

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 790**

51 Int. Cl.:

A61K 31/702 (2006.01)

A61K 36/48 (2006.01)

A23L 29/206 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A23L 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.03.2010** **PCT/FR2010/000238**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.09.2010** **WO10109093**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.03.2010** **E 10711440 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2018** **EP 2411016**

54 Título: **Extracto hidrosoluble de guisante desfructosilado y su utilización como agente prebiótico**

30 Prioridad:

27.03.2009 FR 0901511

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

17.04.2018

73 Titular/es:

OLYGOSE (100.0%)
Parc Technologique des Rives de l'Oise
60280 Venette, FR

72 Inventor/es:

DELBAERE, FRANCOIS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 663 790 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

Extracto hidrosoluble de guisante desfructosilado y su utilización como agente prebiótico

5 La presente invención se refiere a un extracto hidrosoluble de guisante desfructosilado, sustancialmente libre de proteínas y de péptidos, así como a una composición de oligosacáridos tal como la contenida en dicho extracto. Se refiere también a su procedimiento de preparación, así como a sus utilizaciones como agente prebiótico.

10 Las leguminosas constituyen una materia prima de primera calidad para la industria agroalimenticia, en particular para la producción de proteínas, de almidón, en particular rico en amilosa, de fibras y de derivados del almidón tales como los jarabes de glucosa, la maltodextrina, la dextrosa o la isoglucosa.

15 Estos productos encuentran salida en campos variados, tales como los sectores de los adhesivos o del papel, pero sobre todo en el campo alimenticio, en el que el valor nutricional de las leguminosas, tanto en la alimentación humana como animal, ya no es necesario demostrarlo. Entre estas, las leguminosas de granos, tales como la judía, el guisante y el haba, se utilizan así ampliamente utilizadas por su contenido en energía y en proteínas. Los granos de guisantes seco son, en efecto, ricos en glúcidos, formados esencialmente de almidón y también de sacarosa y oligosacáridos, en proteínas (con alto contenido en lisina) y en fibras.

20 En contra de sus beneficios nutricionales, las leguminosas tales como el guisante seco presentan una mala digestibilidad que a menudo requiere ponerlos en remojo en un medio ácido antes de cocerlos y consumirlas. Este inconveniente se atribuye principalmente a su contenido significativo en α -galactosil-oligosacáridos constituidos de unidades D-galactosa, D-flucosa y D-fructosa. En efecto, estos oligosacáridos, que no son digeribles por las enzimas humanas (incapaces de degradar sus enlaces α -1,6-galactosídicos y β -1-4-fructosídicos), se transportan intactos
25 hasta el colon, en el que proporcionan un sustrato para la fermentación de bacterias tales como *Clostridium perfringens*, que provocan fenómenos de flatulencia. Este fenómeno se ha atribuido en particular, según algunos autores, en el caso de las judías (*Phaseolus vulgaris*), al motivo terminal fructosa de la rafinosa que contienen (MYHARA RM *et al.*, Can. Inst. Food Sci. Technol. J., Vol. 21, n° 3, p. 245-250, 1988).

30 Por lo tanto, estos oligosacáridos se eliminan generalmente bien mediante selección agronómica de linajes (en particular de soja o de judía) con contenido reducido en tales oligosacáridos (BURBANO C. *et al.*, J. Sci. Food Agric., Vol. 79, p. 1468-1472, 1999), o bien por separación y eliminación física, o también por hidrólisis enzimática (con la ayuda de una α -galactosidasa) o fermentativa, efectuada en general previamente al consumo de estas leguminosas, pero también por administración de complementos alimenticios constituidos de enzimas destinadas a hidrolizar estos
35 oligosacáridos en compuestos digeribles antes de su llegada al colon (US-5.651.967).

El documento US-4.008.334 propone así un procedimiento para eliminar los carbohidratos solubles de las proteínas vegetales, procedentes en particular de la soja, incluyendo la rafinosa y la estaquiosa, por digestión enzimática con la ayuda de una levadura de panadería. De manera análoga, el documento US-4.216.235 sugiere la utilización de
40 una levadura *Saccharomyces uvarum* para degradar los oligosacáridos de soja, incluyendo la melibiosa y la maninotriosa.

En el caso del guisante, los oligosacáridos se eliminan generalmente durante la transformación de los granos de leguminosas por la industria. Se estima que en la actualidad el volumen de oligosacáridos generados por el refinado
45 del guisante está aumentando altamente y es superior a 25.000 t por año en Europa y en Canadá. A fin de evitar tener que eliminarlos en una planta de depuración, y a pesar de su baja digestibilidad, estos se entregan generalmente a los agricultores para la alimentación del ganado. Esta solución, sin embargo, es costosa en energía ya que, debido a la gran dilución del extracto soluble procedente del refinado, es necesario concentrarlo para asegurar la conservación y permitir su transporte y su utilización por los animales.

50 Por lo tanto, sería interesante poder disponer de un medio que permita valorizar estos sub-productos.

En este contexto, se ha sugerido en el documento US 2004/0198965 utilizar los oligosacáridos, presentes en particular en los granos de soja, para la síntesis de D-galactosa.

55 La invención tiene como objetivo proponer otra utilización de estos sub-productos. Precisamente, el solicitante ha descubierto que una fracción soluble de guisante, sustancialmente libre de proteínas y péptidos y rica en oligosacárido, podía, después de la desfructosilación de los oligosacáridos, aprovecharse útilmente como agente prebiótico.

60 Por "prebiótico" se entiende un componente alimenticio, no digerible, fermentado selectivamente, que induce a unos cambios específicos de la composición y/o de la actividad de la microflora intestinal, confiriendo unos beneficios sobre la salud y el bienestar del hospedante (Gibson GR *et al.*, Nutrition Research Reviews, 17: 259-275, 2004). El prebiótico se puede considerar en particular como un alimento para las bacterias favorables del colon, tales como las bifidobacterias y los lactobacilos, que permiten prevenir los trastornos intestinales, mejorar la absorción de los
65 minerales, modular el metabolismo lipídico, y/o estimular el sistema inmunitario.

Desde que se ha descubierto que era posible modular el equilibrio de la flora intestinal por ingestión de ingredientes alimenticios, se han estudiado numerosos candidatos para la denominación "prebiótico". La mayoría son glúcidos de origen vegetal. Los más conocidos y los mejor caracterizados son los fructanos, polímeros de fructosa, entre los cuales se encuentra la inulina, generalmente extraída de tubérculos de achicoria, pero también de agave, y los fructo-oligosacáridos (FOS) producidos o bien por hidrólisis de inulina, o bien por biosíntesis a partir de sacarosa y de fructosa.

Otros oligosacáridos poseen también unas propiedades prebióticas más o menos establecidas: los galacto-oligosacáridos (GOS) o "trans-galacto-oligosacáridos" (TOS), muy próximos de los compuestos presentes en la leche materna, los oligosacáridos de soja (SOS), los isomalto-oligosacáridos (IMOS), la lactulosa, la rafinosa, los xilo-oligosacáridos, etc.

A pesar de los numerosos trabajos realizados tanto en los prebióticos bien caracterizados (tales como los FOS y GOS) como en un gran número de moléculas candidatas, falta en la actualidad un prebiótico que combina las propiedades siguientes que buscan los productores (potenciales) de alimentos y bebidas con funcionalidad saludable: procedimiento de producción simple y económico, muy buena tolerancia intestinal que permite el uso de concentraciones suficientes para obtener en la práctica los efectos deseados, y estabilidad elevada a los procedimientos de calentamiento y a los medios ácidos típicos de amplios sectores de la industria alimenticia.

Así, las inulinas y FOS presentan una tolerancia intestinal media. Según algunos autores, los síntomas malestar con los FOS aparecen a partir de 2,5 g/día para el 25% de los sujetos, y afectan al 75% de los sujetos a 20 g/día. La tolerancia de las inulinas es comparable a la de las FOS, pero su dosis eficaz para obtener un efecto bifidogénico es más elevada, lo que acentúa el problema de arbitraje entre la dosis mínima para obtener un efecto bifidogénico y dosis máxima para evitar los problemas de tolerancia intestinal. Además, las inulinas y los FOS no son estables a los ácidos y al calor.

No es lo mismo para XOS, rafinosa y SOS que ofrecen además una buena actividad prebiótica. Estos presentan no obstante una tolerancia intestinal muy baja.

Las pirodextrinas, IMOS y polidextrosas, que presentan una buena estabilidad a los ácidos y al calor y una buena tolerancia, presentan, en cambio, una baja eficacia debido a una baja especificidad prebiótica (su estimulación de las bacterias cólicas no está diferenciada) y/o a una baja indigestibilidad.

Por su parte, los GOS presentan una tolerancia intestinal y una estabilidad a la acidez y a los procedimientos elevadas. Se obtienen por reacción de trans-galactosilación (polimerización) a partir de lactosa mediante β -galactosidasas. El rendimiento de reacción es bajo, se ve afectado negativamente por la síntesis de los compuestos buscados (β -GOS), de manera que son necesarias diversas tecnologías de separación, en particular membranas o cromatográficas, sobre el producto de reacción para permitir mantener unas condiciones favorables a la trans-galactosilación y a la obtención de un producto de pureza suficiente para uso prebiótico. Estas tecnologías son costosas y por lo tanto son contrarias a una oferta asequible de los GOS prebióticos.

Esto da como resultado que los prebióticos existentes se utilicen sólo en un número limitado de aplicaciones alimenticias (leches maternizadas en particular) y a concentraciones que no permiten siempre garantizar los efectos teóricamente posibles según la búsqueda *in vitro/in vivo*, incluso clínicas.

Ahora bien, el solicitante ha puesto en evidencia que las mezclas de oligosacáridos presentes en los extractos de guisante desfructosilados permitían obtener el compromiso de las propiedades buscadas para los prebióticos.

La presente invención tiene así por objeto un extracto hidrosoluble de guisante desfructosilado, que contiene menos del 5% en peso, sobre materia seca, de proteínas y de péptidos.

Tiene también por objeto una composición que tiene el perfil de oligosacáridos de estos extractos hidrosolubles de guisante desfructosilado y que contiene, y preferentemente está constituido esencialmente por, melibiosa, maninotriosa y maninotetraosa en una relación en peso maninotetraosa/melibiosa de al menos 1:1 y preferentemente de al menos 4:1, incluso de al menos 5:1 (y como máximo de aproximadamente 10:1, por ejemplo) y/o una relación en peso maninotriosa/maninotetraosa de 0,3:1 a 4:1, preferentemente de 0,8:1 a 1:1.

Tiene también por objeto la utilización no terapéutica como agente prebiótico de un extracto hidrosoluble de guisante desfructosilado, que contiene menos del 5% en peso, sobre materia seca, de proteínas y de péptidos, o bien de la composición antes citada.

Por "esencialmente libre de proteínas y péptidos" se entiende que el extracto hidrosoluble según la invención contiene menos del 5% en peso (sobre materia seca) de tales constituyentes. Estos incluyen, en particular, las albúminas.

El extracto de guisante desfructosilado según la invención se puede obtener por desfructosilación de los oligosacáridos presentes en los solubles de guisante sustancialmente libres de proteínas y de péptidos.

El procedimiento de obtención de este extracto puede comprender, en particular, las etapas siguientes:

- 1- Separación de las proteínas floculables, fibras insolubles y/o almidón del guisante o de una harina de guisante, para obtener un extracto hidrosoluble de guisante,
- 2- Eliminación de los péptidos solubles, en particular de los factores antitripsicos,
- 3- Acción de una invertasa, procedente por ejemplo de *Saccharomyces cerevisiae*, sobre dicho extracto, en condiciones que permiten la desfructosilación de los oligosacáridos presentes en dicho extracto, y
- 4- Recuperación del extracto desfructosilado así obtenido.

La invención tiene por lo tanto también por objeto un procedimiento de preparación de un extracto hidrosoluble de guisante desfructosilado sustancialmente libre de proteínas y de péptidos, que comprende al menos las etapas sucesivas descritas anteriormente.

Por supuesto, este procedimiento puede, como se explica a continuación, comprender otras etapas preliminares, intermedias o subsiguientes a las indicadas anteriormente. Se puede así incluir en particular al menos una etapa de desmineralización (desalado) para disminuir las reacciones de coloración en algunas aplicaciones. Antes de la eliminación de los otros minerales, se aplica ventajosamente una etapa de eliminación de la potasa (por cristalización, por ejemplo), similar a la realizada sobre las vinazas de azúcar. Al ser las sales presentes en los solubles de guisante particularmente ricas en potasio (del orden del 35%), este tratamiento presenta la doble ventaja de disminuir en un 50% aproximadamente el contenido en minerales restantes a eliminar por otras técnicas (en particular resinas intercambiadores de iones) y generar potasa, que constituye un abono de valor elevado, autorizado en cultivo biológico. Este tratamiento consiste generalmente en una acidificación (frecuentemente por H₂SO₄) seguida de una neutralización con amoníaco, recuperándose los cristales por decantación y/o centrifugación. En una variante, se pueden utilizar las técnicas membranarias (en particular la electrodialisis) que permiten optimizar el procedimiento disminuyendo los costes.

Tal procedimiento se realiza generalmente sobre un guisante nativo. El guisante utilizado según la invención puede ser una variedad de guisante liso o rugoso y se selecciona ventajosamente entre los de la especie *Pisum sativum* L., en particular entre las sub-especies: *elatius*, *transcaucasicum* Govorov, *syriacum* Berger, *abyssinicum* Govorov, *asiaticum* Govorov, *sativum* (variedades *Arvense* L., *sativum* o *macrocarpon*, por ejemplo).

Los guisantes pueden previamente limpiarse, clasificarse, pelarse y/o desempolvarse antes de triturarse en una harina que después se pone en suspensión en agua.

La separación de las proteínas floculables del almidón y/o de las fibras insolubles puede realizarse mediante cualquier medio conocido por el experto en la materia y en particular por extracción, centrifugación, decantación, filtración sobre membrana (en particular ultrafiltración) o precipitación isoelectrica de las proteínas o por una combinación de varios de estos medios, eventualmente combinados con una etapa de concentración, por ejemplo por ósmosis inversa y/o evaporación al vacío. Un ejemplo de tal procedimiento de separación se describe en la solicitud WO 2007/017572.

Los solubles de guisantes obtenidos son ricos en péptidos y en oligosacáridos. Estos solubles de guisantes se tratan para separar los péptidos, que presentan un peso molecular superior a 5000 Da, ventajosamente por ultrafiltración y/o nanofiltración. Cabe señalar que la fracción peptídica recuperable está enriquecida en albúmina PA1b (de peso molecular 11.000 Da) cuyas propiedades insecticidas apropiadas para los cereales se describen en la solicitud EP 1 078 085. La recuperación de esta fracción para tal uso no alimenticio constituye, por lo tanto, una ventaja potencial suplementaria de la presente invención.

Al final de esta etapa, se obtiene una fracción hidrosoluble rica en oligosacáridos y sustancialmente libre de proteínas y de péptidos, que puede ventajosamente concentrarse por ósmosis inversa.

La desfructosilación de los oligosacáridos de guisantes residuales contenidos en esta fracción se puede realizar después, de manera continua o secuencial, mediante cualquier procedimiento de hidrólisis ácida, térmica y/o enzimática que permite eliminar la unidad fructosa terminal de los oligosacáridos presentes en los solubles de guisantes, preservando al mismo tiempo sus enlaces α -galactosídicos, y en particular sometiendo a la acción de una enzima o de una levadura (ventajosamente *Saccharomyces cerevisiae*) que presenta una actividad invertasa (o β -fructofuranosidasa). Esta etapa permite transformar respectivamente la rafinosa, la estaquiosa y la verbascosa en melibiosa, maninotriosa y maninotetraosa.

La enzima libre (invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*) se puede utilizar por ejemplo en una cantidad de 200 a 300

UI.mg⁻¹ en seco, a una temperatura de 40 a 50°C, ventajosamente a un pH de 5,0 a 5,4, durante un tiempo que va por ejemplo de 10 a 14h, sobre un permeado concentrado a 100-400 g/l, por ejemplo de aproximadamente 200 g/l, a razón de 50 a 70 UI de enzima por gramo de materia seca del permeado.

La utilización de una levadura, en lugar de una enzima, en este procedimiento de desfructosilación, presenta la ventaja de que la levadura utiliza, y por lo tanto elimina, la fructosa producida por la reacción, lo que permite recuperar directamente (sin separación ulterior) un producto sin azúcar. En el caso en el que el procedimiento según la invención utilice una enzima, este comprenderá, por el contrario, una etapa suplementaria de eliminación de la fructosa.

Este procedimiento presenta unas ventajas medioambientales no despreciables con respecto a los procedimientos de obtención de prebióticos de la técnica anterior, en la medida en la que:

- las materias primas utilizadas son preferentemente unos desechos de la industria agroalimenticia,
- utiliza ventajosamente técnicas de purificación por membrana, que son poco consumidoras de energía,
- permite recurrir a biotecnologías naturales, utilizando unos microorganismos tradicionales no modificados.

El extracto soluble de guisante desfructosilado obtenido se puede utilizar en forma líquida o eventualmente en forma pulverulenta después de deshidratarse, en particular por atomización o liofilización. Se prefiere su uso en forma líquida, ya que gracias a su bajo peso molecular medio y a su polidispersibilidad, el producto ofrece una baja viscosidad, no genera problemas de cristalización y ofrece una buena estabilidad microbiológica.

Se ha demostrado que el perfil de oligosacáridos del guisante desfructosilado era particularmente ventajoso en el plano de la eficacia prebiótica buscada y de su tolerancia, con respecto a mezclas de oligosacáridos procedentes de otras leguminosas desfructosiladas, tales como soja o judías. En particular, el efecto laxante del guisante es inferior al de la soja, y presenta unos efectos prebióticos no solamente en la entrada del colon, sino también en el colon proximal y medio. El procedimiento de desfructosilación es además menos complejo y costoso en el caso del guisante que en el de otras leguminosas tales como la soja y la judía, en la medida en la que no necesita etapa de separación de la sacarosa, ni desmineralización, que es por el contrario indispensable en el caso de la soja, cuyos solubles son muy ricos en sales minerales.

Además, debido a la eliminación de la fructosa, el extracto de guisante desfructosilado según la invención es hipocariogénico y presenta un bajo valor calórico.

El extracto de guisante desfructosilado según la invención, y las composiciones análogas, constituyen por lo tanto un ingrediente prebiótico de buena calidad, para obtener al menos uno de los beneficios siguientes: modificación de la composición bacteriana del colon, estimulación de las fibrobacterias y lactobacilos, disminución de la cantidad relativa de bacterias nefastas y gérmenes patógenos tales como *Clostridium*, *E. coli*, disminución del pH luminal, aumento de la absorción mineral, en particular del calcio, estimulación de las enzimas bacterianas destoxificantes, represión de las enzimas bacterianas tóxicas, insolubilización de las sales biliares que favorecen su excreción, inhibición de la conversión de los ácidos biliares, disminución de la producción de compuestos nefastos tales como fenoles e indoles, disminución del estreñimiento, reducción del riesgo de diarreas infecciosas, reducción de enfermedades inflamatorias intestinales, estimulación de la producción de ácidos grasos de cadenas cortas, estimulación de la apoptosis, prevención del cáncer de colon, refuerzo de la barrera intestinal, disminución de la translocación bacteriana y/o de toxinas bacterianas, estimulación de la secreción de hormonas de saciedad, disminución del porcentaje de colesterol, reducción de peso, disminución del aumento de peso, disminución de la toma alimenticia, reducción de la adipogénesis y/o reducción de los síntomas de desajustes metabólicos.

Por lo tanto, se utilizan ventajosamente para estos fines, o para la fabricación de una composición destinada a obtener uno al menos de los beneficios antes citados.

Por otro lado, debido a su simplicidad de obtención y de su bajo coste de fabricación, el extracto de guisante desfructosilado según la invención es muy conveniente para una utilización en productos de gran consumo. Es particularmente muy adecuado para una utilización en alimentos de larga conservación y bebidas carbonadas con sabor azucarado, teniendo en cuenta su estabilidad al almacenamiento, al calor y a los ácidos.

En estas aplicaciones, la desfructosilación del extracto de guisante se puede efectuar previamente a su utilización en el producto alimenticio o la bebida a los que está destinado conferir unas propiedades prebióticas. En una variante, la desfructosilación se puede realizar durante el tratamiento de preparación y/o durante el almacenamiento (bajo la acción de la acidez o de la actividad invertasa presente en este producto alimenticio o en esta bebida).

La presente invención tiene por lo tanto también por objeto una bebida carbonada que contiene al menos un edulcorante y un extracto hidrosoluble de guisante desfructosilado y/o una composición tal como se ha descrito anteriormente.

Tiene también por objeto un alimento, tal como un alimento de larga duración, un yogur o una leche infantil, que contiene un extracto hidrosoluble de guisante desfructosilado y/o una composición tal como se ha descrito anteriormente.

5 En una variante, el extracto de guisante desfructosilado según la invención, o la composición correspondiente, se puede administrar como complemento nutricional, por ejemplo en forma de jarabe, de cápsula, de comprimido, de polvo para suspensión bebible o cualquier otra forma galénica conveniente para una administración por vía oral.

10 Según un modo de realización de la invención, la bebida, el alimento o el complemento nutricional que contiene el extracto de guisante desfructosilado según la invención, o la composición correspondiente, puede además incluir al menos otro agente prebiótico, en particular procedente de solubles de soja desfructosilados, de haboncillos desfructosilados o de vinazas de remolacha desfructosiladas.

15 La invención se ilustrará ahora mediante los ejemplos no limitativos siguientes.

Ejemplos

Ejemplo 1: preparación de un extracto hidrosoluble de guisante desfructosilado

20 Una fracción hidrosoluble de guisante al 50% en peso de materia seca, obtenida después de la extracción del almidón y de las fibras y coagulación de las proteínas, se diluye al 15% en peso de materia seca y se filtra mediante una membrana de ultrafiltración, con un límite de corte fijado a 5000 Da, para clarificarla y eliminar los péptidos. Esta etapa va seguida de una concentración del permeado por ósmosis inversa, para volverlo a llevar al 20% en peso de materia seca.

25 Paralelamente, se preparan 100 ml de una solución de invertasa a 1 mg/ml, que se lava después también por centrifugación durante 30 minutos. El residuo se recoge con 50 ml de agua. Se mezclan entonces 980 ml de la fracción de guisante con 50 ml de la solución enzimática, en un reactor de doble pared y agitador colocado al baño maría a 50°C. La hidrólisis se controla por determinación de los azúcares reductores con la ayuda de una solución alcalina acuosa de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), a diferentes intervalos de tiempo. Después de al menos 12h de hidrólisis, la enzima se neutraliza, después el producto obtenido se centrifuga y se filtra para obtener una solución límpida que después se concentra por evaporación rotativa al vacío a 70°C, hasta la obtención de un jugo límpido.

35 Ejemplo 2: Estudio de tolerancia digestiva de extracto hidrosoluble de guisante desfructosilado

2.1: Objetivo del estudio

40 El objetivo de este estudio se ha comparado con la tolerancia digestiva del producto procedente de la presente invención (oligosacáridos desfructosilados: OD) con la de dos prebióticos ya presentes en el mercado y con la de un placebo.

45 Este estudio de tolerancia digestiva se ha realizado en Francia sobre 17 personas voluntarias (8 hombres y 9 mujeres) en el sistema doble ciego.

2.2: Protocolo de realización

50 Los voluntarios que han participado en este estudio han consumido, de manera aleatoria, 20g de sustancia activa diluida en zumo de naranja en una toma, estando cada toma espaciada por un tiempo de reposo de 48 horas, para alcanzar cuatro tomas en total.

Los diferentes productos ensayados eran:

- 55 - unos oligosacáridos desfructosilados (OD: producto de la invención),
- unos β -galacto-oligosacáridos (β -HOS),
- unos fructo-oligosacáridos (FOS),
- 60 - sacarosa (placebo).

La tolerancia digestiva se evaluó gracias a un cuestionario que da información sobre la frecuencia (anotada de 1: ningún síntoma a 5: síntomas muy frecuentes) y la intensidad (anotada de 1: ningún síntoma experimentado a 5: síntomas importantes y/o inaceptables) de 6 parámetros diferentes:

- 65 - dolores abdominales,

- hinchazón abdominal,
- ruidos abdominales (borborigmos, gorgoteos, etc.),
- flatulencia,
- náuseas, regurgitación o ardores de estómago,
- necesidad de defecar,

2.3: Resultados y conclusiones del estudio

Los resultados del estudio se presentan en la tabla 1 siguiente, que agrupa la media de las notas obtenidas para cada parámetro tras la evaluación de la tolerancia digestiva de OD, β -GOS y FOS con respecto a la de un placebo.

	Dolores abdominales		Hinchazón abdominal		Ruidos abdominales		Flatulencia		Náuseas		Necesidad de defecar		Nota acumulada
	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	F	I	
placebo	1,1 ^a	1,1 ^a	1,2 ^a	1,2 ^a	1,2 ^a	1,2 ^a	1,9 ^a	1,5 ^a	1,0 ^a	1,0 ^a	1,6 ^a	1,2 ^a	15,1 ^a
OD	1,4 ^a	1,4 ^a	1,9 ^b	1,5 ^{ab}	2,0 ^b	1,8 ^b	3,1 ^b	2,6 ^b	1,2 ^a	1,2 ^a	2,0 ^a	1,8 ^a	21,9 ^b
β -GOS	1,6 ^{ab}	1,5 ^{ab}	1,6 ^{ab}	1,7 ^b	1,8 ^b	1,6 ^{ab}	2,9 ^b	2,5 ^b	1,2 ^a	1,1 ^a	2,1 ^a	1,7 ^a	21,3 ^b
FOS	2,0 ^b	1,9 ^b	2,1 ^b	1,9 ^b	2,1 ^b	2,0 ^b	3,2 ^b	2,7 ^b	1,0 ^a	1,0 ^a	2,1 ^a	2,1 ^a	24,2 ^b

F: frecuencia de los síntomas; I: intensidad de los síntomas.
^{a, b}: los valores de los productos que llevan una letra diferente son significativamente diferentes de los otros valores (p<0,05; ensayo de diferenciación de Duncan)

Como se destaca de la tabla 1, la frecuencia y la gravedad de los síntomas observados durante el consumo de los diferentes productos ensayados han mostrado que estos últimos no inducían a intolerancia digestiva (notas acumuladas aproximadamente iguales a la tercera parte de la nota máxima).

Sin embargo, se han podido mostrar algunas diferencias entre los productos han podido:

- los OD se han tolerado tanto como los β -GOS (producto que presenta la mejor tolerancia entre los prebióticos actualmente en el mercado) con respecto al placebo (que presenta las notas más bajas para el conjunto de los síntomas)

- los OD han mostrado una mejor tolerancia digestiva que los FOS (que sigue siendo el producto peor tolerado con las notas más elevadas para el conjunto de los síntomas).

Este estudio pone así en evidencia la tolerancia digestiva satisfactoria del producto procedente de la invención.

Ejemplo 3: Estudio del efecto bifidógeno del extracto hidrosoluble de guisante desfructosilado

Para evaluar el efecto bifidógeno del extracto según la invención sobre la microflora intestinal, se realiza un estudio nutricional monocéntrico, aleatorizado, frente a placebo, y en sistema doble ciego sobre 36 voluntarios sanos (hombres y mujeres de 20 a 45 años) repartidos en dos grupos iguales, en ambulatorio. El producto según la invención se consume a la dosis de 7g de oligosacáridos (lo que representa el 95% de la materia seca) por día en una toma, mientras que el placebo está constituido de un jarabe de glucosa deshidratado consumido a la misma dosis. La duración del tratamiento es de 3 semanas. Las bifidobacterias se determinan en tiempo real por PCR cuantitativa.

Ejemplo 4: Estudio de estabilidad en medio ácido del extracto hidrosoluble de guisante desfructosilado

La estabilidad en medio ácido del extracto de guisante desfructosilado según la invención se evalúa sobre bebidas de tipo cola sin azúcar cuyo pH es de 2,8. Los ensayos se realizan en comparación con un extracto de guisante idéntico pero no desfructosilado.

Para hacer esto, la mitad de las botellas de cada uno de estos lotes, que contiene 2,48 g del extracto ensayado, se almacena a temperatura ambiente y la otra mitad se almacena a 37°C, durante un mes.

Se extraen unas muestras de cada lote conservado a cada temperatura dos veces por semana. Las muestras se analizan por HPLC a fin de determinar la variación de su concentración en oligosacáridos a lo largo del tiempo y por lo tanto la estabilidad de estos últimos.

REIVINDICACIONES

1. Extracto hidrosoluble de guisante desfructosilado, que contiene menos del 5% en peso, sobre materia seca, de proteínas y de péptidos.
2. Extracto según la reivindicación 1, caracterizado por que se obtiene a partir de guisantes seleccionados entre los de la especie *Pisum sativum* L., en particular entre las subespecies: *elatius*, *transcaucasicum* Govorov, *syriacum* Berger, *abyssinicum* Govorov, *asiaticum* Govorov o *sativum*.
3. Procedimiento de preparación de un extracto hidrosoluble de guisante desfructosilado según una de las reivindicaciones 1 y 2, que comprende al menos las etapas sucesivas de:
 - separación de las proteínas floculables, fibras insolubles y/o almidón de una harina de guisante, para obtener un extracto hidrosoluble de guisante,
 - eliminación de los péptidos solubles, en particular de los factores antitripsicos,
 - realización de la acción de una invertasa, procedente por ejemplo de *Saccharomuces cerevisiae*, sobre dicho extracto, en condiciones que permiten la desfructosilación de los oligosacáridos presentes en dicho extracto, y
 - recuperación del extracto desfructosilado así obtenido.
4. Composición que contiene, y preferentemente que está constituida de, melibiosa, maninotriosa y maninotetraosa en una relación en peso maninotetraosa/melibiosa de al menos 1:1 y preferentemente de al menos 4:1, incluso de al menos 5:1 y/o una relación en peso maninotriosa/maninotetraosa de 0,3:1 a 4:1, preferentemente de 0,8:1 a 1:1.
5. Utilización no terapéutica como agente prebiótico de un extracto hidrosoluble de guisante desfructosilado según una de las reivindicaciones 1 y 2, o de una composición según la reivindicación 4.
6. Extracto hidrosoluble de guisante desfructosilado tal como se ha definido en una de las reivindicaciones 1 y 2, o una composición tal como se define en la reivindicación 4, para su utilización como agente prebiótico.
7. Bebida carbonada que contiene al menos un edulcorante y un extracto hidrosoluble de guisante desfructosilado según una de las reivindicaciones 1 y 2, y/o una composición según la reivindicación 4.
8. Alimento, tal como un alimento de larga conservación, un yogur o una leche infantil, que contiene un extracto hidrosoluble de guisante desfructosilado según una de las reivindicaciones 1 y 2 y/o una composición según la reivindicación 4.