidad de granos de café o extractos obtenidos a partir de granos de café que comprende:

detectar un compuesto según uno cualquiera de los apartados (1) a (4) en granos de café o extractos obtenidos a partir de granos de café.

(10) Un método para identificar o estimar una variedad de café que comprende:

detectar un compuesto según uno cualquiera de los apartados (1) a (4) en granos de café o extractos obtenidos a partir de granos de café.

Efectos ventajosos de la invención

Se confirmó que los glicósidos ácidos orgánicos encontrados por los autores de la presente invención son novedosos, y se pueden utilizar para mejorar el sabor de los extractos obtenidos a partir de granos de café. También se confirmó que el contenido de los glicósidos está correlacionado con la calidad de los granos de café verde y, por lo tanto, los glicósidos se pueden utilizar para estimar o evaluar la calidad de los granos de café o los extractos obtenidos de los granos de café. Además, también se confirmó que el contenido de los glicósidos está correlacionado con la variedad de los granos de café verde y, por lo tanto, se puede identificar o estimar la variedad

de café a partir de granos de café o extractos obtenidos a partir de granos de café. Estos asuntos no eran predecibles a partir de la técnica anterior.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el cromatograma LC-MS de extractos obtenidos a partir de granos de café verde. (a) matriz de fotiodos (PDA); (b) cromatograma de iones totales (TIC) (modo positivo); (c) cromatograma de iones totales (modo negativo); (d) cromatograma de iones extraídos de $m/z = 489$; (e) cromatograma de iones extraídos de $m/z = 471$. 5-CQA: ácido 5-cafeoilquínico (ácido clorogénico), FQA: ácido feruloilquínico.

La Figura 2 muestra el análisis de azúcares producidos por hidrólisis ácida de glicósidos (1) a (3) por LC-RI. Glc: D-glucosa (tiempo de retención: aproximadamente 9,8 min.); Frc: D-fructosa (tiempo de retención: aproximadamente 13,5 min.); Gal: D-galactosa (tiempo de retención: aproximadamente 11,3 min.); Man: D-manosa (tiempo de retención: aproximadamente 12,6 min.).

La Figura 3 muestra los componentes volátiles detectados por medio de tratamiento térmico de glicósidos (1) a (3). (a) El cromatograma de iones totales del componente volátil detectado por medio de tratamiento térmico del glicósido (1), y (b) el espectro de masas del componente detectado en el tiempo de retención de 33,38 min. (c) El cromatograma de iones totales del componente volátil detectado por medio de tratamiento térmico del glicósido (2), y (d) el espectro de masas del componente detectado en el tiempo de retención de 29,00 min. (e) El cromatograma del componente volátil detectado por medio de tratamiento térmico del glicósido (3), y (f) el espectro de masas del componente detectado en el tiempo de retención 29,00 min.

La Figura 4 muestra el efecto que el ácido metilcrotónico producido a partir del glicósido (1) y el ácido isovalérico producido a partir del glicósido (2) sobre el sabor del café. Los puntos sensoriales en el diagrama son los promedios.

La Figura 5 muestra la relación entre el contenido de glicósido en los granos de café verde y la calidad del café. El glicósido (1) se detectó por cromatografía iónica extraída de $m/z = 469$, y los glicósidos (2) y (3) se detectaron por cromatografía iónica extraída de $m/z = 471$.

La Figura 6 muestra la relación entre la puntuación de cata y el glicósido de ácido orgánico, con respecto a los granos de café verde. A: glicósido (1); B: glicósido (2); C: glicósido (3). La medición se llevó a cabo a $N=3$.

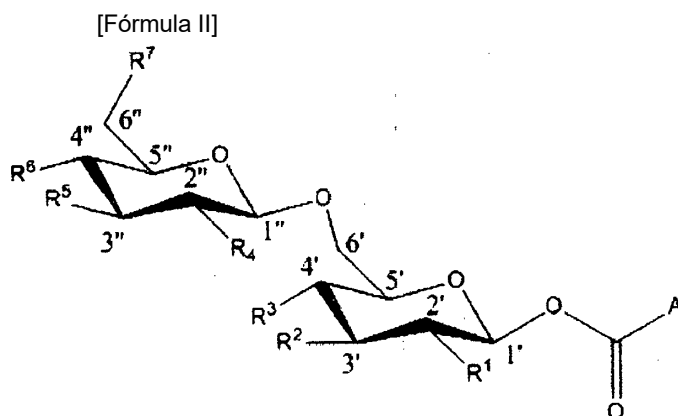
La Figura 7 muestra la relación entre el contenido de glicósidos en los granos de café verde y las variedades de café. 1: Guatemala Pacamala; 2: Guatemala SHB; 3: Jamaica Typica; 4: Brasil 4/5; 5: Vietnam G1.

La Figura 8 muestra la cantidad de glicósidos en la pulpa y la piel del fruto del café. El glicósido (1) se detectó mediante cromatografía iónica extraída de $m/z = 469$, y los glicósidos (2) y (3) se detectaron mediante cromatografía iónica extraída de $m/z = 471$.

Descripción de las realizaciones

<Glucósido novedoso>

La presente invención se refiere a los compuestos definidos en la reivindicación 1. El glicósido de la presente descripción tiene una estructura representada por la siguiente fórmula:



En donde, cada uno de R^1 a R^7 se selecciona independientemente entre un grupo que consiste en H, OH, NH_2OCH_3 , OC(O)CH_3 y NHCOCH_3 . Por ejemplo, cada uno de R^1 a R^7 se selecciona preferiblemente independientemente entre H, OH, NH_2OCH_3 y OC(O)CH_3 , y más preferiblemente, se selecciona independientemente entre OH. A se selecciona entre alquilo C_1 a C_6 o alqueno C_1 a C_6 , en donde el alquilo C_1 a C_6 o alqueno C_1 a C_6 pueden estar sustituidos con metilo o etilo. El alquilo C_1 a C_6 es, por ejemplo, metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo o hexilo, preferiblemente etilo, propilo o butilo, más preferiblemente propilo o butilo, y aún más preferiblemente propilo, que puede estar sustituido con metilo o etilo; cada uno de alqueno C_1 a C_6 es, por ejemplo, etenilo, propenilo, butenilo, pentenilo o hexenilo, preferiblemente etenilo, propenilo o butenilo, más preferiblemente propenilo o butenilo, e incluso más

preferiblemente propenilo, que puede estar sustituido con metilo o etilo.

En esta memoria descriptiva, el compuesto de la presente invención y el glicósido de la presente invención tienen el mismo significado, y se tratan como términos empleables indistintamente.

5 Un ejemplo del compuesto de la presente descripción es, por ejemplo, uno en el que cada uno de R^1 a R^7 es OH, y A es propilo o propenilo que puede estar sustituido con metilo. El compuesto de la presente invención es 3-metil-2-butenoil- β -gentiobiosido (también denominado metil crotonil gentiobiosido) o 3-metil-butenoil- β -gentiobiosido (también denominado isovaleril gentiobiosido).

10 El glicósido consiste en aglicona y glicona. Como ejemplo, el metil crotonil gentiobiosido está compuesto de ácido metil crotonico como aglicona y gentiobiosa como glicona, en donde el ácido metil crotonico y la gentiobiosa se unen a través de un enlace éster. Como otro ejemplo, el isovaleril gentiobiosido está compuesto de ácido isovalérico como aglicona y gentiobiosa como glicona, en donde el ácido isovalérico y la gentiobiosa se unen a través de un enlace éster. Estos dos glicósidos no son volátiles, pero cuando se cortan la aglicona y la glicona, se liberan
15 respectivamente ácido metilcrotonico y ácido isovalérico volátiles. El ácido metilcrotonico y el ácido isovalérico son componentes del aceite esencial vegetal. Por lo tanto, el compuesto de la presente invención se puede utilizar como precursor de aroma.

El compuesto de la presente invención se puede fabricar mediante una síntesis química utilizando un método conocido por un experto en la técnica, o se puede fabricar mediante extracción de una fuente natural. Cuando se
20 fabrica el compuesto de la presente invención a partir de una fuente natural, las plantas se pueden utilizar como material de partida. Las plantas que se pueden utilizar incluyen *Cafés*, tales como *Coffea arabica*, *Coffea canephora* var. *robusta*, *Coffea liberica*. Cuando se fabrica el compuesto de la presente invención a partir de *Coffea*, es posible utilizar un fruto de *Coffea* o un grano de café verde del fruto. Un grano de café verde utilizado en la presente
25 memoria descriptiva es un grano obtenido al secar un fruto de café bajo el sol seguido de trillado, o un grano obtenido al quitar una pulpa de un fruto, seguido de lavado con agua, secado y trillado. También es posible fabricar el compuesto de la presente invención a partir de la piel o pulpa de fruta que se ha eliminado de los frutos de café en la fabricación de granos de café verde. La piel del fruto y la pulpa generalmente se desechan en la fabricación de granos de café verde. Por lo tanto, si la piel del fruto o la pulpa se utiliza como material de partida en la fabricación
30 del compuesto de la presente invención, conduce a un uso eficaz de los residuos.

En términos de la mejora de la eficacia de la producción, es preferible utilizar frutos de café o granos de café verde con un alto contenido del compuesto diana. Tales frutos de café o granos de café verde incluyen frutos de café o granos de café verde, cuyo aroma es muy apreciado. Tales frutos de café o granos de café verde incluyen, por
35 ejemplo, moca, montaña azul, geisha. También es posible realizar una medición preliminar del contenido del compuesto diana en frutos de café o granos de café verde, y seleccionar frutos de café o granos de café verde con un alto contenido del compuesto diana.

Se puede utilizar un disolvente para extraer el compuesto de la presente invención a partir de frutos de café, granos de café verde o piel o pulpa del fruto. Se puede utilizar cualquier disolvente siempre que se extraiga el compuesto de la presente invención. Los ejemplos incluyen una solución acuosa o un disolvente orgánico, más específicamente, un tampón o alcoholes, que se pueden utilizar solos o combinando dos o más. Los alcoholes disponibles en el mercado son convenientes, y se puede utilizar alcohol inferior (metanol, etanol, propanol, isopropanol, butanol, isobutanol, etc.), alcohol polivalente líquido (alcohol de 1,3-butileno, propilenglicol, glicerol, etc.). El alcohol inferior
45 que contiene agua y el alcohol inferior son preferibles en la presente invención. La cantidad de disolvente que se debe utilizar puede variar dependiendo de la cantidad de material de partida que se vaya a tratar y el contenido del compuesto diana en el compuesto de partida. Por ejemplo, se pueden utilizar de 1 a 1000 mL, preferiblemente de 1 a 100 mL de disolvente para 1 g del material de partida.

La pureza del compuesto de la presente invención extraído del material de partida se puede aumentar, si fuera necesario. La pureza se puede incrementar mediante la purificación del extracto. La purificación del extracto se puede realizar por cualquier método conocido por un experto en la técnica, por ejemplo, cromatografía. Los ejemplos de cromatografía incluyen cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía hidrófila, cromatografía de filtración en gel. La pureza se puede evaluar mediante una cromatografía líquida de alto
50 rendimiento, o LC-MS, que es una combinación de la cromatografía líquida de alto rendimiento y una espectrometría de masas.

La estructura química del compuesto de la presente invención se puede analizar utilizando métodos bien conocidos por un experto en la técnica, tales como RMN y análisis de espectro de masas.
60

<Composición que comprende glicósido novedoso>

La presente invención proporciona una composición que comprende el compuesto de la presente invención. Debido a que el compuesto de la presente invención es un glicósido, este se puede utilizar como precursor de aroma. En

otras palabras, el componente de aroma se puede liberar cortando el enlace entre el componente de aroma y el radical de azúcar en el compuesto de la presente invención. Se puede utilizar cualquier método para cortar el enlace entre el componente de aroma y el radical de azúcar en el compuesto de la presente invención. Tal método incluye medios que utilizan ácidos, álcalis, calor o enzimas. Se puede utilizar una enzima hidrolítica como enzima para cortar el enlace entre el componente de aroma y el radical de azúcar. Las enzimas generalmente tienen una alta especificidad de sustrato, por lo que es preferible seleccionar una enzima adecuada de acuerdo con un glicósido para cortar eficientemente el enlace. Las enzimas que se pueden utilizar para cortar el enlace entre el componente de aroma y el radical de azúcar en el compuesto de la presente invención incluyen enzimas con actividad glicosidasa o actividad de hidrólisis de glicósidos.

La composición de la presente invención puede incluir otros componentes. Tales otros componentes incluyen aquellos aprobados como aditivos alimentarios y aquellos que no están aprobados como aditivos alimentarios pero que se reconocen como seguros al haberse consumido en el pasado. Los ejemplos incluyen conservantes, excipientes, edulcorantes, ajustadores de pH, etc. Los ejemplos específicos de conservantes incluyen glicina, acetato de sodio, benzoato de sodio y protamina. Los ejemplos específicos de excipientes incluyen dextrina y almidón. Los ejemplos específicos de edulcorantes incluyen oligosacáridos, glucosa, fructosa, stevia, aspartamo, etc. Los ejemplos específicos de ajustadores de pH incluyen ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido clorhídrico, ácido acético, amoníaco, ácido carbónico, ácido láctico, etc. En una realización, la composición de la presente invención incluye dextrina, oligosacárido o ácido cítrico además del compuesto de la presente invención. La composición de la presente invención puede estar en cualquier forma. Por ejemplo, puede estar en forma de polvo, líquido, comprimidos, gránulos, cápsulas o gel, etc.

Se observa que el compuesto de la presente invención existe en una cantidad de 0,00000001 a 0,00001% en peso en el fruto de café/piel de fruto, y de 0,00001 a 0,1% en peso en los granos de café verde. La composición de la presente invención puede comprender el compuesto de la presente invención en la misma cantidad que el fruto de café o los granos de café verde. La composición de la presente invención puede comprender el compuesto de la presente invención en una cantidad diferente del fruto del café o los granos de café verde.

<Mejora del sabor>

El compuesto o composición de la presente invención se pueden utilizar para mejorar el sabor. El sabor mencionado en esta memoria descriptiva es un gusto limpio, sin sabores no deseados, con una acidez y dulzor equilibrados. Mejorar el sabor se refiere a proporcionar un sabor más preferible. Los ejemplos incluyen mejorar todo el sabor, complementar un sabor insuficiente mejorando un componente aromático específico o agregar un sabor distintivo. El compuesto o composición de la presente invención son aplicables a los alimentos en general para mejorar el sabor, y se pueden aplicar preferiblemente para mejorar el sabor del café, cerveza, vino, whisky, etc., y puede ser aplicable preferiblemente para mejorar el sabor del café. Al referirse simplemente al "café" en esta memoria descriptiva, el término abarca en términos generales productos y productos procesados relacionados con el café, tales como frutos de café, granos de café verde, granos de café tostados, extracto obtenido de frutos de café, extracto obtenido a partir de granos de café verde y extracto obtenido a partir de granos de café tostados. Además, cuando se hace referencia a "granos de café" en esta memoria descriptiva, estos abarcan frutos de café, granos de café verde, granos de café tostados y productos molidos de los mismos, granos de *Coffea* y productos procesados de los mismos.

Cuando el compuesto o composición de la presente invención se aplica para mejorar el sabor del café, se puede utilizar en cualquier etapa de la producción de café. Por ejemplo, los granos de café o un extracto obtenido a partir de granos de café se pueden mezclar con el compuesto o composición de la presente invención. El compuesto o composición de la presente invención se puede aplicar antes de cosechar el fruto del café en la raíz, el tronco, las hojas o el fruto, aumentando así el contenido del compuesto de la presente invención en el fruto del café.

En una realización, después de mezclar los granos de café verde y el compuesto o composición de la presente invención, los granos de café verde se pueden tostar para cortar el enlace entre el componente de aroma y el radical de azúcar en el compuesto de la presente invención por el calor de la tostación, y liberar así el componente de aroma. Por lo tanto, se puede mejorar el aroma de los granos de café tostados. En otra realización, los granos de café tostados o el producto molido de los mismos se mezclan con el compuesto o composición de la presente invención, a continuación, se vierte agua caliente para cortar el enlace entre el componente de aroma y el radical de azúcar en el compuesto de la presente invención mediante el calor del agua caliente, y liberar así el componente de aroma para mejorar el sabor del extracto (también conocido como café por goteo) obtenido de los granos de café tostado o el producto molido del mismo. Como otro ejemplo, el extracto obtenido de los granos de café y el compuesto o composición de la presente invención se pueden mezclar, y a continuación la mezcla se calienta en un momento apropiado antes de beberla para cortar el enlace entre el componente de aroma y el radical de azúcar en el compuesto de la presente invención, de modo que el aroma se puede liberar en el momento deseado. Cuando se utiliza el compuesto o composición de la presente invención para mejorar el sabor, el compuesto o la composición de la presente invención se pueden mezclar con un objetivo de aplicación de modo que la concentración del

componente de sabor libre sea, por ejemplo, de 0,01 a 100 ppb, preferiblemente de 0,1 a 30 ppb, más preferiblemente de 0,1 a 10 ppb. obsérvese que se puede proporcionar un ácido orgánico libre como ejemplo de un componente de aroma libre, y se pueden proporcionar ácido metilcrotónico y ácido isovalérico como ejemplos del ácido orgánico libre.

5

<Evaluación de la calidad del café>

El compuesto de la presente invención se puede utilizar para la evaluación de la calidad del café. Los autores de la presente invención fueron los primeros en descubrir que el compuesto de la presente invención existe en los granos de café, y descubrieron adicionalmente que la cantidad del compuesto de la presente invención está correlacionada con la calidad del café. Es decir, se descubre que el café con un alto contenido del compuesto de la presente invención tiene alta calidad. El compuesto de la presente invención puede ser un precursor de aroma, por lo que el café con un alto contenido del compuesto de la presente invención liberará una gran cantidad de componente de aroma mediante tratamiento térmico en la tostación o extracción, y, por lo tanto, se considera que contribuye a la calidad, sin estar limitado por ello. La evaluación de la calidad por el compuesto de la presente invención incluye extraer el compuesto de la presente invención del café, detectar el compuesto, cuantificar el compuesto y a continuación comparar el valor cuantificado con el de un control. La evaluación de la calidad se puede realizar utilizando granos de café o un extracto obtenido a partir de granos de café, y es preferible utilizar granos de café verde, granos de café tostados, producto molido de granos de café tostados, un extracto obtenido a partir de granos de café verde o un extracto obtenido a partir de granos de café tostados, más preferiblemente, granos de café verdes o granos de café tostados, y más preferiblemente, granos de café verdes. En una realización, la evaluación de la calidad se puede realizar detectando el compuesto de la presente invención en granos de café verde, cuantificando la cantidad del compuesto y comparando con los granos de café verde de control de calidad media. En otra realización, el compuesto de la presente invención se detecta y cuantifica utilizando una parte de granos de café verde sometidos a evaluación, mientras que los granos tostados se preparan a partir del radical de los granos de café verde y se clasifican por la puntuación de cata para considerar la relación entre compuesto de la presente invención y el sabor del café. La "puntuación de cata" significa calificación de sabor en línea con el protocolo de SCAA (Specialty Coffee Associate of America).

Adicionalmente, el compuesto de la presente invención existe en la piel del fruto o la pulpa del fruto del café. De un modo similar a los granos de café verde, se considera que el contenido del compuesto de la presente invención en la piel o pulpa del fruto varía dependiendo de la calidad del café. Por lo tanto, la calidad del café se puede evaluar utilizando piel de la pulpa, la pulpa o el fruto del café, así como utilizando granos de café verde. Es posible clasificar el fruto de café en función del contenido del compuesto de la presente invención evaluando la piel del fruto, la pulpa, el fruto del café o extractos de los mismos, y obteniendo así granos de café verde, que son de calidad controlada. En una realización, el fruto de café puede clasificarse detectando y cuantificando el compuesto de la presente invención en la piel y/o la pulpa del fruto, y comparando el contenido del compuesto de la presente invención con el de una piel de fruta y/o pulpa de control de calidad media.

<Identificación o evaluación de la variedad de café>

El compuesto de la presente invención se puede utilizar para identificar o evaluar la variedad de café. A menudo es difícil distinguir la variedad de café a partir de la apariencia del café. Los inventores de la presente invención encontraron que el contenido del compuesto de la presente invención en granos de café verde difiere dependiendo de la variedad de café. En otras palabras, el contenido del compuesto de la presente invención se puede utilizar como un índice para identificar o evaluar la variedad de café. La identificación o evaluación de la variedad de café comprende la extracción, detección o cuantificación del compuesto de la presente invención a partir del café, y a continuación, la referencia a un conjunto de valores patrón para cada variedad. Por ejemplo, cuando la cantidad cuantificada en una muestra de café está dentro o cerca de un intervalo de un valor patrón de una variedad específica, es posible identificar o evaluar que la muestra de café es de esa variedad específica.

Además, la identificación o evaluación de la variedad de café se puede realizar con granos de café o con un extracto obtenido a partir de granos de café. Por ejemplo, la identificación o evaluación de la variedad de café se puede realizar extrayendo el compuesto de la presente invención de granos de café tostados, un extracto obtenido a partir de granos de café verde o un extracto obtenido a partir de granos de café tostados, detectando y cuantificando el compuesto, y haciendo referencia a un valor patrón establecido para cada variedad.

Además, el compuesto de la presente invención existe en la piel o pulpa del fruto del café. El contenido de la presente invención en la piel o pulpa del fruto puede diferir según la calidad del café, similar al caso de los granos de café verde. Por lo tanto, la variedad de café se puede identificar o evaluar utilizando la piel del fruto, la pulpa o el fruto del café, similar al caso de los granos de café verde. La identificación o evaluación de la variedad de café se puede realizar extrayendo el compuesto de la presente invención de la piel del fruto, la pulpa o el fruto de café, detectando y cuantificando el compuesto y haciendo referencia a un conjunto de valores patrón para cada variedad.

Ejemplos

La presente invención se describe en detalle basándose en los ejemplos proporcionados a continuación. Se entiende que no se desea que los Ejemplos limiten la presente invención de ningún modo.

[Ejemplo 1] Escrutinio de compuestos novedosos

<Purificación del compuesto>

Después de congelar 1,6 kg de granos de café verde (Pacamala) con nitrógeno líquido, los granos de café se molieron con un molino de esferas, y los granos de café verde molido se trataron con 5 litros de hexano para eliminar los componentes lipófilos. Los granos molidos tratados con hexano se sometieron a extracción utilizando 8 litros de metanol del 70% (80°C, 2 h.), y el producto resultante se sometió a filtración utilizando tierra de diatomeas. El residuo se sometió a extracción utilizando 4 litros de metanol al 70%, y el resultado se filtró. Los productos filtrados obtenidos se combinaron entre sí y la mezcla se concentró hasta aproximadamente 1/6 del volumen del volumen original. La concentración se realizó mediante un evaporador rotativo. Además, una parte de la mezcla se sometió a LC-MS para analizar la composición en las mezclas (Figura 1). La espectrometría de masas de alta resolución se realizó mediante LC-MS utilizando Q-Exactive (fabricado por Thermo Fisher Scientific Inc.) en las siguientes condiciones.

Columna: KINETEX C18 (2,1 mm x 250 mm, 1,7 μ m, Phenomenex, CA)
 Temperatura de columna: 40°C
 Fase móvil A: agua + ácido fórmico al 0,1%
 Fase móvil B: acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1%
 Gradiente de concentración de la fase móvil: Concentración de la fase móvil B 5% (0 - 2 min), 5 $\rightarrow$ 55% (2 - 7,5 min), 55 $\rightarrow$ 100% (7,5 min - 17 min), 100% (17 min - 23 min), 100 $\rightarrow$ 5% (23 min - 24 min), 5% (24 min - 32 min)
 Velocidad de flujo de la columna: 0,2 mL/min.
 Método de ionización: ESI, modo positivo, modo negativo
 Voltaje de pulverización: 3,5 kV
 Temperatura capilar: 250°C
 Voltaje capilar: 49V
 Resolución: 70000 (MS, MSMS)
 Rango de escaneo MS: m/z 80 - 1200
 Energía de colisión: 15-45% de normalización

Como resultado, se demostró la existencia de compuestos que tienen m/z 469 (Figura 1(d)) y m/z 471 (Figura 1(e)) como iones seleccionados característicos, a saber, compuesto (1) (m/z 469), compuesto (2) (m/z 471) y el compuesto (3) (m/z 471).

El producto filtrado concentrado se cargó en 1 litro de resina de adsorción HP-20 (Mitsubishi Chemical Co.). La resina se lavó con 3 litros de agua, a continuación, la elución se realizó cargando 3 litros de etanol del 10% y 3 litros de etanol del 20% de manera gradual. Las fracciones obtenidas se sometieron a LC-MS para identificar las fracciones que contenían los compuestos eluidos. El resultado mostró que los compuestos (1), (2) y (3) eluyeron en la fracción de lavado con agua y la fracción de etanol del 10%. La fracción de lavado con agua tenía un mayor contenido de los compuestos.

La fracción de lavado con agua que tenía un mayor contenido de compuestos (1), (2) y (3) se cargó en 1,2 L de resina de adsorción COSMOSIL 18-OPN (tamaño de partícula 140 μ m, fabricada por Nacalai tesque). La resina se lavó con 500 mL de solución de ácido fórmico al 0,1%, a continuación, se cargaron 3 litros de solución de ácido fórmico al 0,1%, 2,5 litros de etanol del 10% que contenía solución de ácido fórmico al 0,1% y 2,5 litros de etanol del 50% que contenía solución de ácido fórmico al 0,1% en la resina de manera gradual para llevar a cabo la elución. Los tres tipos de compuestos se eluyeron en la fracción debido a la elución con 3 L de solución de ácido fórmico al 0,1% y la fracción debido a la elución con 2,5 L de etanol del 10% que contenía solución de ácido fórmico al 0,1%.

Estas fracciones se cargaron en 500 mL de una resina de adsorción COSMOSIL 75C18PREP (tamaño de partícula de 75 μ m, fabricada por Nacalai tesque). La resina se lavó con 500 mL de solución de ácido fórmico al 0,1%, a continuación, se cargaron en la resina de manera gradual 2 litros de solución de ácido fórmico al 0,1%, 2,5 litros de etanol del 10% que contenía solución de ácido fórmico al 0,1% y 2,5 litros de etanol del 20% que contenía solución de ácido fórmico al 0,1% para llevar a cabo la elución. Los tres tipos de compuestos se eluyeron en la fracción debido a la elución con 2 L de solución de ácido fórmico al 0,1% y la fracción debido a la elución con 2,5 L de etanol al 10% que contenía solución de ácido fórmico al 0,1%.

Estas fracciones se purificaron mediante la HPLC preparativa que se muestra a continuación. La columna utilizada fue Develosil-C30-UG-5 (Nomura Chemical Co., Ltd.) 20 mm x 250 mm. Las fases móviles utilizadas fueron A: agua + ácido fórmico al 0,1%, y B: acetonitrilo al 90% + ácido fórmico al 0,1%. La velocidad de flujo se ajustó a 15 mL/min,

con B10% (0 - 14 min), un gradiente lineal de B10 → B25% (14 - 34 min), y a continuación B25% se mantuvo durante 10 min. Una fracción que contenía los compuestos (1) y (2) que se eluyeron a los 7-10 minutos y una fracción que contenía el compuesto (3) que se eluyó a los 11-15 minutos se recogieron y se liofilizaron respectivamente. El proceso de cromatografía se repitió 17 veces.

Los productos liofilizados obtenidos se sometieron respectivamente de nuevo a cromatografía utilizando HPLC preparativa. La columna utilizada fue Shodex Asahipak NH2P-20 20F (Showa Denko K.K.) 20 mm × 300 mm, y las fases móviles utilizadas fueron A: agua y B: acetonitrilo al 90%. El caudal se ajustó a 10 mL/min. La purificación de las fracciones que contenían los compuestos (1) y (2) se realizó bajo las condiciones: B100% (0-12 min) y un gradiente lineal de B100 → B40% (12-90 min). Las fracciones que contenían los compuestos (1) y (2), que se eluyeron a los 26-29 min, se recogieron y se liofilizaron. El proceso de cromatografía se repitió dos veces. La purificación de las fracciones que contenían el compuesto (3) se realizó bajo las condiciones: B100% (0 - 12 min) y un gradiente lineal de B100 → B40% (12 - 60 min). Las fracciones que contenían el compuesto (3) que eluyó a los 22-25 minutos se recogieron y se liofilizaron. El procedimiento de cromatografía se repitió cuatro veces.

Los productos liofilizados obtenidos se sometieron respectivamente de nuevo a cromatografía utilizando HPLC preparativa. Develosil-C30-UG-5 (Nomura Chemical Co., Ltd.) 4,6 mm × 150 mm se utilizó con las fases móviles A: agua + ácido fórmico al 0,1%, y B: acetonitrilo al 90% + ácido fórmico al 0,1%. La velocidad de flujo se ajustó a 1 mL/min. La elución isocrática se realizó con B10% (0-30 min). El compuesto (1) eluido a los 7-8 min, el compuesto (2) eluido a los 8-9 min, el compuesto (3) eluido a los 9-10 min, respectivamente, se recogieron para su liofilización. En consecuencia, se detectaron el compuesto (1) (2,3 mg), el compuesto (2) (2,3 mg) y el compuesto (3) (6 mg). Cuando la pureza de los compuestos (1) a (3) se determinó por LC-MS, se encontró que cada compuesto estaba altamente purificado.

<Determinación de la estructura química>

1. Análisis por espectro de datos de análisis instrumental

Los compuestos purificados (1) a (3) se disolvieron en DMSO-d₆. RMN ¹H, RMN ¹³C, ¹H{¹³C}-HSQC, ¹H{¹³C}-HMBC, TOCSY, DQF-COSY, ¹H-NOESY y ¹H-ROESY se midieron utilizando el dispositivo de RMN (espectrómetro DMX-750) en las condiciones que se muestran a continuación.

[Tabla 1]

RMN ¹ H y desplazamiento químico de RMN ¹³ C de los Compuestos 1, 2 y 3 medidos en DMSO-d ₆						
Posición	1		2		3	
	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	RMN ¹ H	RMN ¹³ C
Radical acilo						
1	-	164,13	-	171,16	-	172,19
2	5,71 (s)	114,91	2,24 (d; 7,0)	42,29	2,20 (m)	42,33
3	-	154,19	2,01 (m)	24,83	1,99 (m)	25,02
4	1,91 (s)	26,9	0,92 (d; 6,7)	22,02	0,91 (d; 6,7)	22,03
5	2,13 (s)	20,02	0,92 (d; 6,7)	22,02	0,91 (d; 6,7)	22,03
Radical de glucosa						
1'	5,36 (d; 8,3)	93,48	5,36 (d; 8,2)	93,86	5,17 (d; 3,6)	91,38
2'	3,11 (m)	72,22	3,11 (m)	72,2	3,20 (m)	71,4
3'	3,23 (m)	76,26	3,23 (m)	76,33	3,48 (m)	72,55
4'	3,19 (m)	69,16	3,18 (m)	69,15	3,06 (m)	70,03
5'	3,39 (m)	76,13	3,41 (m)	76,15	3,90 (m)	69,87
6'a	3,98 (dd; 10,1,1,0)	67,85	3,96 (dd; 11,3,1,0)	67,77	4,24 (dd; 11,7,1,3)	63,36
6'b	3,56 (dd; 10,1,5,5)	-	3,58 (dd; 11,3, 5,5)	-	4,01 (dd; 6,0, 11,7)	-
Radical de glucosa					Fracción de fructosa	
1"	4,16 (d; 7,9)	102,95	4,17 (d; 7,8)	102,94	-	62,03

RMN ¹ H y desplazamiento químico de RMN ¹³ C de los Compuestos 1, 2 y 3 medidos en DMSO-d ₆						
Posición	1		2		3	
	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	RMN ¹ H	RMN ¹³ C	RMN ¹ H	RMN ¹³ C
Radical acilo						
1ab'		-	-	-	3,38 (m)	-
2"	2,96 (m)	73,32	2,95 (m)	73,34	-	103,79
3"	3,11 (m)	76,62	3,11 (m)	76,6	3,87 (d; 8,1)	76,79
4"	3,04 (m)	69,84	3,04 (m)	69,85	3,73 (m)	74,39
5"	3,04 (m)	76,74	3,04 (m)	76,74	3,59 (m)	82,65
6"a	3,65 (dd; 11 2, 5,9)	60,86	3,65 (dd; 11,2, 5,9)	60,89	3,57 (m)	62,50
6"b	3,43 (m)	-	3,44 (m)	-	3,54 (m)	-
Grupo OH de azúcar						
2'(OH)	5,25 (d; 5,5)	-	5,24 (d; 5,5)	-	5,13 (d; 6,0)	-
3'(OH)	5,15 (d; 4,48)	-	5,14 (d; 4,9)	-	4,89 (d; 4,8)	-
4'(OH)	5,07 (d; 5,6)	-	5,07 (d; 5,7)	-	5,01 (d; 5,7)	-
1"(OH)	-	-	-	-	4,81 (t; 6,2)	-
2"(OH)	4,83 (d; 4,8)	-	4,82 (d; 4,8)	-	-	-
3"(OH)	4,90 (d; 4,9)	-	4,90 (d; 4,9)	-	4,56 (d; 8,0)	-
4"(OH)	4,87 (d; 4,6)	-	4,87 (d; 4,5)	-	5,16 (d; 3,6)	-
6"(OH)	4,45 (t; 5,9, 5,9)	-	4,44 (t; 5,9, 5,9)	-	4,40 (t; 5,0,5,0)	-

En el análisis ¹H{¹³C}-HMBC, se observaron picos cruzados de la siguiente manera para los glicósidos (1) a (3): para el glicósido (1), glucosa H-1' (δ5,36) → grupo acilo del carbono carbonílico (δ164,13) y glucosa H-1" (δ4,16) → glucosa C-6' (δ67,85); para el glicósido (2), glucosa H-1' (δ5,36) → grupo acilo del carbono carbonílico (δ171,16), y glucosa H-1" (δ4,17) → glucosa C-6' (δ67,85); y para el glicósido (3), glucosa H-6a' (δ4,01) y glucosa H-6b' (δ4,24) → grupo acilo del carbono carbonílico (δ172,19) y glucosa H-1' (δ5,17) → fructosa C-2" (δ103,79).

A continuación, los compuestos purificados (1) a (3) se sometieron a LC-Orbitrap-MS establecido en las condiciones que se muestran a continuación, y se determinaron sus estructuras químicas. Para los compuestos (1) a (3) se realizaron la espectrometría de masas (ESI-MS) (Tabla 2) y un análisis de los fragmentos principales de los espectros de masas ESI (ESI-MS/MS) (Tabla 3).

[Tabla 2]

Espectrometría de masas de los compuestos (1) a (3)			
	1	2	3
<i>m/z</i> (observado)	469,1554	471,1710	471,1709
Composición	C ₁₈ H ₂₉ O ₁₄	C ₁₈ H ₃₁ O ₁₄	C ₁₈ H ₃₁ O ₁₄
Misa teórica	469,1557	471,1714	471,1714
Delta (ppm)	-0,64	-0,85	-1,06
RDB equiv,	4,5	4,5	4,5

[Tabla 3]

Fragmento principal de los espectros de masas ESI de los compuestos (1) a (3)			
<i>m/z</i>	1	2	3
471,171		[M+HCO ₂ H-H] ⁻	[M+HCO ₂ H-H] ⁻
469,155	[M+HCO ₂ H-H] ⁻		

Fragmento principal de los espectros de masas ESI de los compuestos (1) a (3)			
<i>m/z</i>	1	2	3
425,167		[M-H] ⁻	[M-H] ⁻
423,151	[M-H] ⁻		
323,098	[M-A ^a -H] ⁻	[M-A ^a -H] ⁻	[M-A ^a -H] ⁻
179,056	[M-A- (Hexosa-H ₂ O)-H] ⁻	[M-A- (Hexosa-H ₂ O)-H] ⁻	[M-A-(Hexosa-H ₂ O)-H] ⁻
^a A = radical acilo (para el compuesto 1: ácido 3-metilbut-2-enoico; compuestos 2 y 3: ácido 3-metilbutanoico)			

2. Análisis de la composición del azúcar

Los glicósidos (1) a (3) se sometieron a hidrólisis ácida para analizar la composición del azúcar. Los glicósidos (1) a (3) (a 200 µg cada uno) se disolvieron respectivamente en 0,2 mL de HCl 6N, y se incubaron durante una hora a 100°C. Después de la incubación, una parte de la solución de reacción se sometió a análisis utilizando LC-RI en las siguientes condiciones. Los azúcares patrón (D-glucosa, D-fructosa, D-galactosa, D-manosa) se hicieron reaccionar en condiciones similares y se analizaron. Los resultados se muestran en la Figura 2. Al comparar el tiempo de retención de LC de los glicósidos con el de los azúcares patrón, se confirmó que el glicósido (1) y el glicósido (2) incluyen glucosa, y el glicósido (3) incluye glucosa y fructosa.

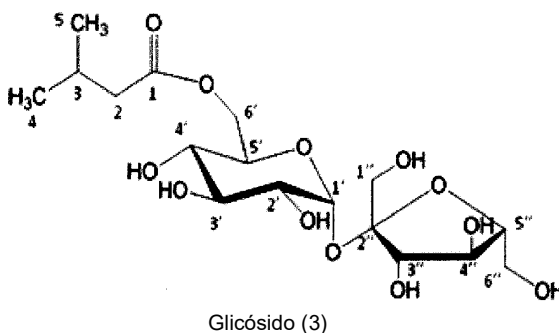
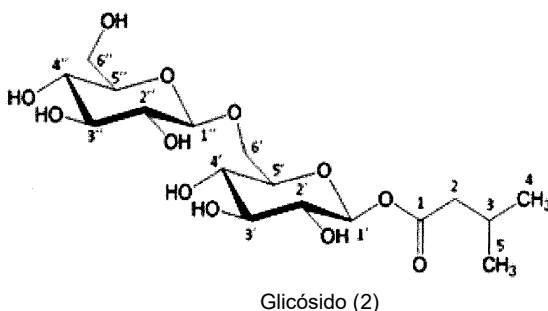
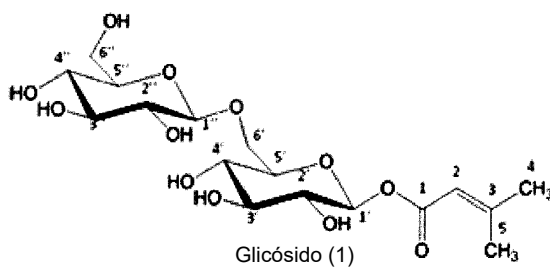
Condiciones del análisis LC-RI:

- Columna: Columna Shodex SUGAR SP080 (300 x 0,8 mm, tamaño de partícula 7 µm)
- Temperatura de columna: 80°C
- Fase móvil: agua (isocrática)
- Velocidad de flujo de la columna: 0,6 mL/min

El análisis de los datos anteriores indicó que los compuestos (1) a (3) son respectivamente los glicósidos (1) a (3) con las siguientes estructuras y nombres de compuestos.

Glucósido (1): 3-metil-2-butenoil-β-gentiobiosido
 Glucósido (2): 3-metil-butenoil-β-gentiobiosido
 Glucósido (3): 3-metil-butenoil-sucrosido

[Fórmula 3]



Como resultado de la búsqueda en la base de datos de compuestos, se encontró que los glicosidos (1) y (2) son compuestos novedosos que se desconocían en este momento. Por otro lado, se encontró que el glicosido (3) correspondía a un compuesto referido en el Documento No Relacionado con Patentes 4. Obsérvese que los compuestos (1) a (3) respectivamente significan lo mismo que los glicosidos (1) a (3), y se puede utilizar indistintamente en esta memoria descriptiva.

[Ejemplo 2] Mejora del sabor del café

<Reacción de pirólisis de los glicosidos>

Para servir como modelo de reacción térmica causada por la tostación de granos de café verde, los glicosidos (1) a (3) purificados por medio del método del Ejemplo 1 se calentaron respectivamente con un pirolizador (200°C, 10 min) y se sometieron a GC- EM. La GC-MS se realizó bajo las siguientes condiciones.

- Dispositivo: Pirolizador de doble disparo (Pyolyzer) fabricado por Frontier Lab, 7890A (GC), 5975C (MS) fabricado por Agilent Technologies
- Condiciones de pirólisis: 230°C, 10 min.
- Columna: DB-WAXetr (60 m × 0,32 mm × 0,25 μm) fabricado por GESTEL
- Temperatura de columna: 40°C (2 min) - 40°C/min - 250°C (5 min)
- Gas portador: He
- Línea de transferencia: 250°C
- Temperatura de la fuente de iones: 230°C
- Parámetro de escaneo: m/z = 33 a 450
- Razón de división: 10:1

El resultado se muestra en la Fig. 3. Cuando se calentó el glicósido (1), se detectó un compuesto que tenía un tiempo de retención (RT) de 33,38 min. Cuando se calentó el glicósido (2), se detectó un compuesto que tenía una RT de 29,00 min. Cuando se calentó el glicósido (3), se detectó un compuesto que tenía una RT de 29,00 min. Al realizar una búsqueda en la biblioteca del espectro de masas, se confirmó que el compuesto de RT 33,38 min era ácido metilcrotónico, y se confirmó que el compuesto de RT 29,00 min era ácido isovalérico.

Este resultado sugiere que los glicósidos (1) a (3) se descomponen pirolíticamente en el proceso de tostado de los granos de café verde, generando ácido metilcrotónico a partir del glicósido (1), ácido isovalérico a partir del glicósido (2) y ácido isovalérico a partir del glicósido (3).

<Efecto en la mejora del sabor del café>

Se examinaron los efectos del ácido metilcrotónico generado al calentar el glicósido (1) y el ácido isovalérico generado al calentar el glicósido (2) sobre el sabor del café.

Después de moler 30 mL de granos de café guatemalteco tostados con calidad media, se añadieron por goteo 300 mL de agua caliente sobre los granos de café molido. El extracto de café resultante se utilizó como control de café por goteo. El café por goteo se mezcló con ácido metilcrotónico (10 ppb) y ácido isovalérico (10 ppb) para realizar la evaluación del sabor en seis paneles.

Se realizó una puntuación sensorial de acidez, limpieza y amargor en el retrogusto. En la evaluación del sabor, se utilizaron dos patrones: el café de control por goteo (café por goteo obtenido a partir de granos de café guatemalteco tostados de calidad media); y café por goteo obtenido a partir de granos tostados de café elaborados tostando granos de café verde que tienen una alta puntuación de sabor, utilizados en el Ejemplo 3. La acidez, la limpieza y el amargor en el retrogusto del café por goteo de control se evaluaron cada uno como 3 puntos. La acidez y la limpieza del café por goteo derivado de granos de café verde con una puntuación alta en sabor se evaluaron como 5 puntos, y el amargura en el retrogusto se evaluó como 1 punto.

El resultado se muestra en la Fig. 4. En comparación con el café por goteo de control, el café por goteo mezclado con ácido isovalérico y ácido metil crotónico tiene una alta acidez y limpieza, y un bajo amargor en el retrogusto.

Adicionalmente, los panelistas comentaron que el ácido isovalérico añadió particularmente una acidez afrutada al café por goteo, y que el ácido metilcrotónico añadió suavidad al café por goteo al reducir el amargor en el retrogusto. Estos resultados indican claramente que se mejoró el sabor del café mediante la adición de ácido metilcrotónico y ácido isovalérico.

[Ejemplo 3] Evaluación de la calidad del café

Se realizó un estudio sobre si los glicósidos (1) a (3) se pueden utilizar para evaluar la calidad del café. Los contenidos de glicósidos en los granos de café verde de alta calidad se compararon con los de los granos de café verde de calidad media para considerar si existe una interrelación entre la calidad de los granos de café verde y el contenido de glicósidos. En el estudio se utilizaron los siguientes granos de café verde.

- Granos de café verde de alta calidad (granos de café verde con alta puntuación de sabor): granos de café verde de montaña azul de Jamaica, se retiraron los granos defectuosos, tamiz 18
- Granos de café verde de calidad media: granos de café verde de Guatemala, se retiraron granos defectuosos, tamiz 18

Se obtuvo un extracto de granos de café verde según el método descrito en el Ejemplo 1, y el análisis se realizó detectando un ion seleccionado m/z 469, que es característico en el glicósido (1), y un ion seleccionado m/z 471, que es característico en los glicósidos (2) y (3), como índices.

El resultado del análisis se muestra en la Figura 5. Las áreas de los picos de m/z 469 y m/z 471 fueron altas en los granos de café verde de alta calidad con respecto a los granos de café verde de calidad media. En otras palabras, se demostró que los contenidos de glicósido (1), glicósido (2) y glicósido (3) eran altos en granos de café verde de alta calidad en comparación con los granos de café verde de calidad media.

Por lo tanto, se demostró que el contenido de uno del glicósido (1), glicósido (2) o glicósido (3) se puede utilizar como índice para evaluar la calidad de los granos de café verde. También se demostró que la calidad de los granos de café verde se puede evaluar utilizando los contenidos de glicósidos (1) y (2), glicósidos (2) y (3), glicósidos (1) y (3) o glicósidos (1) a (3) como índices.

[Ejemplo 4] Evaluación de calidad del café

Los granos de café verde que difieren en cualidades se compararon para investigar la correlación de la calidad de los granos de café verde y los glicósidos (1) a (3).

Se prepararon treinta y seis tipos de granos de café verde guatemaltecos y se tostó una parte de cada tipo de granos de café verde guatemaltecos (valor L: 22-23), a continuación, se asignó una puntuación de cata a cada tipo de granos de café verde según el Protocolo SCAA (Specialty Coffee Associate of America). Además, los restos de cada grano de café verde se congelaron con nitrógeno líquido, y se molieron con un molino de esferas, a continuación, el producto molido se trató con hexano. El producto molido tratado con hexano se trató con metanol del 70% para obtener un extracto. El extracto se sometió a LC-MS ajustada a las siguientes condiciones. El extracto se midió a N = 3.

Dispositivo: LC-MS-IT-TOF (Shimadzu)

Columna: Luna-C18 (1,0 mm × 250 mm, 5 µm, fabricada por Phenomenex, CA)

Temperatura de la columna: 40°C

Fase móvil A: agua + ácido fórmico al 0,1%

Fase móvil B: acetonitrilo + ácido fórmico al 0,1%

Gradiente de concentración de la fase móvil: Concentración de la fase móvil B 5% (0 - 2 min), 5 → 55% (2 - 7,5 min), 55 → 100% (7,5 min - 17 min), 100% (17 min - 23 min), 100 → 5% (23 min - 24 min), 5% (24 min - 32 min)

Velocidad de flujo de la columna: 0,1 mL/min.

Método de ionización: ESI, modo positivo, modo negativo

Voltaje de pulverización: +4,5 kV (modo positivo), -3,5 kV (modo negativo)

Flujo de gas nebulizador: 1.5 L/min.

Temperatura CDL: 250°C

Temperatura del bloque térmico: 250°C

Rango de escaneo MS: m/z 80 - 800

El ion seleccionado m/z 447 (modo positivo), que es característico en el glicósido (1), y el ion seleccionado m/z 449 (modo positivo), que es característico en los glicósidos (2) y (3), se utilizaron como índices para identificar los picos correspondientes a los glicósidos (1) a (3) para medir las áreas de los picos de cada glicósido. El área del pico para cada glicósido se normalizó mediante la suma de los recuentos totales de iones. Se crearon diagramas relacionados con la puntuación de cata y el área del pico normalizada para cada uno de los glicósidos (1) a (3) (Figura 6). La Figura 6 mostró que los granos de alta calidad tienden a contener los glicósidos (1) a (3) en grandes cantidades. Como ejemplo típico, los valores cuantificados de glicósidos (1) a (3) de granos de café verde con una puntuación de cata de 81 puntos fueron los siguientes. Glucósido (1): 0,017% en peso, glicósido (2): 0,018% en peso, glicósido (3): 0,019% en peso.

El resultado anterior mostró que existe una correlación entre las áreas de los picos de los glicósidos (1) a (3) y la puntuación de cata. En otras palabras, las cantidades existentes de los glicósidos (1) a (3) se utilizaron como índices para predecir la calidad del café.

[Ejemplo 5] Identificación o evaluación de la variedad de café

Se estudió si existe una diferencia en el contenido de glicósidos entre las diferentes variedades de café. Se utilizaron los siguientes granos de café verde. Los glicósidos (1) a (3) se extrajeron, detectaron y cuantificaron según el método del Ejemplo 1.

Tabla 41

Núm.	Granos de café verde
1	Guatemala Pacamala
2	Guatemala SHB
3	Jamaica Typica
4	Brasil 4/5
5	Vietnam G1

El resultado se muestra en la Figura 7. Se encontró que los contenidos de glicósidos (1) a (3) difieren mucho entre las diferentes variedades. En otras palabras, se demostró que el contenido de glicósido (1), glicósido (2) o glicósido (3) se puede utilizar como índice para identificar o evaluar la variedad de granos de café verde. Además, se demostró que es posible identificar o evaluar la variedad de granos de café verde combinando los contenidos de glicósidos (1) y (2), glicósidos (2) y (3), glicósidos (1) y (3) o glicósidos (1) a (3).

Además, se encontró que la proporción del contenido de glicósidos (1) a (3) tenía características en cada variedad.

Por lo tanto, se demostró que la variedad de granos de café verde se puede identificar o evaluar utilizando la razón de los contenidos de glicósidos (1) a (3) como índices.

[Ejemplo 6] Glucósido ácido orgánico en pulpa o piel de fruta de café

5 Este ejemplo tenía la intención de extraer glicósidos de ácidos orgánicos de la pulpa o piel del fruto del café, y confirmar su existencia.

10 El fruto del café (variedad: Red Catuai) se congeló con nitrógeno líquido, se separó en piel/pulpa del fruto y granos. La piel/pulpa del fruto se molió con un molino de esferas para obtener un extracto según el método descrito en el Ejemplo 1. El análisis se realizó ajustando el ion seleccionado m/z 469, que es característico en el glicósido (1), y el ion seleccionado m/z 471, que es característico en los glicósidos (2) y (3), como índices (Fig. 8).

15 El resultado indica claramente que también existen glicósidos (1) a (3) en la piel/pulpa del fruto. Esto significa que la piel/pulpa del fruto se puede utilizar para extraer glicósidos, realizar análisis de calidad del café e identificar o evaluar la variedad de café.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto seleccionado entre 3-metil-2-butenoil- β -gentiobiósido o 3-metil-butenoil- β -gentiobiósido.
- 5 2. Una composición que comprende un compuesto según la reivindicación 1 y otro componente seleccionado del grupo que consiste en conservantes, excipientes, edulcorantes y ajustadores de pH.
3. La composición según la reivindicación 2, en donde la composición comprende adicionalmente 3-metil-butenoil-sucrósido.
- 10 4. Una mezcla que comprende la composición según la reivindicación 2 o 3 y granos de café o extractos obtenidos a partir de granos de café.
- 15 5. El uso de 3-metil-2-butenoil- β -gentiobiósido, 3-metil-butenoil- β -gentiobiósido o 3-metil-butenoil-sucrósido para mejorar el sabor de los granos de café o de los extractos obtenidos a partir de granos de café.
- 20 6. Un método para mejorar el sabor de los extractos obtenidos a partir de granos de café que comprende mezclar granos de café o extractos obtenidos a partir de granos de café con 3-metil-2-butenoil- β -gentiobiósido, 3-metil-butenoil- β -gentiobiósido o 3-metil-butenoil-sucrósido.
7. Un método para evaluar la calidad de granos de café o extractos obtenidos a partir de granos de café que comprende detectar 3-metil-2-butenoil- β -gentiobiósido, 3-metil-butenoil- β -gentiobiósido o 3-metil-butenoil-sucrósido en granos de café o extractos obtenido a partir de granos de café.
- 25 8. Un método para evaluar la calidad de granos de café o extractos obtenidos a partir de granos de café según la reivindicación 7, que comprende detectar
 - i) 3-metil-2-butenoil- β -gentiobiósido y 3-metil-butenoil- β -gentiobiósido,
 - 30 ii) 3-metil-butenoil- β -gentiobiósido y 3-metil-butenoil-sucrósido,
 - iii) 3-metil-2-butenoil- β -gentiobiósido y 3-metil-butenoil-sucrósido, o
 - iv) 3-metil-2-butenoil- β -gentiobiósido, 3-metil-butenoil- β -gentiobiósido y 3-metil-butenoil-sucrósido,en granos de café o extractos obtenidos a partir de granos de café.
- 35 9. Un método para identificar o estimar una variedad de café que comprende detectar 3-metil-2-butenoil- β -gentiobiósido, 3-metil-butenoil- β -gentiobiósido o 3-metil-butenoil-sucrósido en granos de café o extractos obtenidos a partir de granos de café.
- 40 10. Un método para identificar o estimar una variedad de café según la reivindicación 9, que comprende detectar
 - i) 3-metil-2-butenoil- β -gentiobiósido y 3-metil-butenoil- β -gentiobiósido,
 - ii) 3-metil-butenoil- β -gentiobiósido y 3-metil-butenoil-sucrósido,
 - iii) 3-metil-2-butenoil- β -gentiobiósido y 3-metil-butenoil-sucrósido, o
 - 45 iv) 3-metil-2-butenoil- β -gentiobiósido, 3-metil-butenoil- β -gentiobiósido y 3-metil-butenoil-sucrósido,en granos de café o extractos obtenidos a partir de granos de café.

[Figura 1]

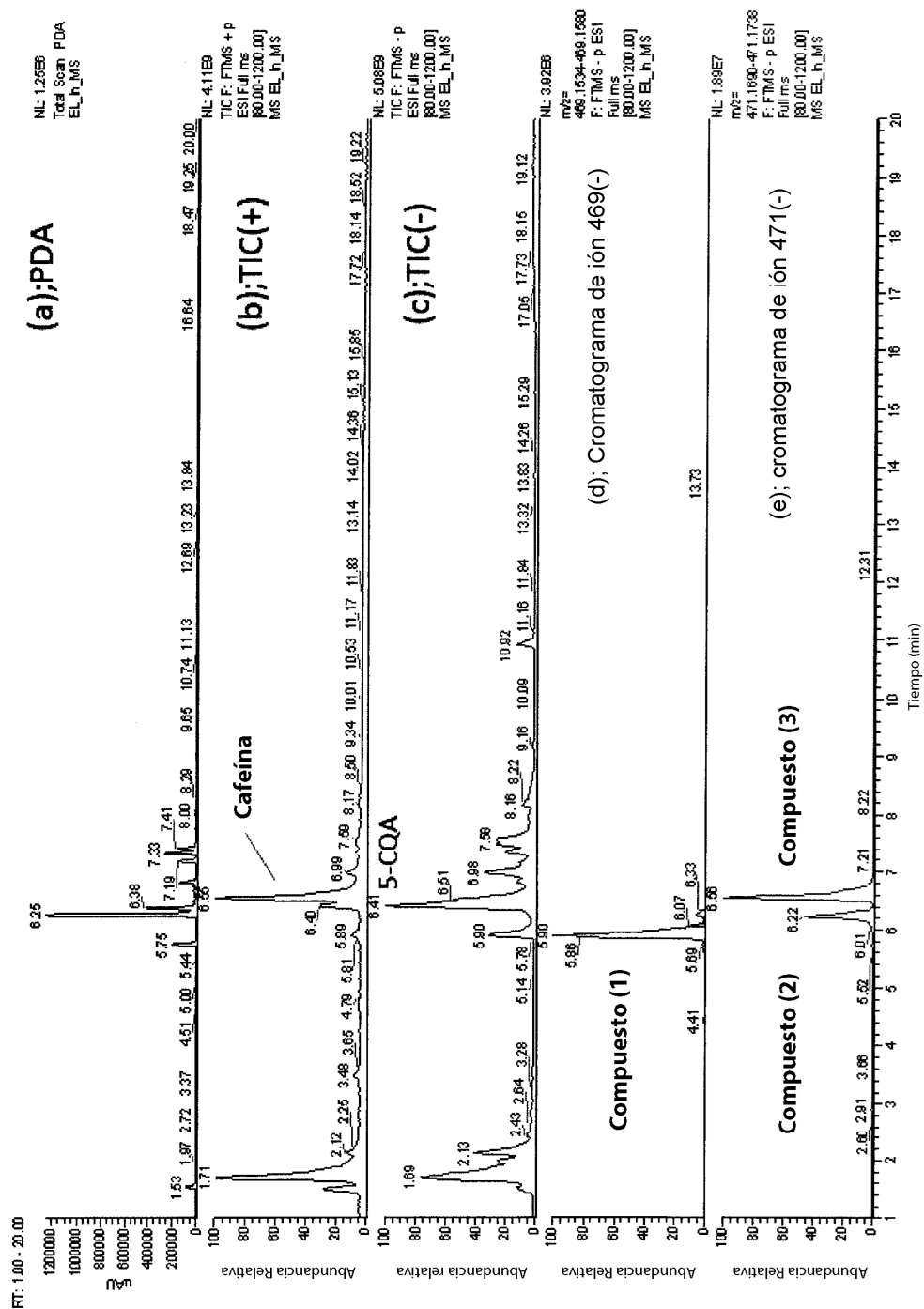
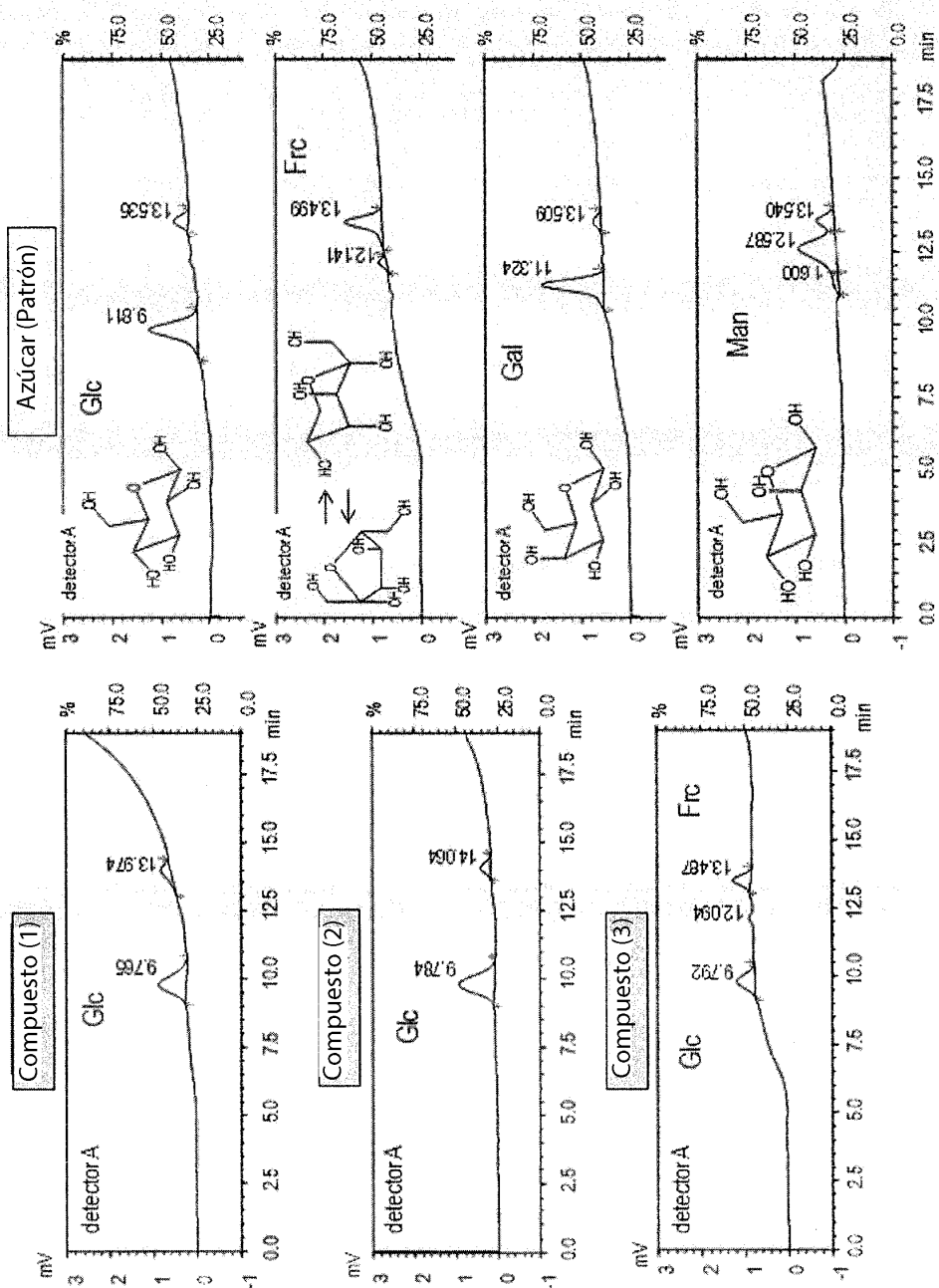
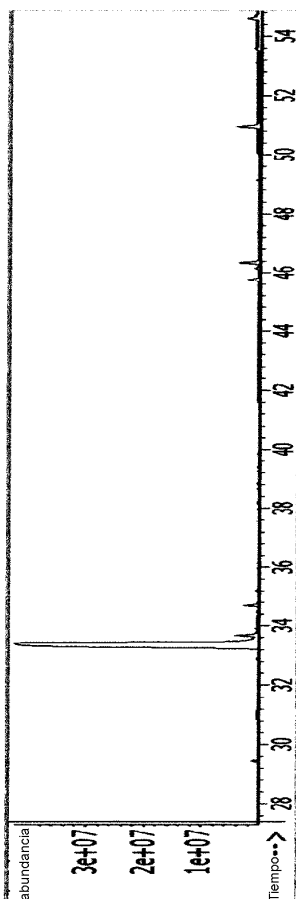


Figura 2

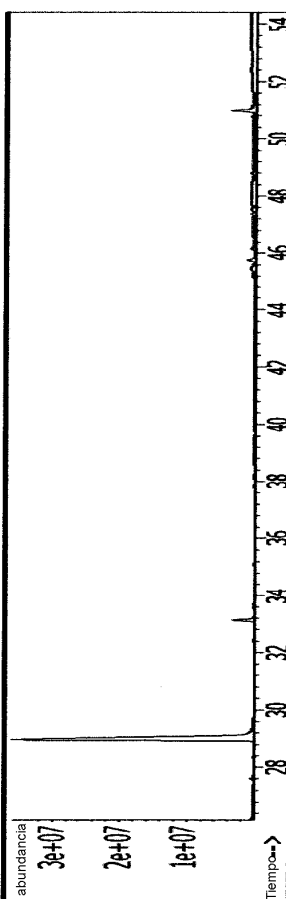


[Figura 3]

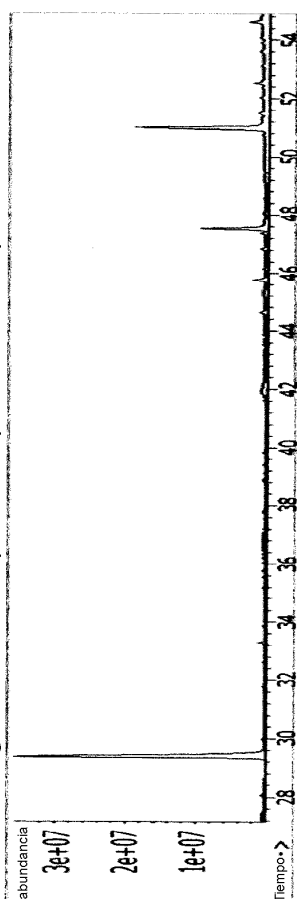
(a) Cromatograma GCMS después de la pirólisis del Compuesto (1)



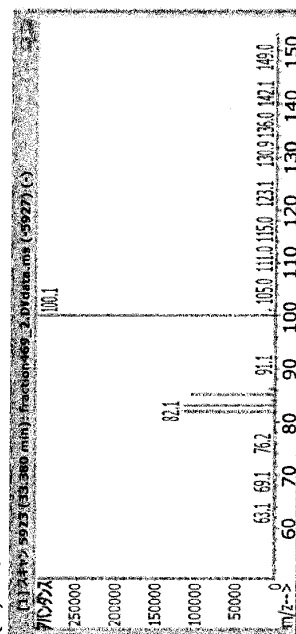
(c) Cromatograma GCMS después de la pirólisis del Compuesto (2)



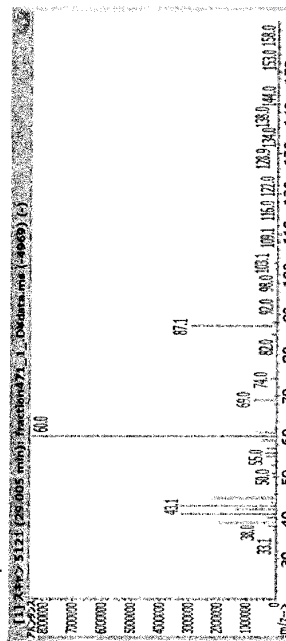
(e) Cromatograma GCMS después de la pirólisis del Compuesto (3)



(b) Espectro MS de (a) a RT 33,38 min



(d) Espectro MS de (c) a RT 29,00 min



(f) Espectro MS de (e) a RT 33,38 min

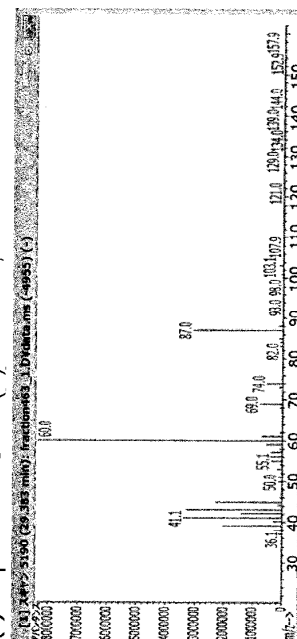


Figura 4

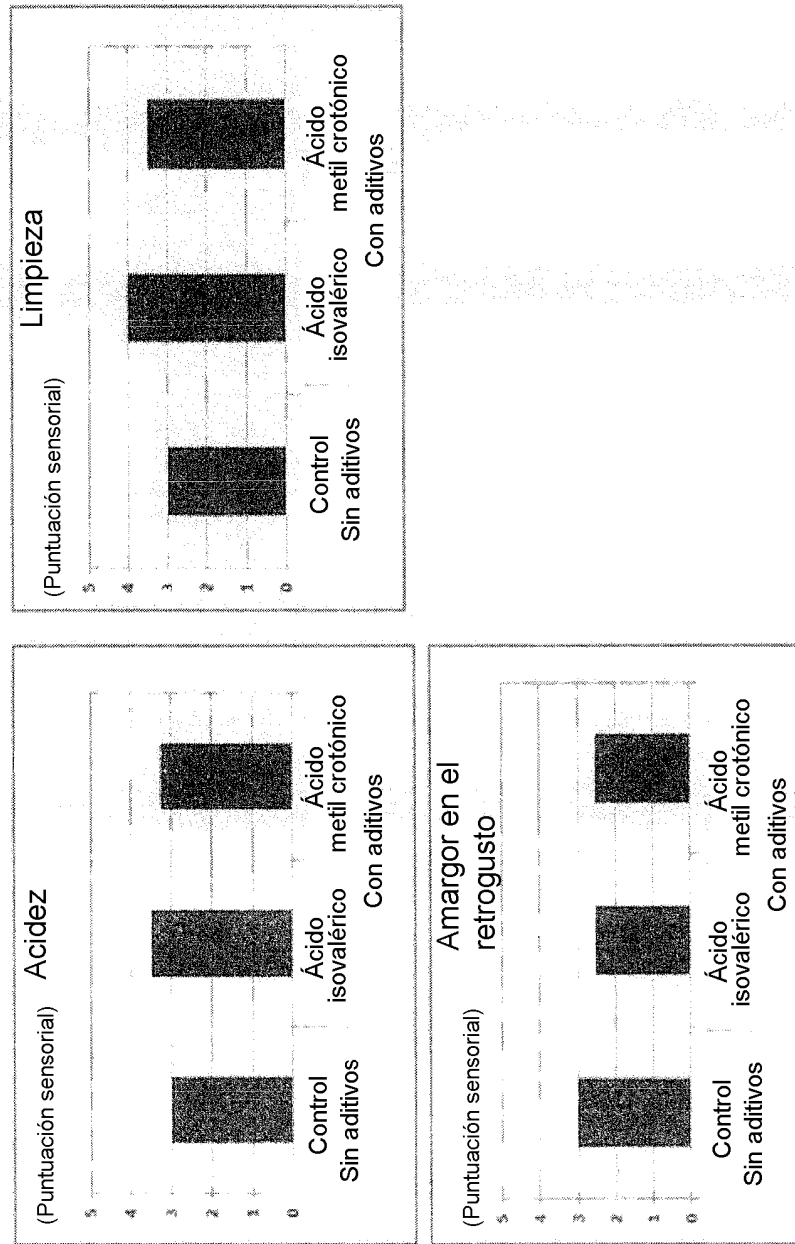


Figura 5

Calidad de sabor y contenido de glicósido de los granos de café verde

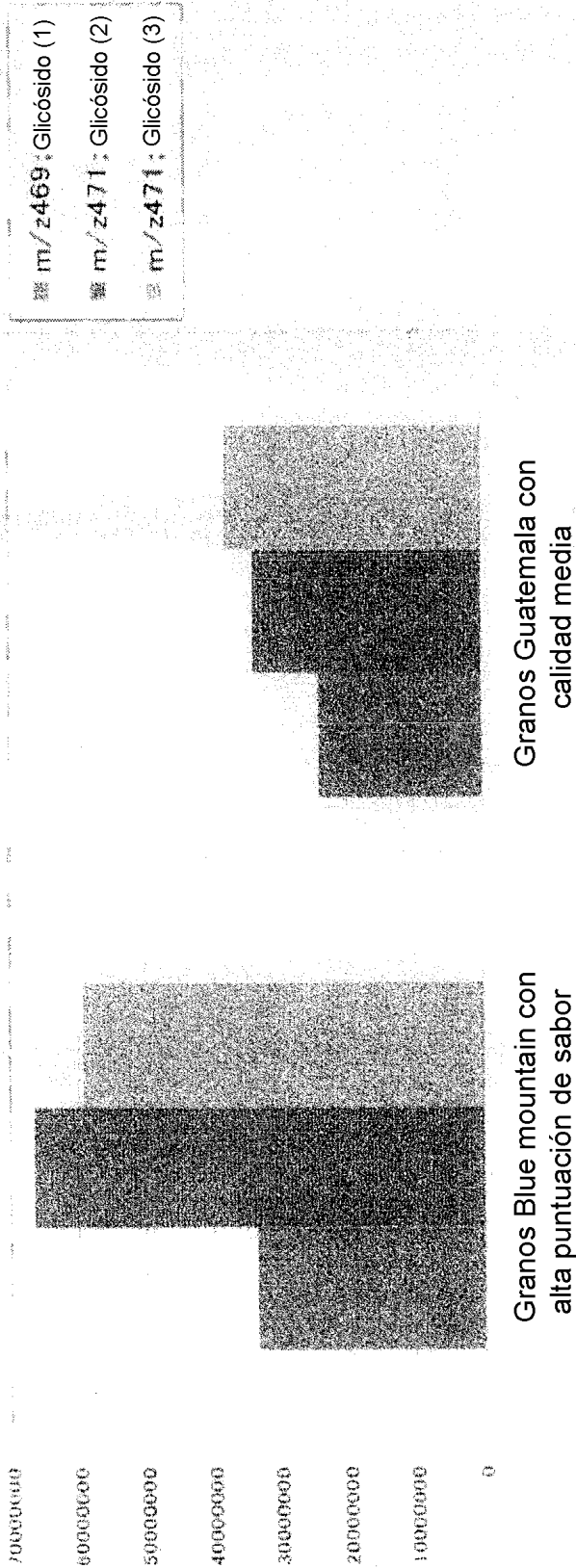
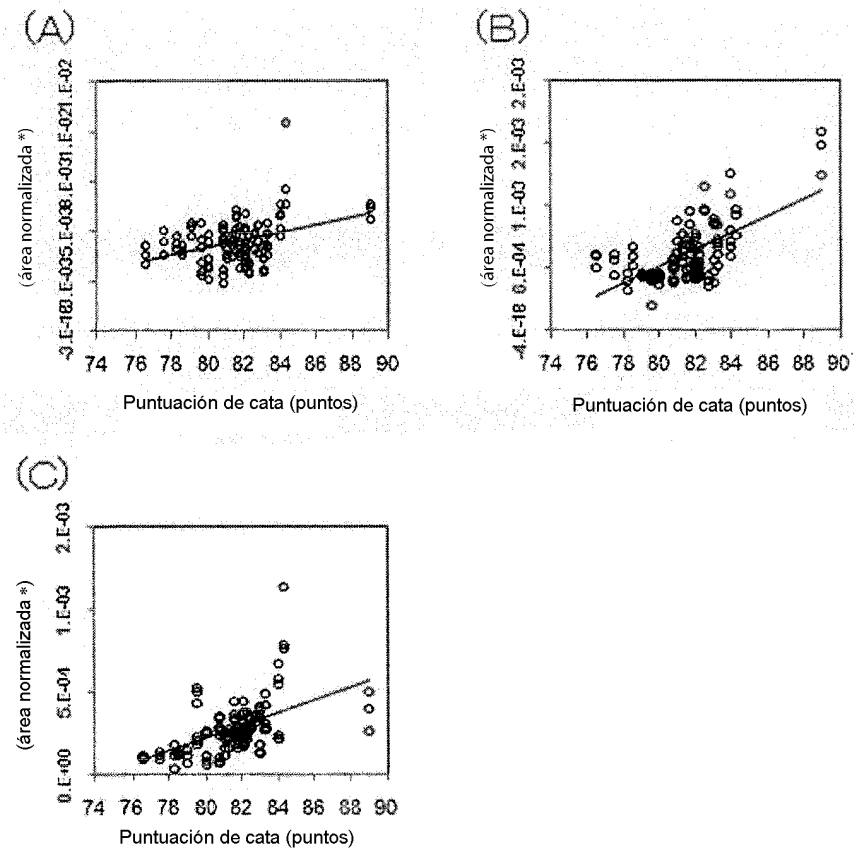


FIGURA 6

* Área normalizada

El área detectada se normalizó mediante la suma de iones totales

Figura 7

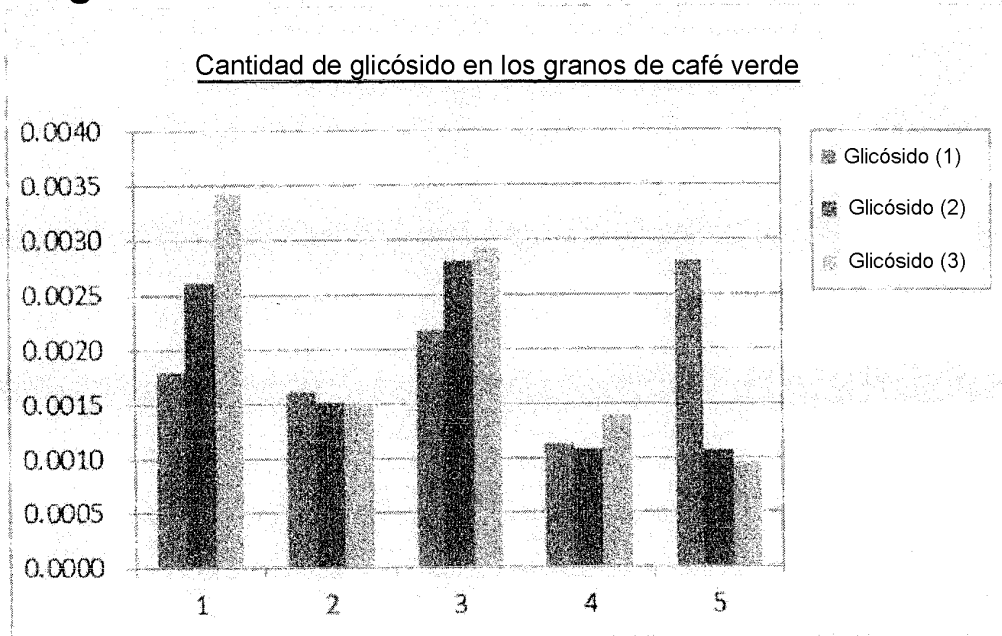


Figura 8

