



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 380**

51 Int. Cl.:
C08B 37/18 (2006.01)
A23L 1/00 (2006.01)
A23L 1/308 (2006.01)
A61K 8/73 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07724952 .2**
96 Fecha de presentación : **27.04.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2027161**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2009**

54 Título: **Inulina de longitud de cadena muy elevada.**

30 Prioridad: **28.04.2006 EP 06090066**
02.05.2006 US 796818 P
27.10.2006 EP 06090199
30.10.2006 US 855248 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.08.2011

73 Titular/es: **Bayer CropScience AG.**
Alfred-Nobel-Strasse 50
40789 Monheim am Rhein, DE

72 Inventor/es: **Meuser, Friedrich;**
Bauer, Ingo;
Hellwege, Elke y
Pilling, Jens

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 363 380 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

Inulina de longitud de cadena muy elevada

5 La invención se refiere a una inulina de cadena particularmente larga y su preparación a partir de raíces de alcachofa, a su uso en productos alimentarios y preparaciones cosméticas y a productos alimentarios y preparaciones cosméticas que comprenden la inulina de cadena particularmente alta.

10 La demanda de productos alimentarios que contienen poca grasa y materias primas más naturales ha aumentado enormemente en las décadas recientes. Muchas sustancias se han propuesto como sustitutos de las grasas, tales como productos en base a carbohidratos o proteína o sustitutos de grasa sintéticos tales como poliésteres de azúcar o ácidos grasos. Sin embargo, estos siempre tienen desventajas tales como una estabilidad térmica baja, una "sensación en la boca" insatisfactoria o un efecto indeseado sobre las personas o el ambiente.

Durante mucho tiempo se ha sabido que la inulina es adecuada para su uso en productos alimenticios. La inulina tiene un valor de energía bajo disponible para seres humanos y por tanto el uso de la inulina como un sustituto de las grasas asegura una reducción grande en el valor calorífico del producto final. Adicionalmente, la inulina se usa como adición prebiótica y agente de volumen en productos alimentarios.

15 La inulina es un polisacárido que pertenece al grupo fructano. La misma consiste en una cadena enlazada a beta-2-1 de moléculas de fructosa y esta cadena puede tener una unidad de alfa-D-glucosa en el extremo reductor. La inulina se encuentra en cantidades económicamente recuperables en diversas plantas tales como, por ejemplo, raíces de achicoria, alcachofa de Jerusalén y tubérculos de dalias. Las longitudes de cadena promedio de las diversas inulinas y sus propiedades fisicoquímicas difieren de especie de planta en especie de planta.

20 Las inulinas empleadas hasta la fecha en el sector de los productos alimentarios no son completamente satisfactorias en sus propiedades de procesamiento tales como, por ejemplo, viscosidad en forma pastosa acuosa, estabilidad térmica y estabilidad al ácido, emulsionabilidad y capacidad higroscópica.

Además existe una necesidad de inulinas con propiedades de fermentación mejoradas y un efecto prebiótico mayor.

25 Un problema adicional es que a la extracción de inulina con agua caliente a partir del tejido vegetal, el extracto contiene además del polímero de inulina crudo también monosacáridos tales como glucosa y fructosa, disacáridos tales como sacarosa y fructooligosacáridos (DP 3-10). Estos subproductos (mono y disacáridos, fructooligosacáridos (DP 3-10) pueden interferir con el procesamiento posterior de la inulina. Por ejemplo, los mono y disacáridos son indeseados en la preparación de productos alimenticios dietéticos. El sabor dulce de los mono y disacáridos y los fructooligosacáridos (DP 3-10) interfiere con determinadas aplicaciones en el sector de los productos alimenticios.

30 Los fructooligosacáridos (DP 3-10) pueden, debido a su higroscopicidad y pegajosidad, interferir enormemente con el uso de inulina cruda en productos alimenticios tanto durante el procesamiento como durante el almacenamiento. Durante el procesamiento adicional de la inulina cruda, por ejemplo mediante derivatización química, los mono y disacáridos y fructooligosacáridos (DP 3-10) pueden conducir a mezclas indefinidas de productos que se pueden purificar únicamente mediante procedimientos costosos o que no se pueden purificar de ninguna manera. Además, una proporción elevada de azúcares reductores tiene la desventaja de que en procedimientos térmicos en presencia de compuestos amino puede haber reacciones de pardeamiento no deseadas, la formación de sabores anormales y la producción de acrilamida (reacción de Maillard).

La presente invención se basa en el objeto de proporcionar una inulina con la cual es posible solucionar los problemas definidos anteriormente.

40 La intención consiste en particular en conseguir propiedades de procesamiento provechosas para aplicaciones en la industria cosmética y de productos alimentarios. Los ejemplos de las mismas son un comportamiento de viscosidad provechoso, una estabilidad térmica elevada y estabilidad al ácido, una buena emulsionabilidad y una capacidad higroscópica elevada.

45 Un problema abordado por la invención fué proporcionar adicionalmente una inulina que tuviera propiedades de fermentación mejoradas y efecto prebiótico mejorado para aplicaciones de productos alimentarios.

Finalmente, se consideró deseable proporcionar una inulina que, en comparación con la inulina cruda, tuviera un contenido menor de mono y disacáridos y de fructooligosacáridos (DP 3-10).

Los problemas anteriores se solucionan mediante la provisión de las realizaciones definidas en las reivindicaciones.

50 La presente invención se refiere a una inulina que tiene un grado promedio de polimerización DP_w , determinado por GPC-RI-MALLS, de entre 65 y 81, preferentemente entre 65 y 79, aún más preferentemente entre 66 y 78, muy particularmente incluso más preferentemente entre 66 y 76, aún más preferentemente entre 66 y 74 y lo más preferente es que esté entre 66-73, caracterizada porque la inulina está secada por pulverización.

En dicho contexto y con respecto a la presente invención, el término "entre" también tiene por objeto incluir los límites numéricos indicados respectivamente.

El término “inulina” tiene por objeto significar con relación a la presente invención un polifructano que consiste en una cadena enlazada a beta-2-1 de moléculas de fructosa. Esta cadena preferentemente tiene en su extremo una unidad de alfa-D-glucosa reductora.

- 5 Con respecto a la presente invención, la expresión “grado promedio de polimerización DP_w ” (peso de DP promedio) significa el cociente de la masa molecular promedio en peso M_w y la masa molecular del monómero M_0 . La masa molecular promedio en peso M_w se produce como resultado a partir de

$$M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i},$$

En lo que N_i es el número de moléculas con masa molecular M_i .

- 10 El “grado promedio de polimerización DP_w ” se mide con relación a la presente invención mediante el procedimiento de “cromatografía de permeación en gel con detección de dispersión de luz e índice de refracción (sistema GPC-RI-MALLS)” descrito en lo sucesivo en el presente documento.

- 15 La inulina de la invención muestra, en comparación con inulinas descritas en la técnica anterior, la ventaja sorprendente de que se puede procesar hasta cremas que muestran estabilidad inusualmente elevada al tratamiento con calor o tratamiento con ácido, de forma que son más adecuadas por ejemplo para aplicaciones industriales particulares o aplicaciones en las industrias cosmética y/o de productos alimenticios. Además, las cremas que comprenden la inulina de la invención muestran una estabilidad inesperadamente elevada hacia fuerzas de cizallamiento. La inulina de la invención por tanto muestra la ventaja adicional, en comparación con la inulina convencional, de que se puede procesar mejor en procedimientos industriales en los que actúan fuerzas de cizallamiento fuertes.

- 20 La inulina de la invención es además notable para las propiedades de viscosidad particularmente provechosas y una resistencia de gel elevada y una solubilidad muy baja, que es provechosa para aplicaciones de productos alimentarios.

Además, la inulina de la invención muestra propiedades sorprendentemente buenas como sustituto de grasa en productos alimentarios con propiedades sensoriales excelentes en la boca.

- 25 La inulina de la invención también muestra en comparación con productos empleados previamente una fermentación más lenta, que es provechosa en la prevención de enfermedades en el intestino grueso posterior. La fermentación más lenta está acompañada de una formación reducida de gases en el intestino, especialmente de hidrógeno.

- 30 La inulina de la invención adicionalmente tiene en comparación con productos empleados previamente un efecto prebiótico mayor. En particular, la inulina de la invención estimula la generación de bifidobacterias de una manera provechosa con una reducción simultánea de bacterias indeseadas y/o patógenas. La inulina de la invención por lo tanto es adecuada para uso en productos alimentarios y/o medicamentos para la prevención y tratamiento de disfunciones y enfermedades intestinales, especialmente en el intestino grueso posterior.

- 35 Finalmente, la inulina de la invención también confiere a diversos productos alimentarios propiedades de uso provechosas tales como, por ejemplo, aumento de viscosidad, emulsionabilidad, capacidad higroscópica y formación de grumos. La inulina de la invención confiere sorprendentemente propiedades de panificación mejoradas en los productos de panadería y aumenta el rendimiento de la masa. La inulina de la invención es además un medio eficaz para la modificación de sabor y la estabilización de espuma.

- 40 En una realización adicional, la inulina de la invención tiene un contenido de fructooligosacáridos (oligofructanos) que tienen un DP desde 3 hasta 10 que es menor del 3%, preferentemente menor del 1,5%, particularmente preferentemente menor del 0,7% y muy particularmente preferentemente menor del 0,3%.

En una realización adicional, la inulina de la invención tiene un contenido de glucosa de menos del 2%, preferentemente menos del 1%, particularmente preferentemente menos del 0,5%, muy particularmente preferentemente menos del 0,2% y lo más preferente es que sea menos del 0,1%.

- 45 En una realización adicional, la inulina de la invención tiene un contenido de fructosa de menos del 2,5%, preferentemente menos del 1,5%, particularmente preferentemente menos del 1,0%, muy particularmente preferentemente menos del 0,3% y lo más preferente es que sea menos del 0,15%.

En una realización adicional, la inulina de la invención tiene un contenido de sacarosa de menos del 2%, preferentemente menos del 1%, particularmente preferentemente menos del 0,5%, muy particularmente preferentemente menos del 0,3% y lo más preferente es que sea menos del 0,1%.

En una realización de la inulina de la invención que es particularmente provechosa para aplicaciones de productos alimentarios, el contenido de mono y disacáridos es menor del 0,5%.

5 Todos los porcentajes son, a menos que se indique de otra manera, porcentajes en peso en base al peso seco total de inulina y sustancias adicionales. "Sustancias adicionales" son todas las sustancias en la mezcla seca que son diferentes de inulina.

El contenido de fructosa, glucosa y sacarosa se mide con relación a la presente invención mediante el procedimiento enzimático óptico descrito más adelante (procedimientos generales: "determinación de azúcar").

10 En una realización adicional, que puede incluir las realizaciones previas, la inulina de la invención tiene una masa molecular promedio en peso M_w de entre 10500 g/mol y 13150 g/mol, preferentemente entre 10500 y 12800 g/mol, particularmente preferentemente entre 10650 g/mol y 12650 g/mol, aún más preferentemente entre 650 g/mol y 12350 g/mol y lo más preferente es que sea entre 10650 g/mol y 12000 g/mol.

La masa molecular promedio en peso M_w se mide en relación con la presente invención mediante el procedimiento de "cromatografía de permeación en gel con detección de dispersión de la luz e índice de refracción (sistema GPC-RI-MALLS)" descrito en lo sucesivo en el presente documento.

15 En una realización adicional, que puede incluir las realizaciones previas, la inulina de la invención tiene un grado promedio de polimerización de DP_n (GPC) medido mediante cromatografía de permeación en gel (GPC) de entre 54 y 75, preferentemente entre 54 y 72, aún más preferentemente entre 57 y 71, particularmente preferentemente entre 60 y 71.

20 El "grado promedio de polimerización DP_n " se mide en relación con la presente invención mediante procedimiento de "cromatografía de permeación en gel con detección de dispersión de la luz e índice de refracción (sistema GPC-RI-MALLS)" descrito en lo sucesivo en el presente documento.

En relación con la presente invención, la expresión "grado promedio de polimerización DP_n " (número de DP medio) significa el cociente de la masa molecular promedio en número M_n y la masa molecular del monómero unido M_0 (anhidrofructosa = 162 g/mol). La masa molecular promedio en número M_n se produce como resultado de

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i},$$

25

donde N_i es el número de moléculas que tienen masa molecular M_i .

En una realización adicional, que puede incluir las realizaciones previas, la inulina de la invención tiene una distribución de peso molecular en el intervalo de 650 a 48000, más preferentemente 970 a 40000 g/mol, aún más preferentemente 1300 g/mol a 34000 g/mol y lo más preferente es que sea de 4000 g/mol a 26800 g/mol.

30 En una realización adicional, que puede incluir las realizaciones previas, la inulina de la invención muestra una masa total de moléculas de inulina que tienen un peso molecular de < 10000 g/mol en base a la masa total de todas las moléculas de inulina del 25-40% y una masa total de moléculas de inulina que tienen un peso molecular de > 20000 g/mol en base a la masa total de todas las moléculas de inulina del 5-20%. Es aún más preferido que la masa total de moléculas de inulina que tienen un peso molecular de < 10000 g/mol en base a la masa total de todas las moléculas de inulina sea del 30-36% y la masa total de moléculas de inulina que tienen un peso molecular de > 20000 g/mol en base a la masa total de todas las moléculas de inulina sea del 9-15%.

35 La distribución de peso molecular se mide con relación a la presente invención mediante el procedimiento de "cromatografía de permeación en gel con detección de dispersión de la luz e índice de refracción (sistema GPC-RI-MALLS)" descrito en lo sucesivo en el presente documento.

40 En una realización de la inulina de la invención con propiedades particularmente provechosas, el grado de ramificación es del 0,5-2,0 mol%, más preferentemente el 0,7-2,0 mol%, aún más preferentemente del 0,9 al 2,0 mol% y lo más preferente es que sea del 1,1 al 2,0 mol%. El grado de ramificación se define en el presente documento como el número de porcentaje de monómeros de fructosa enlazados a beta-2-1 con un punto de ramificación adicional en la posición 6 del monómero de fructosa (también abreviado "2-1,6-" en lo sucesivo en el presente documento) en base al número total de todos los monómeros de inulina medidos en una muestra de la inulina de la invención con pesos moleculares distribuidos aleatoriamente. En esta posición 6, un monómero de fructosa "2-1,6-" con una cadena de polifrufructosa está unido a otra cadena de polifrufructosa, que consiste en al menos dos monómeros de fructosa enlazados a beta-2-1 o a un monómero de fructosa único. La expresión "punto de ramificación" designa una posición de un monómero de fructosa, dentro de una cadena de polifrufructosa, a la cual está unida otra cadena de polifrufructosa que consiste en al menos dos monómeros de fructosa enlazados a beta-2-1 o un

50

monómero de fructosa único. El grado de ramificación se mide mediante el procedimiento de análisis de metilación convencional o, como alternativa, mediante el procedimiento de degradación reductiva después de metilación. Ambos procedimientos se describen con detalle en los ejemplos adjuntos.

5 Una realización de la inulina de la invención que es particularmente provechosa en sus propiedades y que puede incluir las realizaciones descritas previamente tiene una distribución de peso molecular particularmente estrecha expresada por el cociente entre el grado promedio en peso de polimerización y el grado promedio en número de polimerización DP_w/DP_n. Esta cantidad también se denomina índice de polidispersidad. En una realización preferida, el cociente DP_w/DP_n es menor que 1,25, en una realización más preferida es menos de 1,20, en una realización aún más preferida es menos de 1,15 y en la realización más preferida es menos de 1,10. Los valores para DP_w y DP_n con respecto a esto, se miden mediante el procedimiento de "cromatografía de permeación en gel con detección de dispersión de la luz e índice de refracción (sistema GPC-RI-MALLS)" descrito en lo sucesivo en el presente documento. El peso molecular de un monómero para los cálculos de conversión se fija igual a 162 g/mol.

15 La invención se refiere además a una pasta acuosa de la inulina secada por pulverización de la invención que se puede obtener dispersando la inulina secada por pulverización en agua, sometiendo a cizallamiento la dispersión resultante hasta homogénea, almacenando el producto obtenido de esta manera a 4-15°C durante 12-24 h y, después de acondicionamiento a temperatura ambiente, agitando para producir una pasta homogénea. Una pasta preferida comprende agua y del 1-40% en peso, más preferentemente del 1-35% en peso, aún más preferentemente del 1-30% en peso, aun preferentemente del 2-25% en peso, aún más preferentemente del 2-20% en peso y particularmente preferentemente del 10-20% en peso de inulina en base al peso total de la pasta. El término "pasta" es de acuerdo con la presente invención equivalente a una suspensión de inulina cristalina y/o amorfa. Por consiguiente, la expresión "pasta acuosa" se ha de comprender como una suspensión de inulina cristalina y/o amorfa en fase acuosa. La fase acuosa se basa en agua que puede comprender opcionalmente más sustancias disueltas o suspendidas, tales como sales, otros carbohidratos, proteínas y aminoácidos.

25 La pasta descrita anteriormente se puede usar como un componente en sistemas acuosos. Los sistemas acuosos preferidos son productos alimentarios en base acuosa y cosméticos, en los que la expresión "productos alimentarios" se define en otros lugares en la presente descripción. Los ejemplos de productos alimentarios preferidos también se enumeran en otros lugares en la presente descripción. En productos alimentarios y cosméticos, una pasta de acuerdo con la invención se puede usar como un componente para impartir estructura, un agente espesante, un agente texturizante, un agente de potenciación de estabilidad o un agente coadyuvante de la viscosidad, en el que la pasta con respecto a esto puede cumplir una o más de las funciones mencionadas anteriormente. En productos alimentarios, una pasta de acuerdo con la invención también se puede usar como un agente prebiótico y/o componente de fibra dietética, en el que la pasta con respecto a esto puede cumplir una o más de las funciones mencionadas anteriormente. Los productos alimentarios más preferidos en los que se usa una pasta de acuerdo con la invención como un componente, son productos lácteos, tales como yogurt, bebidas de yogurt, crema, crema fresca, cuajada, mantequilla, leche, especialmente leche desnatada, suero de mantequilla, leche agria, kéfir, quesos, tales como queso crema, queso fresco, queso en lonchas, queso duro, suero de leche, leche en polvo y bebidas a base de leche.

40 La inulina de la invención muestra una estabilidad sorprendentemente elevada al ácido. En particular, una pasta acuosa de la inulina de la invención muestra una estabilidad elevada al ácido. La estabilidad al cizallamiento de una pasta de inulina acuosa de la invención es de igual manera excepcional en comparación con productos disponibles en el mercado.

45 La inulina de la invención se distingue de otras inulinas disponibles en el mercado por una resistencia de gel sorprendentemente elevada. Las resistencias de gel de 4-100 N, más provechosamente de 10-100 N, aún más provechosamente 20-100 N y lo más provechosamente 40-100 N, se consiguen a una concentración del 1 - 35% (p/p), más preferentemente del 1 - 30 % (p/p), aún más preferentemente del 2 - 25% (p/p), aún más preferentemente del 2 - 20% (p/p), más preferentemente aproximadamente el 20% (p/p) de la inulina de la invención en agua cuando la inulina se disuelve a 90°C y después se almacena a temperatura ambiente (23°C) durante un periodo de 24 h. Las resistencias de gel elevadas como se ha indicado previamente se pueden conseguir particularmente bien con inulinas de la invención que se secan por pulverización y después se emplean para formación de gel. Los geles obtenidos de esta manera preferentemente muestran un carácter particulado (geles de partículas). El procedimiento de medición para determinar la resistencia de gel se describe con detalle en el apartado de ejemplos (formación de estructura mediante inulinas después de calentamiento en agua).

La presente invención se refiere en un aspecto adicional a un procedimiento para obtener inulina que tiene un grado promedio de polimerización DP_w de entre 65 y 81, determinado por GPC-RI-MALLS, que comprende

- 55 a) triturar raíces de alcachofa en forma de trozos fibrosos
 b) obtener un extracto tratando las raíces trituradas en forma de trozos fibrosos con agua a una temperatura de 60-95°C durante 30 min a 4 horas y separando el extracto de los trozos gastados,
 c) retirar los constituyentes colorantes del extracto obtenido,
 d) precipitar inulina a partir del extracto,
 60 e) reprecipitar la inulina al menos una vez.

El procedimiento es particularmente adecuado para obtener las inulinas descritas previamente de la invención pero no se limita a lo mismo.

5 Las raíces de alcachofa se usan como material de partida, pero el procedimiento no se limita a una variedad particular. El triturado se precede provechosamente por la eliminación de cualquier contaminante adherente de las raíces, por ejemplo, mediante lavado vigoroso con agua con un limpiador a alta presión. Es provechosamente posible lavar las raíces en el estado de congelación con el fin de minimizar la pérdida de masa del material de raíz.

Si es necesario, las raíces se Trituran inicialmente de forma tosca, por ejemplo, mediante corte. Se prefieren trituradoras para la trituración adicional. El producto obtenido es material de raíz triturado en forma de trozos fibrosos.

10 En la realización más provechosa del procedimiento, se usan las raíces de alcachofa con las siguientes características: raíces maduras con respecto a la formación de masa seca e inulina. El grado de madurez se puede establecer a partir de la proporción de contenido de inulina a contenido de materia seca y la proporción de contenido de fructosa a contenido de inulina. El contenido de inulina preferentemente está en el intervalo del 30 - 70% en peso, más preferentemente del 40 - 65% en peso, aún más preferentemente del 50 - 60% en peso, en base al peso total de materia seca de raíces y la proporción de fructosa/inulina preferentemente está en el intervalo del 3 - 24% en peso, más preferentemente del 3 - 12% en peso, más preferentemente menor del 6% en peso. El contenido de materia seca de las raíces de alcachofa limpiadas preferentemente es del 20 - 50% en peso, más preferentemente del 30 - 40%, más preferentemente del 30 - 35% en peso, en base al peso total de raíces limpiadas.

20 En el caso de que las raíces de alcachofa se tengan que almacenar antes de su uso en el procedimiento de la presente invención, las raíces se deben conservar con el fin de evitar la contaminación microbiana, la descomposición o la disminución de peso molecular de inulina debido a degradación enzimática. Los procedimientos preferidos para conservación de las raíces son congelación o secado con aire caliente de raíces trituradas para almacenamiento.

25 Después del triturado, el material de raíz triturado en forma de trozos fibrosos se extrae con agua, preferentemente a una temperatura de 60°C a 95°C, más preferentemente de 80-95°C durante 30 min a 4 horas. La extracción preferentemente tiene lugar en el intervalo de pH neutro a ligeramente alcalino. Una temperatura de al menos 60°C a pH 7-9 es provechosa debido a que en este caso se eliminan la hidrólisis enzimática y ácida. La concentración de material de raíz triturado en el agua es preferentemente del 10 - 40% en peso, más preferentemente del 20 - 30% en peso, medida como peso fresco de raíces en base al peso total de la mezcla de extracción.

30 Preferentemente se establece una proporción entre la materia seca del material triturado usado y el agua como medio de extracción que conduce a un contenido de materia seca en el extracto del 8 - 12% en peso y un contenido de inulina de más del 6% en peso, preferentemente 6 - 8% en peso, en base al peso del extracto. Una elección adecuada de forma correspondiente de las condiciones de extracción, tal como la proporción de agua a peso de raíz, puede conducir a una transferencia del 80 - 90% en peso de la inulina presente en las raíces al extracto. Las condiciones mencionadas anteriormente son adecuadas para conseguir una cristalización favorable y un rendimiento elevado de la inulina a partir del extracto, en base a la observación de que la inulina de peso molecular elevado cristaliza a partir del extracto incluso a una concentración tan baja como el 5% en peso, en base al peso del extracto.

40 No existe una limitación especial acerca del equipo de extracción y las técnicas de extracción convencionales para material vegetal que se pueden aplicar. Es más preferido de acuerdo con la invención que la extracción tenga lugar en un extractor con camisa calefactora con agitador. En otra realización altamente preferida se usa un tanque de filtrado calentable como extractor agitado. Por tanto, la extracción de la inulina a partir de las raíces se combina con la separación del extracto a partir de los trozos gastados por filtración, como se describe más adelante. El tiempo de extracción después del equilibrio de la mezcla de raíz/agua es 30 min - 4 horas, preferentemente 1-2 horas. Después de este tiempo, el extracto se separa de los trozos gastados, por ejemplo mediante bombeo o deformación con esfuerzo o filtración.

45 Después de la separación del extracto de los trozos gastados, cuando sea apropiado, los materiales fibrosos y los fragmentos de plantas pueden permanecer como materiales suspendidos en el extracto. Si están presentes, estos materiales suspendidos igualmente se retiran del extracto. En esta variante del procedimiento, la etapa b) del procedimiento se sigue, por tanto, antes de la etapa c), por una etapa en la que los materiales suspendidos, que consisten principalmente en fibras, se retiran del extracto. La cantidad aceptable de materiales suspendidos y si la eliminación ha de tener lugar lo decidirá un trabajador experto de caso en caso. La eliminación de los materiales suspendidos puede tener lugar mediante técnicas de separación convencionales, como centrifugación o filtración. Un separador de deslodamiento ha demostrado ser particularmente adecuado. También se puede usar una trama o filtro con finura apropiada.

55 En una realización altamente preferida, el material suspendido se puede filtrar mediante el uso de trozos gastados como un material de filtro. En esta realización los trozos gastados se precipitan en el fondo del recipiente de extracción provisto de un tamiz en el fondo, como un tanque de filtrado. El tamiz es preferentemente un tamiz de rendija. Los trozos gastados precipitados se usan como un lecho de filtración a través del cual fluye el extracto.

Mediante el uso de esta técnica es posible una eliminación casi cuantitativa de material suspendido sin el uso de etapas de filtración adicionales antes de refinación o avivamiento adicional del extracto o cristalización de la inulina.

Los extractos son de color debido a su contenido de constituyentes colorantes y materia colorada suspendida coloidalmente. Los constituyentes colorantes consisten, entre otros, en taninos y flavonoides y habitualmente confieren un color amarillo o amarillo parduzco y/o marrón oscuro al extracto. Las inulinas que se pueden obtener directamente a partir de tales extractos no cumplen con los requerimientos deseados con respecto al color neutro. Por lo tanto es necesario eliminar los constituyentes colorantes del extracto en la etapa c) del procedimiento. La etapa c) del procedimiento de la invención para eliminar los constituyentes colorantes de los extractos vegetales generalmente se denomina decoloración, clarificación o "avivamiento" de extractos vegetales. Estos términos son equivalentes en el contexto de la presente invención.

El avivamiento puede tener lugar de acuerdo con la invención añadiendo cal y carbonación posterior (adición de CO₂). El procedimiento de adición de cal se conoce a partir de la técnica anterior y se usa por ejemplo para obtener sacarosa a partir de remolacha azucarera. En un proceso de avivamiento alternativo, los constituyentes de interferencia se eliminan usando un intercambiador de iones.

En una realización particularmente provechosa del procedimiento, los constituyentes colorantes se eliminan en la etapa c) mediante

- i) mezcla de iones de magnesio (Mg²⁺) con el extracto vegetal,
- ii) mezcla de al menos un componente alcalino con el extracto vegetal,
- iii) formación de un precipitado, y
- iv) eliminación del precipitado que se ha formado a partir del extracto vegetal.

Las etapas i) - iv) en esta variante particularmente preferida son subetapas de la etapa c) del procedimiento.

Esta variante de procedimiento hace posible de forma sorprendente la decoloración más eficaz del extracto en comparación con el proceso de avivamiento con cal. Adicionalmente, los auxiliares empleados, sales de magnesio y álcalis, son económicos. El procedimiento por tanto es menos costoso que el uso de un intercambiador de iones. Los gastos en aparatos y tiempo para llevar a cabo esta etapa del procedimiento también son particularmente bajos. Finalmente, este tipo de avivamiento también elimina simultáneamente materiales que provocan turbidez del extracto.

Los iones de magnesio (Mg²⁺) se mezclan de acuerdo con la invención con el extracto vegetal acuoso. Es posible en una variante de la etapa i) añadir una solución acuosa de una sal de magnesio al extracto vegetal. En una variante adicional más preferida, se añade una sal de magnesio directamente en forma sólida al extracto vegetal y se disuelve en el mismo.

Si se añade una sal de magnesio, preferentemente es una sal que, debido a su producto de solubilidad elevada, es muy fácilmente soluble en agua. Las sales de magnesio particularmente adecuadas se seleccionan entre cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, nitrato de magnesio, sales de magnesio de ácidos grasos inferiores tales como acetato y propionato de magnesio y mezclas de los mismos.

Un componente alcalino en ii) significa de acuerdo con la invención un componente que comprende iones hidróxido (OH⁻) o forma iones hidróxido en el extracto después de combinarse con el extracto vegetal. El componente alcalino puede ser líquido, sólido o gaseoso. Preferentemente se emplea un componente alcalino líquido.

A la adición de iones de magnesio y un componente alcalino como se ha descrito en las etapas i) y ii) del procedimiento, se forma un precipitado mediante una reacción de precipitación. Las etapas i) y ii) pueden en el contexto del presente procedimiento en principio llevarse a cabo simultáneamente, especialmente si se usa una solución de iones de magnesio en la etapa i) y se usa un líquido alcalino en la etapa ii). Sin embargo, se prefiere llevar a cabo la etapa i) del procedimiento en primer lugar y después la etapa ii).

Es provechoso para la etapa c) del procedimiento que tanto los iones de magnesio como el componente alcalino se distribuyan tan homogéneamente como sea posible en un extracto de forma que la reacción de precipitación en el extracto también sea homogénea y tan cuantitativa como sea posible. Por lo tanto, se prefiere emplear como un componente alcalino líquidos alcalinos acuosos tales como, por ejemplo, soluciones alcalinas o suspensiones alcalinas que se pueden mezclar rápidamente y homogéneamente en el extracto vegetal. Una solución o suspensión alcalina comprende de acuerdo con la invención iones hidróxido (OH⁻) o los forma después de combinarse con el extracto vegetal.

En una variante del procedimiento muy preferida, una sal de magnesio se disuelve homogéneamente en el extracto en primer lugar en la etapa i). Posteriormente, en la etapa ii) se añade una solución o suspensión alcalina acuosa.

En una realización, el componente alcalino es una solución o suspensión alcalina de un metal alcalino o hidróxido de metal alcalinotérreo. El hidróxido preferentemente se selecciona entre los hidróxidos de los metales alcalinos y metales alcalinotérreos, tales como hidróxido de litio, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, hidróxido de calcio e hidróxido de bario.

- En una variante muy particularmente preferida, el componente alcalino es una suspensión de hidróxido de calcio. La ventaja de usar hidróxido de calcio es que se obtiene una cantidad particularmente pequeña de centrifugado en la etapa iii). Además, la precipitación simultánea de hidróxido de magnesio y sulfato de calcio consigue un índice de sedimentación mayor y una mayor compresibilidad del precipitado. El precipitado tiene una consistencia particularmente poco gelatinosa. La unión de inulina en el precipitado, por tanto, permanece particularmente baja en esta variante del procedimiento.
- Un componente alcalino adicional que se puede usar es amoníaco, preferentemente en solución acuosa. Tampoco se excluye, en principio, utilizar amoníaco gaseoso, pero esto es menos preferido que el uso de una solución acuosa.
- En una realización adicional, el componente alcalino es una solución o suspensión acuosa de una base orgánica tal como etilendiamina y trietanolamina.
- Las sales de ácidos orgánicos débiles tales como metales alcalinos y acetatos de metales alcalinotérreos, especialmente acetato sodio, acetato de potasio, acetato de calcio y acetato de magnesio, también se pueden usar.
- El hidróxido de magnesio se forma como precipitado. Los constituyentes colorantes del extracto acuoso permanecen de acuerdo con la invención en el precipitado y de ese modo se separan de la fase líquida. Se obtiene un extracto sustancialmente decolorado. Las cantidades de iones Mg^{2+} y componente alcalino empleadas y, por tanto, la cantidad de precipitado formado, determinan entre otros qué tan cuantitativa es la decoloración. La optimización de las cantidades de los reactivos está dentro de la competencia de un trabajador experto. En caso de sulfato de magnesio, la concentración preferible está en el intervalo del 0,5 - 3% en peso, más preferentemente del 0,5 - 2% en peso del extracto acuoso.
- En la variante preferida de la etapa c), como se ha descrito anteriormente, la proporción molar de iones hidróxido a iones de magnesio $OH^-:Mg^{2+}$ preferentemente es de 2,2:1 a 1,8:1. Es más preferido que la proporción sea exactamente estequiométrica, es decir, $OH^-:Mg^{2+} = 2:1$. La cantidad de componente alcalino por tanto se debe elegir de forma que la cantidad apropiada de iones hidróxido esté presente para los iones de magnesio.
- La disolución de la sal de magnesio y la mezcla del componente alcalino en las etapas de procedimiento i) y ii) preferentemente tienen lugar con agitación con el fin de conseguir la disolución y homogeneización tan rápidamente como sea posible y por lo tanto una reacción rápida. Sin embargo, no hay limitaciones adicionales particulares acerca de la técnica de mezcla. Por tanto, el procedimiento se puede realizar por ejemplo también mediante otras técnicas de mezcla familiares para el trabajador experto.
- Para acelerar el procedimiento, la etapa i) preferentemente se lleva a cabo a una temperatura de 60-80°C. El tiempo de reacción después de la adición del componente alcalino generalmente es de aproximadamente 1 a 15 min, promediando aproximadamente 10 min.
- La etapa de eliminación iv) preferentemente tiene lugar mediante sedimentación o filtración. La sedimentación se puede hacer más rápida mediante una centrifuga, preferentemente una centrifuga de disco, en particular una centrifuga de deslodamiento. Sin embargo, también se pueden usar otras técnicas de separación familiares para los trabajadores expertos. Estas también se pueden llevar a cabo en combinación las unas con las otras, por ejemplo, deslodamiento centrifugo del extracto avivado con filtración posterior del extracto deslodado, por ejemplo, con un filtro de placa.
- La totalidad de la etapa c) del procedimiento de la invención también se puede llevar a cabo, si es necesario, más de una vez. Si se usa la variante preferida descrita previamente de la etapa c) con las subetapas i) - iv), también es posible que las subetapas individuales i) - iv) se lleven a cabo más de una vez.
- Después de la etapa c), la inulina se precipita a partir del extracto en la etapa d). La precipitación se puede lograr por ejemplo añadiendo alcoholes tales como etanol, metanol o isopropanol. En este caso, dependiendo de la cantidad de alcohol añadida o la polaridad ajustada de la fase líquida, se precipitan inicialmente fracciones de inulina de peso molecular elevado, de forma que es posible influir, a través de la cantidad de alcohol añadida, sobre qué tan cuantitativamente se precipita la inulina presente en el extracto y qué fracciones de peso molecular se obtienen predominantemente. Además de alcohol, también es posible emplear otros líquidos orgánicos no polares que son miscibles con agua.
- Con este fin, en una realización particularmente provechosa de esta etapa de procedimiento, para limitar el uso de alcohol, especialmente etanol e isopropanol, el extracto preparado inicialmente se concentra, preferentemente hasta un cuarto a un quinto de su volumen inicial. La concentración puede tener lugar mediante evaporación o filtración de membrana y una combinación de ambos procedimientos. Se debe tener cuidado en este caso de que el concentrado se mantenga caliente durante la concentración, preferentemente a 60-95°C, con el fin de evitar la precipitación de la inulina. Una ventaja de la filtración con membrana es el agotamiento, asociado con la misma, en sustancias de peso molecular bajo que acompañan a la inulina. La precipitación posterior de la inulina a partir de concentrado se puede manejar mediante la elección de la concentración de alcohol creciente de forma que la inulina se fraccione de acuerdo con intervalos de peso molecular que se caracterizan, por ejemplo, por el grado promedio en peso de

polimerización (DPw). Dependiendo de la elección de las condiciones de precipitación, el resultado son fracciones que tienen el DPw de acuerdo con la invención. Dependiendo de la pureza deseada.

Es más preferido obtener inulina enfriando el extracto que mediante precipitación alcohólica. Las condiciones preferidas son tales que el extracto se enfría hasta una temperatura de 2 - 10°C, más preferentemente 2 - 8°C y se mantiene a esta temperatura durante un periodo de desde 6 hasta 140 h, preferentemente 6 a 48 h, durante el cual precipita la inulina. El índice y la temperatura de enfriamiento y la duración del enfriamiento influyen en la precipitación de la inulina a partir del extracto y la amplitud de la distribución del peso molecular y por lo tanto al mismo tiempo en la cantidad. La elección de un periodo más largo y de una temperatura más baja da como resultado la precipitación de más inulinas de peso molecular bajo y una distribución de peso molecular más amplia y por tanto un peso molecular promedio más bajo de la fracción precipitada. La inulina precipitada se separa de la fase líquida mediante técnicas de separación convencionales tales como, por ejemplo, centrifugación, decantación y filtración.

En una realización preferida, la inulina se cristaliza por primera vez después de la etapa de extracción b) y antes de la etapa c) del procedimiento descrito anteriormente. Tal cristalización preferentemente se realiza como se ha descrito previamente. La cristalización antes de la etapa c) conduce a un aumento en el rendimiento de inulina de peso molecular elevado en comparación con el avivamiento directo del extracto y economiza el uso de agentes de avivamiento, es decir, compuesto de magnesio y el componente alcalino. Es provechoso avivar el extracto después de la primera cristalización de la inulina ya que en este caso únicamente los constituyentes colorantes unidos a los cristales de inulina se tienen que eliminar, lo que conduce a una cantidad similarmente más pequeña de inulina unida al lodo de avivamiento.

Una primera precipitación y eliminación de la inulina precipitada puede estar seguida de enfriamiento renovado del extracto o adición de alcohol con el fin de obtener cualquier fracción de inulina que esté aun disuelta. Una decisión acerca de la repetición se realiza de caso en caso de acuerdo con qué tan cuantitativamente se ha de obtener la inulina a partir de las plantas y qué distribución de peso molecular en el producto final se desea.

La concentración de inulina en el extracto depende sustancialmente del contenido de inulina de las raíces y la concentración de las raíces trituradas en el extracto y es una variable adicional que tiene un efecto sobre la precipitación de la inulina mediante el enfriamiento del extracto. La dependencia de la precipitación sobre la concentración, por lo tanto, se puede utilizar con el fin de concentrar la fase líquida después de la primera precipitación, por ejemplo mediante evaporación, con el fin también de precipitar las fracciones de peso molecular bajo si se desea.

En la última etapa e) del procedimiento, la inulina precipitada se vuelve a precipitar. "Reprecipitación" significa en el contexto de la presente invención que la inulina sólida, que se produce como resultado de la etapa de procedimiento previa, se redissuelve y después se precipita y/o se cristaliza nuevamente a partir de la solución. Por tanto, la etapa e) del procedimiento también se puede redactar como: la inulina se disuelve y precipita y/o cristaliza de nuevo, en la que esta etapa se realiza al menos una vez. La cristalización difiere de la precipitación en que se obtienen estructuras principalmente cristalinas.

La inulina preferentemente se disuelve bajo la influencia de calor y preferentemente en agua. El agua con una temperatura de 70-100°C, en particular 90-100°C, es particularmente adecuada.

La precipitación en la etapa e) puede tener lugar mediante precipitación alcohólica como se ha descrito previamente. Sin embargo, la inulina preferentemente se obtiene enfriando la solución a 2 - 10°C, más preferentemente 2-8°C, durante un periodo de 6 a 140 h, preferentemente 6 a 48 h.

La precipitación de la inulina disuelta en la etapa e) se puede repetir con el fin de obtener la inulina que aún permanece en la fase líquida. La decisión acerca de la repetición se tiene que realizar de caso en caso de acuerdo con qué tan cuantitativamente se ha de obtener la inulina a partir de las plantas y qué distribución de peso molecular en el producto final se desea. La fase líquida se puede concentrar con el fin de simplificar la precipitación.

Después de la reprecipitación, el sólido de inulina resultante se separa de la fase líquida mediante técnicas de separación convencionales tales como, por ejemplo, centrifugación, decantación y filtración.

Con el fin de influir sobre la distribución de la masa molecular y la pureza del producto de inulina resultante, la etapa e) del procedimiento se puede realizar más de una vez. Se ha podido comprobar que los promedios del peso molecular y los promedios del grado de polimerización cambian a valores más elevados a la repetición de la etapa e) de reprecipitación. Por tanto es posible establecer diversos promedios del peso molecular/grado de polimerización de la inulina de la invención dentro del intervalo indicado.

Si aún están presentes impurezas de partículas finas, es provechoso insertar una o más etapas de filtración en el procedimiento. Cualquier impureza de partícula fina presente se elimina en la filtración. La finura del filtro se elige por el trabajador experto dependiendo del tamaño de partícula de la impureza.

La etapa o las etapas de filtración se pueden incluir en cualquier parte en el procedimiento después de obtener el

extracto. Por ejemplo, una etapa de filtración directamente después de obtener el extracto en la etapa b) es provechosa. La etapa de filtración se tiene que distinguir de la eliminación de materiales suspendidos como se ha descrito previamente, debido a que las partículas eliminadas por la filtración son más delgadas que los materiales suspendidos, que consisten principalmente en fibras. En una realización preferida adicional, la etapa de filtración se realiza antes de la etapa d).

La etapa de filtración preferentemente se combina con una reprecipitación como se ha descrito para la etapa del procedimiento e). Esto implica que la inulina se disuelva como se ha descrito previamente para la etapa e) y la solución después se filtra. Después de la filtración, la inulina se precipita o cristaliza fuera de la solución filtrada. La inulina sólida que se produce como resultado después de la precipitación o cristalización se puede separar de la fase líquida mediante técnicas de separación convencional, tales como, por ejemplo centrifugación, decantación y filtración.

En algunos casos la inulina resultante se puede decolorar mediante sustancias que no se pueden eliminar por filtración. En tales casos es preferible eliminar las impurezas colorantes mediante un tratamiento con carbón activado. En una realización se suspende carbón activo en agua y se añade a una solución de inulina a una temperatura de por encima de 80°C, preferentemente por encima de 90°C. En el caso de una solución de inulina al 90% en peso la cantidad de carbón activo preferentemente está en el intervalo del 1 - 10% en peso, preferentemente del 2 - 6%, más preferentemente del 2 - 3%, en base al peso de la solución de inulina. Después de la adsorción de las impurezas colorantes, el carbón activado se elimina mediante centrifugación y/o filtración. La suspensión de carbón activado se puede aclarar previamente mediante separación centrífuga del lodo de carbón activado y después aclararse mediante filtración de dos etapas, por ejemplo, como una combinación de un filtro de prerrevestimiento de diatomeas y un filtro de lámina. Es importante que durante la separación del carbón activo de la solución de inulina la temperatura se mantenga por encima de 80°C, preferentemente por encima de 90°C, con el fin de mantener la inulina en solución. Después de la eliminación del carbón activo la inulina se puede precipitar o cristalizar y separarse de la fase líquida como se ha descrito anteriormente.

Después de la separación de la fase líquida, el producto final se puede lavar nuevamente con agua o una mezcla de agua/alcohol. El lavado con agua fría a una temperatura de 2-10°C se prefiere. Con este fin, el precipitado de inulina se suspende en el agua y la inulina después se sedimenta nuevamente.

La inulina resultante preferentemente se seca en una última etapa de procedimiento adicional. El secado puede tener lugar mediante secado por congelación, secado por pulverización o secado por tambor.

En una realización preferida del procedimiento de la invención, la inulina está en forma seca por pulverización. Los parámetros de secado por pulverización adecuados se describen en los ejemplos adjuntos. Es evidente que en el caso de un procedimiento de secado por pulverización una inulina precipitada o cristalizada se tiene que poner en suspensión (en agua por debajo de aproximadamente 80°C) o en solución (en agua por encima de aproximadamente 80°C) nuevamente. Como alternativa, se puede omitir una última etapa de precipitación o cristalización, como se ha descrito anteriormente, y la inulina suspendida o disuelta a partir del procedimiento se puede secar por pulverización directamente. Es posible añadir inulinas secadas por pulverización de la invención, a productos alimenticios preparados líquidos para aumentar la viscosidad de manera particularmente eficaz. Cuando se añaden cantidades iguales de inulina de la invención, se consigue un aumento mayor en viscosidad con una inulina secada por pulverización en comparación con una inulina secada de cualquier otra manera (por ejemplo, secado por congelación).

En una realización preferida adicional del procedimiento de la invención, la inulina está en forma granulada por pulverización. La inulina granulada por pulverización se obtiene mediante procedimientos conocidos, por ejemplo, introduciendo un material secado por pulverización previamente como semilla de granulación y secando por pulverización inulina adicional. Una inulina con un tamaño de partícula de 10-100 µm por ejemplo puede servir como carga inicial. Las condiciones de granulación por pulverización adecuadas son por ejemplo una composición de alimentación del 70% de agua y el 30% de inulina y una temperatura de alimentación de 90°C.

La inulina secada por pulverización de la invención muy particularmente preferentemente tiene un diámetro de partícula promedio de 50-350 µm, más preferentemente 80-300 µm, aún más preferentemente 100-250 µm y lo más preferente es que sea 100-200 µm, determinado por análisis de tamiz. Una inulina de este tipo es, por tanto, un aspecto adicional de la presente invención.

Es posible ajustar el diámetro de partícula promedio preferido de una inulina seca por medio del fraccionamiento por tamiz en el caso de que, después del secado, aún se encuentre fuera del intervalo preferido. La selección del tamaño de tamiz adecuado está dentro de la competencia del trabajador experto promedio.

Las partículas de inulina de la invención preferentemente tienen una fracción cristalina de menos del 45%, más preferentemente menos del 40%, aún más preferentemente menos del 35%. En una realización preferida adicional, menos del 20%, aún más preferentemente menos del 10%. En la realización más preferida, el grado de cristalinidad es menos del 1%. Los grados indicados de cristalinidad se determinan mediante el procedimiento de Ruland-Vonk (W. Ruland, Acta Cryst., 14, 1180 (1961); C.G. Vonk, J. Appl. Cryst. 6, 148 (1973)). El procedimiento para determinar

el grado de cristalinidad se describe con detalle en los ejemplos adjuntos. Un grado bajo de cristalinidad confiere mejores propiedades de disolución a la inulina, lo cual es provechoso en determinadas aplicaciones de productos alimentarios.

5 En un aspecto adicional, la invención también se refiere a composiciones que comprenden la inulina secada por pulverización descrita previamente de la invención y uno o más ingredientes comestibles o farmacéuticamente aceptables. Las composiciones típicas incluyen productos alimentarios para seres humanos y animales, bebidas, productos alimentarios funcionales, medicamentos y composiciones farmacéuticas (incluyendo composiciones profilácticas y composiciones terapéuticas) e intermedios de los mismos.

10 Un producto alimenticio funcional significa en el contexto de la presente invención un producto alimenticio que además de los nutrientes tradicionales comprende un ingrediente que puede tener un efecto promotor de la salud (definición del Instituto de Medicina de la Academia Nacional de Ciencias, EE.UU., 1994).

15 Dichos ingredientes comestibles o farmacéuticamente aceptables preferentemente se seleccionan entre el grupo que consiste en azúcares (por ejemplo, glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, galactosa, maltosa, isomaltosa, polidextrosa), polioles (por ejemplo, sorbitol, lactitol, maltitol, isomalt, manitol, xilitol), maltodextrinas, edulcorante, jarabes de glucosa hidrogenados, adiciones a alimentos humanos y animales, intermedios de alimentos humanos y animales, productos alimenticios humanos y animales, líquidos comestibles, bebidas, fuentes biodisponibles de minerales, vehículos farmacéuticamente aceptables, sustancias farmacéuticamente y terapéuticamente activas, composiciones farmacéuticas y medicamentos.

20 Una composición particularmente preferida de la presente invención incluye la inulina secada por pulverización de la invención en presencia de una fuente de minerales biodisponibles comestible o farmacéuticamente aceptable, especialmente una fuente de calcio o magnesio y/o hierro, tal como, por ejemplo productos lácteos y sales y complejos de calcio, magnesio y hierro.

25 Como se ha explicado anteriormente, el objeto de la presente invención era proporcionar una inulina con propiedades particularmente provechosas para el uso en productos alimentarios, siendo las expresiones producto-alimenticio y producto alimentario equivalentes de acuerdo con la invención. En un aspecto adicional, la presente invención por tanto también se refiere a productos alimentarios y suplementos dietéticos que comprenden la inulina secada por pulverización descrita previamente. La expresión productos alimentarios incluye de acuerdo con la presente invención tanto productos alimentarios para seres humanos como productos alimentarios para animales o alimento animal. Los suplementos dietéticos incluyen suplementos dietéticos para seres humanos y para animales.

30 Un producto alimentario particularmente preferido se selecciona entre productos lácteos, yogures, helados, helado suave a base de leche, guarniciones a base de leche, pudines, batidos, natillas de huevo, queso, barras nutritivas, barras energéticas, barras de desayuno, productos de confitería, productos de panadería, galletas saladas, galletas, bizcochos, chips de cereales, productos de aperitivo, té helado, helado suave elaborado a partir de jugo de frutas, bebidas dietéticas, bebidas acabadas, bebidas deportivas, bebidas de resistencia, mezclas de bebidas en polvo para
35 suplementos dietéticos, alimentos infantiles y para bebés, jugo de naranja complementado con calcio, pan, cruasanes, cereales de desayuno, fideos, pastas para untar, bizcochos y chocolates sin azúcar, calcio masticable, productos de la carne, mahonesa, aderezos para ensalada, mantequilla de nueces, comidas congeladas, salsas, sopas y comidas listas para servir. El producto alimenticio que comprende la inulina de la invención es más preferentemente un producto lácteo, especialmente un yogurt. La inulina de la invención muestra un efecto
40 particularmente bueno sobre la estabilidad, la textura, el cuerpo y a sensación en la boca de los productos lácteos, especialmente yogurt, siendo las posibilidades yogurt agitado o yogurt fermentado en tarro o bebidas de yogurt.

Otros productos lácteos útiles de acuerdo con la presente invención son crema, crema fresca, cuajada, mantequilla, leche, especialmente leche desnatada, suero de mantequilla, leche agria, kéfir, queso, tal como queso crema, queso blando, queso en lonchas, queso duro, suero de la leche, leche en polvo y bebidas a base de leche.

45 Un nivel preferido de inulina en productos alimentarios, especialmente en lácteos, particularmente en yogurt, es del 0,2 - 5% en peso, preferentemente del 0,5 - 4,5% en peso de inulina seca en base al peso total de todos los componentes del producto alimenticio, lácteo o yogurt.

50 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a preparaciones cosméticas que comprenden la inulina secada por pulverización descrita previamente. La preparación cosmética particularmente preferentemente toma la forma de cremas, en particular cremas para la piel y faciales.

En un aspecto adicional, la presente invención también se refiere al uso de la inulina secada por pulverización descrita previamente como una adición en productos alimentarios, productos alimentarios funcionales y preparaciones cosméticas. El uso también se refiere en particular a todos los productos alimentarios y preparaciones cosméticas específicos como se ha mencionado anteriormente.

55 En un aspecto adicional más, la presente invención se refiere al uso de la inulina secada por pulverización de la invención para la preparación de una composición farmacéutica o de un medicamento.

La inulina secada por pulverización de la invención se puede usar provechosamente en productos alimentarios, productos alimentarios funcionales, composiciones farmacéuticas o medicamentos que sirven para modificar o regular la composición de la flora bacteriana en el intestino grueso, especialmente en la región distal del intestino grueso, de seres humanos, mamíferos y otros vertebrados.

- 5 De la misma forma es posible usar la inulina secada por pulverización de la invención en productos alimentarios, productos alimentarios funcionales, composiciones farmacéuticas o en medicamentos que sirven para modificar o regular el patrón de fermentación de la inulina en el intestino grueso, especialmente en la región distal del intestino grueso, de seres humanos, mamíferos y otros vertebrados.

- 10 Un uso preferido adicional de la inulina secada por pulverización de la invención es el uso como una fibra dietética en productos alimentarios, en el que la expresión "productos alimentarios" incluye al menos todos los productos alimentarios mencionados anteriormente, especialmente todos los productos lácteos mencionados anteriormente. Es provechoso que las propiedades sensoriales, especialmente la sensación en la boca, sean excelentes en comparación con inulinas convencionales. Por tanto, la inulina de la presente invención también se puede usar como un potenciador de propiedades sensoriales, especialmente como un potenciador de la sensación en la boca, en
15 productos alimentarios.

Un uso adicional de inulina secada por pulverización de la invención es el uso como un agente texturizante, agente potenciador de la estabilidad, agente coadyuvante de la viscosidad, especialmente en productos alimentarios y cosméticos. La expresión "productos alimentarios" incluye al menos todos los productos alimentarios mencionados anteriormente, especialmente todos los productos lácteos mencionados anteriormente.

- 20 Finalmente, la inulina secada por pulverización de la invención se puede usar en productos alimentarios, productos alimentarios funcionales, composiciones farmacéuticas o en medicamentos que tienen los siguientes efectos provechosos: efectos de fibra, regulación de la función intestinal, efecto prebiótico y/o bifidogenicidad, absorción aumentada de minerales, por ejemplo de calcio, magnesio y hierro, aumento en la densidad mineral ósea, aumento del contenido mineral óseo, aumento de la masa ósea máxima, mejora de la estructura ósea, reducción de la pérdida
25 de la densidad mineral ósea, reducción en la pérdida de estructura ósea, regulación del metabolismo de lípidos, estimulación del sistema inmune, prevención de cáncer y reducción de riesgo de cáncer, prevención de cáncer de intestino grueso y reducción del riesgo de cáncer de intestino grueso y prevención de cáncer mamario.

La invención se explica más adelante por medio de ejemplos que no tienen por objeto limitar el concepto inventivo general.

30 **Ejemplos**

Procedimientos generales

1. Determinación de fructano

1.1 Determinación de fructano mediante hidrólisis con exoinulinasa

- 35 Las soluciones de inulina que se han de medir se preparan pesando 50,0 +/- 5,0 mg de inulina de forma precisa en un matraz graduado de 1 ml. 700 µl de H₂O dd se añaden para disolver. Después la mezcla se agita con el fin de desprender el material de la muestra tan bien como sea posible de la base del recipiente y después se coloca en un baño de agua casi en ebullición (~99°C) durante 8 min. Durante la incubación, el matraz graduado se agita cada 30 segundos. Después de la incubación, la muestra se permite que se enfríe a temperatura ambiente y después se lleva hasta la marca de 1 ml con H₂O dd. La solución de muestra tiene una concentración de inulina del 5,0 +/- 0,5%.

- 40 Para la determinación de azúcar antes de la digestión, se retiran 200 µl y se congelan a -20°C. Antes de la medición de azúcar, esta muestra se descongela a temperatura ambiente, se mezcla, se disuelve agitando a 1.400 rpm en un bloque de calentamiento a 95°C durante 5 min y se centrifuga a 4.000 rpm durante 2 min.

- 45 Para la hidrólisis, 50 µl de la solución de inulina a aproximadamente el 5% se ponen en la mezcla de digestión que consiste en 50 µl de citrato de Na 1 M pH 4,6, 25 µl de exo-inulinasa (Megazyme International Ireland Ltd, Wicklow, Irlanda, N° de artículo. E-EXO1, 2,5 U/µl) y 375 µl de H₂O dd. La digestión se mezcla y centrifuga a 4.000 rpm durante 1 min. Después la digestión se incuba en un bloque de calentamiento a 40°C durante 4 h. Todas las muestras digeridas se congelan a -20°C. Antes de la medición de azúcar, estas muestras se descongelan a temperatura ambiente, se mezclan y centrifugan a 4.000 rpm durante 2 min. Para la medición de fructosa, se prepara una dilución 1:10 añadiendo 10 µl de digestión a 90 µl de H₂O dd.

- 50 Para determinar la fructosa y glucosa liberadas en la digestión, se lleva a cabo una medición fotométrica de glucosa y fructosa en todas las muestras como se ha descrito en "determinación de azúcar (glucosa, fructosa, sacarosa)". Además de glucosa y fructosa, también se determina sacarosa en la muestra antes de la digestión.

La solución de inulina al 5% no diluida se usa para la medición de azúcar antes de la digestión. 10 µl de esta solución se añaden a 200 µl de tampón de medición. Para la medición de azúcar en las muestras digeridas, se

añaden 10 µl de las muestras no diluidas a 200 µl de tampón de medición. Para la medición de fructosa en las muestras digeridas, se añaden 10 µl de muestra diluidas 1:10 a 200 µl de tampón de medición.

5 El cálculo se basa, al igual que la determinación de azúcar, en un coeficiente de extinción molar de $6,23 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para la conversión en NADP a NADPH. La concentración de glucosa y fructosa presentes antes de la digestión se resta de las concentraciones de glucosa y fructosa en las muestras digeridas. Igualmente, se restan la glucosa y fructosa que se liberarían a partir de la sacarosa hidrolizada presente en la muestra antes de la digestión.

Después se obtienen las concentraciones de fructosa y glucosa formadas durante la digestión de inulina. El contenido de fructano se obtiene mediante la adición de los contenidos de glucosa y fructosa y sin inclusión del factor 162/180 para la conversión de las hexosas libres medidas en las hexosas unidas en el fructano.

10 2. Determinación de azúcar (glucosa, fructosa y sacarosa)

Los contenidos de glucosa, fructosa y sacarosa se determinaron mediante fotometría en un ensayo enzimático a través de la conversión de NADP^+ (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) en NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido reducida). El carácter aromático del anillo de nicotinamida se pierde en la reducción y, por tanto, el espectro de absorción se cambia. Este cambio en el espectro de absorción se puede detectar mediante fotometría.

15 La glucosa y fructosa se convierten por medio de la enzima hexoquinasa y adenosina trifosfato (ATP) en glucosa 6-fosfato y fructosa 6-fosfato. La glucosa 6-fosfato después se oxida mediante la enzima glucosa 6-fosfato deshidrogenasa a 6-fosfogluconato. En esta reacción el NADP^+ se reduce a NADPH y la cantidad de NADPH formado se mide mediante fotometría. La proporción de NADPH formado a la glucosa presente en el extracto es 1:1, de forma que el contenido de glucosa se puede calcular a partir de NADPH usando el coeficiente de extinción molar de NADPH ($6,23 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) de acuerdo con la ley de Lambert-Beer.

Después de que la oxidación de la glucosa 6-fosfato se completa, la fructosa 6-fosfato que se produce igualmente en la solución se convierte por la enzima fosfoglucoisomerasa en glucosa 6-fosfato, que a su vez se oxida a 6-fosfogluconato. La proporción de fructosa y la cantidad de NADPH formado es también 1:1. El contenido de fructosa se calcula a partir de la cantidad de NADPH formado, como se ha descrito para la glucosa.

25 Posteriormente, la sacarosa presente en el extracto se escinde mediante las enzimas sacarasa (de Megazyme) en glucosa y fructosa. Las moléculas de glucosa y fructosa liberadas después se convierten por las enzimas mencionadas anteriormente en la reacción dependiente de NADP^+ en 6-fosfogluconato. Dos moléculas de NADPH se forman en la conversión de una molécula de sacarosa en 6-fosfogluconato. La cantidad de NADPH formado se mide igualmente mediante fotometría y el contenido de sacarosa se calcula a partir del mismo usando el coeficiente de extinción molar de NADPH.

30 Se usa una solución de inulina al 5% como se ha descrito en "Determinación de fructano mediante hidrólisis con exo-inulinasa" para la medición de azúcar. 10 µl de esta solución se añaden a 200 µl de tampón de medición. La medición tiene lugar como determinación por duplicado en placas de microtitulación usando los fotómetros SPECTRAMax (Molecular Devices). Todas las soluciones de enzima usadas se preparan en tampón de medición que consiste en imidazol HCl 50 mM pH 6,9, MgCl_2 2,5 mM, ATP 1 mM y NADP 0,4 mM. La conversión de NADP en NADPH se sigue a una longitud de onda de 340 nm.

40 La determinación de glucosa tiene lugar añadiendo 2 µl de una mezcla de hexoquinasa (a partir de levadura 0,3 U/µl) y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (a partir de levadura 0,14 U/µl). Después de que la conversión de la glucosa se completa, 2 µl de fosfoglucoisomerasa (a partir de levadura 0,14 U/µl) se añaden para determinar fructosa. Cuando la fructosa se ha convertido completamente, se añaden 2 µl de sacarasa (de Megazyme, 0,2 U/µl) para escindir la sacarosa presente. El cálculo de glucosa, fructosa y sacarosa tiene lugar como se ha descrito.

3. Análisis de la distribución de peso molecular

3.1 Cromatografía de permeación en gel con detección de dispersión de la luz e índice refractivo (sistema GPC-RI-MALLS)

45 Las inulinas/fructanos se disuelven en agua extra-pura en una concentración del 0,5% (p/v). Las soluciones se calientan a 95°C durante 30 minutos. Los polímeros se analizan usando los siguientes dispositivos: sistema de cromatografía Alliance (Waters corporation, Milford, Massachusetts, EE.UU.), detector de dispersión de luz DAWN-EOS (Wyatt Technology, Santa Barbara, EE.UU.) con $\lambda_0 = 658 \text{ nm}$ y 16 detectores en el intervalo de ángulos desde 14,4 hasta 163,3°, celda de flujo K5. Los polímeros se fraccionan en una precolumna y tres columnas que tienen los intervalos de separación $300\text{-}10^4$, $5 \times 10^4\text{-}2 \times 10^6$ y $10^6\text{-}10^8$ (SUPREMA-Gel, PSS Polymer Standards Service GmbH, Mainz, Alemania). Se inyectan 100 µl de solución. El fraccionamiento tiene lugar a una temperatura de 30°C y un caudal de 0,8 ml/min con NaNO_3 0,05 M como eluyente. Se usa el programa Astra V 5.1.8.0 (de Wyatt Technology, Santa Barbara, EE.UU.) para analizar la distribución de peso molecular de las muestras.

3.2 Cromatografía de permeación en gel con detección de índice refractivo (sistema GPC-RI)

Las inulinas se disuelven en el eluyente (DMSO+ NaNO₃ 90 mM) en una concentración del 1% (p/v) agitando suavemente en un agitador térmico a 95°C durante 10 minutos. Después de enfriamiento breve, la solución de inulina se diluye al 0,1% con eluyente (100 µl de solución de inulina + 900 µl de eluyente) y se coloca inmediatamente en el automuestreador a 60°C. Los polímeros se analizan usando los siguientes aparatos: bomba Dionex P580, automuestreador Dionex AS50, horno de columna Dionex modelo 585 (Dionex GmbH, Idstein, Alemania), detector Shodex RI-71 (Shodex/Shoko Co. LTD, Tokio, Japón). Los sistemas se controlan mediante el software Chromeleon (Dionex GmbH, Idstein, Alemania). Los polímeros se fraccionan en una precolumna de 10 µ PSS GRAM y las columnas de separación 10 µ PSS GRAM 3000 y 10 µ PSS GRAM 100 (PSS Polymer Standards Service GmbH, Mainz, Alemania). 50 µl de la solución de inulina al 0,1% se inyectan para el análisis. El fraccionamiento tiene lugar en el horno de columna a una temperatura de 60°C y con un caudal de 0,7 ml/min con el eluyente DMSO + NaNO₃ 90 mM. Para determinar las masas moleculares el sistema se calibra con los siguientes patrones de dextrano (Nº de producto 31430, Fluka Riedel-deHaen, Seelze, Alemania): dextrano T1 (Pm 1270), T5 (Pm 5220), T12 (Pm 11 600), T25 (Pm 23 800), T50 (Pm 48 600), T80 (Pm 80 900), T150 (Pm 147 600), T270 (Pm 273 000), T410 (Pm 409 800) T670 (667 800). Se usa el programa PSS WinGPC compact V.6.20 (PSS, Mainz, Alemania) para analizar la distribución de peso molecular de las muestras.

4. Determinación del contenido de agua

El contenido de agua se determina usando un titulador AQUA 40.00 Karl-Fischer (de analytikjena AG). Se usa Hydranal-Coulomat AG (Riedel-deHaën, Nº de artículo 34 836) como analito. La sustancia de referencia usada es dihidrato de tartrato de sodio dibásico (Riedel-deHaën, Nº de artículo 32 323) con un contenido de humedad del 15,61-15,71%. 10-20 mg de muestra se pesan en botellas de muestra de 5 ml (N20-5DIN, Machery-Nagel, Nº de artículo 702 04.36), las botellas se cierran con tapas de prensado (N20 TS/oA, Machery-Nagel, Nº de artículo 702 815) y el contenido de agua de la muestra se determina usando el titulador Karl-Fischer.

5. Determinación del grado de ramificación

Las inulinas inicialmente se someten a permetilación y la integridad de la metilación se comprueba mediante espectroscopía ATR-IR (véase más adelante para aparato y condiciones). Después las muestras se descompusieron mediante hidrólisis ácida (análisis de metilación convencional) o como alternativa mediante degradación reductiva en sus componentes básicos de monómero y la composición molar relativa se determinó mediante cromatografía de gas (véase más adelante para aparato y condiciones) y espectroscopía de masas cromatografía de gas (GC-MS, véase más adelante para aparato y condiciones) de los acetatos de alditol parcialmente metilados y acetatos de anhidro alditol.

ATR-IR	
Aparato	Bruker Tensor 27
Técnica	Diamond ATR

GC:

Aparato:	Carlo Erba HRGC 5160 Mega Series
Columna:	Chrompack CPSi18CB (25 m) con hueco de retención (1,5 m) ID: 0,25 mm FD: 0,25 µm
Gas portador:	He (80 kPa)
Detector:	FID
Inyector:	en columna
Integrador:	Merck Hitachi D-2500 Chromato-Integrator
Programa de temperatura:	60°C (1 min isotérmico), 10°C/min a 170°C, 3°C/min a 230°C, 20°C/min a 290°C (20 min isotérmico)

GC-MS

GC:	Aparato:	Agilent 6890 GC
	Columna:	HP-5, 30 m
	Gas portador:	He
	Inyector:	Split 5:1
	Programa de temperatura:	60°C (1 min isotérmico), 10°C/min a 170°C, 3°C/min a 230°C, 20°C/min a 290°C (20 min isotérmico)
MS:	Aparato	Espectrómetro JEOL GCmate II double-focusing sector field spectrometer
	Modo	EI, 70 eV
	Evaluación	AMDIS32, Wsearch32

5.1 Permetilación

(De acuerdo con Ciucanu y Kerek / Ciucanu, I. & Kerek, F. (1984) A simple and rapid method for the permethylation of carbohydrates. Carbohydr. Res. 131, 209-217).

5 Aproximadamente 50 mg de muestra se disuelven en 2,5 ml de dimetil sulfóxido. Después se añaden 3 eq/OH de hidróxido de sodio finamente molido y 3 eq/OH de yoduro de metilo y se agita a temperatura ambiente durante 24 horas. Después la mitad de la cantidad de cada uno de los reactivos se añade una vez más. Las muestras se dializan posteriormente frente a agua destilada durante cuatro días (membrana de diálisis Spectra/Por MWCO 3500, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, EE.UU.) y se liofilizó. La integridad de la metilación se comprueba mediante espectroscopía ATR-IR. La vibración de alargamiento de OH en el intervalo de $3.300-3.400\text{ cm}^{-1}$ debe haber desaparecido si existe permetilación.

5.2 Análisis de metilación convencional

Hidrólisis

15 Aproximadamente 2 mg de inulina permetilada se mezclan en un vial V de 1 ml con 0,9 ml de ácido trifluoroacético 0,5 M y se hidrolizó mediante agitación a 90°C durante una hora. Después de que la solución se ha enfriado la misma se evapora hasta sequedad en una corriente de nitrógeno. Los restos de ácido trifluoroacético se retiran mediante codestilación con tolueno.

Reducción

20 La muestra hidrolizada se mezcla con 500 μl de una solución de NaBD_4 0,5 M en NH_3 2 M y se calienta a 60°C durante una hora. Después del enfriamiento, se descompone el exceso de borohidrito de sodio añadiendo unas pocas gotas de ácido acético glacial. El borato resultante se elimina mediante codestilación con ácido acético metanólico al 15%.

Acetilación

25 Los alcoholes de azúcar metilados parcialmente que se producen como resultado de la reducción se mezclan con 200 μl de anhídrido acético y 50 μl de piridina y se acetilan a 90°C durante 2 horas. La solución se enfría y después se añade solución saturada de bicarbonato de sodio hasta que no se observe formación de gas adicional. Después se extrae cuatro veces con 15 ml de diclorometano cada vez. Las fases orgánicas combinadas se lavan dos veces con 15 ml de solución de NaHCO_3 saturada cada vez, una vez con 20 ml de HCl 0,1 M frío y una vez con 25 ml de agua destilada. Después la solución se seca sobre cloruro de calcio y se concentra en vacío y se recoge en diclorometano para la medición de GC.

30 5.3 Degradación reductiva

35 Aproximadamente 1 mg de la muestra permetilada se disuelve en 500 μl de diclorometano en un vial de vidrio con tapa de rosca, se mezcla con 6 eq/glicósido unido en trietilsilano y 4 eq de triflato de TMS y se agita a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la adición de 20 μl de anhídrido acético, la agitación se continúa a temperatura ambiente durante 2 horas. Después la reacción se detiene añadiendo solución de NaHCO_3 acuosa saturada y la agitación se continúa durante 1 hora. El procesamiento tiene lugar mediante extracción con diclorometano y posterior lavado de las fases orgánicas combinadas con solución de NaHCO_3 acuosa saturada y agua destilada. La solución finalmente se seca sobre cloruro de calcio, se concentra en una corriente de nitrógeno y se recoge en diclorometano para la medición de GC.

5.4 Análisis cualitativo y cuantitativo

40 Los productos de degradación se analizaron cuantitativamente mediante cromatografía de gas con inyección en columna y un detector de ionización de llama (FID). Las áreas de pico se corrigieron de acuerdo con su respuesta de carbón eficaz. Los picos se asignaron en base a su espectro de masas (GC-MS) y los tiempos de retención de muestras de comparación conocidas.

6. Calorimetría de exploración diferencial de inulina

45 40 ml de una solución de inulina al 15% (p/v) se prepararon en tubos de polipropileno graduados de 50 ml (30,0 x 115 mm, de Greiner, número de orden 227261). Esto se realizó añadiendo el polvo respectivo a agua doble destilada y agitando. Posteriormente, todas las suspensiones preparadas se colocaron en un baño de agua (95°C) y se disolvieron mediante agitación varias veces. Después de 20 minutos, se establece visualmente que todas las suspensiones se han disuelto completamente. Las soluciones preparadas después se dividen en partes iguales en dos tubos de polipropileno graduados de 50 ml (30,0 x 115 mm, de Greiner, número de orden 227261) e inmediatamente se congelan en nitrógeno líquido. Las soluciones congeladas después se liofilizaron durante dos días (contenido de agua aproximadamente el 10%) y se molieron en un mortero.

El contenido de agua de las muestras se determina usando un titulador Karl-Fischer automático (véanse

procedimientos generales 4).

- 5 Para una medición de DSC, aproximadamente 10 mg de sustancia seca de inulina se pesan en un crisol de acero inoxidable (volumen 50 μ l), se encuentra el peso exacto y se añaden 30 μ l de agua destilada. Los crisoles después se sellan herméticamente. Se usa un crisol de acero inoxidable vacío como referencia. La muestra se calienta en un aparato de DSC con automuestreador (Perkin Elmer; Diamond) de 10-160°C a un índice de calentamiento de 10°C/minutos. El análisis de datos se realiza mediante el programa de software PYRIS 7.0 (Perkin Elmer, 63110 Rodgau-Jügesheim, Alemania). Esto implicó la determinación de T_0 (inicio) y la entalpía libre dH.

7. Determinación de viscosidad

- 10 Soluciones de inulina acuosas de diversas concentraciones (peso por volumen de agua destilada) se prepararon mediante agitación a 98°C y las soluciones transparentes se midieron inmediatamente después de un tiempo de disolución no mayor de 13 min. Las mediciones se realizaron en un BOHLIN Gemini Advanced Rheometer (Malvern Instruments; Herrenberg, Alemania) usando el modo de viscosimetría isotérmica (90°C) en un sistema de placa de cono CP4^o/40 mm. El hueco de medición se cubrió con una capa de aceite de parafina extra ligera. Un índice de cizallamiento de 10 s^{-1} durante 60 s con un tiempo de relajación de 10 s se usó para precizamiento.
- 15 El cizallamiento se midió en etapas logarítmicas en un modo de índice de cizallamiento. El índice de cizallamiento inicial fue 20 s^{-1} , el índice de cizallamiento final fue 30 s^{-1} en una rampa creciente con un tiempo de retención de 20 s y un tiempo de integración de 10 s. Los datos se basan en los valores promedio en el intervalo de 20 s^{-1} a 30 s^{-1} y son las medias de tres mediciones independientes por punto de dato. Todas las mediciones especificadas como valores atípicos no se incluyen en los valores promedio. La definición de "atípico" tuvo lugar mediante el denominado "procedimiento cuartil". Esto implicó que los atípicos se especificaran como todas las mediciones que caían fuera del
- 20 "procedimiento cuartil". Esto implicó que los atípicos se especificaran como todas las mediciones que caían fuera del criterio de intervalo $Q_2 - k*(Q_3-Q_1) \leq \text{no atípico} \leq Q_2 + k*(Q_3-Q_1)$ (SACHS, Lothar: Angewandte Statistik, 10^a edición, Springer-Verlag Berlin (2002), págs. 364 y siguientes). Q_1 y Q_3 aquí son el cuartil al 25% y el cuartil al 75%, respectivamente, y Q_2 es la mediana (cuartil del 50%) de los datos medidos. Se usó un valor de 1,5 para el factor k.

8. Determinación de resistencia de gel y comportamiento viscoelástico

- 25 70 g de una suspensión al 17% en peso de inulina en agua (destilada) se pusieron en un vaso de medición MV de un viscosímetro Haake Rotovisco VT 550. Después se insertó un agitador de paleta y se montó en el aparato precalentado (90°C, camisa calefactora). Después la mezcla se calentó con agitación a 128 rpm durante 15 min.

- 30 Después de 15 min, la muestra se transfirió a 90°C a un recipiente que consistía en una base y una pared compuesta de dos anillos cilíndricos de lámina acrílica (cada uno de 20 mm de alto, 30 mm de diámetro) los cuales se colocaron uno encima del otro y se sujetaron por medio de una cinta adhesiva (19 mm de ancho). La mezcla se introdujo en el recipiente sin burbujas hasta que el nivel fue aproximadamente 5 mm por debajo del borde superior. Después el recipiente se cubrió herméticamente con un papel de aluminio y se dejó que reposara a temperatura ambiente (23°C) durante una noche.

- 35 La fuerza del gel se midió después de almacenamiento a temperatura ambiente (23°C) durante aproximadamente 20 horas usando un analizador de textura TA XT2. Para hacer posible la medición de la fuerza del gel en una superficie lisa y sin secar, en primer lugar la cinta adhesiva que mantenía los dos anillos cilíndricos de recipiente unidos se retiró. Después el gel se dividió con una cuchilla de afeitar entre los anillos de forma que la parte inferior del gel mostrara una superficie lisa.

- 40 La fuerza del gel se midió con el analizador de textura TA XT2 mediante un domo de nivel (diámetro 24,5 mm) penetrando (1 mm) en el gel. Los ajustes en el analizador de textura fueron los siguientes:

Principio de medición	fuerza en dirección de presión
Velocidad de avance	2 mm/s
Velocidad de ensayo	2 mm/s
Valor de disparo	0,01 N
Velocidad inversa	2 mm/s
Desplazamiento	1 mm

Se indica el valor máximo con una penetración única del domo en newton.

Ejemplo 1

Caracterización de la inulina a partir de raíces de alcachofa

- 45 **1. Cultivo de las plantas de alcachofa**

Las plantas de alcachofa de la variedad Madrigal se cultivaron en las cercanías de Valencia, España. Las semillas se sembraron en abril de 2005 y las plantas se recogieron en agosto/septiembre de 2005. Las raíces se separaron

de la parte que sobresale del suelo, se limpiaron de la tierra adherente y se secaron. Después las raíces se transportaron sin enfriamiento desde España hasta Alemania. Las raíces se almacenaron a -20°C hasta que la inulina se extrajo.

2. Preparación de inulina a partir de raíces de alcachofa

5 Raíces de plantas de alcachofa de la variedad Madrigal de aproximadamente 4-5 meses de edad se usan para preparar la inulina. 60 kg de raíces se limpian de constituyentes de la tierra que se adhieren a las mismas mediante lavado en el estado congelado con un limpiador a alta presión (Kärcher, Winnenden, tipo HD 700) antes de procesarse adicionalmente hasta trozos en un trituradora (Gloria Universal garden shredder natura 2800L). Los trozos se colocan en un extractor con camisa calefactora con agitador de compuerta que contiene agua precalentada a 70-90°C. La cantidad total de agua añadida es 180 kg. El pH del extracto se ajusta a 9,0 añadiendo NaOH. Después de calentamiento rápido del puré de trozos a 80-85°C a través de la camisa del extractor, el puré se agita a 80-85°C durante aproximadamente 60 min con el fin de extraer la inulina (fructano) de los trozos. Después de este tiempo, el extracto crudo se separa de los trozos mediante bombeo.

15 El extracto crudo se decolora en un procedimiento de dos fases formando un total de 0,7 g de $Mg(OH)_2/100$ ml de extracto. En la primera fase, 3.400 g de $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (equivalente a 0,5 g de $Mg(OH)_2/100$ de extracto) se disuelven en 170 l de extracto coloreado marrón oscuro con agitación durante el transcurso de 10 min. Posteriormente, 1.015 g de $Ca(OH)_2$ al 96% se añaden como suspensión en 3 l de agua y se agitan durante 10 min. Se ajusta un pH de 9,4. La mezcla de precipitación completa se aclara cuantitativamente en un separador de placa (GEA, Westfalia tipo SC 6-06-076) durante el transcurso de 120 min. La solución de extracción decolorada tiene un color amarillo pálido y está libre de materiales que provocan turbidez. Una fase sólida en forma de una pasta gruesa se obtiene y se elimina la fracción de lodo. La etapa de decoloración completa se repite en la solución de extracción obtenida de esta manera y que comprende 150 l con $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (equivalente a 0,2 g de $Mg(OH)_2/100$ de extracto) y 410 g de $Ca(OH)_2$ al 96% como suspensión en 1,5 l de agua. La mezcla de precipitación completa se aclara cuantitativamente en un separador de placa durante el transcurso de 30 min. La solución de extracción decolorada con un pH de 9,4 es transparente, tiene un color amarillo pálido y está libre de materiales que provocan turbidez. Un centrifugado de 71 en forma de una pasta gruesa se obtiene nuevamente como fracción de lodo.

La inulina sólida se obtiene a partir del extracto avivado de esta manera mediante enfriamiento a una temperatura de 4°C durante un periodo de 48 h. La inulina se obtiene como un sedimento similar a lodo mediante depósito centrífugo usando el separador de placa.

30 El sedimento después se purifica dos veces en sucesión en la misma concentración que está presente en el extracto avivado disolviendo la inulina en agua caliente y precipitación renovada mediante almacenamiento a 2°C durante 48 h. El sedimento de inulina obtenido después de la segunda precipitación se liofiliza.

La Figura 1 muestra una representación diagramática del progreso de la extracción.

35 Durante el procedimiento de extracción, la distribución de polímeros se analizó después de las etapas de extracción y purificación individual mediante cromatografía de permeación en gel con detección de índice de refracción y calibración con patrones de dextrano (sistema GPC-RI, véase el Procedimiento 3.2 en "Procedimientos Generales"). Como es evidente a partir de la Figura 2, la distribución de polímeros del extracto (B) después de la extracción con agua caliente es comparable a aquella en las raíces lavadas (A). La Figura 2 muestra un análisis de GPC-RI de la distribución de polímero en las raíces de alcachofa lavadas (A) y el extracto después de la extracción con agua caliente de inulina (B).

40 El análisis de la distribución de polímero después de la precipitación en frío (4°C) de la inulina mostró que una fracción de inulina de peso molecular elevado (C) se separó a partir de una fracción de peso molecular bajo (D) (Figura 3). La Figura 3 muestra un análisis de GPC-RI de la distribución de polímero en el extracto después de la extracción con agua caliente de inulina (B), en el sedimento después de la precipitación de inulina a 4°C (C) y en el desarrollo superior obtenido después de centrifugación de la inulina después de precipitación (D).

Se consiguió un enriquecimiento adicional de inulina de peso molecular elevado y un agotamiento de sustancias de peso molecular bajo, especialmente mono y disacáridos, mediante reprecipitación de la fracción de inulina de peso molecular elevado (Figura 4). Figura 4: análisis de GPC-RI de la distribución de polímero en la inulina precipitada a 4°C (C) en el sedimento después de la reprecipitación (F) y en fase transparente después de la reprecipitación (E).

50 3. Determinación de la pureza de la inulina preparada

La pureza de la inulina de alcachofa preparada obtenida en la sección 2 se determinó determinando los contenidos de fructano y agua del material liofilizado. El contenido de agua determinado para la inulina de alcachofa fue el 1,7% (véase el procedimiento "Determinación del contenido de agua").

55 El contenido de fructano se determinó hidrolizando la inulina con la enzima exo-inulinasa (véase el procedimiento "determinación de fructano mediante hidrólisis con exoinulinasa"). La pureza en base a materia seca (MS) se encontró a partir del contenido de fructano y el contenido de agua. Pureza = contenido de fructano x 100 / (100-

contenido de agua).

Como es evidente a partir de la Tabla 1, el grado promedio de pureza de la inulina de alcachofa preparada es el 97% de la materia seca (MS).

Tabla 1: Determinación de la pureza de la inulina de alcachofa preparada

Material	Contenido de agua [%]	Digestión con exo-inulinasa	
		Fructano [% de peso inicial]	Pureza [% TM]
Inulina de alcachofa	1,7	95 ± 3	97

5

4. Determinación de peso molecular mediante GPC-RI-MALLS

Se prepararon soluciones acuosas al 0,5 % (p/v) a partir de la inulina de alcachofa purificada obtenida en la sección 2 y a partir de muestras de referencia adquiridas en Raftiline HP (de Orafti, lotes: HPBNH4DNH4) e inulina a partir de tubérculos de dalia (de Sigma, número de artículo I-3754, lote: 75H7065) y se determinó la distribución de masa molecular de la inulina mediante cromatografía de permeación en gel (véase el procedimiento 3.1). Esta distribución se representa en la figura 5 y las masas moleculares (anhidrofructosa = 162 g/mol) y las longitudes de cadena promedio calculadas a partir de las mismas se han resumido en la Tabla 2.

10

15

El análisis de la distribución de peso molecular usando el sistema de GPC-RI-MALLS dio como resultado una masa molecular promedio en peso P_m de 12.088 g/mol y un número de masa molecular promedio M_n de 11500 g/mol para la inulina de alcachofa. Esto corresponde a una longitud de cadena promedio de 75 para DPw y de 71 para DPn. Las longitudes de cadena de la inulina de alcachofa purificada son en promedio claramente más largas que las de Raftiline HP (DPw = 33, DPn = 29) y de inulina de dalia (DPw = 39, DPn = 33). Esto también se refleja en las masas moleculares mínimas y máximas, que son claramente más largas para la inulina de alcachofa.

Tabla 2: Distribución de masa molecular de diversas inulinas

Material	P_m [g/mol]	M_n [g/mol]	Distribución de polímero (min -máx.) [g/mol]	DPw	DPn	Dispersidad Molecular
Inulina de alcachofa	12088	11500	4385 - 26086	75	71	1,06
Raftiline HP	5391	4738	999 - 15162	33	29	1,14
Inulina de dalia	6250	5407	1139 - 19569	39	33	1,18

20

5. Resultados de Determinación de glucosa, fructosa y sacarosa,

La proporción de glucosa, fructosa y sacarosa en la inulina de alcachofa obtenida en la sección 2 se determinó mediante determinación fotométrica de los azúcares en soluciones de inulina al 5% como se ha descrito en el Procedimiento 3 ("Determinación de azúcar").

25

Como es evidente a partir de la Tabla 3, los contenidos de glucosa y sacarosa en la inulina de alcachofa purificada son menores del 0,1% del polvo de inulina, el contenido de fructosa es el 0,12% del polvo de inulina.

Tabla 3: Contenido de glucosa, fructosa y sacarosa en inulina de alcachofa purificada.

Material	Glucosa (g/100 g de polvo de inulina)	Fructosa (g/100 g de polvo de inulina)	Sacarosa (g/100 g de polvo de inulina)
Inulina de alcachofa	< 0,1	0,12	< 0,1

6. Grado de ramificación

6.1 Análisis de metilación convencional

El grado de ramificación se midió en una muestra de inulina de la invención que tiene un DPw de 75 y un DPn de 71 y una extensión de 1256-31631 g/mol. Los ejemplos comparativos usados fueron Raftiline HP (de Orafti, lotes HPBNO3DNO3 y HPBNH4DNH4) e inulinas de tubérculos de dalia (de Sigma, número de artículo I-3754, lote: 022K7045 ó 75H7065) y raíces de alcachofa de Jerusalén (Sigma, número de artículo I-2880 lotes 111H7045 y 88F7220) el grado de ramificación se determinó por medio de análisis de metilación (véase Procedimientos Generales, 5.1).

35

La hidrólisis, reducción y acetilación de fructanos enlazados a 2-1- dio como resultado 1,2,5-tri-O-acetil-3,4,6-trio-

metil-D-manitol y -sorbitol. Los radicales fructosilo terminales producen 2,5-di-O-acetil-1,3,4,6-tetra-O-metil-D-manitol y - sorbitol. Una unidad de glucopiranosilo terminal da como resultado 1,5-di-O-acetil-2,3,4,6-tetra-O-metil-D-sorbitol. Los componentes básicos adicionalmente ramificados en la posición 6 producen los correspondientes 1,2,5,6-tetra-O-acetil-3,4-di-O-metilalditoles.

- 5 Además de los productos que indican enlace 2-1, fue posible detectar en todas las muestras de fructano aquellas de componentes básicos de fructosa y glucosa terminales. Los cromatogramas mostraron adicionalmente dianhidrido de difructosa (DFDA, aprox. 3 mol %) que se forma en la eliminación de TFA en una corriente de nitrógeno a partir de fructosa enlazada 2-1.

- 10 A partir del espectro de masas fue posible adicionalmente identificar productos que se producen como resultado a partir de un enlace 2-1,6 en todas las muestras. También se identificaron compuestos 1,3 y 1,4 acetilados, que surgirían con ramificaciones en las posiciones 3 y 4, respectivamente pero también se pueden obtener a partir de metilación incompleta. La aparición inespecífica de productos 1,3 y 1,4 acetilados es un indicador de submetilación. Asumiendo que la posición 6 se ve afectada por la submetilación hasta el mismo alcance que las posiciones 3 y 4, la proporción inespecífica (promedio de compuestos 1,3-Ac y 1,4-Ac) se resta de la proporción de unidades de fructosa 15 2-1,6 ramificadas. La Tabla 4 más adelante muestra los resultados que se producen a partir de las mismas.

Tabla 4

Muestra	2-1,6-Fructosa [mol%]*
Inulina Alcachofa	1.1**
Raftiline HP	0,4
Dalia	0,2
Alcachofa de Jerusalén	no detectado
* en base a todas las especies encontradas	
** promedio de dos mediciones	

- 20 La evaluación del análisis de metilación reveló un grado de ramificación del 1,1 mol % para la inulina de alcachofa. El grado de ramificación de esta inulina por tanto es claramente más elevado que el de las inulinas de las muestras de referencia a partir de alcachofa de achicoria (RaftilineHP), dalia y Jerusalén.

Ejemplo 2

Propiedades de la inulina de raíces de alcachofa

- 25 Todas las investigaciones siguientes se refieren a la inulina de alcachofa de la invención descrita previamente en el Ejemplo 1 y detallada previamente en las Tablas 1-4. Las inulinas Raftiline HP y de dalia comparativas son igualmente aquellas detalladas en el Ejemplo 1.

1. Investigación de calorimetría de exploración diferencial de inulina

- 30 El análisis calorimétrico de exploración diferencial de inulina (para procedimientos: véase procedimientos) mostró diferencias claras entre las diversas materias (véase la Tabla 5 más adelante) con relación al comportamiento de fusión. Ambas muestras de inulina difirieron enormemente en relación a la entalpía de fusión. Esta estuvo por encima de 29 J/g para la inulina de alcachofa y únicamente 22,8 J/g para Raftiline HP. Las diferencias en T_{inicio} (T_0) fueron algo menores, pero la temperatura de fusión inicial para la inulina de alcachofa fue 40,4°C, que era más de 2,5°C más elevada que la de la inulina de achicoria comparativa. Esta estabilidad térmica aumentada de la inulina de alcachofa puede ser una ventaja considerable en determinados procedimientos térmicos en el sector de los productos alimenticios, debido a que la inulina de alcachofa es claramente menos sensible a temperaturas elevadas 35 que la inulina de achicoria.

Tabla 5.

Material	T_0 [°C]	Entalpía de fusión dH [J/g]
Inulina de alcachofa	40,4	29,1
Raftiline HP	37,8	22,8

2. La viscosidad

Tabla 6: Comparación de la viscosidad dinámica de inulina de achicoria e inulina de alcachofa en agua como una función de la concentración (T = 90°C)

% de Concentración (p/v)	Viscosidad (mPas)	
	Raftiline HP (achicoria)	Inulina de alcachofa
10	2,4	2,3
24	4,3	5,4
26	4,2	12,2
28	4,5	15,7

- 5 Como es evidente a partir de la tabla anterior, ambas inulinas demostraron a concentraciones de hasta el 24% (p/v) viscosidades muy bajas a 90°C (agua = 1 mPas). La inulina de la invención se volvió viscosa a concentraciones del 26% (p/v) y especialmente al 28%, mientras que Raftiline HP permaneció muy similar en su viscosidad al agua hasta el 28% (p/v).

3. Tamaño de partículas después de liofilización

- 10 La muestra liofilizada del Ejemplo 1 se molió en un molino de cuchillo (Grindomix GM200, Retsch Technologie GmbH, Haan, Alemania) y se determinó el tamaño de partícula mediante análisis granulométrico (máquina de tamiz vibrador "Analysette 3" de Fritsch frecuencia 2.0, ayudas de tamizado: 8 bolsa de ágata (10 mm Ø)/tamiz, tiempo de tamizado 1-2 min, cantidad cargada aproximadamente 50 g). El resultado se muestra en la Tabla 7 más adelante. Fue posible determinar el diámetro de partícula promedio mediante análisis granulométrico como 126 µm.

15

Tabla 7

Ancho de malla / µm	Masa/g	%
<63	12,80	25,78
<90	4,99	10,05
<125	6,60	13,29
<160	6,26	12,61
<200	5,09	10,25
<500	13,75	27,69
>500	0,16	0,32
Total	49,65	100,00

4. Secado por pulverización, tamaño de partícula

- 20 Se preparó una inulina con DPw = 81 como se ha descrito en el Ejemplo 1. Después de una liofilización intermedia, se redisolvió y después se secó por pulverización en una unidad de secado por pulverización de lecho fluido Glatt GPCG3.1. Para este fin, la inulina liofilizada se introdujo en agua, se calentó hasta 85-90°C y se disolvió. La solución calentada se secó por pulverización con temperatura de aire de salida variable y las propiedades del procedimiento y las propiedades del producto se observaron. La temperatura de entrada se mantuvo constante a 120°C. El alimento consistió en agua al 80% e inulina al 20%, la temperatura del alimento fue de 85-90°C y la temperatura de aire de salida fue de 80°C.

- 25 La distribución del tamaño de partícula se determinó mediante análisis granulométrico como se ha descrito anteriormente. Los resultados del análisis granulométrico de la muestra secada por pulverización se indican en la Tabla 8 más adelante. El tamaño de partícula promedio del producto secado por pulverización se determinó a partir de la distribución del tamaño de partícula del análisis granulométrico que era < 60 µm.

Tabla 8

Ancho de malla / µm	Masa/g	%
<63	34,63	69,9
<90	9,43	19,0
<125	3,03	6,1
<160	1,05	2,1
<200	0,53	1,1
<500	0,86	1,7
>500	0,00	0,0
Total	49,53	100,00

30

5. Cristalinidad

Muestras de inulina en forma de polvo se prepararon sin tratamiento previo adicional en un portador de muestras de 2 mm de grosor (convencional) entre dos películas de revestimiento de PET. Las mediciones de rayos X se realizaron con un difractor de dos círculos D5000 de Bruker-AXS en transmisión simétrica usando radiación Cu-K α monocromática (monocromador Ge (111)). Los registros se realizaron a 30 mA y 40 kV en el intervalo de ángulo 2 θ de 3-29° (ancho de etapa $\Delta 2\theta = 0,1^\circ$) y 29,5-104 (ancho de etapa $\Delta 2\theta = 0,5$), etapa/ $\Delta 2\theta$: 60 segundos.

Se usó software en base al procedimiento de Ruland-Vonk (WAXS 7, desarrollado por Fraunhofer Institut für angewandte Polymerforschung, Potsdam (DE), descrito en http://edocs.tu-berlin.de/diss/2003/rihm_rainer.pdf, págs. 19 y siguientes) para encontrar el grado de cristalinidad x_c , los tamaños de cristalito $D_{(hkl)}$ y el parámetro de desorden k , que es una medida de la alteración de la red cristalina en los cristalitas, a partir de las representaciones de dispersión. La representación de dispersión para la muestra 2 (véase más adelante) se usó como un archivo de fondo amorfo. Se usó fructosa como base química, calculada con una densidad de 1,65 g/cm³. Los tamaños de cristalito $D_{(hkl)}$ se determinaron a partir de la mitad de la anchura de las reflexiones de rayos X mediante la fórmula de Scherrer en las dos primeras interferencias principales a $2\theta = 8^\circ$ y 12° .

La muestra de una inulina liofilizada con un DPw de 77-82 y de una inulina secada por tambor con DPw 81 se midió. Los resultados obtenidos están la Tabla 9 más adelante:

Tabla 9

	Cristalinidad X_c [%]	Parámetro de desorden k [10 ⁻² nm ²]	$D_{(hkl)} 2\theta = 8^\circ$ [nm]	$D_{(hkl)} 2\theta = 12^\circ$ [nm]
Inulina liofilizada	35	4,9	5,7	7,3
Inulina secada por tambor	28	2,4	6,7	10,1

6. Formación de estructura de las inulinas después de calentamiento en agua

Partes de 15 ml de suspensiones al 20% de las inulinas en agua se prepararon cada una en vasos de precipitado de aluminio (vasos de precipitado RVA-3d de Winopal Forschungsbedarf GmbH; volumen aproximadamente 70 ml, diámetro 38 mm), se agitaron y equiparon con una barra de agitación magnética y finalmente se cubrieron. Las suspensiones se calentaron usando un agitador multitérmico (VARIOMAG Multitherm 15 de H + P Labortechnik AG) con agitación. La temperatura se controló en este caso usando una sonda PT 100 (accesorio para el VARIOMAG Multitherm 15) que se situó en un vaso de precipitado de referencia cubierto con agua destilada en el bloque calefactor. El agitador multitérmico se calentó previamente de forma que la temperatura de la muestra de referencia permaneciera estable a 90°C. Las suspensiones que se tienen que calentar se colocaron en el agitador multitérmico y se agitaron a 90°C durante 8 min. Las muestras después se retiraron del agitador multitérmico y almacenaron a temperatura ambiente durante 24 horas. La resistencia de los geles resultantes se midió posteriormente usando un analizador de textura de TA-TX2 (Stable Micro Systems). Esta medición se realizó usando el émbolo de penetración SMS/0.5 R076 (Stable Micro Systems) con un diámetro de 12 mm como sistema de medición. Los siguientes parámetros se aplicaron para la medición de TA con la celda de medición de 5 kg:

- Opciones: medir fuerza en dirección de presión
- Ensayo único
- Parámetro: velocidad de avance 2,00 mm/s
- Velocidades de ensayo 0,50 mm/s
- Velocidad inversa: 0,50 mm/s
- Desplazamiento (profundidad de penetración) 3 mm

Fuerza de disparo 2 g

El comportamiento de formación de estructura de diversas inulinas después de tratamiento térmico en agua se investigó. De ello se desprende que las inulinas de achicoria (Raftiline HP® y Beneo HPX®) no forman estructuras similares a gel en estas condiciones (Tabla 10). Por el contrario a esto, las inulinas de alcachofa con DPw = 77-81 o DPw = 75 forman estructuras muy fuertes. De forma sorprendente, la muestra en la que se usó la inulina secada por pulverización con DPw = 81 también formó geles considerablemente más fuertes que las muestras comparables (DPw = 77-81 o DPw = 75) en las que el fructano estaba liofilizado. Esto es particularmente claro a partir del hecho de que las resistencias de gel encontradas con únicamente el 15% (p/p) de concentración de inulina empleada estuvieron en un nivel similar al de aquellos con muestras comparativas liofilizadas al 20%.

Tabla 10: Formación de estructura de los fructanos después de calentamiento en agua

	Concentración de inulina, % (p/p)	Resistencia de gel [g]	Desviación típica
Raftiline HP® DPw 33	20	No gel	-
Beneo HPX® DPw 33	20	No gel	-
Inulina DPw 77-81	20	370	10*
Inulina DPw 75	20	350	44**
Inulina DPw 81, secada por pulverización	20	931	42*
Inulina DWw 81, secada por pulverización	15	289	69*
* - n=2			
** - n=4			

7. Propiedades prebióticas

5 El efecto prebiótico de inulina de acuerdo con la invención se investigó en un estudio de modelo *in vivo* en un sistema de fermentación de tres fases (modelo intestinal). Los tipos de bacteria que colonizan el sistema de fermentación y sus actividades metabólicas (formación de ácidos grasos de cadena corta), se determinaron.

1. Materiales y procedimientos:

a) Sistema de cultivo de tres fases continuo:

10 En este estudio se usó un sistema de cultivo de tres fases continuo que se había descrito previamente por Pereira y col (2003) *Appl Environ Microbiol* 69(8), 4743-4752 y Probert y col (2004) *Appl Environ Microbiol* 70, 4505-4511. El modelo intestinal consistió en tres recipientes de cultivo V1, V2 y V3 con volúmenes de trabajo de 0,28, 0,30 y 0,30 litros que se dispusieron en series. Cada recipiente estaba provisto de un agitador magnético, la temperatura se mantuvo a 37°C por medio de un baño de agua, y el pH en los recipientes individuales se controló mediante un controlador de pH Electrolab. El sistema entero (incluyendo recipiente de medios) se hizo funcionar en condiciones anaeróbicas pasando nitrógeno sin oxígeno estéril a través del líquido. El pH en los tres recipientes se ajustó añadiendo la cantidad apropiada de HCl-NaOH 0,5 M a 5,5 (V1), 6,2 (V2) y 6,8 (V3). El recipiente 1 simuló las condiciones microbianas en el intestino grueso anterior. Era relativamente rico en nutrientes, tenía un pH relativamente más ácido y un tiempo de residencia más corto que el recipiente 3 con un pH más neutro y comparativamente poco sustrato. El recipiente 3 simuló la parte posterior del intestino grueso. El recipiente 2 modeló la parte central transversal del intestino grueso (colon transversal).

15 Se insufló continuamente nitrógeno sin oxígeno en el medio de cultivo estéril y se introdujo por medio de una bomba peristáltica en V1 que condujo secuencialmente a V2 y V3. El medio de cultivo consistía en los siguientes componentes en agua destilada (g/l): almidón de patata, 5,0; pectina (cítricos), 2,0; caseína (sal de sodio), 3,0; Raftiline LS (Orafti, Tienen; BE), 1,0; xilano (cáscara de avena), 2,0; arabinogalactano (Fluka), 2,0; goma guar, 1,0; mucina (porcina gástrica tipo III), 4,0; triptona (Oxoid), 5,0; agua de peptona (Oxoid), 5,0; extracto de levadura (Oxoid), 4,5; sales biliares N° 3 (Oxoid), 0,4; L-cisteína HCl, 0,8; NaHCO₃ (Fisher Scientific), 1,5; hemina, 0,05; NaCl (Fisher Scientific), 4,5; KCl (Fisher Scientific), 4,5; CaC₁₂x6H₂O (BDH), 0,15; KH₂P0₄ (BDH), 0,5; FeSO₄x7H₂O (BDH), 0,005; MgSO₄x7H₂O (Fisher Scientific), 1,25. Además, se añadieron 1,0 ml de Tween 80 (BDH) y 10 microlitros de vitamina K. Una concentración de 4 ml de una solución al 0,025% (p/v) de resazurina se añadió al medio de cultivo como indicador de condiciones anaeróbicas. El medio se sometió a autoclave a 121°C durante 15 min y se enfrió en una atmósfera de nitrógeno. A menos que se indique de otra manera, todos los químicos se adquirieron en Sigma Chemical Co., RU.

Recolección y preparación de materia fecal:

25 El volumen restante de cada recipiente se alcanzó con suspensión fecal preparada recientemente a partir de un hombre de 30 años de edad que no había tomado ningún antibiótico durante tres meses antes del ensayo. La suspensión fecal fresca al 20% (p/p) se preparó con solución salina tamponada con fosfato reducida previamente (PBS) y digerida a velocidad normal durante 2 minutos en un aparato de digestión (estómago). Los restos de alimentos grandes se eliminaron a través de una bolsa de filtro. Cien ml de la suspensión resultante después se emplearon para inocular cada uno de los tres recipientes de fermentación. El sistema se operó inicialmente como cultivo de lote usando el medio de cultivo a lo largo de 48 horas. Después de 48 h de fermentación de cultivo de lote, el medio de cultivo complejo que simula la composición de líquido intestinal se introdujo en V1 y después en V2 y V3 a través de la bomba peristáltica. El tiempo de residencia (R) se calculó como el índice de dilución recíproca para cada recipiente, el tiempo de residencia se ajustó a 27,1 horas y el sistema se operó durante 12 días después del periodo de equilibrio de 48 h inicial para asegurar un estado estable. El tiempo de residencia global fue el total de los tiempos de residencia individuales R de cada fermentador.

Toma de muestras:

La primera muestra (5 ml) (día 0) se tomó después de fermentación durante 24 h. la fermentación continuó hasta que se alcanzó un estado estable (después de 10-12 días) (SS1). En esta fase, las muestras del líquido de cultivo se eliminaron de cada recipiente para análisis posterior de bacterias y ácidos grasos de cadena corta y se usaron como indicadores de SS1. Después de que se alcanzó SS1, el sustrato de ensayo se colocó en el recipiente 1 cada día durante un periodo adicional de 10-12 días. La fermentación se continuó hasta que se alcanzó un estado estable adicional (SS2) y una vez más las muestras se tomaron del líquido de cultivo a partir de cada recipiente para análisis posteriores.

Recuento de bacterias en muestras fecales y muestras del modelo intestinal mediante análisis FISH:

Muestras de recipientes individuales del sistema de fermentación se trataron como se muestra más adelante. Preparación de muestras: se retiraron muestras (375 µl) a partir de los cultivos de lote, se añadieron a 1.125 µl de solución de paraformaldehído al 4% (p/v) filtrada (pH 7,2), se mezclaron y se almacenaron a 4°C durante una noche con el fin de fijar las células. Las células fijadas se centrifugaron a 13.000 rpm durante 5 minutos y se lavaron dos veces en solución tamponada de fosfato filtrada y se resuspendieron en 150 µl de PBS. Se añadió etanol (150 µl) y la mezcla se mezcló y se almacenó a -20°C hasta su uso, pero no durante más de 3 meses.

Hibridación:

Las células fijadas (16 µl) se añadieron a 264 µl de tampón de hibridación filtrado precalentado (horno) (precalentado en X (Tris-HCl 30 mM, NaCl 1,36 M, pH 7,2, dodecilsulfato de sodio al 0,1% v/v, SDS) y se mezclaron. La mezcla se añadió a la sonda marcada con Cy3 adecuada (50 ng/µl) en una proporción de 9:1 (v/v), se mezcló y se colocó en el horno de hibridación a una temperatura adecuada durante una noche.

Lavado y filtrado:

La muestra hibridada (alícuotas adecuadas para conseguir de 30 a 150 células por campo de visión) se añadió a 5 ml de tampón de hibridación filtrado precalentado (Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,9 M, pH 7,2) junto con 20 µl de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, 500 ng/µl) y se dejó a la temperatura de hibridación adecuada durante 30 min. La mezcla se colocó en un filtro de membrana negro con un tamaño de poro de 0,2 µm (GTBP 01300, Millipore Corp.). Slowfade-Light Antifade (Molecular Probes Europe, Leiden, NL) se colocó en el filtro con el fin de evitar la decoloración de la fluorescencia y los soportes se almacenaron en la oscuridad a 4°C durante un máximo de 3 días.

Se examinaron un mínimo de 15 campos de visión por soporte con un microscopio de fluorescencia Nikon Microphot EPI (aumento 1000 X). Se usó el filtro DM510 (550 nm) con el fin de contar las células hibridadas y el filtro de extracción DM400 se usó para las células teñidas con DAPI.

Se usó la siguiente fórmula para calcular la concentración de células C (células/ml) en cada muestra:

$$C = N \times 15,56 \times 14\,873,74 \times (1.000/q)$$

N: número promedio de células contadas por campo de visión

q: volumen de mezcla de hibridación usado

14 873,74: constante de aumento

15,56: factor para todas las diluciones realizadas

Sondas oligonucleotídicas dirigidas a ARNr 16S específicas de género marcadas con el colorante fluorescente Cy 3 que se habían designado previamente y validado se usaron para el recuento de grupos importantes de bacterias. Las sondas usadas fueron Bifl64, específica para *bifidobacterium* (Langedijk (1995), Appl Environ Microbiol 61, 3069-3075), Bac303, específica para bacteroides (Manz y col. (1996) Microbiology 142, 1097-1106), His150, específica para el subgrupo de *Clostridium histolyticum* y Erec482, específica para el grupo de *Clostridium coccooides-Eubacterium rectale* (Franks y col. (1998) Appl Environ Microbiol 64, 3336-3345), Lab158, específica para *Lactobacillus/Enterococcus* (Harmsen y col. (1999) Microb Ecol Health Dis 11, 3-12), Ato291, específico para el grupo *Atopobium*. El colorante de ácido nucleico 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) se usó para el recuento celular total (Tabla 11)

Tabla 11:

Sonda	Género diana	Secuencia (5' a 3')	T-hibridación/ °C
Bif 164	<i>Bifidobacterium</i> spp.	CATCCGGCATTACCACCC	50
Bac 303	<i>Bacteroides</i> spp.	CCAATGTGGGGGACCTT	45
Chis 150	Grupo <i>Clostridium histolyticum</i>	TTTCCYTCTAATTATGGCGTATT	50
Lab 158	<i>Lactobacillus/Enterococcus</i> spp.	GGTATTAGCATCTGTTTCCA	50
Ato 291	Grupo <i>Atopobium</i>	GGTCGGTCTCTCAACCC	50
Erec 482	Grupo <i>Clostridium coccooides-E. rectale</i>	GCTTCTTAGTCARGTACCG	52

Análisis de ácidos grasos de cadena corta:

Se analizaron ácidos grasos de cadena corta (SCFA) en muestras tomadas a partir de diversos recipientes del modelo intestinal como se ha descrito en Pereira y col., Appl. Environ Microbiol (2003) 69(8), 4743-4752. Las muestras se centrifugaron (6.000 g, 10 min) con el fin de eliminar las bacterias y los sólidos y después se filtraron a través de un filtro de HPLC de polisulfona con un tamaño de poro de 0,2 µm. Después 200 µl de cada sobrenadante filtrado se diluyeron con 800 µl de acetonitrilo (1:4) que contenía ácido 2-etilbutírico 3,7 mM como patrón interno. Los ácidos grasos se determinaron mediante cromatografía de gas usando un sistema HP 5890 serie II GC provisto de una columna capilar rellena de sílice fundida (Permabond FFAP, Macherey Nagel, DE) (25 m x 0,32 mm, espesor de película 0,25 µm). Se usó helio como gas portador con un flujo volumétrico de 2,42 ml/min. La temperatura de la columna fue 140°C y la temperatura del inyector y el detector fue 240°C. 5 minutos después de la inyección de la muestra, la temperatura de la columna se aumentó en etapas de 20°C/min a 240°C y el sistema se dejó que se desarrollara durante 5 minutos adicionales. La composición de gas se analizó usando un software HP 3365 series II ChemStation Apg-top Software, Versión A0.03.34. Los siguientes ácidos se usaron como patrones externos, cada uno con concentraciones en el intervalo de 0,5 a 40 mM: ácido acético, ácido propiónico, ácido n-butírico, ácido n-valérico, ácido isovalérico (Fluka), ácido isobutírico (Fluka) y ácido n-capríco. A menos que se indique de otra manera, todos los ácidos se adquirieron en Sigma y tenían una pureza de más del 90%. Las concentraciones de SCFA se calcularon usando una calibración de patrón interno y se expresaron en mM por litro.

2. Resultados

Las siguientes inulinas se ensayaron en el modelo intestinal descrito anteriormente:

20 Inulina de la invención: DPw = 77-81

Muestra de comparación: Raftiline HP® (Orafti), DPw = 33

Se realizó una comparación entre el segundo estado estable (SS2) y el primer estado estable (SS1) y los datos se analizaron usando ensayo T de Student.

25 La Figura 5 muestra la comparación de la población bacteriana en el recipiente 1 (V1) entre estado estable 1 (SS1) y estado estable 2 (SS2) después de tratamiento con inulina de la invención. Las Figuras 6 y 7 muestran comparaciones correspondientes para el recipiente 2 (V2) y 3 (V3).

La Figura 8 muestra la comparación de la población bacteriana en el recipiente 1 (V1) entre estado estable 1 (SS1) y estado estable 2 (SS2) después de tratamiento con la muestra comparativa. Las Figuras 9 y 10 muestran comparaciones correspondientes para el recipiente 2 (V2) y 3 (V3).

30 Se observó una respuesta bifidogénica después de la adición de la inulina de la invención al modelo intestinal. El nivel de aumento fue significativo en los tres recipientes para bifidobacteria y fue significativo para lactobacilos en el recipiente 2 (P<0.05). Los niveles de Clostridia permanecieron sin cambios. Con la muestra comparativa se observó que había un aumento en bifidobacterias en el recipiente 1, pero el mismo no fue significativo. La población de lactobacilos en el recipiente 3 fue significativamente más elevada (P<0.05) pero no se observaron cambios en la población de Clostridia. Los *Bacteroides* y el grupo de *Clostridium coccooides-E. rectale* fueron significativamente menores en el recipiente 2 (P<0.05).

40 La Figura 11 muestra una comparación de la concentración de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) en todos los recipientes entre el estado estable 1 (línea basal) (SS1) y estado estable 2 (SS2) después de tratamiento con inulina de la invención. Los ácidos grasos individuales se representan en cada caso como diagrama de bilis para cada recipiente y estado estable (por ejemplo V1-SS1). De izquierda a derecha: ácido acético, ácido propiónico, ácido isobutírico, ácido butírico, ácido isovalérico, ácido n-valérico y ácido n-capríco.

La Figura 12 muestra la comparación de la concentración de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) en todos los recipientes entre estado estable 1 (línea basal) (SS1) y estado estable 2 (SS2) después de tratamiento con la muestra comparativa.

45 La adición de la inulina de la invención en el modelo intestinal condujo a un aumento significativo en las concentraciones de butirato y propionato en el recipiente 3 (V3) (p<0.05). La concentración de butirato no aumentó significativamente en los otros recipientes. La adición de la muestra comparativa en el modelo intestinal condujo a un aumento en la concentración de acetato, propionato y butirato en todos los recipientes, pero el mismo fue significativo únicamente en el recipiente 2 (V2).

50 El ensayo *in vivo* revela que la inulina de la invención es un prebiótico potencial fuerte debido a que tanto el número de bifidobacterias como el número de lactobacilos aumentó en los tres recipientes. Esto estuvo acompañado por un aumento en la concentración de butirato en todos los recipientes y un aumento significativo en butirato y propionato en el recipiente 3. El aumento en butirato y propionato en el recipiente 3 es un indicio marcado de que la inulina de la invención muestra un efecto prebiótico en la parte posterior del intestino grueso. Esto es provechoso debido a que la mayoría de los cánceres intestinales surgen en la región distal del intestino grueso/en el recto.

55

8. Producción de yogurt

Procedimientos

- 5 Se preparó yogurt en lotes de 700 g. La leche se estandarizó a diferentes contenidos de sólidos de la leche sin grasa (MSNF) en el intervalo de 11,0-14,0 por ciento en peso en base a la composición total. Las cantidades de inulina (inulina de la invención e inulina comparativa Beneo HP® de Orafiti) se ajustaron al 0,0 al 4,5% en peso. Las recetas de yogurt se enumeran en la Tabla 12. La inulina de la invención (inulina de cadena muy larga, abreviada VLCL en lo sucesivo en el presente documento) corresponde a la inulina del Ejemplo 1/Tabla 2 y tenía un grado promedio de polimerización DPw de 75, la muestra comparativa Beneo HP® tenía un DPw de 34. Todos los porcentajes se refieren a porcentaje en peso en base a la composición total, a menos que se indique de otra manera.
- 10 Los ingredientes secos se mezclaron con el fin de facilitar la dispersión de inulina y de leche seca sin grasa y después se añadieron a la leche con cizallamiento moderado con el fin de formar la base de yogurt. La base estandarizada se mantuvo a 4°C durante 3 horas de forma que la leche seca sin grasa se pudiera disolver completamente. Cada lote se pasteurizó a 80°C durante 30 minutos, se enfrió rápidamente a 44°C y se inoculó con
- 15 Yo-Flex 88 (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii*, de Chr. Hansen Inc.) en una concentración de 3,6 g/l. Para yogurt fermentado en tarro (yogurt de estilo de crema), la base inoculada se vertió en los envases finales antes de la incubación. El yogurt agitado se incubó en tanques grandes. Las mezclas base se incubaron a 44°C durante 4-6 horas hasta que alcanzaron pH 4,5 (pH inicial aproximadamente 6,8). Cuando el yogurt alcanzó pH
- 20 4,5, las muestras de yogurt de estilo cremoso se enfriaron a 4°C y se mantuvieron en la misma durante 48 horas con el fin de alcanzar la viscosidad máxima. Las muestras agitadas se enfriaron a 35°C, se mezclaron con cizallamiento bajo, se envasaron en tarros plásticos, se enfriaron hasta 4°C y se mantuvieron en la misma durante 48 horas con el fin de alcanzar la viscosidad máxima. La viscosidad se midió con un viscosímetro Brookfield con un adaptador heliopath.

Tabla 12 (todos los datos numéricos en % en peso en base a la masa total, excluyendo viscosidad)

Ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18						
	Variación en contenido de inulina						Menos sólido con inulina al 3,5%						Azúcar						Sin estabilizante					
a) Datos acerca de los ingredientes individuales																								
Leche al 2%	--	--	-	--	69,84	--	--	--	--	--	--	--	--	70,33	--	67,62	--	71,00						
Azúcar	--	--	--	--	-	--	--	--	--	--	3,87	3,90	4,04	--	--	4,08	--	--						
Leche desnatada	89,05	89,92	90,88	91,79	23,38	89,05	90,74	91,58	92,43	90,74	85,61	86,42	89,45	23,55	90,54	22,64	91,37	23,77						
Leche seca sin grasa	5,81	5,86	5,93	5,99	6,08	5,81	5,01	4,13	3,25	5,01	5,58	5,64	5,83	6,12	5,90	4,98	5,04	5,23						
Estabilizante CC723	0,67	0,68	0,68	0,69	0,70	0,67	0,68	0,69	0,70	0,68	0,64	0,65	0,67	--	--	0,68	--	--						
Beneo HPX	--	--	--	--	--	4,47	--	--	--	3,57	--	--	--	--	--	--	--	--						
Inulina de la invención (VLCI)	4,47	3,53	2,51	1,53	--	--	3,57	3,60	3,63	--	4,29	3,40	--	--	3,56	--	3,56	--						
b) Datos acerca de los sólidos																								
Sólidos de la leche	13,41	13,54	13,69	13,82	14,04	13,41	12,79	12,03	11,25	12,79	12,89	13,02	13,47	14,14	13,64	12,73	12,88	13,36						
Inulina	4,47	3,53	2,51	1,53	--	4,47	3,57	3,60	3,63	3,57	4,29	3,40	--	--	3,56	--	3,59	--						
Grasa	--	--	--	--	1,40	--	--	--	--	--	--	--	--	1,41	--	1,35	--	1,42						
Sólidos totales	17,88	17,08	16,20	15,36	15,44	17,88	16,36	15,63	14,88	16,36	21,05	20,31	17,51	15,55	17,19	18,15	16,47	14,78						
Sólidos	E	E	E	E	E	E	E	B	MB	M	E	E	E	E	E	M	M	M						
Inulina	E	M	B	MB	O	E(B)	M	M	M	M(B)	E	M	O	O	M	O	M	O						
Grasa	O	O	O	O	M	O	O	O	O	O	O	O	O	E	O	E	O	E						
Estabilizante	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	O	O	E	O	O						
Azúcar	O	O	O	O	O	O	O	O	O	O	E	E	E	O	O	E	O	O						
	E= elevado	M= moderado	B= bajo	O= cero	MB= muy bajo																			
Viscosidad (relativa)	7250	5550	4666	3400	3300	3400	4690	4275	3860	3175	4750	5183	2950	3250	6000	2550	5500	2825						

Resultados:

- La Figura 13 muestra los resultados de los efectos de la inulina y sólidos de la leche sobre la viscosidad del yogurt. La inulina de la invención (VLCI) desarrolló una viscosidad significativa en yogurt sin grasa, los niveles de viscosidad se alcanzaron con VLCI al 4,5% siendo dos veces tan alto como aquellos de un yogurt con el 1,5% de grasa sin ninguna inulina. La curva de la derecha en la Figura 13 muestra el cambio dramático en la viscosidad cuando el contenido de VLCI en el yogurt, aproximadamente el 13,5% de sólidos de leche aumenta del 1,5% al 4,5%. Mediante comparación con el mismo, un cambio en el contenido de Beneo HP® tenía únicamente una influencia insignificante sobre la viscosidad, incluso cuando el contenido de sólidos de la leche cambió en el 1%. La curva superior izquierda en la Figura 13 demuestra el efecto de los sólidos de la leche crecientes en yogurt que contiene VLCI al 3,5%. En general, un aumento del 1% en VLCI aumentó la viscosidad del yogurt sin grasa en aproximadamente el 30%, mientras que Beneo HP® tenía un efecto mucho más pequeño sobre la viscosidad. Dependiendo del contenido de sólidos de la leche, la cantidad de VLCI necesaria para generar el nivel de viscosidad en un yogurt comparativo con grasa al 1,5% fue del 1,5-3,5%. Al menos el 3,5% de Beneo HP® fue necesario para conseguir el nivel de viscosidad de un yogurt comparativo con el 1,5% de grasa.
- En un ensayo adicional, VLCI al 2,5% y Beneo HP® al 4,5% se mezclaron en un yogurt sin grasa. Un yogurt con grasa reducida con el 1,5% de grasa se usó como comparación. La muestra con VLCI tenía una viscosidad más elevada que las dos muestras comparativas con Beneo HP® y el 1,5% de grasa, como se muestra en la tabla más adelante.

Tabla 13

Cantidad de inulina	Viscosidad/relativa
VLCI al 2,5%	4666
Beneo HP® al 4,5%	3400
Grasa al 1,5%	3300

- VLCI es inequívocamente más eficaz para cambiar la textura del yogurt sin grasa que Beneo HP®, ya que se consiguieron viscosidades más elevadas con contenidos más bajos. Esto abre la posibilidad de emplear inulina más económicamente en yogurt mientras se mantiene un contenido necesario para conseguir un buen efecto de volumen. En los experimentos anteriores, cantidades mínimas de 3 g de inulina por parte se mantuvieron como la cantidad necesaria para un efecto de volumen.
- La Tabla 14 muestra ensayos adicionales con yogurt fermentado en tarro (estilo cremoso). La producción tuvo lugar como se ha indicado previamente. Es evidente que una inulina secada por pulverización de la invención tiene un efecto de aumento de la viscosidad particularmente marcado en comparación con las inulinas liofilizadas y secadas por tambor. La inulina de la invención secada por pulverización o secada por tambor al 2,5% aún produce un aumento mayor en la viscosidad que la inulina al 4,5% del ejemplo comparativo.
- La Tabla 15 muestra ensayos con yogurt no agitado y fermentado en tarro (cremoso) y con yogurt agitado. Las muestras A-D se fermentaron de manera normal. Una parte de cada muestra se mezcló con cizallamiento suave mientras que el yogurt estaba aún caliente (37-40°C). Las preparaciones agitadas y no agitadas (cremosas) se analizaron para la viscosidad de cada muestra después de 48 horas. Las muestras E-I se fermentaron de nuevo normalmente, pero las fracciones E-G se mezclaron calientes, como anteriormente y se añadió sacarosa durante el procedimiento de mezcla. Las muestras H e I se mezclaron después de que la temperatura había caído a 10°C, con el fin de investigar el efecto de la temperatura sobre la viscosidad de la inulina y la viscosidad del yogurt.
- La adición de inulina secada por pulverización de la invención (ensayo C) aumentó la viscosidad en las preparaciones agitadas y cremosas, habiéndose alcanzado la viscosidad del yogurt de leche entera (ensayo D). En la segunda serie (ensayos E-I), la viscosidad fue aproximadamente la misma a la adición de la inulina comparativa Beneo HP® que después de la adición de la inulina de la invención, pero el producto del ensayo F fue granular y la suavidad fue baja. Una observación adicional fue que en todos los experimentos hubo la formación de una capa de 5 mm de proteína de suero desnaturalizada en el fondo del recipiente de fermentación, con la excepción de los ejemplos en los que la inulina de la invención se añadió. Esto es un indicio de que la inulina de la invención tiene efectos beneficiosos sobre la estabilidad del yogurt.

Tabla 14

	Ejemplo comparativo inulina comercial 4,5%	Ejemplo inulina liofilizada al 2,5%	Ejemplo inulina secada por tambor al 2,5%	Ejemplo inulina secada por pulverización al 2,5%	Ejemplo comparativo 1,5% de grasa	Ejemplo comparativo 3,35% de grasa
a) Datos acerca de ingredientes individuales						
Leche entera	--	--	--	--	--	95,91
Leche al 2%	--	--	--	--	71,85	--
Azúcar	--	--	--	--	--	--
Leche desnatada	91,51	93,44	93,44	93,44	24,06	--
Leche seca sin grasa	3,21	3,28	3,28	3,28	3,37	3,37
Estabilizante CC723	0,69	0,70	0,70	0,70	0,72	0,72
Beneo HPX®	4,59	—	—	—	—	—
Inulina DPw = 75	—	—	-	—	—	—
Inulina liofilizada DPw = 81	—	2,58	—	—	—	—
Inulina secada por tambor DPw = 81	—	—	2,58	—	—	—
Inulina secada por pulverización DPw = 81	—	—	—	2,58	—	—
b) Datos acerca de los sólidos	—	—	—	—	—	—
Sólidos de la leche	11,14	11,37	11,37	11,37	11,67	11,67
Inulina	4,59	2,58	2,58	2,58	—	—
Grasa	—	—	—	—	1,44	3,36
Sólidos totales	15,73	13,95	13,95	13,95	13,11	15,03
Viscosidad (centipoises)	302 500	292 500	338 750	362 500	281 250	320 000
pH	4,34	4,52	4,41	4,57	4,57	4,55
Todos los datos en por ciento en base a la masa total, excepto en viscosidad y pH						

Tabla 15

Ensayo	A	B	C	D	E	F	G	H	I
	Comparación de yogurt bajo en grasa	Comparación de Beneo HP al 2% bajo en grasa	Ejemplo de inulina al 2% baja en grasa DPw = 81, secada por pulverización	Comparación de yogurt con grasa completa	Comparación de yogurt bajo en grasa	Comparación Beneo HP al 2% bajo en grasa	Ejemplo de inulina al 2% baja en grasa DPw = 81, secada por pulverización	Ejemplo de inulina al 2% con grasa completa DPw = 81, secada por pulverización	Comparación de yogurt con grasa completa
Viscosidad crema [cPs]	238 000	267 000	308 000	326 000	240 000	306 000	306 000		
Viscosidad agitado [cPs]	90 000	110 000	146 000	152000	61 000	104 000	120000	84 000	62 000
Sacarosa añadida	--	--	--	--	Si	Si	Si	Si	Si
Sólidos de la leche	11,67%	11,44%	11,44%	11,67%	10,99%	10,78%	10,78%	11,44%	11,67%
Inulina	--	2,04%	2,04%	--	--	1,83%	1,83%	2,04%	--
Grasa	1,44%	1,41%	1,41%	3,36%	1,28%	1,26%	1,26%	3,29%	3,36%
Sólidos totales	13,11%	14,89%	14,89%	15,03%	12,27%	13,88%	13,88%	16,77%	15,03%

REIVINDICACIONES

1. Inulina que tiene un grado promedio de polimerización DP_w de entre 65 y 81, determinado por GPC-RI-MALLS, **caracterizada porque** la inulina es secada por pulverización.
- 5 2. Inulina según la reivindicación 1, que tiene un grado promedio de polimerización DP_w de entre 65 y 79, determinado mediante GPC-RI-MALLS.
3. Inulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que el cociente DP_w/DP_n , determinado por GPC-RI-MALLS, es menor que 1,25.
4. Inulina según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que está en forma de partículas con un diámetro promedio de 50-350 μm , determinado por análisis granulométrico.
- 10 5. Un procedimiento para obtener inulina que tiene un grado promedio de polimerización DP_w de entre 65 y 81, determinado mediante GPC-RI-MALLS, que comprende
 - a) triturar raíces de alcachofa en forma de trozos fibrosos
 - b) obtener un extracto tratando las raíces triturdadas en forma de trozos fibrosos con agua a una temperatura de 60-95°C durante 30 min a 4 horas y separar el extracto de los trozos gastados,
 - 15 c) eliminar los constituyentes colorantes del extracto obtenido,
 - d) precipitar inulina a partir del extracto,
 - e) reprecipitar la inulina al menos una vez.
6. El procedimiento según la reivindicación 5, que comprende una etapa de filtración adicional.
7. El procedimiento según la reivindicación 5 ó 6, en el que la inulina es secada por pulverización.
- 20 8. El procedimiento según la reivindicación 5 ó 6, en el que los constituyentes colorantes se retiran en la etapa c) mediante
 - i) mezcla de iones magnesio (Mg^{2+}) con el extracto de planta,
 - ii) mezcla de al menos un componente alcalino con el extracto de planta,
 - iii) formación de un precipitado, y
 - 25 iv) retirada del precipitado que se ha formado del extracto de planta.
9. El procedimiento según la reivindicación 8, en el que una sal de magnesio se mezcla en la etapa i).
10. El procedimiento según la reivindicación 9, en el que la sal de magnesio está seleccionada entre cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, nitrato de magnesio, acetato de magnesio y propionato de magnesio.
- 30 11. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8-10, en el que la etapa i) se lleva a cabo a una temperatura de 60-80°C.
12. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8-11, en el que la cantidad de componente alcalino se elige de forma que el ajuste de la proporción molar de $OK^-: Mg^{2+}$ sea 2,2:1 - 1,8:1.
13. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8-12, en el que el componente alcalino es una solución o suspensión acuosa de un hidróxido de metal alcalino o hidróxido de metal alcalinotérreo.
- 35 14. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 8-13, en el que el componente alcalino es una suspensión de hidróxido de calcio.
15. Un producto alimenticio que comprende una inulina secada por pulverización que tiene un grado promedio de polimerización DP_w de entre 65 y 81, determinado por GPC-RI-MALLS.
- 40 16. El producto alimenticio según la reivindicación 15, que está seleccionado entre productos lácteos, yogures, helados, helado suave a base de leche, guarniciones a base de leche, pudines, batidos, natillas de huevo, quesos, barras nutritivas, barras energéticas, barras de desayuno, productos de confitería, productos de panadería, galletas saladas, galletas, bizcochos, copos de cereales, productos de aperitivo, té helado, helado suave elaborado a partir de jugo de frutas, bebidas dietéticas, bebidas acabadas, bebidas deportivas, bebidas de resistencia, mezclas de bebidas en polvo para suplementos dietéticos, alimentos infantiles y para bebés, jugo de naranja complementado con calcio, pan, cruasanes, cereales de desayuno, fideos, pastas para untar, bizcochos y chocolates sin azúcar,
- 45 calcio masticable, productos de la carne, mahonesa, aderezos para ensalada, mantequilla de nueces, comidas congeladas, salsas, sopas y comidas listas para servir.
17. Un suplemento dietético que comprende inulina secada por pulverización que tiene un grado promedio de polimerización DP_w de entre 65 y 81, determinado por GPC-RI-MALLS.

18. Una preparación cosmética que comprende inulina secada por pulverización que tiene un grado promedio de polimerización DP_w de entre 65 y 81, determinado por GPC-RI-MALLS.
19. El uso de inulina secada por pulverización que tiene un grado promedio de polimerización DP_w de entre 65 y 81, determinado por GPC-RI-MALLS, como adición a productos alimentarios.
- 5 20. El uso de inulina según la reivindicación 19 como adición con propiedades prebióticas, agente texturizante, agente potenciador de la estabilidad, agente coadyuvante de la viscosidad y/o fibra dietética.
21. El uso de inulina secada por pulverización que tiene un grado promedio de polimerización DP_w de entre 65 y 81, determinado por GPC-RI-MALLS, como adición en preparaciones cosméticas.
- 10 22. El uso de inulina según la reivindicación 21 como agente texturizante, agente potenciador de la estabilidad y/o agente coadyuvante de la viscosidad.
23. Pasta acuosa de inulina secada por pulverización que tiene un grado promedio de polimerización de DP_w de entre 65 y 81, determinado por GPC-RI-MALLS.
- 15 24. El uso de una pasta acuosa de acuerdo con la reivindicación 23 como componente para impartir estructura, agente texturizante, agente potenciador de estabilidad y/o agente coadyuvante de la viscosidad en productos alimentarios o preparaciones cosméticas.

Figura 1:

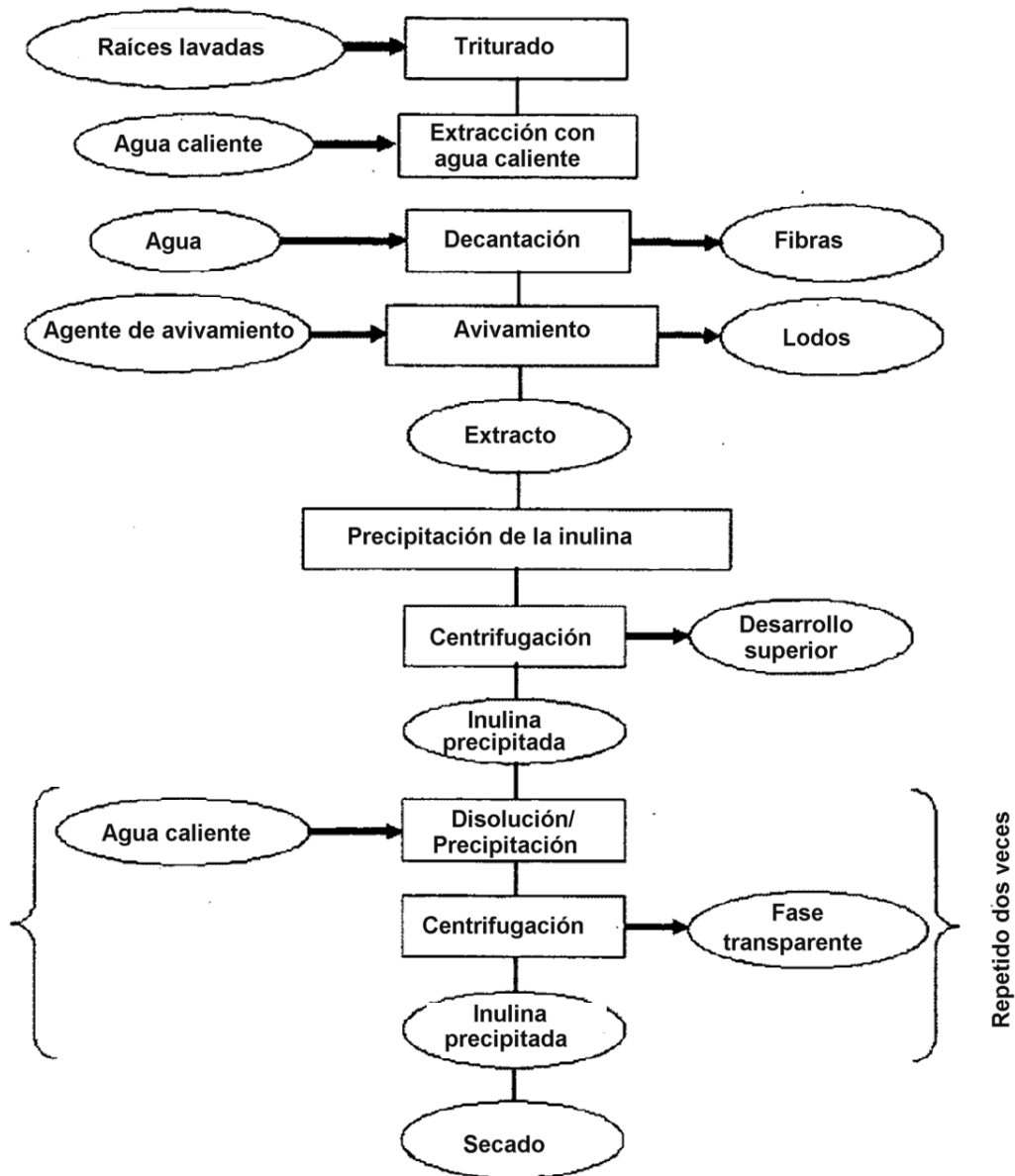
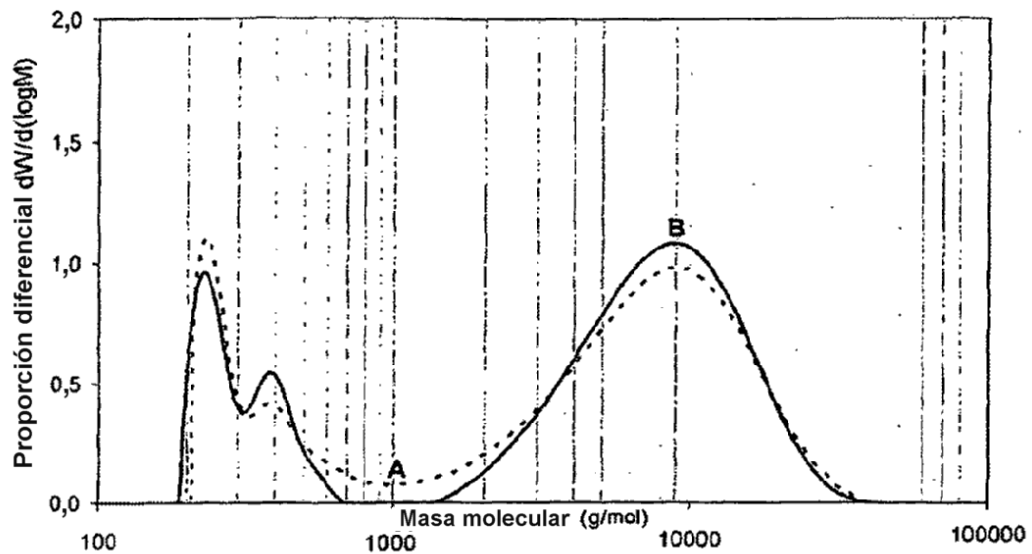
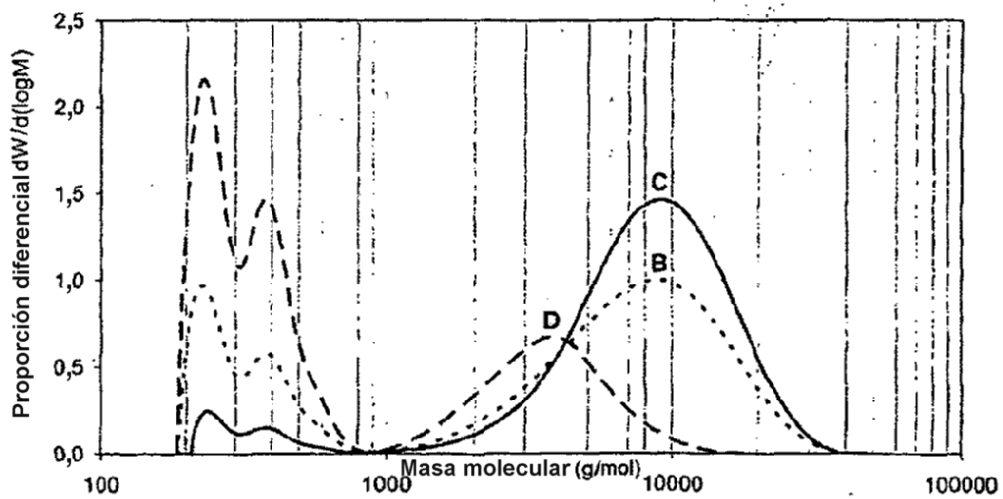


Figura 2:



A = raíces lavadas
 B = extracto después de no extracción

Figura 3:



B = Extracto
 C = Inulina precipitada
 D = Desarrollo superior de la precipitación de inulina

Figura 4:

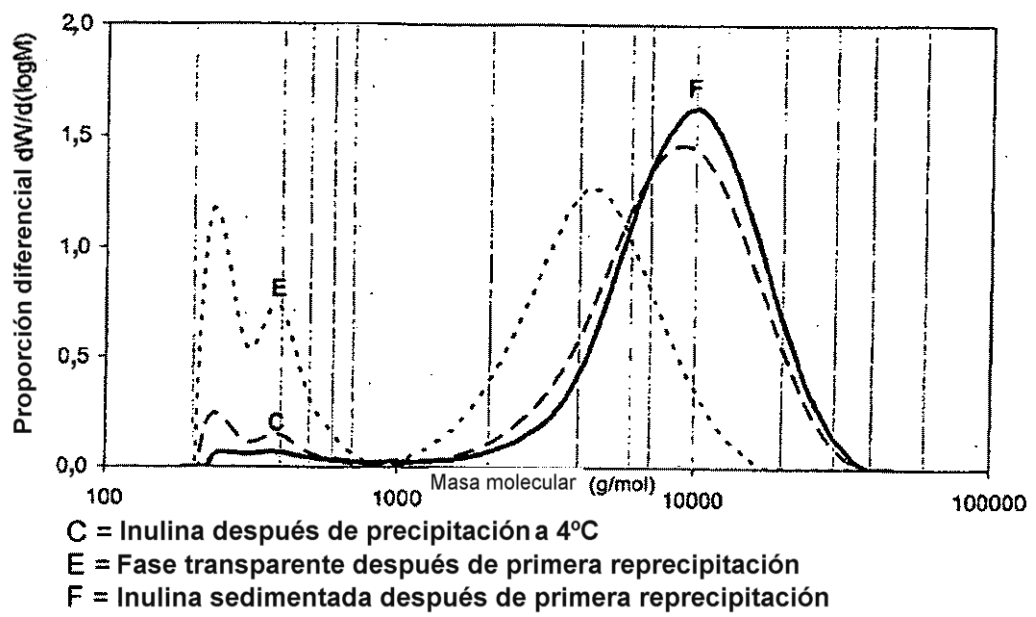


Figura 5:

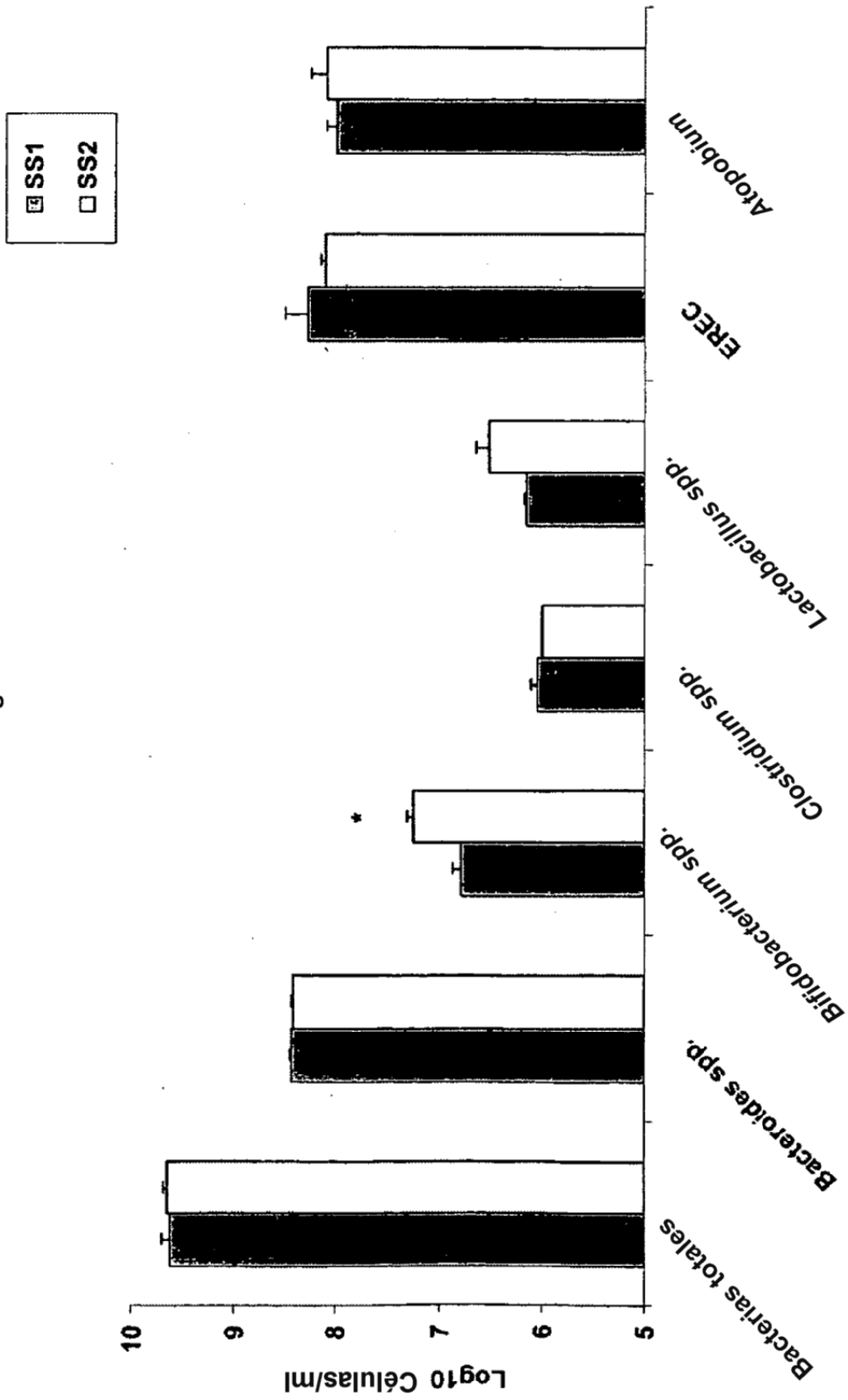
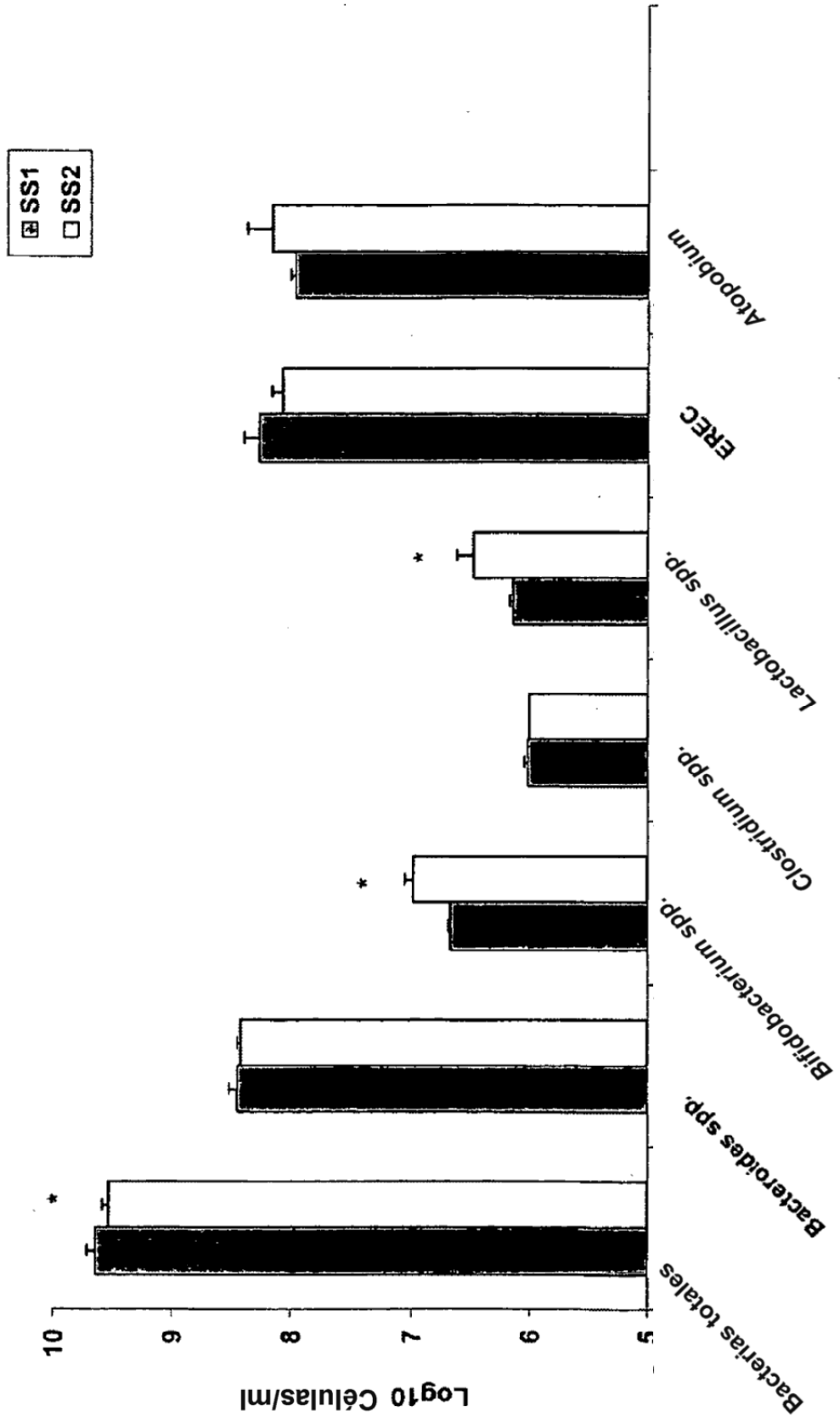
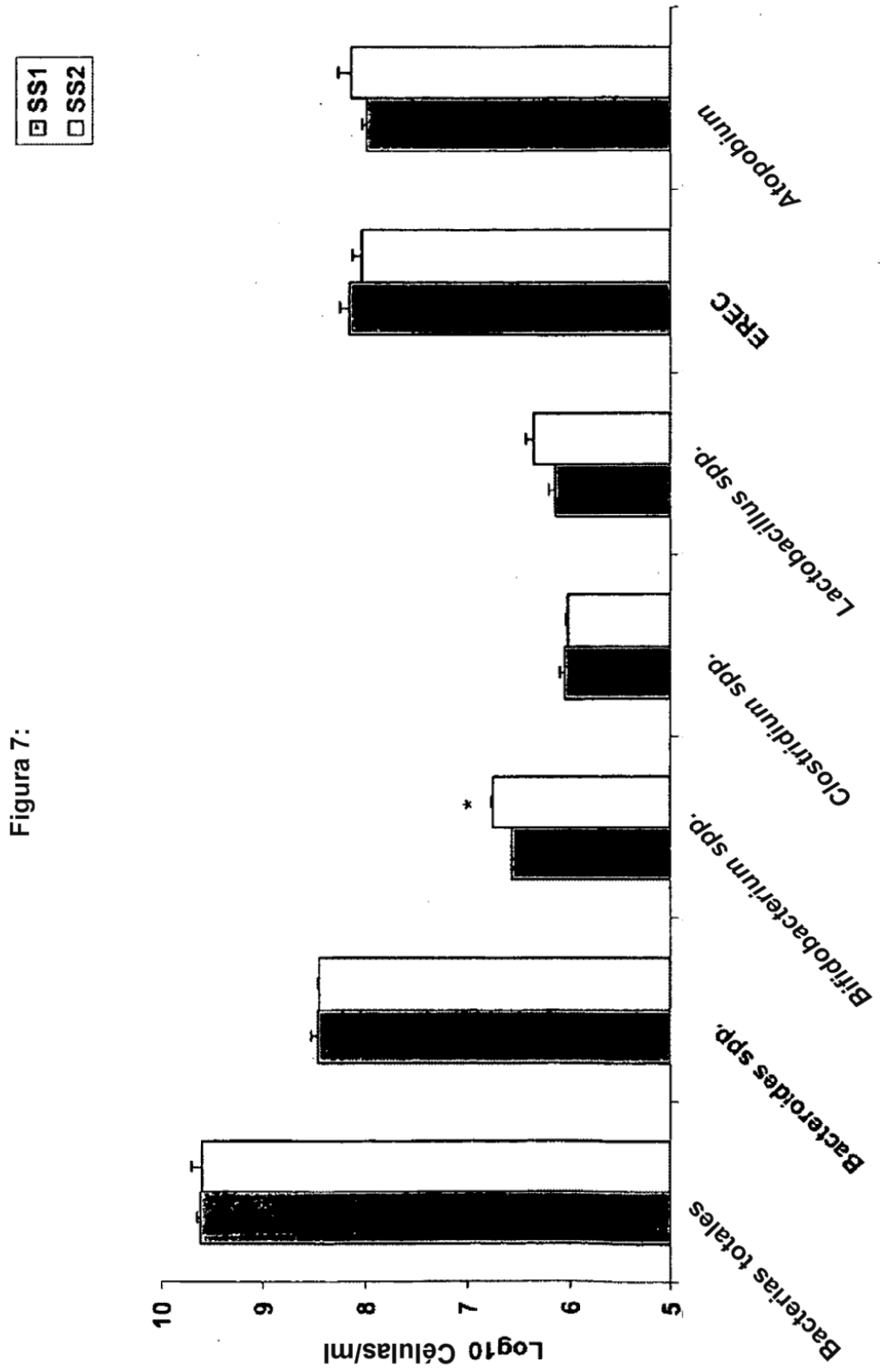


Figura 6:





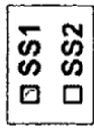
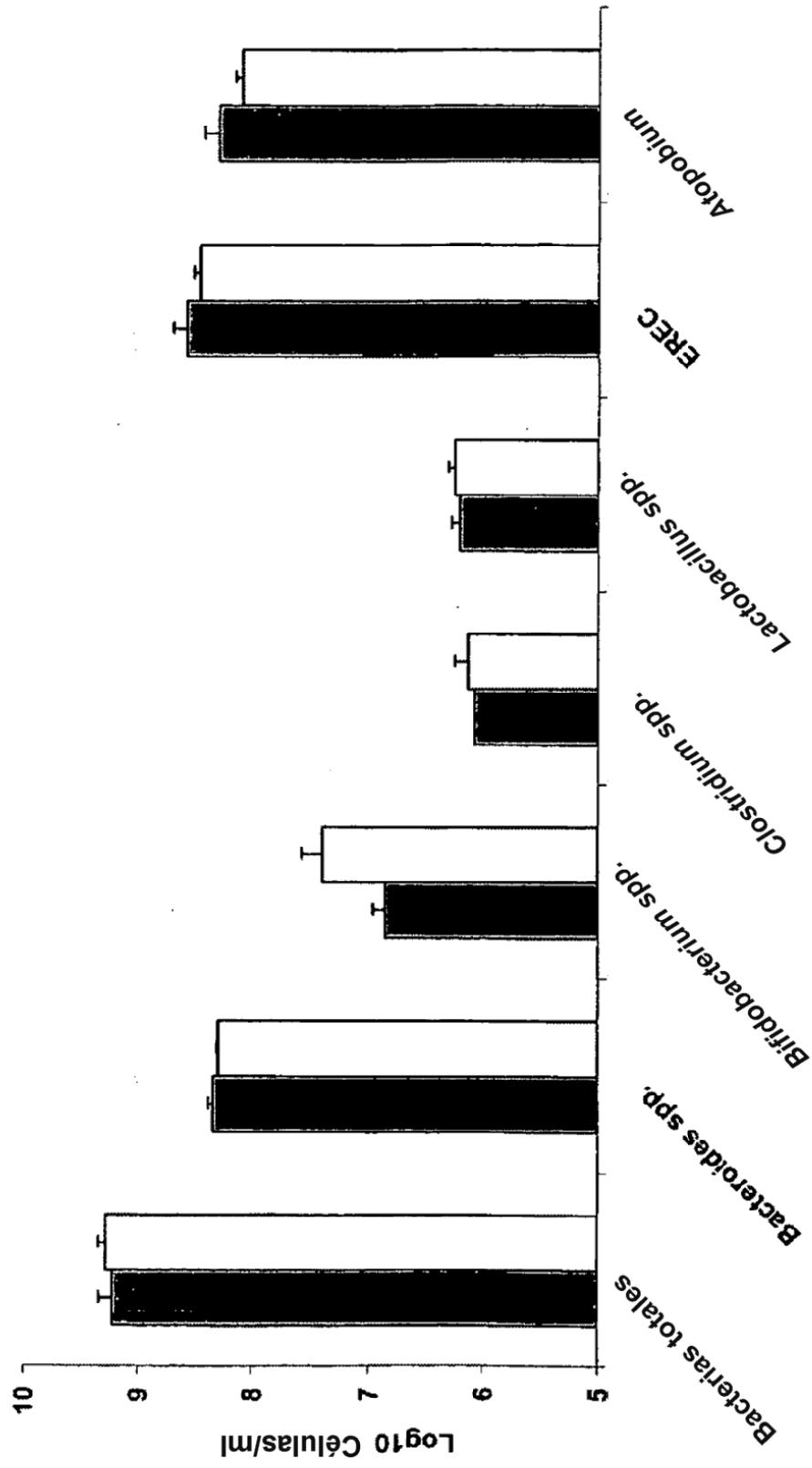


Figura 8:



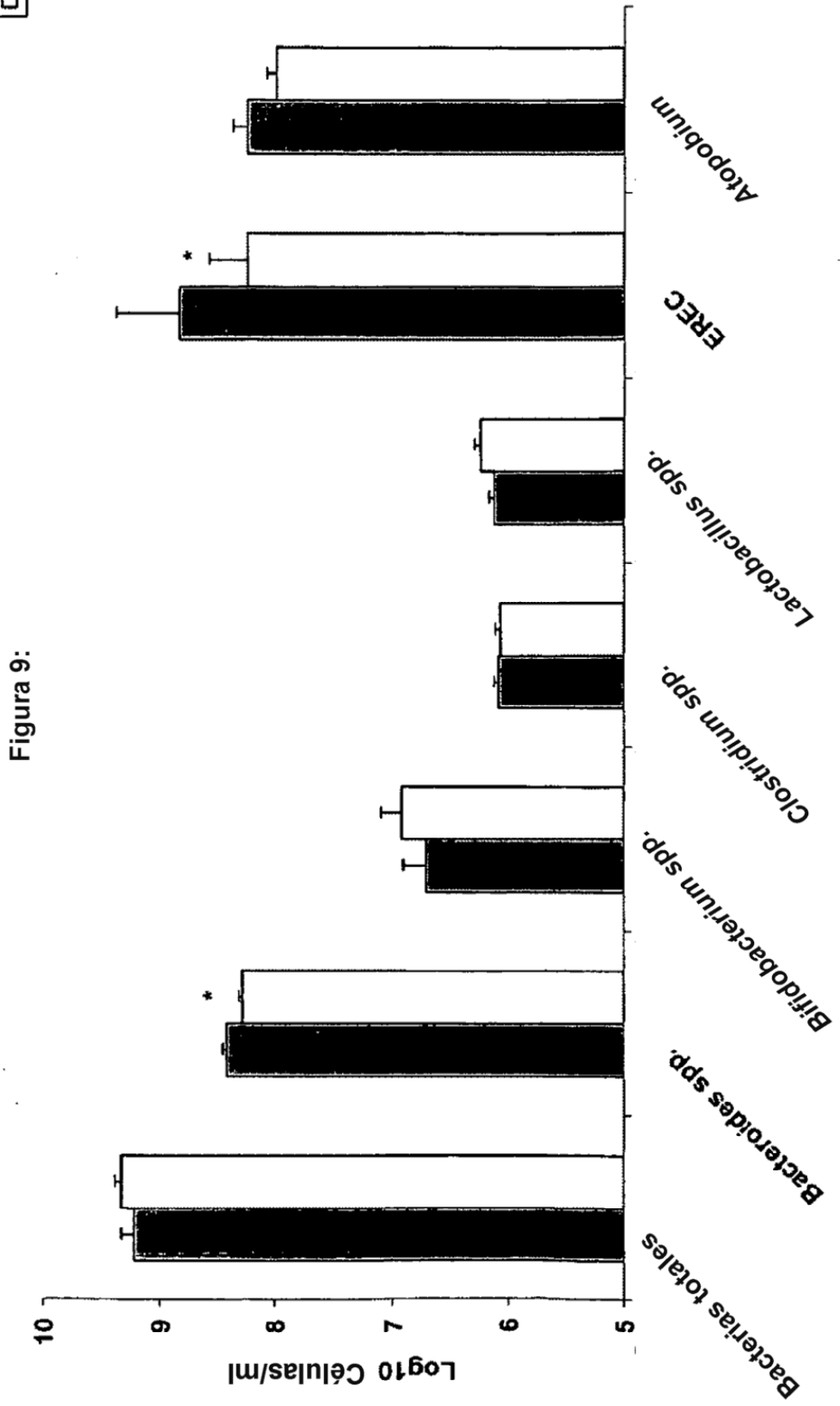
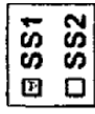


Figura 9:

Figura 10:

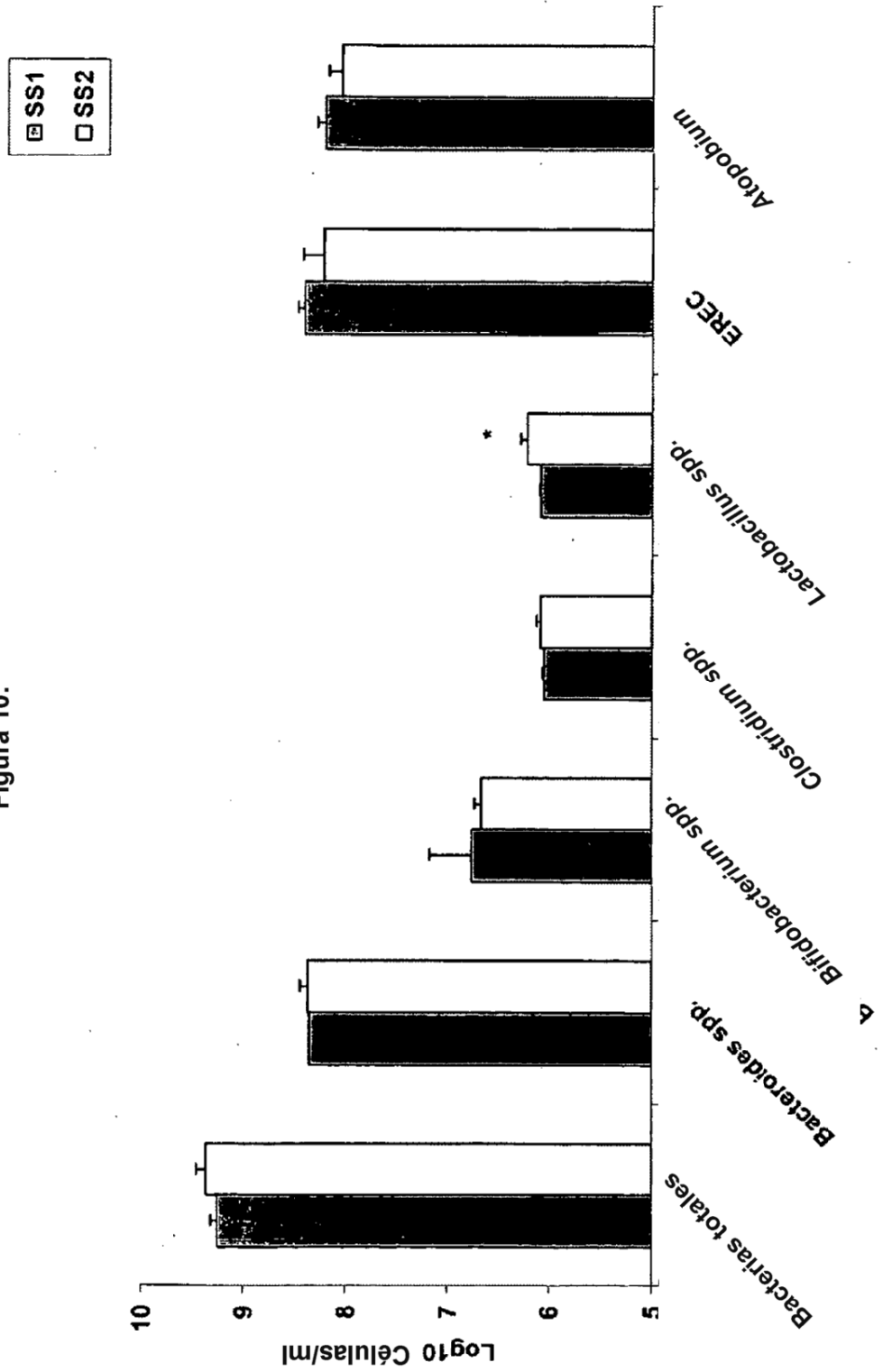


Figura 11:

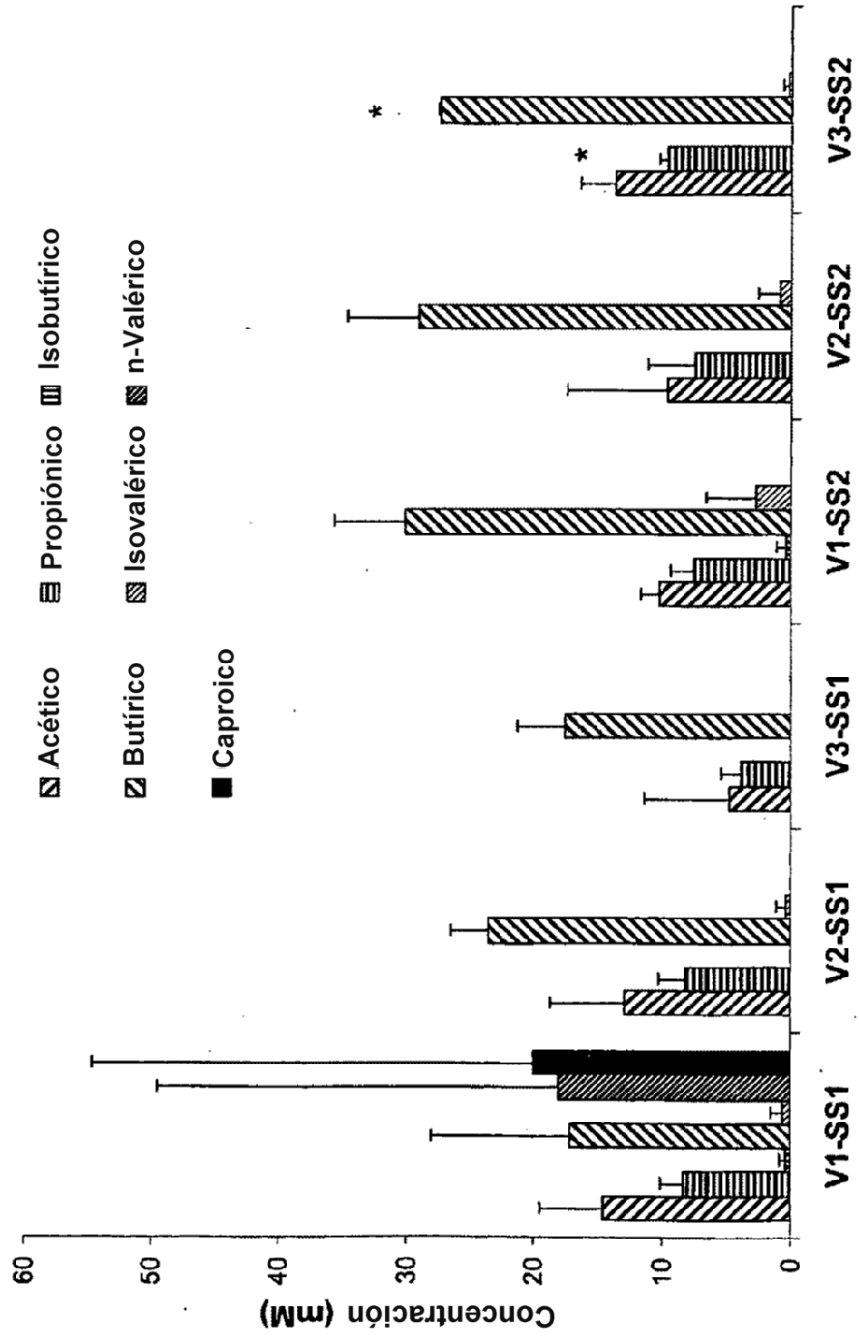


Figura 12:

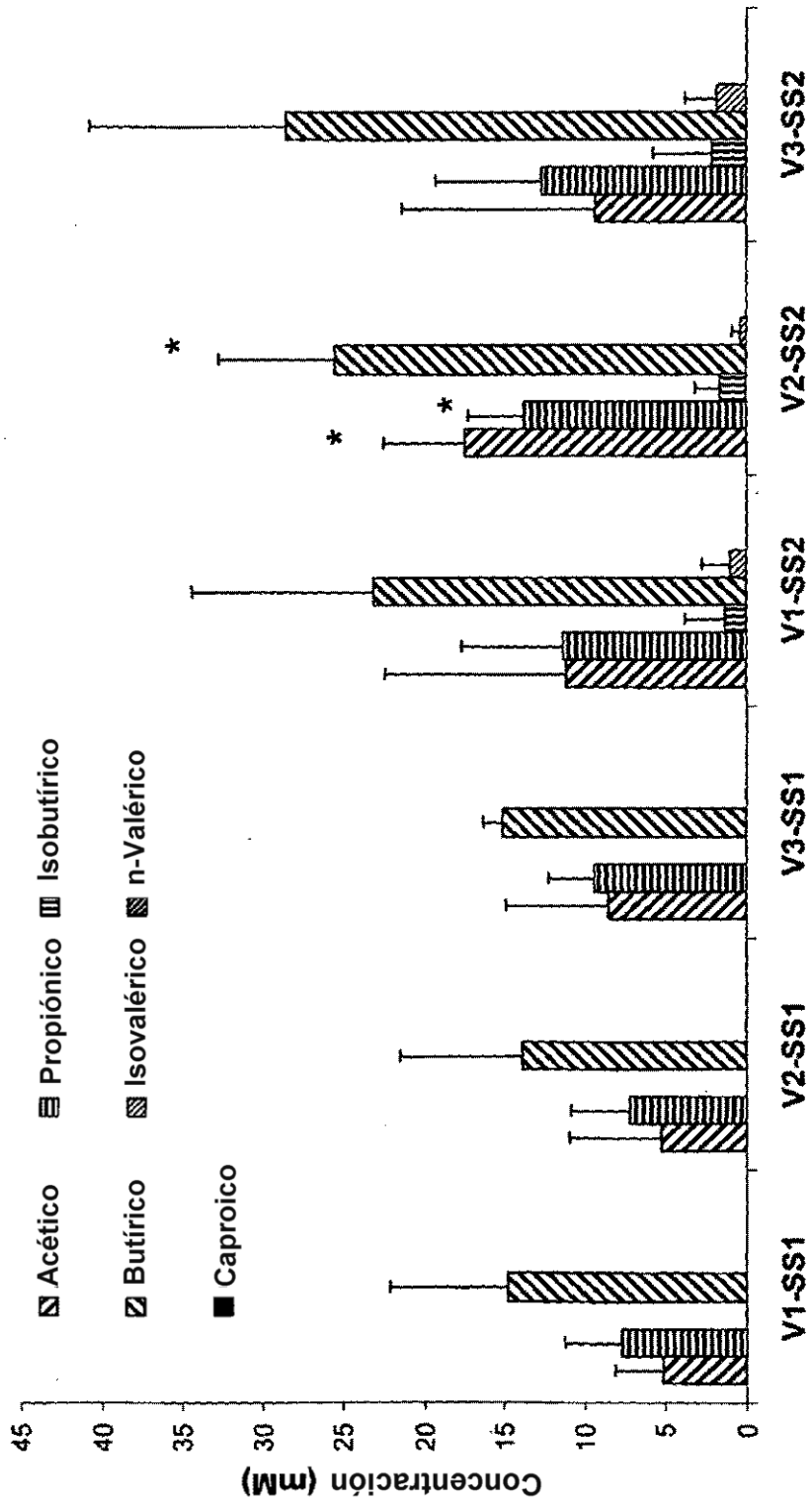


Figura 13:

