

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 982 721**

51 Int. Cl.:

A23L 2/52 (2006.01)
A61K 39/39 (2006.01)
A61K 31/175 (2006.01)
A61K 36/23 (2006.01)
A23L 29/231 (2006.01)
A23L 33/105 (2006.01)
A61K 31/23 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.10.2018** **PCT/EP2018/079058**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.05.2019** **WO19081525**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2018** **E 18789159 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2024** **EP 3700350**

54 Título: **Método de producción de un aislado de polisacárido péctico enriquecido en ramnogalacturonano-I**

30 Prioridad:

23.10.2017 EP 17197706
04.12.2017 WO PCT/NL2017/050807
07.09.2018 WO PCT/EP2018/074127

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.10.2024

73 Titular/es:

NUTRILEADS B.V. (100.0%)
Bronland 12-N
6708 WH Wageningen, NL

72 Inventor/es:

ALBERS, RUUD y
TZOUMAKI, MARIA

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 982 721 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

Método de producción de un aislado de polisacárido péctico enriquecido en ramnogalacturonano-I

5 CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a un método para producir un aislado polisacárido péctico que está enriquecido en polisacárido ramnogalacturonano-I (RG-I). Más particularmente, la invención se refiere a un método para producir tal aislado de polisacárido mediante hidrólisis enzimática de un sustrato rico en pectina que se ha obtenido a partir de material vegetal sin el uso de disolvente orgánico y que contiene una cantidad significativa de polisacárido RG-I, seguido de ultrafiltración y recuperación del retenido.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] La pectina es un heteropolisacárido estructural que está presente en las paredes celulares primarias de las plantas terrestres. La composición del polisacárido péctico y la estructura fina varían ampliamente dependiendo de la fuente vegetal y las condiciones de extracción aplicadas. La actividad biológica del polisacárido péctico depende en gran medida de su estructura fina.

[0003] Los polisacáridos pécticos son un grupo heterogéneo de polisacáridos que comprende cantidades variables de los siguientes componentes de polisacáridos:

- (i) homogalacturonano (HG),
- (ii) xilogalacturonano (XG),
- (iii) apiogalacturonano (AG)
- (iv) ramnogalacturonano-I (RG-I), y
- (v) ramnogalacturonano-II (RG-II).

[0004] La Figura 1 proporciona una representación esquemática de la estructura de los polisacáridos pécticos, incluyendo los 4 componentes polisacáridos mencionados anteriormente. Se observa que los componentes polisacáridos AG, XG y RG-II típicamente representan sólo una fracción menor de polisacáridos pécticos.

[0005] Los componentes polisacáridos HG, XG y RG-II comprenden cada uno una cadena principal que consiste en una cadena lineal de unidades monosacáridas de ácido D-galacturónico con enlace α -(1-4).

[0006] Solo RG-I comprende una cadena principal que consiste en una cadena lineal de las unidades disacáridas repetidas: ácido 4)- α -D-galacturónico-(1,2)- α -L-ramnosa-(1. En la Figura 2 se muestra una representación esquemática de la estructura de RG-I.

[0007] El dominio homogalacturonano puede tener una longitud de hasta aproximadamente 100 residuos de D-GalA consecutivos. El dominio RG-I que contiene las cadenas laterales suele denominarse "región ramificada" o "región peluda", mientras que el dominio homogalacturonano (entre dos dominios RG-I) no suele estar sustituido por oligosacáridos.

[0008] Los residuos de GalA en RG-I están unidos a los residuos de Rha a través de las posiciones 1 y 4, mientras que el residuo de Rha está unido al residuo de GalA a través de las posiciones anomérica y 2-OH. En general, alrededor del 20-80 % de los residuos de Rha están ramificados en la posición 4-OH (dependiendo de la fuente vegetal y del método de aislamiento), con cadenas laterales neutras y ácidas. Estas cadenas laterales constan principalmente de residuos Ara y Gal unidos de varias maneras, constituyendo polímeros conocidos como arabinogalactano I (AG-I) y/o AG-II. AG I está compuesto por una cadena principal de D-Gal con enlace beta-(1,4) con sustituciones en 3-OH de grupos alfa-L-arabinosilo; la cadena principal de Gal puede tener unidades alfa(1,5)-L-Ara interespaciadas. AG-II consiste en galactano altamente ramificado con D-Gal con enlaces beta(1,3) predominantemente interior con sustituciones de cadenas cortas con enlaces (1,6) en el exterior. Este último tiene más uniones de L-Ara con enlaces (1,3) y/o alfa(1,5). Las cadenas laterales de oligosacáridos pueden ser lineales o ramificadas, y algunas de estas cadenas laterales pueden terminar con residuos de alfa-L-fucósidos, beta-D-glucurónidos y 4-O-metil beta-D-glucuronilo.

[0009] Khodaei y Karboune ("Extraction and structural characterization of rhamnogalacturonan I-type pectic polysaccharides from potato cell wall". Food Chemistry, 1:39 (2013), pág. 617-623) describieron la extracción de polisacáridos pécticos de tipo ramnogalacturonano I (RG-I) ricos en galactano usando alcalinos (NaOH y KOH) y métodos enzimáticos (endopolygalacturonase de *Aspergillus niger*).

[0010] Khodaei y Karboune ("Enzymatic extraction of galactan-rich rhamnogalacturonan I from potato cell wall by-product". LWT - Food Science and Technology, 57 (2014), pág. 207-216) investigaron adicionalmente los efectos de parámetros variables en la extracción enzimática de ramnogalacturonano I rico en galactano (RG I) usando endo-poligalacturonasa de *Aspergillus niger*.

[0011] El documento WO 2015/192247 describe un proceso de aislamiento de oligosacáridos no digeribles de pulpa de patata extrayendo contenido de ramnogalacturonano de la pulpa de patata, digiriendo el contenido de ramnogalacturonano extraído con una mezcla multienzimática para producir los oligosacáridos no digeribles del contenido de ramnogalacturonano extraído; y aislando los oligosacáridos no digeribles.

[0012] El documento WO 2016/132130 describe un proceso para la preparación de un fragmento de RG-I a partir de pulpa de patata y su uso para proporcionar actividad inmunomoduladora a un sujeto. El proceso comprende los pasos de:

- proporcionar RG-I obtenido de la extracción enzimática de patata;
- preparar un fragmento de dicho RG-I, teniendo el fragmento un peso molecular medio comprendido entre 5 kDa y 30 kDa, por despolimerización selectiva de dicho RG-I para proporcionar el fragmento donde el fragmento tiene una composición de monosacáridos que comprende:

Arabinosa 7-13 %,
 Ramnosa 5-10 %,
 Xilosa 0-1 %,
 Ácido galacturónico 20-40 %, y
 Galactosa 35-60 %.

[0013] El documento CN 102784193 A describe un proceso de aislamiento de polisacáridos a partir de Hedysarum polybotrys.

[0014] El documento KR 2017/053144 A describe la extracción de una fracción de polisacáridos a partir de hojas de cebada. Se describe que la fracción de polisacárido presenta actividad de promoción de la función de inmunidad.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

[0015] Los inventores han descubierto que un aislado de polisacárido enriquecido en polisacárido ramnogalacturonano-I (RG-I) con alta funcionalidad biológica puede obtenerse mediante un método que comprende:

- someter un sustrato rico en pectina que contiene una cantidad significativa de polisacárido RG-I a hidrólisis enzimática para hidrolizar parcialmente el polisacárido RG-I, seleccionándose dicho sustrato de hollejo, extracto acuoso de hollejo, torta de aceite, extracto acuoso de torta de aceite y combinaciones de los mismos y obteniéndose de uno o más cultivos seleccionados de fruta, zanahoria, oliva, guisantes, remolacha azucarera, achicoria, soja, girasol, colza y maíz sin el uso de un solvente orgánico;
- someter el polisacárido RG-I parcialmente hidrolizado a ultrafiltración utilizando una membrana de ultrafiltración con un corte comprendido entre 5 y 100 kDa;
- y recuperar el retenido de ultrafiltración.

[0016] La hidrólisis enzimática se realiza con la ayuda de una o más pectinasas seleccionadas de pectina liasa (EC 4.2.2.10), pectato liasa (EC 4.2.2.2), endo-poligalacturonasa (EC 3.2.1.15), exopoligalacturonasa (EC 3.2.1.67 y EC 3.2.1.82).

[0017] Así, un primer aspecto de la presente invención se refiere a la provisión de un método para producir un aislado polisacárido péptico hidrolizado que está enriquecido en ramnogalacturonano-I, comprendiendo dicho método los pasos de:

- proporcionar un sustrato rico en pectina seleccionado entre hollejo, extracto acuoso de hollejo, torta de aceite, extracto acuoso de torta de aceite y sus combinaciones, obteniéndose dicho sustrato rico en pectina de uno o varios cultivos seleccionados entre frutas, zanahorias, oliva, guisantes, remolacha azucarera, achicoria, soja, girasol, colza y maíz sin el uso de un solvente orgánico, conteniendo dicho sustrato rico en pectina al menos 3 % en peso de materia seca de polisacáridos pépticos con una cadena principal constituida por residuos de ácido galacturónico y residuos de ramnosa, estando los residuos de ramnosa contenidos en una cadena principal constituida por residuos de ácido galacturónico y residuos de ramnosa, estando dichos residuos de ramnosa contenidos en residuos de alfa(1→4)-galacturónico-alfa(1→2)-ramnosa;
- someter el sustrato rico en pectina a un tratamiento enzimático para hidrolizar parcialmente los polisacáridos pépticos, comprendiendo dicho tratamiento enzimático el uso de una o más pectinasas seleccionadas de pectina liasa (EC 4.2.2.10), pectato liasa (EC 4.2.2.2), endo-poligalacturonasa (EC 3.2.1.15), exopoligalacturonasa (EC 3.2.1.67 y EC 3.2.1.82);
- someter los polisacáridos pépticos parcialmente hidrolizados a ultrafiltración utilizando una membrana de ultrafiltración con un corte de peso molecular en el intervalo de 5 a 100 kDa; y

- recuperar el retenido de ultrafiltración.

[0018] Los inventores han descubierto que la hidrólisis parcial enzimática de los polisacáridos pécticos en los sustratos mencionados anteriormente usando una o más de las pectinasas mencionadas anteriormente seguido de la eliminación de pequeños componentes moleculares, incluyendo moléculas pequeñas producidas durante la hidrólisis, produce un aislado de polisacárido péctico hidrolizado que presenta una funcionalidad biológica excepcionalmente alta.

[0019] Aunque los inventores no desean limitarse a la teoría, se cree que esta alta funcionalidad biológica se logra eliminando al menos parte de los dominios de homogalacturonano de los polisacáridos pécticos contenidos en el sustrato, y eliminando componentes inactivos, tales como celulosa y hemicelulosa. La eliminación de los dominios homogalacturonanos altera las propiedades fisicoquímicas de los polisacáridos pécticos, dando como resultado configuraciones tridimensionales de la molécula que pueden interaccionar más eficazmente con los denominados receptores de reconocimiento de patrones en el tracto intestinal y en células mononucleares de sangre periférica humana. La eliminación de dominios homogalacturonanos de los polisacáridos pécticos aumenta el contenido de dominios RG-I. Se cree que la interacción de dominios polisacáridos RG-I con receptores de reconocimiento de patrones expresados en células intestinales y otras células inmunológicamente activas puede modular su capacidad de respuesta funcional, que a través de la producción de mediadores y recirculación de células inmunológicamente activas puede mejorar la resistencia a infecciones en el tracto intestinal así como en otros sitios en el cuerpo incluyendo la cavidad oral, el tracto respiratorio, el tracto urinario, la vagina y la piel.

[0020] El presente método ofrece además la ventaja de que el polisacárido péctico hidrolizado altamente activo se obtiene a partir de un sustrato rico en pectina que se ha producido sin el uso de un solvente orgánico. Por tanto, a diferencia de algunos métodos de la técnica anterior que utilizan precipitación con solvente orgánico para ayudar al aislamiento de polisacáridos pécticos, el presente método emplea un sustrato rico en pectina que no se ha puesto en contacto con solvente orgánico y el procesamiento adicional de este sustrato según el presente método no requiere el uso de solvente orgánico.

[0021] La presente invención se refiere además al aislado polisacárido péctico hidrolizado obtenido mediante el presente método, donde el sustrato rico en pectina se obtiene a partir de uno o más cultivos seleccionados de manzana, pera, zanahoria, remolacha azucarera y achicoria, y a un proceso para preparar un producto seleccionado de una formulación nutricional, un producto alimenticio, un suplemento dietético, una bebida o un producto farmacéutico, comprendiendo dicho proceso la adición del aislado polisacárido péctico hidrolizado mencionado anteriormente en una concentración de al menos el 0,1 % en peso de la materia seca que está contenida en el producto final.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0022] En consecuencia, un primer aspecto de la invención se refiere a un método para producir un aislado de polisacárido péctico hidrolizado que está enriquecido en ramnogalacturonano I, comprendiendo dicho método los pasos de:

- proporcionar un sustrato rico en pectina seleccionado entre hollejo, extracto acuoso de hollejo, torta de aceite, extracto acuoso de torta de aceite y combinaciones de los mismos, obteniéndose dicho sustrato rico en pectina de uno o varios cultivos seleccionados entre fruta, zanahoria, oliva, guisantes, remolacha azucarera, achicoria, soja, girasol, colza y maíz sin el uso de un solvente orgánico, conteniendo dicho sustrato rico en pectina al menos 3 % en peso de materia seca de polisacáridos pécticos con una cadena principal constituida por residuos de ácido galacturónico y residuos de ramnosa, estando los residuos de ramnosa contenidos en una cadena principal constituida por residuos de ácido galacturónico y residuos de ramnosa, estando dichos residuos de ramnosa contenidos en residuos de alfa(1→4)-galacturónico-alfa(1→2)-ramnosa;
- someter el sustrato rico en pectina a un tratamiento enzimático para hidrolizar parcialmente los polisacáridos pécticos, comprendiendo dicho tratamiento enzimático el uso de una o más pectinasas seleccionadas de pectina liasa (EC 4.2.2.10), pectato liasa (EC 4.2.2.2), endo-poligalacturonasa (EC 3.2.1.15), exopoligalacturonasa (EC 3.2.1.67 y EC 3.2.1.82);
- someter los polisacáridos pécticos parcialmente hidrolizados a ultrafiltración utilizando una membrana de ultrafiltración con un corte de peso molecular en el intervalo de 5 a 100 kDa; y
- recuperar el retenido de ultrafiltración.

[0023] El sustrato rico en pectina que se usa en el presente método se ha obtenido a partir de material vegetal sin el uso de solvente orgánico, lo que significa que este sustrato se ha obtenido a partir de material vegetal sin que ese material vegetal se haya puesto en contacto con solvente orgánico. Por tanto, el sustrato rico en pectina no se obtiene mediante extracción o precipitación con solvente orgánico.

[0024] Como se usa en el presente documento, los términos "cadena troncal" y "cadena principal" son sinónimos.

[0025] El término "sacárido", como se usa en el presente documento, abarca mono-, di-, oligo- y polisacáridos.

5 [0026] El término "oligosacárido", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un polímero de sacárido que contiene de 3 a 10 residuos monosacáridos.

[0027] El término "polisacárido", como se usa en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, se refiere a un polímero de sacárido que contiene al menos 11 residuos monosacáridos.

10 [0028] El término "polisacárido pectico", como se usa en el presente documento, se refiere a polisacáridos opcionalmente ramificados con un peso molecular de al menos 10 kDa y que comprenden una cadena principal que consiste en residuos de ácido galacturónico y residuos de ramnosa, estando contenidos dichos residuos de ramnosa en residuos de alfa(1→4)galacturónico-alfa(1→2)-ramnosa. El término "polisacárido péctico", como se
15 usa en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, también abarca polisacáridos pécticos hidrolizados que tienen un peso molecular de al menos 10 kDa.

[0029] El término "polisacárido ramificado", como se usa en el presente documento, se refiere a un polisacárido que comprende una cadena principal lineal de unidades monosacáridas unidas entre sí por enlaces glicosídicos, donde al menos una de las unidades monosacáridas dentro de la cadena principal porta una cadena lateral de una o más unidades monosacáridas unidas glicosídicamente.

20 [0030] El término "tramo", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de dos unidades monosacáridas unidas glicosídicamente dentro de la cadena principal de un polisacárido, excluyendo cualquier cadena lateral que esté unida a la misma.

[0031] El término "dominio", como se utiliza en el presente documento, se refiere a un tramo más cualquier cadena lateral que esté unida a dicho tramo.

30 [0032] El término "tramo ramnogalacturonano-I" o "tramo RG-I" se refiere a un tramo que consiste en pares de ácido galacturónico (GalA) y ramnosa (Rha), donde los residuos de GalA están unidos a los residuos de Rha a través de las posiciones 1 y 4, mientras que los residuos Rha están unidos al residuo GalA a través de las posiciones anomérica y 2-OH, es decir, alternando residuos alfa(1→4)-galacturónico-alfa(1→2)-ramnosa. El dominio RG-I puede comprender cadenas laterales tales como, por ejemplo, cadenas laterales de galactano, arabinano y arabinogalactano.

[0033] El término "polisacárido ramnogalacturonano-I" o "polisacárido RG-I" se refiere a polisacáridos pécticos opcionalmente ramificados que comprenden una cadena principal que contiene uno o más tramos ramnogalacturonano-I.

40 [0034] El término "tramo ácido galacturónico con enlace alfa(1,4)" se refiere a un tramo que consta de residuos alfa(1→4)-galacturónicos.

45 [0035] Además de los dominios RG-I, el aislado de polisacárido péctico hidrolizado obtenido mediante el método de la presente invención puede contener uno o más de los siguientes dominios:

- homogalacturonano (HG),
- xilogalacturonano (XG),
- apiogalacturonano (AG)
- 50 • ramnogalacturonano-II (RG-II).

[0036] Los dominios XG, AG y RG-II normalmente representan sólo una fracción menor de los polisacáridos RG-I.

55 [0037] Los dominios HG, los dominios XG, los dominios AG y RG-II que están opcionalmente presentes en los polisacáridos RG-I de la presente invención comprenden una cadena principal que consiste en una cadena lineal de dos o más ácidos D-galacturónicos con enlaces α -(1-4).

60 [0038] Los dominios HG no contienen cadenas laterales. Los grupos carboxilo de los residuos de ácido galacturónico dentro de la cadena principal de los dominios HG pueden estar esterificados. El ácido galacturónico esterificado puede presentarse en forma de éster metílico o éster acetílico.

[0039] La cadena principal de los dominios XG contiene una o más cadenas laterales en forma de D-xilosa.

65 [0040] La cadena principal de los dominios AG contiene una o más cadenas laterales que están compuestas por uno o más residuos de D-apiosa.

- 5 [0041] La cadena principal de RG-II contiene una o más cadenas laterales que no están compuestas exclusivamente de D-xilosa o D-apiosa. Los grupos carboxilo de los residuos de ácido galacturónico dentro de la cadena principal de los dominios RG-II pueden esterificarse. El ácido galacturónico esterificado puede presentarse en forma de éster metílico o éster acetílico.
- [0042] La terminología "grado de acetilación" se refiere al número de residuos de acetilo por residuo de ácido galacturónico, expresado como porcentaje.
- 10 [0043] La terminología "grado de metilación" se refiere al número de residuos de metilo por residuo de ácido galacturónico, expresado como porcentaje.
- [0044] La concentración de diferentes polisacáridos y su composición monosacárida se puede determinar mediante técnicas analíticas conocidas por el experto. Después de la metanolisis, la composición monosacárida se puede determinar adecuadamente por cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento combinada con detección amperométrica de pulsos (HPAEC-PAD).
- 15 [0045] La distribución de tamaño molecular puede determinarse mediante cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento usando la detección (concentración) del índice de refracción (RI), la detección de dispersión de luz (detección de masa molecular), la detección UV (indicativa de presencia de proteínas) y la detección de presión diferencial (detección de viscosidad intrínseca).
- 20 [0046] Los métodos analíticos mencionados anteriormente se describen en: Analytical Biochemistry Vol. 207, Número 1, 1992, pág. 176 (para la metanolisis y el análisis de azúcar neutro) y en Mol. Nutr. Food Res., Vol 61, Número 1, 2017, 1600243 (para el análisis del ácido galacturónico y la distribución de tamaño molecular).
- 25 [0047] El término "hollejo" o "torta", como se usa en el presente documento, se refiere al residuo, opcionalmente seco, de fruta, verduras o semillas que permanece después de prensar para obtener zumo o aceite. El término "torta de aceite" se refiere a la torta que se obtiene después de la extracción de aceite de semillas, frutas o verduras.
- 30 [0048] Todos los porcentajes mencionados en el presente documento, a menos que se indique lo contrario, se refieren al porcentaje en peso.
- 35 [0049] El presente método preferiblemente no emplea ningún solvente orgánico. En otras palabras, el sustrato rico en pectina que se ha obtenido de uno o más cultivos seleccionados de fruta, zanahoria, oliva, guisantes, remolacha azucarera, achicoria, soja, girasol, colza y maíz sin el uso de solvente orgánico se procesa adicionalmente (tratamiento enzimático y ultrafiltración) para producir el aislado de polisacárido péctico hidrolizado deseado, sin el uso de solvente orgánico.
- 40 [0050] El sustrato rico en pectina usado en el presente método contiene preferiblemente al menos 4 % en peso de materia seca, más preferiblemente al menos 6 % en peso de materia seca, incluso más preferiblemente al menos 8 % en peso de materia seca de polisacáridos pécticos.
- 45 [0051] Los polisacáridos pécticos en el sustrato rico en pectina se caracterizan preferiblemente por un peso molecular medio ponderado en masa de al menos 100 kDa, más preferiblemente de al menos 150 kDa, de la manera más preferible de al menos 200 kDa.
- 50 [0052] Los polisacáridos pécticos en el sustrato rico en pectina tienen típicamente un contenido medio de ramnosa de al menos 0,1 % en moles, más preferiblemente de al menos 0,5 % en moles, incluso más preferiblemente de al menos 1 % en moles y de la manera más preferible de al menos 2 % en moles, calculado sobre la composición total de monosacáridos de los polisacáridos pécticos.
- 55 [0053] El sustrato rico en pectina que se emplea en el presente método se obtiene preferiblemente de uno o más cultivos seleccionados de manzana, pera, cítricos, zanahoria, remolacha azucarera y achicoria. Aún más preferiblemente, el sustrato rico en pectina se obtiene de uno o más cultivos seleccionados de manzana, pera, zanahoria y achicoria. Según una forma de realización particularmente preferida, el sustrato rico en pectina se obtiene de zanahoria y/o manzana.
- 60 [0054] El material de cultivo rico en pectina puede usarse como tal, como el sustrato rico en pectina en el presente método. Tal material de cultivo debe ser triturado para producir una pulpa o un zumo, con el fin de permitir que las pectinasas descompongan los polisacáridos pécticos en el sustrato. El material de cultivo triturado puede secarse o concentrarse antes de su uso en el presente método.
- 65 [0055] Preferiblemente, el sustrato rico en pectina se obtiene como una corriente secundaria de un proceso de producción que usa material de cultivo como material de partida y donde no se emplean solventes orgánicos o

reacciones químicas hasta el paso del proceso en el que se genera la corriente secundaria. De acuerdo con una forma de realización particularmente preferida del presente método, el sustrato rico en pectina se selecciona de hollejo, extracto acuoso de hollejo, torta de aceite, extracto acuoso de torta de aceite, raspaduras, pieles, cáscaras, huesos, semillas y combinaciones de los mismos. De la manera más preferible, el sustrato rico en pectina se selecciona de hollejo, extracto acuoso de hollejo y combinaciones de los mismos.

[0056] El sustrato rico en pectina que se emplea en el presente método puede obtenerse adecuadamente mediante un procedimiento que incluya molienda, calentamiento, microondas, secado o técnicas alternativas que alteren las estructuras de la pared celular para facilitar la hidrólisis enzimática de los polisacáridos pécticos.

[0057] El sustrato rico en pectina tiene preferiblemente un contenido de agua de no más del 15 % en peso, más preferiblemente de no más del 10 % en peso y de la manera más preferible de no más del 8 % en peso.

[0058] El sustrato rico en pectina se somete preferiblemente al tratamiento enzimático en forma de un líquido acuoso que contiene el sustrato rico en pectina y que tiene un contenido de materia seca de 0,5-40 % en peso, más preferiblemente de 1-30 % en peso, incluso más preferiblemente de 2-20 % en peso, de la manera más preferible de 3-15 % en peso. Este líquido acuoso puede prepararse adecuadamente combinando el sustrato rico en pectina con agua.

[0059] El sustrato rico en pectina constituye preferiblemente al menos el 50 % en peso, más preferiblemente al menos el 75 % en peso y de la manera más preferible al menos el 85 % en peso de la materia seca que está contenida en el líquido acuoso que se somete a tratamiento enzimático.

[0060] El tratamiento enzimático del método según la invención se lleva a cabo preferiblemente a un pH en el intervalo de 3,0 a 7,5, más preferiblemente en el intervalo de 4 a 7,5, incluso más preferiblemente en el intervalo de 4,5 a 7, de la manera más preferible en el intervalo de 5 a 7.

[0061] Según una forma de realización preferida, los polisacáridos pécticos se hidrolizan parcialmente usando una o más pectinasas seleccionadas de endo-poligalacturonasa (EC 3.2.1.15) y exopoligalacturonasa (EC 3.2.1.67 y EC 3.2.1.82).

[0062] Según otra forma de realización preferida, los polisacáridos pécticos se hidrolizan parcialmente usando una o más pectinasas seleccionadas de pectina liasa (EC 4.2.2.10) y pectato liasa (EC 4.2.2.2). La hidrólisis de polisacáridos pécticos por estas liasas produce inevitablemente fragmentos de polisacáridos que contienen un residuo de ácido galacturónico no reductor insaturado terminal.

[0063] Los polisacáridos pécticos se hidrolizan preferiblemente en el presente proceso usando una combinación de la una o más pectinasas anteriormente mencionadas y una o más pectinesterasas (EC 3.1.1.11). La una o más pectinesterasas pueden emplearse antes o simultáneamente con la una o más pectinasas. El uso combinado de pectinasas y pectinesterasas es particularmente ventajoso en caso de que la pectinasa empleada se seleccione de endo-poligalacturonasa, exo-poligalacturonasa y combinaciones de las mismas. El uso combinado de pectinasas y pectinesterasas suele producir polisacáridos pécticos parcialmente hidrolizados que tienen un grado reducido de metilación y una relación de acetilación/metilación aumentada.

[0064] De acuerdo con una forma de realización particularmente preferida, el sustrato rico en pectina se somete a tratamiento enzimático que comprende el uso de una o más pectinesterasas (EC 3.1.1.11) antes o simultáneamente con la hidrólisis parcial usando la una o más pectinasas. De la manera más preferible, el tratamiento enzimático con pectinesterasas y el tratamiento enzimático con una o más pectinasas se llevan a cabo simultáneamente.

[0065] En el presente método, el sustrato rico en pectina puede tratarse adecuadamente con celulosa y/o hemicelulosa (EC 3.2.1.4, EC 3.2.1.176, EC 3.2.1.203) antes del tratamiento enzimático con pectinasa o como parte de dicho tratamiento. El tratamiento con celulosa y/o hemicelulosa descompone las paredes celulares vegetales en el sustrato e induce de este modo la liberación de las pectinas que están contenidas dentro de estas paredes celulares y hace así que estas pectinas sean más accesibles para las pectinasas.

[0066] El tratamiento enzimático del sustrato rico en pectina con una o más pectinasas se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura en el intervalo de 15 a 70 °C, más preferiblemente de 25 a 55 °C. La duración del tratamiento enzimático es preferiblemente de al menos 10 minutos, más preferiblemente de 20 minutos a 3 horas.

[0067] El presente método puede emplear adecuadamente un sustrato rico en pectina que contiene una cantidad relativamente alta de material de pared celular vegetal más o menos intacto. Normalmente, dicho sustrato rico en pectina contiene al menos 40 % en peso de materia seca de material de celulosa seleccionado de celulosa, hemicelulosa y combinaciones de las mismas. Normalmente, una gran fracción de los polisacáridos pécticos en estos sustratos es insoluble en agua, es decir, los polisacáridos pécticos que están atrapados en la matriz de

celulosa/hemicelulosa de la pared celular vegetal (fragmentos). Preferiblemente, al menos el 50 % en peso de los polisacáridos pécticos presentes en el sustrato no se disuelven en agua destilada a 45 °C y pH 5,5 a una concentración de polisacárido péctico de 1 g/l.

[0068] De acuerdo con una forma de realización particularmente preferida del presente método, después del tratamiento enzimático y antes de la ultrafiltración, los polisacáridos pécticos solubles en agua se separan de los sólidos no solubles en agua sometiendo un líquido acuoso que contiene los polisacáridos pécticos parcialmente hidrolizados a separación sólido-líquido. Los ejemplos de técnicas de separación sólido-líquido que pueden emplearse incluyen sedimentación, decantación, centrifugación, hidrociclones y/o filtración. Esta forma de realización particular ofrece la ventaja de que se puede conseguir un alto rendimiento de los polisacáridos pécticos deseados.

[0069] En una forma de realización del presente método, el sustrato rico en pectina contiene 10-80 % en peso de materia seca de polisacáridos de la pared celular seleccionados de pectinas, celulosa, hemicelulosa y combinaciones de las mismas. Más preferiblemente, el sustrato contiene 20-70 % en peso de materia seca de los polisacáridos de la pared celular. De la manera más preferible, el sustrato contiene 30-60 % en peso de materia seca de los polisacáridos de la pared celular. El hollejo es un ejemplo de un sustrato rico en pectina que pueda usarse en el presente método y que contiene una cantidad relativamente alta de polisacáridos de la pared celular.

[0070] El hollejo contiene normalmente 2-50 % en peso de materia seca, preferiblemente 5-40 % en peso de materia seca, más preferiblemente 10-30 % en peso de materia seca, de carbohidratos con un peso molecular de menos de 20 kDa.

[0071] El contenido de proteína del hollejo típico está en el intervalo de 0-20 % de proteína en peso de materia seca, más preferiblemente 1-18 % de proteína en peso de materia seca, incluso más preferiblemente 2-16 % de proteína en peso de materia seca.

[0072] En la forma de realización del presente método en la que el sustrato rico en pectina es hollejo o torta de aceite, preferiblemente se retira material no disuelto (tamaño de partícula > 5 µm) del hollejo tratado enzimáticamente o de la torta de aceite tratada enzimáticamente antes de la ultrafiltración. El material no disuelto se elimina preferiblemente por medio de separación sólido-líquido, más preferiblemente por decantación, centrifugación y/o filtración.

[0073] En otra forma de realización del presente método, el sustrato rico en pectina es un aislado de pectina que contiene al menos 10 % en peso de materia seca, preferiblemente al menos 20 % en peso de materia seca, más preferiblemente al menos 40 % en peso de materia seca, de los polisacáridos pécticos, y menos de 20 % en peso de materia seca de polisacáridos de la pared celular seleccionados de celulosa, hemicelulosa y combinaciones de los mismos. Más preferiblemente, el aislado de pectina contiene polisacáridos de la pared celular en una concentración de menos del 10 % en peso de materia seca, incluso más preferiblemente de menos del 5 % en peso de materia seca. Los extractos acuosos de hollejo y los extractos acuosos de torta de aceite son ejemplos de aislados de pectina que pueden emplearse en el presente método como sustrato rico en pectina.

[0074] Preferiblemente, el extracto de hollejo acuoso se obtiene mediante una secuencia de pasos de extracción acuosa, más preferiblemente al menos dos pasos de extracción acuosa. Por consiguiente, el primer paso de extracción comprende preferiblemente mezclar hollejo con agua seguido de separación sólido-líquido. El segundo paso comprende preferiblemente mezclar la fracción sólida recuperada con agua, seguido de otra separación sólido-líquido. Los métodos de separación sólido-líquido adecuados son, por ejemplo, la decantación, la centrifugación y la filtración.

[0075] Preferiblemente, la extracción acuosa se lleva a cabo a un pH en el intervalo de 2,0 a 8,5, más preferiblemente a un pH en el intervalo de 4,5 a 7,5, incluso más preferiblemente a un pH en el intervalo de 6,0 a 7,0.

[0076] En una forma de realización particularmente preferida del presente método, los polisacáridos pécticos parcialmente hidrolizados se someten a ultrafiltración usando una membrana de ultrafiltración con un corte de peso molecular en el intervalo de 6-50 kDa, preferiblemente en el intervalo de 7-40 kDa, más preferiblemente en el intervalo de 8-30 kDa.

[0077] El retenido de ultrafiltración recuperado puede secarse adecuadamente usando una o más técnicas de secado seleccionadas de secado por pulverización, liofilización, secado al aire, secado con rodillos, secado en superficie plana, secado en cinta y secado en tambor.

[0078] Preferiblemente, el retenido de ultrafiltración recuperado se seca hasta un contenido de agua de menos del 15 % en peso, más preferiblemente menos del 13 % en peso, incluso más preferiblemente menos del 11 % en peso, y de la manera más preferible menos del 9 % en peso.

5 [0079] El retenido de ultrafiltración recuperado contiene preferiblemente residuos de ácido galacturónico y residuos de ramnosa en una relación molar de no más de 6:1, más preferiblemente de no más de 5:1, incluso más preferiblemente de no más de 4:1, de la manera más preferible de no más de 3,5:1.

10 [0080] Los polisacáridos pécticos que están presentes en el retenido de ultrafiltración recuperado tienen preferiblemente un contenido medio de ramnosa de al menos 4 %, más preferiblemente 5-50 %, incluso más preferiblemente 6-45 %, aún más preferiblemente 6,5-40 % y de la manera más preferible 7-30 %, calculado sobre la composición total de monosacáridos de los polisacáridos pécticos.

15 [0081] El retenido de ultrafiltración recuperado contiene preferiblemente al menos 5 % en peso de materia seca, preferiblemente al menos 15 % en peso de materia seca, más preferiblemente al menos 25 % en peso de materia seca, de la manera más preferible al menos 50 % en peso de materia seca de polisacáridos pécticos, teniendo dichos polisacáridos pécticos un contenido medio de ramnosa de al menos 4 % en moles, calculado sobre la composición total de monosacáridos de los polisacáridos pécticos.

20 [0082] De acuerdo con una forma de realización preferida adicional, los polisacáridos pécticos en el retenido recuperado tienen un peso molecular medio ponderado en masa de más de 20 kDa, más preferiblemente de más de 30 kDa, incluso más preferiblemente de más de 40 kDa, de la manera más preferible de más de 50 kDa.

25 [0083] El método de la presente invención produce preferiblemente un aislado de polisacárido péctico hidrolizado como se especifica a continuación.

[0084] Un segundo aspecto de la invención se refiere a un aislado de polisacárido péctico hidrolizado obtenido mediante el método según la invención, donde el sustrato rico en pectina se obtiene de uno o más cultivos seleccionados de manzana, pera, zanahoria, remolacha azucarera y achicoria.

30 [0085] El aislado de polisacárido péctico hidrolizado tiene normalmente un contenido de materia seca de al menos 85 % en peso, más preferiblemente de al menos 90 % en peso y de la manera más preferible de al menos 95 % en peso.

35 [0086] Preferiblemente, el aislado polisacárido péctico hidrolizado contiene al menos 10 % en peso de materia seca, más preferiblemente al menos 20 % en peso de materia seca, incluso más preferiblemente al menos 40 % en peso de materia seca de polisacáridos pécticos, teniendo dichos polisacáridos pécticos un contenido medio de ramnosa de al menos 4 % en moles, calculado sobre la composición total de monosacáridos de los polisacáridos pécticos.

40 [0087] De acuerdo con una forma de realización particularmente preferida, los polisacáridos pécticos hidrolizados tienen un peso molecular medio ponderado en masa de más de 20 kDa, más preferiblemente de más de 30 kDa, incluso más preferiblemente de más de 40 kDa, de la manera más preferible de más de 50 kDa.

45 [0088] En una forma de realización particular, el aislado polisacárido péctico hidrolizado contiene menos del 15 % en peso, menos del 10 % en peso, más preferiblemente menos del 5 % en peso, de la manera más preferible menos del 1 % en peso de sacáridos (polisacáridos, oligosacáridos, disacáridos y monosacáridos) que tienen un peso molecular de menos de 2,5 kDa.

50 [0089] Preferiblemente, el aislado polisacárido péctico hidrolizado contiene menos del 30 % en peso, más preferiblemente menos del 20 % en peso, incluso más preferiblemente menos del 10 % en peso de sustancias orgánicas que tienen un peso molecular de menos de 20 kDa.

55 [0090] Normalmente, el aislado polisacárido péctico hidrolizado contiene menos del 15 % en peso de materia seca, preferiblemente menos del 10 % en peso de materia seca, más preferiblemente menos del 5 %, de la manera más preferible menos del 1 % en peso de materia seca de polisacáridos insolubles seleccionados de celulosa, hemicelulosa, lignina y almidón.

60 [0091] El contenido de proteína del aislado polisacárido péctico hidrolizado preferiblemente no excede el 15 % en peso de materia seca, más preferiblemente está en el intervalo del 0,5-10 % en peso de materia seca y de la manera más preferible en el intervalo del 1-5 % en peso de materia seca.

65 [0092] Preferiblemente, el aislado polisacárido péctico hidrolizado contiene al menos 10 % en peso de materia seca, preferiblemente al menos 20 % en peso de materia seca, más preferiblemente al menos 30 % en peso de materia seca de polisacáridos pécticos, teniendo dichos polisacáridos pécticos un contenido medio de ramnosa

de al menos 5 % en moles, más preferiblemente al menos 6 %, calculado sobre la composición total de monosacáridos de los polisacáridos pécticos.

[0093] Normalmente, la combinación de residuos de ácido galacturónico, residuos de ramnosa, residuos de arabinosa y residuos de galactosa constituye al menos el 50 % en moles de los residuos de monosacáridos presentes en los sacáridos que están contenidos en el aislado de polisacárido péctico hidrolizado. Más preferiblemente, esta combinación constituye al menos 60 % en moles, incluso más preferiblemente al menos 65 % en moles, aún más preferiblemente al menos 70 % en moles y de la manera más preferible al menos 75 % en moles de los residuos de monosacárido en los sacáridos que están contenidos en el aislado de polisacárido péctico hidrolizado.

[0094] En una forma de realización particularmente preferida del aislado de polisacárido péctico hidrolizado, la combinación de residuos de ácido galacturónico y residuos de ramnosa representa al menos 15 % en moles, más preferiblemente 17-70 % en moles, de la manera más preferible 18-60 % en moles de los residuos de monosacárido presentes en los sacáridos que están contenidos en el aislado de polisacárido péctico hidrolizado.

[0095] Los residuos de ácido galacturónico y los residuos de ramnosa están presentes preferiblemente en el aislado de polisacárido péctico hidrolizado en una relación molar de no más de 6:1, más preferiblemente de no más de 5:1, incluso más preferiblemente de no más de 4:1, de la manera más preferible de no más de 3,5:1.

[0096] Los residuos de ramnosa representan normalmente 5-50 %, más preferiblemente 6-45 %, incluso más preferiblemente 6,5-40 % y de la manera más preferible 7-30 % de todos los residuos de monosacárido contenidos en los polisacáridos pécticos que están presentes en el aislado de polisacárido péctico hidrolizado.

[0097] Los residuos de ácido galacturónico representan normalmente 5-80 %, más preferiblemente 8-60 % y de la manera más preferible 10-50 % de todos los residuos de monosacáridos contenidos en los polisacáridos pécticos que están presentes en el aislado de polisacáridos pécticos hidrolizados.

[0098] Los polisacáridos pécticos en el aislado tienen preferiblemente un peso molecular medio ponderado en masa de no más de 800 kDa. Más preferiblemente, los polisacáridos pécticos tienen un peso molecular medio ponderado en masa entre 22 kDa y 500 kDa, de la manera más preferible entre 25 kDa y 250 kDa.

[0099] En una forma de realización particular, los polisacáridos pécticos en el aislado de la presente invención tienen preferiblemente un grado medio de acetilación de al menos 10 %, más preferiblemente de 20-110 %, incluso preferiblemente de 25-100 % y de la manera más preferible de 30-80 %.

[0100] En una forma de realización particular adicional, los polisacáridos pécticos en el aislado tienen preferiblemente un grado medio de metilación de no más del 60 %, más preferiblemente de no más del 50 % y de la manera más preferible de 5-30 %.

[0101] La cadena principal de los polisacáridos pécticos en el aislado puede comprender una o más cadenas laterales. Estas cadenas laterales pueden contener residuos de arabinosa y/o galactosa, y cantidades menores de residuos de los monómeros fucosa, glucosa, ácido glucurónico, xilosa, y/o ácido urónico. La una o más cadenas laterales se seleccionan preferiblemente de entre cadenas laterales de galactano, cadenas laterales de arabinano y cadenas laterales de arabinogalactano.

[0102] La cadena lateral de arabinano comprende al menos uno o más residuos de arabinosa con enlace alfa(1,5) y está sustituida en la posición 4-OH de un residuo de ramnosa en el dominio RG-I. La cadena lateral de arabinano puede ser lineal o ramificada. En caso de que la cadena lateral sea lineal, la cadena lateral consiste en residuos de arabinosa con enlaces alfa(1,5). En caso de que la cadena lateral de arabinano sea una cadena lateral ramificada, uno o más residuos de alfa-arabinosa están enlazados al 2-OH y/o 3-OH de arabinosas con enlace alfa(1,5).

[0103] La cadena lateral de galactano comprende al menos uno o más residuos de galactosa con enlace beta(1,4) y está sustituida en la posición 4-OH de un residuo de ramnosa en el dominio RG-I.

[0104] La cadena lateral de arabinogalactano está sustituida en la posición 4-OH de un residuo ramnosa en el dominio RG-I y puede ser un arabinogalactano de tipo I (AGI) o un arabinogalactano de tipo II (AGII). El AGI está compuesto por una cadena principal (1→4)-β-D-Galp sobre la que pueden producirse sustituciones por unidades monoméricas de Galp en la posición O-6 o en la O-3. El AGI se sustituye adicionalmente con residuos α-L-Araf-p y/o con cadenas laterales cortas (1→5)-α-L-Araf. El AGII está compuesto por una cadena principal α(1→3)-β-D-Galp decorada con cadenas secundarias (1→6)-β-D-Galp, que están arabinosiladas.

[0105] Los residuos de arabinosa representan normalmente 0-50 %, más preferiblemente 3-48 % y de la manera más preferible 5-46 % de todos los residuos monosacáridos contenidos en los polisacáridos pécticos que están presentes en el aislado de polisacárido péctico hidrolizado.

[0106] Los residuos de galactosa representan normalmente 0-50 %, más preferiblemente 3-35 % y de la manera más preferible 5-25 % de todos los residuos de monosacárido contenidos en los polisacáridos pécticos que están presentes en el aislado de polisacárido péctico hidrolizado.

[0107] Los residuos de galactosa y los residuos de ramnosa están presentes preferiblemente en los polisacáridos pécticos del aislado en una relación molar de menos de 4:1, más preferiblemente de menos de 3:1, de la manera más preferible de menos de 2:1.

[0108] Un tercer aspecto de la invención se refiere a un proceso de preparación de un producto seleccionado entre una formulación nutricional, un producto alimenticio, un suplemento dietético, una bebida o un producto farmacéutico, comprendiendo dicho proceso la adición del aislado de polisacárido péctico hidrolizado según la invención en una concentración de al menos el 0,1 % en peso de la materia seca que está contenida en el producto final.

[0109] El aislado polisacárido péctico hidrolizado se añade preferiblemente en una concentración de al menos 0,2 %, más preferiblemente 0,3-95 %, de la manera más preferible 1-80 % en peso de la materia seca que está contenida en el producto final.

[0110] El producto de la presente invención puede contener trazas de una o más de las pectinasas empleadas en el método de obtención del aislado de polisacárido péctico hidrolizado. Estas pectinasas pueden estar presentes en el producto en forma activa y/o inactiva.

[0111] En una forma de realización particularmente preferida, los polisacáridos pécticos del aislado de polisacárido péctico hidrolizado representan al menos 20 % en peso, más preferiblemente al menos 30 % en peso, incluso más preferiblemente 60 % en peso, y de la manera más preferible al menos 80 % en peso de la cantidad total de polisacáridos pécticos presentes en el producto final.

[0112] La invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1:

[0113] 500 Kg de hollejo de zanahoria seco (proteínas 14-15 %, carbohidratos 73 % (azúcares 16-18 %, fibra dietética 55 %), ceniza 3-4 %, grasa 6-7 %) obtenido del prensado de zumo se dispersaron en 4 500 L de agua a 45 °C, bajo agitación. Se añadieron 5 kg de preparado enzimático (Pectinex™ Ultra Mash, ex Novozymes, actividad principal pectina liasa y poligalacturonasa) a la mezcla (0,1 % del total de 5 000 L), seguido de incubación a 45 °C durante 2 horas. La incubación se completó mediante la inactivación de la enzima (90 °C durante 30 s), seguido de la separación líquido-sólido en un decantador.

[0114] El líquido así obtenido se filtró usando un filtro de 1 µm, para eliminar los agregados/sólidos. Posteriormente, el líquido se concentró a 1/3 del volumen original mediante ultrafiltración usando una membrana de polietersulfona de 10 kDa (Microdyn Nadir; UP010). A continuación, el retenido se diluyó hasta el volumen original con agua y se concentró de nuevo hasta 1/3 del volumen original.

[0115] El retenido así obtenido se concentró por evaporación para aumentar el contenido de sólidos, y después se secó por pulverización.

[0116] La Tabla 1 muestra la composición básica del aislado de polisacárido péctico hidrolizado así obtenido.

Tabla 1

Carbohidratos	Proteína	Lípidos	Humedad	Ceniza	Fibra cruda
81	6	0,5	6,0	6,0	1,0

[0117] La composición de monosacáridos del aislado se determinó usando los métodos analíticos descritos en: Analytical Biochemistry Vol. 207, Número 1, 1992, pág. 176 (análisis de azúcar neutro) y en Mol. Nutr. Food Res., Vol 61, Número 1, 2017, 1600243 (análisis de ácido urónico y distribución de tamaño molecular). La Tabla 2 muestra los resultados.

Tabla 2

Rha	GalA	Ara	Gal	Glc	Man	Xil
17	23	33	20	4	0	1

Ejemplo 2

[0118] 2 Kg de hollejo de manzana seco (proteína 6,5-8 %, carbohidratos 71 % (azúcares 11 %, fibra dietética 60 %), ceniza 1,0-1,5 %, grasas 3,0-4,0 %) se disolvieron en 18 kg de agua en un recipiente de acero inoxidable de 25 L y se colocaron en un baño de agua a 45 °C. La mezcla se agitó continuamente para mantener los componentes insolubles en dispersión. Se añadieron 20 g de Pectinex™ Ultra Mash después de que la dispersión de hollejo de manzana hubiera alcanzado los 45 °C. La incubación continuó durante 2 horas. Después de estas 2 horas, el recipiente se colocó en un baño de hielo. A continuación, la dispersión se introdujo en cubos de centrífuga y se centrifugó durante 5 min a 6 000 g. Los sobrenadantes se recogieron en un recipiente de acero inoxidable de 25 L después de la filtración sobre un filtro de 10 µm. El recipiente se colocó en un baño de agua de 98 °C. Después de que la dispersión hubiera alcanzado una temperatura de 90 °C, la mezcla se calentó durante otros 10 min para inactivar la enzima. A continuación, la mezcla se enfrió a 50 °C colocando el recipiente en un baño de hielo.

[0119] El pH de la mezcla se ajustó a pH 5,0 añadiendo una solución de NaOH al 33 % (m/m). A continuación, la mezcla se concentró por un factor 5 y se lavó con un 200 % de agua sobre una membrana de ultrafiltración usando un equipo LAB20 equipado con una membrana de polietersulfona de 10 kDa (Microdyn Nadir; UP010) a 50 °C. Después de la ultrafiltración/diafiltración, el aislado se liofilizó usando un liofilizador a escala de laboratorio.

[0120] La composición de monosacáridos del aislado se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3

Rha	GalA	Ara	Gal	Glc	Man	Xil
8	18	48	9	10	0	6

Ejemplo 3

[0121] El hollejo de zanahoria seco del Ejemplo 1 se dispersó en agua desmineralizada (100 g/l) y se sometió a hidrólisis enzimática a escala de laboratorio usando 3 condiciones de enzimólisis diferentes:

1. Pectinex® Yield Mash ex Novozymes (0,2 % p/p de dispersión total)
2. Pectinex® Ultra Mash ex Novozymes (0,2 % p/p de dispersión total)
3. Pectinex® Ultra Mash ex Novozymes (0,05 % p/p de dispersión total)

[0122] La enzimólisis (45 °C, 120 minutos) se terminó calentando a 90 °C durante 10 minutos, seguido de centrifugación y diálisis extensiva del sobrenadante usando una membrana de polietersulfona de 10 kDa (Microdyn Nadir; UP010).

[0123] Se produjo un aislado de referencia introduciendo el hollejo de zanahoria seco en agua (100 g/l), manteniendo la solución durante 120 minutos a una temperatura de 90 °C, centrifugando y dializando el sobrenadante mediante diálisis de la misma manera que las dispersiones enzimolizadas.

Ejemplo 4

[0124] La composición de monosacáridos del polisacárido RG-I de zanahoria no hidrolizado del Ejemplo 3 (Referencia) y del polisacárido RG-I de zanahoria enzimáticamente hidrolizado del Ejemplo 3 (Muestras 1 a 3) se determinó de la misma manera que en el Ejemplo 1.

[0125] Los resultados del análisis de monosacáridos se muestran en la Tabla 4 (Rha = ramnosa; GalA = ácido galacturónico; Ara = arabinosa; Gal = galactosa).

Tabla 4

Muestra	% molar de Rha	% molar de GalA	% molar de Ara	% molar de Gal	[GalA]:[Rha]	[Gal]:[Rha]	[Ara]:[Rha]
Referencia	6	62	14	16	10,3	2,7	2,3
1	10	45	19	23	4,6	2,3	2,0
2	17	35	28	16	2,1	1,0	1,6
3	13	47	23	15	3,7	1,2	1,8

Ejemplo 5

[0126] La actividad inmunomoduladora de los polisacáridos RG-I de zanahoria no hidrolizados del Ejemplo 3 (Referencia) y de los polisacáridos RG-I de zanahoria enzimáticamente hidrolizados del Ejemplo 3 (Muestras 1 a 3) se determinó usando un ensayo de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC).

Ensayo de inmunomodulación.

[0127] Para evaluar el efecto de los materiales polisacáridos sobre la función inmunitaria, se incubaron con células mononucleares de sangre periférica (PBMC) recién aisladas. En resumen, se aislaron PBMC de capas leucocitarias de sangre usando Ficoll-plaque (Amersham). Se incubaron PBMC (2×10^6 células/ml) en medio RPMI (medio RPMI Gibco™ 1640) con 300 µg de polisacáridos RG-I durante 20 horas (5 % de CO₂, 37 °C). Posteriormente, se recogieron los sobrenadantes y se midieron las citoquinas usando una matriz de microesferas (kit de inflamación humana CBA, BD-Bioscience) medidas en un citómetro de flujo (BD FACSCANTO II) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usó RPMI como control negativo y LPS (de *E. Coli* - Sigma L3012-5mG) como referencia a la cual los resultados se normalizaron con LPS como 100 %. Los datos se expresan como % normalizado con respecto a la respuesta inducida por LPS, promediados sobre 3 donantes diferentes para 4 citoquinas diferentes y su suma.

[0128] La Tabla 5 muestra los resultados del ensayo de inmunomodulación.

Tabla 5

Muestra	TNF	IL10	IL6	IL1B	Suma
Referencia	23	6	22	17	69
1	200	68	91	81	441
2	367	106	142	214	828
3	435	124	124	150	832

Ejemplo 6

[0129] Se prepararon aislados de polisacárido péctico hidrolizado a partir de diferentes fuentes, con y sin tratamiento con pectinasa. Los polvos obtenidos moliendo y secando pimienta morrón, hollejo de zanahoria, hollejo de manzana, pulpa de cítricos, pulpa de remolacha azucarera, hollejo de arándano, hollejo de uva roja, hollejo de uva blanca, pulpa de achicoria, huesos de oliva y torta de oliva se dispersaron en agua desmineralizada (100 g/l) y se sometieron a hidrólisis enzimática a escala de laboratorio usando Rapidase C600 (una mezcla enzimática que contenía actividad pectina liasa, poligalacturonasa, pectina esterasa, celulasa y hemicelulasa, Miltz, H. Wood Sci.Technol. (1993) 28: 9) con concentración de enzima de 1 g/100 ml de dispersión total, a 45 °C, durante 120 minutos.

[0130] La enzimólisis se terminó calentando a 100 °C durante 10 min, seguido de centrifugación (18 000 g, 10 min) y diálisis extensiva del sobrenadante usando una membrana con un corte de 12-14 kDa (Visking, Londres, Reino Unido).

[0131] Los aislados de referencia se produjeron introduciendo los polvos secos en agua (100 g/l), manteniendo la solución durante 120 minutos a una temperatura de 90 °C, centrifugando y dializando el sobrenadante por medio de diálisis de la misma manera que las dispersiones enzimolizadas.

[0132] La actividad inmunomoduladora de los aislados producidos con y sin tratamiento con pectinasa se determinó usando el ensayo de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) a una concentración de 300 microg/ml como se describe para el Ejemplo 3.

[0133] La Tabla 6 muestra los resultados del ensayo de inmunomodulación.

Tabla 6

Fuente	Enzima	TNF	IL10	IL6	IL1B	Suma
Pimiento morrón	No	53	19	67	80	219
	Sí	90	21	75	89	275
Zanahoria	No	23	6	22	38	89
	Sí	480	58	85	132	755
Hollejo de manzana	No	15	8	21	13	57
	Sí	70	26	64	42	202
Pulpa de cítricos	No	0	1	4	17	22
	Sí	181	37	87	123	428
Pulpa de remolacha azucarera	No	0	0	0	3	3
	Sí	4	2	7	20	33
Hollejo de arándanos	No	0	0	2	10	12
	Sí	2	1	6	14	23
Uva roja	No	43	17	47	22	129
	Sí	167	54	106	88	415

Uva blanca	No	100	20	61	34	215
	Sí	108	49	79	51	287
Hueso de oliva	No	83	55	86	50	274
	Sí	162	87	108	91	448
Torta de oliva	No	51	9	49	19	128
	Sí	87	29	77	34	227
Pulpa de achicoria	No	24	8	38	12	82
	Sí	128	62	94	73	357

[0134] Los resultados del análisis de monosacáridos se muestran en la Tabla 7 (Rha = ramnosa; GalA = ácido galacturónico; Ara = arabinosa; Gal = galactosa).

Tabla 7

Fuente	Enzima	% molar de Rha	% molar de GalA	% molar de Ara	% molar de Gal	[GalA]:[Rha]	[Gal]:[Rha]	[Ara]:[Rha]
Pimiento morrón	No	6	71	8	7	12,1	1,3	1,3
	Sí	11	46	8	13	4,3	1,2	0,7
Zanahoria	No	6	62	14	16	10,6	2,8	2,4
	Sí	14	47	13	18	3,4	1,3	1,0
Hollejo de manzana	No	2	31	33	11	19,9	6,7	21,1
	Sí	8	14	46	10	1,8	1,3	6,0
Pulpa de cítricos	No	4	39	32	13	9,9	3,3	8,2
	Sí	8	30	37	10	3,9	1,3	4,9
Pulpa de remolacha azucarera	No	4	54	32	7	13,1	1,8	7,8
	Sí	8	39	36	11	4,7	1,3	4,4
Hollejo de arándanos	No	3	75	8	6	26,8	2,3	2,7
	Sí	15	35	20	11	2,4	0,8	1,3
Uva roja	No	7	32	24	15	4,8	2,3	3,6
	Sí	8	19	15	19	2,2	2,2	1,7
Uva blanca	No	7	48	15	14	6,8	1,9	2,1
	Sí	8	39	11	16	4,7	1,9	1,4
Hueso de oliva	No	3	30	14	5	8,9	1,6	4,2
	Sí	8	31	8	9	4,1	1,1	1,1
Torta de oliva	No	8	25	29	9	3,2	1,1	3,7
	Sí	11	29	24	12	2,7	1,1	2,2
Pulpa de achicoria	No	1	68	19	5	68,0	5,0	19,0
	Sí	8	35	48	8	4,4	1,1	6,0

5

Ejemplo 7

[0135] El Ejemplo 3 se repitió en diferentes escalas, es decir a 20 litros (muestra 1), 5 000 litros (muestra 2) y 10 000 litros (muestra 3), usando la enzima Pectinex® Ultra Mash ex Novozymes (condiciones: 0,1 % p/p de dispersión total, 45 °C, 2 horas, inactivación enzimática: 90 °C durante 10 minutos). En las muestras 2 y 3, en lugar de centrifugación, se usó decantación para separar los sólidos del líquido. El sobrenadante se sometió a ultrafiltración, usando una membrana de 10 kDa, para eliminar pequeños componentes moleculares.

10

[0136] La composición de monosacáridos de los materiales de polisacáridos hidrolizados se analizó de la misma manera que en el Ejemplo 1.

15

[0137] Los resultados de los análisis se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8

Muestra	% molar de Rha	% molar de GalA	% molar de Ara	% molar de Gal	[GalA]:[Rha]	[Gal]:[Rha]	[Ara]:[Rha]
1	17	28	30	22	1,6	1,3	1,7
2	17	23	33	20	1,4	1,2	2,0
3	15	28	29	19	1,8	1,2	1,9

[0138] El grado de acetilación y metilación se determinó como sigue: Se trataron muestras de polisacárido (2-5 mg) con hidróxido de sodio (0,1 M, durante la noche, 20 °C). El metanol liberado se midió usando GC de espacio de cabeza equipado con una columna DB-WAX ETR, trampa fría Cryo Focus-4 y detección FID (adaptado de Huisman *et al.*, Food Hydrocolloids, 18, 4, 2004, 665-668).

[0139] Las muestras se neutralizaron (HCl 1 M) y luego se cuantificó el acetilo liberado usando HPLC equipada con una columna Aminex HPX 87H con precolumna y detección RI (adaptada de Voragen *et al.* Food Hydrocolloids, 1, 1, 1986, 65-70).). El grado de esterificación se expresa como cantidad molar de metanol y ácido acético liberada como porcentaje de la cantidad de ácido urónico.

[0140] Los resultados de los análisis del grado de esterificación se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9

	DM %¹	DA %²	DA:DM
2	16	42	2,6
3	21	36	1,7
¹ grado de metilación			
² grado de acetilación			

Ejemplo 8

[0141] La actividad inmunomoduladora de los polisacáridos RG-I de zanahoria hidrolizados enzimáticamente del Ejemplo 7 (Muestras 1 a 3) se determinó usando un ensayo de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) como se describe para el Ejemplo 5. Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 10

	TNF	IL10	IL6	IL1B	Suma
1	131	61	105	72	368
2	181	70	124	136	511
3	107	35	97	72	311

Ejemplo 9

[0142] El material polisacárido hidrolizado de la muestra 2 del Ejemplo 7 se hidrolizó adicionalmente, seguido del aislamiento de una fracción de alto peso molecular. El material polisacárido se disolvió en agua desmineralizada (100 g/l) y se sometió a hidrólisis enzimática adicional (Pectinex® Ultra Mash ex Novozymes, 45 °C, 14 horas). La enzimólisis se terminó calentando a 90 °C durante 10 minutos.

[0143] Una porción de las soluciones de polisacáridos enzimolizados se sometió a fraccionamiento usando cromatografía semipreparativa de exclusión por tamaño para producir una fracción que contenía polisacáridos que tenían un peso molecular de más de 70 kDa.

[0144] La composición de monosacáridos del polisacárido hidrolizado no fraccionado y de la fracción de alto peso molecular aislada se analizó de la misma manera que en el Ejemplo 1.

[0145] Los resultados de los análisis se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11

	% molar de Rha	% molar de GalA	% molar de Ara	% molar de Gal	[GalA]: [Rha]	Ara:Rha	Gal:Rha
No fraccionado	23	31	14	19	1,3	0,6	0,8
>70 kDa	15	23	17	38	1,5	1,1	2,5

[0146] La actividad inmunomoduladora del polisacárido enzimolizado y su fracción de alto peso molecular se determinó usando la metodología descrita en el Ejemplo 5. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12

14 h enzimólisis	TNF	IL10	IL6	IL1B	Suma de todo
No fraccionado	295	95	130	158	678
fracción >70	302	112	139	174	726

kDa					
-----	--	--	--	--	--

Ejemplo 10

[0147] Se dispersó polvo de cáscaras de guisante seco y molido (ex Cosucra, Warcoing, Bélgica) en agua desmineralizada (100 g/l) y se sometió a prehidrólisis enzimática con una alfa-amilasa termoestable (Megazyme) a 90 °C durante 30 min y a hidrólisis posterior usando pectinasa (2 h 45 °C, 0,2 % v/v Pectinex® Ultra Mash, Novozymes). La enzimólisis se terminó calentando a 100 °C durante 10 min, seguido de centrifugación (18 000 g, 10 min) y diálisis extensiva del sobrenadante usando una membrana con un corte de 12-14 kDa (Visking, Londres, Reino Unido). A continuación, el material se liofilizó.

[0148] Se procesó polvo de pulpa de remolacha azucarera molida (ex Suiker Unie, Dinteloord, NL) de la misma manera que el polvo de guisante, excepto que se omitió el paso de preincubación con α -amilasa.

[0149] La composición de monosacáridos de los aislados se determinó usando el mismo método que en el Ejemplo 1. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13

Muestra	% molar de Rha	% molar de GalA	% molar de Ara	% molar de Gal	[GalA]: [Rha]	[Gal]: [Rha]	[Ara]: [Rha]
Guisante	8	57	14	6	7,1	1,8	0,8
Remolacha azucarera	7	40	45	7	5,7	6,4	1,0

Ejemplo 11

[0150] Se prepararon aislados de polisacárido péctico hidrolizado dispersando hollejo de zanahoria en agua (100 g/l).

La muestra 1 se extrajo a 90 °C durante 120 minutos sin enzima añadida (rendimiento del extracto: 4,8 %)

La muestra 2 se extrajo añadiendo Rapidase C600 (una mezcla de enzimas que contenía actividad pectina liasa, poligalacturonasa, pectina esterasa, celulasa y hemicelulasa, Militz, H. Wood Sci.Technol. (1993) 28: 9) con concentración de enzima a 1 g/100 ml de dispersión total, a 45 °C, durante 120 minutos. La enzimólisis se terminó calentando a 100 °C durante 10 min (rendimiento del extracto: 5,6 %)

[0151] Ambas muestras fueron posteriormente centrifugadas (18 000 g, 10 min) y el sobrenadante se dializó extensivamente usando una membrana con un corte de 12-14 kDa (Visking, Londres, Reino Unido). Después de la ultrafiltración/diafiltración, el aislado se liofilizó usando un liofilizador a escala de laboratorio.

[0152] La distribución de tamaño molecular de la Muestra 1 y la Muestra 2, determinada por HPSEC con detección del índice de refracción, se muestra en la Figura 3.

[0153] La composición de monosacáridos de las dos muestras se analizó usando la metodología descrita para el Ejemplo 1. Los resultados de los análisis se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14

	% molar de Rha	% molar de GalA	% molar de Ara	% molar de Gal	[GalA]: [Rha]	[Ara]: [Rha]	[Gal]: [Rha]
Muestra 1	3,7	47,5	8,0	11,5	12,8	3,1	2,2
Muestra 2	8,4	34,7	7,3	12,2	4,1	1,5	0,9

REIVINDICACIONES

1. Método para producir un aislado de polisacárido péctico hidrolizado que está enriquecido en ramnogalacturonano-I, comprendiendo dicho método los pasos de:

- proporcionar un sustrato rico en pectina seleccionado de hollejo, extracto acuoso de hollejo, torta de aceite, extracto acuoso de torta de aceite y combinaciones de los mismos, obteniéndose dicho sustrato rico en pectina de uno o más cultivos seleccionados de fruta, zanahoria, oliva, guisantes, remolacha azucarera, achicoria, soja, girasol, colza y maíz sin el uso de solvente orgánico, conteniendo dicho sustrato rico en pectina al menos 3 % en peso de materia seca de polisacáridos pécticos que tienen una cadena principal que consiste en residuos de ácido galacturónico y residuos de ramnosa, estando contenidos los residuos de ramnosa en una cadena principal que consiste en residuos de ácido galacturónico y residuos de ramnosa, estando contenidos dichos residuos de ramnosa en residuos de alfa(1→4)-galacturónico-alfa(1→2)-ramnosa;
- someter el sustrato rico en pectina a tratamiento enzimático para hidrolizar parcialmente los polisacáridos pécticos, comprendiendo dicho tratamiento enzimático el uso de una o más pectinasas seleccionadas de pectina liasa (EC 4.2.2.10), pectato liasa (EC 4.2.2.2), endopoligalacturonasa (EC 3.2.1.15), exopoligalacturonasa (EC 3.2.1.67 y EC 3.2.1.82);
- someter los polisacáridos pécticos parcialmente hidrolizados a ultrafiltración utilizando una membrana de ultrafiltración con un corte de peso molecular en el intervalo de 5 a 100 kDa; y
- recuperar el retenido de ultrafiltración.

2. Método según la reivindicación 1, donde el sustrato rico en pectina se selecciona de hollejo, extracto acuoso de hollejo y combinaciones de los mismos.

3. Método según la reivindicación 1 o 2, donde el aislado de pectina se obtiene de cítricos, manzana, pera, remolacha azucarera, achicoria, zanahoria.

4. Método según la reivindicación 3, donde el aislado de pectina se obtiene a partir de zanahoria y/o manzana.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el sustrato rico en pectina contiene al menos 10-80 % en peso de materia seca de material de celulosa seleccionado de celulosa, hemicelulosa y combinaciones de las mismas.

6. Método según la reivindicación 5, donde al menos el 50 % en peso de los polisacáridos pécticos presentes en el sustrato no se disuelve en agua destilada a 45 °C y pH 5,5 a una concentración de polisacárido péctico de 1 g/l.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde después del tratamiento enzimático y antes de la ultrafiltración, un líquido acuoso que contiene los polisacáridos pécticos parcialmente hidrolizados se somete a separación sólido-líquido.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el sustrato rico en pectina es un aislado de pectina que contiene al menos 10 % en peso de materia seca de polisacáridos pécticos.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el sustrato rico en pectina se somete a tratamiento enzimático en forma de un líquido acuoso que contiene el sustrato rico en pectina y que tiene un contenido de materia seca del 0,5-40 % en peso.

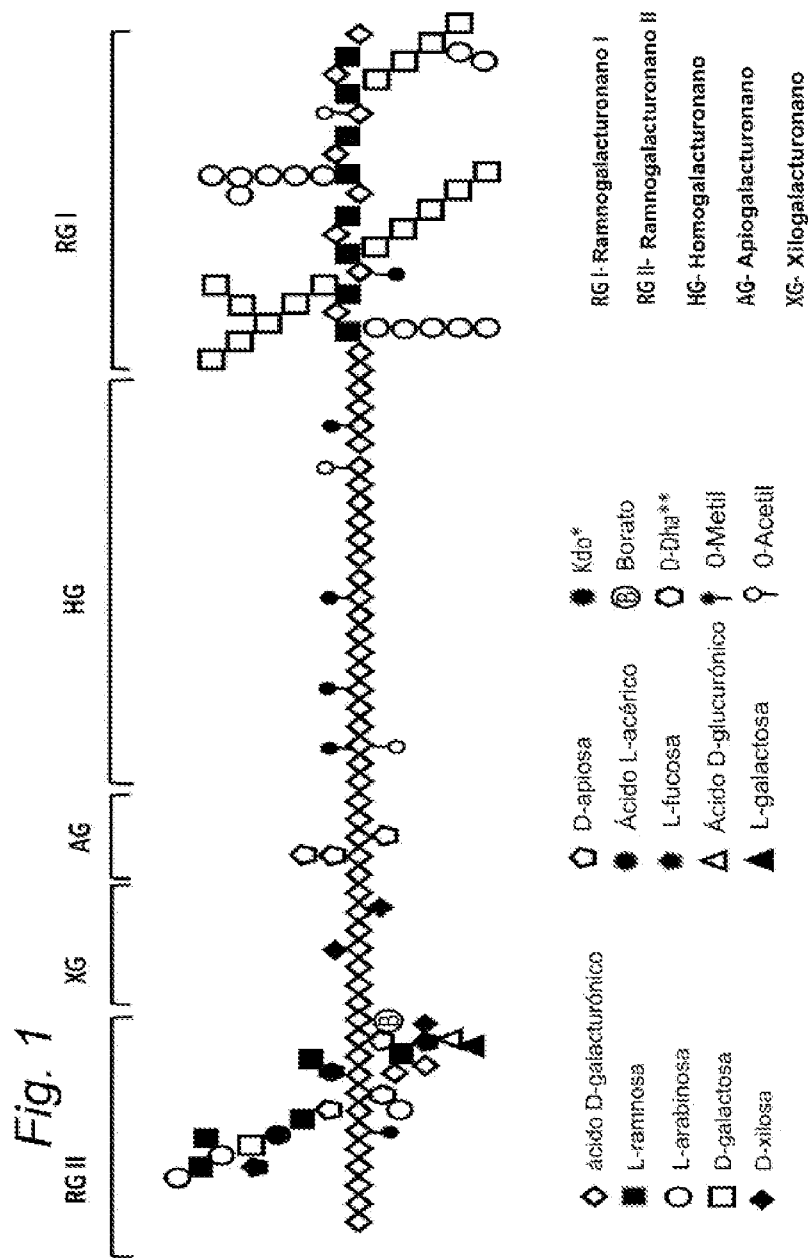
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la una o más pectinasas se seleccionan de pectina liasa (EC4.2.2.10), pectato liasa (EC 4.2.2.2), endopoligalacturonasa (EC 3.2.1.15) y exopoligalacturonasa (EC 3.2.1.67 y EC 3.2.1.82).

11. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el sustrato rico en pectina se somete a tratamiento enzimático, comprendiendo dicho tratamiento el uso de una o más pectinesterasas (EC 3.1.1.11) antes de o simultáneamente con la hidrólisis parcial usando la una o más pectinasas.

12. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los polisacáridos pécticos parcialmente hidrolizados se someten a ultrafiltración usando una membrana de ultrafiltración con un corte de peso molecular en el intervalo de 6-50 kDa.

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el retenido de ultrafiltración recuperado se seca hasta un contenido de agua de menos del 15 % en peso.

14. Aislado de polisacárido péctico hidrolizado obtenido mediante el método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el sustrato rico en pectina se obtiene de uno o más cultivos seleccionados de manzana, pera, zanahoria, remolacha azucarera y achicoria.
- 5 15. Proceso de preparación de un producto seleccionado de entre una formulación nutricional, un producto alimenticio, un suplemento dietético, una bebida o un producto farmacéutico, comprendiendo dicho proceso la adición del aislado de polisacárido péctico hidrolizado según la reivindicación 14 en una concentración de al menos 0,1 % en peso de la materia seca contenida en el producto final.



* Kdo=ácido 3-deoxi-D-manno-2-octulosónico

** D-Dha=ácido 3-deoxi-D-lixo-2-heptulosárico

Fig. 2

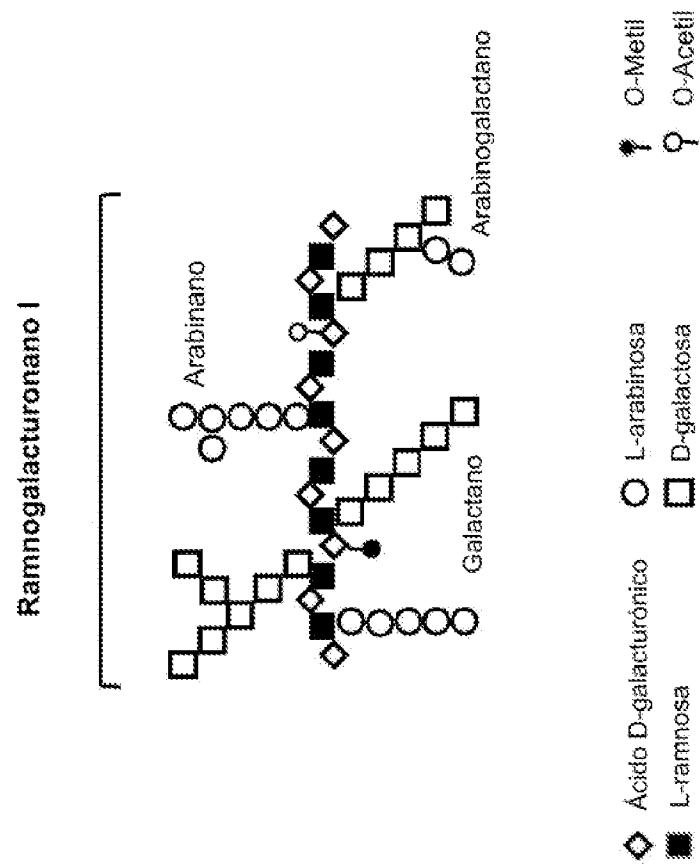


Fig. 3

