

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 869**

51 Int. Cl.:

**C08B 37/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.04.2006 E 06724397 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.02.2015 EP 1902070**

54 Título: **Inulina de cadena larga**

30 Prioridad:

**15.04.2005 EP 05090107**  
**15.09.2005 EP 05090258**  
**14.03.2006 EP 06075613**  
**18.04.2005 US 672315 P**  
**15.09.2005 US 717577 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**15.04.2015**

73 Titular/es:

**BAYER INTELLECTUAL PROPERTY GMBH**  
**(100.0%)**  
**Alfred Nobel Strasse 10**  
**40789 Monheim am Rhein, DE**

72 Inventor/es:

**HELLWEGE, ELKE;**  
**PEETERS, ROGER y**  
**PILLING, JENS**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**Observaciones :**

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

**ES 2 533 869 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 cadena larga

5 **Descripción**

La presente invención se refiere a inulina de cadena larga y su preparación a partir de raíces de alcachofa, a su uso en productos alimenticios y preparaciones cosméticas y, a productos alimenticios y preparaciones cosméticas que comprenden inulina de cadena larga.

10 Inulina es un polisacárido que pertenece al grupo de fructano. Consiste en una cadena con unión beta-2-1 de moléculas de fructosa, que presenta en su extremo una unidad de alfa-D-glucosa en el extremo reductor. Inulina aparece en cantidades recuperables desde el punto de vista de rentabilidad en diversas plantas tales como, por ejemplo, raíces de achicoria y tubérculos de dalia. Además, inulina se ha encontrado por ejemplo en alcachofas y alcachofas de Jerusalén. Las longitudes medias de cadena de las diversas inulinas y sus propiedades fisico-químicas difieren de unas especies de plantas a otras.

20 Cuando se extrae la inulina con agua caliente a partir de los tejidos vegetales, el extracto comprende, además de la inulina bruta polimérica, 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 procesado adicional de inulina. Por ejemplo, los mono- y disacáridos resultan no deseados en la fabricación de productos alimentarios dietéticos. El sabor dulce de los mono- y disacáridos, fructooligosacáridos (DP 3-10) interfiere con determinadas aplicaciones en el sector de productos alimentarios. Los fructooligosacáridos (DP 3-10) pueden, debido a su naturaleza higroscópica y adherencia, interferir en gran medida en el uso de inulina bruta en los productos alimentarios tanto durante el procesado como durante el almacenamiento. En el procesado adicional de inulina bruta, por ejemplo por medio de derivatización química, los mono- y disacáridos, fructooligosacáridos (DP 3-10) pueden conducir a mezclas no definidas de productos cuya purificación es imposible o únicamente es posible por medio de métodos costosos.

30 Por tanto, resulta deseable proporcionar inulina que, en comparación con la inulina bruta, tenga un contenido de mono- y disacáridos y de fructooligosacáridos (DP 3-10)

Por tanto, la presente invención está basada en el objeto de proporcionar inulina con nuevas propiedades.

35 Este objeto se logra por medio de la provisión de las realizaciones identificadas en las reivindicaciones.

La presente invención se refiere a inulina de alcachofa que tiene un grado medio de polimerización DP<sub>w</sub> de entre 54 y 61, preferentemente entre 55 y 60, de forma particularmente preferida entre 56 y 57.

40 En este sentido y en conexión con la presente invención, también se pretende que el término "entre" incluya los límites numéricos respectivamente indicados.

45 Se pretende que el término "inulina" signifique, en conexión con la presente invención, un polifrufructano obtenido por medio de extracción a partir de alcachofa que consisten en una cadena con unión beta-2-1 de moléculas de fructosa. Preferentemente, la cadena tiene en su extremo una unidad de alfa-D-glucosa reductora. El grado de ramificación de las unidades de fructosa con unión beta-2-1 es menor de un 5 %, preferentemente menor de un 2 %.

50 En conexión con la presente invención, la expresión "grado medio de polimerización DP<sub>w</sub>" (peso DP medio) significa el cociente entre la masa M<sub>w</sub> molecular media expresada en peso y la masa molecular del monómero M<sub>0</sub>. La masa M<sub>w</sub> molecular media expresada en peso es el resultado de

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

55 en la que N<sub>i</sub> es el número de moléculas con masa molecular M<sub>i</sub>.

Preferentemente, el "grado medio de polimerización DP<sub>w</sub>" se mide en conexión con la presente invención por medio del método de "cromatografía de permeabilidad en gel con dispersión de luz y detección de índice de refracción (sistema GPC-RI-MALLS)" descrito a continuación.

60

- La inulina de la invención exhibe, por comparación con inulinas descritas en la técnica anterior, la ventaja sorprendente de que se puede procesar hasta cremas que exhiben una estabilidad inusualmente elevada tras tratamiento térmico o ácido, de manera que son más solubles por ejemplo para aplicaciones industriales particulares o aplicaciones en las industrias de productos cosméticos y/o alimentarios. Además, las cremas que comprenden
- 5 inulina de la invención muestran una estabilidad inesperadamente elevada frente a las fuerzas de cizalladura. La inulina de la invención exhibe de este modo la ventaja adicional, en comparación con la inulina convencional, de que se puede procesar mejor en los procesos industriales en los cuales tienen lugar fuerzas de cizalladura intensas.
- Además, la inulina de la invención destaca por propiedades de viscosidad beneficiosas extraordinarias y elevada
- 10 resistencia de gel.
- La inulina de la invención también muestra una fermentación menor en comparación con los productos empleados hasta el momento, lo cual resulta beneficioso en la profilaxis de enfermedades en el colon distal.
- Además, la inulina de la invención muestra un efecto prebiótico más intenso en comparación con los productos
- 15 empleados hasta la fecha. En particular, la inulina de la invención estimula la generación de bifidobacterias de manera ventajosa con reducción simultánea de las bacterias no deseadas y/o patógenas. Por tanto, la inulina de la invención resulta apropiada para su uso en productos alimentarios y/o medicamentos para la prevención y
- 20 tratamiento de disfunciones intestinales y enfermedades, en particular en el colon distal.
- Finalmente, la inulina de la invención también confiere propiedades de uso beneficiosas a varios alimentos como, por ejemplo, generación de viscosidad, capacidad de emulgación, capacidad de unión en agua y formación de
- grumos.
- En una realización adicional, la inulina de la invención tiene un contenido de fructooligosacáridos (oligofructanos)
- 25 que tienen un DP de 3 a 10 menor de un 3 %, preferentemente menor de un 1,5 %, de forma particularmente preferida menor de un 0,7 %, de forma muy particularmente preferida menor de un 0,3 %.
- El contenido de fructooligosacáridos que tienen un DP de 3 a 10 se mide en conexión con la presente invención por
- 30 medio del método descrito a continuación (véase métodos generales: "Análisis de inulina por medio de cromatografía de intercambio iónico y con detección amperométrica por pulsos (HPAEC-PAD) y "Determinación del contenido en porcentaje de oligómeros de inulina con una longitud de cadena de DP = 3 a DP = 10 en la inulina total por medio de HPAEC-PAD").
- En una realización adicional, la inulina de la invención tiene un contenido de glucosa menor de un 2 %, preferentemente menor de un 1 %, de forma particularmente preferida menor de un 0,5 %, de forma muy particularmente preferida menor de un 0,2 %.
- En una realización adicional, la inulina de la invención tiene un contenido de fructosa menor de un 2,5 %, preferentemente menor de un 1,5 %, de forma particularmente preferida menor de un 1,0 % y de forma muy particularmente preferida menor de un 0,3 %.
- En una realización adicional, la inulina de la invención tiene un contenido de sacarosa menor de un 2 %, preferentemente menor de un 1 %, de forma particularmente preferida menor de un 0,5 % y de forma muy particularmente preferida menor de un 0,3 %.
- En una realización particularmente ventajosa de la inulina de la invención para aplicaciones alimentarias, la fracción de mono y disacáridos es menor de un 0,5 %.
- 50 A menos que se afirme lo contrario, todos los porcentajes están en peso basado en la mezcla seca total de inulina y otras sustancias.
- El contenido de fructosa, glucosa y sacarosa se mide en conexión con la presente invención por medio del método enzimático óptico descrito a continuación (métodos generales: "determinación de azúcar").
- 55 En una realización adicional, la inulina de la invención tiene una masa  $M_w$  molecular media expresada en peso de entre 8740 g/mol y 9890 g/mol, preferentemente entre 8910 g/mol y 9720 g/mol, de forma particularmente preferida entre 8910 g/mol y 9250 g/mol.
- Preferentemente, la masa  $M_w$  molecular media expresada en peso se mide en conexión con la presente invención por medio del método de "cromatografía de permeabilidad en gel con dispersión de luz y detección de índice de refracción (sistema GPC-RI-MALLS) descrito a continuación.
- 60 En una realización adicional, la inulina de la invención tiene un grado medio de polimerización  $DP_n$  (GPC) de entre 44 y 48, preferentemente entre 45 y 48, de forma particularmente preferida entre 46 y 48, medido por medio de cromatografía de permeabilidad en gel (GPC).
- 65

Preferentemente, el "grado medio de polimerización  $DP_n$ " se mide en conexión con la presente invención por medio del método de "cromatografía de permeabilidad en gel con dispersión de luz y detección de índice de refracción (sistema GPC-RI-MALLS) descrito a continuación.

- 5 En conexión con la presente invención, la expresión "grado medio de polimerización  $DP_n$ " (número medio DP) significa el cociente entre la masa  $M_n$  molecular expresada en número y la masa molecular del monómero unido  $M_0$  (anhidrofructosa = 162 g/mol). La masa  $M_n$  molecular media expresada en número es el resultado de

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

- 10 donde  $N_i$  es el número de moléculas con masa molecular  $M_i$ .

En una realización adicional, la inulina de la invención tiene una distribución de peso molecular de 1620 g/mol a 40 000 g/mol, preferentemente de 2268 g/mol a 32 000 g/mol, de forma particularmente preferida de 2592 g/mol a 29 160 g/mol.

- 15 Preferentemente, la distribución de peso molecular se mide en conexión con la presente invención por medio del método de "cromatografía de permeabilidad en gel con dispersión de luz y detección de índice de refracción (sistema GPC-RI-MALLS) descrito a continuación.

- 20 También es posible determinar el grado medio de polimerización  $DP_n$  por medio del método de hidrólisis ácida con ácido percloro acético (PCA, idéntico a ácido tricloro acético-TCA). Cuando se aplica este método se obtiene un grado medio de polimerización  $DP_n$  (PCA) de entre 48 y 56, preferentemente entre 48 y 52, para la inulina de la invención. El método de hidrólisis con PCA se lleva a cabo como se describe en los ejemplos siguientes.

- 25 Un objetivo adicional de la invención es una pasta acuosa formada por la inulina de la invención, que se puede obtener por medio de la dispersión de la inulina en agua, cizalladura de la dispersión obtenida hasta lograr homogeneidad, almacenamiento del producto obtenido de este modo durante 12-24 horas a 4-15 °C y agitación hasta lograr una pasta homogénea tras acondicionamiento a temperatura ambiente. Una pasta preferida contiene 5-40 % en peso, todavía más preferentemente 5-30 % en peso y de forma particularmente preferida 10-20 % en peso de inulina, basado en el peso total de la pasta.

- 35 Sorprendentemente, la inulina de la invención muestra una estabilidad elevada frente a ácidos. Particularmente una pasta acuosa de inulina de la invención muestra elevada estabilidad frente a ácidos. El incremento de viscosidad de una pasta acuosa de inulina de la invención a pH 4 y temperatura ambiente durante un tiempo de almacenamiento de 2 semanas es menor de un 10 % en relación al valor inicial de viscosidad. Preferentemente, no obstante, el aumento de viscosidad es menor de un 7 % y del modo más preferido menor de un 5 %, en relación al valor inicial de viscosidad, respectivamente.

- 40 El valor inicial de viscosidad es el valor que muestra una pasta tras la dispersión de la inulina en agua, almacenamiento durante 12-24 horas a 4-15 °C, acondicionamiento a temperatura ambiente y posterior agitación hasta lograr una pasta suave y homogénea. Los detalles referentes a la fabricación de las pastas se describen en los ejemplos de trabajo.

- 45 Se midieron los valores de estabilidad frente a ácidos en las siguientes condiciones: temperatura ambiente, viscosimetría rotacional (Rotovisco VT 550), agitador de álabes diagonales, 128 rpm, tiempo de medición 15 minutos, concentración de inulina en agua preferentemente de 10-30 % en peso/volumen (1 % en peso/volumen = 10 g/litro), de forma especialmente preferida 15 % en peso/volumen. Se proporciona una descripción detallada del método en los ejemplos. Dichos aumentos pequeños de viscosidad (posteriores al espesado) resultan ventajosos en la aplicación de inulina en productos alimentarios con pH ácido.

- 50 También resulta excelente la estabilidad frente a cizalladura de una pasta acuosa de inulina de la invención en comparación con los productos comercialmente disponibles. El valor de viscosidad de una pasta acuosa de inulina es todavía mayor que un 85 %, preferentemente mayor que 90 % y del modo más preferido mayor que 95 % del valor inicial tras 15 minutos de cizalladura. La pasta se obtiene como se ha descrito previamente. Los valores de estabilidad frente a cizalladura se determinan en las siguientes condiciones: temperatura ambiente, viscosimetría rotacional (Rotovisco VT 550), agitador de álabes diagonales, 128 rpm, tiempo de medición 15 minutos, concentración de inulina en agua preferentemente de 15 % en peso/volumen (1 % en peso/volumen = 10 g/litro). Se proporciona una descripción detallada del método en los ejemplos. La elevada estabilidad frente a cizalladura resulta ventajosa en la fabricación de preparaciones alimentarias y cosméticas, en particular cuando se procesan con agitación.

En comparación con otras inulinas comercialmente disponibles, la inulina de la invención sobresale a una resistencia de gel sorprendentemente elevada. A una concentración de 20-50 % (peso/volumen) de inulina en agua, se obtienen resistencias de gel de 30-100 N, más ventajosamente 40-100 N y del modo más ventajoso 50-100 N, cuando se disuelve la inulina a 90 °C y posteriormente se enfría a temperatura ambiente durante un periodo de 20 horas. Los geles obtenidos de este modo tienen un carácter de tipo partículas (geles de partículas). El método de medición para la determinación de la resistencia de gel se describe con detalle en los ejemplos de trabajo.

Además, las inulinas de la invención muestran propiedades de viscosidad sorprendentes en estado disuelto en agua. A una concentración de un 30 % en peso/volumen de inulina en agua a una temperatura de medición de 90 °C y una velocidad de cizallamiento de  $20 \text{ s}^{-1}$  (CVO 120 HR Bohlin/reómetro de Malvern, geometría de cono-placa) se logra una viscosidad de 300-1000 mPa.s, preferentemente de 400-1000 mPa, todavía más preferentemente de 500-1000 mPa.s. Para detalles sobre el método de medición se hace referencia a la descripción del método en los ejemplos adjuntos. Estos valores son más elevados que lo que cabría esperar en comparación con las inulinas conocidas hasta el momento. Dichos valores de viscosidad a concentraciones relativamente bajas son especialmente beneficiosos en aplicaciones alimentarias.

Además de la inulina previamente descrita la invención también va destinada a composiciones que contienen la inulina previamente descrita de la invención así como uno o más componentes comestibles o farmacéuticamente aceptables. Las composiciones normales contienen alimentos para humanos y animales, bebidas, alimentos funcionales, medicamentos y composiciones farmacéuticas (incluyendo composiciones profilácticas y composiciones terapéuticas) y sus intermedios.

Por alimento funcional de acuerdo con la presente invención se entiende un alimento que contiene, más allá de los nutrientes tradicionales, un ingrediente que puede proporcionar un efecto beneficioso para la salud (definición de acuerdo con Institute of Medicine of the National Academy of Sciences (EE.UU; 1994)).

Preferentemente, los componentes comestibles o farmacéuticamente aceptables mencionados están seleccionados entre el grupo que consiste en azúcares (por ejemplo: glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, galactosa, maltosa, isomaltulosa), polioles (por ejemplo: sorbitol, lactitol, maltitol, isomalt, manitol, xilitol), maltodextrinas, edulcorantes, jarabes de glucosa hidrogenados, conservantes de alimentos y piensos, intermedios de alimentos y alimentos para piensos, líquidos comestibles, bebidas, fuentes bio-disponibles de minerales, excipientes farmacéuticamente aceptables, sustancias farmacéuticas y terapéuticamente aceptables, composiciones farmacéuticas y medicamentos.

Una composición particularmente preferida de la invención comprende inulina de la invención en presencia de una fuente de minerales comestibles o farmacéuticamente aceptables y bio-disponibles; en particular una fuente de calcio y/o magnesio y/o hierro, tal como por ejemplo productos lácteos y sales y complejos de calcio, magnesio y hierro.

Como se ha comentado anteriormente, el objetivo de la presente invención es proporcionar una inulina que tiene propiedades beneficiosas extraordinarias para su uso en alimentos, en la que los términos alimentos y piensos de acuerdo con la presente invención son equivalentes. En otro aspecto adicional, la invención también esta destinada por tanto a alimentos y complementos dietéticos que comprenden las inulinas previamente descritas. El término alimento engloba, de acuerdo con la presente invención, alimentos para humanos así como alimentos para animales y piensos, respectivamente. Los complementos dietéticos engloban complementos dietéticos para humanos y animales.

De forma particularmente preferida, un alimento está seleccionado entre productos lácteos, yogur, helados, licuados de base láctea, cubiertas de tipo lácteo, pudín, batidos lácteos, natillas, quesos, barras nutritivas, barras energéticas, barras de desayuno, dulces, pasteles, galletas saladas, galletas dulces, bizcochos, copos de cereales, mezclas energéticas, mezclas de té helado, licuados de zumo de frutas, bebidas dietéticas, bebidas preparadas, bebidas para la práctica de deporte, bebidas para lograr resistencia, mezclas de bebidas en forma de polvo como complemento, fórmulas para lactantes y niños, zumo de naranja complementado con calcio, pan, croissants, cereales, pastas, pastas para untar en pan, dulces y chocolates que no contienen azúcar, dulces masticables de calcio, productos de carne, mayonesa; aderezos para ensaladas, mantecas de frutos secos, alimentos congelados, salsas, sopas y comidas preparadas.

En una realización de la invención, el alimento es un alimento preparado por medio de un proceso de extrusión, como por ejemplo un cereal.

En otro aspecto, la presente invención va destinada a preparaciones cosméticas que comprenden la inulina previamente descrita. De forma particularmente preferida, la preparación cosmética es una crema, en particular cremas para la piel y la cara.

En un aspecto adicional, la presente invención va destinada al uso de la inulina previamente descrita como complemento en alimentos, alimentos funcionales y preparaciones cosméticas. De forma particular, el uso también

está relacionado con todos los alimentos específicos y preparaciones cosméticas que se mencionan anteriormente.

En otro aspecto, la presente invención va destinada al uso de inulina de la invención para la preparación de una composición farmacéutica o un medicamento.

5 La inulina de la invención se puede usar de manera beneficiosa en alimentos, alimentos funcionales, composiciones farmacéuticas o medicamentos para la modificación o modulación de la composición de la flora bacteriana en el colon, especialmente en la parte distal del colon, de humanos, mamíferos u otros vertebrados.

10 La inulina de la invención también se puede usar en alimentos, alimentos funcionales, composiciones farmacéuticas o medicamentos para la modificación o modulación del patrón de fermentación de inulina en el colon, especialmente en la parte distal del colon, de humanos, mamíferos u otros vertebrados.

15 Finalmente, al inulina de la invención se puede usar en alimentos, alimentos funcionales, composiciones farmacéuticas o medicamentos, que tienen los siguientes beneficios: efectos de fibra dietética, modulación de la función intestinal, acción prebiótica y/o carácter bifidogénico, mayor absorción de minerales, como por ejemplo calcio, magnesio y hierro, aumento de la densidad mineral ósea, aumento del contenido mineral óseo, aumento de la masa ósea máxima, mejora de la estructura ósea, reducción de la pérdida de densidad ósea, reducción de la pérdida de la estructura ósea, modulación del metabolismo de lípidos, estimulación del sistema inmunológico, prevención del cáncer y reducción del riesgo de cáncer, prevención del cáncer de colon y reducción del riesgo de cáncer de colon y prevención del cáncer de mama.

20 A continuación, se ilustra la invención por medio de los ejemplos que no se pretende que sean una limitación del concepto general de la invención.

25

## Ejemplos

Métodos generales

### 30 1. Purificación de inulina y fraccionamiento

Se usa 1 kg de raíces de diámetro de raíz de 0,5-5,0 cm de plantas de alcachofa de aproximadamente 1 año de edad para la preparación. Se homogeneiza este material en partes de 200 gramos en un homogeneizador (Waring Blender, de VWR International GmbH, Darmstadt, Alemania) con 500 ml de agua a 85 °C. Se combinan las fracciones homogeneizadas resultantes en un recipiente de metal que se encuentra en un baño de agua a 85 °C, se aumenta el volumen de extracción hasta 5l de agua, y se extrae la inulina del material por medio de agitación a 80-85 °C durante 45 minutos. Se filtra el extracto caliente a través de un tamiz de 125 µm. Se transfiere la torta filtrante a un paño de algodón y se escurre. Se combina la disolución escurrida con el filtrado (total de aproximadamente 5 litros). Se purifica el extracto de inulina para retirar los materiales que no son sacáridos por medio de tratamiento en un baño de cal y carbonatación. En el pre-tratamiento en baño de cal, se ajusta el extracto bruto a un valor de pH de 11,2 por medio de agitación con Ca(OH)<sub>2</sub>. El extracto permanece a este pH durante 30 minutos, siendo la temperatura del extracto de 65 °C. Para el tratamiento principal de cal, se eleva el pH a pH > 12 por medio de la adición de Ca(OH)<sub>2</sub>, y posteriormente se agita el extracto a 85 °C durante 30-45 minutos. Con el fin de hacer que la materia turbia precipitada fuera más fácilmente filtrable, se reduce el pH del extracto hasta un pH = 10,8 en una primera etapa de combinación haciéndola pasar de forma rápida en CO<sub>2</sub>. La temperatura durante esta etapa es de aproximadamente 65 °C. Se retira el lodo que se forma por medio de centrifugación (2800 g, 10 minutos). En una segunda etapa de carbonatación, se reduce el pH del sobrenadante a (pH = 8,9) haciéndolo pasar en CO<sub>2</sub>. Se retira el lodo que se forma del extracto por medio de centrifugación (2800 g, 10 minutos) y posterior filtración a través de un filtro de papel (Schleicher & Shuell, N° Orden 10311614) usando un embudo de succión a vacío.

50 Se decolora el extracto por medio de adición gradual de 10-15 % (peso/volumen) de un intercambiador iónico (resina de lecho mixto TMD8, Sigma, N°. Orden M8157) al tiempo que se agitaba en un proceso por lotes. Tras la retirada del intercambiador iónico por medio de filtración a través de tamices de 30 µm, se ajusta la disolución a un pH = 7,0 con KOH. Para la concentración selectiva de los polímeros de inulina de cadena larga (DP>10), se añade etanol absoluto a la disolución hasta que la concentración final sea de un 40 % (volumen/volumen), y se mezcla intensamente la disolución y se incuba a 8 °C durante la noche. Se sedimenta la inulina precipitada por medio de centrifugación (2800 g, 10 minutos). Se lava dos veces el precipitado de inulina con 1,6 litros de etanol de 80 % (volumen/volumen). Se disuelve la inulina lavada en 1 litro de agua en un baño de agua a 95 °C, se retira la materia suspendida por medio de filtración a través de un tamiz de 30 µm, y se congela la disolución de inulina a -80 °C. Posteriormente, se retira el agua por medio de secado por congelación (Alpha 1-4, de Christ, Alemania) y se aísla el polvo de inulina seco.

### 2. Determinación de fructano

65 2.1. Procedimiento de Ensayo de Fructano

Se puede determinar el contenido de fructano de una muestra usando el estuche de "Procedimiento de Ensayo de Fructano" (de Megazyme International Ireland Ltd., Wicklow, Irlanda). El principio de este ensayo está basado en la hidrólisis de fructano hasta sus monómeros reductores glucosa y fructosa y la posterior determinación fotométrica (longitud de onda = 410 nm) del contenido de estos azúcares reductores (glucosa, fructosa) tras la formación de color por medio del denominado "método de PAHBAH" (véase a continuación para los detalles del método).

En una primera etapa, se hidroliza la sacarosa presente en el extracto por medio de la enzima específica sacarasa para glucosa y fructosa. Además, de igual forma, los almidones y maltodextrinas presentes en el extracto se degradan hasta glucosa con una mezcla de enzimas  $\beta$ -amilasa, pululanasa y maltasa altamente purificadas. Posteriormente, se reducen los azúcares reductores resultantes hasta alcoholes de azúcar por medio de tratamiento con una disolución alcalina de borohidruro y, de este modo, se retiran de la disolución. La adición de ácido acético diluido neutraliza la disolución y retira el exceso de borohidruro. A continuación, se hidroliza el fructano con fructanasa purificada (exo-inulinasa) hasta fructosa y glucosa, y se determina el contenido de los monosacáridos resultantes por medio del método de PAHBAH.

Sustancias químicas y disoluciones en los estuches de "Procedimiento de Ensayo de Fructano"

1. 50 U de sacarasa (levadura), 500 U de  $\beta$ -amilasa (*B. cereus*), 100 U de pululanasa (*K. pneumoniae*) y 1000 U de maltasa (levadura) están presentes como polvo seco por congelación y se disuelven en 22 ml de tampón de maleato de sodio de 0,1 M de pH 6,5 (referido como "enzima 1" a continuación) para la medición
2. 8000 U de fructanasa (exo-inulinasa) están presentes como polvo seco por congelación y se disuelven en 22 ml de tampón de acetato de sodio de 0,1 M de pH 4,5 (referido como "enzima 2" a continuación) para la medición.
3. Disolución patrón de fructosa (1,5 mg de fructosa/ml) disuelta en ácido benzóico de 0,2 %.
4. Polvo de control de fructano  
Fructano de dalia con contenido conocido de fructano, seco por congelación en presencia de alfa-celulosa.

Disoluciones no presentes en el estuche:

I. reactivo de PAHBAH

Disolución A: se añaden 10 g de PAHBAH (hidrazida de ácido p-hidroxibenzoico, Sigma N°. Orden H-9882) a 60 ml de agua destilada en un vaso de precipitados de 250 ml, y se añaden 10 ml de ácido clorhídrico concentrado a la suspensión al tiempo que se agita. Se lleva la disolución hasta 200 ml y se almacena a temperatura ambiente.

Disolución B: al tiempo que se agita, en primer lugar se disuelven por etapas 24,9 g de citrato de sodio y posteriormente 2,20 g de cloruro de calcio y finalmente 40 g de hidróxido de sodio en 500 ml de agua destilada. Tras la adición de hidróxido de sodio, la disolución puede ser lechosa, pero se vuelve transparente cuando se completa la disolución hasta 2l con agua. Se almacena la disolución a temperatura ambiente.

Poco antes del uso, se añaden 20 ml de la disolución A a 180 ml de la disolución B y se mezcla de forma intensa (= reactivo de PAHBAH). Se debe almacenar la disolución en hielo y se puede usar durante 4 horas.

II. Disolución de hidróxido de sodio 50 mM

III. Disolución alcalina de borohidruro de sodio  
borohidruro de sodio de 10 mg/ml (Sigman, N° Orden S-9125) en hidróxido de sodio de 50 mM.

IV. Ácido acético 100 mM.

Método de detección:

1. **Control de Fructano (A)**

Se someten a extracción 20 mg de polvo de control de fructano en 1 ml de agua destilada dos veces en un bloque de calentamiento a 95 °C durante 30 minutos. Tras la centrifugación (13 000 x g durante 5 minutos), se transfiere el sobrenadante a un nuevo recipiente de reacción, y se coloca el precipitado de nuevo en 1 ml de agua destilada y se somete a extracción en el bloque de calentamiento a 95 °C durante 30 minutos. Tras una centrifugación renovada (véase: anteriormente) se retira el sobrenadante y se combina con el primer sobrenadante.

(B) Se someten a extracción fructano purificado/inulina en 2 ml de agua destilada dos veces en un bloque de calentamiento a 95 °C durante 1 hora. Tras la centrifugación (13 000 x g durante 5 minutos), se transfiere el sobrenadante a un nuevo recipiente y se usa para la medición.

2. Se mezclan 200  $\mu$ l de muestra con 200  $\mu$ l de enzima y se incuba a 40 °C durante 60 minutos (tiempo de incubación ampliado en 30 minutos a partir del protocolo de megaenzima).

3. Se añaden 200  $\mu$ l de disolución alcalina de borohidruro de sodio, y se mezcla intensamente la disolución y se incuba a 40 °C durante 30 minutos con el fin de lograr una conversión completa de los azúcares reductores en alcoholes de azúcar.

4. Se retira el exceso de borohidruro, y se ajusta la disolución a un pH = 4,5, por medio de la adición de 500 µl de ácido acético 100 mM y mezcla intensa.
5. Se diluyen los extractos de fructano purificado/inulina - no el control de fructano - en una proporción 1:5 con agua destilada dos veces. Posteriormente, se mezclan 100 µl de disolución de esta mezcla y del control de fructano con 100 µl de tampón de acetato de Na 100 mM a pH 4,5.
6. Se mezclan 200 µl de disoluciones con 100 µl de enzima-2 y se incuban a 40 °C durante 60 minutos (tiempo de incubación ampliado en 40 minutos a partir de la estuche de megaenzima con el fin de lograr una hidrólisis completa del fructano).
7. Se incluye un patrón de fructosa como muestra adicional. Se tratan 200 µl de disolución de fructosa convencional en el estuche con 900 µl de tampón de acetato de sodio de 100 mM de pH 4,5 y se mezcla. Se retiran 4 x 200 µl de esta mezcla y se mezclan con 100 µl adicionales de tampón de acetato de sodio de 100 mM de pH 4,5.
8. Se mezclaron todas las muestras y la muestra de blanco adicional (300 µl de un tampón de acetato de sodio 100 mM de pH 4,5) con 5 ml de reactivo de PAHBAH y se incubó en un baño de agua en ebullición durante exactamente 6 minutos.
9. Posteriormente se enfriaron las muestras de forma inmediata en agua fría (10-15 °C) durante aproximadamente 5 minutos.
10. Se mide la absorción de todas las disoluciones en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 410 nm frente a la muestra de blanco.

El cálculo tiene lugar de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{Fructano (\% en peso/peso)} = \Delta E \times F \times 5 \times V_{\text{Ex}} \times 1,1/0,2 \times 100/W \times 1/1000 \times 162/180$$

$\Delta E$  = absorción de PAHBAH de las muestras medidas frente a la muestra de blanco

F = factor de conversión de la absorción de fructosa en µg de fructosa (54,5 µg de fructosa/absorción)

5 = factor para convertir el volumen de incubación de 200 µl en 1 ml

$V_{\text{Ex}}$  = volumen del extracto

1,1/0,2 = 0,2 ml de 1,1 ml de digestión enzimática

W = peso de la muestra sometida a extracción en gramos

100/W = factor para indicar fructano como % del peso inicial (W)

1/1000 = conversión de µg en mg

162/180 = factor para convertir la fructosa libre en anhidrofructosa ligada en el fructano

## 2.2 Determinación de fructano por medio de hidrólisis con exolnulinasa

Se somete a extracción 1 % (peso/peso) de material en agua destilada dos veces a 95 °C durante 30 minutos y posteriormente se diluye 1:25 con agua (véase anteriormente). Para la digestión de exo-inulinasa (100 µl), se incuban 50 µl de extracto en acetato de sodio 0,1 M de pH 5,6 con 25 U de exo-inulinasa (Megazyme International Ireland Ltd., Wicklow, Irlanda, artículo N.º. E-EXO1) a 40 °C durante tres horas. Se detiene la reacción por medio de incubación a 95 °C durante 10 minutos. La determinación fotométrica de la glucosa y fructosa liberadas tiene lugar como se ha descrito en el método de "determinación de azúcar". Se determina el contenido de fructano por medio de adición de los contenidos de glucosa y fructosa y por medio de la inclusión del factor 162/180 con el que cual se convierten las hexosas medidas libres en hexosas ligadas en el fructano.

## 3. Determinación de azúcares (glucosa, fructosa y sacarosa)

Se determinaron glucosa, fructosa y sacarosa por medio de fotometría en un ensayo enzimático por medio de conversión de NAD<sup>+</sup> (nicotinamida adenina dinucleótido) en NADH (nicotinamida adenina dinucleótido reducido). El carácter aromático del anillo de nicotinamida se pierde en la reducción, y de este modo se modifica el espectro de absorción. Este cambio en el espectro de absorción se puede detectar por medio de fotometría.

Se convierten fructosa y galactosa por medio de la enzima hexoquinasa y adenosin trifosfato (ATP) en glucosa 6-fosfato y fructosa-6-fosfato. Posteriormente, se oxida la glucosa 6-fosfato por medio de la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa hasta 6-fosfogluconato. Se reduce NAD<sup>+</sup> hasta NADH en esta reacción, y se mide la cantidad formada de NADH por medio de fotometría. La proporción de NADH formado con respecto a glucosa presente en el extracto es de 1:1, de manera que se puede calcular el contenido de glucosa a partir del contenido de NADH usando el coeficiente de extinción molar de NADH (6,31 mmol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) de acuerdo con la Ley de Lambert Beer.

Tras completarse la oxidación de la glucosa 6-fosfato, se convierte la fructosa 6-fosfato que se produce de igual forma en las disoluciones por parte de la enzima fosfoglucoisomerasa para dar glucosa 6-fosfato, que a su vez se oxida hasta 6-fosfogluconato. La proporción de fructosa y la cantidad de NADH formado también es de 1:1. Se calcula el contenido de fructosa a partir de la cantidad formada de NADH, como se ha descrito para la glucosa.

Posteriormente, se escinde la sacarosa presente en el extracto por medio de la enzima sacarasa (de Megazyme) para dar glucosa y fructosa. A continuación, se convierten las moléculas liberadas de glucosa y fructosa por medio

de las enzimas anteriormente mencionadas, en reacción dependiente de  $\text{NAD}^+$ , para dar lugar a 6-fosfogluconato. Se forman dos moléculas de NADH en la conversión de una molécula de sacarosa en 6-fosfogluconato. De igual forma, se mide la cantidad de NADH formado por medio de fotometría, y se calcula a partir del mismo el contenido de sacarosa usando el coeficiente de extinción molar de NADH.

5

#### 4. Análisis de la distribución de peso molecular

##### 4.1. Cromatografía de permeabilidad en gel con dispersión de luz y detección de índice de refracción (sistema GPC-RI-MALLS).

10

Se disuelven las inulinas/fructanos en agua con una concentración de un 0,5 % (peso/volumen). Se calientan las disoluciones a 95 °C durante 10 minutos. Se analizan los polímeros usando los siguientes instrumentos: cromatógrafo de gel PL120 (de Polymer Laboratories, Alemania), Midas Autosampler (de Spark, Holanda), detector de dispersión de luz DAWN-EOS (Wyatt Technology, Santa Barbara, EE.UU.) con  $\lambda_o = 690 \text{ nm}$  y 16 detectores dentro del intervalo de ángulos de 14,9 a 162,9° más célula de flujo de K5, detector de índice de refracción-viscosidad combinado  $\eta$ -1002 (de: WGE Dr. Bures GmbH & CoKG, Alemania). Se separan los polímeros en las siguientes columnas: pre-columna TSK, TSK6000PW, TSK3000PW (de Tosoh BioScience GmbH, Stuttgart, Alemania). Se inyectaron 100  $\mu\text{l}$  de disolución. El fraccionamiento tuvo lugar a una temperatura de 30 °C y con un caudal de 0,8 ml/minuto con  $\text{NaNO}_3$  de 0,3 M como eluyente. El programa Astra 4.90.08 (de Wyatt Technology Santa Barbara, EE.UU) analiza la distribución de peso molecular de las muestras en GPC-RI-MALLS-MALLS.

15

20

##### 4.2. Determinación de $\text{DP}_n$ de inulina con hidrólisis de PCA

25

La inulina se hidroliza por completo con ácido percloro acético (PCA). A partir de la proporción de fructosa generada con respecto a glucosa generada, se puede determinar el número medio de longitud de cadena ( $\text{DP}_n$ ) de la muestra de inulina.

Preparación de muestra:

30

Se pesaron exactamente 50,0 +/- 5,0 mg de inulina en un matraz de 1 ml. Se añaden 700  $\mu\text{l}$  de  $\text{O}_{\text{bidest}}$  para disolver. Posteriormente, se agita la muestra con el fin de despegar el material de la muestra de la parte inferior del recipiente de la mejor forma posible y posteriormente se deja reposar en un baño de agua en ebullición (~99 °C). Durante la incubación, se agita al matraz cada 30 segundos. Tras la incubación se enfría la muestra hasta temperatura ambiente con el fin de llenar con  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$  hasta la marca de 1 ml de calibración. La disolución de la muestra tiene una concentración de inulina de 5,0 +/- 0,5 %. Para la determinación del azúcar antes de la hidrólisis se retienen 200  $\mu\text{l}$  y se congela a -20 °C. Antes del tratamiento del azúcar se descongela a temperatura ambiente, se mezcla, se disuelve durante 5 minutos bajo agitación a 1400 rpm en un bloque de calentamiento a 95 °C y se centrifuga durante 2 minutos a 4000 rpm.

35

40

Hidrólisis y extracción de muestra:

Se proporcionan 250  $\mu\text{l}$  de disolución de inulina de ~ 5 % en 250  $\mu\text{l}$  de PC de 18 % ya preparado (concentración final de inulina 2,5 %, PCA 9 %). Alternativamente, se proporcionan 900  $\mu\text{l}$  de disolución de inulina de 5 % en 100  $\mu\text{l}$  de PCA de 5 % ya preparado (concentración final de inulina 4,5 %, PCA 0,5 %). Se homogeneiza la mezcla de hidrólisis y se centrifuga durante 1 minuto a 4000 rpm. Posteriormente, se coloca la mezcla de hidrólisis en un dispositivo de calentamiento (bloque de calentamiento) a 37 °C o, alternativamente, 56 °C. En diferentes momentos, tras la mezcla del hidrolizado de nuevo y la centrifugación durante 1 minuto a 4000 rpm, se extraen 100  $\mu\text{l}$  de muestra y se neutralizan de forma inmediata por medio de adición de una mezcla de neutralización de NaOH acuoso. Se comprueba el valor de pH de la muestra neutralizada con un indicador de pH (papel de pH). Los momentos de extracción de muestra son 50 minutos, 2 horas, 3 horas y 4 horas y 24 horas. Se congelaron todas las muestras neutralizadas a -20 °C. Antes de la medición de los azúcares, se descongelan estas muestras a temperatura ambiente, se mezclan y centrifugan durante 2 minutos a 4000 rpm. Para la medición de fructosa se prepara una dilución de 1:10 por medio de adición de 10  $\mu\text{l}$  de hidrolizado neutralizado sobre 90  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ .

50

55

Medición de azúcares

Para la determinación de fructosa y glucosa liberadas durante la hidrólisis en todas las muestras, se lleva a cabo una medición fotométrica de glucosa-fructosa. En la muestra, antes de la hidrólisis, también se determina sacarosa además de glucosa y fructosa. La medición se lleva a cabo como determinación repetida en placas de microvaloración por medio del uso de un fotómetro SPECTRAMax (Molecular Devices). Se preparan todas las disoluciones de enzima empleadas en tampón de medición, que consiste en imidazol-HCl 50 mM pH 6,9,  $\text{MgCl}_2$  2,5 mM, ATP 1 mM y NADP 0,4 mM. Se observa la conversión de NADP en NADPH a 340 nm.

60

65

Para la medición de azúcares antes de la hidrólisis se usa la disolución de inulina no diluida de 5 %. Se proporcionan 10  $\mu\text{l}$  de esta disolución a 200  $\mu\text{l}$  de un tampón de medición. Se lleva a cabo la determinación de glucosa por medio

de adición de 2 µl de una mezcla de hexoquinasa (de levadura, 0,3 U/µl) y glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (de levadura, 0,14 U/µl). Tras la conversión completa de la glucosa se añaden 2 µl de fosfoglucoisomerasa (de levadura, 0,14 U/µl) con el fin de determinar la fructosa. Una vez se ha convertido la fructosa de forma completa, se añaden 2 µl de β-fructosidasas (3 U/µl) para la escisión de la sacarosa presente.

5 La medición de la glucosa y fructosa se llevan a cabo como se ha descrito previamente en el punto 3 (determinación de azúcares).

Cálculo:

10 En el cálculo, para la conversión de NADP en NADPH, se toma como base un coeficiente de extinción molar de  $6,23 \times 10^4 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Se resta la concentración de glucosa y fructosa, que ya está presente antes de la hidrólisis, de las concentraciones de glucosa y fructosa en los hidrolizados. De igual forma, se resta la glucosa y la fructosa, que se liberaría a partir de la sacarosa hidrolizada que está presente en la muestra antes de la hidrólisis. Las concentraciones de fructosa y glucosa obtenidas de este modo se generan durante la hidrólisis de la inulina. Además, la longitud media de cadena expresada en número ( $DP_n$ ) se puede calcular de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$DP_n = (C_{\text{Fructosa}}/C_{\text{Glucosa}}) + 1$$

20 En este caso, se garantiza que cada molécula de inulina tenga una glucosa terminal.

Para controlar que la hidrólisis tiene lugar de forma completa, se puede determinar la tasa de recuperación refiriendo las concentraciones generadas de glucosa y fructosa a la masa aplicada de inulina.

25 **5. Análisis de inulinas por medio de cromatografía de intercambio iónico y con detección amperométrica por pulsos (HPAEC-PAD)**

30 Se separan las mezclas poliméricas de inulina por medio de cromatografía de intercambio aniónico y detección amperométrica por pulsos en un sistema DIONEX (bomba de gradiente GP50, dispositivo automático de toma de muestra AS50, horno de columna modelo 585, detector ED50, pre-columna CarboPac PA-100, columna de separación CarboPacPA-100, de DIONEX Corporation, Alemania). El horno de columna tiene una temperatura de 30 °C. El eluyente A es NaOH 150 mM, y el eluyente B es acetato de sodio 1 M en NaOH 150 mM. El caudal es de 1 ml/min.

35 Se preparan disoluciones de inulina de 0,5-2 % (peso/volumen) en agua destilada dos veces y se incuban a 95 °C hasta la disolución completa de la inulina.

La forma de onda del detector Ed50 tiene la siguiente composición:

Tiempo (s)	Potencial (V)	
0,00	0,05	
0,28	0,05	Comienzo de la integración
0,48	0,05	Final de la integración
0,49	0,65	
0,60	0,65	
0,61	-0,96	
0,72	-0,96	
0,73	0,05	

Se aplica el siguiente gradiente para el fraccionamiento máximo de los polímeros de inulina:

Gradiente 1: (90 minutos)	Tiempo (minutos)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
	0	100	0
	5	100	0
	40	72	28
	70	55	45
	75	0	100
	80	0	100
	85	100	0
	90	100	0

45 Se usa el soporte lógico DIONEX Chromeleon (Versión 6.6) para analizar los cromatogramas.

**6. Determinación del contenido en porcentaje de oligómeros de inulina con longitudes de cadena de DP = 3 a DP = 10 en la inulina total por medio de HPAEC-PAD**

- 5 Se determinan las proporciones de polímeros de inulina con una longitud de cadena de DP3 a DP10 por medio de cromatografía de intercambio aniónico y detección amperométrica (véase método 6), pero con una configuración de detector modificada y con un gradiente de sal diferente.
- 10 Se preparan disoluciones acuosas de 2 % (peso/volumen) a partir de inulina de alcachofa purificada. Se separan 100 µl de esta disolución en cada operación de cromatografía de intercambio aniónico con gradiente 2, con el detector ED50 no acoplado, y se recogen los oligofruktanos individuales después de la columna. Se llevan a cabo cuatro operaciones separadas con la disolución de inulina de concentración 2 %.

<u>Gradiente 2:</u> (50 minutos)	Tiempo (minutos)	Eluyente A (%)	Eluyente B (%)
	0	100	0
	5	100	0
	35	76	24
	37	0	100
	42	0	100
	45	100	0
	50	100	0

- 15 Se neutralizan las fracciones recogidas con ácido acético (pH = 7) y posteriormente se retiran las sales por medio de incubación durante cinco minutos con un intercambiador aniónico (resina TMD8 de lecho mixto, de Sigma, número de artículo M8157) en un proceso por lotes al tiempo que se agita a temperatura ambiente. Se retira el intercambiador iónico de la disolución por medio de centrifugación y filtración a través de un filtro de 0,2 µm (MC-ultrafree, de amicon, número de artículo UFC3 OLG 25).

- 20 Se congelan y concentran las fracciones hasta sequedad en estado congelado en un concentrador de vacío. Se combinan las fracciones correspondientes de las cuatro operaciones en un total de 250 µl de agua desionizada.

- 25 Para determinar la proporción de los diversos oligómeros, se hidrolizan las fracciones individuales con exo-inulinasa hasta glucosa y fructosa. Se diluyen las fracciones cuando resulta apropiado. Se someten a digestión 100 µl de disolución de fracción con 0,25 U de exo-inulinasa (de Megazyme, número de artículo E-EXO1) a 37 °C durante tres horas. Se detiene la reacción por medio de incubación a 95 °C durante 10 minutos. Tras el enfriamiento, se filtra la disolución (ultrafree-MC, de amicon, número de artículo UFC3 OLG 25). Se separan 150 µl de filtrado por medio de cromatografía de intercambio iónico con gradiente 2 y la siguiente forma de onda del detector.

30

Tiempo (s)	Potencial (V)	
0,00	0,05	
0,20	0,05	Comienzo de la integración
0,40	0,05	Final de la integración
0,41	0,75	
0,60	0,75	
0,61	-0,15	
1,00	-0,15	

- 35 Se calibra el sistema HPAEC-PAD con disoluciones patrón de glucosa y fructosa en un intervalo de concentración de 6 µM-30 µM. Se determinan las concentraciones de glucosa y fructosa liberadas en las fracciones con ayuda de esta calibración (en µmol/l).

- Para calcular el contenido en porcentaje de los oligómeros de DP3 a DP10 en la inulina total, se divide el total de glucosa y fructosa liberadas por el oligómero respectivo entre el peso de inulina de alcachofa purificada (disolución de concentración de 2 %).

**40 7. Determinación del contenido de agua**

- Se determina el contenido de agua usando un dispositivo de valoración AQUA 40.00 Karl-Fischer (de analytikjena AG). Se usa Hydranal Coulomta AG (Riedel-deHeën, artículo N°. 34836) como analito. La sustancia de referencia usada es tartrato de sodio dibásico dihidratado (Riedel-deHaëm, artículo N°. 32323) con un contenido de humedad de 15,61-15,71 %. Se pesan 10-20 mg de la muestra en botellas de muestra de 5 ml (N20-5DIN, Machery-Nagel, artículo N°. 702 04.36), se cierran las botellas con tapones a rosca (N20 TS/oA, Machery-Nagel, artículo N°. 702 815) y se determina el contenido de agua de la muestra usando un dispositivo de valoración de Karl-Fischer.

## 8. Preparación de las pastas de inulina

5 Se dispersan pastas de inulina (sustancia seca) en 59,5 ml (de agua o tampón de citrato de pH 4,0) en un vaso de precipitados de vidrio de 150 ml usando un batidor pequeño (3-bucle: 2 cm de ancho; 8,6 cm de largo) que se acciona por medio de un agitador básico IKA RW16 (IKA Werke GmbH und Co., KG, 79219 Staufen, Alemania) con un valor 6-7, por medio de adición continua de la inulina durante un período de 30 s. Posteriormente, se transfiere la dispersión a un cilindro de medición de 250 ml (diámetro de 35 mm; altura de 160 mm) y se somete a cizalladura  
10 usando un Ultra-Turrax T25 (dispositivo de dispersión básico T25) (IKA Werke GmbH und Co., KG, 79219 Staufen, Alemania) a 24 krpm durante 3 minutos. Los contenidos del recipiente no se enfrían. Posteriormente, se transfieren las pastas de inulina a un vaso de precipitados de vidrio de 100 ml, se cubren con una tapa de vidrio y se almacenan en un frigorífico a 13 °C durante la noche. Antes de cada medición posterior, se acondicionan las pastas de inulina a temperatura ambiente durante una hora. A continuación, se agitan hasta lograr una consistencia suave con un agitador de paletas largas (2 paletas de agitación en un eje de 1 cm de ancho; anchura de paletas 1,4 cm; longitud de paletas 5,9 cm) accionado por un agitador básico IKA RW16 (IKA Werke GmbH und Co. KG, 79219 Staufen, Alemania) a 100 rpm durante 5 minutos. Inmediatamente después, se transfieren las pastas a los respectivos recipientes de medición.

## 20 9. Determinación de la estabilidad frente a la cizalladura de las pastas de inulina

Se mide la estabilidad frente a la cizalladura de las pastas de inulina acuosas usando un viscosímetro Rotovisco VT550 (de: antiguamente Thermo Haake GmbH, actualmente Thermo Electron GmbH, 63303 Dreieich, Alemania) a una temperatura de medición de 20-22 °C usando un agitador de paletas inclinadas a 128 rpm en una copa de  
25 medición (diámetro 42 mm; altura de 93 mm). Por este motivo, se agitaron las pastas de inulina en el Rotovisco durante 15 minutos y se midió la viscosidad de las pastas en cada caso al comienzo (punto más elevado de la curva) y al final del período de agitación. Posteriormente, se calcula la relación de la viscosidad al final del proceso de agitación ( $Visc_2$ ) con respecto a la viscosidad al comienzo ( $Visc_1$ ), y de este modo se determina la estabilidad frente a la cizalladura:

$$30 \text{ Estabilidad frente a la cizalladura [\%]} = Visc_2 / Visc_1 * 100$$

## 10. Determinación de la estabilidad frente a ácidos de las pastas de inulina

35 Se preparan pastas de inulina en tampón de citrato de pH 4 para determinar la estabilidad frente a ácidos. La determinación de la estabilidad en un medio ácido tiene lugar por analogía a la determinación de la estabilidad frente al cizalladura, es decir, usando un dispositivo de ensayo de viscosidad Rotavisko VT550 a una temperatura de medición de 20-22 °C usando un agitador de paletas inclinadas a 128 rpm en una copa de medición (diámetro 42 mm; altura 93 mm). Se agitan las pastas de inulina en el Rotovisko durante 15 minutos y se mide la viscosidad de  
40 las pastas en cada caso al comienzo y al final del período de agitación. A continuación, se calcula la relación de la viscosidad al final del período de agitación ( $Visc_2$ ) con respecto a la viscosidad al comienzo ( $Visc_1$ ), y la estabilidad frente a ácidos viene, de este modo, determinada por medio de:

$$45 \text{ Estabilidad frente ácidos [\%]} = Visc_2 / Visc_1 * 100$$

## 11. Determinación de la estabilidad térmica de las pastas de inulina

50 Se determina la estabilidad térmica de las pastas de inulina en un reómetro DSC (antiguamente Bohlin Instruments GmbH, 75181 Pforzheim, Alemania; desde 10/2004; Malvern Instruments GmbH, 71083 Herrenberg, Alemania) con la siguiente configuración:

Sistema de medición:	cono (4 °)/placa
Tasa:	0,1 Hz
Deformación:	0,001
Tensión inicial:	0,6 Pa
Perfil de temperatura:	30 °C-90 °C (1 °C/minuto)

55 La temperatura definida como la temperatura de fusión de las pastas de inulina es esa en la cual la viscosidad de los geles es menor que 2 Pa.s.

## 12. Calorimetría de barrido diferencial de inulina

60 Se pesan por arco partes de 3 gramos de inulina (sustancia seca en tubos de polipropileno graduados de 50 ml (30,0 x 115 mm, de Greiner, número de orden 227261). Se añaden 18 ml de agua destilada dos veces al respectivo polvo y se agita. A continuación, se colocan todas las suspensiones disponibles en un baño de agua (95 °C) y se

disuelven por medio de agitación varias veces. Se establece visualmente tras 20 minutos que todas las suspensiones experimentaron disolución completa. Posteriormente, se llevan las disoluciones disponibles hasta 20 ml por medio de la graduación del tubo de polipropileno para permitir una disolución de 15 % de concentración (peso/volumen).

5 A continuación, se colocaron las disoluciones, todavía calientes, de forma completa en placas de Petri (100 x 20 mm, de Grenier, número de orden 664102) y se secaron con la tapa abierta a 37 °C durante 2 días. Transcurrido este tiempo, se transfiere el material seco disponible a un mortero y se muele durante 2-3 minutos. Posteriormente, se homogeneiza este polvo en un molino de martillos (MM 300 de Retsch) con un adaptador que comprende una  
10 bola de acero con un diámetro de 20 mm durante 30 s y a una frecuencia de 30 Hertz. A continuación, se transfiere el polvo a un recipiente que se puede cerrar y se emplea para las mediciones de DSC.

Se determina el contenido de agua de las muestras por medio de un dispositivo automático de valoración de Karl-Fischer (véase los métodos generales 7). Para la medición de DSC, se pesan aproximadamente 10 mg de sustancia  
15 seca de inulina en una cazoleta de acero inoxidable (volumen 50 µl), se determina el peso exacto, y se añaden 30 µl de agua destilada. Posteriormente, se sellan herméticamente las cazoletas. Se usa una cazoleta de acero inoxidable como referencia. La muestra se calienta en un aparato de DSC con un dispositivo automático de toma de muestras (Perkin Elmer; Diamond) de 10-160 °C a una velocidad de calentamiento de 10 °C/minuto. Se lleva a cabo el análisis de datos por medio de un programa de soporte lógico de PYRIS 7.0 (Perkin Elmer, 63110 Rodgau-Jügesheim,  
20 Alemania). En este caso, se determinaron  $T_0$  (aparición) y la entalpía libre dH.

### 13. Determinación de la viscosidad

Disoluciones de inulina a una temperatura de 90 °C: Viscosidad frente a concentración.

25 Se produjo una disolución acuosa de inulina por medio de llenado de la cantidad de inulina con el respectivo volumen de agua destilada (peso por volumen). Se calentó la suspensión resultante y se disolvió en un baño de agua hasta 95 °C con agitación constante.

30 Se ejecutaron las mediciones en un reómetro CVO 120HR Bohlin/Malvern aplicando el modo de viscosimetría de isoterma (90 °C) en un sistema de cono-placa CP 4°C/40 mm. A modo de pre-cizalladura, se aplicó una velocidad de cizalladura de 10/segundo durante 60 segundos con un tiempo de relajación de 10 segundos. Se midió la cizalladura en el modo de velocidad de cizallamiento con etapas de tipo barrido logarítmico. La velocidad de cizallamiento de partida fue de 20/segundo, velocidad de cizallamiento final 30 /segundo, en una rampa ascendente con 20 segundos  
35 de tiempo de mantenimiento y 10 segundos de tiempo de integración. Se tomaron los datos a una velocidad de cizallamiento de 20 s<sup>-1</sup>.

### 14. Determinación de la resistencia de gel y comportamiento viscoelástico

40 Se llenaron 70 g de una suspensión de 10-25 % en peso de suspensión de inulina en agua (destilada) en una copa de medición MV de un viscosímetro Haake Rotovisco VT 550. Posteriormente, se insertó un agitador de álabes y se instaló en un dispositivo precalentado (camisa de temperatura, 90 °C). Posteriormente, se calentó la preparación durante 15 minutos bajo agitación a 128 rpm.

45 Trascurridos 15 minutos, se transfirió la preparación a 90 °C a un recipiente que consistía en una parte inferior y una pared de dos anillos cilíndricos a partir de vidrio acrílico (cada uno de 20 mm de altura, 30 mm de diámetro) que descansaban uno sobre otro y fijados uno a otro por medio de una cinta adhesiva (19 mm de anchura). Se llenó la preparación en un recipiente hasta un nivel de aproximadamente 5 mm por debajo del borde superior sin burbujas. Posteriormente, se selló herméticamente el recipiente con papel de aluminio y se dejó a temperatura ambiente (23  
50 °C) durante la noche.

La medición de la resistencia de gel se hizo tras el almacenamiento durante aproximadamente 20 horas a temperatura ambiente (23 °C) con un Texture Analyser TA XT2. Con el fin de permitir una medición de resistencia de gel a una superficie lisa y no seca, en primer lugar se retira la cinta adhesiva que mantenía unidos los dos anillos cilíndricos del recipiente. Posteriormente, se cortó el gel entre los anillos con un cuchillo de manera que la parte inferior del gel mostrara un superficie suave.

Se llevó a cabo la medición de la resistencia de gel con un Texture Analyser TA XT2 por medio de penetración (profundidad de 1 mm) de una placa giratoria plana (24,5 mm de diámetro) en el gel. Los ajustes del Analizador de  
60 Textura fueron los siguientes:

Principio de medición:	fuerza en la dirección de presión
Pre-velocidad:	2 mm/s
Velocidad de ensayo:	2 mm/s
Valor de accionamiento:	0,01 N
Velocidad de retorno:	2 mm/s

Distancia

1 mm

El valor máximo para una penetración de tiempo del solideo se proporciona en Newton.

##### 5 Comportamiento viscoelástico tras enfriamiento hasta 25 °C

Se prepararon disoluciones acuosas de inulina de concentraciones diferentes como ya se ha descrito en la determinación de viscosidad (véase anteriormente) y posteriormente se enfrió. Se mantuvo constante la velocidad de enfriamiento en 1 K por minuto, por medio de control automático de temperatura. Tras alcanzar 25 °C, se aplicó instantáneamente la desviación de frecuencia. Se ejecutaron las medidas en un reómetro CVO 120 HR Bohlin/Malvern aplicando un modo de oscilación isoterma (25 °C) en un sistema de cono-placa CP 4<sup>o</sup>/40 mm. No se aplicó pre-cizalladura. Se midió la tensión en etapas de tipo barrido logarítmico con 10 segundos de tiempo de mantenimiento. La frecuencia de partida fue de 0,100 Hz, la frecuencia final de 5,000 Hz/segundo en una rampa ascendente. Se ajustó la tensión a  $\gamma = 0,010$  (deformación supuesta) comenzando de forma automática  $\sigma = 0,100$  Pa.

## 15. Estudio de fermentación

### Muestras Fecales

Se seleccionaron 10 contribuyentes a muestras fecales en consideración de los siguientes criterios de exclusión.

- sin tratamiento con antibióticos durante los últimos 6 meses
- sin tratamiento permanente con medicamentos de ningún tipo, excepto anticonceptivos orales
- sin indisposición durante la semana anterior a la contribución
- sin síntomas de diarrea durante la semana anterior a la contribución
- sin nutrición mediante una dieta terapéutica
- sin selección especial de alimento con fines de pérdida de peso

Se tomaron muestras fecales para el experimento no antes de 1 hora antes del comienzo del experimento. Se pesaron aproximadamente 4 g de muestra fecal de forma exacta y se diluyeron 1:10 con medio anaeróbico de Wilkins-Chalgren (WCA) aireado con N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20, volumen/volumen). Para la homogeneización, se introdujeron en una bolsa Stomacher™ Lab Blender y se trataron a velocidad máxima en un Stomacher™ Lab Blender. El período necesario fue entre uno y diez minutos dependiendo de la consistencia de la muestra.

Se inoculó 1 ml de muestras fecales homogeneizadas, respectivamente, en condiciones asépticas en tubos de cultivo de Hungate y se mezcló con medio que se había llenado con anterioridad. Los tubos contenían 9 ml de medio WCA aireado con N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (80/20, volumen/volumen), en el que en el medio WCA los carbohidratos evaluados estuvieron en concentraciones tales que se obtuvo una concentración final de 10 mM, calculada en relación al monómero, tras la adición de la muestra fecal diluida. Los cultivos preparados de tal forma se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Se tomaron muestras de 4 ml, respectivamente, antes del comienzo de la incubación y después de 24 horas para el análisis posterior.

### Pretratamiento de las muestras

Se separaron las muestras tomadas del tubo Hungate en dos recipientes de reacción de 2 ml, respectivamente, y se centrifugaron durante 10 minutos a 8000 x g. Se decantaron los sobrenadantes y se congeló a -20 °C hasta la evaluación de los parámetros. Se re-suspendieron las células sedimentadas en 1,5 ml 1 x PBS por medio de mezcla intensa junto con tres perlas de vidrio de 3 mm y se centrifugó a 300 x g durante 1 minuto con el fin de retirar las partículas gruesas. Posteriormente, se mezcló 1 ml del sobrenadante con 3 ml de disolución de paraformaldehído y se incubó durante 3 horas a 4 °C. Posteriormente, se centrifugó 1 ml de la suspensión a 8000 x g durante 3 minutos y se mezcló la pella con 300  $\mu$ l de 1 x PBS y se almacenó a -20 °C tras la adición de 300  $\mu$ l de etanol (absoluto).

### Determinación de la valoración celular

Se llevó a cabo el análisis para la determinación de la valoración celular por medio de microscopia FISH de acuerdo con el procedimiento de Thiel & Blaut (Thiel, R., Blaut, M. (2005) Microbiol. Meth. 61, 369-379).

### Sondas para la determinación del número de células

Se analizaron las células presentes en las muestras por medio del método de microscopia FISH automática. Para la determinación del número total de células se usó la sonda de mezcla EUB-mezcla (EUB 338; Amann et al., 1990, Appl. Environ. Microbiol. 56, 1919-1925; EUB 785, EUB 1055 y EUB 1088; Lee et al., 1993, Mar. Ecol. Prog. Ser. 101, 193-201; EUB 927; Giovannoni et al., 1988, J. Bacteriol. 170, 720-726). Se llevó a cabo la determinación de

Lactobacilos con sonda Lab158 (Harmsen et al., 1999 Microbiol. Ecol. Health Dis. 11:3-12) por medio de conteo manual debido a las reducidas valoraciones celulares esperadas.

Detección de la Producción de H<sub>2</sub>

5 Se llevó a cabo la detección de hidrógeno con un cromatógrafo de gases HP Serie 6900 II que tenía una columna capilar 5A- tamiz molecular HP-19091P-MS4 (30 m x 0,32 mm x 12 µm de espesor de película) con un detector de conductividad térmica. Como gas portador, se usó N<sub>2</sub> con un flujo de 1 ml/min. La temperatura del horno de columna fue de 40 °C, la temperatura del detector fue de 205 °C. Se ajustó la división en 1:10 y el volumen de inyección fue de 0,5 ml.

Determinación de fructosa

15 Se determinó el contenido de fructosa con el Estuche de Ensayo de Fructano (Megazyme Cat. N°: K-FRUC) bajo ajuste para proporcionar volúmenes de muestra. El contenido de fructosa es una medición de la inulina residual en las muestras de fermentación ya que se la inulina se convierte en fructosa.

**16. Preparaciones de alimentos**

20 a) Aliño para Ensaladas de Bajo Contenido de Grasa

Recetas

Tipo de inulina usada	Alcachofa, DPw 56 medio	--- (control)	Fibra de Cargill Oliggo LC/HT	Fibra de Cargill Oliggo F97	Orafti Raftline HP
Ingredientes <sup>1)</sup>	Peso (g)	Peso (g)	Peso (g)	Peso (g)	Peso (g)
Fase de aceite:					
Aceite de soja	92,45	302,45	92,45	92,45	92,45
Huevos, enteros, pasteurizados	23,00	23,00	23,00	23,00	23,00
Yemas de huevo, pasteurizadas	18,00	18,00	18,00	18,00	18,00
Fase Acuosa:					
Leche desnatada, sintética, de bajo contenido graso	89,45	89,45	89,45	89,45	89,45
Agua	190,45	40,45	190,45	190,45	190,45
Vinagre, blanco destilado	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00
Perejil, escamas enteras, deshidratado	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Sorbato de potasio	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Mezcla A seca					
Sal	3,73	3,75	3,75	3,75	3,75
Harina de Mostaza	1,50	1,50	1,50	1,50	1,50
Mezcla B seca					
Inulina	60,00	---	60,00	60,00	60,00
Azúcar, granulado	8,00	8,00	8,00	8,00	8,00
Sal	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25
Pimienta negra, media	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Polvo de ajo	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

## ES 2 533 869 T3

Polvo de cebolla	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Goma Xantán	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

1) Suministradores (todos los nombres de suministradores y nombres de producto son marcas registradas):  
 Aceite de Soja de AC Humko.  
 Huevos enteros y yemas de huevo (10 % de sal) de Sysco  
 Vinagre de Fleischmann's (20 % de acidez)  
 Escamas de perejil entero y pimienta negra de McCormick  
 Sorbato de potasio de ADM  
 Sal de Morton  
 Harina de mostaza de French's (82841)  
 Azúcar granulado de C&H  
 Polvo de ajo y polvo de cebolla de ConAgra/Gilroy  
 Goma xantán de KelCo (Keltrol 521)

### Preparación:

- 5 1. Disolver el sorbato de potasio en agua
2. Añadir la mezcla B bajo cizalladura
3. Añadir vinagre seguido de leche desnatada bajo cizalladura
4. Añadir yemas de huevo y huevo entero
5. Añadir la mezcla A seca bajo cizalladura
6. Añadir lentamente mezcla de aceite bajo cizalladura
- 10 7. Envolver las escamas de perejil al tiempo que se mezcla a baja velocidad o a mano.
8. Mantener refrigerado

### b) Pan Blanco

### 15 Recetas

Tipo de inulina usada	Alcachofa, DPw 56 medio	--- (control)	Fibra de Cargill Oligo LC/HT	Fibra de Cargill Oligo F97	Orafti Raftline HP
Ingredientes <sup>1)</sup>	Peso (g)	Peso (g)	Peso (g)	Peso (g)	Peso (g)
Harina de pan, 12,6 % de proteína	357,20	391,80	357,20	357,20	357,20
Agua	300,30	300,30	300,30	300,30	300,30
Harina de repostería, 9,5 % de proteína	135,80	148,90	135,80	135,80	135,80
Grasa comestible, hidrogenada	48,40	48,40	48,40	48,40	48,40
Azúcar, granulado	48,40	48,40	48,40	48,40	48,40
Inulina	47,70	---	47,70	47,70	47,70
Azúcar invert	29,80	29,80	29,80	29,80	29,80
Leche seca sin grasa, Nth Inst Bulk	14,90	14,90	14,90	14,90	14,90
Levadura, instantánea	8,60	8,60	8,60	8,60	8,60
Sal	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
Monoglicérido Destilado	1,70	1,70	1,70	1,70	1,70
Emulsionante	1,10	1,10	1,10	1,10	1,10
Enzima Repostería	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10

(continuación)

1) Suministradores (todos los nombres de suministradores y nombres de producto son marcas registradas):  
 Harina de pan y harina de repostería de General Mills (Superlative #53521; Superlative # 58431)  
 Grasa comestibles de Lodders Croaklaar (321)  
 Azúcar granulado de C&H  
 Azúcar Invert de LSI (Nulomoline)  
 Leche seca sin materia grasa de Kerry (I1532)  
 Levadura instantánea de Fleischmann's (2139)  
 Sal (Tabla) de Morton  
 Monoglicérido destilado (Domodan PH 300 K-A), Emulsionante (Panodan Datem 205 K) y Enzima de Reposterías (Grindamy Max-Life U4) de Danisco

**Preparación**

1. Pesar todos los ingredientes secos excepto la sal en un recipiente KitchenAid.
- 5 2. Añadir azúcar Invert, grasa comestible y agua y mezclar durante 1 minuto a velocidad de "agitación".
3. Añadir la sal y continuar la mezcla durante 1 minuto a velocidad de "agitación" y 6 minutos a velocidad "1".
4. Cerrar de forma estanca durante 1,5 horas a 29 °C en un recipiente tapado.
5. Empujar hacia abajo la masa y conformar para dar lugar rebanadas de pan de molde y colocar el pan de molde con grasa.
- 10 6. Dejar cerrado hasta alcanzar el doble de tamaño en aproximadamente 1,5 horas.
7. Cocer a 200 °C en un horno de convección durante 30 minutos, hasta obtener un ligero color dorado y que la temperatura interna sea de 96 °C - 100 °C.
8. Rotar la cazoleta una vez durante la cocción.
- 15 9. Enfriar sobre una rejilla durante 5 minutos, retirar la cazoleta de pan de molde y enfriar a temperatura ambiente.

**Ejemplo 1****Caracterización de la inulina procedente de raíces de alcachofa**

20

**1. Cultivo de plantas de alcachofa**

Se cultivaron plantas de alcachofa de la variedad Nun9444 (también denominada N9444) en las proximidades de Valencia, España. Se sembraron las semillas en Junio en cajas de plantas con 104 huecos (8 x 13 orificios, 4 x 4 cm) en un invernadero de malla. Se cultivaron las plantas en cajas de plantas durante seis semanas. Se plantaron en una parcela a una densidad de 10 000 plantas/hectárea a principios de Agosto. Se recolectaron todas las plantas en Julio del año siguiente. Se separaron las raíces de la parte aérea y se limpió el suelo adherido con agua (a presión) y de forma adicional a mano. Se secaron las raíces en un sustrato fijo a la sombra durante 3 días. A continuación, se transportaron las raíces sin enfriamiento alguno desde España a Alemania. Se almacenaron las raíces a -80 °C hasta la extracción de la inulina.

30

**2. Preparación de inulina a partir de raíces de alcachofa**

Para la preparación de inulina, se descongelaron raíces de alcachofa de la variedad Madrigal (antiguamente Nun 9444) a temperatura ambiente y se cortaron en trozos. Se extrajo la inulina y se purificó como se describe en el método de "Purificación de inulina y fraccionamiento" descrito anteriormente. Se combinó la inulina purificada a partir de una pluralidad de preparaciones para proporcionar una muestra.

35

**3. Determinación de la pureza de la inulina preparada**

40

Se determinó la pureza de la inulina de alcachofa preparada por medio de la determinación de los contenidos de agua y fructano del material seco por congelación. Se determinó un contenido de agua de un 5,4 % para la inulina de alcachofa (véase el método de "Determinación del contenido de agua").

45

Para determinar el contenido de fructano/inulina, se incubaron 20 mg de alcachofa en 2 ml de agua destilada dos veces con agitación en un bloque de calentamiento a 95 °C durante una hora. Se determinó el contenido de fructano/inulina por un lado (1) con el estuche de "Procedimiento de Ensayo de Fructano" (véase método 2.1) y (2) por medio de hidrólisis de la inulina usando exo-inulinasa y posterior Determinación enzimática del contenido de glucosa y fructosa liberadas (véase método 2.2. Se diluyeron las muestras 1:5 con agua destilada dos veces para (1). Se determinó la pureza basada en materia seca (DM) a partir del contenido de fructano y el contenido de agua. Pureza = contenido de fructano x 100/(100 - contenido de agua).

50

Como resulta evidente a partir de la tabla 1, el grado medio de pureza de la inulina de alcachofa preparada es de un 92,5 o un 99,1 % de materia seca (DM), dependiendo del método de determinación.

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

Material	Contenido de agua [%]	Procedimiento de Ensayo de Fructano (1)		Digestión de exo-inulinasa (2)	
		Fructano [% del peso inicial]	Pureza [% de DM]	Fructano [% del peso inicial]	Pureza [% de DM]
Inulina de alcachofa	5,4	86,5 ± 2,2	91,5 ± 2,2	94,5 ± 4,1	99,1 ± 4,1

5

**4. Determinación de peso molecular por medio de GPC-RI-MALLS**

Se prepararon disoluciones acuosas de 0,5 % (peso/volumen) a partir de inulina de alcachofa purificada y a partir de muestras de referencia adquiridas comercialmente de Raftiline HP (de Orafiti, lote: HPBN03DNO3) e inulina procedente de tubérculos de dalia (de Sigma, número de artículo I-3754, lote: 022K7045 o 75H7065) y se determinó la distribución de masa molar de las inulinas por medio de cromatografía de permeabilidad en gel (véase el método 4). Esta distribución se muestra en la Figura 1, y las masas molares (anhidrofructosa = 162 g/mol) y longitudes de cadena medias calculadas a partir de las mismas se recogen en la Tabla 2.

10

15

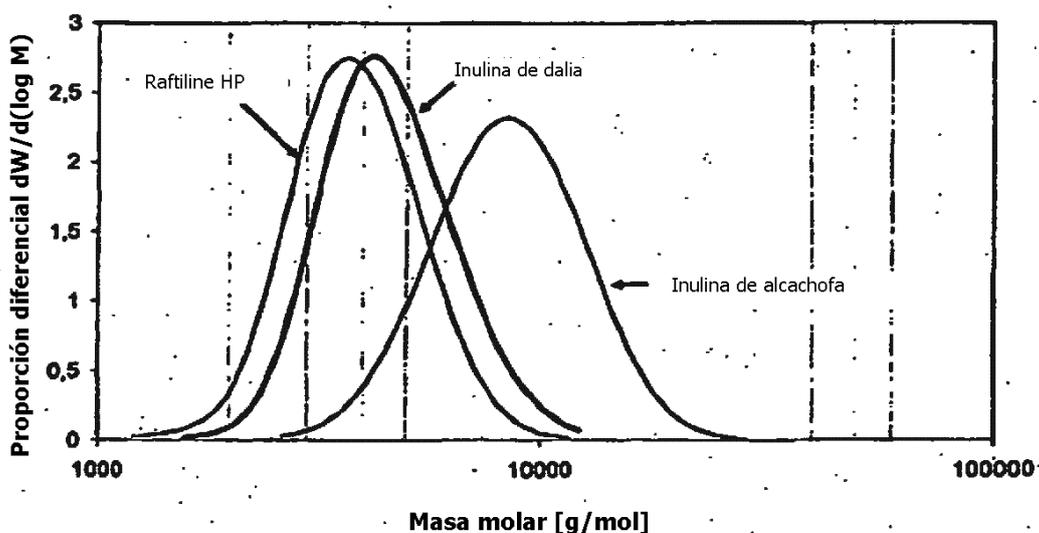
El análisis de la distribución de peso molecular usando el sistema GPC-RI-MALLS dio como resultado una masa  $M_w$  molar media expresada en peso de 9045 g/mol y un masa  $M_n$  molar media expresada en número de 7797 g/mol para la inulina de alcachofa. Esto corresponde a una longitud media de cadena de 56 para DPw y 48 para DPn. Las longitudes de cadena de la inulina de alcachofa purificada son de media más largas que las correspondientes a Raftiline HP (DPw = 25, DPn = 23) e inulina de dalia (DPw = 29, DPn = 26). Esto también queda reflejado en las masas molares mínima y máxima, que son más grandes para la inulina de alcachofa.

20

**Tabla 2: Distribución de masa molar de diversas inulinas**

Material	$M_w$ [g/mol]	$M_n$ [g/mol]	Distribución polimérica (min-max) [g/mol]	DPw	DPn	Dispersión Molecular
Inulina de alcachofa	9045 ± 45	7797 ± 46	2650-28 630	56	48	1,17
Raftiline HP	4120 ± 28	3673 ± 45	1210-11 610	25	23	1,09
Inulina de Dalia	4734 ± 68	4242 ± 50	1590- 12 300	29	26	1,11

**Distribución de masa molar de GPC-RI-MALLS**



25

**Figura 1: Análisis de la distribución de masa molar de diversas inulinas**

30

**4a Determinación del peso molecular con hidrólisis de ácido percloro acético (PCA)****Tabla 2a**

DPn	1. medición	2. medición
Inulina de alcachofa	51	48
Raftiline HP	27	-
Inulina de dalia	-	35

1. medición: 4,5 % de concentración final de inulina, 0,5 % de concentración final de TCA, 24 h, 56 °C  
2. medición: 2,5 % de concentración final de inulina, 9 % de concentración final de TCA, 4b, 37 °C

**5. Resultados de la determinación de glucosa, fructosa y sacarosa**

Para determinar la proporción de glucosa, fructosa y sacarosa en la inulina de alcachofa purificada, se prepararon disoluciones acuosas de inulina de concentraciones 1 % y 2 % y se incubaron a 95 °C durante una hora. Esto vino seguido de determinación fotométrica de los azúcares como se describe en el método 3 ("determinación de azúcar").

Como resulta evidente a partir de la Tabla 3, la fructosa se puede detectar en la inulina de alcachofa purificada únicamente con un contenido de 0,1 %. No se detectaron glucosa y sacarosa en las condiciones descritas con el método de detección fotométrico.

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	No detectable	0,1	No detectable

**Tabla 3: Contenido de glucosa, fructosa y sacarosa en inulina de alcachofa purificada****6. Determinación del contenido en porcentaje de oligofruktanos con una longitud de cadena de DP = 3 a DP = 10 en la Inulina total por medio de HPAEC-PAD**

Para calcular el contenido en porcentaje de oligofruktanos con una longitud de cadena de DP = 3 a DP = 10 en la inulina total, se prepararon disoluciones acuosas de 2 % (peso/volumen) de la inulina de alcachofa purificada y se separaron por medio de HPAEC-PAD (método 5), y se calcularon las proporciones de oligofruktanos por medio del método 6. Los valores resultantes de esto son los siguientes.

Oligómero de inulina	Contenido (g/100 g de polvo)
DP3	0,007
DP4	0,016
DP5	0,012
DP6	0,013
DP7	0,024
DP8	0,029
DP9	0,044
DP10	0,072
Total	0,217

**Ejemplo 2****Caracterización de las pastas de inulina****1. Determinación de la estabilidad de las pastas de inulina**

Los análisis de estabilidad de las pastas de inulina (procedimiento: véase métodos) mostraron que el comportamiento de estabilidad de la inulina de alcachofa se ve alterado en comparación con la procedente de achicoria (Raftiline HP) y dalia (véase la Tabla 4). A las velocidades de cizalladura usadas en la presente memoria, la inulina de alcachofa mostró la estabilidad más grande con más de un 90 % del valor inicial. El análisis de la estabilidad frente a la viscosidad de las pastas de inulina en un medio ácido (estabilidad frente a ácidos) mostró de manera adicional que la inulina de alcachofa muestra el cambio más pequeño tras almacenamiento durante 2 semanas a partir del valor inicial tras 24 horas, y la viscosidad aumentó únicamente un 6,7 %. Al contrario, la viscosidad de la pasta de inulina de dalia aumentó en medio ácido en más de un 15 % y la de la Raftiline HP en más de un 32 %. Este espesamiento posterior resulta no deseado en muchas aplicaciones del sector alimentario. La temperatura de fusión de las pastas de inulina de alcachofa fue de 73 °C, que es más elevado que la de las sustancias de comparación, es decir, 62,3 °C para Raftiline HP (de Orafiti, lote: HPBNO3DNO3) y 65,5 °C para inulina de dalia (de Sigma, número de artículo 1-3754, lote: 75H7065). Una elevada estabilidad térmica de las pastas de inulina es una ventaja muy grande en muchos procesos térmicos del sector alimentario.

Tabla 4

Material	Estabilidad frente a cizalladura [%]	Estabilidad frente a ácidos [%]	Temperatura de fusión [°C]
Inulina de alcachofa	90,5	106,7	73,0
Raftiline HP	49,8	132,1	62,3
Inulina de dalia	81,0	115,9	65,5

## 2. Investigación de inulina por medio de calorimetría de barrido diferencial

El análisis calorimétrico de barrido diferencial de inulina (procedimiento: véase métodos) mostró claras diferencias entre los diversos materiales (véase la Tabla 5) en relación con el comportamiento de fusión. Aunque  $T_{\text{aparición}}$  ( $T_0$ ) fue muy similar para todas las muestras de inulina, se diferenciaron en gran medida por la entalpía de fusión. Esta fue más de 30 J/g para inulina de alcachofa, únicamente 21,3 J/g para Raftiline HP y 22,9 J/g para inulina de dalia. Además, la forma de la curva de fusión de inulina de alcachofa fue diferente a la de las otras dos inulinas (véase la Figura 2). Inicialmente, la curva de fusión de la inulina de alcachofa tiene un curso más aplanado que la de las otras dos inulinas, pero posteriormente aumenta más que con Raftiline HP o inulina de dalia (Figura 2). La mayor estabilidad térmica de la inulina de alcachofa puede ser una ventaja considerable en determinados procesos térmicos del sector alimentario, debido a que la inulina de alcachofa es menos sensible a las temperaturas elevadas que la inulina de Raftiline HP o de dalia.

Tabla 5

Material	$T_0$ [°C]	Entalpía de fusión dH [J/g]
Inulina de alcachofa	51,6	30,2
Raftiline HP	51,2	21,3
Inulina de dalia	51,1	22,9

### Ejemplo 3

#### Viscosidad, Comportamiento de Formación de Gel, Solubilidad.

##### a) Viscosidad

Tabla 6: Comparación de la viscosidad dinámica de inulina de achicoria y alcachofa en agua como función de la concentración ( $T = 90\text{ °C}$ )

Concentración (peso/volumen)	Viscosidad (mPa.s)	
	DPw 25 medio de Raftiline® HP (achicoria)	Inulina de Alcachofa, DPw medio = 56
20	2,2	3,0
22,5	2,4	3,4
25	3,1	8
30	2,7	550

Como se puede observar a partir de la tabla anterior, a concentraciones de hasta 22,5 % ambas inulinas mostraron viscosidades muy bajas a 90 °C (agua = 1 mPa.s). Cuando las concentraciones fueron de 25 % (peso/volumen) la inulina de la invención comenzó a volverse viscosa mientras que la Raftiline HP permaneció muy similar en agua hasta un 30 % (peso/volumen). A 30 %, la inulina de la invención mostró una viscosidad inesperadamente elevada.

##### b) Comportamiento de formación de gel

Se llevó a cabo el comportamiento de formación de gel de las inulinas tras solubilización térmica por medio de dos tipos de análisis. Las inulinas fueron las descritas en las Tablas 2 y Ejemplo 2. En primer lugar, se calentaron diferentes concentraciones de inulinas de alcachofa (de la invención), Raftiline HP e inulina de dalia a 90 °C y posteriormente se enfriaron durante 20 h a temperatura ambiente. Los geles que se formaron mostraron un carácter de tipo partícula (geles de partículas). Se cuantificó la resistencia de gel por medio de análisis de textura y los valores se proporcionan en la Tabla siguiente. A una concentración concreta de 20 % (peso/volumen), el gel formado por inulina de alcachofa fue muy fuerte, no se observó formación de gel alguna para Raftiline HP y únicamente se obtuvo un consistencia de tipo pudín con inulina de dalia.

**Tabla 7: Resistencia de geles a partir de inulina térmicamente disuelta**

Concentración (peso/volumen)	Resistencia de gel [N]		
	Raftiline HP	Alcachofa	Dalia
10 %	Sin gel	Sin gel	Sin gel
15 %	Sin gel	Sin gel	3,2
20 %	Sin gel	> 50	4,4
25 %	12,6	> 50	> 50

Se llevó a cabo una caracterización más detallada de la formación de gel con un reómetro dinámico. Se solubilizaron concentraciones diferentes (peso/volumen) de Raftiline HP e Inulina procedente de Alcachofa de la invención (DPw media 56) en agua a 90 °C y posteriormente se enfrió a 1 °C/minuto a 25 °C.

**Tabla 8**

Concentración (peso/volumen)	Módulo Elástico G' a 5 Hz [Pa]		Módulo viscoso G'' a 5 Hz [Pa]	
	DPw medio Raftiline ® medio (achicoria) = 25	Inulina de Alcachofa, DPw medio = 56	Raftiline® HP DPw media = 25 (achicoria)	Inulina de Alcachofa, DPw medio = 56
15	no detectable	2,5	no detectable	1,9
20	13,0	171,3	12,4	134,4
22,5	12,8	636900	14,2	20880

Los resultados de la tabla anterior indican que de un 20 % a un 22,5 % de Raftiline HP no mostró comportamiento de formación de gel ( $G' > G''$ ; módulo viscoso > módulo elástico). Al contrario, la inulina de alcachofa de la invención formó geles muy sólidos a las mismas concentraciones.

**c) Solubilidad**

En otro experimento se preparó una disolución de 20 % (peso/volumen) de Raftiline, inulina de dalia e inulina de alcachofa a 98 °C y posteriormente se almacenó en un frigorífico. Después, se cuantificó la cantidad de inulina que todavía estaba en la disolución. Las inulinas fueron las descritas en la Tabla 2 y en el Ejemplo 2.

**Tabla 9: Solubilidad de las diferentes inulinas**

	Achicoria	Alcachofa	Dalia
Solubilidad [%]	97,2	14,2	88

Como se muestra en la tabla anterior. Raftiline fue con mucho la más soluble, seguido de cerca por inulina de dalia, mientras que la inulina procedente de alcachofa únicamente fue soluble en menor medida.

Estas observaciones implican que a temperaturas intermedias (por debajo de 60 °C) o temperaturas bajas, se pueden introducir cantidades de inulina de alcachofa en los alimentos (tales como bebidas, aderezos, etc.) sin que afecte a la viscosidad mayores que las de otras inulinas comercialmente disponibles. Esto es una gran ventaja en aplicaciones de alimentos.

**Ejemplo 4**

**Estudio de Fermentación**

**a) Tasas de Fermentación**

Se fermentaron inulinas de alcachofa de DP 58 (lotes A y B) y Raftiline HP por medio de bacterias fecales humanas como viene indicado por medio de la producción de gas de H<sub>2</sub> logrado, en comparación con un control sin inulina.

La tabla siguiente muestra los contenidos de inulina (inulina residual + desviación estándar) en las preparaciones de fermentación tras 24 horas en porcentaje de la cantidad de inulina empleada originalmente (valores medios de preparaciones de fermentación independientes para cada uno de los sustratos, n = 10).

**Tabla 10**

Muestra	Inulina residual (%)	valore-p*
Raftiline HP	2,6 +/- 1	
Inulina de alcachofa lote A	9,0 +/- 3	0,00002
Inulina de alcachofa lote B	10,0 +/- 4	0,00010

\* significado de la desviación en comparación con Raftiline HP (Ensayo de T para muestras marcadas emparejadas)

La tabla muestra que después de 24 horas de fermentación hubo más inulina residual en la muestra de la invención (inulina de alcachofa, DPw medio 58) que en la muestra con Raftiline HP. De este modo, la inulina de alcachofa con un DP de 58 experimenta fermentación por parte de las bacterias fecales de manera más lenta que Raftiline HP comercial. Cabría esperar una inulina de cadena muy larga fermentada más lentamente, como la inulina de la invención, para ejercer efectos metabólicos y prebióticos en las partes más distales del colon, en comparación con las inulinas comerciales. La fermentación en el colon distal resulta beneficiosa, ya que muchas enfermedades intestinales (por ejemplo, la colitis ulcerosa, enfermedad de divertículos) se desarrollan principalmente en esa zona.

**b) Efectos prebióticos**

La siguiente tabla muestra el aumento del número de Lactobacilos (Lab) tras 24 horas provocados por fermentación, corregido frente a una muestra de blanco (sin inulina) en porcentaje, y la proporción en número de Lactobacilos con respecto a Eubacterias (Eub) tras 24 horas de fermentación (valores medios de preparaciones de fermentación independientes para cada uno de los sustratos, n = 10).

**Tabla 11**

Muestra	Aumento de lactobacilos (%)	Lab/Eub
<b>Raftiline HP</b>	<b>81</b>	<b>0,62</b>
<b>Inulina de alcachofa lote A</b>	<b>119</b>	<b>0,87</b>
<b>Inulina de alcachofa lote B</b>	<b>100</b>	<b>0,81</b>

La inulina de alcachofa de la invención estimuló los números de Lactobacilos a niveles más elevados que Raftiline HPI. El efecto superior de inulina de alcachofa frente a Raftiline HP con respecto a la estimulación de Lactobacilos, se vuelve más coherente si se considera la proporción de Lactobacilos/Eubacterias, que es significativamente más elevada con la inulina de la invención. Este valor es incluso más apropiado para expresar el efecto simulador específico sobre los Lactobacilos deseados.

**Ejemplo 5**

**Aplicaciones en alimentos**

**a) Aderezo para ensaladas de bajo contenido en grasa**

**Tabla 12**

Inulina (Fuente)	Inulina de acuerdo con la invención procedente de Alcachofa	-(control)	Fibra™ de Cargill Oliggo LC/HT (Achicoria)	Fibra™ de Cargill Oliggo F97 (Achicoria)	Orafd® Raftiline HP (Achicoria)
DPw media	56		> 20	70 % es < 10	25
Mono & Disacáridos	< 0,5 %		1,0 %	3,0 %	
Contenido de Humedad	5,40 %		4,00 %	5,00 %	3,00 %
<b>Atributos Organolépticos:</b>					
Aspecto	Ligeramente más espeso que el control; adhesión similar	Ranch típico; cremoso, color blanquecino; permanece en la ensalada	Ligeramente más fino que el control; adhesión similar	Mucho más fino que el control; no se adhiere a la ensalada	Más espeso que el control; no colable
Aroma	Similar al control	Típico	Similar al control	Similar al control	Similar al control
Textura	n/a*	Completamente graso, sensación cremosa en boca	Sensación en boca fina, ausencia de plenitud de contenido graso	Sensación en boca muy fina	Sensación en boca espesa, contiene plenitud de contenido graso
Aceptación frente al Control	Aceptable en cuanto a aspecto		Aceptable en cuanto a aspecto	Inaceptable	Inaceptable

**Formación de viscosidad:**

Como se observa a partir de la tabla anterior, el aderezo con inulina de la invención únicamente fue ligeramente más espeso que el Control pero todavía suave y colable. Se comportó mejor que los aderezos de inulinas de los ejemplos comparativos en cuanto a consistencia visual, formando un aderezo típico de Ranch suave, espeso y colable. El aderezo de Inulina Cargill Oliggo-Fiber™ LC/HT fue el más próximo en cuanto a consistencia a la inulina de la invención y al control, pero tuvo una consistencia ligeramente más fina. Orati Raftiline® HP mostró una consistencia mucho más espesa, más similar a una crema de queso y el aderezo con Cargil Oliggo-Fiber™ F-97 fue mucho más fino que el Control y se separó tras almacenamiento durante la noche.

**Sustitución de Grasa & Emulsionado:**

El aderezo con inulina de la invención se comportó de forma comparable a Cargill Oliggo-Fiber™ LC/HT y Orafiti Raftiline® HP en cuanto a capacidad de emulsionado y de forma superior al aderezo con Cargil Oliggo-Fiber™ F-97 que se separó tras almacenamiento durante la noche.

**b) Pan Blanco**

Tabla 13

Inulina (Fuente)	Inulina de acuerdo con la invención procedente de Alcachofa	-(control)	Fibra™ de Cargill Oliggo LC/HT (Achicoria)	Fibra™ de Cargill Oliggo F97 (Achicoria)	Orafiti® Raftiline HP (Achicoria)
DPw media	56		> 20	70 % es < 10	25
Mono & Disacáridos	< 0,5 %		1,0 %	3,0 %	
Contenido de Humedad	3,40 %			5,00 %	3,00 %
Atributos Organolépticos:					
Aspecto	Similar a control, miga más uniforme, ligeramente más denso	Pan típico; buen oscurecimiento y crecimiento, formación de miga irregular	Similar al control	Sin crecimiento, miga desmoronable	Similar al control, grupos más gruesos
Aroma	Similar al control	Típico	Similar al control	Similar al control	Similar al control
Aceptación frente al Control	Aspecto aceptable		Aceptable	Aceptable	Aceptable
Especificaciones Cuantitativas (pan cocido):					
Contenido de Humedad	32,34 %	33,60 %	31,98 %	31,85 %	32,93 %
Contenido de Grasas	6,79 %	6,57 %	6,68 %	6,87 %	6,51 %
Actividad de Agua	0,910	0,890	0,907	0,906	0,898
Estructura de Miga (visual)	0,5-2,0 mm	0,5-3,0 mm	1,0-2,0 mm	0,5-2,0 mm	0,5-2,0 mm
Facilidad de uso:					
Manipulación	Pulverulento		Ligera forma de polvo	Ligera forma de polvo	Ligera forma de polvo
Mezcla	Sin problema		Sin problema	Sin problema	Sin problema
Solubilidad/Dispersión	Masa ligada		Masa húmeda pero suave	Batido muy húmedo	Masa húmeda pero suave
Cocción	Sin problema			Sin crecimiento	

La inulina de la invención ligó más agua y formó una masa más firme que el control y las inulinas competitivas. Por tanto, la masa que resulta de la inulina de la invención tuvo una capacidad de unión más elevada dando como resultado una masa más compacta y firme con miga más uniforme.

La masa con la inulina de la invención experimentó mejor cocción con buena altura y buen color frente al control. La masa de Cargill Oliggo-Fiber™ LC/HT y el pan fueron similares al Control. La masa de Orafiti Raftiline® HP fue similar al Control, no obstante el pan cocido fue más basto pero con miga más uniforme. El Cargil Oliggo-Fiber™ F-

97 no tuvo propiedades de unión suficientes dando como resultado una masa que no creció o experimentó cocción en buenas condiciones.

5 La inulina de la invención proporcionó el aspecto de miga más uniforme y una textura más densa. El Control y Cargill Oliggo-Fiber™ LC/HT tuvieron un aspecto de miga no uniforme, la masa de Orafit Raffiline® HP tuvo un aspecto de miga basto y Cargill Oliggo-Fiber™ F-97 tuvo un aspecto de miga desmoronable.

10 Como resultado de ello, la inulina de la invención resultó preferida con respecto a las inulinas competitivas en cuanto a aspecto y generación de miga.

15

## REIVINDICACIONES

- 5 1.- Inulina de alcachofa que tiene un grado medio de polimerización DPw de entre 54 y 61, medido por medio de cromatografía de permeabilidad en gel con dispersión de luz y detección de índice de refracción como se describe en los **Métodos Generales** en el párrafo 4.1.
- 10 2.- Inulina de alcachofa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la inulina tiene un grado medio de polimerización DPw de entre 55 y 60, medido por medio de cromatografía de permeabilidad en gel con dispersión de luz y detección de índice de refracción.
- 3.- Inulina de alcachofa de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la inulina tiene un grado medio de polimerización DPw de entre 56 y 57, medido por medio de cromatografía de permeabilidad en gel con dispersión de luz y detección de índice de refracción.
- 15 4.- Inulina de alcachofa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el contenido de glucosa es menor que un 2 %, medido por medio del método descrito en los **Métodos Generales** en el párrafo 3.
- 5.- Inulina de alcachofa de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el contenido de glucosa es menor que un 1 %.
- 20 6.- Inulina de alcachofa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el contenido de fructosa es menor que un 2,5 %, medido por medio del método descrito en **Métodos Generales** en el párrafo 3.
- 25 7.- Inulina de alcachofa de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el contenido de fructosa es menor que un 1,5 %.
- 8.- Inulina de alcachofa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el contenido de fructooligosacáridos con un DP de 3 a 10 es menor que un 3 %, medido por medio del método descrito en **Métodos Generales** en los párrafos 5 y 6.
- 30 9.- Inulina de alcachofa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el contenido de fructooligosacáridos con un DP de 3 a 10 es menor que un 1,5 %.
- 35 10.- Inulina de alcachofa de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el contenido de fructooligosacáridos con un DP de 3 a 10 es menor que un 0,7 %.
- 11.- Inulina de alcachofa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-10, **caracterizada por que** el aumento de viscosidad de una pasta acuosa de la inulina a pH 4 y temperatura ambiente durante un tiempo de almacenamiento de 2 semanas es menor que un 10 % en relación con el valor inicial de viscosidad.
- 40 12.- Inulina de alcachofa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-10, **caracterizada por que** a una concentración de un 30 % en peso/volumen de inulina en agua a 90 °C la viscosidad es de 300-1000 mPa.s a una velocidad de cizallamiento de 20 s<sup>-1</sup> usando un reómetro CVO 120 HR Bohlin/Malvern con un sistema de cono placa como se describe en **Métodos Generales** en el párrafo 13.
- 45 13.- Alimento, que comprende inulina de alcachofa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-12.
- 14.- Alimento de acuerdo con la reivindicación 13, que está seleccionado entre productos lácteos, yogures, helados, licuados de base láctea, cubiertas de tipo lácteo, pudín, batidos lácteos, natillas, quesos, barritas nutritivas, barritas energéticas, barritas de desayuno, dulces, pasteles, galletas saladas, galletas dulces, bizcochos, copos de cereales, mezclas energéticas, mezclas de té helado, licuados de zumo de frutas, bebidas dietéticas, bebidas preparadas, bebidas para la práctica de deporte, bebidas para lograr resistencia, mezclas de bebidas en forma de polvo como complemento, fórmulas para lactantes y niños, zumo de naranja complementado con calcio, pan, croissants, cereales, pastas, pastas para untar en pan, dulces y chocolates que no contienen azúcar, dulces masticables de calcio, productos de carne, mayonesa, aderezos para ensaladas, mantecas de frutos secos, alimentos congelados, salsas, sopas y comidas preparadas.
- 50 55 15.- Alimento de acuerdo con la reivindicación 13 o 14, **caracterizado por que** es un producto de extrusión.
- 60 16.- Complemento dietético que comprende inulina de alcachofa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-12.
- 17.- Preparación cosmética que comprende inulina de alcachofa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-12.
- 18.- Uso de inulina de alcachofa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-12 como aditivo alimentario.
- 65 19.- Uso de inulina de alcachofa de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-12, como aditivo en preparaciones cosméticas.

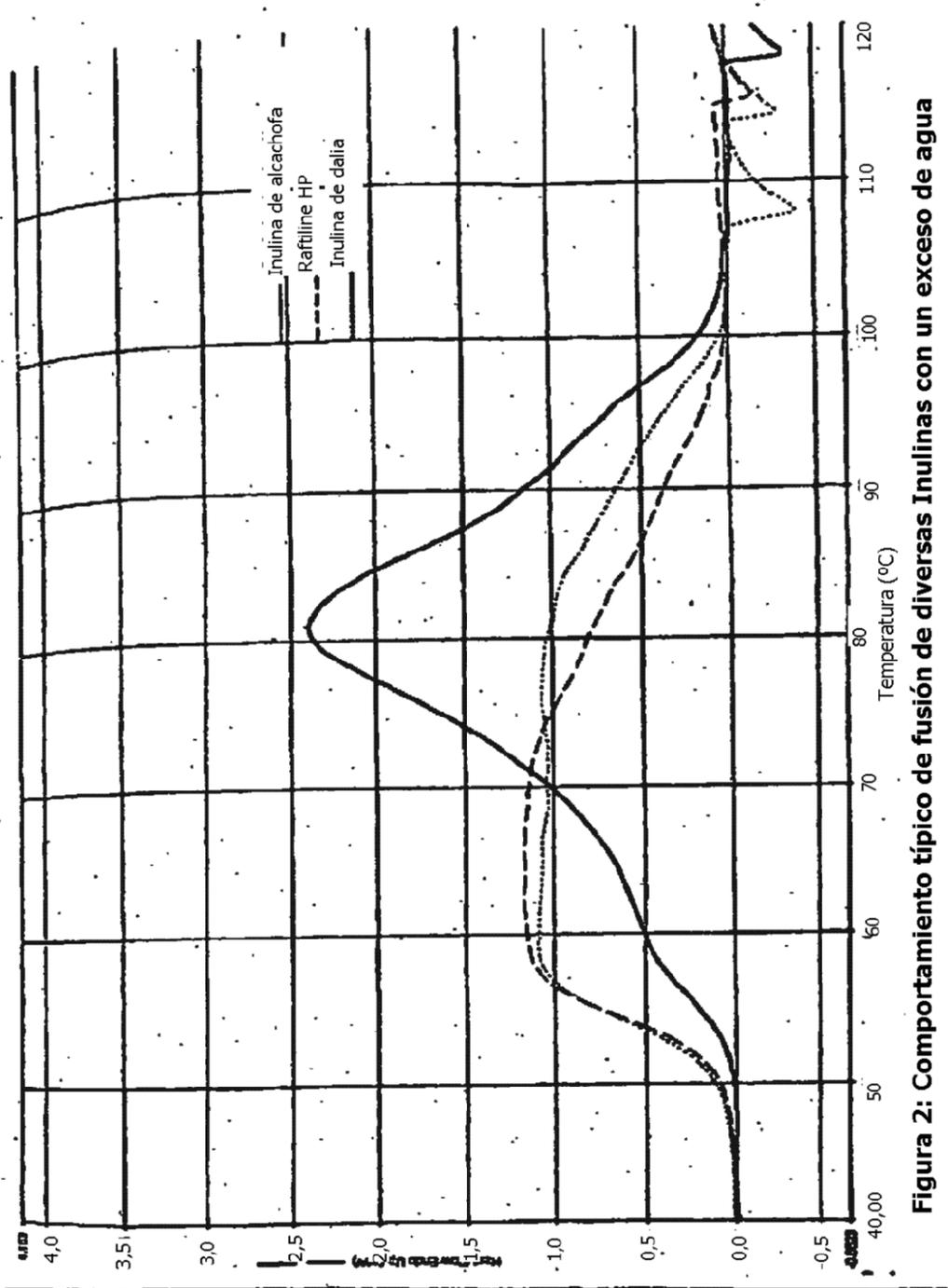


Figura 2: Comportamiento típico de fusión de diversas Inulinas con un exceso de agua