

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 138**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/715** (2006.01)

**C08B 37/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2018** **PCT/US2018/038350**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2018** **WO18236917**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2018** **E 18820526 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2024** **EP 3641787**

54 Título: **Producción de oligosacáridos bioactivos**

30 Prioridad:

**20.06.2017 US 201762522604 P**

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

**04.11.2024**

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (100.0%)**  
**1111 Franklin Street 12th Floor**  
**Oakland, CA 94607-5200, US**

72 Inventor/es:

**AMICUCCI, MATTHEW, J.;**  
**PARK, DAYOUNG;**  
**GALERMO, ACE, GITA;**  
**MILLS, DAVID, A.;**  
**GERMAN, JOHN, BRUCE y**  
**LEBRILLA, CARLITO, B.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 985 138 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

Producción de oligosacáridos bioactivos

## 5 Antecedentes de la invención

Las cadenas cortas de moléculas de azúcar de 3 a 20 monosacáridos de longitud, conocidas como oligosacáridos, han sido de gran interés debido a su bioactividad. Esto incluye su capacidad para actuar como prebióticos, modular el sistema inmunológico y bloquear la adhesión de patógenos en el intestino [Hooper, L. V.; Midtvedt, T.; Gordon, J. I., *Annual review of nutrition* **2002**, 22 (1), 283-307]. El mejor ejemplo de estos oligosacáridos son aquellos producidos en la leche humana [LoCascio, R. G. *et al.*, *Journal of agricultural and food chemistry* **2007**, 55 (22), 8914-8919; Marcobal, A. *et al.*, *Journal of agricultural and food chemistry* **2010**, 58 (9), 5334; Wang, M. *et al.*, *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **2015**, 60 (6), 825]. Se sabe que estos compuestos tienen una alta especificidad para enriquecer bacterias específicas en el intestino naciente.

Se han realizado varios esfuerzos para recoger oligosacáridos de productos de origen vegetal y animal. Ejemplos de estos incluyen los galactooligosacáridos (GOS) [Lamsal, B. P., *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2012**, 92 (10), 2020-2028] y oligosacáridos de fructosa (FOS) [Yoshikawa, J. *et al.*, *Biotechnology letters* **2008**, 30 (3), 535-539]. Estos productos se emplean actualmente en aplicaciones nutraceuticas y farmaceuticas.

Con excepción de los oligosacáridos de la leche humana, las cadenas cortas de oligosacáridos no conjugados no se encuentran fácilmente en la naturaleza. Adicionalmente, la síntesis de estos compuestos es costosa y el aislamiento es difícil ya que los oligosacáridos no existen en gran abundancia en la mayoría de los productos naturales. Los polisacáridos, moléculas de azúcar de hasta 100.000 monosacáridos de longitud, son muy abundantes en la naturaleza a partir de plantas, bacterias y levaduras, pero son demasiado grandes para poseer actividad biológica.

La química de Fenton se basa en la generación de radicales hidroxilo e hidroperoxilo usando un catalizador de hierro [Neyens, E.; Baeyens, J., *Journal of Hazardous materials* **2003**, 98 (1), 33-50; Walling, C., *Accounts of chemical research* **1975**, 8 (4), 125-131], estos productos radicales pueden a su vez oxidar una diversidad de sustratos diferentes [Kuo, W., *Water Research* **1992**, 26 (7), 881-886; Lin, S. H.; Lo, C. C., *Water research* **1997**, 31 (8), 2050-2056; Watts, R. J. *et al.*, *Hazardous Waste and Hazardous Materials* **1990**, 7 (4), 335-345; Zazo, J. *et al.*, *Environmental science & technology* **2005**, 39 (23), 9295-9302]. De manera notable, la oxidación de Fenton se ha usado como herramienta analítica para determinar complejos de ácidos nucleicos e interacciones proteína-proteína mediante la escisión selectiva de sus respectivos polímeros [Meares, C. F. *et al.*, *Methods in enzymology* **2003**, 371, 82-106; Rana, T. M.; Meares, C. F., *Journal of the American Chemical Society* **1990**, 112 (6), 2457-2458]. La oxidación y la degradación oxidativa de carbohidratos con y sin un catalizador de hierro han sido de gran interés, especialmente en la funcionalización del almidón y la celulosa y en la degradación de los polisacáridos de la madera [Emery, J. A. *et al.*, *Wood Science and Technology* **1974**, 8 (2), 123-137; Xu, G.; Goodell, B., *Journal of Biotechnology* **2001**, 87 (1), 43-57; Haskins, J. F.; Hogsed, M. J., *The Journal of Organic Chemistry* **1950**, 15 (6), 1264-1274; Šelih, V. S. *et al.*, *Polymer Degradation and Stability* **2007**, 92 (8), 1476-1481; Parovuori, P. *et al.*, *Starch-Starke* **1995**, 47 (1), 19-23]. Los mecanismos y los resultados de las oxidaciones tipo Fenton en mono-, di- y oligosacáridos se han estudiado por varios investigadores. La oxidación de carbohidratos de Fenton tiende a tener una especificidad inherente. Se ha demostrado que los disacáridos se oxidan más fácilmente que los monosacáridos y los alcoholes de azúcar [Morelli, R. *et al.*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2003**, 51 (25), 7418-7425], mientras que los enlaces (1→6) tienden a ser más lábiles que los enlaces (1→4) [Uchida, K.; Kawakishi, S., *Carbohydrate Research* **1988**, 173 (1), 89-99].

Más recientemente, los sistemas Fenton se han usado para la despolimerización de sulfato de condroitina, heparina y otros glucosaminoglicanos [Achour, O. *et al.*, *Carbohydrate Polymers* **2013**, 97 (2), 684-689; Li, J.-h. *et al.*, *Marine Drugs* **2016**, 14 (9), 170; Petit, A. C. *et al.*, *Carbohydrate Polymers* **2006**, 64 (4), 597-602; Wu, M. *et al.*, *Carbohydrate Polymers* **2010**, 80 (4), 1116-1124]. Todos estos artículos usan un sustrato que contiene ácido en forma de restos de ácido idurónico o glucurónico. Panagos *et al.*, *Carbohydrate Polymers* **2011**, 87, 2086-2092 describen un método para despolimerizar dermatán sulfato (DS) en una mezcla de oligosacáridos, que comprende hacer reaccionar DS con Cu<sup>2+</sup> 0,01 M y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a pH=7,5 en una reacción de tipo Fenton, mientras se ajusta el pH cada 5 minutos añadiendo NaOH 0,1 M para neutralizar los iones H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> generados por la propia reacción.

## Breve resumen de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones. Las realizaciones que no entran dentro de las reivindicaciones tienen solo fines ilustrativos.

Se proporciona un método para la formación de oligosacáridos a partir de polisacáridos. En algunas realizaciones, el método comprende hacer reaccionar polisacáridos con peróxido de hidrógeno y Fe<sup>3+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> u otros metales como se analiza en el presente documento seguido de la escisión de enlaces glucosídicos en los polisacáridos con una base, generando de esta manera oligosacáridos a partir de los polisacáridos. Esta reacción se denomina en el presente documento "FITDOG".

Los presentes inventores desarrollaron un método para producir oligosacáridos bioactivos digiriendo polisacáridos de

plantas, de bacterias y de levaduras. El método emplea el reactivo de Fenton compuesto por hierro ( $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ) u otro metal de transición (incluyendo pero no limitado a,  $\text{Cu}^{1+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ , etc.) y peróxido de hidrógeno. En algunas realizaciones, los oligosacáridos se producen en el intervalo de DP 3 a 20 (DP se refiere al grado de polimerización). En algunas realizaciones, el método descrito producirá oligosacáridos para análisis y para alimentos bioactivos que son

5 prebióticos, anticancerosos, bloqueantes de patógenos o que tengan otras funciones.

El método puede usarse para convertir polisacáridos (por ejemplo, de plantas, de bacterias o de levaduras) en oligosacáridos bioactivos. El método implica la reacción de polisacáridos con  $\text{Fe}^{3+}$  y peróxido de hidrógeno. Otros iones metálicos que incluyen pero no se limitan a  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  también producen los mismos resultados con eficacia

10 variable. En algunas realizaciones, se deja que la reacción avance durante 30 minutos (o por ejemplo, entre 10 minutos y 4 horas, por ejemplo, de 15 minutos a 2 horas o de 10 minutos a una hora). La reacción se inactiva posteriormente con una base (por ejemplo, hidróxido sódico acuoso, hidróxido cálcico, hidróxido potásico, etc.).

15 En algunas realizaciones, pueden caracterizarse los oligosacáridos resultantes. En algunas realizaciones, el análisis por cromatografía líquida de alta resolución - espectrometría de masas (CL-EM) de la mezcla de productos muestra una serie de estructuras de oligosacáridos que varían en tamaño desde un grado de polimerización de 3 a tanto como 20 (o de 3 hasta 200, por ejemplo), dependiendo de la fuente de polisacárido. Las estructuras y las composiciones de oligosacáridos dependen de las fuentes de polisacáridos.

20 En algunas realizaciones, se proporciona la producción de oligosacáridos a partir de fuentes vegetales que consisten en grados de polimerización (DP) de 3 a 20 (o de 3 a 200, por ejemplo). Los polisacáridos pueden incluir, por ejemplo, aquellos de alimentos conocidos tales como arroz, plátano, calabaza, harina de trigo y polisacáridos como subproducto de la producción de alimentos. En algunas realizaciones, los polisacáridos pueden provenir de productos alimenticios de desecho y de fuentes que normalmente no se consideran alimentos. En algunas realizaciones, la fuente de

25 polisacárido son alimentos procesados y productos vegetales.

En algunas realizaciones, el método proporciona la producción de oligosacáridos (por ejemplo, que tienen un grado de polimerización entre DP 3 y 20 (o desde 3 hasta 200, por ejemplo)) a partir de polisacáridos de la pared celular bacteriana.

30 En algunas realizaciones, el método proporciona la producción de oligosacáridos (por ejemplo, que tienen un grado de polimerización entre DP 3 y 20 (o desde 3 hasta 200, por ejemplo)) a partir de polisacáridos de la pared celular de levadura.

35 En algunas realizaciones, el método proporciona la producción de oligosacáridos (por ejemplo, que tienen un grado de polimerización entre DP 3 y 20 (o desde 3 hasta 200, por ejemplo)) a partir de polisacáridos de algas.

40 En algunas realizaciones, los oligosacáridos son oligosacáridos bioactivos. En algunas realizaciones, los oligosacáridos bioactivos se consumen por bacterias beneficiosas para el intestino humano. En algunas realizaciones, los oligosacáridos bioactivos pueden modular el sistema inmunológico. El oligosacárido puede hacer que el sistema inmunológico reaccione de forma exagerada o insuficiente ante estímulos conocidos y desconocidos. En algunas realizaciones, los oligosacáridos bioactivos funcionan como bloqueadores de patógenos.

45 En algunas realizaciones, los oligosacáridos son sustratos de carbono selectivos para estimular el crecimiento de la microbiota de los suelos. En algunas realizaciones, los oligosacáridos se añaden al suelo siguiendo protocolos de fumigación o esterilización del suelo. El carbono orgánico accesible puede llevar la ecología del suelo en una dirección patógena si no se controla. Al proporcionar oligosacáridos específicos que estimulan selectivamente el crecimiento de la microbiota beneficiosa del suelo, pueden reducirse las poblaciones de patógenos en el suelo. En algunas realizaciones, puede añadirse al suelo una combinación de uno o más oligosacáridos preparados como se describe

50 en el presente documento con uno o más microbios (por ejemplo, microbios beneficiosos del suelo).

En algunas realizaciones, pueden usarse uno o más oligosacáridos preparados como se describe en el presente documento para generar un prebiótico para suplementación alimenticia. En algunas realizaciones, los oligosacáridos pueden contribuir al control del apetito y/o al control de la ingesta energética (calórica) en niños con sobrepeso y

55 obesidad.

En algunas realizaciones, se proporciona un método para crear fibra soluble a partir de fibra insoluble que comprende polisacáridos usando las condiciones de reacción descritas en el presente documento. Al ejecutar la reacción solo hasta cierto grado, uno puede generar composiciones que tengan características deseables (por ejemplo, geles o ungüentos). Los productos de fibra soluble pueden ser útiles para varios usos, incluyendo pero no limitado a productos

60 y dispositivos médicos, productos alimenticios (es decir, espesantes, enmiendas nutricionales, modificaciones de sabor), enmiendas del suelo (para enriquecer componentes específicos beneficiosos del microbioma del suelo) y producción de fibras (es decir, textiles novedosos, cuerdas, envases biodegradables, etc.). En algunas realizaciones, por ejemplo, la fibra insoluble es el algodón.

65 En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para generar oligosacáridos a partir de polisacáridos. En algunas

realizaciones, el método comprende, hacer reaccionar polisacáridos en una mezcla de reacción con peróxido de hidrógeno y un metal de transición o un metal alcalinotérreo; seguido de inactivar la reacción con una base y/o escindir enlaces glucosídicos en los polisacáridos con una base, generando de esta manera una mezcla de oligosacáridos a partir de los polisacáridos. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende un metal de transición. En algunas realizaciones, el metal de transición se selecciona de hierro (por ejemplo,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ), cobre (por ejemplo,  $\text{Cu}^{2+}$ ), manganeso, cobalto o molibdeno. En algunas realizaciones, la mezcla de reacción comprende un metal alcalinotérreo. En algunas realizaciones, el metal alcalinotérreo se selecciona de calcio o magnesio.

En algunas realizaciones, el metal de transición o el metal alcalinotérreo en la mezcla de reacción está en una concentración de al menos 0,65 nM. En algunas realizaciones, el metal de transición o el metal alcalinotérreo en la mezcla de reacción está en una concentración de 0,65 nM a 500 nM. En algunas realizaciones, el peróxido de hidrógeno en la mezcla de reacción está en una concentración de al menos 0,02 M. En algunas realizaciones, el peróxido de hidrógeno en la mezcla de reacción está en una concentración de 0,02 M a 1 M. En algunas realizaciones, la base es hidróxido sódico, hidróxido potásico o hidróxido cálcico. En algunas realizaciones, la base está en una concentración de al menos 0,1 M. En algunas realizaciones, la base está en una concentración de 0,1 M - 5,0 M. En algunas realizaciones, los polisacáridos incluyen uno o más de amilosa, amilopectina, betaglucano, pululano, xiloglucano, arabinogalactano I y arabinogalactano II, ramnogalacturonano I, ramnogalacturonano II, galactano, arabinano, arabinoxilano, xilano (por ejemplo, xilano de madera de haya), glucógeno, manano, glucomanano, curdlano o inulina. En algunas realizaciones, los polisacáridos son de origen vegetal o animal. En algunas realizaciones, los polisacáridos provienen de una fuente bacteriana o de algas. En algunas realizaciones, los polisacáridos se encuentran en forma de material vegetal (opcionalmente liofilizado). En algunas realizaciones, el material vegetal es material vegetal de plátano, de garbanzo o de mijo. En algunas realizaciones, el método comprende además purificar uno o más oligosacáridos de la mezcla de oligosacáridos.

En algunas realizaciones, antes de la reacción, el método comprende poner en contacto polisacáridos con una o más enzimas degradantes de polisacáridos. En algunas realizaciones, la una o más enzimas degradantes de polisacáridos comprenden una amilasa, una isoamilasa, una celulasa, una maltasa, una glucanasa o una combinación de las mismas.

También se describen composiciones que comprenden la mezcla de oligosacáridos como se genera en el método anterior o en otro lugar del presente documento o el uno o más oligosacáridos purificados como se generan en el método anterior o en otro lugar del presente documento.

También se describe un oligosacárido de la Tabla 1, o una mezcla de dos o más oligosacáridos de la Tabla 1.

También se proporciona un método para estimular microbios *in vitro* o *in vivo*. En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto un microbio (por ejemplo, bacterias, hongos, levaduras) con una composición que comprende la mezcla de oligosacáridos generados en el método anterior o como se describe en otra parte del presente documento (por ejemplo, Tabla 1) o un oligosacárido de la Tabla en condiciones para estimular selectivamente el crecimiento del microbio. En algunas realizaciones, los microbios son microbios probióticos. En algunas realizaciones, los microbios están en el intestino de un animal y la composición se administra al animal. En algunas realizaciones, el microbio probiótico se administra al animal, ya sea por separado de la composición o simultáneamente con la composición. En algunas realizaciones, el microbio probiótico es *Bifidobacterium pseudocatenulatum*. En algunas realizaciones, los microbios son microbios del suelo, microbios orales (por ejemplo, bacterias) o microbios de la piel (por ejemplo, bacterias).

## Definiciones

El "grado de polimerización" o "DP" de un oligosacárido se refiere al número total de unidades de monómero de azúcar que forman parte de un oligosacárido particular. Por ejemplo, un tetra galactooligosacárido tiene un DP de 4, teniendo 3 restos de galactosa y un resto de glucosa.

El término "*Bifidobacterium*" y sus sinónimos se refieren a un género de bacterias anaeróbicas que tienen propiedades beneficiosas para los seres humanos. *Bifidobacterium* es una de las principales cepas de bacterias que forman la flora intestinal, las bacterias que residen en el tracto gastrointestinal y tienen beneficios para la salud de sus huéspedes. Véase, por ejemplo, Guarner F y Malagelada JR. *Lancet* (2003) 361, 512-519, para una descripción más detallada de *Bifidobacterium* en la flora intestinal normal.

Un "prebiótico" o "nutriente prebiótico" es generalmente un ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente a un huésped cuando se ingiere estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de uno o un número limitado de microbios en el tracto gastrointestinal. Como se usa en el presente documento, el término "prebiótico" se refiere a los ingredientes alimentarios no digeribles descritos anteriormente en sus estados no naturales, por ejemplo, después de la purificación, la síntesis química o enzimática en contraposición a, por ejemplo, en la leche humana entera.

Un "probiótico" se refiere a microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un

beneficio para la salud del huésped.

Como se usa en el presente documento, los términos y expresiones "alrededor de" y "aproximadamente", cuando se usan para modificar una cantidad especificada en un valor o intervalo numérico, indican que el valor numérico así como las desviaciones razonables del valor conocido por el experto en la materia, por ejemplo,  $\pm 20\%$ ,  $\pm 10\%$  o  $\pm 5\%$ , están dentro del significado previsto del valor recitado.

#### Breve descripción de los dibujos

- 10 **FIG. 1.** Ejemplo MALDI-MS para oligosacáridos de xiloglucano producidos por FITDOG.
- FIG. 2.** Optimización de las concentraciones de sulfato de hierro (III) para producir abundancias óptimas de oligosacáridos.
- 15 **FIG. 3.** Optimización del pH del tampón para producir abundancias óptimas de oligosacáridos.
- FIG. 4.** Optimización de las concentraciones de NaOH y Peróxido de hidrógeno.
- FIG. 5.** Optimización de las condiciones de Tiempo y Temperatura.
- 20 **FIG. 6.** Perfil de HPLC-MS de oligosacáridos de guisantes verdes generados por  $\text{CuCl}_2$ ,  $\text{FeSO}_4$  y  $\text{Fe}_3(\text{SO}_4)_2$ .
- FIG. 7.** Composición relativa de monosacáridos de los alimentos que se sometieron al tratamiento FITDOG.
- 25 **FIG. 8.** Cromatogramas de picos base anotados para cáscara de plátano, garbanzos y mijo que se sometieron al tratamiento FITDOG. Las anotaciones corresponden con la designación del compuesto en la **Tabla 1**.
- FIG. 9.** El crecimiento de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* MP80 sobre oligosacáridos generados a partir de la oxidación de Fenton de calabaza.
- 30 La **FIG. 10** muestra cromatogramas de picos base anotados para xilano.
- La **FIG. 11** muestra cromatogramas de picos base anotados para arabinoxilano.
- 35 La **FIG. 12** muestra cromatogramas de picos base anotados para liquenano.
- La **FIG. 13** muestra cromatogramas de picos base anotados para galactomanano.
- La **FIG. 14** muestra cromatogramas de picos base anotados para amilopectina.
- 40 La **FIG. 15** muestra cromatogramas de picos base anotados para amilosa.
- La **FIG. 16** muestra cromatogramas de picos base anotados para ramnogalacturonano I.
- 45 La **FIG. 17** muestra cromatogramas de picos base anotados para xiloglucano.
- La **FIG. 18** muestra cromatogramas de picos base anotados para curdlano.
- La **FIG. 19** muestra cromatogramas de picos base anotados para galactano.
- 50 La **FIG. 20** muestra cromatogramas de picos base anotados para manano.
- La **FIG. 21** muestra cromatogramas de picos base anotados para glucomanano.
- 55 La **FIG. 22** muestra cromatogramas de picos base anotados para arabinogalactano de alerce.
- La **FIG. 23** muestra cromatogramas de picos base anotados para ácido poligalacturónico.
- La **FIG. 24** muestra cromatogramas de picos base anotados para inulina.
- 60 La **FIG. 25** muestra cromatogramas de picos base anotados para amilosa en los cuales se usaron diferentes metales en el método Fitdog.
- 65 La **FIG. 26** muestra cromatogramas de picos base anotados para amilosa en los cuales se usaron diferentes metales en el método Fitdog.

La FIG. 27 muestra cromatogramas de picos base anotados para amilosa.

La FIG. 28 muestra cromatogramas de picos base anotados para polisacáridos de la pared celular de levadura.

- 5 La FIG. 29 muestra cromatogramas de picos base anotados para calabaza que se sometió a FITDOG a escala de litros, mostrando un intervalo de polimerización de 1-200+ Hexosas. Estos datos se analizaron en un espectrómetro de masas HPLC/Q-TOF de nanochip. Se demostró que los grados de polimerización de 4-7 Hexosas eran los de mayor abundancia.

## 10 Descripción detallada de la invención

La iniciación de Fenton hacia grupos definidos de oligosacáridos (FITDOG) es un método para la degradación controlada de polisacáridos en oligosacáridos. En algunas realizaciones, los polisacáridos brutos primero se someten a un tratamiento oxidativo inicial con peróxido de hidrógeno y un catalizador de metal de transición o metal alcalinotérreo (por ejemplo, sulfato de hierro (III)) para hacer que los enlaces glucosídicos sean más lábiles. Después se usa NaOH u otra base para la escisión inducida por bases, que da como resultado una diversidad de oligosacáridos. Se produce una neutralización inmediata para reducir la reacción de descamación. Este método tiene la capacidad de generar grandes cantidades de oligosacáridos biológicamente activos a partir de una diversidad de fuentes de carbohidratos.

Si se desea, el polisacárido puede tratarse opcionalmente con una o más enzimas que degradan el polisacárido para reducir el tamaño promedio o la complejidad del polisacárido antes de que los polisacáridos resultantes se traten con el tratamiento oxidativo y el catalizador metálico. Los ejemplos no limitantes de enzimas de polisacáridos incluyen, por ejemplo, amilasa, isoamilasa, celulasa, maltasa, glucanasa o una combinación de las mismas.

El tratamiento oxidativo inicial puede incluir peróxido de hidrógeno y un metal de transición o un metal alcalinotérreo. Se han probado metales con diferentes estados de oxidación, tamaños, grupos periódicos y números de coordinación para comprender la aplicación con el proceso FITDOG. Cada uno de los diferentes metales ha mostrado actividad en la reacción FITDOG. Aunque estos metales funcionan con cualquier polisacárido, pueden usarse diferentes metales para producir oligosacáridos con grados preferenciales de polimerización. Al tratamiento oxidativo le sigue un tratamiento base. El método es capaz de generar oligosacáridos a partir de polisacáridos que tienen diversos grados de ramificación y que tienen una diversidad de composiciones de monosacáridos, incluyendo polisacáridos naturales y modificados. Este método funcionará con polisacáridos de cualquier fuente. Los sustratos de polisacáridos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, uno o más de amilosa, amilopectina, betaglucono, pululano, xiloglucono, arabinogalactano I y arabinogalactano II, ramnogalacturonano I, ramnogalacturonano II, galactano, arabinano, arabinoxilano, xilano (por ejemplo, xilano de madera de haya), glucógeno, manano, glucomanano, curdlano o inulina.

En algunas realizaciones, la mezcla resultante de oligosacáridos generada por el método puede tener en promedio un grado de polimerización entre 2-200, por ejemplo, entre 2-100 o 3-20 o 5-50.

La mezcla resultante de oligosacáridos generada por el método puede tener una diversidad de usos. En algunas realizaciones, la mezcla de oligosacáridos puede usarse como un prebiótico para estimular selectivamente el crecimiento de una o más bacterias probióticas. En algunas realizaciones, las composiciones de oligosacáridos pueden administrarse como una formulación prebiótica (es decir, sin bacterias) o como una formulación probiótica (es decir, con bacterias deseables tales como bifidobacterias como se describe en el presente documento). En general, cualquier alimento o bebida que pueda ser consumido por seres humanos o animales puede usarse para elaborar formulaciones que contengan composiciones que contienen oligosacáridos prebióticos y probióticos. Los alimentos ilustrativos incluyen aquellos con una consistencia semilíquida para permitir una dispersión fácil y uniforme de las composiciones prebióticas y probióticas descritas en el presente documento. Sin embargo, otras consistencias (por ejemplo, polvos, líquidos, etc.) también pueden usarse sin limitación. En consecuencia, tales artículos alimentarios incluyen, sin limitación, productos lácteos tales como queso, requesón, yogur y helado. Las frutas y verduras procesadas, incluyendo aquellas destinadas a bebés/niños pequeños, tales como puré de manzana o guisantes y zanahorias colados, también son adecuados para su uso en combinación con los oligosacáridos de la presente invención. Tanto los cereales infantiles como los cereales a base de arroz o avena como los cereales para adultos como Musilix también son adecuados para su uso en combinación con los oligosacáridos. Además de los alimentos destinados al consumo humano, los piensos para animales también pueden suplementarse con composiciones que contienen oligosacáridos prebióticos y probióticos.

Como alternativa, las composiciones que contienen oligosacáridos prebióticos y probióticos pueden usarse para suplementar una bebida. Los ejemplos de tales bebidas incluyen, sin limitación, fórmulas para lactantes, fórmulas de seguimiento, bebidas para niños pequeños, leche, leche fermentada, zumo de frutas, bebidas a base de frutas y bebidas deportivas. Muchas fórmulas para bebés y niños pequeños son conocidas en la técnica y están disponibles en el mercado, incluyendo, por ejemplo, Carnation Good Start (Nestlé Nutrition Division; Glendale, Calif.) y Nutrish A/B producida por Mayfield Dairy Farms (Athens, Term.). Otros ejemplos de fórmula para bebés o lactantes incluyen aquellos descritos en la Patente de EE.UU. N.º 5.902.617. Otras formulaciones beneficiosas de las composiciones incluyen la suplementación de leches animales, tales como la leche de vaca.

Como alternativa, las composiciones que contienen oligosacáridos prebióticos y probióticos pueden formularse en píldoras o comprimidos o encapsularse en cápsulas, tales como cápsulas de gelatina. Las formas de comprimido pueden incluir opcionalmente, por ejemplo, uno o más de lactosa, sacarosa, manitol, sorbitol, fosfatos cálcicos, almidón de maíz, almidón de patata, celulosa microcristalina, gelatina, dióxido de silicio coloidal, talco, estearato de magnesio, ácido esteárico y otros excipientes, colorantes, cargas, aglutinantes, diluyentes, agentes tampón, agentes humectantes, conservantes, agentes saborizantes, tintes, agentes disgregantes y vehículos farmacéuticamente compatibles. Las formas de pastillas o caramelos pueden comprender las composiciones en un sabor, por ejemplo, sacarosa, así como pastillas que comprenden las composiciones en una base inerte, tales como emulsiones de gelatina y glicerina o sacarosa y goma arábiga, geles y similares que contienen, además del principio activo, vehículos conocidos en la técnica. Las formulaciones que contienen oligosacáridos prebióticos o probióticos también pueden contener cargas y extensores de complementos alimenticios convencionales tales como, por ejemplo, harina de arroz.

En algunas realizaciones, la composición que contiene oligosacáridos prebióticos o probióticos comprenderá además una proteína no humana, un lípido no humano, un carbohidrato no humano u otro componente no humano. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las composiciones comprenden una proteína de leche bovina (u otra no humana), una proteína de soja, una proteína de arroz, betalactoglobulina, suero de la leche, aceite de soja o almidón.

Las dosificaciones de las composiciones que contienen oligosacáridos prebióticos y probióticos variarán dependiendo de los requisitos del individuo y tendrán en cuenta factores tales como la edad (bebé frente a adulto), el peso y las razones de la pérdida de bacterias intestinales beneficiosas (por ejemplo, terapia con antibióticos, quimioterapia, enfermedad o edad). La cantidad administrada a un individuo, en el contexto de la presente divulgación, debería ser suficiente para establecer la colonización del intestino con bacterias beneficiosas a lo largo del tiempo. El tamaño de la dosis se determinará también según la existencia, la naturaleza y el alcance de cualquier efecto secundario adverso que pueda acompañar a la administración de una composición que contiene oligosacáridos prebióticos o probióticos. En algunas realizaciones, el intervalo de dosificación será eficaz como un suplemento alimenticio y para restablecer las bacterias beneficiosas en el tracto intestinal. En algunas realizaciones, la dosificación de una composición de oligosacáridos de la presente invención varía de aproximadamente 1 microgramo/l a aproximadamente 25 gramos/l de oligosacáridos. En algunas realizaciones, la dosificación de una composición de oligosacáridos es de aproximadamente 100 microgramos/l a aproximadamente 15 gramos/l de oligosacáridos. En algunas realizaciones, la dosificación de una composición de oligosacáridos es de aproximadamente 1 gramo/l a aproximadamente 10 gramos/l de oligosacáridos. Las dosificaciones ilustrativas de *Bifidobacterium* incluyen, pero no se limitan a, de aproximadamente  $10^4$  a aproximadamente  $10^{12}$  unidades formadoras de colonias (UFC) por dosis. Un intervalo ventajoso adicional es de aproximadamente  $10^6$  a aproximadamente  $10^{10}$  UFC.

Las formulaciones que contienen oligosacáridos prebióticos o probióticos pueden administrarse a cualquier individuo que las necesite. En algunas realizaciones, el individuo es un bebé o un niño pequeño. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el individuo tiene menos de, por ejemplo, 3 meses, 6 meses, 9 meses, un año, dos años o tres años. En algunas realizaciones, el individuo tiene entre 3-18 años. En algunas realizaciones, el individuo es un adulto (por ejemplo, 18 años o más). En algunas realizaciones, el individuo tiene más de 50, 55, 60, 65, 70 o 75 años. En algunas realizaciones, el individuo es inmunodeficiente (por ejemplo, el individuo tiene SIDA o está en quimioterapia).

Las *Bifidobacterium* ilustrativas que pueden incluirse en las composiciones probióticas de la invención incluyen, pero no se limitan a, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, *B. longum* subsp. *longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium adolescentis* y *B. pseudocatenulatum*. La *Bifidobacterium* usada dependerá en parte del consumidor diana.

Se apreciará que puede ser ventajoso para algunas aplicaciones incluir otros factores bifidogénicos en las formulaciones descritas en el presente documento. Dichos componentes adicionales pueden incluir, pero no se limitan a, fructooligosacáridos tales como Raftilosa (Rhône-Poulenc, Cranbury, N.J.), inulina (Imperial Holly Corp., Sugar Land, Tex.) y Nutraflora (Golden Technologies, Westminster, Colo.), así como lactosa, xilooligosacáridos, oligosacáridos de soja, lactulosa/lactitol y galactooligosacáridos entre otros. En algunas aplicaciones, otras bacterias beneficiosas, tales como *Lactobacillus*, *Rumminococcus*, *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Faecalibacterium* pueden incluirse en las formulaciones.

Los oligosacáridos como se describen en el presente documento, pueden usarse para estimular microbios de cualquier tipo. Algunos ejemplos de microbios que pueden estimularse por los oligosacáridos incluyen, por ejemplo, microbios del suelo (por ejemplo, hongos micorrízicos y bacterias y otros microbios usados como inoculantes del suelo tales como *Azospirillum* sp.), bacterias orales (por ejemplo, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguis* y *S. oralis*) y bacterias de la piel (por ejemplo, *Propionibacterium acnes*, también bacterias oxidantes de amoníaco, incluyendo pero no limitado a *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosospira*, *Nitrosocystis*, *Nitrosolobus* y *Nitrosovibrio*).

En algunas realizaciones, las composiciones de oligosacáridos se administran a un ser humano o animal que lo necesite. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las composiciones de oligosacáridos se administran a una persona o animal que tiene al menos una afección seleccionada del grupo que consiste en síndrome inflamatorio del intestino,

estreñimiento, diarrea, colitis, enfermedad de Crohn, cáncer de colon, trastorno intestinal funcional (FBD), síndrome del intestino irritable (IBS), exceso de bacterias reductoras de sulfato, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) y colitis ulcerosa. El síndrome del intestino irritable (IBS) se caracteriza por dolor y malestar abdominal, hinchazón y función intestinal alterada, estreñimiento y/o diarrea. Hay tres grupos de IBS: IBS con predominio de estreñimiento (C-IBS), IBS alternante (A-IBS) e IBS con predominio de diarrea (D-IBS). Las composiciones de oligosacáridos son útiles, por ejemplo, para reprimir o prolongar los períodos de remisión en pacientes ulcerosos. Las composiciones de oligosacáridos pueden administrarse para tratar o prevenir cualquier forma de trastorno intestinal funcional (FBD) y, en particular, síndrome del intestino irritable (IBS), tal como IBS con predominio de estreñimiento (C-IBS), IBS alternante (A-IBS) e IBS con predominio de diarrea (D-IBS); estreñimiento funcional y diarrea funcional. FBD es un término general para una diversidad de trastornos gastrointestinales que son crónicos o semicrónicos y que están asociados a dolor intestinal, alteración de la función intestinal y alteración social.

En otra realización, las composiciones de oligosacáridos se administran a aquellos que necesitan estimulación del sistema inmunológico y/o para promover la resistencia a infecciones bacterianas o por hongos, por ejemplo, *Candidiasis* o enfermedades inducidas por bacterias reductoras de sulfato.

## Ejemplo

### Ejemplo 1

La capacidad de crear oligosacáridos a partir de polisacáridos mediante despolimerización es una solución atractiva. Actualmente los polisacáridos se despolimerizan de dos formas, hidrólisis ácida y tratamiento enzimático con glicosil hidrolasas. Ambas técnicas tienen sus propios inconvenientes, la hidrólisis ácida tiende a producir grandes cantidades de monosacáridos y muy pequeñas cantidades de oligosacáridos. Por otra parte, el tratamiento enzimático puede producir grandes cantidades de oligosacáridos, pero cada glicosil hidrolasa solo puede escindir en sitios muy específicos dependiendo de la posición del enlace, la estereoquímica y la disposición de monosacáridos del entorno circundante. Esto significa que incluso si se conocen y están disponibles enzimas capaces de despolimerizar un polisacárido específico, no sería capaz de degradar a gran escala los polisacáridos estructuralmente diversos que se encuentran en los productos naturales.

Aunque hay informes de despolimerización de polisacáridos que contienen celulosa y ácido, todavía no existe un método que pueda despolimerizar eficazmente los polisacáridos neutros usando sistemas Fenton. Adicionalmente, no se ha demostrado el uso de sistemas Fenton para preparar grandes cantidades de oligosacáridos a partir de productos naturales brutos con altos rendimientos. El siguiente ejemplo tiene por objeto mostrar los métodos a escala analítica y preparativa y las aplicaciones de la iniciación hacia la disociación de grupos oligosacáridos (FITDOG) de Fenton para la creación de oligosacáridos de alto rendimiento a partir de aislados de polisacáridos y de productos naturales.

## MÉTODOS

### *Materiales*

Los alimentos se obtuvieron de un supermercado local. Acetato sódico, peróxido de hidrógeno (30 % p/p), hidróxido sódico, sulfato de hierro (III) pentahidrato y ácido acético glacial se adquirieron todos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

### *Iniciación de Fenton a pequeña escala hacia la disociación de grupos oligosacáridos (FITDOG)*

Se preparó una solución que contenía tampón acetato sódico al 95 % (v/v) ajustado a pH 5 con ácido acético glacial, peróxido de hidrógeno al 5 % (v/v) (30 % p/p) y sulfato de hierro (III) 65 nM. Esta mezcla se agitó y se añadió a patrones de polisacáridos secos para obtener una solución final de 1 mg/ml. La reacción se incubó a 100 °C durante 20 minutos. Después de reaccionar, se añadió la mitad del volumen de reacción de NaOH 2 M frío y se agitó antes de añadir el 0,6 % del volumen de reacción inicial de ácido acético concentrado para neutralizar.

### *Purificación de oligosacáridos generados por FITDOG a pequeña escala*

Los oligosacáridos se aislaron usando cartuchos de carbón grafitado no poroso (GCC-SPE). Los cartuchos se lavaron con acetonitrilo al 80 % en ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 % (v/v) y agua nanopura. Los oligosacáridos se cargaron y lavaron con 5 volúmenes de columna de agua nanopura. Los oligosacáridos se eluyeron con acetonitrilo al 40 % con TFA al 0,05 % (v/v).

### *Iniciación de Fenton a gran escala hacia la disociación de grupos oligosacáridos (FITDOG)*

El alimento se liofilizó hasta sequedad completa y se molió hasta obtener un polvo fino en un molinillo KRUPS F203 (Millville, NJ). Se llevó a ebullición una solución de 950 ml de tampón acetato sódico 40 mM ajustado a pH 5 con ácido acético glacial en un matraz de fondo redondo de 2 litros equipado con un condensador de columna de agua fría. Al matraz, se añadieron 1,0 gramos de alimento molido liofilizado, 32 mg de sulfato de hierro (III) y 50 ml de peróxido de hidrógeno al 30 % (p/p) al matraz. La solución se deja reaccionar durante 20 minutos con una barra agitadora. Para



inducir la escisión, se añaden 500 ml de NaOH 2 M enfriado con hielo y se agita durante 30 segundos antes de añadir 61,5 ml de ácido acético glacial enfriado con hielo para neutralizar la reacción.

#### *Purificación de oligosacáridos generados por FITDOG a gran escala*

El hierro floculado se eliminó filtrándolo a través de un filtro de polifluoruro de vinilideno (PVDF) de 0,45 µm. Se usó una columna de cromatografía líquida ultrarrápida (Flash-LC) de carbono grafitado poroso (PGC) autoempaquetada de 50 g con un cromatógrafo líquido ultrarrápido CombiFlash Rf200 (Teledyne Isco). La muestra se cargó en la columna a una velocidad de 7 ml/min. Se usó un sistema de disolventes binario que consistía en A: agua nanopura y B: acetonitrilo (calidad HPLC). La muestra se lavó con 100 % de disolvente A durante 20 minutos a 10 ml/min antes de iniciar un gradiente del 0 % al 80 % de disolvente B durante 140 minutos, después isocrático al 80 % de disolvente B durante 20 minutos. El eluyente se dirigió a desecho excepto en los minutos 40-100, donde se recogió en una botella de vidrio. El eluyente recogido se secó en un evaporador rotatorio durante 1 hora para eliminar el acetonitrilo. El líquido restante se evaporó en un liofilizador.

#### *Análisis mediante espectrometría de masas de ionización y desorción láser asistida por matriz (MALDI-MS)*

Las muestras se reconstituyeron en agua nanopura. Se sembró 1 µl de muestras directamente sobre una placa MALDI de acero inoxidable. A esto se añadieron 0,3 µl de NaCl 0,01 M y 0,7 µl de 25 mg/ml de ácido 2,5-dihidroxibenzoico y se mezclaron dentro de la punta de la pipeta. Las muestras se secaron después al vacío. Las muestras se procesaron en un instrumento Bruker UltraFlexreme MALDI-TOF/TOF. El instrumento se hizo funcionar en modo positivo y usó el 95 % de la potencia máxima del láser.

#### *Análisis por espectrometría de masas de tiempo de vuelo chip-HPLC-nano/cuadrupolo (chip-HPLC-nano/Q-TOF MS)*

Las muestras se reconstituyeron en agua nanopura antes del análisis mediante chip-HPLC-nano/Q-TOF MS. El sistema incluye dos bombas, una bomba capilar para carga de muestras y una nanobomba para separación analítica. En este sistema un HPLC Agilent serie 1200 está acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 6520 Q-TOF a través de una interfaz de cubo de chip. El chip contiene una columna de enriquecimiento de 40 nl y una columna analítica de 75 µm × 43 mm, ambas columnas están empaquetadas con PGC. La carga de la muestra se realizó con acetonitrilo al 3 % (v/v)/agua + ácido fórmico al 0,1 % a un caudal de 4 µl/min. La separación cromatográfica se realizó con un gradiente binario de disolvente A: (acetonitrilo al 3 % (v/v)/agua + ácido fórmico 0,1) y disolvente B: (acetonitrilo al 90 %/agua + ácido fórmico al 0,1 %) con un caudal de 0,4 µl/min. El gradiente se ejecutó durante 60 minutos, del 1 % de B al 5 % de B en 2 min, después del 5 % al 30 % en 33 min, después del 30 % al 99 % durante 5 min, después se mantuvo al 99 % durante 10 min, después del 99 % al 1 % en 1 min, después se mantuvo al 1 % durante 9 min antes de comenzar la siguiente ejecución.

Los datos se recogieron en modo positivo y se calibraron con iones calibradores internos que variaban de m/z 118,086 a 2721,895. El gas de secado se ajustó a 325 °C y con un caudal de 5 l/min. Los voltajes del fragmento, la espumadera y Octapole 1 RF se configuraron en 175, 60 y 750 voltios, respectivamente. La fragmentación se realizó a una velocidad de 0,63 espectros/segundo. La energía de colisión se basó en la masa del compuesto y se expresó como (Energía de colisión)=1,8\*(m/z)-2,4.

#### *Composición de monosacáridos*

La calabaza seca y los oligosacáridos FITDOG se sometieron a una composición de monosacáridos de la siguiente manera. Brevemente, se reconstituyeron 10 mg de muestra en 138 µl de agua nanopura. Las muestras se solubilizaron añadiendo aproximadamente 100 mg de perlas de acero inoxidable de 1,4 mm y se batieron durante dos minutos en una licuadora Next Advance Storm 24 Bullet (Averill Park, NY) y se cocinaron durante 1 hora a 100 °C. A continuación, se añadieron 68 µl de TFA concentrado, produciendo una solución 4 M y se incubó durante 2 horas a 100 °C. Para inactivar, se añadieron 800 µl de agua nanopura enfriada con hielo y la solución se diluyó 1000 veces. 50 µl de la solución diluida se secaron al vacío. Las muestras secas se derivatizaron después con 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona y se secaron. Las muestras se reconstituyeron después en agua nanopura y se extrajeron dos veces con cloroformo, la capa acuosa se usó para el análisis. Las muestras se inyectaron en un UHPLC Agilent 1290 Infinity II acoplado con un MS Agilent 6495 QqQ. La separación se produjo en una columna Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (2,1 mm × 150 mm i.d., 1,8 µm de tamaño de partícula). El sistema disolvente consistió en A: acetato de amonio 25 mM ajustado a pH 8,2 usando NH<sub>4</sub>OH en acetonitrilo/H<sub>2</sub>O al 5 %. Se siguieron todos los demás parámetros del instrumento.

#### *Consumo bacteriano*

Varias especies bacterianas, en su mayoría cepas de *Blifidobacterium*, se exploraron para su capacidad de metabolizar grupos de oligosacáridos FITDOG. Para completar este objetivo, se usaron cultivos puros recolectados en la fase exponencial tardía para inocular MRS basal que contenía las siguientes fuentes de carbono diferentes: Glucosa al 2 % (control positivo), Oligosacáridos de calabaza (BSL) al 2 % y al 5 % p/v y sin fuente de carbono (control negativo). Los cultivos se incubaron a 37 °C en condiciones anaeróbicas durante 96 horas y el crecimiento se monitorizó cada 30 minutos usando un lector de placas Biotek modelo EON 120928C (Biotek Instruments Inc, Winooski, VT, EE.UU.).

El seguimiento del crecimiento se realizó midiendo la absorbancia a 600 nm después de 30 segundos de agitación.

## RESULTADOS

### 5 Optimización de las condiciones de reacción FITDOG

La reacción de Fenton se optimizó en diversas condiciones usando un patrón comercial de xiloglucano (polisacárido). Las concentraciones de sulfato de hierro (III) y peróxido de hidrógeno, tiempo de reacción, temperatura, pH de la reacción y concentraciones de NaOH de inactivación se optimizaron secuencialmente usando el procedimiento FITDOG a escala analítica. Se usó MALDI-TOF MS para monitorizar los productos de oligosacáridos. Las abundancias de MS se usaron directamente para obtener concentraciones relativas de oligosacáridos. Los espectros MALDI TOF-MS (**FIG. 1**) se usaron para obtener las abundancias relativas de los respectivos productos.

#### 1. Optimización de la concentración de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$

El sulfato de hierro (III) se optimizó variando las concentraciones de 0,0065 nM a 65 nM. No se observaron abundancias de oligosacáridos con menos de 0,65 nM. La abundancia total de OS aumentó con la concentración, como se muestra en la **FIG. 2**. A concentración de  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  aproximadamente 10 nM, la señal alcanzó el máximo y aumentó ligeramente a 65 nM. Por esta razón, esta última concentración se usó para la preparación.

#### 2. Optimización del pH del tampón

La condición de pH se optimizó usando un tampón acetato sódico y añadiendo cantidades apropiadas de ácido y base (ácido acético y NaOH (acuoso)) correspondientes a un pH entre 2 y 12 en aumentos de 1 unidad de pH. El pH inferior a 5 no produjo cantidades observables. El pH 5 produjo la mayor abundancia de oligosacáridos, mientras que más allá de 6 también produjo muy poca abundancia (**FIG. 3**). Por lo tanto los presentes inventores eligieron un pH de 5 como el valor óptimo.

#### 3. Concentraciones de peróxido de hidrógeno y NaOH

Una característica importante de este procedimiento es el uso de la solución básica de NaOH para terminar la reacción. Esta etapa es clave para producir abundantes productos de oligosacáridos. Para optimizar la condición se usó un diseño factorial completo variando la concentración de NaOH, la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  y la abundancia de los oligosacáridos. Las concentraciones de NaOH fueron, 0, 0,1, 1,0, 2,0 y 3,0 M. Las concentraciones de  $\text{H}_2\text{O}_2$  fueron 0,02, 0,12, 0,24 y 0,48 M de peróxido de hidrógeno. Había poco o ningún oligosacárido detectable en la mezcla de reacción cuando no se añadió NaOH (0,0 M, **FIG. 4**). De forma similar, no se observaron oligosacáridos detectables cuando la concentración de  $\text{H}_2\text{O}_2$  cayó por debajo de 0,02 M. No se observó ninguna señal de oligosacárido detectable cuando no se añadió  $\text{H}_2\text{O}_2$  a la solución (**FIG. 4**). Basándose en este estudio, los presentes inventores descubrieron que 2,0 M de NaOH y 0,12 M de  $\text{H}_2\text{O}_2$  funcionaron bien.

#### 4. Tiempo de reacción y temperatura

El tiempo y la temperatura se analizaron también usando un diseño factorial completo. Se examinaron los puntos de tiempo de 0, 20, 40, 60 y 120 minutos. Se usaron temperaturas de 25, 50, 75 y 100 °C. Se observaron señales mínimas de oligosacáridos por debajo de 75 °C. Las mayores abundancias se observaron a 100 °C y el tiempo de reacción de 20 minutos. (**FIG. 5**).

#### 5. Efectos de otros metales de transición

Se ha demostrado que las reacciones de tipo Fenton se desarrollan con compuestos que contienen Fe (III), Fe (II) y Cu (II). Se hicieron reaccionar sulfato de hierro (III), sulfato de hierro (II) y cloruro de cobre (II) con guisantes verdes en las condiciones previamente optimizadas. Los tres metales de transición generaron oligosacáridos (**FIG. 6**). El cloruro de cobre (II) produjo oligosacáridos de 3 a 7 hexosas de longitud en gran abundancia, siendo Hex4 el oligosacárido más abundante. El sulfato de hierro (II) también produjo oligosacáridos de 3 a 7 hexosas de longitud, pero 10 veces menos abundante que en la muestra de cloruro de cobre (II). El sulfato de hierro (III) produjo oligosacáridos de 3 a 10 hexosas de longitud, con igual o mayor abundancia que el cloruro de cobre (II). Esta muestra también generó varios isómeros de hexosa, incluidos tres isómeros Hex3 y dos isómeros Hex4. A partir de estos datos, los presentes inventores descubrieron que diferentes metales de transición y estados de oxidación pueden generar oligosacáridos a partir de polisacáridos. También descubrieron que diferentes metales de transición pueden producir diferentes perfiles de oligosacáridos, sugiriendo que cada metal tiene una especificidad diferente.

### Aplicación de las reacciones de Fenton sobre polisacáridos alimentarios

Mijo, garbanzo y cáscara de plátano se trataron con FITDOG para mostrar los tipos de oligosacáridos producidos con diferentes polisacáridos de partida. En la **FIG. 7** se muestra la composición de monosacáridos determinada usando el procedimiento descrito anteriormente. La glucosa es el componente más abundante en todos los alimentos, sin

embargo, para la cáscara de plátano, hubo mayores abundancias de xilosa y fructosa. Para garbanzos, hubo mayores abundancias de arabinosa y galactosa. El mijo contenía principalmente glucosa (95,71 %) (**FIG. 7**). Esto indica que los oligosacáridos de hexosa que se liberaron de FITDOG son de una glucosa.

- 5 El cromatograma de cromatografía líquida-espectrometría de masas resume los resultados de los tres polisacáridos (**FIG. 8**). Los picos se enumeran con su composición de oligosacáridos en la Tabla 1. Cada cromatograma produjo picos distintos que diferían según sus respectivas composiciones de monosacáridos.

- 10 La cáscara de plátano (panel superior) produjo principalmente oligómeros cortos incluyendo tres isómeros de la Hex3 (trisacárido de hexosa A, B y S). Hex o Hexosa pueden ser glucosa o fructosa, pero probablemente glucosa. Los oligosacáridos más abundantes corresponden a Hex5 (J). También se observan isómeros Hex4 (F y H). Se descubrió que el garbanzo tenía una especie Hex2HexA1 (D), HexA corresponde al ácido hexurónico. Se observaron otros compuestos abundantes Hex4 (C, E, G), Hex5 (I), Hex6 (K) y Hex7 (N y P). El mijo (panel inferior) produjo Hex4 (C, E y G) con bajas abundancias de Hex3. Hex5 estuvo presente correspondiente a la especie más abundante I, mientras que K corresponde a Hex6. Se observaron combinaciones mixtas como en L, que estaba compuesto por Hex5PentA1 y donde PentA corresponde al ácido penturónico.

#### Actividad prebiótica de los oligosacáridos de calabaza

- 20 Se examinaron varios oligosacáridos del FITDOG de diversos polisacáridos alimentarios para determinar su actividad prebiótica. Se proporciona un ejemplo usando los oligosacáridos de la calabaza. El perfil de los oligosacáridos fue similar a los obtenidos anteriormente. En este ejemplo *B. pseudocatenulatum* MP80 se cultivó en oligosacáridos generados a partir de la oxidación de Fenton de la calabaza. A diferencia de otras cepas probadas, *B. pseudocatenulatum* MP80 pudo crecer en soluciones al 2 % y al 5 % de oligosacáridos de calabaza. El crecimiento finalmente alcanzó una DO máxima de 0,962 en la solución al 5 %. El crecimiento de los oligosacáridos de la calabaza fue significativamente mayor que el del control negativo (DO máxima de 0,378) pero menor que el del control positivo (**FIG. 9**). Como las otras cepas probadas no crecieron en los oligosacáridos de la calabaza, este resultado muestra que estos oligosacáridos permiten selectivamente el crecimiento de determinadas bacterias.

- 30 **Tabla 1:** Biblioteca de los compuestos más abundantes encontrados en el tratamiento FITDOG en varios alimentos. "X" representa en qué alimentos se encontró un compuesto.

Designación del compuesto	Tiempo de retención	m/z	Composición	Cáscara de plátano	Garbanzo	Mijo
A	1,89	505,17	3Hex	X	X	X
B	2,3	505,17	3Hex	X		
C	2,8	667,26	4Hex		X	X
D	4,56	519,19	2Hex+1HexA		X	
E	5,05	667,23	4Hex		X	X
F	5,47	667,23	4Hex	X		
G	5,76	667,23	4Hex		X	X
H	6,18	667,23	4Hex	X		
I	8,54	829,28	5Hex		X	X
J	9,46	829,28	5Hex	X		
K	11,32	991,34	6Hex		X	X
L	12,92	959,31	5Hex +(1Penturónico)			X
M	13,83	887,29	5Hex+(76,02)			X
N	14,39	1153,39	7Hex		X	X
O	15,12	887,29	5Hex+(76,02)	X		
P	17,11	1049,34	6Hex+(76,02)		X	X
Q	17,41	521,17	2Hex+ (1HexA-2H)	X		
R	18,93	1301,43	7Hex +(1Penturónico)		X	
S	19,44	505,17	3Hex	X		
T	19,89	1211,39	7hex +(76,02)		X	

#### Ejemplo 2

- 35 Los resultados a continuación ilustran la utilidad del método Fitdog en mezclas complicadas de polisacáridos y

polisacáridos puros. Las mezclas complicadas de polisacáridos incluyen la calabaza (obsérvese en cuenta que se producen oligosacáridos de 3-200 (FIG. 29)). El método puede usarse en la pared celular de levadura (FIG. 28). El método también funciona con polisacáridos purificados incluyendo xilano, arabinoxilano de centeno, liquenano, galactomanano, amilopectina, amilosa, ramnogalacturonano I, xiloglucano, curdlano, galactano, manano, glucomanano, arabinogalactano de alerce, ácido poligalacturónico, inulina (FIG. 10-24 y 27).

Se han usado diferentes metales para el método FITDOG. Incluyen Fe, Ni, Ca, Cu y Mg. Producen oligosacáridos con distribución variable de DP (FIG. 25-26).

#### **Materiales:**

Xilano, Arabinoxilano de centeno, Liquenano, Galactomanano, Amilosa, Ramnogalacturonano I, Xiloglucano, Curdlano, Galactano, Manano, Glucomanano, Arabinogalactano de alerce, Ácido poligalacturónico e Inulina se adquirieron de Megazyme (RU). La amilopectina se adquirió de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Acetato sódico, peróxido de hidrógeno (30 % p/p), hidróxido sódico, sulfato de hierro (III) pentahidrato, sulfato de hierro (II) heptahidrato, sulfato de cobre (II) heptahidrato, cloruro de cobre (I), sulfato de manganeso (II), sulfato de cobalto (II) heptahidrato, sulfato de magnesio, cloruro cálcico, cloruro de níquel (II) y ácido acético glacial se adquirieron todos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

#### **Métodos:**

##### **Producción de oligosacáridos**

Se preparó una solución que contenía tampón acetato sódico al 95 % (v/v) ajustado a pH 5 con ácido acético glacial, peróxido de hidrógeno al 5 % (v/v) (30 % p/p) y 65 nM del complejo metálico bajo investigación. Esta mezcla se agitó y se añadió a patrones de polisacáridos secos para obtener una solución final de 1 mg/ml. La reacción se incubó a 100 °C durante 60 minutos. Después de reaccionar, se añadió la mitad del volumen de reacción de NaOH 2 M frío y se agitó antes de añadir el 0,6 % del volumen de reacción inicial de ácido acético glacial para neutralizar.

##### **Purificación de oligosacáridos**

Los oligosacáridos se aislaron usando cartuchos de carbón grafitado no poroso (GCC-SPE). Los cartuchos se lavaron con acetonitrilo al 80 % en ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 % (v/v) y agua nanopura. Los oligosacáridos se cargaron y lavaron con 5 volúmenes de columna de agua nanopura. Los oligosacáridos se eluyeron con acetonitrilo al 40 % con TFA al 0,05 % (v/v).

Se entiende que los ejemplos y las realizaciones descritos en el presente documento son únicamente con fines ilustrativos y que los expertos en la materia podrán sugerir diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos y se han de incluir dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para generar oligosacáridos a partir de polisacáridos, comprendiendo el método,
  - 5        hacer reaccionar polisacáridos en una mezcla de reacción con peróxido de hidrógeno y un metal de transición o un metal alcalinotérreo; seguido de inactivar la reacción con una base y/o escindir enlaces glucosídicos en los polisacáridos con una base, generando de esta manera una mezcla de oligosacáridos a partir de los polisacáridos.
- 10    2. El método de la reivindicación 1, en donde la mezcla de reacción comprende un metal de transición.
  3. El método de la reivindicación 2, en donde el metal de transición se selecciona de hierro (por ejemplo, Fe<sup>3+</sup>, Fe<sup>2+</sup>), cobre (por ejemplo, Cu<sup>2+</sup>), manganeso, cobalto o molibdeno.
- 15    4. El método de la reivindicación 1, en donde la mezcla de reacción comprende un metal alcalinotérreo; opcionalmente en donde el metal alcalinotérreo es calcio o magnesio.
  5. El método de la reivindicación 1 o 3, en donde:
    - 20        (a) el metal de transición en la mezcla de reacción está a una concentración de al menos 0,65 nM; o
    - (b) el metal de transición en la mezcla de reacción está a una concentración de 0,65 nM a 500 nM.
6. El método de la reivindicación 1, en donde:
  - 25        (a) el peróxido de hidrógeno en la mezcla de reacción está en una concentración de al menos 0,02 M; o
  - (b) el peróxido de hidrógeno en la mezcla de reacción está a una concentración de 0,02 M a 1 M.
7. El método de la reivindicación 1, en donde la base es hidróxido sódico, hidróxido potásico o hidróxido cálcico.
- 30    8. El método de la reivindicación 1 o 7, en donde:
  - (a) la base está en una concentración de al menos 0,1 M; o
  - (b) la base está en una concentración de 0,1 M - 5,0 M.
- 35    9. El método de la reivindicación 1, en donde:
  - (a) los polisacáridos incluyen uno o más de amilosa, amilopectina, betaglucono, pululano, xiloglucano, arabinogalactano I y arabinogalactano II, ramnogalacturonano I, ramnogalacturonano II, galactano, arabinano, arabinosilano, xilano, glucógeno, manano, glucomanano, curdlano o inulina;
  - 40        (b) los polisacáridos son de origen vegetal o animal;
  - (c) los polisacáridos provienen de una fuente bacteriana, fúngica o de algas;
  - (d) los polisacáridos están en forma de material vegetal; o
  - (e) el material vegetal es material vegetal de plátano, de garbanzo o de mijo.
- 45    10. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-9:
  - (a) que comprende además purificar uno o más oligosacáridos de la mezcla de oligosacáridos; y/o
  - (b) en donde, antes de la reacción, el método comprende poner en contacto polisacáridos con una o más enzimas degradantes de polisacáridos, opcionalmente en donde la una o más enzimas degradantes de polisacáridos comprenden una amilasa, una isoamilasa, una celulasas, una maltasa, una glucanasa o una combinación de las mismas.
  - 50        (c) que comprende además purificar uno o más oligosacáridos de la mezcla de oligosacáridos; y/o
11. Un método para estimular el crecimiento microbiano *in vitro* o *in vivo* no terapéuticamente, comprendiendo el método poner en contacto microbios con la mezcla de oligosacáridos generada por el método de la reivindicación 1, en condiciones para estimular selectivamente el crecimiento de los microbios; opcionalmente en donde:
  - (i) los microbios son microbios probióticos; opcionalmente en donde los microbios probióticos están en el intestino de un animal y la mezcla de oligosacáridos se administra al animal; además opcionalmente los microbios probióticos se administran al animal por separado o simultáneamente con la mezcla de oligosacáridos; o
  - 60        (ii) los microbios son microbios orales, microbios del suelo o microbios de la piel.
12. El método de la reivindicación 11, en donde el microbio probiótico es *Bifidobacterium pseudocatenulatum*.

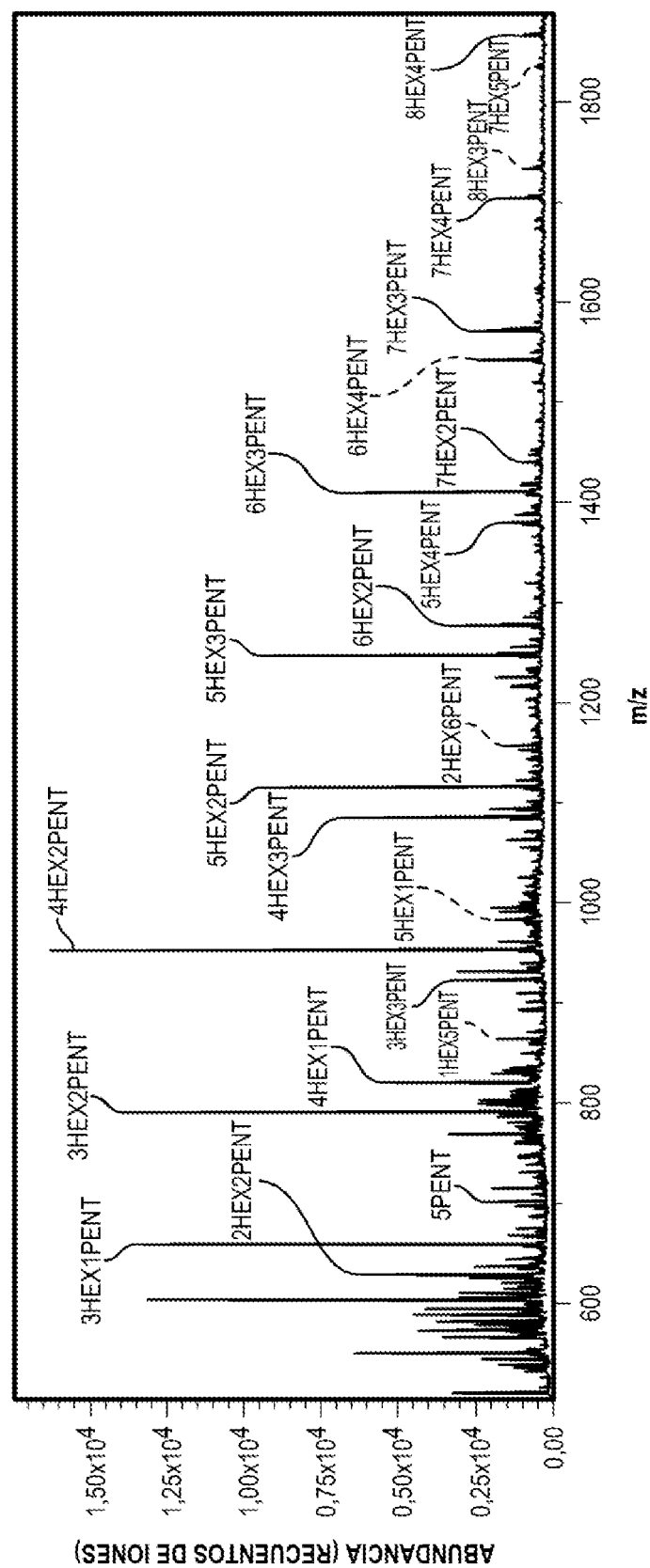
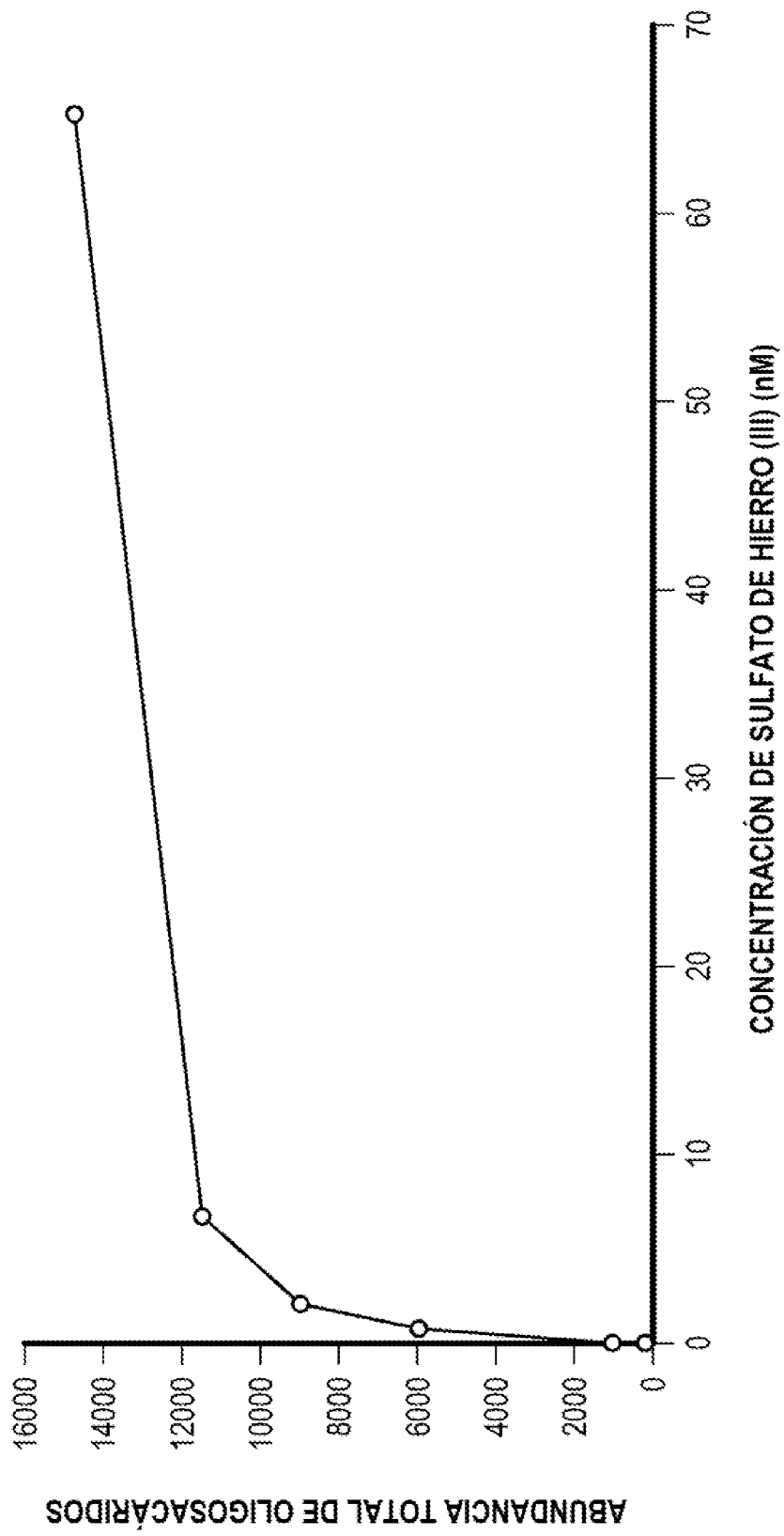
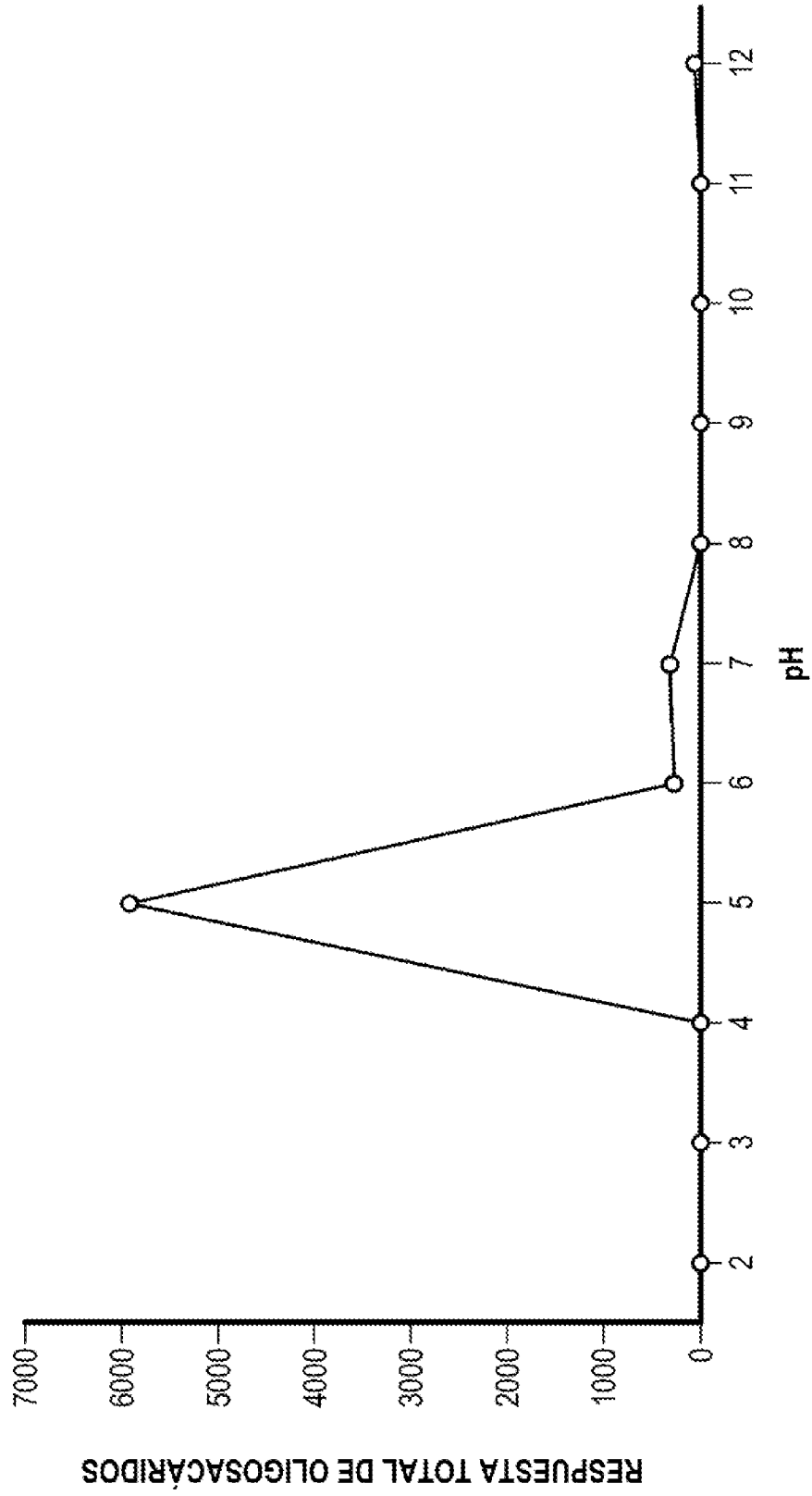


FIG. 1



**FIG. 2**



**FIG. 3**



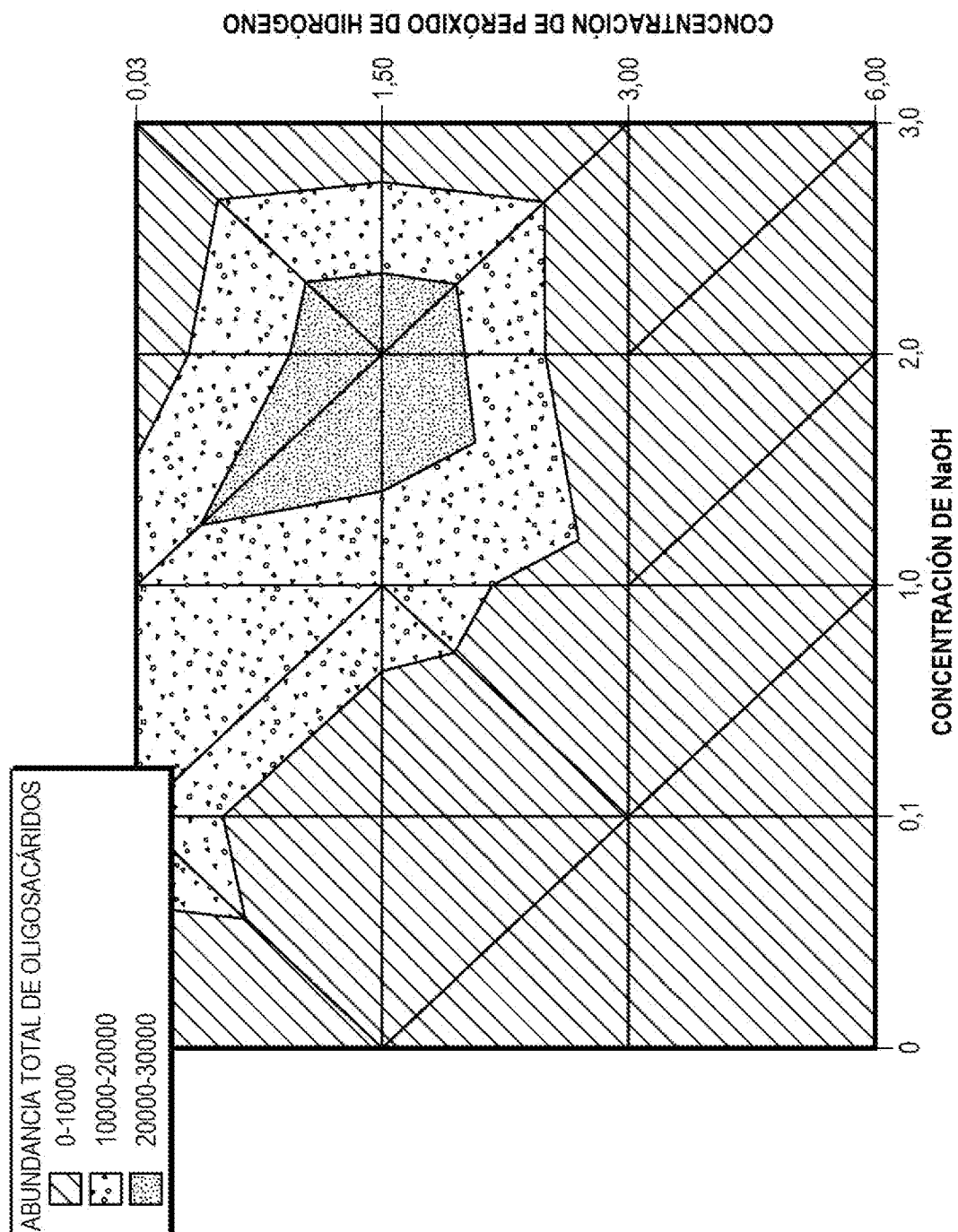
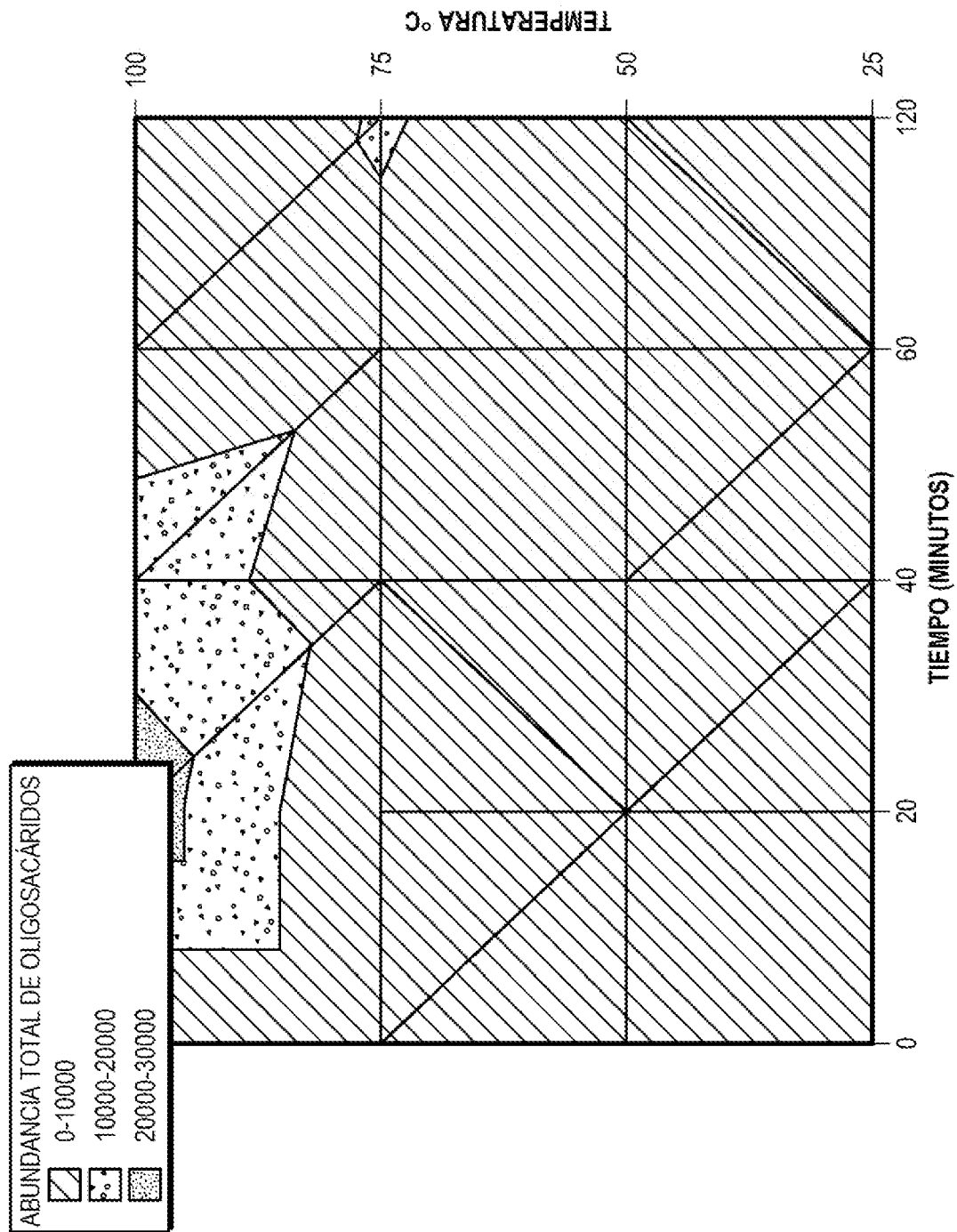


FIG. 4



**FIG. 5**

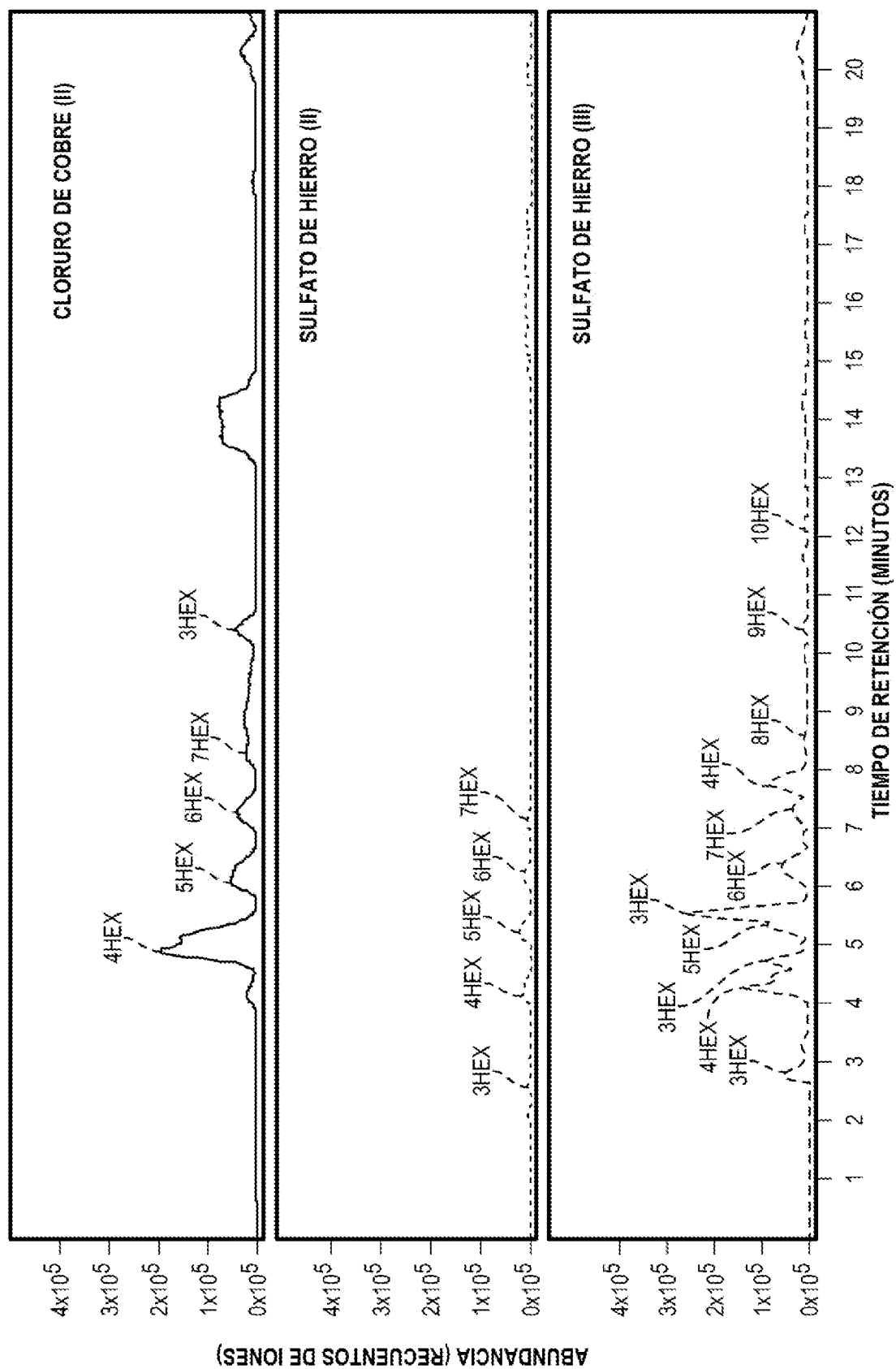
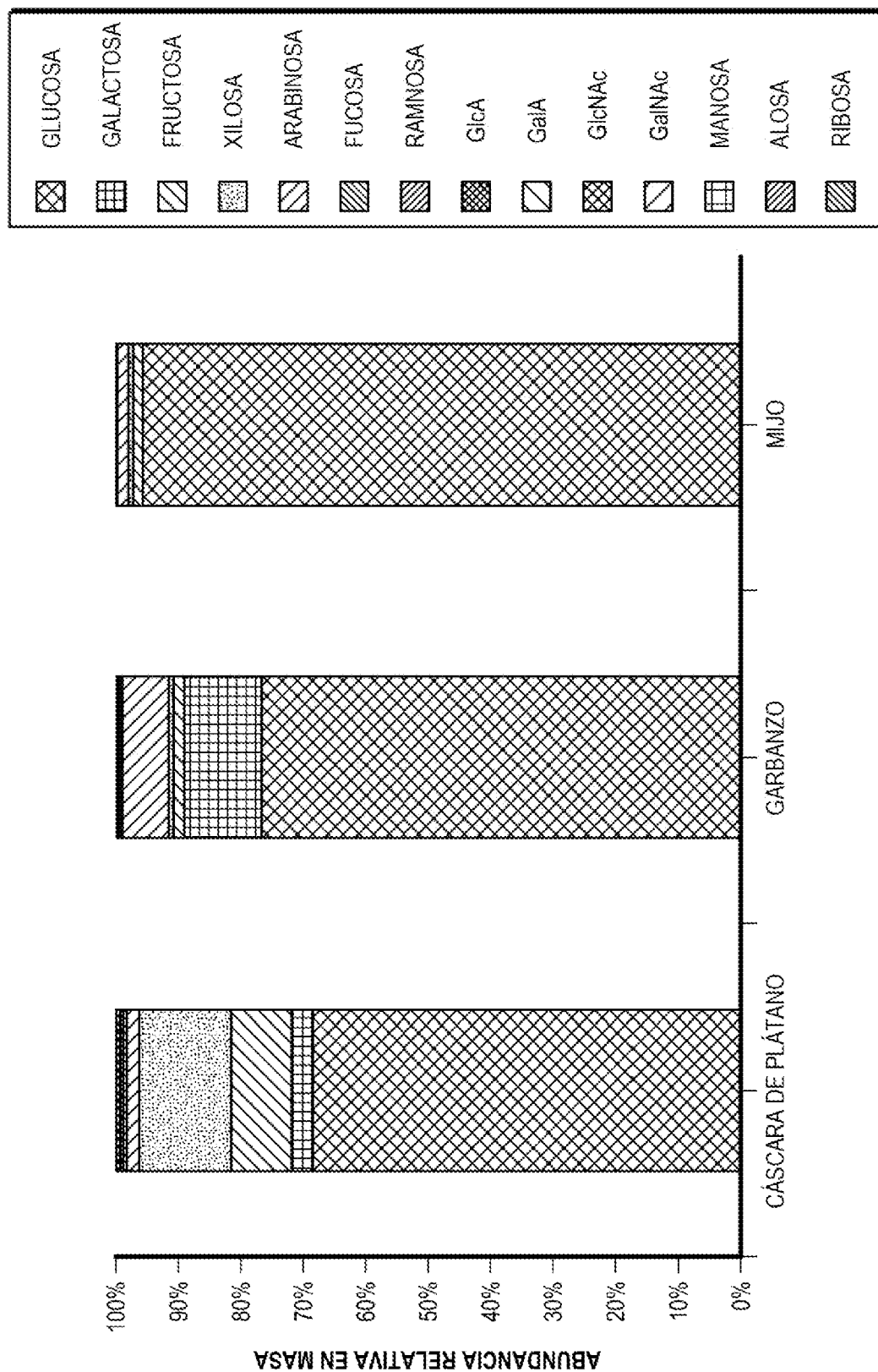
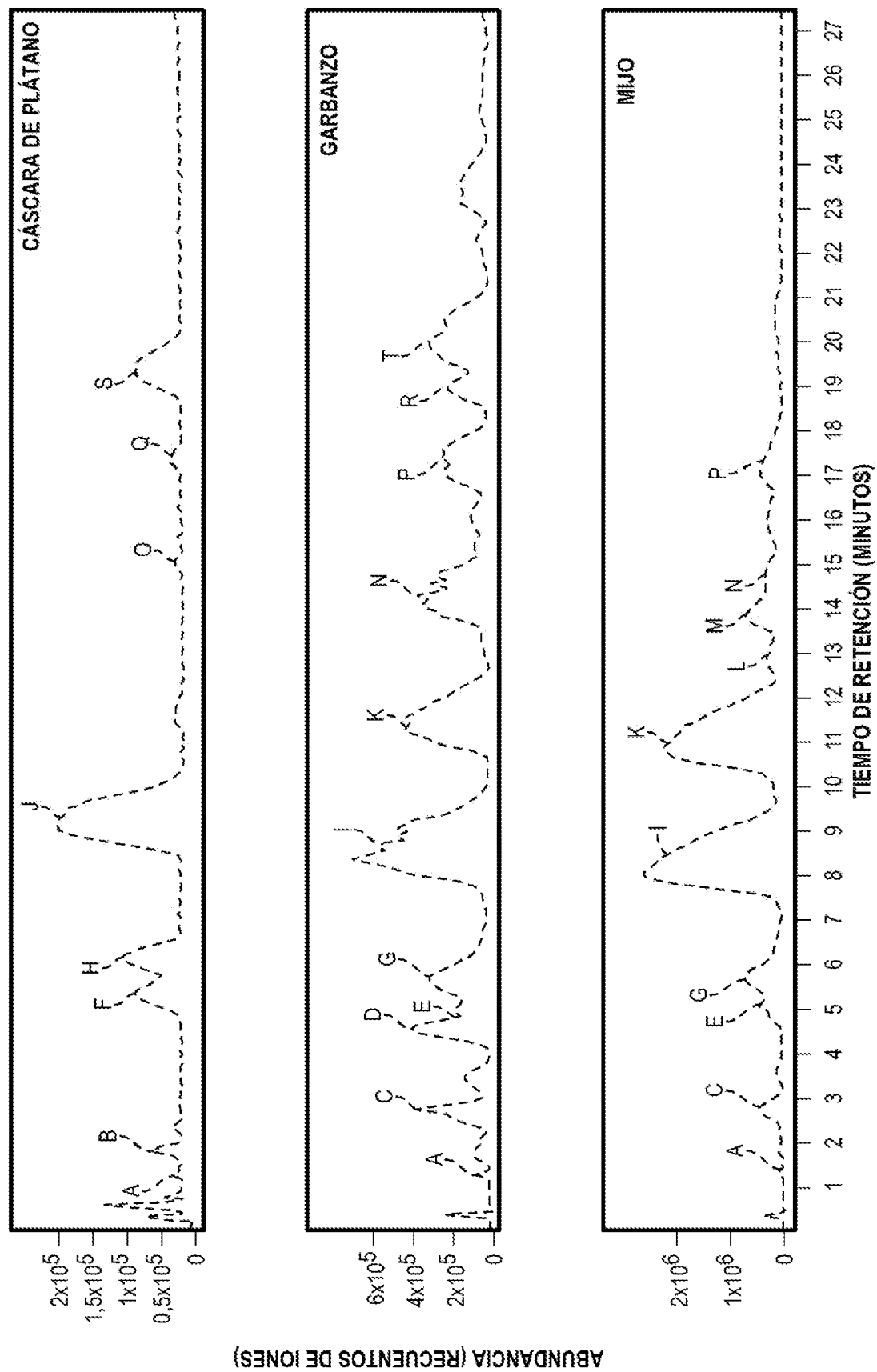


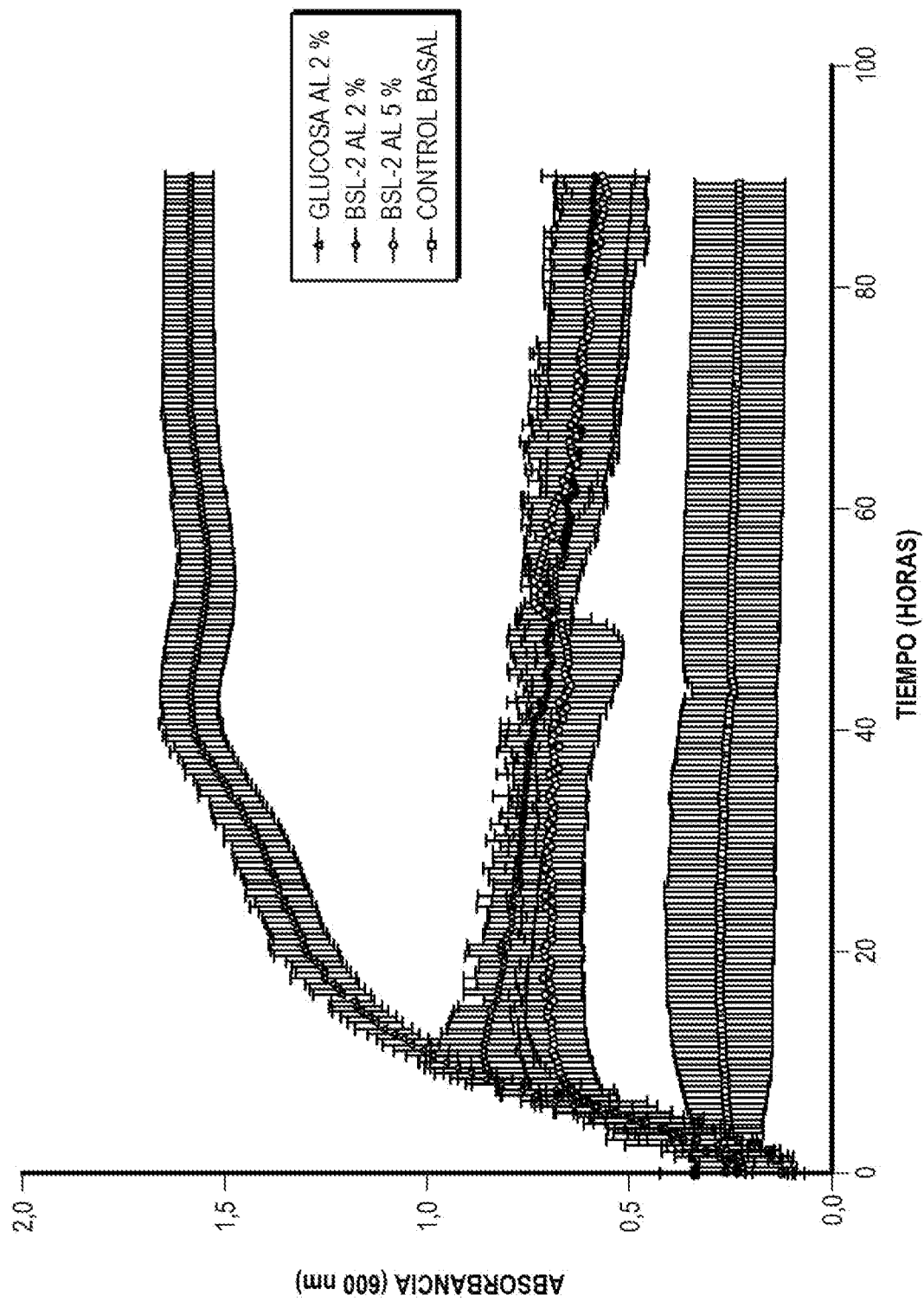
FIG. 6



**FIG. 7**

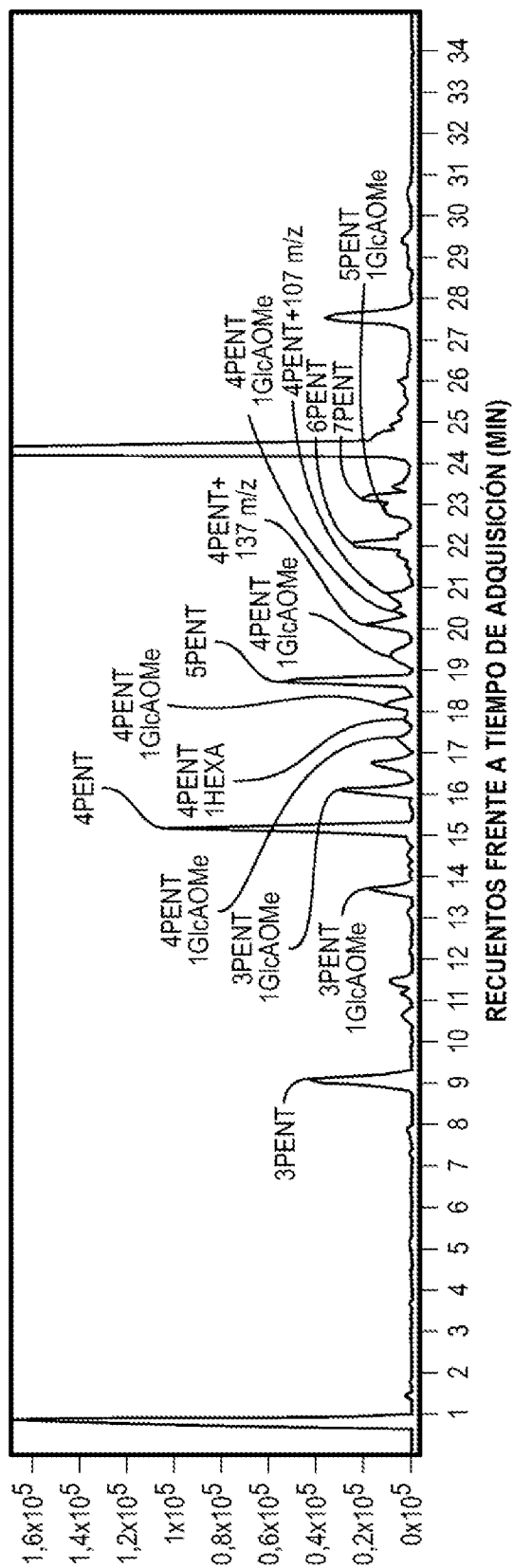


**FIG. 8**



**FIG. 9**

PATRÓN DE POLISACÁRIDO: XILANO  
 > ESTRUCTURA PRINCIPAL DE XILOSA DE 4 ENLACES CON RAMIFICACIÓN POTENCIAL DE GLIC METILADO



**FIG. 10**

PATRÓN DE POLISACÁRIDO: ARABINOXILANO DE CENTENO  
> ESTRUCTURA PRINCIPAL DE XILOSA DE 4 ENLACES CON RAMIFICACION DE ARABINOSA EN LAS POSICIONES 2 Y 3

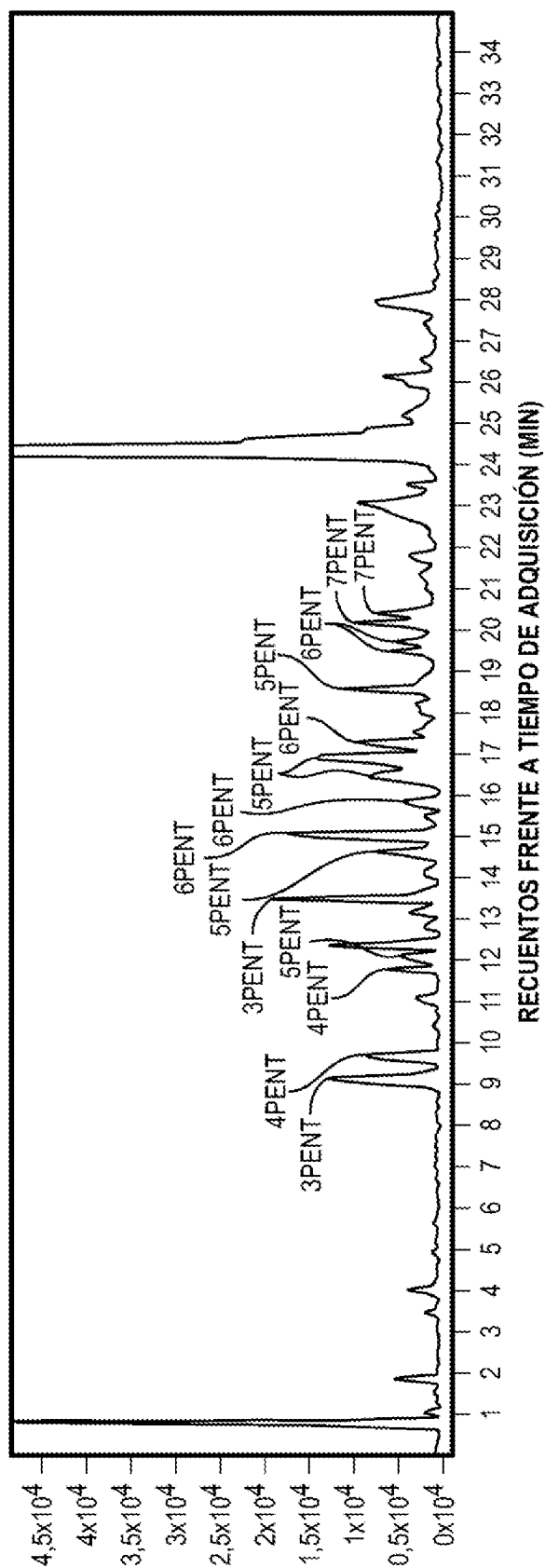
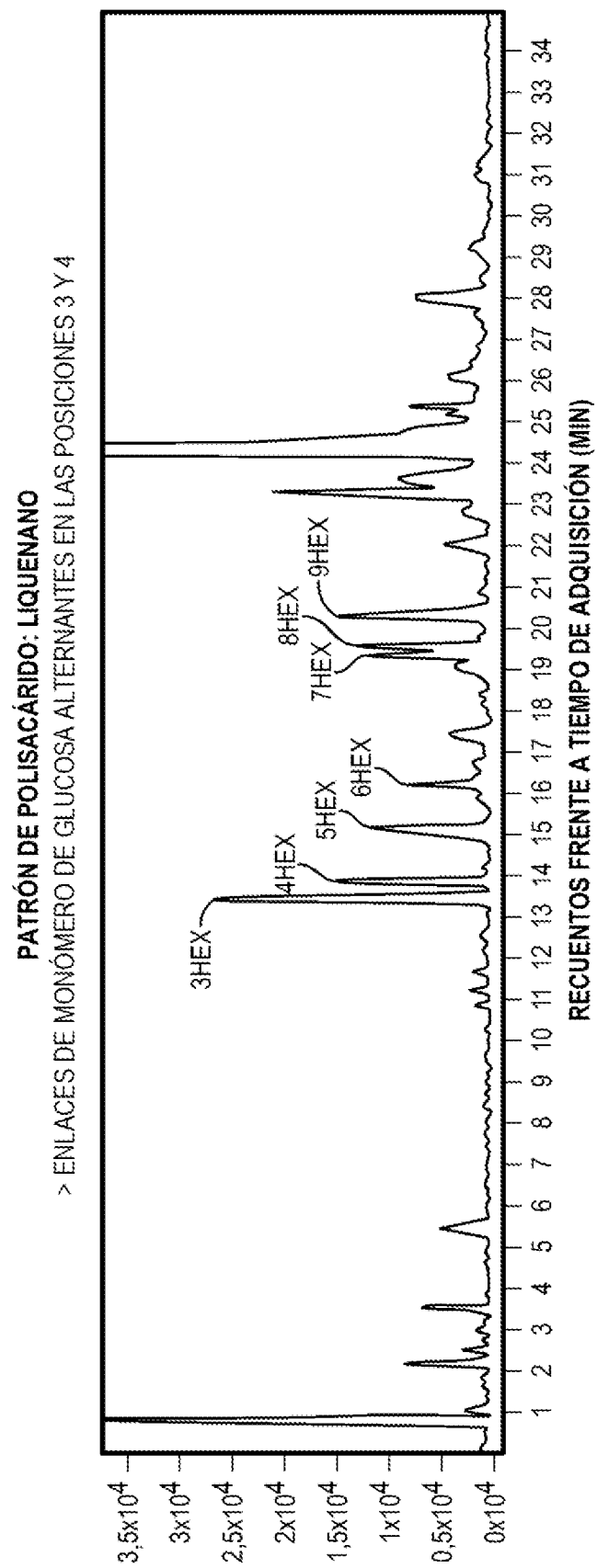
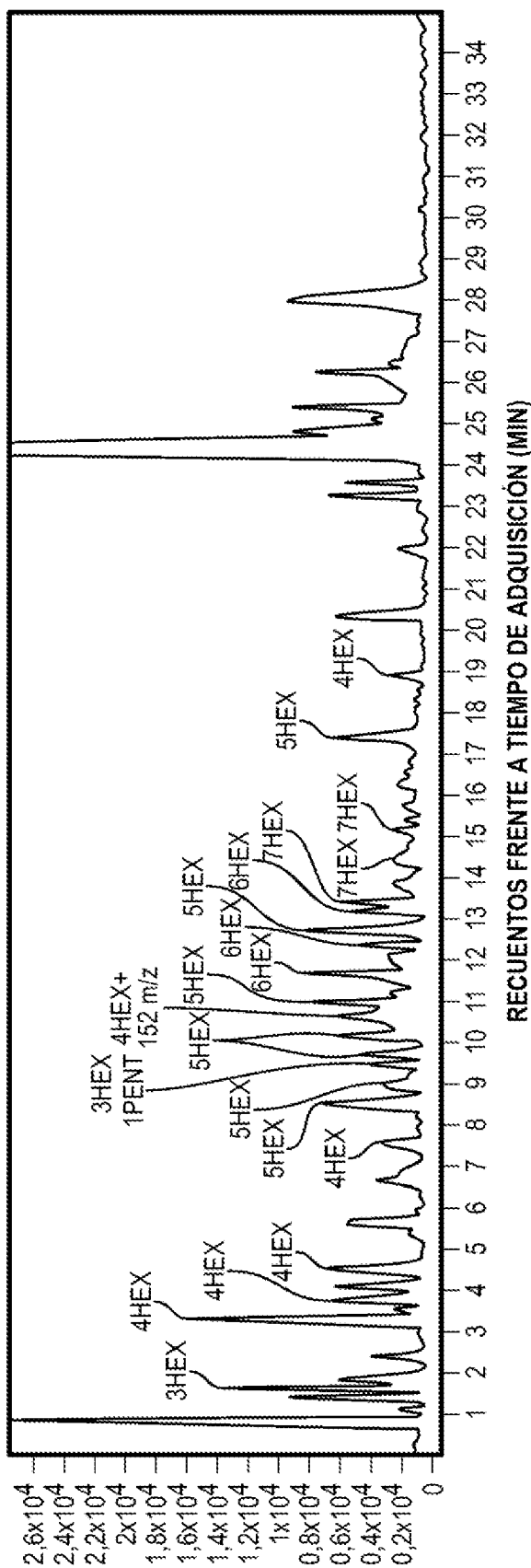


FIG. 11



**FIG. 12**

**PATRÓN DE POLISACÁRIDO: GALACTOMANANO**  
 > ESTRUCTURA PRINCIPAL DE MANOSA DE 4 ENLACES CON RAMIFICACIÓN EN LA POSICIÓN 6  
 > GALACTOSA-MANOSA = 22.78 [DEPENDE DE DÓNDE DERIVE]



**FIG. 13**

PATRÓN DE POLISACÁRIDO: AMILOPECTINA  
> ESTRUCTURA PRINCIPAL DE GLUCOSA DE 4 ENLACES CON RAMIFICACIÓN EN LA POSICIÓN 6

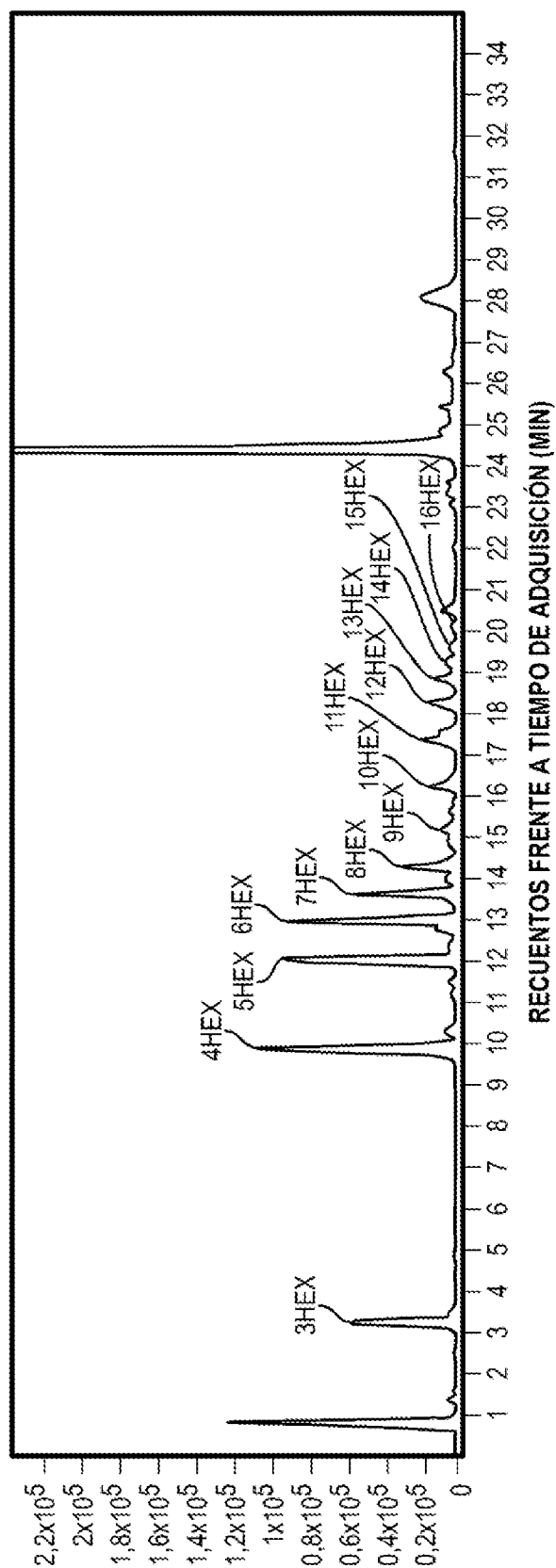
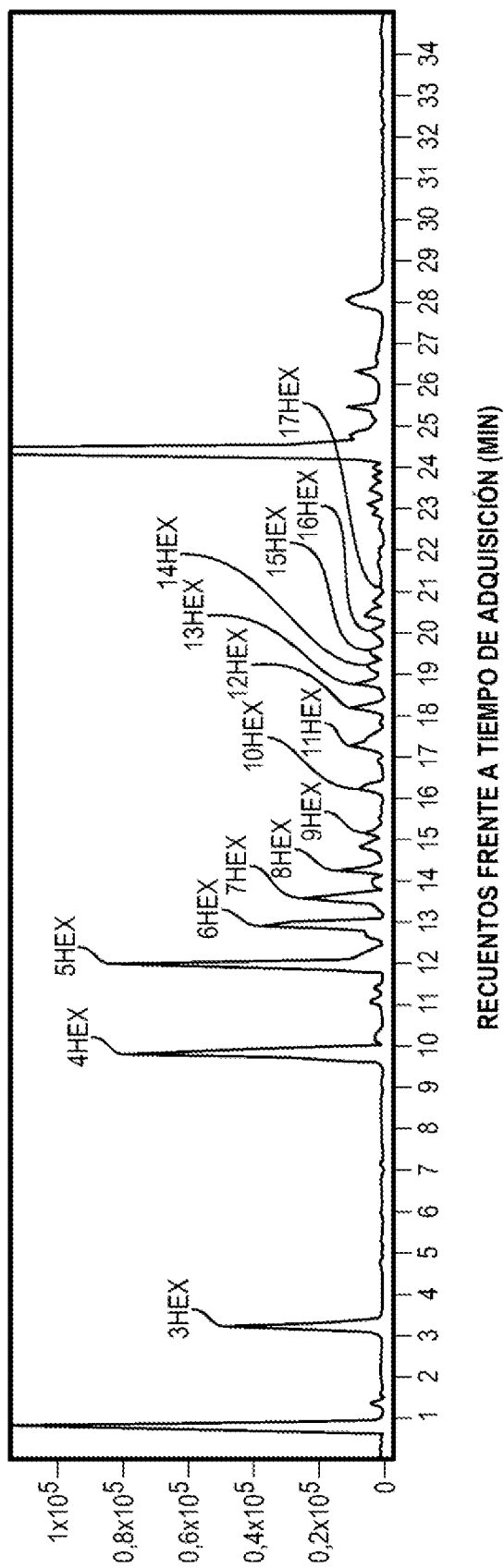


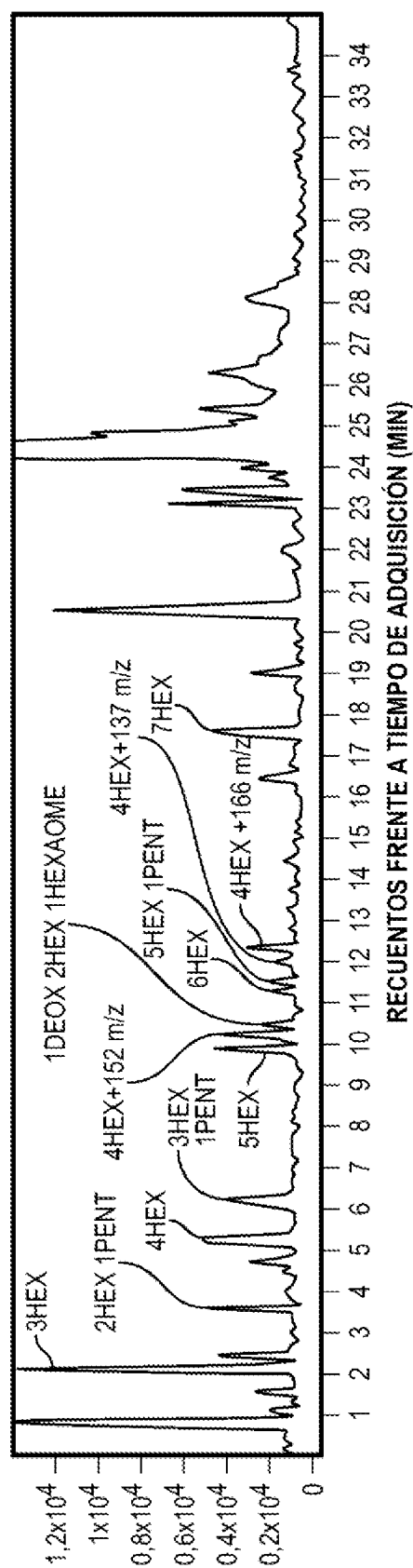
FIG. 14

**PATRÓN DE POLISACÁRIDO: AMILOSA**  
> POLÍMERO LINEAL DE GLUCOSA DE 4 ENLACES

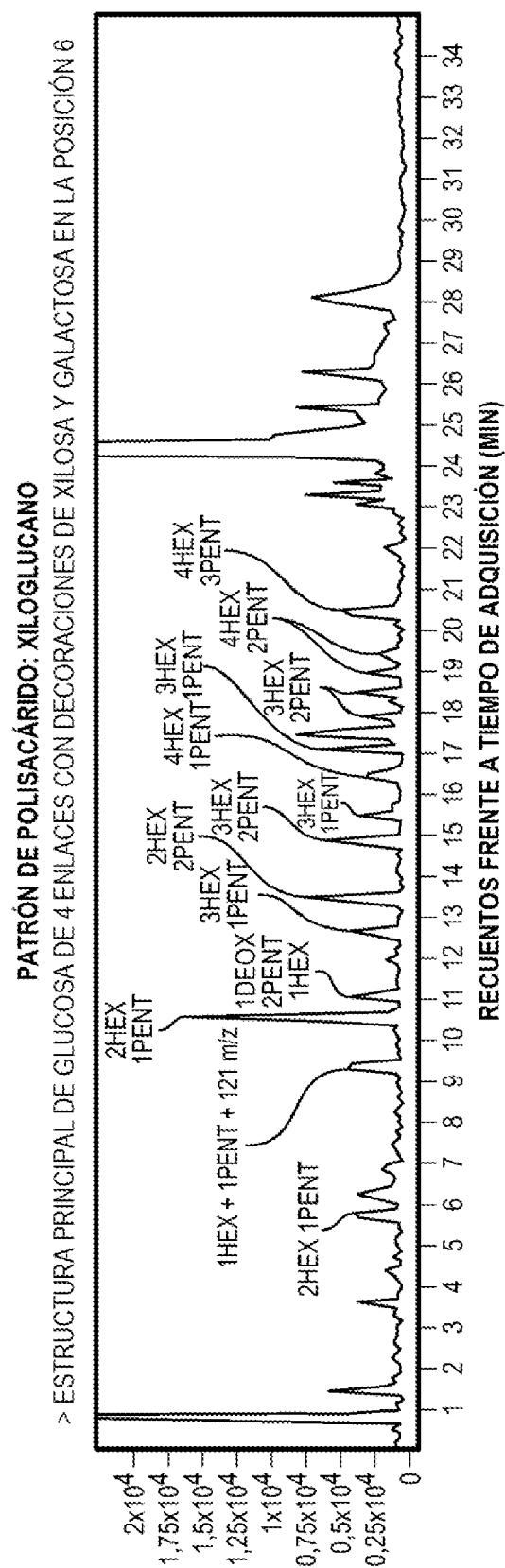


**FIG. 15**

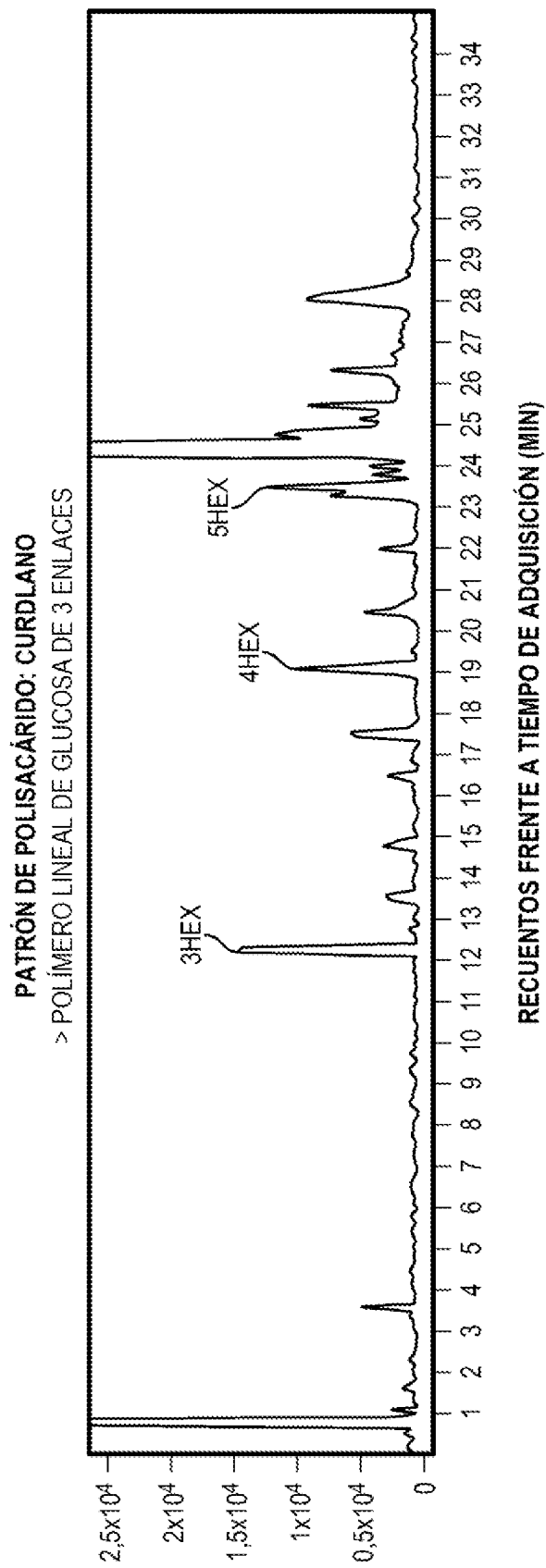
**PATRÓN DE POLISACÁRIDO: RAMNOGALACTURONANO I**  
 > ESTRUCTURA PRINCIPAL QUE ALTERNA RAMNOSA Y GALA CON CADENAS  
 DE RAMIFICACIÓN DE ARABINANO, GALACTANO Y ARABINOGALACTANO



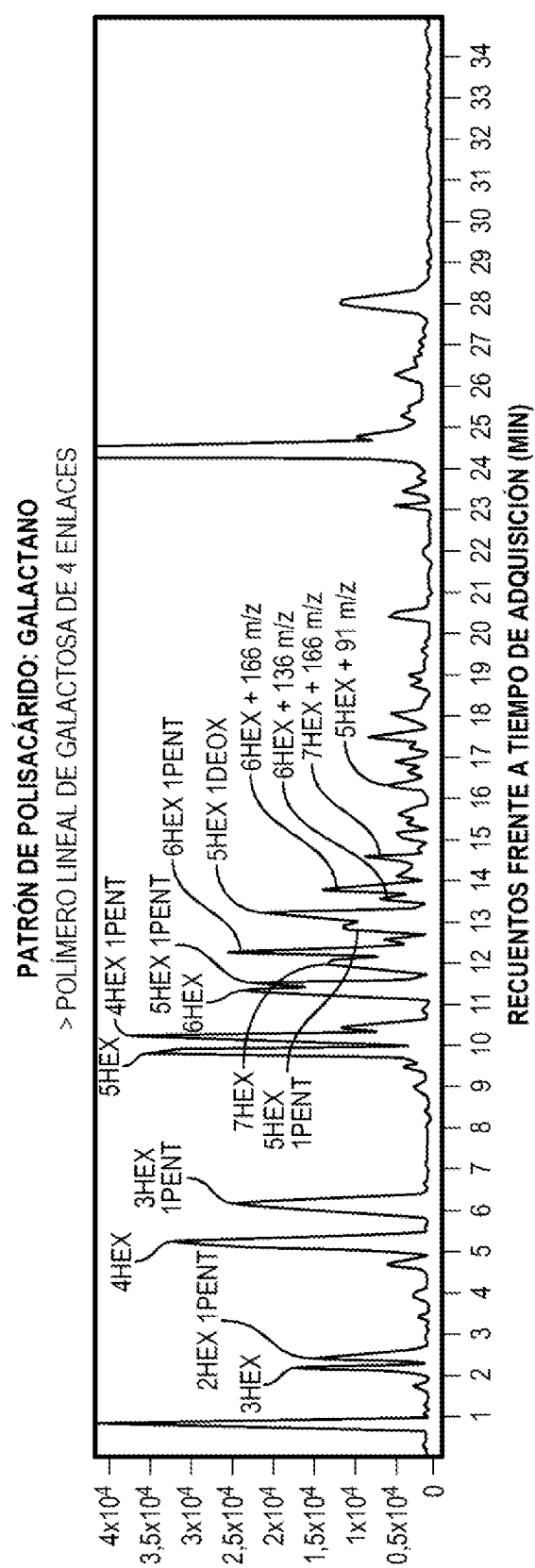
**FIG. 16**



**FIG. 17**

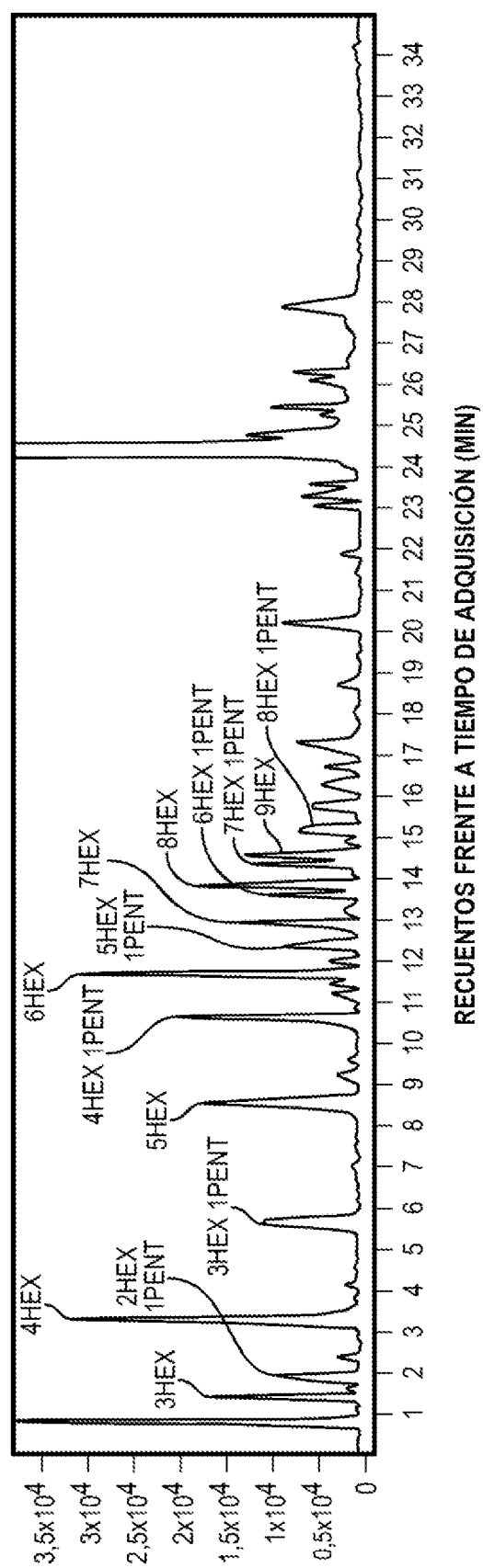


**FIG. 18**

**FIG. 19**

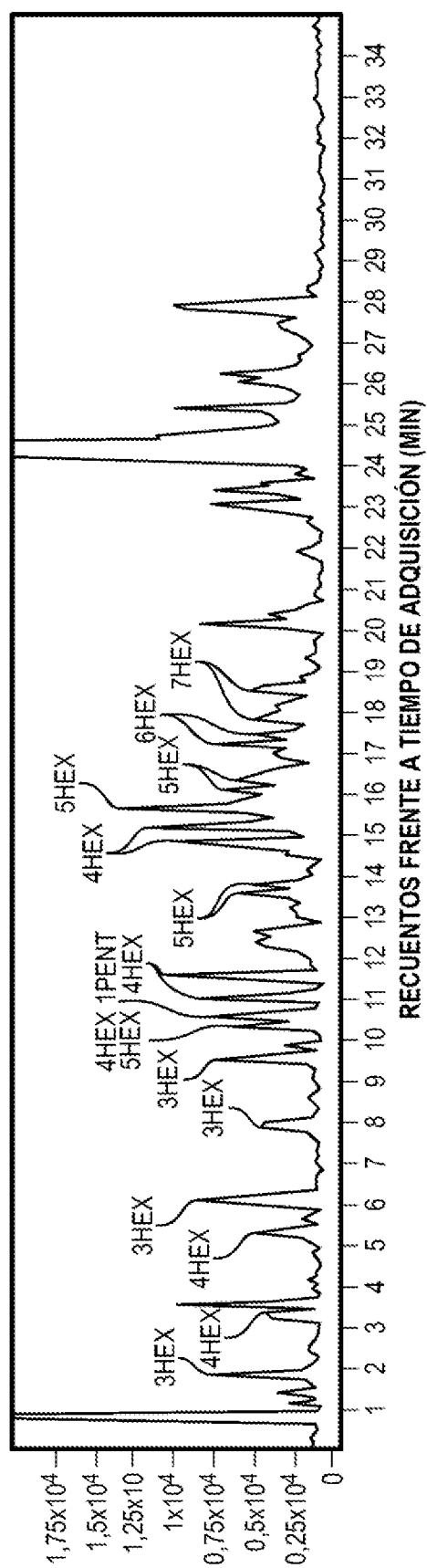


**PATRÓN DE POLISACÁRIDO: MANANO**  
**> POLÍMERO LINEAL DE MANOSA DE 4 ENLACES**



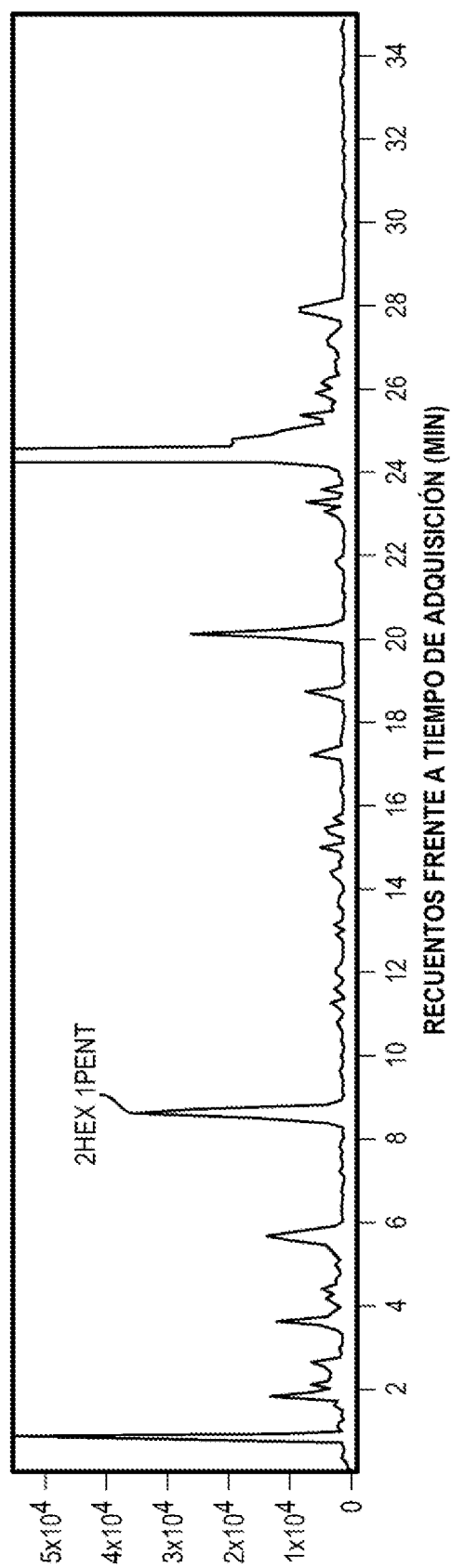
**FIG. 20**

**PATRÓN DE POLISACÁRIDO: GLUCOMANANO**  
 > MANOSA Y GLUCOSA DE 4 ENLACES QUE FORMAN UN POLÍMERO LINEAL  
 > POSIBLES GRUPOS ACETILADOS PRESENTES



**FIG. 21**

**PATRÓN DE POLISACÁRIDO: ARABINO GALACTANO DE ALERCE**  
> ESTRUCTURA PRINCIPAL DE GALACTOSA DE 3 ENLACES CON RAMIFICACIÓN  
DE ARABINOSA Y GALACTOSA EN LAS POSICIONES 4 Y 6



**FIG. 22**

PATRÓN DE POLISACÁRIDO: ÁCIDO POLIGALACTURÓNICO  
> POLÍMERO LINEAL DE GAJA DE 4 ENLACES

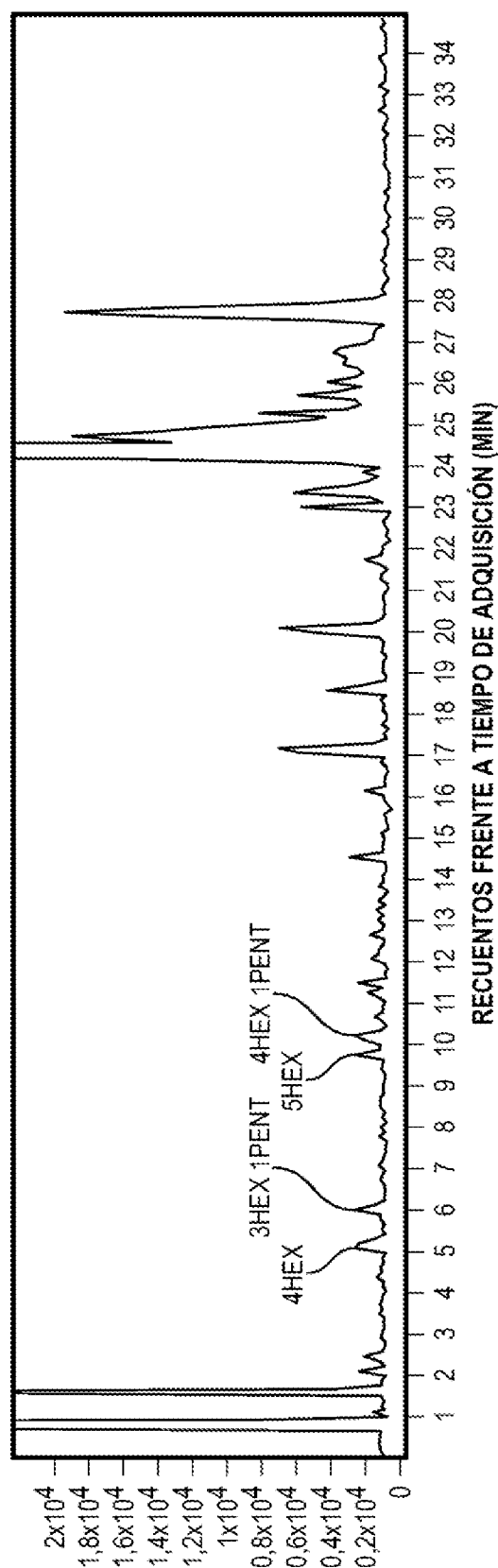
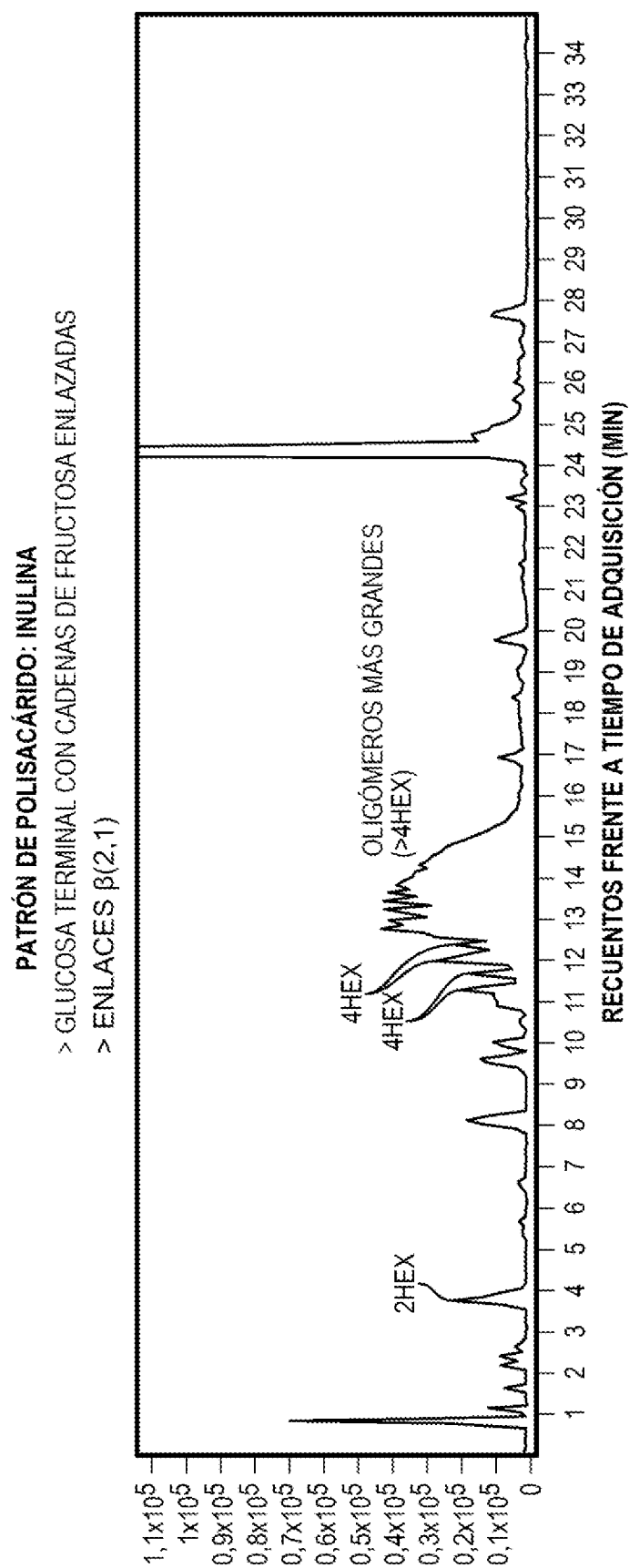
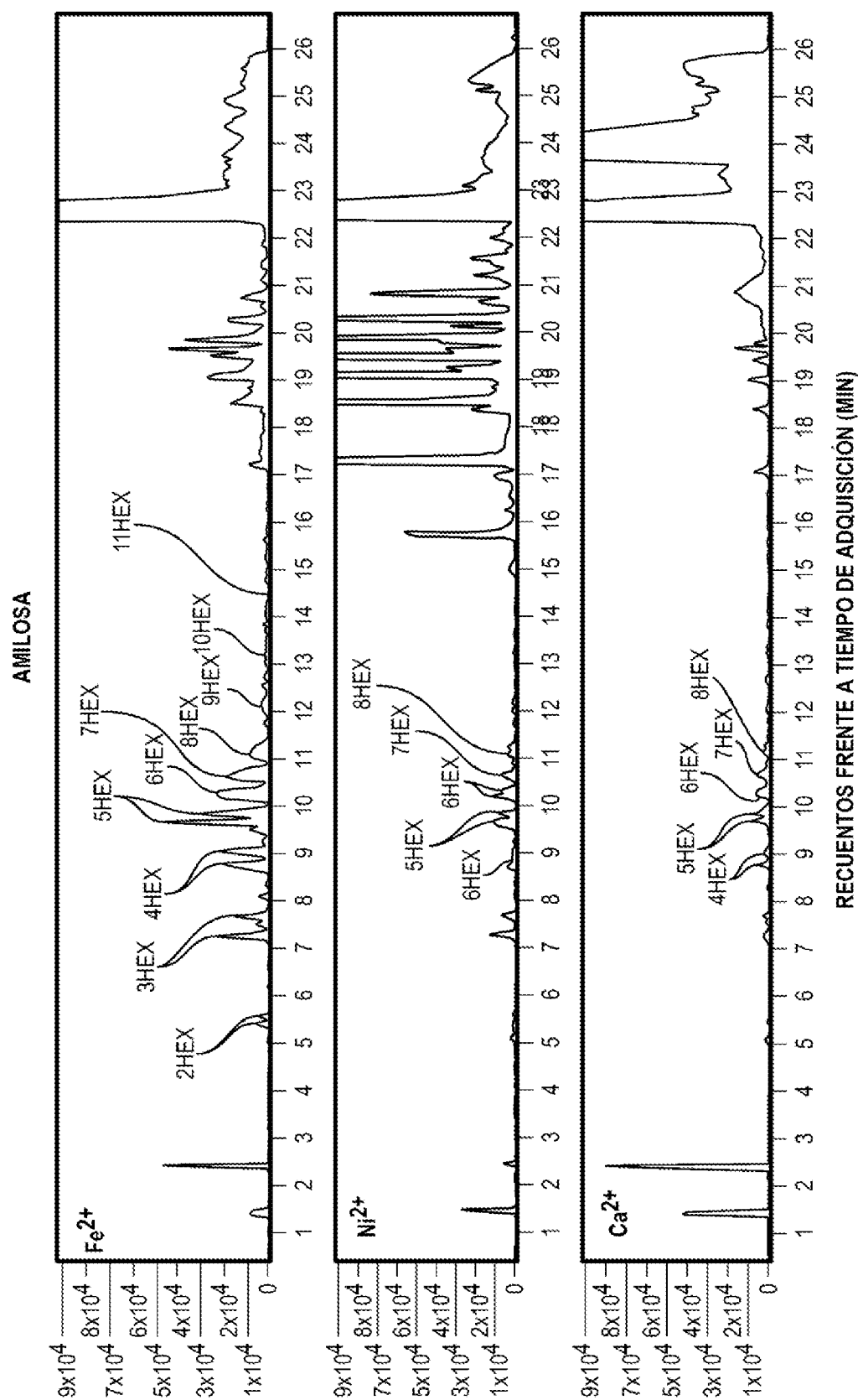
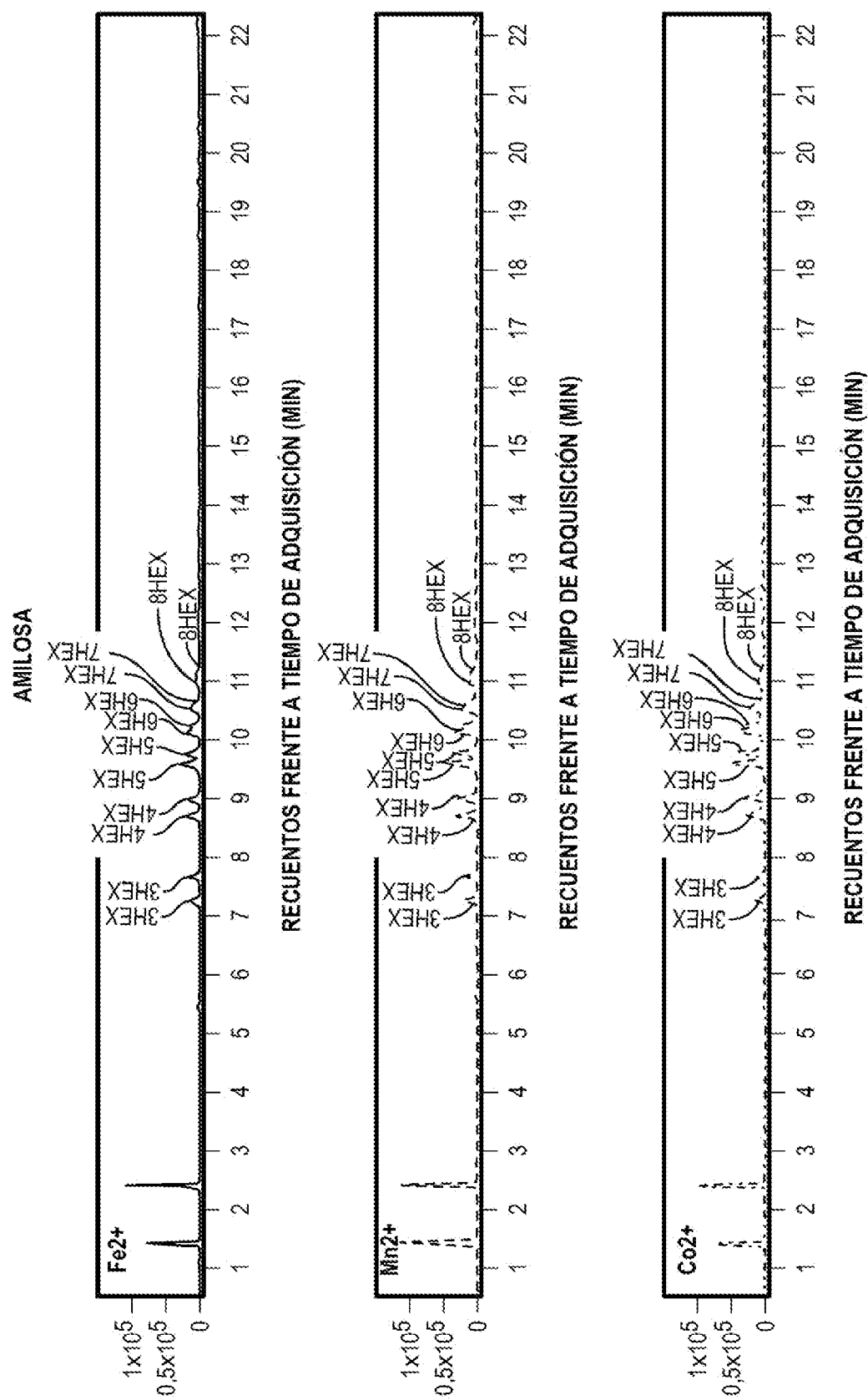


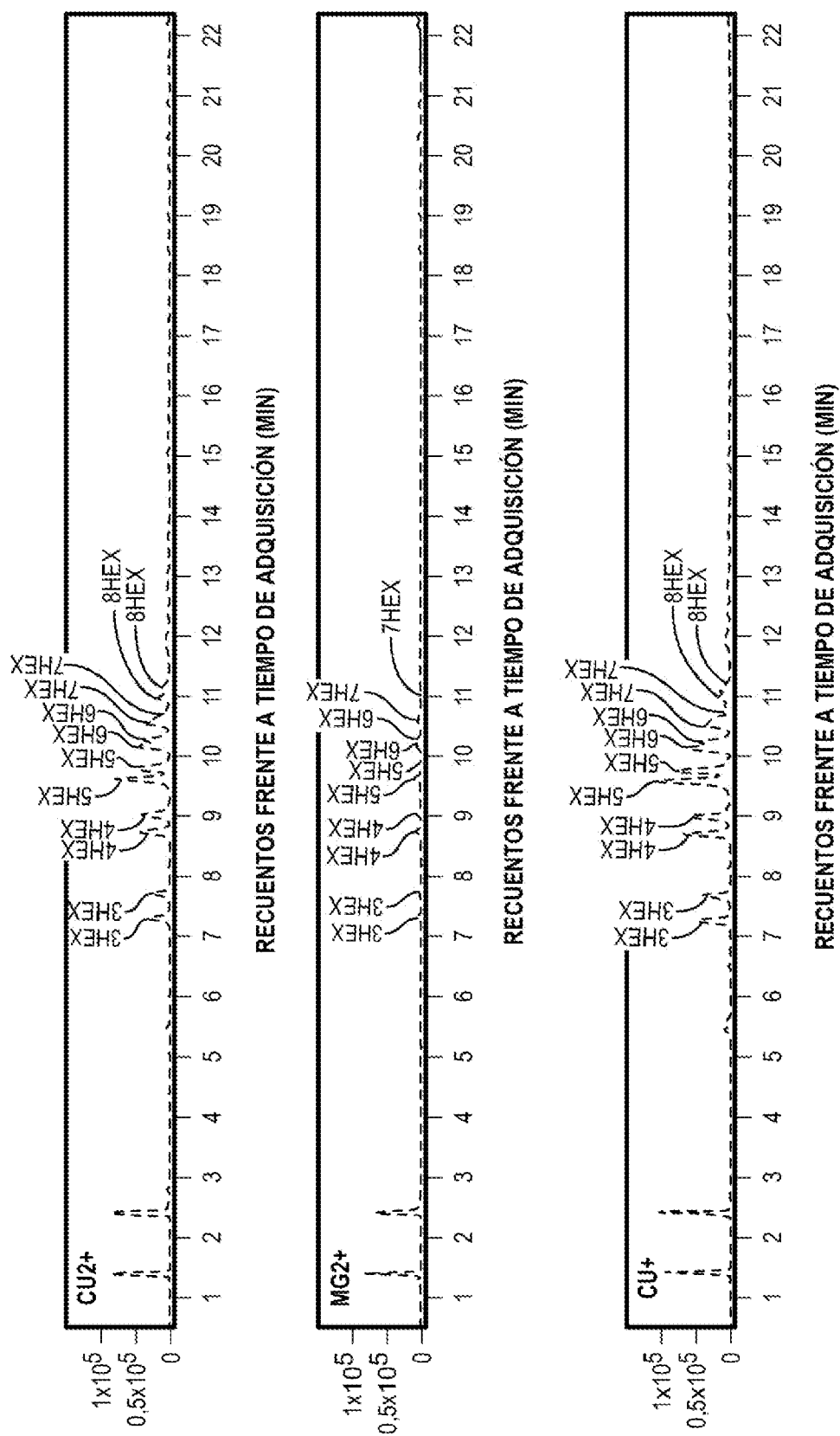
FIG. 23



**FIG. 24**

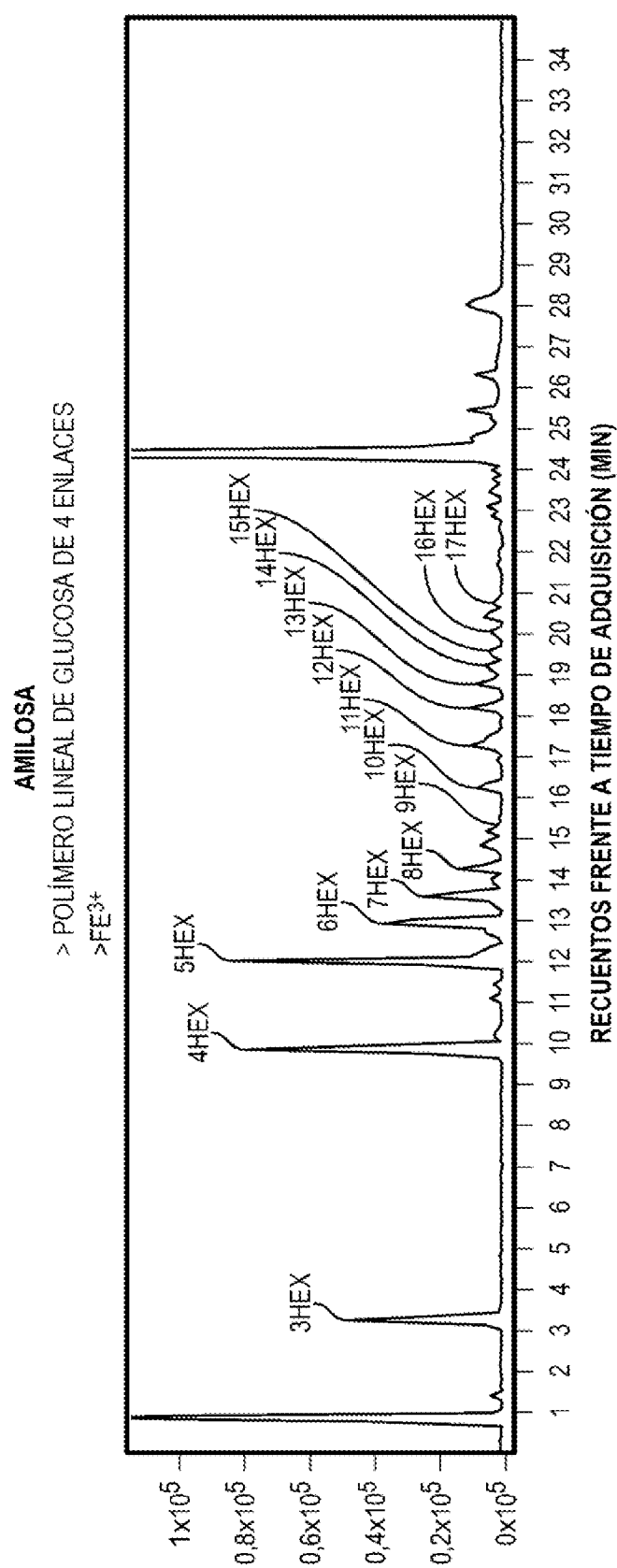


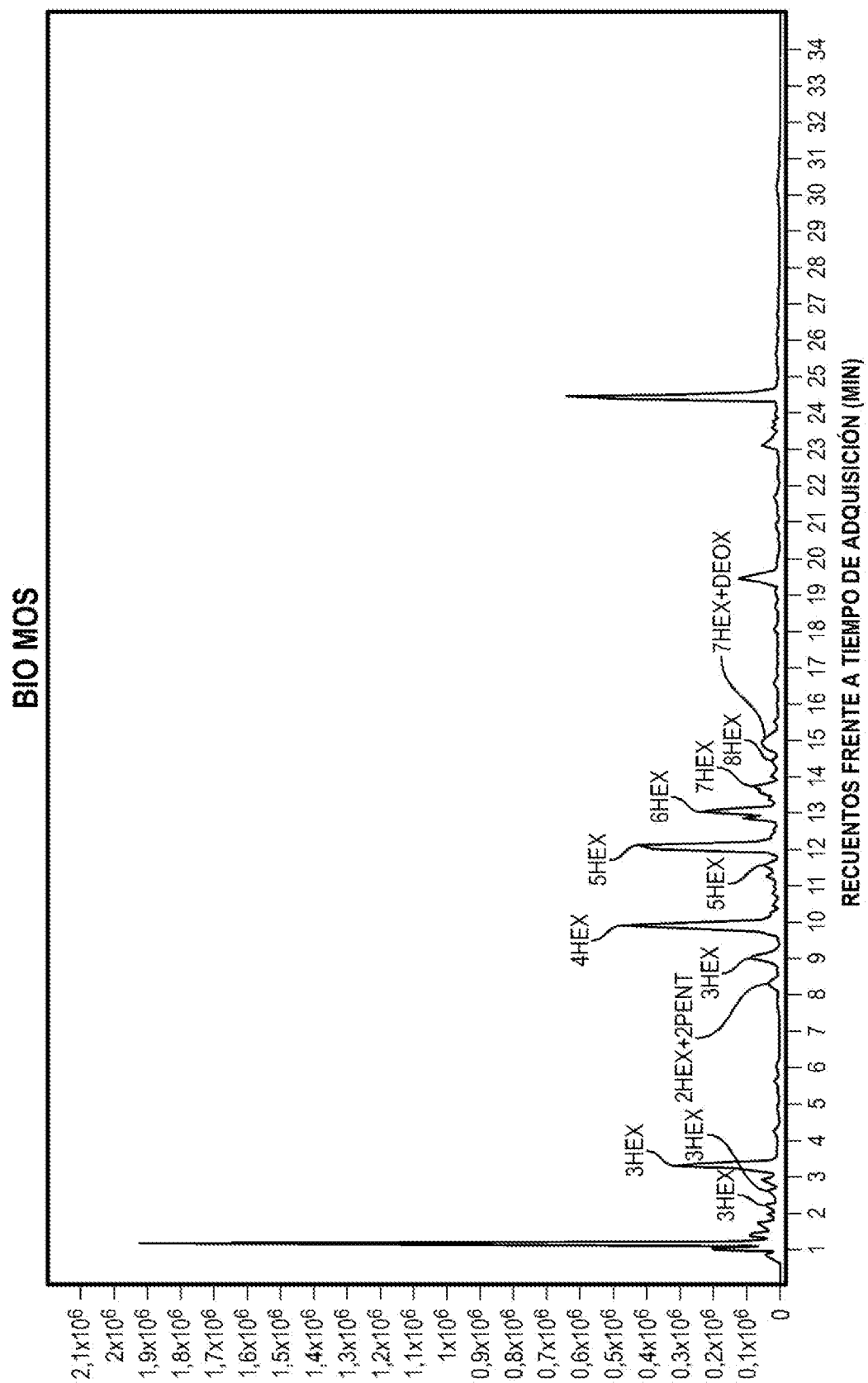
**FIG. 26**



**FIG. 26**  
**(CONTINUACIÓN)**



**FIG. 27**

**FIG. 28**

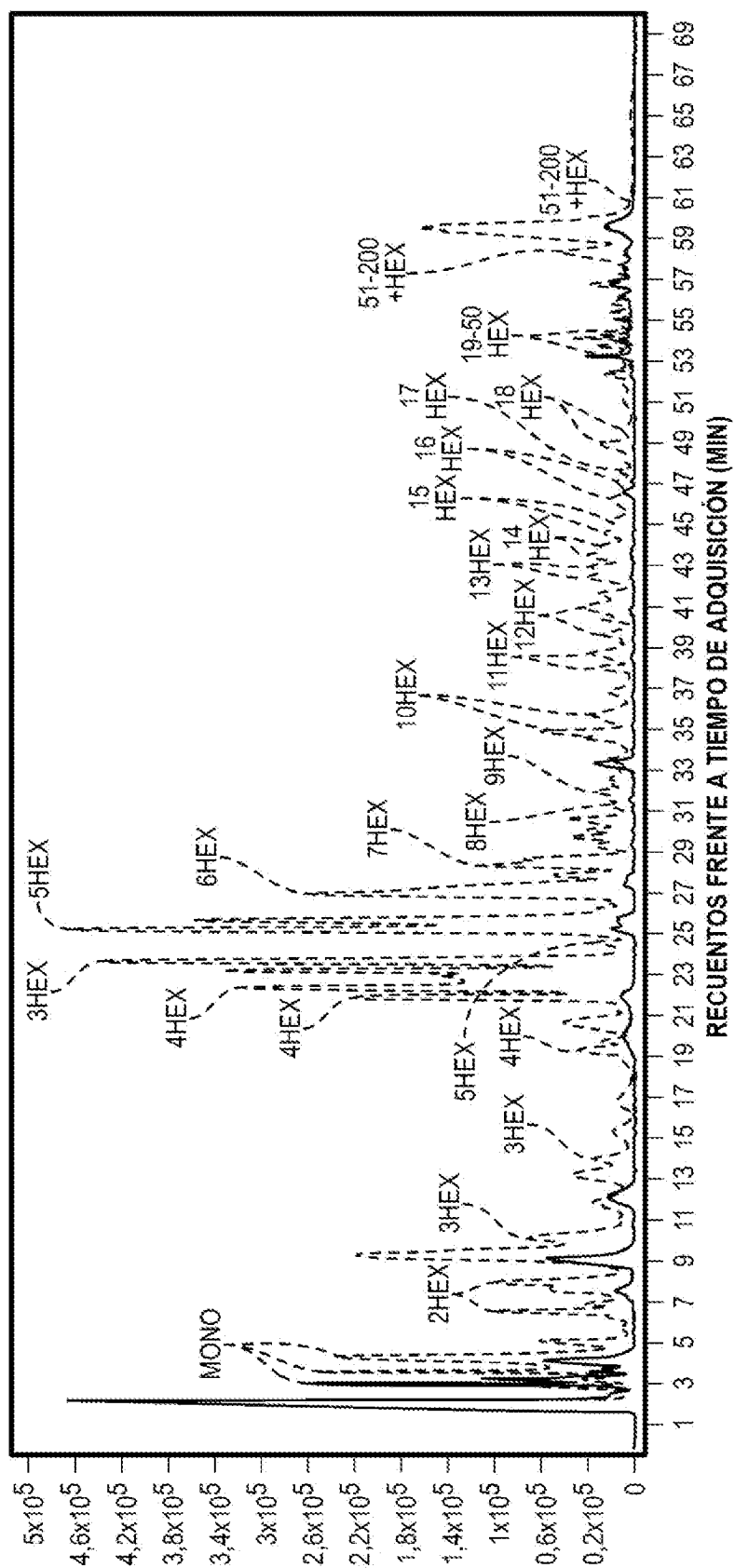


FIG. 29