

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 929 460**

51 Int. Cl.:

C08B 37/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.12.2014** **PCT/EP2014/078194**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015** **WO15091629**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.12.2014** **E 14812744 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2022** **EP 3083703**

54 Título: **Procedimiento de extracción de pectina sensible al calcio**

30 Prioridad:

18.12.2013 GB 201322454

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

29.11.2022

73 Titular/es:

DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)

Langebrogade 1
1411 Copenhagen K, DK

72 Inventor/es:

BUCHHOLT, HANS CHRISTIAN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 929 460 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

Procedimiento de extracción de pectina sensible al calcio

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 Esta invención se refiere a un procedimiento para la extracción de pectina sensible al calcio a partir de material de partida que contiene pectina. La invención se refiere además al uso de la pectina obtenida en este procedimiento.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 La pectina es un aditivo de uso común en la industria alimentaria. Es útil, por ejemplo, como agente estabilizante, espesante y agente gelificante, por ejemplo en mermeladas y otros productos a base de frutas, así como en productos a base de leche agria, tales como yogures. La pectina también ha encontrado otros usos en la industria alimentaria, por ejemplo como sustituto de grasas.

La pectina es un polisacárido estructural que normalmente se encuentra en forma de una sustancia péctica original insoluble en agua, la protopectina, en la pared celular primaria y la lámina media de las plantas terrestres verdes, tales como frutas y verduras. Las principales fuentes de productos comerciales de pectina son la cáscara de los cítricos y el orujo de manzana, en los que la protopectina representa 10-40% del peso de la materia seca.

- 15 La pectina es la denominación genérica de los compuestos solubles en agua que resultan de la hidrólisis restringida de la protopectina. La naturaleza exacta de la protopectina no se comprende completamente. Sin embargo, generalmente se reconoce que la protopectina es una estructura compleja en la que la pectina se une a otros componentes de la pared celular, tal como la celulosa, la proteína de la pared celular y la hemicelulosa mediante enlaces covalentes, enlaces de hidrógeno y/o interacciones iónicas.

- 20 La pectina comprende cadenas lineales de galacturonano (polímero de ácido D-galacturónico unido mediante uniones α -(1-4)) que se interrumpen con cadenas principales de ramno-galacturonano (polímeros del disacárido repetitivo ácido α -(1-4)-D-galacturónico- α -(1-2)-L-ramnosa), que a menudo tiene cadenas laterales de arabinogalactanos poliméricos unidos glicosídicamente a las posiciones O-3 u O-4 de la L-ramnosa. Las secuencias de galacturonano pueden tener D-xilosa y D-apiosa unidas glicosídicamente a sus posiciones O-2 u O-3, que también pueden estar
25 sustituidas con grupos acetilo enlazados mediante éster. Las cadenas largas de restos de ácido D-galacturónico unidos mediante α -(1-4) se denominan comúnmente "regiones suaves", mientras que las regiones de ramnogalacturonano altamente ramificadas se denominan comúnmente "regiones pilosas".

- Las moléculas de pectina tienen un peso molecular de hasta más de 200.000 Da, y un grado de polimerización de más de 1000 unidades. Una parte de los grupos ácido carboxílico de las unidades de ácido galacturónico están
30 esterificados con metilo. En las plantas, los grupos carboxilo residuales se neutralizan parcial o completamente con cationes de calcio, potasio y magnesio, que están inherentemente contenidos en los tejidos vegetales.

- El "grado de esterificación" (DE) significa la medida en que los grupos ácido carboxílico libres contenidos en las unidades de ácido galacturónico de la pectina se han esterificados con metilo. Si más del 50% de los grupos carboxilo están esterificados, la pectina resultante se denomina "pectina rica en éster" ("pectina HE" para abreviar). Si menos
35 del 50% de los grupos carboxilo están esterificados, la pectina resultante se denomina "pectina poco esterificada" ("pectina LE" para abreviar, o "pectina poco metoxilada"). Si la pectina no contiene ningún grupo esterificado, o solo unos pocos, generalmente se denomina ácido péctico.

- La fuente de pectina también regirá en cierta medida si otros grupos éster están presentes o no en la estructura de la pectina. A este respecto, se sabe que algunas pectinas comprenden grupos acetilo. Aquí típicamente, los grupos
40 hidroxilo en C₂ o C₃ pueden estar acetilados. A modo de ejemplo, la pectina de remolacha azucarera está acetilada en cierta medida en O-2 y/u O-3 de los restos de ácido galacturónico.

- La estructura de la pectina, en particular el grado de esterificación, determina sus propiedades físicas y/o químicas. Por ejemplo, la gelificación de la pectina depende de la naturaleza química de la pectina, especialmente del grado de esterificación y grado de polimerización. Además, sin embargo, la gelificación de la pectina también depende de la
45 concentración de pectina y de las condiciones ambientales, como el contenido de sólidos solubles, el pH y la concentración de iones de calcio.

- La pectina se ha producido convencionalmente extrayendo primero los polímeros solubles con agua caliente débilmente acidificada, luego la disolución obtenida se filtra y se concentra, y la pectina se precipita con alcohol o sales metálicas a un pH adecuado. Sin embargo, esto conduce a una fracción de pectina extraída a granel que muestra
50 variabilidad molecular y sigue una interacción variada entre los iones de calcio y las moléculas de pectina separadas que tienen una afinidad variable por los iones de calcio y otras partículas cargadas. Los productos de pectina extraídos a granel comprenden moléculas que representan una amplia distribución del grado de esterificación y moléculas de patrón de esterificación de metilo aleatorio y no aleatorio. Esto afecta los parámetros de calidad importantes para la pectina, tales como la resistencia a la ruptura de los geles, el ajuste del perfil de temperatura, las interacciones con proteínas o cationes, y la solubilidad de la pectina en aplicaciones de fabricación de alimentos.
55

El documento WO98/58968 describe un método para preparar fracciones separadas de pectina HE que tiene características funcionales mejoradas con respecto a la pectina extraída a granel. En este método, el material de partida que contiene pectina HE se extrae usando una disolución de extracción acuosa con un pH ácido que extrae solo una parte del contenido de pectina en un primer ciclo de tratamiento. El material de partida tratado puede extraerse entonces al menos una vez más con otros medios de extracción, en el que el pH de los medios de extracción en el segundo y posibles ciclos posteriores es más bajo que en el ciclo de tratamiento inmediatamente anterior. Por lo tanto, por cada ciclo de extracción, el pH se vuelve más y más bajo, y la disolución de extracción más y más ácida. Por lo tanto, este procedimiento se centra en la extracción selectiva de fracciones de pectina con distribuciones estrechas de éster metílico y alta funcionalidad.

Sin embargo, muchas aplicaciones de pectina requieren fracciones de pectina homogéneas, pero esto da como resultado un rendimiento de pectina relativamente bajo y altos costes de producción.

El documento de la técnica anterior US4016351 describe un procedimiento para preparar pectina poco metoxilada en dos etapas: la etapa (1) es una etapa de lavado y desmetoxilación, en la que se añade una sal de calcio al agua usada para lavar la materia prima que contiene pectina antes de la extracción. El pH en esta etapa es 3-8. La sal de calcio se usa para inmovilizar (fijar) las sustancias pécticas en la materia prima formando pectatos de calcio insolubles para que los azúcares solubles y los sólidos puedan separarse de la materia prima. Es importante destacar que en la etapa (1) no tiene lugar ninguna extracción de pectina. En la etapa (2), la extracción de las sustancias pécticas fijadas se realiza mediante una disolución ácida que comprende ácido oxálico y opcionalmente otro ácido tal como el ácido sulfúrico, clorhídrico, nítrico o fosfónico. Después de la extracción, la mezcla se enfría y neutraliza a pH 3-7 (pH 6 en el Ejemplo 1, y pH 5-6 en el Ejemplo 2) inmediatamente antes de la separación de la pectina extraída. Cabe señalar que no tiene lugar ninguna extracción adicional de pectina durante el enfriamiento y la neutralización. Por el contrario, la presente invención se refiere a un procedimiento de extracción en dos etapas: una etapa a un pH fuertemente ácido (1,5-2,5), y una etapa posterior a un pH más alto que la primera etapa (pH 2,5-7 o 7-14) y preferiblemente en presencia de un agente quelante. La primera etapa da como resultado la formación de pectina tolerante al calcio, y la segunda etapa da como resultado la formación de pectina sensible al calcio. El presente procedimiento no incluye una etapa inicial de lavado de la materia prima que contiene pectina en presencia de iones de calcio para inmovilizar la pectina, y no da como resultado pectina desmetoxilada (o poco metoxilada). Siendo así, no sólo el procedimiento difiere del mencionado documento del estado de la técnica, sino también el producto final.

El documento WO00/39168 describe un método para separar el lote de pectina en fracciones separadas con diferentes características. En este documento, el lote de pectina que comprende pectina HE se separa con respecto a su sensibilidad frente a cationes polivalentes tales como iones de calcio. Esto se realiza, por ejemplo, tratando el material de partida con una disolución ácida débil para eliminar una fracción de extracto acuoso de pectina no sensible al calcio (NCSP), con lo que después el material vegetal tratado se trata con una disolución ácida acuosa más fuerte que la disolución ácida débil, es decir, que tiene un pH más bajo. De este modo, se puede eliminar una fracción que contiene algo de pectina sensible al calcio (CSP). En la primera etapa de extracción, se deben añadir sales de calcio si el pH está entre 2,5 y 3,0, para mantener insoluble la pectina sensible al calcio.

La segunda fracción es una mezcla de NCSP y CSP, y no una fracción pura. La CSP eliminada es una CSP débil, ya que la mayor parte de las fracciones de pectina más sensibles al calcio no son solubles en ácido y no se extraerán mediante este método. Además, el uso de las condiciones ácidas más fuertes usadas para la extracción de la fracción de CSP despolimeriza y desesterifica la pectina y cambia sus propiedades funcionales en un sentido negativo.

Las fracciones de pectina obtenidas por la presente invención en la segunda extracción descrita en la etapa c. no es soluble en condiciones ácidas. Entonces, cuando añadimos CSP adicional al extracto ácido, obtenemos una pectina con una funcionalidad diferente en comparación con todo el estado de la técnica descrito. Este diferencial en el producto final por el uso del procedimiento reivindicado también tiene un impacto en las aplicaciones finales destinadas a ser usadas en dicho producto.

Sin embargo, todavía existe una demanda en la industria de formas alternativas de separar CSP de NCSP, especialmente si estos procedimientos dan como resultado un alto rendimiento y una alta proporción de CSP en comparación con NCSP, además de obtener CSP como un producto natural, que es solo mínimamente modificado por ejemplo por despolimerización y/o desesterificación, así como por no obtenerse por ejemplo por modificación enzimática.

Además, un alto rendimiento de extracción, junto con una funcionalidad mejorada de la pectina, es atractivo tanto desde un punto de vista medioambiental y sostenible como económico debido al uso eficiente de los recursos que contienen pectina.

OBJETO DE LA INVENCION

Es el objeto de la invención proporcionar un procedimiento para la extracción o aislamiento de pectina sensible al calcio que dé como resultado un alto rendimiento y una alta pureza de pectina sensible al calcio.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Este objeto se puede lograr mediante un procedimiento para la extracción de pectina sensible al calcio a partir de un material de partida que contiene pectina, que comprende:

- 5 a. una primera etapa, que es una extracción ácida, en la que dicho material de partida se somete a extracción usando una disolución ácida que tiene un pH entre 1,5 - 2,5, que extrae un primer extracto que deja un primer residuo, en la que dicho primer extracto comprende pectina tolerante al calcio;
- b. opcionalmente, una segunda etapa, en la que el primer residuo se somete a al menos a un lavado, que da como resultado un segundo residuo y un segundo extracto;
- 10 c. una tercera etapa, que es una segunda extracción, en la que dicho primer o segundo residuo se somete a dicha segunda extracción usando una tercera disolución que extrae un tercer extracto que deja un tercer residuo, en la que dicho tercer extracto comprende pectina sensible al calcio; y en la que el pH de dicha tercera disolución es mayor que el pH de dicha disolución ácida, y dicha tercera disolución es una disolución formadora de quelatos.

El término "pectina" pretende significar una forma soluble en agua de una sustancia péctica obtenida por separación de pectina de un material vegetal.

- 15 La "sensibilidad al calcio" es una propiedad de la pectina que da como resultado un aumento de la viscosidad de una disolución de pectina en presencia de iones de calcio. La sensibilidad al calcio es un fuerte indicador de la sensibilidad a otros cationes multivalentes; la presente invención cubre también la sensibilidad a tales otros cationes, por ejemplo magnesio, cobre, hierro, zinc, aluminio, manganeso, y bario.

- 20 El contenido de pectina sensible al calcio en un producto de pectina HE se puede describir como la "relación de pectina sensible al calcio" (relación CSP o CSPR), que es la fracción de pectina sensible al calcio en un producto de pectina. Por lo tanto, la pectina sensible al calcio pura tiene teóricamente una CSPR = 1,0, una pectina que tiene un 50% de pectina sensible al calcio tiene una CSPR = 0,5, y una pectina tolerante al calcio pura tiene una CSPR = 0.

La alta pureza de la pectina sensible al calcio debe entenderse como la fracción de pectina que tiene un alto valor de CSPR, es decir, CSPR > 0,75, tal como CSPR > 0,8, por ejemplo CSPR > 0,9.

- 25 El material de partida de pectina se puede obtener preferiblemente de cítricos, manzanas, remolacha azucarera, cabezas de girasol, verduras, o productos de desecho de vegetales, tales como manzanas, remolacha azucarera, zanahorias, cebollas, melocotones, bayas de uva, mangos, guayabas, calabacines, calabazas, tomates, albaricoques, plátanos, judías, patatas, girasol o cítricos. Ejemplos de cítricos son limas, limones, toronjas, mandarinas, tangerinas, pomelos, y naranjas.

- 30 Para obtener el material de partida de pectina, las frutas y verduras se tratan según el tipo de fruta y verdura de una manera comúnmente conocida por los expertos en la técnica. Esto puede comprender una disgregación o prensado del material para separar el zumo y el aceite, seguido de varios lavados con agua para eliminar los sólidos solubles como azúcares y residuos de aceite y grasa. El material lavado se puede prensar y usar directamente para la extracción de pectina, o se puede secar a más del 85% de materia seca para que sea seguro para el transporte o el almacenamiento.

- 35 Los materiales de partida particularmente interesantes incluyen cáscaras secas de cítricos, que tienen un contenido de materia seca de alrededor del 85% en peso o más, preferiblemente en forma de piezas de 2 cm de longitud como máximo, que se obtienen como se describe anteriormente después del procesamiento de cáscara prensada de la industria del zumo tras la extracción del zumo de cítricos y los aceites esenciales. Todos estos materiales tienen un alto contenido de sustancias pécticas en forma de protopectina insoluble en agua. La cáscara de cítricos que tiene un
- 40 contenido de pectina extraíble en el intervalo de 20-35% en peso sobre la base de materia seca es particularmente interesante.

En términos de esta invención, "pectina tolerante al calcio" debe entenderse como similar a "pectina no sensible al calcio".

- 45 En la primera etapa, se realiza una extracción ácida con una disolución ácida y a un pH determinado, lo que, combinado con una temperatura y un tiempo, da como resultado la extracción de la mayoría de pectina tolerante al calcio y algo de pectina sensible al calcio en la disolución procedente del material de partida de pectina. Esta disolución ácida forma un primer extracto a partir del cual la fracción enriquecida con pectina tolerante al calcio puede purificarse usando técnicas como se describe más adelante. La primera etapa deja además un primer residuo, que es el material de partida que contiene pectina menos la fracción extraída por la disolución ácida, que comprende principalmente
- 50 pectina tolerante al calcio.

En una realización, el pH de la disolución ácida es 2-2,5.

A este pH, una cantidad importante de pectina tolerante al calcio, pero solo una cantidad menor de CSP, se extraerá del material de partida que contiene pectina.

Con el fin de optimizar aún más la extracción de pectina principalmente tolerante al calcio, la temperatura de extracción y el tiempo de extracción se ajustan en consecuencia.

En una realización, la temperatura de dicha extracción con ácido está entre 15-100°C. En otra realización, la extracción con ácido se lleva a cabo entre 60-75°C.

- 5 En otra realización, la extracción con ácido se lleva a cabo durante un período de tiempo de 0,5 a 10 horas. En otra realización más, la extracción con ácido se lleva a cabo de 1 a 8 horas.

La cantidad de disolución de extracción a usar en la extracción ácida como se describe en la primera etapa depende, por ejemplo, del origen y la condición del material que contiene pectina a extraer y del contenido de pectina extraíble en el material.

- 10 Según la invención, la cantidad de material que contiene pectina y la disolución de extracción en cada etapa de extracción, que se lleva a cabo mientras se agita suavemente la suspensión de material que contiene pectina, se escoge de modo que la suspensión tenga un contenido de materia seca que esté en el intervalo de 1% a 20% en peso, por ejemplo en el intervalo de 2% a 15% en peso, tal como en el intervalo de 2% a 6%.

- 15 Las diferentes disoluciones pueden ser para la extracción ácida, tal como un ácido orgánico o inorgánico. Los ácidos útiles incluyen ácidos inorgánicos fuertes o medianamente fuertes como por ejemplo, pero no se limitan a, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido sulfuroso, ácido nítrico o ácido fosfórico. Los ácidos orgánicos incluyen, pero no se limitan a, ácido fórmico, ácido acético, ácido propiónico, ácido cítrico, ácido malónico, ácido succínico, ácido tartárico, ácido oxálico, ácido glioxálico, ácido láctico, ácido glicerólico, ácido maleico, ácido fumárico y ácido benzoico. Debe entenderse que pueden usarse mezclas de ácidos.

- 20 La segunda etapa (primera etapa de lavado) es opcional, y por lo tanto puede omitirse. Sin embargo, se logra una relación de pectina sensible al calcio (CSPR) aún mayor en la tercera etapa cuando tiene lugar el lavado entre la primera y la segunda extracción.

- 25 Si se omite la segunda etapa, debe entenderse que la extracción con ácido es seguida de la segunda extracción. Así, el primer residuo obtenido por la extracción ácida (primera etapa) forma la base para la segunda extracción (tercera etapa).

Por lo tanto, el objeto de la presente invención también se puede lograr mediante un procedimiento para la extracción de pectina sensible al calcio a partir de un material de partida que contiene pectina, que comprende:

- 30 a. una primera etapa, que es una extracción ácida, en la que dicho material de partida se somete a extracción usando una disolución ácida que extrae un primer extracto que deja un primer residuo, en la que dicho primer extracto comprende pectina tolerante al calcio;

b. una etapa adicional, que es una segunda extracción, en la que dicho primer residuo se somete a una segunda extracción usando una segunda disolución que extrae un segundo extracto que deja un segundo residuo, en la que dicho segundo extracto comprende pectina sensible al calcio; y en la que el pH de dicha segunda disolución es mayor que el pH de dicha disolución ácida.

- 35 En una realización adicional, se realiza al menos un primer lavado entre la extracción con ácido y la segunda extracción.

- 40 En esta primera etapa de lavado, se puede lavar el primer residuo para eliminar restos de la disolución ácida así como del primer extracto. La primera etapa de lavado elimina los restos de disolución ácida y pectina tolerante al calcio extraída (o solubilizada), y extrae algo de pectina adicional del primer residuo, cambiándola a un segundo residuo. A partir de la primera etapa de lavado se obtiene además un segundo extracto que comprende la disolución de lavado y los restos de la disolución ácida y pectina tolerante al calcio extraída adicionalmente.

- 45 En la primera etapa de lavado, el primer residuo se somete a al menos a un lavado. Por la presente debe entenderse que el primer residuo puede lavarse una vez, que el primer residuo puede lavarse dos veces, o que el primer residuo puede lavarse tres veces, etc., y que el residuo resultante que queda del procedimiento o procedimientos de lavado debe ser considerado como el segundo residuo.

El lavado se puede realizar usando, por ejemplo, un lavado continuo a contracorriente o un lavado por un procedimiento de percolación. El lavado se puede realizar por ejemplo como un lavado continuo en un filtro estacionario o como un lavado a contracorriente.

- 50 En una realización, la o las disoluciones de uno o más lavados se mezclan en un segundo extracto. En otra realización, la o las disoluciones de los lavados posteriores se mantienen separadas como un primer segundo extracto, un segundo segundo extracto; un tercer segundo extracto, etc., y la pectina se puede aislar de cada uno de los segundos extractos por separado.

El número de lavados necesarios depende del material de partida original, así como de los parámetros de extracción como tales, es decir, pH, temperatura, disolución, tiempo de extracción, etc. Por lo tanto, el número de lavados debe ajustarse en consecuencia para asegurarse de que se eliminan las trazas de la disolución ácida así como la pectina tolerante al calcio extraída en la primera etapa.

- 5 La cantidad de disolución de lavado a usar en el lavado como se describe en la segunda etapa depende del origen y la condición del material que contiene pectina, la disolución de lavado, la disolución de extracción ácida, y el contenido de pectina extraíble en el material.

En una realización, el lavado se realiza en una relación de disolución de lavado:material vegetal seco de 5:1 a 50:1. Esto significa que si se usan 100 kg de material vegetal seco como material de partida que contiene pectina, debe lavarse con 500 a 5000 kg de la disolución de lavado.

- 10

En otra realización, el lavado se realiza en una relación de disolución de lavado:material vegetal seco de alrededor de 15:1.

En otra realización, al menos uno de dicho al menos un lavado se realiza con agua. En todavía otra realización, al menos uno de dicho al menos un lavado se realiza con agua a una temperatura entre 50-80°C.

- 15 Alternativamente, el lavado se puede realizar usando agua débilmente acidificada o agua caliente débilmente acidificada con un pH mayor que el pH de la disolución ácida usada en la primera etapa de extracción.

La primera etapa de lavado se realiza a un pH determinado y con una disolución durante un tiempo y a una temperatura que permite un lavado óptimo para que los restos se eliminen de manera eficiente. Si se incluye esta etapa, esto permite obtener una fracción de pectina (tercer extracto) en la tercera etapa que tiene una alta pureza de CSP.

- 20 En una realización, el lavado se realiza a una temperatura entre 20°C y 90°C. En otra realización, el lavado se realiza a una temperatura entre 65°C y 75°C.

En otra realización, el lavado se realiza entre 15 min y 2 horas. En todavía otra realización, el lavado se realiza entre 30 min y 60 min.

- 25 La segunda extracción se realiza con una tercera disolución y a un pH que, combinado con la temperatura y el tiempo, da como resultado la extracción de cantidades importantes de CSP en la disolución a partir del material de partida de pectina. La disolución extrae CSP del segundo residuo, dando como resultado un tercer residuo que es el segundo residuo menos la fracción de pectina extraída que es principalmente CSP. La pectina extraída y la tercera disolución forman un tercer extracto a partir del cual se puede purificar CSP usando técnicas que se describen más adelante.

- 30 Si se omite el primer lavado, la segunda extracción seguirá a la extracción con ácido, y la tercera disolución como se describe aquí será la segunda disolución. La CSP se extraerá del primer residuo, dando como resultado un segundo residuo que es el primer residuo menos la fracción de pectina extraída que es principalmente CSP. La pectina extraída y la segunda disolución forman un segundo extracto a partir del cual se puede purificar CSP usando técnicas que se describen más adelante.

- 35 Se ha encontrado sorprendentemente que tener una segunda extracción después de una extracción con ácido da como resultado la liberación de una cantidad adicional considerable de pectina, además de la fracción de pectina extraída con ácido. La pectina en el tercer extracto, o en el segundo extracto si se omite la primera etapa de lavado, es significativamente diferente de la primera fracción con respecto a las características químicas así como a las propiedades funcionales de la pectina. La extracción ácida parece eliminar el material péctico y crear acceso a la extracción de más fracciones de pectina reactivas al Ca, que no se pueden extraer usando exclusivamente una única extracción ácida o el uso continuo de la extracción ácida.

- 40 Para obtener un alto rendimiento y una fracción altamente pura de CSP, es importante que el pH de la tercera disolución sea mayor que el pH de la disolución ácida usada en la primera etapa de extracción. Así, el pH durante la segunda extracción es mayor que el pH durante la extracción ácida.

- 45 Si se omite el primer lavado, la segunda extracción seguirá a la extracción con ácido, y la tercera disolución como se describe aquí será la segunda disolución. El pH de la segunda disolución es mayor que el pH de la disolución ácida usada en la primera etapa de extracción. Así, el pH durante la segunda extracción es mayor que el pH durante la extracción ácida.

En una realización, el pH de dicha tercera disolución es de 2,5 a 7.

- 50 Si se omite el primer lavado, la segunda extracción seguirá a la extracción con ácido, y la tercera disolución como se describe aquí será la segunda disolución. El pH de dicha segunda disolución es de 2,5 a 7.

En otra realización, el pH de dicha tercera disolución es de 2,5 a 6,9, siendo dicha tercera disolución una disolución ácida débil.

- Si se omite el primer lavado, la segunda extracción seguirá a la extracción con ácido, y la tercera disolución como se describe aquí será la segunda disolución. El pH de dicha segunda disolución es de 2,5 a 6,9, siendo dicha segunda disolución una disolución ácida débil.
- 5 En todavía otra realización, el pH de dicha tercera disolución es de 2,5 a 4, siendo dicha tercera disolución una disolución ácida débil.
- Si se omite el primer lavado, la segunda extracción seguirá a la extracción con ácido, y la tercera disolución como se describe aquí será la segunda disolución. El pH de dicha segunda disolución es de 2,5 a 4, siendo dicha segunda disolución una disolución ácida débil.
- 10 En todavía otra realización, el pH de la tercera disolución es de 4 a 6, siendo dicha tercera disolución una disolución ácida débil.
- Si se omite el primer lavado, la segunda extracción seguirá a la extracción con ácido, y la tercera disolución como se describe aquí será la segunda disolución. El pH de la segunda disolución es de 4 a 6, siendo dicha segunda disolución una disolución ácida débil.
- 15 En otra realización adicional, la tercera disolución comprende una o más sales de ácidos inorgánicos parcialmente neutralizados, como polifosfato, borato, fosfato, pirofosfato, fosfonatos, hidrogenocarbonato, hidrogenosulfato, zeolitas, resinas orgánicas catiónicas, sales de ácidos orgánicos parcialmente neutralizados, o policarboxilatos tales como tartrato, citrato, oxalato, gluconato, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético), NTA (triacetato de nitrilo), imidazol y derivados.
- 20 Si se omite el primer lavado, la segunda extracción seguirá a la extracción con ácido, y la tercera disolución como se describe aquí será la segunda disolución. La segunda disolución comprende una o más sales de ácidos inorgánicos parcialmente neutralizados, como polifosfato, borato, fosfato, pirofosfato, fosfonatos, hidrogenocarbonato, hidrogenosulfato, zeolitas, resinas orgánicas catiónicas, sales de ácidos orgánicos parcialmente neutralizados, o policarboxilatos como tartrato, citrato, oxalato, gluconato, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético), NTA (triacetato de nitrilo), imidazol y derivados.
- 25 En procedimiento adicional, la tercera disolución es una disolución formadora de quelatos. Por la presente, debe entenderse que la tercera disolución comprende agentes quelantes, y por lo tanto tiene una función quelante, es decir, puede formar complejo o complejos con cationes di- o multivalentes.
- Si se omite el primer lavado, la segunda extracción seguirá a la extracción con ácido, y la tercera disolución como se describe aquí será la segunda disolución. La segunda disolución es una disolución formadora de quelatos.
- 30 De este modo, los cationes di- o multivalentes se unen a los agentes quelantes usados para la segunda extracción, y la CSP se mantiene soluble. Por lo tanto, se extrae una fracción mayor de CSP, lo que da como resultado un mayor rendimiento de CSP. Sorprendentemente, se encontró que la extracción con ácido parece eliminar el material péctico y crear acceso a la extracción de más fracciones de pectina reactivas con Ca mediante agentes quelantes. Los agentes quelantes solos no son suficientes.
- 35 En una realización, la disolución formadora de quelatos comprende uno o más de los siguientes: polifosfatos, ácido cítrico o sus sales, ácido oxálico o sus sales, ácido fosfórico o sus sales, sales de ácidos orgánicos di- o multivalentes parcialmente neutralizados, como EDTA, CDTA, DTPA, NTA, imidazol, ácido carbónico, o resinas de intercambio iónico catiónico.
- 40 En una realización, el pH de la tercera disolución es de 7 a 14. En otra realización, el pH de la tercera disolución es de 7,1 a 14 (disolución básica). En otra realización, el pH de la tercera disolución es de 8 a 12 (disolución básica). En todavía otra realización, el pH de la tercera disolución es de 4 a 12. En otra realización, el pH de dicha tercera disolución es de 8 a 10 (disolución básica). En todavía otra realización, el pH de la tercera disolución es de 10 a 12 (disolución básica).
- 45 Si se omite el primer lavado, la segunda extracción seguirá a la extracción con ácido, y la tercera disolución como se describe aquí será la segunda disolución. El pH de la segunda disolución es de 7 a 14. En otra realización, el pH de la tercera disolución es de 7,1 a 14 (disolución básica). En otra realización, el pH de la tercera disolución es de 8 a 12 (disolución básica). En todavía otra realización, el pH de la tercera disolución es de 4 a 12. En otra realización, el pH de dicha tercera disolución es de 8 a 10 (disolución básica). En todavía otra realización, el pH de la tercera disolución es de 10 a 12 (disolución básica).
- 50 Dependiendo de las condiciones generales de extracción, los intervalos de pH básicos más bajos, tales como por ejemplo pH 8-10, dan como resultado una menor despolimerización y desesterificación de la pectina extraída que la extracción a un pH más alto.

En todavía otra realización, dicha tercera disolución comprende una o más bases o sales básicas con cationes mono- o divalentes. Ejemplos de tales son carbonatos, hidrogenocarbonatos, así como hidróxidos de litio, sodio, potasio, amonio, calcio y magnesio.

- 5 Si se omite el primer lavado, la segunda extracción seguirá a la extracción con ácido, y la tercera disolución como se describe aquí será la segunda disolución. La segunda disolución comprende una o más bases o sales básicas con cationes mono- o divalentes.

A fin de optimizar aún más la extracción de CSP, se pueden ajustar la temperatura y el tiempo de extracción.

En una realización, la segunda extracción se lleva a cabo durante un período de tiempo de 0,5 a 5 horas.

- 10 En una realización, la temperatura de dicha segunda extracción está entre 0-100°C. En otra realización, la temperatura de la segunda extracción está entre 65-75°C. En otra realización, la temperatura está entre 20-65°C.

En una realización, cuando se usa una extracción alcalina, es decir, cuando el pH de la tercera disolución está por encima de 7, la temperatura de dicha extracción alcalina está entre 0-75°C. En una realización adicional, la temperatura de la extracción alcalina está entre 0-25°C, o entre 20-50°C.

- 15 Si se omite el primer lavado, la segunda extracción seguirá a la extracción con ácido, y la tercera disolución como se describe aquí será la segunda disolución. En una realización, cuando se usa una extracción alcalina, es decir, cuando el pH de la segunda disolución está por encima de 7, la temperatura de dicha extracción alcalina está entre 0-75°C. En una realización adicional, la temperatura de la extracción alcalina está entre 0-25°C, o entre 20-50°C.

En otra realización, el procedimiento comprende una cuarta etapa, en la que dicho tercer residuo se somete a al menos un lavado que da como resultado un cuarto extracto y un cuarto residuo.

- 20 Si se omite el primer lavado, la segunda extracción seguirá a la extracción con ácido, y la tercera disolución como se describe aquí será la segunda disolución. El segundo residuo se somete a al menos a un lavado, que da como resultado un tercer extracto y un tercer residuo.

- 25 De este modo, el residuo se lava para eliminar los restos de CSP adheridos al tercer residuo (segundo residuo si se omite el primer lavado). La disolución de lavado -al menos en cierto grado- extrae componentes del primer residuo. La cuarta etapa elimina los restos de CSP del tercer residuo, cambiándolo a un cuarto residuo. A partir de la cuarta etapa se obtiene además un cuarto extracto, que comprende la disolución de lavado y los restos de la tercera disolución y CSP extraída.

- 30 En la cuarta etapa (segundo lavado), el tercer residuo se somete a al menos a un lavado. Por la presente, debe entenderse que el tercer residuo se puede lavar una vez, que el tercer residuo se puede lavar dos veces, que el tercer residuo se puede lavar tres veces, etc., y que el residuo resultante que queda del procedimiento o procedimientos de lavado debe ser considerado como el cuarto residuo. El lavado se puede realizar usando, por ejemplo, un lavado continuo a contracorriente o un lavado mediante un procedimiento de percolación.

- 35 En una realización, la o las disoluciones de uno o más lavados se mezclan en un cuarto extracto. En otra realización, la o las disoluciones de lavados posteriores se mantienen separadas como un primer cuarto extracto, un segundo cuarto extracto; un tercer cuarto extracto, etc.; y la CSP puede aislarse de cada uno de los cuartos extractos por separado.

El número de lavados necesarios depende del material de partida original, así como de los parámetros de extracción como tales, es decir, pH, temperatura, disolución, tiempo de extracción, etc. Por lo tanto, el número de lavados debe ajustarse para asegurarse de que se eliminan del tercer residuo los restos de CSP.

- 40 La cantidad de disolución de lavado a usar en la cuarta etapa depende, es decir, del origen y la condición del material que contiene pectina, de la tercera disolución, de la disolución de lavado, y del contenido de pectina extraíble en el material.

- 45 En una realización, el lavado se realiza en una relación de disolución de lavado:material vegetal seco de 5:1 a 50:1. Esto significa que si se utilizan 100 kg de material vegetal seco como material de partida que contiene pectina, debe lavarse con 500 a 5000 kg de la disolución de lavado.

En otra realización, el lavado se realiza en una relación de disolución de lavado:material vegetal seco de alrededor de 15:1.

En otra realización, al menos uno de dicho al menos un lavado se realiza con agua.

- 50 Alternativamente, el lavado se puede realizar usando agua débilmente acidificada o alcalina con un pH mayor que el pH de la disolución ácida usada en la primera etapa de extracción, pero no mayor que el pH de la tercera disolución.

La cuarta etapa se realiza a un pH y con una disolución durante un tiempo y a una temperatura que permita un lavado óptimo para que los restos se eliminen de manera eficiente.

En una realización, el lavado se realiza a una temperatura entre 0°C y 80°C. En otra realización, el lavado se realiza a una temperatura entre 0°C y 20°C. En todavía otra realización, el lavado se realiza a una temperatura entre 50°C y 80°C.

En otra realización, el lavado se realiza entre 10 min y 2 horas.

En todavía otra realización, el lavado se realiza entre 30 min y 90 min.

En otra realización, dos o más de los extractos se mezclan formando un extracto mixto. De este modo, la cantidad de pectina tolerante al calcio y/o CSP en el extracto mixto final es mayor, y en consecuencia, el rendimiento obtenido finalmente será mayor, así como la carga de trabajo al purificar un extracto en lugar de dos o más será menor.

En una realización, el extracto mixto comprende pectina tolerante al calcio o CSP. En otra realización, el extracto mixto son dos extractos mixtos: un primer extracto mixto que comprende principalmente pectina tolerante al calcio, y un segundo extracto mixto que comprende principalmente CSP.

Así, en una realización, el tercer extracto y dicho cuarto extracto se mezclan formando un quinto extracto.

En otra realización, el primer extracto y dicho segundo extracto se mezclan formando un sexto extracto.

En todavía otra realización, el primer extracto, dicho segundo extracto, dicho tercer extracto y dicho cuarto extracto se mezclan formando un séptimo extracto.

En otra realización, el primer extracto se separa de dicho primer residuo, dicho segundo extracto se separa de dicho segundo residuo, dicho tercer extracto se separa de dicho tercer residuo, y/o dicho cuarto extracto se separa de dicho cuarto residuo por filtración, tamizado en húmedo, decantación o centrifugación.

Los procedimientos de separación se realizan mediante técnicas comúnmente conocidas por el experto en la técnica, y como tales, pueden ser realizados por estos expertos en la técnica usando sus conocimientos generales comunes. La separación se realiza entre las etapas separadas del procedimiento antes de aislar la pectina de los extractos, o usando los residuos en etapas posteriores del procedimiento.

En otro procedimiento, dicho material de partida se ha sometido a un pretratamiento.

El pretratamiento se puede realizar para cambiar la distribución del tamaño de partícula de la materia prima moliendo la cáscara seca o cortando el material en una suspensión acuosa de cáscara.

En todavía otro procedimiento, dicho material de partida está en estado reciente, congelado o seco.

El secado del material puede llevarse a cabo mediante cualquier equipo de secado convencional, tal como un horno de secado, un secador de banda, un secador de tambor, o un secador de lecho fluido, durante un período de tiempo suficiente para obtener un contenido de materia seca en el material de al menos 80% en peso. En una realización, el contenido de materia seca en el material es al menos 90% en peso. El secado se lleva a cabo a una temperatura que oscila desde la temperatura ambiente hasta por encima de 100°C, durante un período máximo de 36 horas. En una realización, el secado se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 40°C a 100°C, durante un período de 36 horas como máximo. En una realización, el secado se puede llevar a cabo a presiones por debajo de la presión atmosférica, por lo que se puede usar una temperatura de secado relativamente menor o un período de secado comparativamente más corto, lo que da como resultado un tratamiento más suave.

En otro procedimiento, la pectina se purifica adicionalmente a partir de dicho primer extracto, dicho segundo extracto, dicho tercer extracto, dicho cuarto extracto, dicho quinto extracto, dicho sexto extracto y/o dicho séptimo extracto mediante centrifugación, filtración, intercambio de iones, concentración, precipitación, lavado, prensado, secado y molienda.

La pectina extraída puede recuperarse de los extractos individuales o extractos mixtos por cualquier método conveniente.

Todos estos métodos se pueden realizar como conoce el experto en la técnica.

En todavía otro procedimiento, la precipitación se realiza usando 2-propanol.

La precipitación de pectina se puede realizar con cualquier disolución que sea miscible en agua y en la que la pectina sea sustancialmente insoluble. La pectina precipitada se separa del líquido por cualquier método conveniente, tal como por ejemplo por decantación, centrifugación o filtración, y entonces el precipitado se puede prensar y lavar en el filtro para eliminar las sales solubles y las impurezas. Finalmente, la pectina se puede secar y opcionalmente triturar antes del uso.

La precipitación de la pectina mediante 2-propanol u otras disoluciones alternativas del extracto puede estar precedida por una concentración de la pectina, por ejemplo por filtración por membrana o por evaporación a presión reducida.

Disoluciones alternativas para la precipitación de pectina pueden ser alcohol monohidroxilado, por ejemplo metanol, etanol, terc-butanol, sec-butanol, n-butanol, alcohol terc-amílico, alcohol neopentílico, alcohol sec-amílico o dietilcarbinol; un alcohol dihidroxilado, por ejemplo etilenglicol, propilenglicol, o tetrametilenglicol; una cetona, por ejemplo acetona, metiletilcetona, metilisobutylcetona, o metil terc-butylcetona; o un éter de glicol, por ejemplo monometiléter de dietilenglicol, monometiléter de etilenglicol, monometiléter de dietilenglicol o dimetiléter de trietilenglicol. También se pueden usar mezclas de dos o más de tales disoluciones en la precipitación de la pectina.

Esta invención describe además una fracción de pectina obtenida/obtenible mediante el procedimiento descrito anteriormente, en la que la relación de pectina sensible al calcio (CSPR) está por encima de 0,75. En una realización adicional, la relación de pectina sensible al calcio (CSPR) está por encima de 0,80. En una realización adicional, la relación de pectina sensible al calcio (CSPR) está por encima de 0,85. En una realización adicional, la relación de pectina sensible al calcio (CSPR) está por encima de 0,9.

En otra realización, se describe una fracción de pectina en la que el grado de esterificación (DE) está por encima de 50%. En otra realización, el grado de esterificación (DE) está por encima de 55%. En otra realización, el grado de esterificación (DE) está por encima de 60%. En otra realización, el grado de esterificación (DE) está por encima de 65%.

En una realización, la CSPR está por encima de 0,75, y el DE está por encima del 50%.

En otra realización, la CSPR está por encima de 0,8, y el DE está por encima del 50%.

En otra realización, la CSPR está por encima de 0,9, y el DE está por encima del 50%.

En otra realización, la CSPR está por encima de 0,75, y el DE está por encima del 60%.

En otra realización, la CSPR está por encima de 0,8, y el DE está por encima del 60%.

En otra realización, la CSPR está por encima de 0,9, y el DE está por encima del 60%.

Esta fracción de pectina obtenida por el procedimiento, es decir, los extractos obtenidos en las diferentes etapas, incluye fracciones de pectinas con diferentes propiedades, tales como fracciones que comprenden principalmente pectina tolerante al calcio y fracciones que comprenden principalmente CSP. Por lo tanto, los extractos tienen diferentes niveles de CSPR.

A partir del procedimiento es posible obtener extractos que comprenden un alto nivel de CSP, y por lo tanto que tienen una CSPR elevada. Además, dado que este procedimiento se realiza sin adición de enzimas y en condiciones sensibles, la pectina se desesterifica y despolimeriza solo moderadamente. De este modo se puede obtener una fracción particular de pectina.

Esta invención describe además un uso de pectina obtenida mediante el procedimiento descrito anteriormente, en el que la pectina se usa para estabilizar bebidas y para estructurar productos lácteos acidificados.

Además, se describe un uso en el que la bebida es leche acidificada o zumos de frutas diluidos.

En una realización, para este fin se usa la fracción de pectina que comprende principalmente CSP, es decir, con una CSPR por encima de 0,75.

En una realización, los productos lácteos acidificados se seleccionan de productos lácteos acidificados, por ejemplo que tienen un pH de 3,5 a 5, tal como leche acidificada, yogur bebible, y yogur con frutas.

Los productos lácteos acidificados comprenden productos lácteos obtenidos por acidificación mediante fermentación con bacterias vivas productoras de ácido o mediante la adición de zumos de frutas o ácidos alimentarios.

Además, se describe un uso en el que la pectina se usa como estabilizador en postres lácteos.

Esta invención describe además un uso de pectina obtenida mediante el procedimiento descrito anteriormente, en el que la pectina se usa como fibra dietética, como agente gelificante y/o como agente aglutinante de proteínas. Para este fin, se usa la fracción de pectina que comprende principalmente CSP, es decir, con una CSPR por encima de 0,75.

La pectina se puede usar además como fibra soluble (opcionalmente: como sal de Ca), transportador de nutrientes (Fe, Ca, Zn), aglutinante de radionúclidos en los alimentos, precursor de pectina de bajo éster convencional o pectina amidada, aglutinante de proteínas para la recuperación de proteínas a partir de agua de procedimiento en plantas de alimentos, y floculante de proteínas en plantas de aguas residuales, agente de encapsulación y aglutinante de colorantes.

EJEMPLOS**Métodos****Determinación del grado de esterificación (DE)**

5 El grado de esterificación se determinó según los procedimientos dados en Food Chemical Codex, tercera edición, National Academic Press, Washington 1981, página 216.

10 Pésense 5 g de la muestra de pectina con una precisión de 0,1 mg en un vaso de precipitados de 250 ml, y añádase una mezcla de 100 ml de 2-propanol acuoso al 60% y 5 ml de ácido clorhídrico conc. Agítese en un agitador magnético durante 10 minutos. Filtrese a través de un embudo de filtro de vidrio grueso de 30 ml, seco y previamente pesado, con vacío reducido. Lávese con seis porciones de 15 ml de mezcla de HCl-2-propanol al 60%. Lávese entonces con 2-propanol acuoso al 60% (6-8 porciones de 20 ml) hasta que el filtrado esté libre de cloruros (ensayo con una disolución de 1,7 g de nitrato de plata en 100 ml de agua destilada). Finalmente, lávese con aprox. 30 ml de 2-propanol al 100%. Séquese durante 2½ horas en un horno a 105°C. Enfríese en un desecador. Pésese.

15 Pipetee 20,00 ml de hidróxido de sodio 0,5 N usando una pipeta volumétrica de 20 ml en un vaso de precipitados, y mézclense con 20,00 ml de ácido clorhídrico 0,5 N, que se ha transferido usando una pipeta volumétrica de 20 ml. Añada dos gotas de una disolución de indicador de fenolftaleína (1 g de fenolftaleína se disuelve en 100 ml de etanol al 96%), y titule con hidróxido de sodio 0,1 N. Registre el volumen V_0 .

20 Pese exactamente en un matraz Erlenmeyer de 250 ml una décima parte de la pectina lavada y secada, y humedézcase con 2 ml de etanol al 96%. Coloque el matraz en un agitador magnético y añada lentamente 100 ml de agua desionizada hervida y enfriada. Evite las salpicaduras. Revuelva hasta que toda la pectina se disuelva por completo. Añada cinco gotas de la disolución de fenolftaleína, y titule con hidróxido de sodio 0,1 N. El volumen se registra como V_1 en ml. Añada 20,00 ml de hidróxido de sodio 0,5 N, y agite enérgicamente. Deje reposar el contenido durante 15 minutos a fin de saponificar los grupos éster. Añada 20,00 ml de ácido clorhídrico 0,5 N, y agite hasta que desaparezca el color rosa. Añada tres gotas de la disolución de fenolftaleína, y titule con hidróxido de sodio 0,1 N hasta lograr un color rosado tenue persistente, registrando el volumen de hidróxido de sodio 0,1 N requerido como V_2 ml

$$\%DE = \frac{V_2 - V_0}{V_1 + V_2 - V_0} * 100.$$

Determinación de la viscosidad intrínseca

30 La viscosidad intrínseca se determinó extrapolando la función de viscosidad reducida dividida entre la concentración de pectina a concentración cero. A una concentración dada, la viscosidad reducida fue:

$$\frac{\eta_c - \eta_r}{\eta_r}$$

35 en la que η_c es la viscosidad de la disolución de pectina, η_r es la viscosidad del disolvente (disolución acuosa al 1% de polifosfato de sodio, pH 4,75). Las viscosidades se midieron en un viscosímetro C (Haake, GmbH), a 21,0°C, con una bola de vidrio.

Determinación de US SAG°

US SAG° se determinó según el método descrito en Food Tech. 1959 13 (9), págs. 496-500.

Determinación de la relación de CSP (CSPR)

Se disolvieron 2,00 g de pectina en aprox. 90 g de agua desmineralizada a 70°C. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, el pH se aumentó hasta 4,0 mediante la adición de una disolución de carbonato de sodio al 20% en peso durante la agitación. Se añadió agua desmineralizada hasta 100,0 g de peso total, y la muestra se mezcló.

45 15,00 g de la muestra se mezclaron lentamente en 30,00 g de 2-propanol acuoso al 80% en peso en un tubo de centrífuga de 50 ml con tapón de rosca para precipitar la pectina. Después de una hora con agitación frecuente, el material precipitado se recogió tras centrifugar a 2800 g durante 20 minutos y decantar el centrifugado. Al material

precipitado se añadieron aprox. 25 ml de 2-propanol acuoso al 60% en peso, y se mezcló a conciencia. Después de una hora con mezclado frecuente, el precipitado se separó como antes. El lavado con 2-propanol al 60% en peso se repitió una vez más, y después de la separación final, el exceso de líquido se prensó a mano, y el residuo prensado se transfirió a una bandeja y se secó durante la noche a 60°C en un horno ventilado. La pectina aislada se pesó (un gramo), y la materia seca a' se determinó en el material secando a 105°C durante 2½ horas.

En un tubo de centrifuga con tapón de rosca de 50 ml se añadieron 25,00 g de CaCl₂ 60 mM en agua desmineralizada que contenía 2-propanol al 16% en peso, y se mezclaron con 25,00 g de la muestra de pectina preparada. La mezcla se agitó a la velocidad más baja en un IKA MTS2 Schüttler, que se conectó a un temporizador para permitir el mezclado durante 1 de cada 15 minutos. Después de 24 horas, la mezcla se centrifugó a 2800 g durante 20 minutos, y el líquido se sifoneó a través de una tela. El material precipitado en el tubo de centrifuga se pesó, y se añadió una cantidad igual de CaCl₂ 30 mM en agua desmineralizada que contenía 2-propanol al 8% en peso, y se mezcló. El tubo se agitó lentamente durante otras 24 horas y se centrifugó a 2800 g durante 20 minutos, y el líquido se sifoneó a través de una tela. El lavado de CSP precipitada se repitió una vez más. El residuo en el tubo se mezcló finalmente con dos partes de 2-propanol acuoso al 80% en peso, y después de una hora se separó sobre una tela de algodón, y después de escurrir se transfirió de nuevo al tubo y se mezcló nuevamente dos veces con la misma cantidad de 2-propanol acuoso al 60% por peso, y después de una hora se escurrió y se prensó en la tela. El residuo de la prensa se transfirió a una bandeja y se secó durante la noche a 60°C en un horno ventilado. El residuo (b gramos) se pesó, y la materia seca b' del material se determinó secando a 105°C durante 2½ horas.

La relación de CSP se determinó a partir de:

$$\text{Relación de CSP} = \frac{b * b'}{a * a'}$$

Se pueden lograr cifras de CSPR por encima de 1,0 porque la precipitación de moléculas de pectina pequeñas particulares en presencia de calcio es más cuantitativa que la precipitación con 2-propanol. Una cifra de CSPR por encima de 1,0 indica que la muestra es pectina pura sensible al calcio.

Ejemplo 1: Extractos combinados

En un experimento, los extractos se combinaron para obtener una fracción de pectina heterogénea con un alto rendimiento y una gran cantidad de CSP.

Materiales

Las materias primas de cáscara de cítricos se extrajeron en una relación agua:cáscara (a:c) de 27 a 70°C a pH 2,0 durante tres horas. El exceso de líquido se separó entonces mediante tamizado, y el primer residuo se lavó durante una hora a 70°C con agua añadida para constituir una relación a:c de 12. Después de un segundo tamizado, el segundo residuo, incluyendo el lodo de la centrifugación del líquido separado, se extrajo a 70°C durante dos horas con 15 g de monohidrato de ácido oxálico por kg de cáscara de cítrico a pH 3,8±0,2 (ajustado con disolución de carbonato de sodio) y relación a:c 19. La mezcla se separó entonces por centrifugación. El tercer residuo se lavó nuevamente con una relación a:c de 14 durante ½ hora a 70°C, y el líquido se separó por centrifugación.

Las fases líquidas de las centrifugaciones se mezclaron y clarificaron haciendo pasar el líquido por un filtro de vacío con una capa de auxiliar de filtración Clarcel DIT-R. El zumo clarificado se sometió a intercambio iónico a través de una resina Amberlite C200 débilmente acidificada, esencialmente en forma de sodio. El zumo de pectina refinado se concentró por ultrafiltración a una concentración de pectina de 1,5-2,0%, y se precipitó en una concentración final de 2-propanol de 55% en peso. El material precipitado se prensó, se lavó con 2-propanol al 60% en peso, y finalmente se volvió a prensar antes de secarlo en un horno ventilado a 45°C durante la noche. El material seco se pesó y se molió para pasarlo por un tamiz de 0,5 mm.

Rendimiento de pectina

El rendimiento de pectina de una etapa de extracción/lavado es la cantidad de pectina (calculada como materia seca de pectina) que durante la etapa de extracción/lavado se transforma de protopectina insoluble en pectina soluble, calculada como porcentaje del material de la cáscara (calculado como materia seca).

El rendimiento de pectina se determina para cada etapa de extracción/lavado determinando la concentración de pectina en el extracto clarificado (por precipitación de una cantidad pesada de concentrado en 1,2 volúmenes de 2-propanol, lavado del precipitado con 2-propanol al 60% en peso, secando al 100% de materia seca, y pesando el residuo). A partir de la cantidad total de extracto/líquido de lavado y la concentración de pectina determinada, se calcula la cantidad total de pectina soluble. A partir de esto, la pectina soluble transferida con el residuo de cáscara de la extracción/lavado anterior se calcula a partir de la cantidad de residuo de cáscara transferido y la concentración de

pectina en el líquido clarificado, determinada a partir de la etapa de extracción/lavado anterior. Esta cantidad de pectina transferida de la etapa de extracción/lavado anterior se resta de la cantidad total de pectina encontrada en la etapa de extracción/lavado, y la diferencia da el rendimiento de pectina de la etapa de extracción o lavado.

Resultados

- 5 El rendimiento de pectina, el grado de esterificación, la viscosidad intrínseca, la relación de pectina sensible al calcio, y US SAG^o se midieron para diferentes tipos de cítricos, como se ilustra en la tabla 1 a continuación. Estos parámetros se midieron como se describe en materiales y métodos.

Tabla 1

Materia prima	Cáscara de naranja	Cáscara de lima	Cáscara de pomelo
Rendimiento de pectina	29,0%	29,5%	26,3%
DE	67,4%	69,5%	68,1%
Viscosidad intrínseca (l/g)	0,44	0,44	0,45
CSPR	0,76	0,38	0,76
USA SAG ^o	206	246	242
DE: grado de esterificación; CSPR: relación de pectina sensible al calcio			

- 10 Se observa variación entre diferentes cáscaras de cítricos. Sin embargo, se observa un alto rendimiento de pectina que oscila de 26-30%. La fracción heterogénea purificada muestra una relación de CSP relativamente alta, aunque también depende de la fruta, excepto la cáscara de lima, que se sabe que tiene el contenido más alto de pectina tolerante al calcio.

Ejemplo 2: Aislamiento de extractos separados.

15 Materiales

- Se suspendieron 400±0,1 g de cáscara de cítrico seca en 9,6±0,1 l de agua desmineralizada en un reactor agitado de 10 l controlado termostáticamente, y se calentó hasta la temperatura escogida. El pH se redujo hasta el pH escogido mediante adición de ácido nítrico al 32% en peso a la mezcla agitada, hasta que el pH se estabilizó. Al final del tiempo de extracción escogido (determinado a partir de la adición de la parte principal de ácido nítrico hasta la separación), el contenido total en el reactor se pesó, y el contenido se vertió en coladores y se separó en residuo de cáscara y filtrado, usando cubiertas de bolsas de plástico para reducir la evaporación.

- El residuo de cáscara extraído se pesó y se transfirió nuevamente al reactor agitado, y se añadió agua desmineralizada caliente hasta un volumen total de 6 l. Después de agitar a la temperatura y el tiempo dados, el contenido se pesó nuevamente y se separó en los coladores, dando un filtrado procedente del primer lavado y un residuo del lavado de la cáscara.

- El residuo del lavado de la cáscara se pesó y se transfirió al reactor agitado, y se añadió agua caliente para dar un contenido total de 8 l. Se encontró la temperatura predeterminada, y se añadió el extrayente (10 g de polifosfato de sodio, o 5,3 g de oxalato de sodio, dihidratado, o 50 ml de Amberlite 200C, o ajustando el pH con carbonato de sodio acuoso al 20% o hidróxido de sodio 1N hasta el pH escogido), y el pH se ajustó hasta que se mantuvo constante en el valor escogido. El tiempo de reacción predeterminado se escogió desde el inicio del ajuste del pH hasta el pesaje del contenido total del reactor, antes de la separación en los coladores. Se pesó el residuo de cáscara extraído separado.

- La pectina se aisló de los filtrados del colador mediante el siguiente procedimiento. El filtrado caliente se centrifugó en botellas cerradas durante 12 min a 4500 RPM en una centrífuga. Se precipitó una cantidad pesada de centrifugado en 1,5 volúmenes de 2-propanol al 100% agitado. El pH del precipitado agitado se ajustó con carbonato de sodio al 20% o ácido nítrico al 32% en peso, hasta pH 3,0±0,2. Después de agitar durante una hora, el material precipitado se recogió por filtración a través de una tela de algodón, se prensó a mano, y se suspendió de nuevo en 2-propanol al 60% en peso durante una hora antes del escurrido final y el prensado en la tela. El material prensado se secó en una bandeja a 45°C durante la noche, y se pesó.

- 40 La materia seca se determinó en la pectina aislada y la materia prima secando a 105°C durante 4 horas.

Rendimiento de pectina

El rendimiento de pectina se determinó para cada etapa de extracción mediante el cálculo de la concentración de pectina a partir de la cantidad aislada de pectina (sobre la base de la materia seca) con respecto a la cantidad de centrifugado precipitado. Se debe encontrar la misma concentración de pectina en la fase líquida de la mezcla de extracción total y en la fase líquida del residuo de extracción de pectina, suponiendo que no haya dilución ni evaporación durante los procedimientos de separación. Esto significa que la cantidad de pectina extraída se puede calcular multiplicando el peso del extracto de pectina (menos el peso de la cáscara seca añadida) por la concentración de pectina en la fase líquida. De la misma manera, se puede determinar la cantidad de pectina extraída transferida con el residuo de extracción de la cáscara al siguiente procedimiento de lavado/extracción, y restando esta cantidad de la cantidad determinada de pectina extraída en el siguiente procedimiento de lavado/extracción se puede calcular la pectina neta extraída de esta etapa de procesamiento, etc. Este cálculo permite determinar el rendimiento neto de extracción en cada etapa de extracción/lavado.

Experimento 2a - Alto rendimiento de pectina

Se realizaron varios experimentos usando diferentes extrayentes, diferentes temperaturas de extracción, pH y diferentes tiempos de extracción. La Tabla 2 ilustra los diferentes experimentos en los que la cáscara de naranja de 2013 se extrae en la etapa 1 (primera etapa) con un primer extrayente, después se lava con agua desmineralizada caliente en la etapa 2 (segunda etapa), se extrae con un segundo extrayente en la etapa 3 (tercera etapa). Para algunos de los experimentos, se realiza un lavado adicional después de la segunda extracción en la etapa 4 (cuarta etapa).

El rendimiento de pectina para cada una de las etapas se da en la Tabla 2, así como el rendimiento total se calcula consecutivamente.

Sin embargo, para cada uno de los experimentos se puede ver en la Tabla 2 que el uso de más etapas de extracción aumenta el rendimiento total de pectina obtenida de la cáscara. Además, tener una etapa de lavado adicional (etapa 4) aumenta aún más el rendimiento total.

Tabla 2

Etapa	Temp. °C	Tiempo, h	pH	Ej.	Rendimiento	cRendimiento	DE	Viscosidad intrínseca l/g	CSPR	USA SAG ^o
1	70	3	2,0	H ⁺	13,5%	13,5%	70,7%	0,44	0,33	197
2	70	1	2,3		3,4%	16,9%	70,1%	0,41	0,65	
3	70	2	4,0	NaPP	8,7%	25,6%	57,5%	0,37	0,96	220
4	70	1	4,4		5,8%	31,4%	58,2%	0,34	0,96	
Ej.: extrayente; DE: grado de esterificación; Rendimiento: rendimiento generado pr. etapa; cRendimiento: rendimiento acumulado de pectina; CSPR: relación de pectina sensible al calcio; H ⁺ : ácido nítrico al 32% añadido para alcanzar el pH; NaPP: polifosfato de sodio;										

Experimento 2b - Importancia de pH bajo en la primera etapa

Los experimentos se llevaron a cabo usando cáscara de naranja de 2013 como material de partida. En el experimento, la cáscara de naranja se sometió a una extracción según la invención, sometiendo primero la cáscara a una primera extracción con un ácido fuerte, a un lavado, y después a una segunda extracción usando mayor pH y NaPP, y finalmente a un lavado adicional. Se realizó un experimento comparativo en el que se usó NaPP a igual pH en la primera etapa de extracción y el ácido fuerte en la segunda etapa de extracción. En el experimento comparativo, los lavados se realizaron como en el experimento. Todas las etapas de los experimentos se realizaron a 70°C.

Como puede verse en la tabla 3 a continuación, la relación de pectina sensible al calcio (CSPR) obtenida mediante un método de extracción en dos etapas como se describe en esta invención es considerablemente más alta que si la primera extracción se realizara a un pH mayor que la segunda etapa de extracción. Así, se aumenta la CSPR de la fracción de pectina obtenida en la etapa 3 después de la segunda extracción, así como en el lavado después de la segunda extracción (etapa 4) según la invención.

Además, se incrementa el rendimiento acumulativo de pectina.

Tabla 3

Exp.	Etapas	Tiempo, h	pH	Ex.	Rendimiento	cRendimiento	DE	Viscosidad intrínseca, l/g	CSPR
I	1	3	2.0	H ⁺	13.5%	13.5%	70.7%	0.44	0.33
	2	1	2.3		3.4%	16.9%	70.1%	0.41	0.65
	3	2	4.0	NaPP	8.7%	25.6%	57.5%	0.37	0.96
	4	1	4.4		5.8%	31.4%	58.2%	0.34	0.96
V	1	2	4.0	NaPP	2.7%	2.7%	74.2%	0.30	
	2	1	4.2		-0.3%	2.4%	75.0%	0.37	
	3	3	2.0	H ⁺	12.4%	14.8%	67.9%	0.51	0.46
	4	1	2.3		4.3%	19.1%	66.6%	0.44	0.70

I: Experimento según la presente invención; V: Experimento comparativo; Ex.: Extrayente; cRendimiento: rendimiento de pectina acumulado; DE: grado de esterificación; CSPR: relación de pectina sensible al calcio; Rendimiento: rendimiento generado por etapa; H⁺: ácido nítrico al 32% añadido para lograr el pH; NaPP: Polifosfato de sodio

Experimento 2c - Importancia del lavado para la pureza de CSP

Se realizaron estudios comparativos para ilustrar la importancia del lavado entre las dos etapas de extracción.

La cáscara de naranja de 2013 se extrajo con un ácido fuerte en una primera etapa de extracción (etapa 1), y con NaPP en una segunda etapa de extracción (etapa 3). Se realizaron estudios comparativos, teniendo una etapa de lavado (etapa 2) entre las dos etapas de extracción o no y la siguiente influencia en la pureza de la fracción de pectina con respecto a CSP después de la segunda extracción. Todas las etapas se realizaron a 70°C.

A partir de los resultados obtenidos en la tabla 4 se observa que el lavado entre las dos etapas es importante para obtener una cantidad muy alta de CSP en la fracción de pectina obtenida de la segunda extracción, es decir, CSPR es mayor en Exp. I que II en la tercera etapa.

Tabla 4

Exp.	Etapas	Tiempo, h	pH	Ex.	Rendimiento	DE	Viscosidad intrínseca, l/g	CSPR	US SAG°
I	1	3	2.0	H ⁺	13.5%	70.7%	0.44	0.33	197
	2	1	2.3		3.4%	70.1%	0.41	0.65	
	3	2	4.0	NaPP	8.7%	57.5%	0.37	0.96	220
II	1	3	2.0	H ⁺	13.1%	70.2%	0.39	0.53	200
	3	2	4.0	NaPP	7.2%	65.0%	0.37	0.79	183

I: Etapa de lavado; II: Etapa sin lavado; Ex.: Extrayente; DE: grado de esterificación; Rendimiento: rendimiento generado por etapa; CSPR: relación de pectina sensible al calcio; H⁺: ácido nítrico al 32% añadido para lograr el pH; NaPP: Polifosfato de sodio

5 Experimento 2d - Diferentes temperaturas, tiempos, pH y extrayentes

Se realizaron experimentos comparativos, en los que se cambió la temperatura así como el tiempo y el pH de las extracciones y las etapas de lavado.

Los experimentos se realizaron en cáscara de naranja de 2013.

10 En una primera extracción (etapa 1), se usó un ácido fuerte para la extracción de pectina de la cáscara de naranja. A esto le siguió un lavado con agua desmineralizada caliente (etapa 2) antes de una segunda extracción con un ácido débil (etapa 3). En algunos de los experimentos, se realizó un procedimiento de lavado final (etapa 4).

En la etapa 3 se usaron diferentes segundos extrayentes, teniendo todos ellos un pH de 3,6-4,5.

Tabla 5

Exp.	Etapas	Temp. °C	Tiempo, h	pH	Ex.	Rendimiento	DE	Viscosidad intrínseca, l/g	CSPR	US SAG°
I	1	70	3	2.0	H ⁺	13.5%	70.7%	0.44	0.33	197
	2	70	1	2.3		3.4%	70.1%	0.41	0.65	
	3	70	2	4.0	NaPP	8.7%	57.5%	0.37	0.96	220
	4	70	1	4.4		5.8%	58.2%	0.34	0.96	
IV	1	70	4	2.0	H ⁺	13.1%	69.1%	0.50	0.48	197
	2	70	½	2.3		3.1%	70.8%	0.43	0.61	
	3	75	1	3.8	NaPP	6.7%	58.2%	0.38	0.94	217
VI	1	65	2	1.5	H ⁺	11.7%	71.7%	0.53	0.58	214
	2	65	1	1.8		3.2%	68.2%	0.48	0.69	
	3	65	2	4.5	NaPP	12.9%	56.1%	0.51	0.96	233
VII	1	75	3	2.5	H ⁺	11.6%	72.5%	0.49	0.47	195

ES 2 929 460 T3

	2	75	1	2.9		2.9%	71.1%	0.41	0.60	
	3	75	2	3.6	NaPP	8.2%	57.5%	0.35	0.95	192
VIII	1	68	4	2.2	H ⁺	10.5%	71.6%	0.53	0.65	205
	2	68	½	2.5		2.3%	71.7%	0.49	0.62	
	3	70	2	3.6	NaPP	7.2%	61.4%	0.47	0.91	205
IX	1	70	1	1.8	H ⁺	9.3%	73.2%	0.55	0.64	210
	2	70	1	2.1		6.1%	70.8%	0.52	0.71	
	3	60	4	3.8	NaPP	9.5%	61.9%	0.47	1.01	224
X	1	72	1	1.8	H ⁺	11.0%	71.8%	0.53	0.60	213
	2	72	½	2.1		3.7%	71.4%	0.48	0.69	
	3	72	2	3.4	NaPP	8.6%	58.0%	0.42	0.91	223
XI	1	72	3	1.8	H ⁺	14.9%	72.6%	0.51	0.66	194
	2	72	½	2.1		3.1%	67.4%	0.41	0.62	
	3	72	1	3.8	NaPP	8.1%	56.2%	0.35	1.02	207
XIV	1	80	1	2.2	H ⁺	12.2%	73.2%	0.47	0.20	
	2	70	1	2.5		3.4%	70.8%	0.43	0.70	
	3	60	4	3.8	NaPP	8.6%	61.0%	0.39	0.98	
XII	1	68	3	1.8	H ⁺	13.7%	69.3%	0.45	0.65	202
	2	70	1	2.1		3.9%	68.9%	0.39	0.55	
	3	70	2	3.6	Ox.	6.5%	60.6%	0.41	1.02	225
XIII	1	68	3	1.8	H ⁺	13.3%	69.3%	0.49	0.60	204
	2	68	1	2.1		3.7%	68.9%	0.43	0.32	
	3	70	2	3.6	Ox.	5.6%	60.6%	0.44	0.97	218
III	1	70	3	2.0	H ⁺	13.7%	73.2%	0.45	0.58	202
	2	70	1	2.3		3.8%	67.6%	0.42	0.69	
	3	70	2	3.6	Ox.	5.3%	66.1%	0.46	0.88	218
XVI	1	68	3	1.8	H ⁺	13.6%	70.0%	0.49	0.61	
	2	70	1	2.1		3.2%	68.6%	0.46	0.77	
	3	70	2	3.6	Resina	4.4%	63.8%	0.42	0.94	

XVII	1	68	3	1.8	H ⁺	14.4%	69.3%	0.46	0.63	
	2	70	1	2.1		3.1%	68.9%	0.42	0.65	
	3	70	2	3.6	Na ₂ CO ₃	3.7%	66.7%	0.37	0.80	
XXIV	1	70	3	2.0	H ⁺	13.8%	70.4%	0.50	0.56	
	2	70	1	2.3		3.3%	69.5%	0.44	0.71	
	3	42	2	5.5	Na ₂ CO ₃	3.4%	66.8%	0.47	0.92	

5 Ex.: Extrayente; DE: grado de esterificación; Rendimiento: rendimiento generado por etapa; CSPR: relación de pectina sensible al calcio; H⁺: ácido nítrico al 32% añadido para lograr el pH; NaPP: Polifosfato de sodio; Ox.: oxalato de sodio; Resina: Amberlite 200C

10 Los resultados de la Tabla 5 muestran que, incluso aunque se cambie el tiempo de extracción, el pH difiera así como también la temperatura y los extrayentes usados para la segunda extracción, la CSPR de la fracción de pectina obtenida en la tercera etapa es 0,8 o mayor. Por lo tanto, mientras el pH de la segunda extracción sea mayor que el de la primera extracción, es decir, mayor en la etapa 3 que en la etapa 1, la CSPR permanecerá elevada.

Experimento 2e - Diferentes materiales de partida que contienen pectina

El procedimiento según la invención se puede usar para múltiples tipos de cáscaras de cítricos. Los experimentos descritos en la Tabla 6 muestran que también se puede obtener un alto rendimiento acumulativo y una alta relación de CSP (CSPR) mediante el procedimiento según la presente invención usando cáscara de lima, pomelo y limón.

15

Tabla 6

Tipo	Etap n°	Temp. °C	Tiempo, h	pH	Ex.	DE	Rendimiento	Viscosidad intrínseca, l/g	CSPR
Naranja	1	70	3	2.0	H ⁺	70.7%	13.5%	0.44	0.33
	2	70	1	2.3		70.1%	3.4%	0.41	0.65
	3	70	2	4.0	NaPP	57.5%	8.7%	0.37	0.96
Limón	1	70	3	2.0	H ⁺	69.7%	16.0%	0.44	0.49
	2	70	1	2.3		69.1%	3.4%	0.40	0.56

	3	70	2	3.6	NaPP	58.2%	8.3%	0.39	0.86
Pomelo	1	70	3	2.0	H ⁺	70.3%	13.8%	0.46	0.65
	2	70	1	2.3		70.1%	3.9%	0.42	0.45
	3	70	2	3.6	NaPP	60.5%	7.1%	0.37	0.94

Naranja: cáscara de naranja de 2013; Lima: cáscara de lima de 2013; Pomelo: cáscara de pomelo de 2011; Ex.: Extrayente; DE: grado de esterificación; Rendimiento: rendimiento generado por etapa; CSPR: relación de pectina sensible al calcio; H⁺: ácido nítrico al 32% añadido para lograr el pH; NaPP: Polifosfato de sodio

- 5 Así, a partir de la Tabla 6, puede verse que la CSPR de la fracción de pectina obtenida en la etapa 3 es 0,86 o superior, incluso cuando se usan diferentes tipos de materiales de partida que contienen pectina.

Experimento 2f - lavando dos veces

El número de lavados entre la primera y la segunda extracción es al menos uno. Este experimento lavó una vez (36) o dos veces (53) entre la primera extracción (etapa 1) y la segunda extracción (etapa 3).

- 10 Como se muestra en la Tabla 7, se puede observar que la CSPR en la fracción de pectina lograda al lavar una sola vez es 0,88, mientras que se logra una CSPR mayor, de 0,96 - y una fracción de CSP más pura -, al lavar el primer residuo dos veces antes de llevar a cabo la segunda extracción.

Los experimentos se realizaron en cáscara de naranja de 2013.

Tabla 7

Exp. nº	Etapas nº	Temp. °C	Tiempo, h	pH	Ex.	Rendimiento	DE	Viscosidad intrínseca, l/g	CSPR
III	1	70	3	2.0	H ⁺	13.7%	73.2%	0.45	0.58
	2	70	1	2.3		3.8%	67.6%	0.42	0.69
	3	70	2	3.6	Ox.	5.3%	66.1%	0.46	0.88
XX	1	70	3	2.0	H ⁺	14.4%	70.6%	0.50	0.55

15

	2a	70	1	2.3		3.4%	70.2%	0.45	0.69
	2b	70	1	2.5		4.4%	71.1%	0.43	0.77
	3	70	2	3.6	Ox.	2.4%	61.8%	0.44	0.96

- 20 Ex.: Extrayente; Rendimiento: rendimiento generado por etapa; CSPR: relación de pectina sensible al calcio; H⁺: ácido nítrico al 32% añadido para lograr el pH; Ox.: oxalato de sodio; DE: grado de esterificación

Experimento 3 – en el que la segunda extracción se lleva a cabo sobre diferentes materiales que contienen pectina.

Materiales

1ª fracción (etapa 1 y 2 combinadas):

- 25 1 kg de cáscara seca de cítricos se extrajo a 70-73°C en un reactor termostático agitado, a pH 2,0-2,2, en 30 kg de agua desmineralizada. Después de 3 horas, el residuo de cáscara se separó del líquido de extracción en un tamiz (0,8 mm de abertura), y se transfirió al reactor y se lavó durante 1 hora con 15 kg de agua desmineralizada a 70°C. El residuo de cáscara se separó nuevamente y se sometió a otro lavado en las mismas condiciones.

- 30 El primer extracto y los líquidos procedentes de los lavados se mezclaron, se clarificaron haciéndolos pasar por un filtro de vacío con auxiliar de filtración, y se purificaron adicionalmente haciéndolos pasar por una resina con Amberlite 200C en forma de sodio. El zumo de pectina purificada se concentró hasta aprox. 1,8% de pectina por ultrafiltración, y el concentrado se precipitó en dos volúmenes de 2-propanol al 80% en peso. La pectina precipitada se lavó

adicionalmente con 2-propanol al 60% en peso, y se secó a 45°C durante la noche. La pectina seca se pesó y se molió para pasarla por un tamiz de 0,5 mm.

3ª fracción (etapa 3):

Partes pesadas del residuo de cáscara se sometieron a diferentes extracciones de pectina para aislar el rendimiento adicional de pectina en diferentes condiciones de extracción. Las extracciones se realizaron con NaOH 1N. Las temperaturas fueron de 0 a 30°C, el pH varió de 4,5 a 12, el tiempo de extracción desde menos de una hora hasta más de 2 horas. Después de la extracción, la mezcla se pesó, y el residuo de cáscara se separó del líquido de extracción en un tamiz (0,8 mm de abertura). El primer extracto se centrifugó, y una parte pesada del centrifugado transparente se precipitó en dos volúmenes de 2-propanol al 80% en peso. La pectina precipitada se lavó adicionalmente con 2-propanol al 60% en peso, y se secó a 45°C durante la noche. La pectina seca se pesó y se molió para pasarla por un tamiz de 0,5 mm. El rendimiento de pectina de la tercera fracción se calculó determinando la concentración de pectina en el centrifugado, que es igual a la concentración de pectina en el líquido en la mezcla de extracción.

El rendimiento de pectina (Rendimiento), el grado de esterificación (DE), la viscosidad intrínseca y la relación de pectina sensible al calcio (CSPR) en la fracción de pectina se calcularon como se describe anteriormente en "Método".

Resultados

Los experimentos se realizaron sobre diferentes materiales de partida que contenían pectina, que son cáscara de naranja (Tabla 8), cáscara de lima (Tabla 9) y cáscara de limón (Tabla 10). El material de partida se extrajo usando una disolución ácida, y posteriormente se lavó (etapa 1+2). El residuo obtenido se separó en múltiples sub-residuos, los cuales se sometieron a una segunda extracción usando NaOH (etapa 3) usando diferentes configuraciones de extracción, tales como pH, temperatura y tiempo.

Como se puede observar en la tabla 8, los resultados muestran que usando cáscara de naranja como material de partida se puede lograr una CSPR elevada en la fracción de pectina extraída, de 0,84-1,07, cuando se usa una extracción con base. Además, se obtiene un alto rendimiento acumulativo de pectina, de 28,5%-32,6%.

Tabla 8: Cáscara de naranja

Etapas No.	Temperatura	pH	Tiempo, h	Rendimiento	DE	Viscosidad intrínseca	CSPR
1+2 *)	73°C	2,0	2	22,0%	73,0%	0,45	0,62
3	0,5°C	10	2,03	8,6%	55,0%	0,38	0,97
3	0,5°C	9,5	2,11	8,5%	54,6%	0,38	0,84
3	2°C	9,0	2	7,6%	54,2%	0,40	1,02
3	0,5°C	8,5	2	6,5%	55,9%	0,40	1,02
3	0,8°C	8,0	2	6,5%	55,7%	0,41	1,02
3	20°C	10	2	8,8%	46,3%	0,31	1,07
3	22°C	7,5	2	10,6%	55,8%	0,39	1,00
*incluyendo 1 ^{er} lavado							
Rendimiento: rendimiento generado por etapa; CSPR: relación de pectina sensible al calcio; DE: grado de esterificación							

Tabla 9: Cáscara de lima

Etapas No.	Temperatura	pH	Tiempo, h	Rendimiento	DE	Viscosidad intrínseca	CSPR
1+2	74°C	2,2	2	19,5%	73,1%	0,48	0,57
3	2°C	10	2,08	13,2%	61,7%	0,50	0,85

Etapas No.	Temperatura	pH	Tiempo, h	Rendimiento	DE	Viscosidad intrínseca	CSPR
3	2°C	7,5	2	12,3%	64,3%	0,52	0,99
3	16-18°C	7,5	2	12,6%	60,9%	0,48	0,84
3	2°C	8,5	2	11,8%	64,3%	0,51	0,89
3	20°C	6,0	2	11,9%	61,3%	0,49	0,88
3	20°C	4,5	2	11,8%	61,5%	0,47	0,79
Rendimiento: rendimiento generado por etapa; CSPR: relación de pectina sensible al calcio; DE: grado de esterificación							

Como se puede observar en la tabla 9, los resultados muestran que usando cáscara de limón como material de partida se puede lograr una CSPR elevada en la fracción de pectina extraída, de 0,79-0,99, cuando se usa una extracción con base. Además, se obtiene un alto rendimiento acumulativo de pectina, de 31,3%-32,7%.

- 5 Como se puede observar en la tabla 10, los resultados muestran que usando cáscara de limón como material de partida se puede lograr una CSPR elevada en la fracción de pectina extraída cuando se usa una extracción con base, de 0,88-1,17. Además, se obtiene un alto rendimiento acumulativo de pectina, de 32,9%-39,9%.

Tabla 10: Cáscara de limón

Etapas No.	Temperatura	pH	Tiempo, h	Rendimiento	DE	Viscosidad intrínseca	CSPR
1+2	71°C	2,0	3	26,4%	74,0%	0,54	0,47
3	5°C	11,5	2	8,9%	47,6%	0,33	1,05
3	5°C	10,5	2	8,6%	58,8%	0,39	0,88
3	30°C	12,0	0,8	14,8%	5,9%	0,10	1,17
3	13°C	11,5	2	7,1%	19,0%	0,22	1,16
3	30°C	11,0	2,7	6,5%	4,7%	0,13	1,04
3	50°C	10,5	0,93	7,7%	6,3%	0,06	1,04
Rendimiento: rendimiento generado por etapa; CSPR: relación de pectina sensible al calcio; DE: grado de esterificación							

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la extracción de pectina sensible al calcio a partir de un material de partida que contiene pectina, que comprende:
 - a. una primera etapa, que es una extracción ácida, en la que dicho material de partida se somete a extracción usando una disolución ácida que tiene un pH entre 1,5 - 2,5, que extrae un primer extracto que deja un primer residuo, en la que dicho primer extracto comprende pectina tolerante al calcio;
 - b. opcionalmente, una segunda etapa, en la que el primer residuo se somete a al menos a un lavado, que da como resultado un segundo residuo y un segundo extracto;
 - c. una tercera etapa, que es una segunda extracción, en la que dicho primer o segundo residuo se somete a dicha segunda extracción usando una tercera disolución que extrae un tercer extracto que deja un tercer residuo, en la que dicho tercer extracto comprende pectina sensible al calcio; y en la que el pH de dicha tercera disolución es mayor que el pH de dicha disolución ácida, y dicha tercera disolución es una disolución formadora de quelatos.
2. El procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que el pH de dicha disolución ácida es 2-2,5.
3. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el pH de dicha tercera disolución es de 2,5 a 7, tal como de 2,5 a 4, tal como de 4 a 6.
4. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, caracterizado por que el pH de la tercera disolución es de 7 a 14, tal como de 8 a 12, tal como de 8 a 10, tal como de 10 a 12.
5. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicho procedimiento comprende un cuarta etapa, en la que dicho tercer residuo se somete a al menos un lavado que da como resultado un cuarto extracto y un cuarto residuo.
6. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicha tercera disolución comprende una o más sales de ácidos inorgánicos parcialmente neutralizados, como polifosfato, borato, fosfato, pirofosfato, fosfonatos, hidrogenocarbonato, hidrogenosulfato, zeolitas, resinas orgánicas catiónicas, sales de ácidos orgánicos parcialmente neutralizados, o policarboxilatos tales como tartrato, citrato, oxalato, gluconato, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético), NTA (triacetato de nitrilo), imidazol y derivados.
7. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicha disolución formadora de quelatos comprende uno o más de los siguientes polifosfatos, ácido cítrico o sus sales, ácido oxálico o sus sales, ácido fosfórico o sus sales, sales de ácidos orgánicos di- o multivalentes parcialmente neutralizados, como EDTA, CDTA, DTPA, NTA, imidazol, ácido oxálico, ácido carbónico, o resinas de intercambio iónico catiónico.
8. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado por que dicha tercera disolución comprende una o más bases o sales de bases con cationes monovalentes.
9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que la temperatura de dicha extracción ácida y/o dicha segunda extracción está entre 15-100°C, tal como entre 65-75°C.
10. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que dicho lavado se realiza en una relación de disolución de lavado:material vegetal seco de 5:1 a 50:1.
11. Fracción de pectina obtenible por el procedimiento como se describe en cualquiera de las reivindicaciones 1-10, caracterizada por que la relación de pectina sensible al calcio (CSPR) está por encima de 0,75, tal como por encima de 0,80, como por encima de 0,85, tal como por encima de 0,90.
12. Fracción de pectina según la reivindicación 11, caracterizada por que el grado de esterificación (DE) está por encima de 50%, tal como por encima de 55%, como por encima de 60%, tal como por encima de 65%.
13. Un uso de pectina según cualquiera de las reivindicaciones 11-12 para estabilizar bebidas, estructurar productos lácteos acidificados, como una fibra dietética, un agente gelificante, un estabilizante en postres lácteos, y/o un agente complejante de proteínas.
14. El uso según la reivindicación 13, caracterizado por que la bebida es leche acidificada o zumos de frutas diluidos.