

COMPOSICIÓN PREBIÓTICA DE PECTINOLIGOSACÁRIDOS (POS)

CAMPO TÉCNICO

5

La composición del presente desarrollo está relacionada con la industria de alimentos y la industria farmacéutica, particularmente con composiciones de pectinolígosacáridos prebióticos y azúcares no calóricos.

10 DESCRIPCIÓN DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

El procesamiento de frutas para la obtención de ingredientes y productos alimenticios genera una alta cantidad de residuos, ya que entre 30 y 50% del peso de las frutas no se considera comestible. Estos residuos, a pesar de ser ricos en una variedad de moléculas de alto interés para las industrias de alimentos, cosmética y farmacéutica, muchas veces son dispuestos como desechos.

Un campo de interés para el aprovechamiento de estos residuos agroindustriales consiste en su valorización por medio de la producción de compuestos prebióticos y azúcares no calóricos. Los prebióticos disponibles comercialmente y más conocidos son oligosacáridos no digeribles como inulina, fructooligosacáridos (FOS), galacto-oligosacáridos y lactulosa, sin embargo, hay un creciente interés por la identificación y el desarrollo de nuevos compuestos prebióticos con funciones adicionales. Los azúcares no calóricos, como ácido galacturónico, manosa, ramnosa, arabinosa, entre otros, permiten aumentar la concentración de sólidos solubles en productos alimenticios sin aumentar su carga calórica y evitando la adición de azúcares calóricos como sacarosa, fructosa y glucosa. Adicionalmente, algunos de estos azúcares pueden cumplir funciones prebióticas.

Los microorganismos probióticos se encargan de consumir los prebióticos y proliferar en el intestino humano, generando ácidos grasos de cadena corta con múltiples beneficios y compitiendo e inhibiendo el crecimiento de microorganismos patógenos que generan

problemas a la salud (Gullón et al., 2013). Entre algunos géneros de microorganismos reconocidos como probióticos se encuentran: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* y *Escherichia*.

5 Los oligosacáridos derivados de pectina (POS) han sido evaluados como posibles compuestos prebióticos encontrando un efecto protector sobre colonocitos contra verocitotoxinas de *E. coli* y estimulando la apoptosis de células de adenocarcinoma de colon. Adicionalmente, se han demostrado los beneficios de POS derivados del procesamiento de naranja al estimular el crecimiento de bifidobacterias y *E. rectale*. Estos compuestos
10 derivados de la pectina pueden formarse con uso de enzimas pectinolíticas sobre sustratos como los albedos de frutas tropicales. Por ejemplo, métodos químicos como la hidrólisis ácida (química) es comúnmente usada para la extracción de pectina, sin embargo, la baja especificidad de la reacción resulta en compuestos no deseados, disminuyendo el rendimiento de la extracción.

15

Entre la información disponible, se encuentra US8313789 que está dirigido a un método para promover el crecimiento de bacterias benéficas en el intestino de un humano, en donde se administra una composición que comprende una cantidad efectiva de una fracción de pectinoligosacáridos que contiene Ara-(1-5)-(Ara)_n-(1-5)-Ara, en donde $n=0-18$, y un radio
20 arabinosa a lactosa de 5,7 a 14,2. De acuerdo a los ejemplos, la arabinosa está en una cantidad entre 20 y 45%mol, y el ácido galacturónico está entre 1 y 50%mol.

Adicionalmente, se encuentra US20090305362 que está dirigido a un proceso químico-mecánico para la manufactura de oligosacáridos de ácido urónico a partir de la extrusión de
25 la pectina con una enzima a condiciones básicas de pH y la composición nutricional obtenida a partir del mismo. La composición nutricional comprende pectinoligosacárido entre 25 y 100% wt con un DP entre 2 y 250, que preferiblemente no son digeribles por el tracto intestinal superior humano.

30 Finalmente se encuentra K. Klingchongkon *et al.* (2015) que describe un proceso de extracción de oligosacáridos a partir de polvo de cáscara maracuyá (PFP) por medio de un

tratamiento de agua subcrítica que hidroliza la pectina a temperaturas entre 100 y 245°C, en donde los oligosacáridos obtenidos pueden ser útiles como fibra dietaria. El hidrolizado obtenido tiene ácido galacturónico entre 0,04 y 0,09g/100g de PFP, y arabinosa entre 0,06 y 0,15g/100g de PFP.

5

Si bien en los documentos disponibles se describen métodos y composiciones que contienen pectinoligosacáridos a partir de residuos agroindustriales, es necesario diseñar composiciones alternativas que tengan un mayor valor nutricional para su incorporación en productos con características funcionales como actividad prebiótica, capacidad antioxidante, y disminución de calorías, sin dejar a un lado la viabilidad técnica y económica de su escalado.

10

BREVE DESCRIPCIÓN

15

En un primer aspecto, el desarrollo está dirigido a una composición prebiótica de carbohidratos obtenida a partir de un material vegetal que comprende pectinoligosacáridos (POS), monosacáridos no digeribles como arabinosa, manosa, ramnosa y ácido galacturónico, y pectina. La composición prebiótica obtenida permite incorporar los beneficios de las fibras prebióticas producto de la hidrólisis enzimática de la pectina en cáscara de frutas, con los beneficios como alta capacidad antioxidante, resultando en un conjunto de sólidos solubles con bajo contenido calórico y potencial actividad prebiótica, que puede ser usado como texturizante en productos alimenticios dirigidos a humanos.

20

En un segundo aspecto, el desarrollo está dirigido al uso de la composición prebiótica de carbohidratos como texturizante, suplemento prebiótico, antioxidante y/o reductor de índice glicémico.

25

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 Contenido de ácido galacturónico en cáscara de maracuyá y naranja. Las letras a, b, c y d indican diferencia estadística significativa entre las medidas, con un α de 0,05.

5 **FIG. 2** Cantidad de POS producidos por hidrólisis enzimática de cáscara de maracuyá y naranja. Las letras a, b, c y d indican diferencia estadística significativa entre las medidas.

FIG. 3 Perfiles de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) como ácido acético, ácido butírico, ácido fórmico, ácido láctico, ácido propiónico y ácido succínico a 20h de fermentación de microcolon.

10

FIG. 4 Diagrama de proceso del Ejemplo 12 donde 1 es un molino, 2 es un biorreactor (hidrólisis/inactivación de la enzima), 3 es un filtro, 4 es un evaporador y 5 es una pulverizadora.

15

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Composición prebiótica de carbohidratos

20 La composición prebiótica de carbohidratos que se describe a continuación es rica en prebióticos. Los prebióticos son moléculas que presentan resistencia a la digestión en el tracto gastrointestinal y son capaces de modular el crecimiento de microorganismos benéficos propios (probióticos), reprimiendo la proliferación de bacterias menos deseables. Particularmente la composición prebiótica de carbohidratos está compuesta principalmente

25 por pectinolígosacáridos (POS), monosacáridos no digeribles, pectina y carbohidratos digeribles, adicionalmente la composición podría comprender ácidos orgánicos propios de la fruta, lignina, hemicelulosa, celulosa y antioxidantes.

La composición prebiótica de carbohidratos puede ser obtenida a partir de diferentes

30 materiales vegetales, entre los cuales se encuentran pasifloras, cítricos, tubérculos, o combinación de los anteriores. Estos materiales vegetales tienen en común que se

caracterizan por su contenido de pectina en alguna fracción de su cuerpo (por ejemplo en la cáscara o en la pulpa) o la totalidad de su cuerpo. En una modalidad preferida la fracción de interés del material vegetal es la cáscara. Preferiblemente el material vegetal tiene más del 10% de pectina, o entre el 10 y el 20% de pectina. En una modalidad, el material vegetal es

5 *Passiflora* spp., cítricos o tubérculos. Entre las pasifloras se encuentran las del subgénero *Passiflora*, particularmente de la serie *Passiflora edulis* f. *edulis* Sims y *Passiflora ligularis* como maracuyá, gulupa, curuba, granadilla y badea. El material vegetal también puede seleccionarse de naranja, limón, mandarina, lima, pomelo, toronja, manzana, cebolla y remolacha azucarera.

10

Posteriormente, se realiza una preparación del material vegetal antes de poner en contacto con la enzima. La preparación del material vegetal no involucra un tratamiento químico. En dicha preparación se realiza una disminución de la humedad y/o una disminución del tamaño de partícula. Particularmente, la disminución de la humedad se realiza por cualquier método

15 conocido por una persona medianamente versada en la materia por ejemplo mediante secado durante tiempo necesario hasta alcanzar una humedad entre el 4 y el 8%, o inferior al 6%. El tamaño de partícula se disminuye hasta que el material vegetal tenga un tamaño entre 0,1 y 1mm, o menor o igual a 1mm, o hasta obtener un material vegetal triturado que parezca un polvo. Para efectos del presente desarrollo, la pectina se obtiene directamente de la cáscara,

20 es decir no se realiza una purificación de la pectina en la cáscara por otros medios como la hidrólisis ácida y precipitación con etanol, o la hidrólisis enzimática y precipitación con etanol. El hecho que no se realice una purificación de la pectina permite conservar los antioxidantes y otros carbohidratos útiles como compuestos bioactivos que se encuentran en la celulosa, hemicelulosa y lignina.

25

Para efectos del presente desarrollo se entiende por pectinoligosacáridos o POS a los oligosacáridos derivados de la pectina con grados de polimerización (DP) entre 2 y 15 o entre 2 y 10. Los pectinoligosacáridos (POS) se encuentran en la composición entre 1 y 80%p/p, entre 10 y 70% p/p, entre 10 y 50% p/p, entre 20 y 60% p/p, entre 25 y 50%p/p,

30 entre 30 y 45% p/p o entre 25 y 35% p/p en base seca (bs). En donde se entiende por base seca a la composición del material sólido en la mezcla excluyendo toda el agua. En una

modalidad, los POS se encuentran en la composición de carbohidratos en una cantidad entre 10 y 50%, en donde dichos POS se caracterizan por ser en su mayoría DP3, es decir un valor mayor al 50%, mayor al 70%, mayor al 80%, entre 50 y 95%, entre 65 y 85% o entre 70 y 95%.

5

En cuanto a los monosacáridos no digeribles, estos corresponden a los azúcares monoméricos que no pueden ser metabolizados en el tracto gastrointestinal humano. Los monosacáridos no digeribles se seleccionan del grupo que comprende arabinosa, manosa, ramnosa, ácido galacturónico, o mezcla de los anteriores. Los monosacáridos no digeribles se encuentran en la composición entre 1 y 30%p/p, entre 1 y 50%, o entre 1 y 60.

10

En particular, se define la composición prebiótica de carbohidratos por su contenido de ácido galacturónico en tanto se reporta que este monosacárido no digerible está relacionado con Elkeurti Khadidja et al (2016) *In vitro fermentation and bifidogenic potential of galacturonic acid*. El ácido galacturónico se encuentra en la composición en base seca entre 1 y 50%p/p, entre 1 y 30% p/p, entre 1 y 25% p/p, entre 5 y 25%, entre 5 y 20%, o entre 1 y 15% p/p. En otra modalidad los monosacáridos son arabinosa entre 1 y 10% p/p; ácido galacturónico entre 1 y 5% p/p; ramnosa entre 0 y 3% p/p; y manosa entre 0,5 y 3% p/p.

15

Adicionalmente, la composición prebiótica de carbohidratos puede contener pectina o trazas de pectina. La pectina es un tipo de heteropolisacárido ramificado que constituye el principal componente de la lámina media de la pared celular y constituye 30% del peso seco de la pared celular primaria de células vegetales. La pectina se encuentra en la composición en una cantidad entre 0 y 20%p/p, entre 1 y 15%p/p, entre 1 y 10% p/p, entre 1 y 5% p/p, entre 0 y 5% p/p, entre 0 y 3% p/p o entre 0 y 1% p/p.

25

Opcionalmente la composición prebiótica de carbohidratos también comprende carbohidratos digeribles o carbohidratos con capacidad endulzante. Los carbohidratos digeribles corresponden al grupo de poli, oligo y monosacáridos que pueden ser hidrolizados y/o absorbidos en el tracto gastrointestinal humano con aporte calórico, galactosa, glucosa, fructosa y sacarosa. Los carbohidratos digeribles se pueden encontrar en la composición en

30

base seca entre 1 y 60% p/p, entre 20 y 50% p/p, entre 1 y 25% p/p, entre 3 y 15 % p/p o entre 0 y 10% p/p.

5 En una modalidad la composición prebiótica de carbohidratos comprende POS entre 10 y 60% p/p; pectina entre 0 y 15%p/p; y como monosacárido no digerible, al menos ácido galacturónico entre 1 y 25% p/p.

10 En una modalidad la composición prebiótica de carbohidratos comprende POS entre 30 y 45% p/p; pectina entre 0 y 15%p/p; y como monosacárido no digerible, al menos ácido galacturónico entre 1 y 20% o entre 1 y 25% p/p.

15 En otra modalidad la composición prebiótica de carbohidratos comprende POS entre 30 y 40% p/p; pectina entre 0 y 5%p/p; y los monosacáridos no digeribles se encuentra ácido galacturónico entre 1 y 15% p/p; en donde el contenido de DP3 en los POS se encuentran en una cantidad entre 65 y 85%p/p.

20 La composición prebiótica de carbohidratos puede ser un líquido o un polvo. La composición se puede convertir en un jarabe si se aumenta la concentración de sólidos solubles por cualquier método conocido por una persona medianamente versada en la materia. La concentración de sólidos solubles de la composición se puede modificar de acuerdo a la necesidad de producto por cualquier método conocido por una persona medianamente versada en la materia. La composición tiene un pH ácido, por ejemplo entre 3,5 y 5.

25 La composición prebiótica de carbohidratos tiene potencial bioactivo. La composición prebiótica de carbohidratos tiene capacidad antioxidante, en donde la composición tiene un contenido de fenoles totales entre 1 y 15 mg de ácido gálico (GAE) equivalente por g de materia seca, entre 6 y 10 mg GAE / g bs, o entre 6,2 y 7,7 mg GAE / g bs. La composición de carbohidratos tiene un contenido de carga calórica entre 1 y 3 kcal/g, entre 1 y 2,5kcal/g o entre 1,5 y 2kcal/g. La composición se caracteriza por un índice glucémico menor a 55.

30

La composición prebiótica de carbohidratos también comprende cenizas entre 30 y 45%, proteína entre 2 y 15%, grasa entre 0 y 1% o entre 0 y 0,02%, carbohidratos identificados (POS, azúcares no calóricos y calóricos derivados de la pectina) entre 35 y 70%, y carbohidratos no identificados 1 y 50%. Adicionalmente puede comprender entre otros componentes como compuestos antioxidantes.

Método de obtención

La composición prebiótica de carbohidratos se realiza por ejemplo mediante la hidrólisis enzimática de un material vegetal y enzimas con actividad pectinasa, celulasa, hemicelulasa, o combinaciones de las mismas, entre otras. En una modalidad preferida, la enzima tiene más de una actividad pectinasa, celulasa y hemicelulasa, que permite sinérgicamente acceder de forma más eficiente a la pectina en este tipo de matrices vegetales que puede resultar más compleja al no estar la pectina aislada.

Se usan cáscaras de material vegetal con una humedad promedio entre 1 y 90%, o preferiblemente cáscaras secas entre 1 y 10%, o entre 2 y 5%. Las cáscaras se trituran para disminuir su tamaño de partícula, preferiblemente hasta alcanzar un tamaño de partícula entre 1 y 5cm, menor a 2cm, 10mm, menor a 5mm, menor o igual a 1 mm, o entre 0,2 y 0,7mm.

Opcionalmente se puede realizar una etapa de blanqueamiento en donde se eliminan azúcares digeribles como la glucosa. Dicho blanqueamiento consiste en someter la cáscara a altas temperaturas por ejemplo poner el material vegetal en agua caliente a temperaturas entre 70 y 95°C por el tiempo que sea necesario de tal manera que se eliminen algunos de los azúcares calóricos (como glucosa y fructosa) presentes en la cáscara y se inactiven enzimas endógenas que puedan afectar el proceso de producción de POS. Posteriormente las cáscaras se escurren.

Independientemente de que se realice o no la etapa de blanqueamiento, posteriormente se suspenden las partículas en un medio acuoso, por ejemplo el medio puede ser agua con ajuste

de pH o una sustancia buffer como citrato (a una concentración de sólidos entre 3 y 10% p/p, entre 4 y 7% p/p), fosfato o cualquier otro conocido por una persona medianamente versada en la materia. Se adiciona la enzima y se deja hidrolizar. Se inactiva la enzima aumentando la temperatura hasta entre 80 y 100°C, hasta entre 85 y 95°C por el periodo de tiempo necesario para inactivar completamente la enzima. Se separan los sólidos insolubles por medio de una separación sólido líquido, por ejemplo mediante centrifugación, filtración y/o decantación. La inactivación de la enzima se puede realizar antes o después de la separación de los sólidos insolubles.

- 10 La solución resultante presenta oligosacáridos de pectina (POS) y ácido galacturónico, al igual que otros posibles carbohidratos como pectina, glucosa, arabinosa, manosa, ramnosa, y galactosa, entre otros.

Usos

- 15 El producto propuesto corresponde a una composición prebiótica de carbohidratos que comprende POS y azúcares no calóricos y calóricos derivados de la pectina y que puede ser usado como ingrediente para la formulación de productos alimenticios. La composición es útil como texturizante, suplemento prebiótico, antioxidante y/o reductor de índice glicémico.

- 20 La composición prebiótica de carbohidratos es una mezcla de pectinoligosacáridos (POS) y monosacáridos no calóricos como ácido galacturónico, y adicionalmente manosa, ramnosa, arabinosa, entre otros, la cual puede ser usada como reemplazo de sólidos solubles calóricos en productos alimenticios. Su contenido de monosacáridos no calóricos permite mantener las características reológicas del producto sin aumentar su contenido calórico. Adicionalmente, en una modalidad la composición del desarrollo puede ser usada como reemplazo de azúcar añadido.

EJEMPLOS

- 30 *Ejemplo 1. Preparación de cáscaras de maracuyá y naranja*

Se obtuvieron cáscaras de naranja y de maracuyá de residuos domésticos y se almacenaron en congelación a -20 °C hasta su uso.

- 5 Una vez descongeladas las cáscaras se cortaron para disminuir su tamaño y facilitar el secado en horno de convección a 55 °C por 72 h, hasta llegar a una humedad entre el 4 y el 6%. Luego del secado se llevaron las cáscaras secas a temperatura ambiente en disecador y se trituraron en licuadora hasta un tamaño de partícula menor o igual a 1 mm. La cáscara en polvo resultante se almacenó en bolsa sellada a temperatura ambiente.

10

Ejemplo 2. Ensayo preliminar de hidrólisis con enzimas comerciales en términos de viscosidad

- 15 Se realizó un ensayo de hidrólisis enzimática de cáscara de maracuyá (en polvo, resultante del Ejemplo 1) usando tres enzimas comerciales EnzA, EnzB y EnzC caracterizadas por tener actividad pectinasa, celulasa y hemicelulasa.

- Se preparó 100mL de una suspensión de la cáscara en polvo del Ejemplo 1 en buffer citrato 50 mM con una concentración de cáscara al 4% p/v. Se le agregó 1% v/v de enzima EnzA, EnzB o EnzC diluida a una concentración de proteína de 10 mg/mL. Las hidrólisis se llevaron a cabo en matraces agitados a 150 rpm y 40 °C por 2 horas. Se realizó duplicado de hidrólisis para cada enzima. Se incluyó una solución de cáscara en polvo del Ejemplo 1 como control, a la cual no se le adicionó enzima. Luego de la hidrólisis se tomaron muestras de 5 mL en tubos de ensayo y se llevaron a baños de maría con agua en ebullición por 10 min, con el objetivo de inactivar la enzima.
- 20
- 25

- Posteriormente, se centrifugaron los hidrolizados a 4500 rpm por 5 min para remover sólidos de gran tamaño. El sobrenadante se usó para las mediciones de viscosidad en reómetro Discovery HR-1®. Para las mediciones de viscosidad se usó una configuración de cono y plato con una velocidad de cizalla de 100 s⁻¹ a 30 °C. Los valores de viscosidad reportados en la Tabla 1 corresponden al promedio de las medidas tomadas en un lapso de 20 min.
- 30

Tabla 1. Viscosidad de soluciones de cáscara en polvo luego de 2h de hidrólisis con enzimas comerciales

Enzima	Viscosidad promedio (Pa.s)	Desv. Est.	Reducción viscosidad (%)
Control	6,7E-03	1,8E-04	-
EnzB	2,8E-03	1,2E-04	58,0
EnzA	2,9E-03	8,7E-05	57,5
EnzC	2,5E-03	1,9E-04	62,8

- 5 Entre las enzimas evaluadas, EnzC resultó en la mayor reducción de viscosidad de la solución de cáscara (Tabla 1) comparada con los valores obtenidos con EnzA y EnzB, los cuales fueron ligeramente superiores y muy similares entre sí.

10 *Ejemplo 3. Evaluación de la capacidad de hidrólisis de pectina en términos de ácido galacturónico suelto para cáscara de maracuyá y naranja, catalizada por enzimas pectinasas*

Se evaluó la capacidad de hidrólisis de las enzimas EnzC, EnzA, EnzB, y la combinación de una enzima con actividad Endopoligalacturonasa (EnzC) y otra con actividad pectin-esterasa
 15 (EnzD), para evaluar el efecto en la hidrólisis de pectina al reducir el grado de esterificación de la misma. La hidrólisis enzimática ha probado ser más eficiente y precisa que la hidrólisis total con ácidos diluidos cuyas reacciones de hidrólisis son más inespecíficas y llevan a la degradación indeseada de los monómeros de azúcares, alterando el resultado.

20 Se usó un diseño unifactorial donde cada enzima fue un nivel y la variable respuesta fue la concentración de ácido galacturónico (AGA) al final del proceso. Se realizó la prueba Tukey ($\alpha=0,05$) para comparar las medias de los diferentes tratamientos y determinar la enzima capaz de hidrolizar la mayor cantidad de pectina en cáscaras de maracuyá y naranja. Para esto se usó el software IBM SPSS Statistics Base®, versión 22 (IBM, USA). Las enzimas
 25 con mayor capacidad de hidrólisis se usaron en los ensayos para la producción de la composición prebiótica.

Las hidrólisis se realizaron con soluciones de polvo del Ejemplo 1 al 4% p/v en buffer citrato 50 mM, pH 5. La concentración de enzima fue 5% (v/v), a una concentración inicial de proteína de 10 mg/mL, exceptuando EnzD que se adicionó al 1% (v/v). Las hidrólisis se realizaron en matraz con volumen de 50 mL, en agitador orbital a 150 rpm y 50 °C, por 24 horas. Todos los tratamientos se hicieron por duplicado. Se incluyó un control para cada solución de cáscara en polvo bajo las mismas condiciones de proceso pero sin adición de enzima.

Al finalizar la hidrólisis se recuperaron 10 mL de solución que se centrifugaron a 4500 rpm por 5 min para remover los sólidos. El sobrenadante se almacenó a -15 °C, hasta su uso.

La medición de AGA en las muestras hidrolizadas se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con un equipo Flexar® (Perkin Elmer, USA), usando una columna C18 Acclaim Polar Advantage II ® (Thermo Fisher Scientific, USA) (120 Å, 150 x 4.6 mm, 5 µm p.s.) y un detector UV-Vis a 201 y 230 nm. Se usó un gradiente de buffer fosfato, pH 7,4 (solvente A) y acetonitrilo (solvente B) de la siguiente forma: 0-2 min, 100% solvente A; 2-10 min, 20% solvente A, 10-14min, 100% solvente A, finalizando con 10 min de reequilibrio (100% solvente A). El flujo fue de 1 mL/min y la temperatura de 60 °C, con un volumen de inyección de 10 µL. Cada muestra fue inyectada 6 veces. La curva de calibración se realizó con un estándar de ácido galacturónico monohidratado (Sigma Aldrich, Ref. 48280-5G-F, pureza $\geq 97\%$). La FIG. 1 presenta los resultados de ácido galacturónico obtenidos de la hidrólisis enzimática de cáscara de maracuyá y naranja.

De los resultados obtenidos se puede concluir que la acción de las enzimas tuvo un efecto significativo en la hidrólisis de pectina de ambas cáscaras dada la mayor concentración de AGA encontrada en estos tratamientos, en comparación con los blancos donde no se adicionó enzima. Para maracuyá, la enzima EnzC y la combinación EnzC+EnzD poseen la mayor capacidad de hidrólisis, comparada con las enzimas EnzA y EnzB, mientras que para naranja, las enzimas EnzA y EnzB presentan la mayor eficiencia en la hidrólisis de pectina. Comparando las concentraciones de AGA entre ambos sustratos, se encuentra que no hay

diferencia significativa para los tratamientos con mayor eficiencia de hidrólisis, lo cual permite inferir que la concentración de pectina entre ambas cáscaras es similar.

Basado en los resultados obtenidos anteriormente, se continuó el trabajo experimental de producción de composición rica en prebióticos con las enzimas EnzC y EnzA para las hidrólisis de las cáscaras de maracuyá y naranja, respectivamente.

Ejemplo 4. Optimización de condiciones de hidrólisis para producción de POS a partir de cáscaras de maracuyá y naranja

Para evaluar la producción de POS a partir de cáscara de maracuyá y naranja se realizó un diseño factorial completo con dos factores y dos niveles (2^2), como se muestra en la Tabla 2. Todas las hidrólisis con cáscara de maracuyá se hicieron con la enzima comercial EnzC, y las hidrólisis con cáscara de naranja se hicieron con la preparación comercial EnzA.

Tabla 2. Diseño experimental para optimización de tiempo y concentración de enzima en la producción de pectinolígosacaridos

Cáscara	# tratamiento	Enzima	Concentración enzima (%v/v)	Tiempo hidrólisis (h)
Maracuyá	1	EnzC	0,5	0,5
	2		2	0,5
	3		0,5	2
	4		2	2
Naranja	5	EnzA	0,5	0,5
	6		2	0,5
	7		0,5	2
	8		2	2

Todos los ensayos se hicieron por duplicado con soluciones de cáscara en polvo del Ejemplo 1 al 4% p/v en buffer citrato 50 mM, pH 5. Las hidrólisis se realizaron en matraz agitado con volumen de trabajo de 50 mL, en agitador orbital a 150 rpm y 50 °C. Al finalizar la hidrólisis se recuperaron 10 mL de solución y se inactivó la enzima llevando las muestras a

baño de María en ebullición por 10 min. Posteriormente, se centrifugaron a 4500 rpm por 5 min para remover los sólidos y el sobrenadante se almacenó a -15 °C, hasta su uso.

5 Se cuantificó el contenido de POS en las muestras obtenidas del diseño experimental usando cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a un detector ELSD. Se usó una columna Hypercarb® 100x4,6 mm (Thermo Scientific) a una temperatura de 60 °C, flujo de 0,8 mL/min usando un gradiente de elución con ácido trifluoroacético (TFA) al 0,01% y acetonitrilo. Se usaron patrones de monómeros, dímeros y trímeros de ácido galacturónico para la cuantificación de POS en las muestras y la distribución de los grados de
10 polimerización.

Se usó como variable de respuesta el rendimiento de POS por gramo de cáscara (peso seco), es decir, la cantidad de cáscara convertida en POS. Adicionalmente, se determinaron los grados de polimerización y la concentración total de monómeros derivados de pectina. Se
15 realizó el análisis de varianza y comparación de medias con la prueba Duncan y un α de 0,05.

La FIG. 2 presenta los rendimientos de producción de POS, expresados como g POS/g cáscara (base seca), para las hidrólisis enzimáticas realizadas con cáscaras de maracuyá y naranja.
20

Como se observa en la FIG. 2, no hubo diferencia en la producción de POS entre ninguno de los tratamientos realizados, a excepción de los tratamientos 5 y 8, para cáscara de naranja. Esto implica que a bajas concentraciones de enzima (0,5% v/v) y cortos tiempos de proceso (30 min) fue posible fraccionar la pectina y obtener un rendimiento de POS aproximado de
25 0,5 g/g, tanto en cáscara de maracuyá, como de naranja.

En el estudio realizado por Gómez et al. (2016) para la producción de pectin-oligosacáridos (POS) a partir de cáscaras de limón, por tres métodos diferentes (extracción con agua, hidrólisis enzimática, y filtración por membrana), se encontraron rendimientos de 0,45 a 0,55
30 g/g. Por otro lado, en el trabajo realizado por Martínez et al. (2012) para la generación de POS a partir de residuos de naranja por hidrólisis enzimática, se alcanzaron rendimientos de

0,31 g/g. En el estudio para la producción de oligosacáridos a partir de cáscara de maracuyá por tratamiento con agua subcrítica se lograron rendimientos de 0,21 g/g (Klinchongkon, Khuwijitjaru, Wiboonsirikul, & Adachi, 2017). Los estudios reportados anteriormente incluyen el pretratamiento de la materia prima previo al proceso para la producción de los oligosacáridos, ya sea a través de la purificación de la pectina o de la eliminación de compuestos solubles. Estos tratamientos adicionales acarrearían costos al momento de llevar el proceso a nivel industrial, lo cual puede afectar la viabilidad tecno-económica del proceso.

En la metodología planteada en este estudio, no solo se obtienen rendimientos de POS similares o superiores a los reportados en la literatura sino que se plantea un proceso sencillo de hidrólisis enzimática donde el único pretratamiento a la materia prima consiste en el secado y reducción de tamaño de partícula. Esto representa una ventaja técnica que afectará positivamente la evaluación económica del proceso y permitirá continuar la evaluación de la tecnología a mayores escalas.

Ejemplo 5. Composiciones de carbohidratos obtenidas a partir de cáscara de maracuyá

Siguiendo el proceso descrito en los ejemplos anteriores y empleando cascará de maracuyá como material vegetal de partida, se obtuvieron las composiciones de carbohidratos No. 1 a 8 como se describen en la Tabla 3:

Tabla 3. Composición prebiótica de carbohidratos a partir de cáscara de maracuyá (% p/p, base seca)

	Ácido galacturónico (%bs)	POS (%bs)	Sacarosa (%bs)	Glucosa (%bs)	Galactosa (%bs)	Fructosa (%bs)
1	1,9	30	1,1	1,2	0,1	2,1
2	1,8	33	1,0	1,3	0,1	2,5
3	4,3	33	1,5	2,1	0,2	2,1
4	4,2	31	0,8	1,0	0,1	1,3
5	4,5	32	0,6	1,1	0,1	1,6

6	4,2	31	0,5	1,3	0,1	1,2
7	6	32	0,8	3,4	0,2	2,1
8	4	29	2,6	6,9	0,4	5,4

La composición resultante presenta contenido de pectinolígosacáridos con propiedades prebióticas, de acuerdo a lo reportado en la literatura científica. Adicionalmente, el contenido de carbohidratos no digeribles (POS, ácido galacturónico) permite aumentar concentración de sólidos en fórmulas sin incrementar la carga calórica de la misma. El contenido de sacarosa, glucosa, fructosa y galactosa de origen natural habilita el reemplazo de azúcar refinada en productos alimenticios, evitando declarar el ingrediente como “azúcar adicionada”.

- 10 Tabla 4. Grados de polimerización de POS obtenidos de composición prebiótica de carbohidratos a partir de cáscara de maracuyá (Participación en porcentaje, por grado de polimerización)

Composición No.	DP2	DP3	>DP3
1	1,65	90,73	0,97
2	1,56	91,68	1,04
3	1,24	85	0,87
4	1,16	84,5	1
5	1	85,12	0,89
6	1,09	85,11	0,87
7	1,04	81,36	0,44
8	2,44	84,45	0,42

- 15 El alto contenido de oligosacáridos con grado de polimerización 3 representa una ventaja funcional del producto debido a que se ha demostrado que POS con grados de polimerización entre 2-6 promueven el crecimiento selectivo de bacterias probióticas como las bifidobacterias, inclusive por encima de oligosacáridos con grados de polimerización más elevados (Al-Tamimi et al., 2006; Holck et al., 2011). Adicionalmente, se ha encontrado que los oligosacáridos derivados de pectina, incluyendo aquellos de cadena corta, tienen la capacidad de reducir la adhesión de bacterias patógenas como *L. monocytogenes*, *E. coli* y *S. typhimurium* a las paredes del intestino humano (Wilkowska et al., 2019).
- 20

Ejemplo 6. Ensayo a escala de banco (2L) de hidrólisis de cáscara de maracuyá para producción de composición prebiótica de carbohidratos llevado a jarabe de 68°Brix

- 5 Las cáscaras de maracuyá fueron adecuadas por dos tratamientos diferentes: Secado y trituración, y cavitación hidrotermodinámica. Para el primer tratamiento, las cáscaras fueron cortadas manualmente y llevadas a horno convectivo a 55 °C por 48 horas, hasta alcanzar una humedad promedio de 5%. Posteriormente, se trituraron en licuadora de cocina y se pasó el polvo resultante por tamiz de 1 mm. Finalmente, el polvo de cáscara se almacenó en bolsa sellable a 4 °C. Para el segundo tratamiento, se pasó una mezcla de agua:cáscara en una proporción 45:55 por un equipo de cavitación hidrotermodinámica (Kavitec, Colombia) donde se llevó la temperatura de la mezcla hasta 45 °C antes de parar el proceso. La suspensión de cáscara en agua fue almacenada en bolsas sellables a -20 °C.
- 10
- 15 Para evaluar el efecto del pretratamiento de cavitación o secado por convección realizado a la cáscara de maracuyá sobre la producción enzimática de POS se usaron como materias primas las cáscaras tratadas descritas anteriormente. En ambos casos, las suspensiones de cáscara se encontraban a una concentración de 6,6% p/p en buffer citrato 50 mM, pH 5. Se usó una enzima EnzC a una concentración de 1,32 mg proteína/g cáscara. Adicionalmente,
- 20 se incluyó un control negativo que se obtuvo del proceso de cavitación, sin adición de enzima.

- Las reacciones se llevaron a cabo en reactores de tanque agitado de 2 L con un volumen de trabajo de 1 L. Se agitó el medio a 450 rpm y se mantuvo a una temperatura de 50 °C, durante
- 25 1 hora. Terminado el tiempo de reacción, se removieron sólidos de gran tamaño con un tamiz de 1 mm y se recuperaron 600 ml de medio que fueron llevados a baño de maría en ebullición para inactivar la enzima. Posteriormente, se centrifugó el medio a 4500 rpm por 10 min con el objetivo de remover sólidos pequeños y obtener una solución traslúcida. Esta solución se llevó a rotaevaporación, buscando reducir el contenido de agua en la muestra y
- 30 facilitar las técnicas analíticas para cuantificación de POS y otros carbohidratos. Las muestras se almacenaron en congelación hasta su uso.

Para la determinación de oligosacáridos y ácido galacturónico se usó HPLC acoplado a un detector ELSD con una columna Hypercarb 100x4,6 mm 5 um (Thermo Scientific) a una temperatura de 60 °C, un flujo de 0,8 ml/min, usando dos tipos de eluyentes: ácido trifluoroacético al 0,01% y acetonitrilo. Se usaron como estándares el ácido galacturónico, ácido digalacturónico y ácido trigalacturónico, en donde todos los picos entre el ácido galacturónico y el digalacturónico se sumaron como POS DP2, todos los picos entre el ácido digalacturónico y el trigalacturónico se sumaron como POS DP3, y finalmente, todos los picos superiores a trigalacturónico se sumaron como POS >DP3.

10

Tabla 5. Composición Jarabe POS (68°Brix)

		g/L	% bs
Cavitación	Ác. Galacturónico	89,23	9,8
	POS	259,49	28,5
Secado	Ác. Galacturónico	95,65	10,5
	POS	314,00	34,5
Control	Ác. Galacturónico	31,30	3,4
	POS	60,22	6,6

Se obtuvo un total de POS entre 301,8 y 404,4 g/L, en promedio con un DP2 de 1,0, DP3 del 72% y >DP3 de 0,5.

15

Se evaluó el contenido calórico aportado por el componente de carbohidratos de la composición tipo jarabe descrita anteriormente para el tratamiento secado y triturado, asumiendo la siguiente carga calórica:

20

Tabla 6. Carga calórica componentes

	Calorías (Kcal/g)
Ac. Galacturónico	4
POS	1,5

Dicha composición tipo jarabe obtenida tiene un total de contenido calórico, asumiendo estos dos componentes, de 0,94 kcal/g en promedio, mientras que si se asume un aporte con componentes adicionales como otros carbohidratos y proteína tiene un contenido calórico entre 1,5 y 2 kcal/g. En comparación con un jarabe de sacarosa convencional que tiene una
 5 carga calórica de 4 kcal/g, se obtiene una reducción calórica igual o superior al 50%.

Ejemplo 7. Cinética de producción de POS en reactor de 10L.

Se realizó la reacción enzimática para la producción de POS a partir de cáscara de maracuyá
 10 secada en horno convectivo y triturada hasta un tamaño de partícula menor o igual a 1 mm. La cáscara fue diluida en buffer citrato 50 mM pH 5 a una concentración del 7% p/p.

La reacción enzimática se llevó a cabo en reactor de 10 L usando 5 L como volumen de trabajo y una enzima EnzC. La reacción se realizó a 50 °C y una velocidad de agitación de
 15 500 rpm. La concentración de la enzima fue de 1,32 g proteína/g cáscara. Se tomaron muestras del medio a las 0,5, 1, y 1,5 horas de proceso y se removieron sólidos e inactivó la enzima.

Cada muestra fue almacenada en congelación previo al análisis de POS y azúcares presentes
 20 en la pectina como ácido galacturónico.

Tabla 7. Contenido de ácido galacturónico y POS a diferentes tiempos de reacción

	Componente	g/L	% bs
0,5h	Ácido galacturónico	110,39	12,1
	POS	353,73	38,9
1h	Ácido galacturónico	133,60	14,7
	POS	376,31	41,4
1,5h	Ácido galacturónico	136,09	15,0
	POS	335,62	36,9

Se obtuvo una cantidad de POS entre 335,6 y 376,3 g/L, en promedio con un DP2 de 0,53, DP3 del 71% y >DP3 de 1,1.

Ejemplo 8. Medición de la capacidad antioxidante de la composición prebiótica de carbohidratos tipo jarabe

Se realizó la medición de la capacidad antioxidante de la composición tipo jarabe rico en POS obtenido en el Ejemplo 6 a diferentes concentraciones de sólidos solubles, medidos como grados Brix (g sólidos solubles/100g de jarabe). Se usó la técnica DPPH, como la describe Brand-Williams, Cuvelier, & Berset (1995) y el resultado se expresa como porcentaje de inhibición:

Tabla 8

°Brix	% Inhibición
23,7	84
21,3	83
17,3	71,5
15,6	69,9
11,6	67,9
4	30,1

Como se observa en los resultados, la composición tipo jarabe presenta actividad antioxidante a diferentes concentraciones de sólidos solubles, siendo una actividad considerable inclusive en valores bajos de sólidos solubles como 4 g/100 g solución. Con mayores grados Brix, mayor será su actividad antioxidante que pueda transferirse a los productos donde se aplique.

Se realizó un análisis de fenoles totales a las composiciones de acuerdo con el Ejemplo 5 por la técnica de Folin–Ciocalteu, y se expresó el resultado en GAE (ácido gálico equivalente) en base seca (BS) en donde se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 9

Tipo	mg GAE/g BS
Blanqueada	6,2-7,2
Sin blanquear	6,7-7,7

Al comparar dichos resultados con lo divulgado en el estado del arte, por ejemplo el reportado por Macagnan et al., (2015), donde se cuantificaron los fenoles totales de cáscara de maracuyá en polvo con la técnica Folin–Ciocalteu, encontrando una concentración de 6,9mg GAE/g BS. Lo que demuestra potencial bioactivo en la composición tipo jarabe preparado.

5

Ejemplo 9. Incorporación de la composición prebiótica de carbohidratos como texturizante en bebidas

Se tomaron dos productos tipo bebida a base de mora y a base de pera, en donde se agregó el jarabe POS obtenido de acuerdo al Ejemplo 6, a una concentración de 2,25%. Se midió la viscosidad tanto al patrón como al ensayo y se encontraron los siguientes resultados:

10

Tabla 10

Producto	Viscosidad (cP)	Sólidos solubles totales (Brix)
Bebida mora	201	6,1
Bebida mora + POS	215	7,5
Bebida pera	7,45	8
Bebida pera + POS	7,8	9,3

15

Se puede observar que la adición del jarabe POS a las bebidas de frutas trae un aumento de la viscosidad, sin embargo, de acuerdo a los ejemplos anteriores, esto no implica un aumento calórico en el producto.

Ejemplo 10. Análisis proximal de la composición prebiótica de carbohidratos tipo jarabe

20

Se midió el contenido de proteína, grasa y cenizas en la composición tipo jarabe descrita en el Ejemplo 6, usando el método Dumas, arrastre con eter y gravimetría, respetivamente. Se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 11

	% base seca
Ceniza	36,24
Grasa	0,09

Proteína	10,0
Carbohidratos identificados	50,5
Otros	3,2
Total	100

Los carbohidratos identificados corresponden a los POS, azúcares no calóricos y calóricos derivados de la pectina. En otros es posible que haya otros carbohidratos no identificados.

5 *Ejemplo 11. Evaluación de actividad prebiótica de la composición prebiótica de carbohidratos*

Para evaluar la actividad prebiótica del jarabe rico en POS generado a partir de la composición, se realizaron fermentación de MicroColon usando como medio de cultivo una
10 mezcla de heces fecales obtenidas de 6 adultos sanos. La actividad prebiótica se determinó a partir de la formación de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) que se conocen como indicadores del crecimiento de microorganismos probióticos en el sistema gastrointestinal humano. Según el artículo publicado por Markowiak-Kopeć y colaboradores (2020), la presencia de SCFA en el cuerpo humano, principalmente, acético, butírico y propiónico, en
15 cantidades adecuadas, es esencial para la salud y bienestar del consumidor, sin embargo, la formación de estos ácidos depende de la adecuada ingesta de substratos, como fibras dietarias y prebióticos, necesarios para la correcta evolución de las fermentaciones. Los beneficios atribuidos a los SCFA no solo se limitan a la salud gastrointestinal de los humanos, ya que también se han encontrado vínculos entre la presencia de estos compuestos
20 con el correcto funcionamiento del cerebro, evitando afecciones como depresión, Alzheimer, Parkinson y desordenes autistas (Silva et al., 2020).

Para evaluar las concentraciones de ácidos orgánicos en las fermentaciones de microcolon, que pueden derivarse de la producción o el consumo por organismos microbianos, se
25 analizaron los sobrenadantes de las fermentaciones de microcolon mediante un método de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), que separa, identifica y cuantifica cada componente en una mezcla.

Concentraciones de ácidos orgánicos

Se han identificado y cuantificado los siguientes ácidos orgánicos en sobrenadantes de fermentación de microcolon: ácido acético, ácido butírico, ácido fórmico, ácido láctico, ácido propiónico y ácido succínico.

Los resultados SCFA totales después de 20 h de fermentación se muestran a continuación:

Tabla 12.

#Muestra	Condición
AL084	Alpina POS 15 mg/ml
AL085	Alpina POS 10 mg/ml
AL086	Alpina POS 5 mg/ml
AL087	Vivinal GOS 15 mg/ml
AL088	Vivinal GOS 10 mg/ml
AL089	Vivinal GOS 5 mg/ml
AL090	FOS Orafti P95 15 mg/ml
AL091	FOS Orafti P95 10 mg/ml
AL092	FOS Orafti P95 5 mg/ml
AL105	Alpha GOS PEA 15 mg/ml
AL106	Alpha GOS PEA 10 mg/ml
AL107	Alpha GOS PEA 5 mg/ml
AL137	Control agua
AL138	Control agua

Tabla 13

#Muestra	Ác. Succínico (mg/L)	Ác. Láctico (mg/L)	Ác. Fórmico (mg/L)	Ác. Acético (mg/L)	Ác. Propiónico (mg/L)	Ác. Butírico (mg/L)	Σ (mg/ml)
AL084	1504	4700	183	3982	219	284	10,9
AL085	68	3710	191	3518	778	316	8,6

AL086	19	2427	200	3223	646	380	6,9
AL087	71	1757	90	1628	214	113	3,9
AL088	100	3526	209	3279	430	241	7,8
AL089	80	3317	212	3262	436	282	7,6
AL090	103	3447	270	2782	431	271	7,3
AL091	121	3434	269	2625	438	292	7,2
AL092	82	3224	266	2732	410	297	7,0
AL105	115	3329	245	3072	n.a.	279	7,0
AL106	135	3393	242	3118	460	294	7,6
AL107	83	3188	240	3203	435	276	7,4
AL137	21	1713	356	2676	418	546	5,7
AL138	20	1656	332	2619	425	544	5,6

La información resumida anteriormente se describe también en la FIG. 3.

Se concluye que después de 20 horas de fermentación, la mayoría de los componentes probados muestran un aumento en los SCFA totales, en donde los efectos más fuertes son provocados por Alpina POS (todas las concentraciones probadas), en donde los Alpina POS corresponde a la composición prebiótica de carbohidratos aquí reclamada. Adicionalmente se concluye que el principal impulsor del aumento de SCFA es el ácido láctico. Es notable el fuerte aumento de ácido succínico en las condiciones de Alpina POS 15 mg/mL.

Ejemplo 12. Ensayo a escala piloto (40L) de hidrólisis de cáscara de maracuyá para producción de composición prebiótica de carbohidratos

Se realizó la hidrólisis enzimática de cáscara de maracuyá en un reactor de tanque agitado de 50 L, con un volumen de trabajo de 40 L. La cáscara de maracuyá fue sometida al tratamiento de secado mencionado en el Ejemplo 1 hasta conseguir un polvo con tamaño de partícula igual o inferior a 1 mm. Con este polvo se hizo una suspensión al 7% p/p de la cáscara en buffer citrato de sodio 50 mM, pH 5. La suspensión se llevó a 50°C en el reactor de tanque agitado y se adicionó la enzima EnzC a una concentración de 1,32 mg proteína/ g

de cáscara. La suspensión fue agitada por 50 min a 480 rpm. Finalizado el tiempo de la reacción enzimática, se aumentó la temperatura en el reactor a 80°C por entre 15 y 20 minutos, con el objetivo de inactivar la enzima.

- 5 En vista que no hay información técnica que indique cómo es el proceso de escalado para la obtención de POS en volúmenes superiores (>10kg de suspensión), se propuso pasar la suspensión de sólidos por un filtro prensa con cinco placas, una capacidad de retención de entre 0,1 y 0,5kg/placa, un tamaño de poro inferior a 1µm, un área de filtrado de 0,7m², se obtiene un líquido de la composición. Este líquido se evaporó para concentrar los sólidos
- 10 solubles hasta alcanzar 68-75 °Brix, obteniendo una composición tipo jarabe. Se obtiene una composición prebiótica de carbohidratos con características similares a las reportadas anteriormente y que se caracterizó por el siguiente contenido de monosacáricos.

Tabla 14.

	Ác. galacturónico	Glucosa	Fructosa	Arabinosa
Filtrado (%bs)	18-20	8-12	12-16	0,5-1,5

15