

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 175**

21 Número de solicitud: 201631484

51 Int. Cl.:

**A23G 3/00** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

18.11.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

05.06.2018

Fecha de concesión:

06.03.2019

45 Fecha de publicación de la concesión:

13.03.2019

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2017/070764

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD DE GRANADA (16.5%)  
HOSPITAL REAL. AVDA. DEL HOSPICIO S/N  
18071 GRANADA (Granada) ES;  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (34.0%);  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA (16.5%);  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE (CNRS) (16.5%) y  
UNIVERSITÉ DE POITIERS (16.5%)

72 Inventor/es:

GARCÍA FERNÁNDEZ, José Manuel;  
ATENCIO GENES, Loyda Ester;  
ORTIZ MELLET, Carmen;  
JÉRÔME, François;  
DE OLIVEIRA VIGIER, Karine;  
AUDEMAR, Maite y  
GÁLVEZ PERALTA, Julio Juan

54 Título: **PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE CAMELOS CON ELEVADO CONTENIDO EN OLIGOSACÁRIDOS PREBIÓTICOS**

57 Resumen:

Procedimiento de preparación de caramelos con elevado contenido en oligosacáridos prebióticos.

La presente invención comprende la transformación de azúcares alimentarios que contengan D-fructosa, en caramelos enriquecidos en oligosacáridos con actividad prebiótica mediante el uso de dióxido de carbono gas como catalizador, sólo o en combinación con un ácido alimentario tal como el ácido acético, el ácido cítrico o el ácido fosfórico, en medio homogéneo, mediante un procedimiento que no requiere ninguna etapa de separación ni genera ningún residuo. El caramelo resultante exhibe propiedades prebióticas, favoreciendo el desarrollo de una flora intestinal beneficiosa y un efecto reparador en el colon dañado.

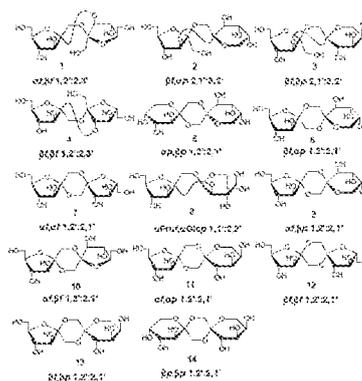


FIG. 1

ES 2 671 175 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP 11/1986.

**PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE CAMELOS CON ELEVADO CONTENIDO  
EN OLIGOSACÁRIDOS PREBIÓTICOS**

**DESCRIPCIÓN**

5

**OBJETO DE LA INVENCION**

La presente invención tiene por objeto un nuevo método de obtención de caramelos ricos en oligosacáridos con actividad prebiótica. Más concretamente, la presente invención comprende la transformación de azúcares alimentarios en caramelos enriquecidos en oligosacáridos con actividad prebiótica mediante el uso de dióxido de carbono como catalizador o el uso conjunto de dióxido de carbono con un ácido alimentario como los ácidos acético, fosfórico o cítrico. Una ventaja importante del método es que hace innecesaria la separación del catalizador al final del proceso y no genera ningún residuo. De acuerdo con la invención, el azúcar alimentario de partida puede ser la D-fructosa, la sacarosa o cualquier oligo- o polisacárido que contenga fructosa como constituyente, incluyendo las fructobiosas como la palatinosa o la leucrosa, los fructooligosacáridos como la 1-kestosa o la nistosa, los fructanos y la inulina. Estos azúcares de partida pueden utilizarse solos o combinados en diferentes proporciones, así como en combinación con otro u otros azúcares de uso alimentario, incluyendo glucosa, galactosa, maltosa, lactosa, rafinosa o ciclodextrinas. Los productos resultantes de la activación de estos azúcares con el dióxido de carbono, obtenidos de acuerdo con esta invención, presentan una elevada proporción de oligosacáridos que contienen fructosa y exhiben propiedades prebióticas, favoreciendo el desarrollo de una flora intestinal beneficiosa, en particular de los géneros *Bifidobacteria* y *Lactobacillus*, y ejerciendo un efecto reparador en el colon dañado.

10

15

20

25

**ESTADO DE LA TECNICA**

Los oligosacáridos que contienen la D-fructosa en su estructura, denominados de manera genérica como fructooligosacáridos, han demostrado poseer propiedades nutricionales beneficiosas para la dieta tanto animal como humana. Estos oligosacáridos modifican la flora intestinal favoreciendo, particularmente, un aumento en la proporción de bacterias de tipo Bifidus en el tracto digestivo. Consecuentemente, los caramelos que contienen una proporción elevada de este tipo de oligosacáridos presentan ventajas nutricionales importantes.

35

Los caramelos son productos que resultan del tratamiento térmico de los azúcares, tales como la sacarosa, la fructosa, la glucosa u otros. Este tratamiento térmico puede efectuarse sobre el azúcar seco o en presencia de agua, en ausencia o en presencia de aditivos ácidos, básicos, sales o compuestos nitrogenados. Su composición ha sido estudiada con anterioridad y consiste, básicamente, en una fracción volátil en la que el compuesto mayoritario es el 2-hidroximetilfurfural (HMF) y en una fracción no volátil constituida por una proporción variable del azúcar de partida o de sus constituyentes monosacarídicos y por oligosacáridos formados a partir de éstos durante el proceso de caramelización. En concreto, para el caso de caramelos industriales preparados a partir de la sacarosa en presencia de un ácido alimentario, los componentes mayoritarios de esta fracción oligosacáridica, que puede alcanzar el 20% del total, presentan estructura de dianhidridos de fructosa. Hasta 13 isómeros diferentes con esta estructura general, resultante de la dimerización de la D-fructosa con formación de dos enlaces glicosídicos recíprocos, han sido identificados en caramelos. Oligómeros superiores, resultantes de la adición de unidades de D-fructosa o de D-glucosa, procedentes de la hidrólisis de la sacarosa durante la caramelización, sobre un núcleo central de dianhidrido de fructosa, así como glucooligosacáridos de reversión, están también presentes en el caramelo. Tanto los dianhidridos de fructosa como sus derivados glicosilados han mostrado poseer propiedades prebióticas.

La preparación de caramelos enriquecidos en dianhidridos de fructosa y fructooligosacáridos derivados de éstos presenta la dificultad asociada al carácter reversible tanto de la reacción de dimerización de la fructosa como de las reacciones de glicosidación, así como a la competencia entre estas reacciones y las reacciones de deshidratación inespecíficas.

En el documento US 5 454 874, Richards ha descrito la preparación de caramelos con un elevado contenido en fructooligosacáridos mediante un procedimiento que consiste en mezclar íntimamente la sacarosa y un ácido alimentario, preferentemente ácido cítrico o ácido tartárico, ambos componentes finamente divididos, y someter la mezcla a un tratamiento térmico (130-160 °C). El producto así obtenido contiene entre un 20 y un 50% de fructooligosacáridos, incluyendo los dianhidridos de fructosa y sus derivados glicosilados, con un rango en el grado de polimerización (DP) que va de 2 a 20.

En el documento WO 96/39444, el mismo autor ha extendido el método anterior a la preparación de caramelos enriquecidos en dianhidridos de fructosa y oligómeros superiores

a partir del polisacárido inulina mediante pirólisis a 150-205 °C. En este caso, la composición del producto resultante ha sido estudiada con detalle. En concreto, se establece que las proporciones relativas de los diferentes dianhidridos de fructosa presentes no se corresponden con la esperable para una distribución termodinámica de los diferentes isómeros.

Un problema inherente a los métodos comentados es que, al ser los ácidos alimentarios ácidos débiles, conducen a conversiones en fructooligosacáridos que, de manera general, son inferiores al 50%. El hecho de que todo el catalizador permanezca en el producto final limita además la proporción en que éste puede utilizarse y va a afectar significativamente las propiedades organolépticas de los caramelos resultantes.

Un problema adicional de los procedimientos anteriores es que los ácidos débiles utilizados como promotores de la caramelización conducen a distribuciones cinéticas de dianhidridos de fructosa que, al no encontrarse en equilibrio termodinámico, pueden evolucionar con el tiempo alterando la composición del producto, más aún si tenemos en cuenta que las reacciones de isomerización y de deshidratación inespecífica están igualmente catalizadas por el medio ácido. De manera general, en una distribución de dianhidridos de fructosa próxima al equilibrio termodinámico el isómero mayoritario contiene una unidad de fructosa en forma de piranosa, mientras que en distribuciones cinéticas el compuesto mayoritario contiene las dos unidades de fructosa en forma de furanosa.

En el documento WO 2008/107506 A1, E. M. Rubio Castillo y otros autores describen la preparación de caramelos enriquecidos en dianhidridos de fructosa y en oligómeros superiores a partir de fructosa o de otros azúcares alimentarios que contiene fructosa, solos o en combinación con otros azúcares alimentarios, utilizando catalizadores sólidos tales como las zeolitas, la bentonita o las resinas ácidas de intercambio iónico en su forma ácida. Estos catalizadores son capaces de promover la formación de caramelos con un alto contenido en dianhidridos de fructosa y dianhidridos de fructosa glicosilados en condiciones heterogéneas, garantizando una distribución termodinámica de los dianhidridos de fructosa. Una vez libre del catalizador, los caramelos obtenidos de acuerdo por este método presentaron propiedades prebióticas. Así, los productos obtenidos de acuerdo con este método favorecieron el desarrollo de una flora intestinal beneficiosa, aumentando en particular la proporción de *Bifidobacteria* y *Lactobacillus* en modelos animales. Además, mostraron un efecto reparador sobre el colon dañado en un modelo animal que se corresponde con enfermedades tales como la enfermedad de Crohn en humanos, por lo que

pueden considerarse como nutracéuticos útiles para el tratamiento de esta patología y otros trastornos relacionados tanto en humanos como en animales.

5 Si bien el método descrito en el documento WO 2008/107506 A1 conduce a productos potencialmente utilizables como ingredientes o aditivos en la elaboración de piensos para animales o en la elaboración de productos específicos destinados a la alimentación humana, tiene el inconveniente de que, al no ser el catalizador un ácido alimentario, requiere un proceso de separación que garantice que no quedan trazas del mismo en el producto final.

10

Existe por tanto una necesidad de métodos de preparación de caramelos con un contenido elevado de oligosacáridos prebióticos derivados de dianhidridos de fructosa que transcurran en condiciones homogéneas, que no impliquen catalizadores que no sean aptos para su consumo, que por tanto no requieran la retirada del catalizador al final del proceso ni generen residuos, y que conduzcan preferentemente a distribuciones bien definidas, próximas al equilibrio termodinámico, de los constituyentes finales.

15

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20 Figura 1. Estructuras de los dianhidridos de fructosa presentes en caramelos de fructosa y sacarosa (salvo en **8**, las dos subunidades monosacáridicas derivan de la D-fructosa; Fru = D-fructosa; Glc = D-glucosa; *f* = furanosa; *p* = piranosa).

Figura 2. Proporciones relativas de los diferentes dianhidridos de fructosa isoméricos obtenidos por caramelización de la D-fructosa (85% peso/volumen en agua) con dióxido de carbono gas (20 bares) a 100 °C durante 48 horas.

25

Figura 3. Proporciones relativas de los diferentes dianhidridos de fructosa isoméricos obtenidos por caramelización de la D-fructosa (85% peso/volumen en agua) con dióxido de carbono gas (20 bares) y ácido cítrico (5% peso/peso relativo a la fructosa inicial) a 90 °C durante 12 horas.

30

Figura 4. Proporciones relativas de los diferentes dianhidridos de fructosa isoméricos obtenidos por caramelización de la D-fructosa (85% peso/volumen en agua) con dióxido de carbono gas (20 bares) y ácido cítrico (10% peso/peso relativo a la fructosa inicial) a 90 °C durante 12 horas.

35

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Un primer objeto de la presente invención es la producción de caramelos con un alto contenido en oligosacáridos prebióticos a partir de azúcares alimentarios que contengan fructosa en su composición, de mezclas de varios de estos azúcares o de mezclas de éstos con otros azúcares, mediante procedimientos que no requieran la separación del catalizador ácido utilizado y que no generen residuos.

Un segundo objeto de la presente invención es un procedimiento que permite maximizar el contenido de oligosacáridos prebióticos del tipo dianhidridos de fructosa y dianhidridos de fructosa glicosilados en caramelos, favoreciendo preferentemente distribuciones isoméricas de dianhidridos de fructosa próximas al equilibrio termodinámico.

De acuerdo con estos objetos de la invención y de otros que se mencionan más adelante, la presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de caramelos con un alto contenido en oligosacáridos prebióticos que incluye:

(a) Un azúcar alimentario como producto de partida, pudiendo ser éste la D-fructosa, la sacarosa o cualquier oligo o polisacárido que contenga fructosa como constituyente, incluyendo las fructobiosas como la palatinosa o la leucrosa, los fructooligosacáridos como la 1-kestosa o la nistosa, los fructanos y la inulina. Estos azúcares de partida pueden utilizarse solos o combinados en diferentes proporciones, así como en combinación con otros u otros azúcares de uso alimentario, incluyendo glucosa, galactosa, maltosa, lactosa, rafinosa o ciclodextrinas.

(b) La utilización de dióxido de carbono como catalizador, sólo o en combinación con un ácido alimentario como el ácido acético, el ácido cítrico o el ácido fosfórico, bajo condiciones de reacción homogéneas.

Preferentemente, de acuerdo con la invención, la caramelización se realiza en presencia de agua, a concentraciones de azúcar total comprendidas entre el 60-95% (peso/volumen) en agua y con una agitación constante eficaz, a temperaturas que oscilan entre 70-140 °C, preferentemente entre 90-115 °C, y tiempos de reacción que pueden ir desde 1 hora a una semana, preferentemente entre 24 y 72 horas cuando el catalizador utilizado es exclusivamente dióxido de carbono y entre 6 y 12 h cuando se utiliza dióxido de carbono en combinación con un ácido alimentario en proporción peso/peso relativa al azúcar

total de partida comprendida entre un 1% y un 20%, preferentemente entre un 5 y un 10%.

La presente invención también proporciona nuevos caramelos con un elevado contenido en dianhidridos de fructosa y dianhidridos de fructosa glicosilados, comprendida  
5 entre el 40-85%, preferentemente entre el 50-80%, con una composición isomérica en dianhidridos de fructosa próxima a la correspondiente para una distribución termodinámica, sin necesidad de retirar el catalizador ácido utilizado como promotor de la caramelización, así como la utilización de estos caramelos como prebióticos que, entre otros efectos favorables, favorecen el desarrollo de una flora intestinal beneficiosa, tales como  
10 *Bifidobacteria* o *Lactobacillus*, y que muestran un efecto reparador sobre lesiones del colon.

#### DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

De acuerdo con la presente invención, se ha encontrado posible preparar caramelos  
15 con un elevado contenido en dianhidridos de fructosa y dianhidridos de fructosa glicosilados a partir de azúcares de uso alimentario, utilizando exclusivamente dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como promotor de caramelización. Estos oligosacáridos presentan propiedades prebióticas, ejerciendo un efecto reparador sobre lesiones del colon y modificando la flora intestinal, aumentando la proporción de bacterias beneficiosas como *Bifidobacteria* o *Lactobacillus* en  
20 el tracto digestivo tanto de animales (aves, cerdos, conejos) como de humanos. Los caramelos con un elevado contenido en estos oligosacáridos presentan, en consecuencia, ventajas nutricionales importantes en comparación con los caramelos convencionales.

El azúcar de partida puede ser la D-fructosa, la sacarosa o cualquier oligo o  
25 polisacárido que contenga fructosa como constituyente, incluyendo las fructobiosas como la palatinosa o la leucrosa, los fructooligosacáridos como la 1-kestosa o la nistosa, los fructanos y la inulina. Estos azúcares de partida pueden utilizarse solos o combinados en diferentes proporciones, así como en combinación con otro u otros azúcares de uso alimentario, incluyendo glucosa, galactosa, maltosa, lactosa, rafinosa o ciclodextrinas. El  
30 caramelo se prepara utilizando una concentración elevada de azúcar total en agua, comprendida entre el 60-95% (peso/volumen) y preferentemente entre el 70-90% (peso/volumen), en recipiente hermético y bajo una presión de dióxido de carbono gas que puede variar entre 1 y 40 bares, preferentemente entre el 10 y 30 bares, y a temperaturas que oscilan entre 70-140 °C, preferentemente entre 90-115 °C.

35

En el caso de que el azúcar de partida sea la D-fructosa, la adición de agua da lugar a disoluciones en todo el rango de concentraciones de la invención. En el caso de otros azúcares como la sacarosa o la inulina, o cuando se parte de mezclas de azúcares, pueden obtenerse inicialmente suspensiones que, durante el proceso de caramelización en presencia del catalizador, conducen finalmente a disoluciones homogéneas. Los tiempos preferidos de caramelización en estas condiciones van de 1 a 168 horas (una semana), preferentemente entre 24 y 72 horas.

De acuerdo con la presente invención, en todos los casos la reacción se efectúa preferentemente bajo una agitación intensa, eficaz y constante, por ejemplo magnética o mecánica, durante el periodo de calentamiento. El producto final, obtenido sin necesidad de realizar ninguna etapa de separación del catalizador y sin que se generen residuos, es un caramelo homogéneo de color ámbar a caoba oscuro.

Según otro procedimiento de la invención, se pueden preparar caramelos con un elevado contenido en dianhidridos de fructosa y dianhidridos de fructosa glicosilados a partir de azúcares de uso alimentario utilizando dióxido de carbono en combinación con un ácido alimentario, preferentemente el ácido acético, el ácido cítrico o el ácido fosfórico, como promotor de caramelización. En este caso los tiempos de caramelización oscilan entre 1 y 48 horas, preferentemente entre 6 y 12 horas.

La proporción de ácido alimentario referido al peso de azúcar inicial total puede variar, estando preferentemente comprendida entre un 1% y un 20%, más preferentemente entre un 5 y un 10%. Si bien la utilización de proporciones mayores del ácido alimentario no presenta problemas técnicos, se prefiere adaptar la proporción de catalizador al mínimo necesario para que se obtengan conversiones en oligosacáridos prebióticos de tipo dianhidridos de fructosa o dianhidridos de fructosa glicosilados superiores al 50% en tiempos inferiores a 12 horas a temperaturas de caramelización de 80-115 °C.

De acuerdo con lo anterior, el procedimiento para preparar un caramelo con un alto contenido en oligosacáridos prebióticos de tipo dianhidridos de fructosa y dianhidridos de fructosa glicosilados según la presente invención consiste, esencialmente, en el calentamiento en un reactor hermético de una disolución o suspensión de los azúcares alimentarios de partida a concentración elevada en agua, bajo una presión de dióxido de carbono gas que puede variar entre 1 y 40 bares, en presencia o no de un ácido alimentario, con agitación eficaz constante y a temperatura comprendida entre 70-140 °C.

Un procedimiento preferido para preparar caramelos ricos en oligosacáridos prebióticos de acuerdo con la invención consiste en el calentamiento de una disolución de fructosa al 70-90% (peso/volumen) en agua a 80-115 °C bajo una presión de dióxido de carbono comprendida entre 10 y 30 bares, por un periodo de 24-72 horas.

5

Otro procedimiento preferido para preparar caramelos ricos en oligosacáridos prebióticos de acuerdo con la invención consiste en el calentamiento de una disolución de fructosa al 70-90% (peso/volumen) en agua conteniendo un ácido alimentario como el ácido acético, el ácido cítrico o el ácido fosfórico en una proporción peso/peso comprendida entre el 5-10% relativa a la fructosa, a 80-115 °C bajo una presión de dióxido de carbono comprendida entre 10 y 30 bares, por un periodo de 6-12 horas.

10

La composición del producto final resultante de la caramelización puede determinarse mediante cromatografía de filtración sobre gel y cromatografía de gases, haciendo uso paralelamente de técnicas como la espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear de protón y carbono-13. El grado de polimerización (DP) de los oligosacáridos prebióticos formados va de 2 a aproximadamente 25, estando generalmente entre 2-12 cuando el azúcar de partida es fructosa y aumentando generalmente a 2-25 cuando el material sacarídico de partida contiene otros azúcares. Los oligosacáridos presentan una amplia variedad de tipos de enlaces glicosídicos.

15

20

Los caramelos preparados de acuerdo con la presente invención contienen proporciones de los azúcares de partida o de sus constituyentes monosacáridos que varían entre el 10-60% y de oligosacáridos prebióticos del tipo dianhidridos de fructosa y dianhidridos de fructosa glicosilados entre el 40-85%. Cuando al azúcar inicial contienen un monosacárido diferente de la fructosa, el caramelo resultante puede contener además cantidades variables de oligosacáridos de reversión reductores resultantes de la autoglicosidación de dicho monosacárido. Por ejemplo, en el caso de caramelos obtenidos a partir de sacarosa se detecta la presencia de glucobiosas y glucooligosacáridos superiores en proporción generalmente inferior al 10%.

25

30

En los caramelos preparados según la presente invención, la fracción disacarídica consiste mayoritariamente en dianhidridos de fructosa, mientras que los oligosacáridos superiores tienen esencialmente estructura de dianhidridos de fructosa glicosilados. La distribución isómerica de los diferentes dianhidridos de fructosa en la fracción disacarídica puede determinarse mediante cromatografía de gases. Puede seguirse para ello el protocolo

35

descrito por Ratsimba et al. en el documento *J. Chromatogr. A.* **1999**, *844*, 283-293. Los cromatogramas obtenidos a partir de muestras de los caramelos de la invención indican la presencia de 13 dianhidridos de fructosa isoméricos. En el caso particular de caramelos obtenidos a partir de sacarosa se identifica adicionalmente en esta fracción un dianhidrido mixto que contiene una subunidad de fructosa y otra de glucosa. Las estructuras de estos dianhidridos se corresponden con las 13 y 14 estructuras identificadas previamente en caramelos industriales o caseros obtenidos por tratamiento térmico de D-fructosa o de sacarosa, respectivamente, en presencia de un ácido alimentario, que se muestran en la Figura 1, a saber:

- 5
- 10
- $\alpha$ -D-fructofuranosa  $\beta$ -D-fructofuranosa 1,2':2,3'-dianhidrido (compuesto nº 1 o DAF 1).
  - $\beta$ -D-fructofuranosa  $\alpha$ -D-fructopiranososa 1,2':2,3'-dianhidrido (compuesto nº 2 o DAF 2).
  - $\beta$ -D-fructofuranosa  $\beta$ -D-fructopiranososa 1,2':2,3'-dianhidrido (compuesto nº 3 o DAF 3).
  - Di- $\beta$ -D-fructofuranosa 1,2':2,3'-dianhidrido (compuesto nº 4 o DAF 4).
  - 15 -  $\alpha$ -D-fructopiranososa  $\beta$ -D-fructopiranososa 1,2':2,1'-dianhidrido (compuesto nº 5 o DAF 5).
  - $\beta$ -D-fructofuranosa  $\alpha$ -D-fructopiranososa 1,2':2,1'-dianhidrido (compuesto nº 6 o DAF 6).
  - Di- $\alpha$ -D-fructofuranosa 1,2':2,1'-dianhidrido (compuesto nº 7 o DAF 7).
  - $\alpha$ -D-fructofuranosa  $\alpha$ -D-glucopiranososa 1,1':2,2'-dianhidrido (compuesto nº 8 o DAF 8).
  - $\alpha$ -D-fructofuranosa  $\beta$ -D-fructopiranososa 1,2':2,1'-dianhidrido (compuesto nº 9 o DAF 9).
  - 20 -  $\alpha$ -D-fructofuranosa  $\beta$ -D-fructofuranosa 1,2':2,1'-dianhidrido (compuesto nº 10 o DAF 10).
  - $\alpha$ -D-fructofuranosa  $\alpha$ -D-fructopiranososa 1,2':2,1'-dianhidrido (compuesto nº 11 o DAF 11).
  - Di- $\beta$ -D-fructofuranosa 1,2':2,1'-dianhidrido (compuesto nº 12 o DAF 12).
  - $\beta$ -D-fructofuranosa  $\beta$ -D-fructopiranososa 1,2':2,1'-dianhidrido (compuesto nº 13 o DAF 13).
  - Di- $\beta$ -D-fructopiranososa 1,2':2,1'-dianhidrido (compuesto nº 14 o DAF 14).

25

Una característica importante de la invención es que las proporciones relativas de los diferentes isómeros de dianhidridos de fructosa en los caramelos resultantes corresponden, preferentemente, a distribuciones próximas al equilibrio termodinámico. Así, a diferencia de lo que se observa en caramelos obtenidos mediante procedimientos que utilizan

30 exclusivamente ácidos alimentarios como catalizadores, en los que el isómero mayoritario es siempre un isómero difructofuranosídico, preferentemente los compuestos nº 1, 4 ó 10, el isómero mayoritario en los caramelos obtenidos de acuerdo con la presente invención es el compuesto nº 9, en el que una de las dos subunidades de fructosa se encuentra en forma de piranososa y que es el isómero termodinámicamente más estable.

35

Una característica importante de la invención es que los oligosacáridos prebióticos con estructura de dianhidridos de fructosa y dianhidridos de fructosa glicosilados que constituyen los componentes mayoritarios de los caramelos objeto de la misma no son tóxicos y no son hidrolizables o lo son sólo parcialmente durante la digestión. En este último caso, los productos resultantes de la hidrólisis son azúcares alimentarios y, consecuentemente, carentes de toxicidad. Los caramelos con elevado contenido en dianhidridos de fructosa y dianhidridos de fructosa glicosilados de la presente invención exhiben, por tanto, un poder calórico reducido en comparación con otros caramelos de diferente composición.

10

Los caramelos preparados según la presente invención, presentan importantes ventajas nutricionales, derivadas de su elevado contenido en oligosacáridos prebióticos, en concreto de dianhidridos de fructosa y dianhidridos de fructosa glicosilados y de la distribución isómerica próxima al equilibrio termodinámico de los mismos, en comparación con los caramelos de diferente composición preparados con anterioridad. Estas características son análogas a las descritas para el caramelo obtenido utilizando catalizadores sólidos tales como las zeolitas, la bentonita o las resinas ácidas de intercambio iónico en su forma ácida en el documento WO 2008/107506 A1, pero con la ventaja importante de que el procedimiento descrito en la presente invención no requiere ninguna etapa de separación del catalizador ni genera residuos. De hecho, en ensayos realizados sobre ratas Wistar a las que se les ha inducido una lesión en el colon para generar un modelo análogo a la enfermedad de Crown en humanos, los caramelos de la invención han demostrado tener un efecto reparador importante, análogo al descrito para los caramelos preparados según el procedimiento descrito en el documento WO 2008/107506 A1, al mismo tiempo que favorecen el desarrollo de una flora intestinal beneficiosa de tipo *Bifidus* y *Lactobacillus* en el tracto intestinal.

15

20

25

30

35

Los caramelos preparados de acuerdo con la presente invención tienen numerosas aplicaciones y pueden, de manera general, utilizarse como sustituto de cualquier otro caramelo. El caramelo obtenido puede mezclarse con azúcares adicionales, vitaminas, aromas, colorantes, con otros prebióticos, probióticos o cualquier otra sustancia necesaria para la elaboración de un producto comestible determinado. El caramelo obtenido puede también decolorarse, por ejemplo mediante el tratamiento de una disolución acuosa del mismo con carbón vegetal o con una resina adecuada para la adsorción de productos coloreados, como por ejemplo la resina Lewatit® S6823 A, sin que este proceso afecte a la composición en dianhidridos de fructosa y dianhidridos de fructosa glicosilados o a la

proporción relativa de los diferentes dianhidridos de fructosa isoméricos.

Los caramelos con elevado contenido de dianhidridos de fructosa y dianhidridos de fructosa glicosilados de la invención poseen propiedades especialmente beneficiosas para el tratamiento y la prevención de patologías tanto en animales como en humanos, particularmente patologías que afectan al aparato digestivo y más particularmente la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, el cáncer de colon o enfermedades infecciosas, por ejemplo las provocadas por *E.coli* o *Salmonella*. Pueden también utilizarse en la preparación de nutracéuticos específicos para la prevención y tratamiento de estas patologías. De manera general, los caramelos de la invención pueden utilizarse como sustituto de otros prebióticos en la elaboración de productos destinados a la alimentación o a la salud y bienestar en animales y humanos. La proporción final de caramelo prebiótico de la invención en un producto capaz de producir un efecto prebiótico destinado a cualquiera de estos fines puede variar en un amplio rango, estando preferentemente comprendida entre el 1 y el 30%.

#### MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

Las características y ventajas de la invención son más evidentes a la vista de los ejemplos siguientes, que tienen un carácter ilustrativo y no limitativo.

##### Ejemplo 1:

Una disolución al 85% (peso/volumen) de fructosa (30 g) en agua (5 mL) se introdujo en un reactor de acero inoxidable y se inyectó dióxido de carbono gas hasta alcanzar una presión de 20 bares. La mezcla homogénea se calentó a 100 °C en el reactor cerrado con agitación magnética constante durante 48 horas, al cabo de las cuales dejó enfriar a temperatura ambiente y se despresurizó el reactor hasta presión atmosférica. El producto obtenido de esta manera es un caramelo de color caoba.

El análisis del caramelo mediante cromatografía de filtración sobre gel, utilizando Sephadex G10 como fase estacionaria, y por cromatografía de gases utilizando fenil  $\beta$ -D-glucopiranosido como estándar interno, siguiendo el protocolo descrito en el documento *J. Chromatogr. A. 1999, 844, 283-293*, indica la presencia de fructosa (28%), dianhidridos de fructosa (47%) y fructooligosacáridos superiores de DP 3-12 (22%). El resto (3%) está constituido esencialmente por 2-hidroximetilfurfural (HMF) y melanoidinas. Las proporciones

relativas de los diferentes dianhidridos de fructosa isoméricos, determinadas a partir del correspondiente cromatograma de gases, se recogen en la Figura 2.

5 La hidrólisis ácida suave de una alícuota del caramelo obtenido o de la fracción conteniendo los oligosacáridos de DP 3-12 condujo exclusivamente a fructosa y dianhidridos de fructosa, lo que indica que estos oligosacáridos tienen una estructura de dianhidridos de fructosa fructosilados. El perfil de distribución isomérica de los dianhidridos de fructosa resultantes de la hidrólisis es prácticamente idéntico al de la fracción de DAFs en el caramelo inicial mostrado en la Figura 2.

10

**Ejemplo 2:**

El procedimiento del ejemplo 1 se repitió exactamente, excepto que se utilizó una disolución al 85% (peso/volumen) de fructosa (180 g) en agua (30 mL). El producto es un  
15 caramelo de color caoba que contiene fructosa (31%), dianhidridos de fructosa (40%) y fructooligosacáridos superiores de DP 3-10 (27%). El resto (2%) está constituido esencialmente por 2-hidroximetilfurfural (HMF) y melanoidinas. El perfil de distribución de isómeros de dianhidridos de fructosa es prácticamente idéntico al del ejemplo 1.

20 **Ejemplo 3:**

El procedimiento del ejemplo 1 se repitió exactamente, excepto que se utilizó una presión de dióxido de carbono gas de 1.2 bares y se calentó a 90 °C durante 72 horas. El producto es un caramelo de color caoba oscuro que contiene fructosa (37%), dianhidridos  
25 de fructosa (45%) y fructooligosacáridos superiores de DP 3-10 (16%). El resto (2%) está constituido esencialmente por 2-hidroximetilfurfural (HMF) y melanoidinas. El perfil de distribución de isómeros de dianhidridos de fructosa es prácticamente idéntico al del ejemplo 1.

30 **Ejemplo 4:**

Una disolución al 85% (peso/volumen) de fructosa (30 g) en agua (5 mL) conteniendo un 5% (peso/peso) de ácido cítrico (1.5 g) relativo a la fructosa de partida se introdujo en un reactor de acero inoxidable y se inyectó dióxido de carbono gas hasta alcanzar una presión  
35 de 20 bares. La mezcla homogénea se calentó a 90 °C en el reactor cerrado con agitación magnética constante durante 12 horas, al cabo de las cuales dejó enfriar a temperatura

ambiente y se despresurizó el reactor hasta presión atmosférica. El producto obtenido de esta manera es un caramelo de color caoba que contiene fructosa (38%), dianhidridos de fructosa (47%) y fructooligosacáridos superiores de DP 3-10 (9%). El resto (6%) está constituido esencialmente por ácido cítrico, 2-hidroxiacetilfurfural (HMF) y melanoidinas. Las proporciones relativas de los diferentes dianhidridos de fructosa isoméricos, determinadas a partir del correspondiente cromatograma de gases, se recogen en la Figura 3.

#### **Ejemplo 5:**

El procedimiento del ejemplo 4 se repitió exactamente, salvo que se utilizó una proporción del 10% (peso/peso) de ácido cítrico (3.0 g) relativo a la fructosa de partida. El producto es un caramelo de color caoba oscuro que contiene fructosa (31%), dianhidridos de fructosa (48%) y fructooligosacáridos superiores de DP 3-10 (9%). El resto (11%) está constituido esencialmente por ácido cítrico, 2-hidroxiacetilfurfural (HMF) y melanoidinas. Las proporciones relativas de los diferentes dianhidridos de fructosa isoméricos, determinadas a partir del correspondiente cromatograma de gases, se recogen en la Figura 4.

#### **Ejemplo 6:**

Una disolución al 85% (peso/volumen) de palatinosa (30 g) en agua (5 mL) se introdujo en un reactor de acero inoxidable y se inyectó dióxido de carbono gas hasta alcanzar una presión de 20 bares. La mezcla homogénea se calentó a 90 °C en el reactor cerrado con agitación magnética constante durante 24 horas, al cabo de las cuales dejó enfriar a temperatura ambiente y se despresurizó el reactor hasta presión atmosférica. El producto obtenido de esta manera es un caramelo de color caoba que contiene fructosa (0.5%), glucosa (0.6%), palatinosa (54%) y glicosil dianhidridos de fructosa superiores de DP 3-12 (43%). El resto (1.9%) está constituido esencialmente por 2-hidroxiacetilfurfural (HMF) o derivados glicosilados del HMF y melanoidinas.

#### **Ejemplo 7:**

El procedimiento del ejemplo 6 se repitió exactamente, salvo que el tiempo de reacción se prolongó durante 72 horas. El producto obtenido de esta manera es un caramelo de color caoba oscuro que contiene fructosa (1%), glucosa (2%), palatinosa (35%) y glicosil dianhidridos de fructosa superiores de DP 3-16 (55%). El resto (8%) está constituido esencialmente por 2-hidroxiacetilfurfural (HMF), derivados glicosilados del HMF y

melanoidinas.

**Ejemplo 8:**

5 Valoración in vivo del efecto antiinflamatorio intestinal de los caramelos obtenidos de acuerdo con los ejemplos 1 y 2 en la colitis experimental inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS) en ratas.

10 El efecto antiinflamatorio de los caramelos enriquecidos en dianhidridos de fructosa y dianhidridos de fructosa glicosilados de la presente invención obtenidos de acuerdo con los ejemplos 1 y 2 se evaluó in vivo en ratas en un modelo de colitis experimental siguiendo el procedimiento descrito en el documento WO 2008/107506 A1 y en comparación con el caramelo obtenido en las condiciones heterogéneas detalladas en el ejemplo 3 de dicho documento. Los animales de experimentación que se utilizaron en estas experiencias son  
15 ratas Wistar, de 200-230 g de peso, suministradas por el Servicio de Animales de Experimentación de la Universidad de Granada. El modelo de inflamación experimental seleccionado consiste en la administración en el agua de bebida de DSS al 5% durante una semana. Este modelo se caracteriza por generar un proceso inflamatorio en el colon de la rata, con numerosas similitudes con la enfermedad inflamatoria intestinal en humanos  
20 (enfermedad de Crohn), en cuanto al daño tisular que genera y a la producción de mediadores involucrados en la respuesta inflamatoria. Para llevar a cabo estos estudios, distintos grupos de animales (n = 10) recibieron la dieta suplementada con la proporción adecuada de los caramelos prebióticos de los ejemplos. Este tratamiento se inició dos semanas antes de iniciar la incorporación del DSS en el agua de bebida y se mantuvo hasta  
25 una semana después, momento en el que se procedió al sacrificio de los animales y se valoró el daño colónico. Para poder valorar la efectividad del tratamiento prebiótico se utilizaron grupos control de animales colíticos (n = 10) que recibieron la dieta estándar conteniendo celulosa en lugar del caramelo prebiótico. Adicionalmente se utilizó un grupo blanco (n = 10) que no recibió tratamiento dietético alguno y que no se sometió a inflamación  
30 intestinal.

La valoración macroscópica del proceso inflamatorio intestinal se realizó mediante la determinación de la relación peso/longitud del colon (índice de daño macroscópico, IDM). Para la relación peso/longitud del colon en animales de control que no han sufrido lesión  
35 alguna el IDM se define como 0.0, en tanto que este índice alcanza un valor medio de 7.5 para el grupo de control que se trató con DSS y que no recibió los caramelos prebióticos en

su dieta. En animales que recibieron los caramelos de los ejemplos 1 y 2, este valor descendió a 5.5 y 5.3, respectivamente, prácticamente idéntico al alcanzado con el caramelo prebiótico obtenido en condiciones heterogéneas según el ejemplo 3 del documento WO 2008/107506 A1. Dado lo agresivo del modelo utilizado, los datos recogidos en este ejemplo indican un poder de protección/regeneración frente a la inflamación del colon muy significativo y completamente análogo al descrito para caramelos enriquecidos en dihidratos de fructosa y dihidratos de fructosa glicosilados obtenidos en condiciones heterogéneas, con la ventaja importante de no necesitar retirar el catalizador al final del proceso de preparación y de no generar residuos.

10

**Ejemplo 11:**

Valoración in vivo del efecto de los caramelos de los ejemplos 1 y 2 en la flora bacteriana en ratas.

15

Sobre los animales sometidos a tratamiento con DSS y a los que se suministra una dieta que contiene los caramelos prebióticos de los ejemplos 1 y 2, así como sobre los correspondientes grupos de control, se efectuó el recuento de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. La población de estas bacterias desciende en los animales tratados con DSS a un 30 y un 20%, respectivamente, de los valores observados en animales sanos no tratados. En el caso de animales para los que se ha incluido en su alimentación los caramelos de los ejemplos 1 y 2, se observa una recuperación muy significativa de las poblaciones correspondientes, alcanzando valores próximos a los iniciales.

20

**REIVINDICACIONES**

5 1.- Procedimiento para la preparación de caramelos con un alto contenido en oligosacáridos prebióticos a partir de:

(a) al menos un material sacarídico de partida que contiene D-fructosa, y  
(b) dióxido de carbono gas como catalizador ácido promotor de la caramelización, caracterizado porque el proceso de caramelización comprende el calentamiento de una disolución del material sacarídico de partida en agua en recipiente hermético y bajo una presión de dióxido de carbono comprendida entre 1 y 40 bares.

15 2.- Procedimiento para la preparación de caramelos con un alto contenido en oligosacáridos prebióticos según la reivindicación 1 donde los oligosacáridos prebióticos son del tipo dianhidridos de fructosa y dianhidridos de fructosa glicosilados y el material sacarídico de partida es la D-fructosa, la sacarosa o cualquier oligo- o polisacárido que contenga fructosa como constituyente, particularmente las fructobiosas como la palatinosa o la leucrosa, los fructooligosacáridos como la 1-kestosa o la nistosa, los fructanos y la inulina.

20 3.- Procedimiento para la preparación de caramelos con un alto contenido en oligosacáridos prebióticos según las reivindicaciones 1 o 2, donde el material sacarídico de partida que contiene D-fructosa se utiliza combinado en proporciones comprendidas entre 1:10 y 10:1 con al menos otro azúcar de uso alimentario, particularmente glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa, rafinosa o ciclodextrinas.

25 4.- Procedimiento para la preparación de caramelos con un alto contenido en oligosacáridos prebióticos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde se adiciona a la mezcla de reacción un ácido alimentario que se selecciona entre el ácido acético, el ácido cítrico y el ácido fosfórico en una proporción peso/peso relativa al material sacarídico de partida comprendida entre un 1% y un 20%.

30 5.- Procedimiento para la preparación de caramelos con un alto contenido en oligosacáridos prebióticos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 caracterizado porque la concentración del material sacarídico de partida en agua está comprendida entre el 60 y el 95% (peso/volumen)

- 6.- Procedimiento para la preparación de caramelos con un alto contenido en oligosacáridos prebióticos según la reivindicación 5, caracterizado porque la concentración del material sacarídico de partida en agua está comprendida entre el 70 y el 90% (peso/volumen).
- 5 7.- Procedimiento para la preparación de caramelos con un alto contenido en oligosacáridos prebióticos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la temperatura a la que se realiza el calentamiento está comprendida entre 70 y 140 °C.
- 8.- Procedimiento para la preparación de caramelos con un alto contenido en oligosacáridos prebióticos según la reivindicación 7, caracterizado porque la temperatura a la que se realiza el calentamiento está comprendida entre 80 y 115 °C.
- 10 9.- Procedimiento para la preparación de caramelos con un alto contenido en oligosacáridos prebióticos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el calentamiento transcurre durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 168 horas.
- 15 10.- Procedimiento para la preparación de caramelos con un alto contenido en oligosacáridos prebióticos según la reivindicación 9, caracterizado porque el calentamiento transcurre durante un periodo de tiempo comprendido entre 24 y 72 horas.
- 20 11.- Procedimiento para la preparación de caramelos con un alto contenido en oligosacáridos prebióticos según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, caracterizado porque al adicionar un ácido alimentario el calentamiento transcurre durante un periodo de tiempo comprendido entre 6 y 12 horas.
- 25 12.- Caramelo con un alto contenido en oligosacáridos prebióticos obtenido mediante un procedimiento según se define en las reivindicaciones 1 a 11, caracterizado porque contiene al menos un 40% de oligosacáridos prebióticos del tipo dianhidridos de fructosa y dianhidridos de fructosa glicosilados con grado de polimerización comprendido entre 3 y 25 y con una distribución isomérica de dianhidridos de fructosa, en la que el isómero mayoritario es el  $\alpha$ -D-fructofuranosa  $\beta$ -D-fructopiranososa 1,2':2,1'-dianhidrido.
- 30 13.- Caramelo según la reivindicación 12, caracterizado porque contiene adicionalmente:  
a) al menos otro azúcar diferente de la fructosa, particularmente glucosa, galactosa, sacarosa, maltosa, lactosa, rafinosa, ciclodextrinas u oligosacáridos de reversión formados a partir de estos azúcares.
- 35

b) al menos un componente seleccionado de entre las familias de las vitaminas, los aromatizantes, los colorantes, los prebióticos o los probióticos.

5 14.- Uso de caramelo, según se define en las reivindicaciones 12 y 13, para elaborar un producto destinado a la alimentación animal o humana, encontrándose en proporción comprendida entre el 1 y el 30%, capaz de inducir un aumento de *Bifidobacteria* o *Lactobacillus* en el tracto intestinal.

10 15.- Uso de caramelo, según se define en las reivindicaciones 12 y 13, para la elaboración de producto farmacéutico destinado a la prevención o al tratamiento de patologías, en animales o en humanos, encontrándose en proporción en peso comprendida preferentemente entre el 1 y el 30%

15 16.- Uso de caramelo, según se define en las reivindicaciones 12 y 13, para la elaboración de producto farmacéutico destinado a la prevención o al tratamiento de patologías que afectan al aparato digestivo, en animales o en humanos, encontrándose en proporción en peso comprendida preferentemente entre el 1 y el 30%.

20 17.- Uso según la reivindicación 16, donde las patologías del aparato digestivo son la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa, el cáncer de colon o enfermedades infecciosas.

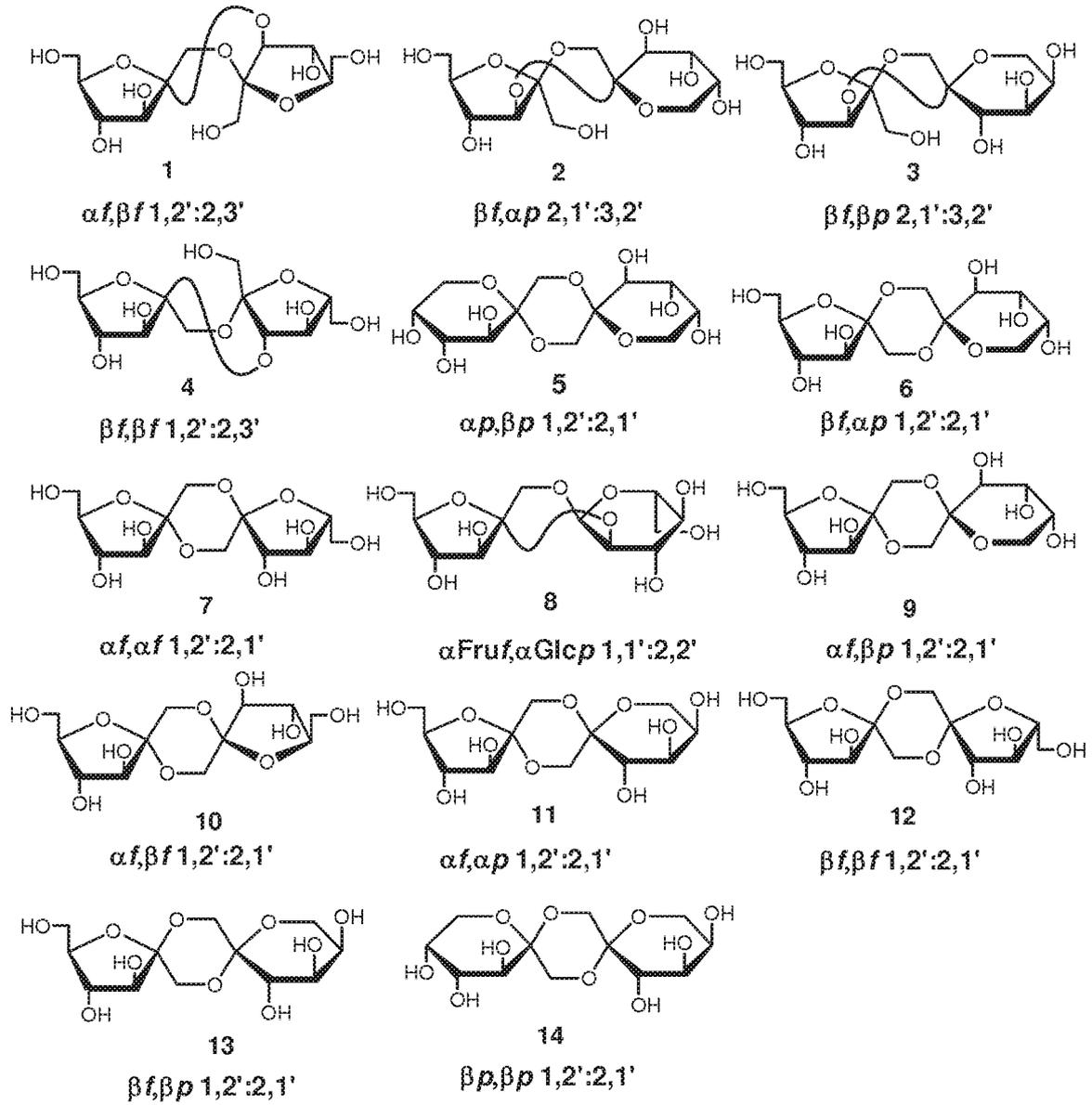


FIG.1

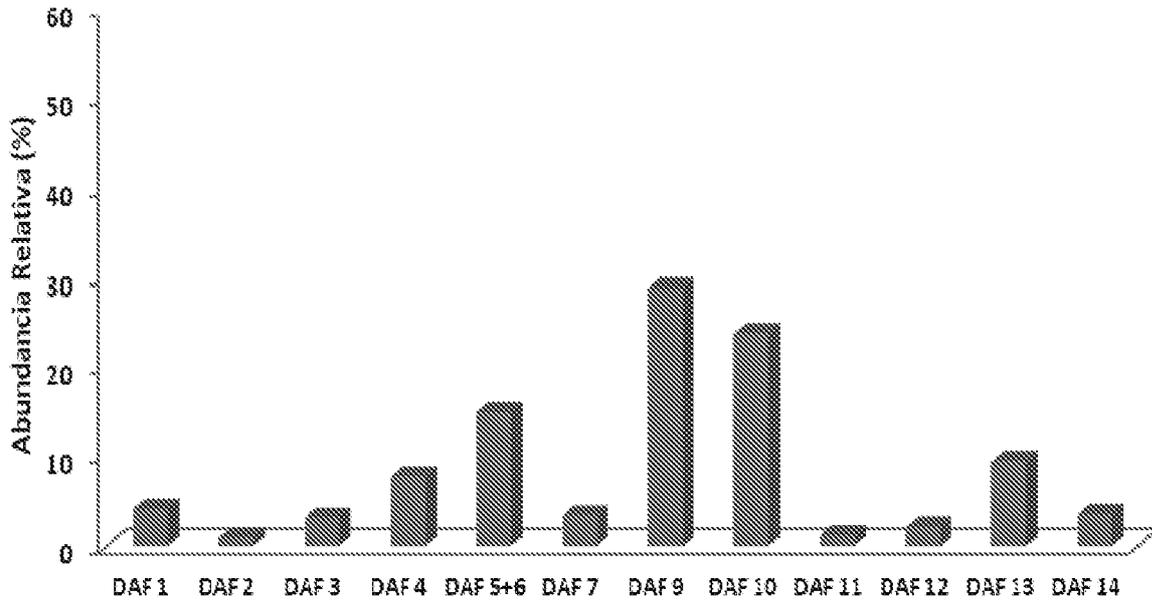


FIG.2

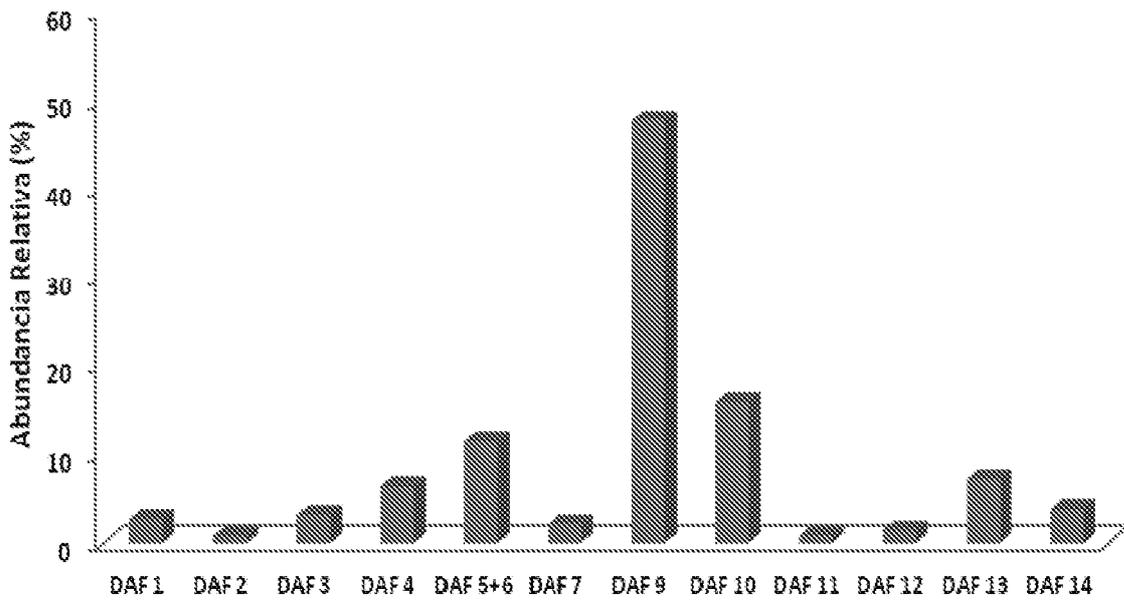


FIG.3

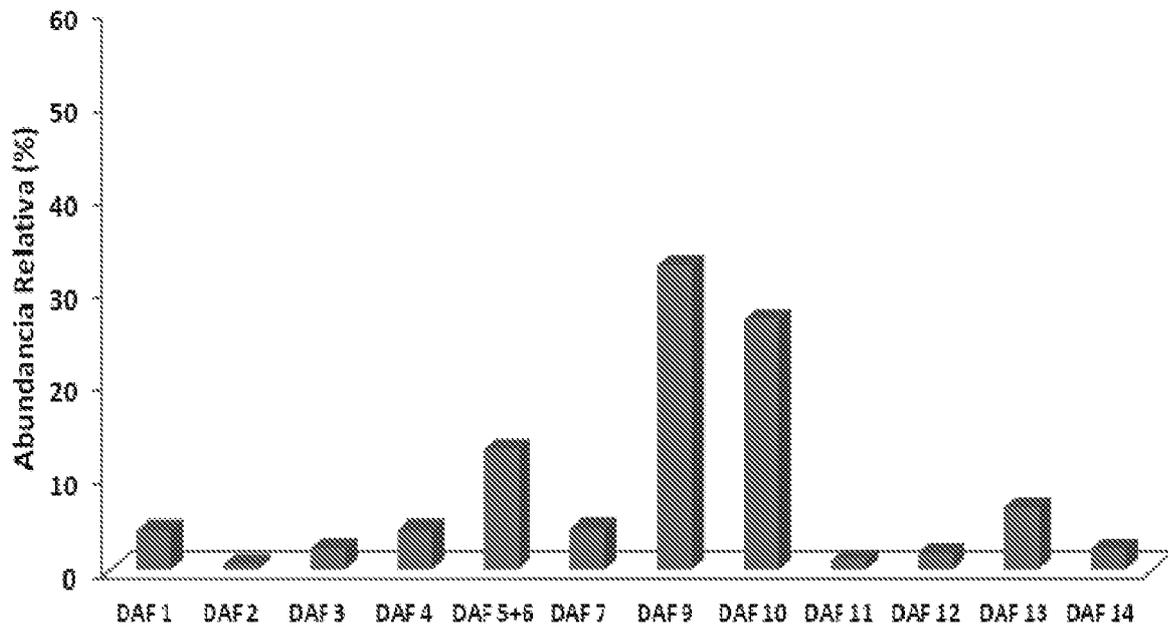


FIG.4