

**Producción de mezclas de oligogalacturónidos de bajo peso molecular a partir de cáscara de limón y evaluación *in vitro* de propiedades biológicas de interés**

Producción de mesturas de oligogalacturónidos de baixo peso molecular a partir de casca de limón e avaliación *in vitro* de propiedades biolóxicas de interese

Production of low molecular weight oligogalacturonides mixtures from lemon peel and *in vitro* evaluation of biological properties of interest



Autor: David González Formoso

Director (UVigo): José Luis Alonso González

Directora (UDC): María Isabel González Siso

Fecha de presentación: 22/07/2022

**GONZALEZ FORMOSO, DAVID (FIRMA)**  
GONZALEZ FORMOSO, DAVID (FIRMA)  
c=ES,  
serialNumber=45144673C,  
sn=GONZALEZ,  
givenName=DAVID,  
cn=GONZALEZ FORMOSO, DAVID (FIRMA)  
2022.07.14 23:15:03 +02'00'

**GONZALEZ SISO MARIA ISABEL - DNI 32754332D**  
Firmado digitalmente por GONZALEZ SISO MARIA ISABEL - DNI 32754332D  
Fecha: 2022.07.14 11:17:35 +02'00'

**ALONSO GONZALEZ JOSE LUIS - DNI 35559988X**  
Firmado digitalmente por ALONSO GONZALEZ JOSE LUIS - DNI 35559988X  
Fecha: 2022.07.14 14:55:46 +02'00'

## Acrónimos y abreviaturas

ADPN	Adiponectina
AraGalOS	Arabinogalactooligosacáridos
AraOS	Arabinoooligosacáridos
CLAE	Cromatografía Líquida de Alta Eficacia
CNV	Compuestos no volátiles
CS	Contenido seco
DE	Grado de esterificación
DM	Grado de metilación
DP	Grado de polimerización
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i> (Hibridación in situ fluorescente)
FOS	Fructooligosacáridos
GalA	Ácido galacturónico
GalOS	Galactooligosacáridos
GOS	Glucooligosacáridos
HG	Homogalacturonano
HMOs	Oligosacáridos de la leche humana
IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6	Interleuquina 1 $\beta$ , 4 y 6
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
INV	Impurezas no volátiles
ISAPP	<i>International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics</i>
lcFOS	Fructooligosacáridos de cadena larga
LPOS	Oligosacáridos de cáscara de limón
LPS	Lipopolisacárido
mPOS	Pectooligosacáridos metilados
mRNA	ARN mensajero
NO	Óxido nítrico
OGalA	Oligogalacturónidos
OND	Oligosacáridos no digeribles
PGA	Ácido Poligalacturónico
PHA	Posthidrólisis ácida
PHE	Posthidrólisis enzimática
POS	Pectooligosacáridos
RamnOS	Ramnooligosacáridos
RhaGalAOS	Ramnogalacturonoligosacáridos
RCL	Residuo de cáscara de limón
RG-I	Ramnogalacturonano tipo I
RG-II	Ramnogalacturonano tipo II
RLS	Relación líquido-sólido
rRNA	<i>Ribosomal RNA</i>
SCFA	Ácidos grasos de cadena corta
scGalOS	Galactooligosacáridos de cadena corta
spp.	<i>species plural</i>
STH	Sólido para tratamiento hidrotérmico
T <sub>máx</sub>	Temperatura máxima
VIH-1	Virus de inmunodeficiencia humana 1
XilOGalA	Xilooligogalacturónidos
XOS	Xilooligosacáridos

**Resumen (126 palabras):** La microbiota intestinal está influida por múltiples factores y es determinante en la salud y en el desarrollo de enfermedades como el asma o la obesidad. Puede ser modulada a través de la dieta y de prebióticos, sustratos que alcanzan el colon y son metabolizados por las bacterias colónicas, que producen moléculas beneficiosas para el individuo. Las propiedades de los prebióticos dependen de sus características fisicoquímicas, siendo los oligogalacturónidos de bajo DP una alternativa interesante. En este proyecto se plantea un método de producción de mezclas de oligogalacturónidos de bajo peso molecular partiendo de residuos de cáscara de limón, que fueron procesados mediante una extracción acuosa multietapa, un tratamiento hidrotérmico a 155°C y una hidrólisis con preparados comerciales de pectinasas. Las mezclas obtenidas presentaron capacidad antioxidante.

**Resumo (118 palabras):** A microbiota intestinal está influenciada por múltiples factores e é determinante na saúde e no desenvolvemento de enfermidades como a asma ou a obesidade. Pódese modular mediante a dieta e os prebióticos, sustratos que chegan ao colon e que son metabolizados polas bacterias colónicas, que producen moléculas beneficiosas para o individuo. As propiedades dos prebióticos dependen das súas características fisicoquímicas, sendo unha alternativa interesante os oligogalacturónidos de baixo DP. Este proxecto propón un método para a produción de mesturas de oligogalacturónidos de baixo peso molecular a partir de residuos de casca de limón, que foron procesados mediante extracción acuosa multietapa, tratamento hidrotermal a 155°C e hidrólise con preparados comerciais de pectinasas. As mesturas obtidas presentaron capacidade antioxidante.

**Abstract (112 words):** The intestinal microbiota is influenced by multiple factors and is decisive in health and in the development of diseases such as asthma or obesity. It can be modulated through diet and prebiotics, substrates that reach the colon and are metabolized by colonic bacteria, which produce beneficial molecules for the individual. The properties of prebiotics depend on their physicochemical characteristics, with low DP oligogalacturonides being an interesting alternative. This project proposes a method for the production of low molecular weight oligogalacturonide mixtures starting from lemon peel residues, which were processed by means of multi-stage aqueous extraction, hydrothermal treatment at 155°C and hydrolysis with commercial preparations of pectinases. The obtained mixtures presented antioxidant capacity.

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. Microbiota intestinal y salud

La microbiota humana es el conjunto de microorganismos que colonizan la piel, las mucosas y el intestino humano, existiendo aproximadamente 1,3 bacterias por cada célula humana en nuestro organismo (Sender *et al.*, 2016). El tracto intestinal es el principal ambiente en el que se asientan las bacterias de la microbiota, que alcanzan las 1000 especies y que forman comunidades que difieren mucho entre individuos, pudiendo determinar la diferencia interindividual de respuesta del organismo a distintos estímulos. Por el momento, no se conocen con exactitud los mecanismos por los que la microbiota afecta a la salud del hospedador, pero se sabe que existe una correlación entre la alteración de la microbiota y múltiples patologías, como la enfermedad inflamatoria intestinal, el cáncer o la depresión (Gilbert *et al.*, 2018).

En un principio se creía que *E. coli* era una de las bacterias más abundantes del intestino, por su facilidad de ser cultivada (Lozupone *et al.*, 2012), pero estudios posteriores (Finegold *et al.*, 1983) revelaron que las bacterias más prevalentes y abundantes eran los *Bacteroides* y los cocci anaerobios. Otras bacterias con una alta prevalencia, si bien poco abundantes, son las de los géneros *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Escherichia*. Franks *et al.* (1998) revelaron que aproximadamente dos tercios de la microbiota intestinal se compone de *Bacteroides*, *Clostridium*, *Streptococcus/Lactococcus* y *Eubacterium rectale*.

La microbiota de los seres humanos es única para cada individuo y los factores que afectan su composición son diversos: genética (Goodrich *et al.* (2014)), dieta, ejercicio, estilo de vida... Una dieta estable sostenida en el tiempo determina en gran medida la composición de la microbiota intestinal, si bien los cambios repentinos en la dieta pueden inducir cambios drásticos en la microbiota de mucha gente (Gilbert *et al.*, 2018). Los antibióticos condicionan las comunidades bacterianas del hospedador y su administración durante la edad temprana puede causar alteraciones importantes en la microbiota intestinal que pueden conducir a padecer obesidad, asma y enfermedad inflamatoria intestinal (Trasande *et al.*, 2013; Gilbert *et al.*, 2018). El ejercicio físico reduce la inflamación y promueve cambios sutiles de la microbiota (Cook *et al.*, 2016). La interacción con animales de compañía en la edad temprana está asociada a un menor riesgo de asma y la interrupción temprana de esta interacción en poblaciones con un historial cultural de proximidad con estos animales aumenta el riesgo de atopía en estos individuos, especialmente de asma (Stein *et al.*, 2016). El estrés psicológico aumenta la permeabilidad intestinal, promoviendo cambios en las comunidades de *Bacteroidetes* y *Actinobacteria* y en la concentración de marcadores de inflamación (Karl *et al.*, 2017). Por último, la interacción social y el contacto físico homogenizan las microbiotas de quienes establecen dichas interacciones (Gilbert *et al.*, 2018).

La microbiota regula diversos mecanismos del organismo, como la lipogénesis y la oxidación de ácidos grasos, influyendo en el metabolismo energético y en el peso corporal (Gérard, 2016). Scher *et al.* (2013) revelaron el posible papel de *Prevotella copri* en la artritis reumatoide de nueva aparición, reduciendo las comunidades de *Bacteroides*. Kostic *et al.* (2013) observaron que *Fusobacterium* spp. está más presente en pacientes con adenoma colónico y que, en ratones, promueve la infiltración de células tumorales, que favorecen la progresión tumoral. En pacientes con aterosclerosis sintomática, las bacterias del género *Collinsella* se encontraban enriquecidas, frente a los controles, que mostraron mayor abundancia de *Roseburia* y *Eubacterium* (Karlsson *et al.*, 2012).

En síntesis, la microbiota del colon juega un papel importante en la salud humana y puede ser modulada a través de diversos factores como la dieta y el consumo de probióticos y prebióticos, que actúan sobre la composición bacteriana y su actividad metabólica.

## **1.2. Prebióticos: definición y tipos**

De acuerdo con la ISAPP, un prebiótico es un “sustrato que es utilizado selectivamente por los microorganismos del hospedador, confiriendo un beneficio para la salud” (Gibson *et al.*, 2017). Los prebióticos más comúnmente estudiados son la fibra soluble de inulina, los fructooligosacáridos (FOS), los galactooligosacáridos (GalOS) y, más recientemente, los oligosacáridos de la leche humana o HMOs.

No obstante, existe un creciente interés por la producción, evaluación y comercialización de nuevos prebióticos con potenciales efectos mejorados y propiedades adicionales. En este contexto, los oligosacáridos pécticos (POS), obtenidos por ruptura de la pectina, podrían ser una alternativa interesante, siendo el objeto de estudio de múltiples grupos de investigación en todo el mundo.

La pectina es un polisacárido complejo que representa un alto porcentaje de algunos subproductos agroindustriales, como la pulpa de manzana, la pulpa de la remolacha azucarera o de las cáscaras de los cítricos (Gullón *et al.*, 2013; Gamonpilas *et al.*, 2021). Estos subproductos pueden ser procesados para generar una variedad de fragmentos incluyendo oligogalacturónidos (OGalA), arabinogalactooligosacáridos (AraGalOS), arabinooligosacáridos (AraOS) y galactooligosacáridos (GalOS), que pueden presentar diversas propiedades biológicas y/o potencial prebiótico.

Cuando los prebióticos alcanzan el colon, son fermentados por la microbiota intestinal dando lugar a cambios en las poblaciones bacterianas y a la generación, principalmente, de ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato), siendo el butirato uno de los metabolitos más importante, entre otros motivos, por sus efectos antiinflamatorios (Andoh *et al.*, 1999).

A pesar de que los AraOS (obtenidos, principalmente, a partir de la pulpa de la remolacha azucarera) muestran un alto potencial bifidogénico (Al-Tamimi *et al.*, 2006) y resultan de interés, los oligogalacturónidos de bajo DP han demostrado tener interesantes propiedades biológicas y prebióticas.

### **1.3. La biomasa vegetal como materia prima para la obtención de prebióticos**

#### **1.3.1. Los materiales lignocelulósicos**

La biomasa lignocelulósica es la materia prima más abundante en la Tierra y está compuesta por lignina y polisacáridos como la celulosa y las hemicelulosas. En algunos materiales lignocelulósicos, como la madera de *Eucalyptus globulus*, abunda el xilano, un polisacárido hemicelulósico a partir del cual se pueden obtener xilooligosacáridos (XOS) mediante métodos enzimáticos, químicos o una combinación de ambos (Samanta *et al.*, 2015). Los XOS tienen propiedades prebióticas, antioxidantes y citoprotectoras y están recomendados como sustitutos del azúcar de mesa para pacientes con diabetes, pues no alteran la glucemia. Estos productos se pueden obtener a partir de materiales vegetales diversos, como la madera de haya (Remón *et al.*, 2019), la madera de abedul y el centeno (Falck *et al.*, 2013), favoreciendo la economía circular y la revalorización de la biomasa vegetal.

#### **1.3.2. Materiales ricos en pectinas**

Los oligosacáridos pécticos o pectooligosacáridos (POS) son un conjunto de oligómeros obtenibles por ruptura de las cadenas de pectina y que se han convertido en una interesante alternativa a los prebióticos más establecidos, siendo el objeto de estudio de numerosos grupos de investigación a nivel mundial.

Las pectinas son polisacáridos complejos formados por tres componentes estructurales principales: el homogalacturonano (HG), el ramnogalacturonano tipo I (RG-I) y el ramnogalacturonano tipo II (RG-II). El HG constituye el esqueleto principal de la pectina y está formado por monómeros de ácido D-galacturónico unidos por enlace  $\alpha$  (1-4). El RG-I es un polímero constituido por ramnosa y ácido galacturónico que tiene ramificaciones complejas formadas por cadenas de arabinogalactano I y II, galactano y arabinano. Por su parte, el RG-II es una cadena de ácido galacturónico que presenta ramificaciones complejas de hasta 12 tipos de azúcares minoritarios. La pectina representa en torno al 30% del peso seco de las células vegetales, en las que actúa como cementante en la pared celular. Para su uso comercial, la pectina se obtiene de la cáscara de cítricos, de la pulpa de la remolacha azucarera (Yapo *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2017), del bagazo de manzana (Kumar *et al.* (2010)) y de las pieles de otras frutas. Para la obtención de la pectina se utilizan normalmente procesos químicos que involucran el tratamiento con ácidos y que determinan las características del producto final.

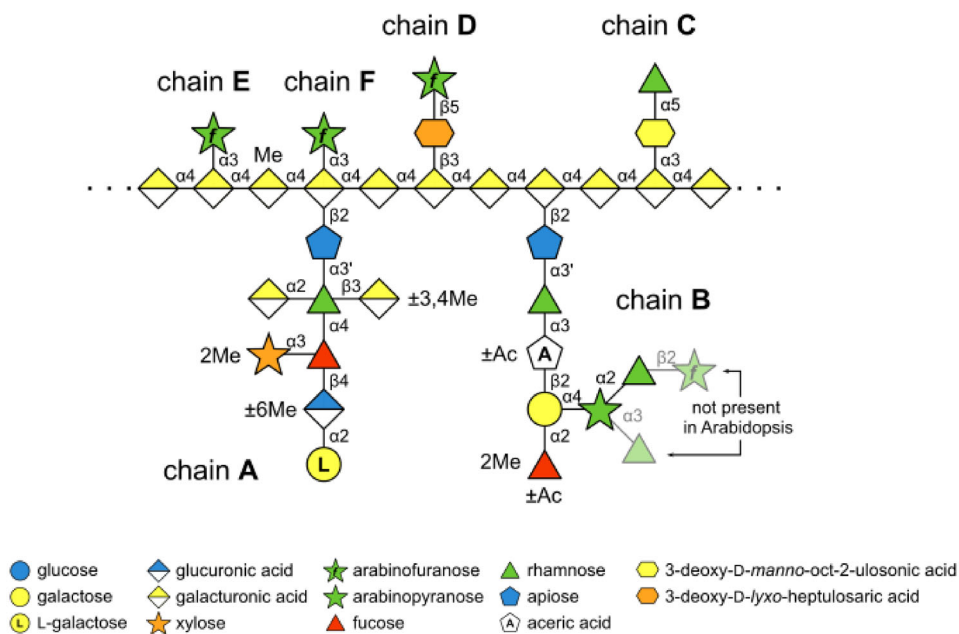


Figura 1. Esquema estructural del RG-II, extraído de Wikimedia Commons. Se observa el esqueleto central de GalA, presente también en el HG, con ramificaciones con rannosa, apiosa y otros azúcares.

### 1.3.3. La cáscara de limón: un subproducto agroindustrial rico en pectinas

El limón es un producto de uso habitual en la gastronomía de muchas culturas y su producción mundial aumenta anualmente, siendo Europa la principal productora mundial y España la líder en producción europea y en exportación mundial de limón. La producción industrial de zumo es el destino mayoritario del limón, en el cual se generan residuos tras la extracción y centrifugación del jugo que representan en torno al 50% del peso total del limón (González Molina *et al.*, 2010). La vía de producción de prebióticos, incorporables en alimentos funcionales, es una vía de revalorización de gran interés para la industria agroalimentaria y farmacéutica.

## 1.4. Métodos de producción de oligosacáridos

### 1.4.1. Métodos químicos

Dentro de los métodos químicos destacan aquellos que emplean la adición externa de ácidos (Manderson *et al.*, 2005; Coenen *et al.*, 2008) y los conocidos como tratamientos hidrotérmicos (Martínez *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2010).

Los tratamientos hidrotérmicos utilizan únicamente agua caliente altamente comprimida para degradar la pectina y obtener fragmentos de tamaño variable procedentes de sus componentes estructurales (HG, RG-I y RG-II). Son procesos que pueden superar los 200°C, en los que el catalizador de la reacción es el ion hidronio, generado de manera espontánea por la ionización del agua, aunque también por disociación de ácidos como el acético, liberado al medio a partir de grupos funcionales de los polisacáridos. El reactor presenta además un sistema de turbinas que asegura la agitación del medio y un sistema de refrigeración, que permite el enfriamiento

del reactor una vez alcanzada la temperatura deseada. Este procedimiento es respetuoso con el medio ambiente, pues los únicos reactivos son el material crudo y el agua. Además, permite obtener oligosacáridos con un alto rendimiento en menor tiempo que la hidrólisis enzimática (Martínez *et al.*, 2010).

#### **1.4.2. Métodos enzimáticos**

Los métodos enzimáticos utilizan hidrolasas y liasas para catalizar reacciones de hidrólisis y de  $\beta$ -eliminación, respectivamente, de las cadenas de pectina (Gullón *et al.*, 2013). Para romper la pectina se suelen utilizar preparados enzimáticos, que combinan distintas actividades como la celulasa y la poligalacturonasa, entre otras. Gómez *et al.* (2014) utilizaron endopoligalacturonasas y pectin liasas para el tratamiento de cáscaras de naranja. Los preparados comerciales de pectinasas suelen contener tres actividades enzimáticas: poligalacturonasa (PG), pectin esterasa (PE) y pectin liasa (PL) (Combo *et al.*, 2012). El tratamiento con endopoligalacturonasas del ácido poligalacturónico (PGA) previamente extraído permite obtener oligogalacturónidos de  $DP < 7$  (Coenen *et al.*, 2008; Combo *et al.*, 2012). Las condiciones de reacción en la hidrólisis enzimática son suaves y no requieren adición de ácidos. Además, la actividad de las enzimas es específica, por lo que se generan productos bastante puros y con rendimientos favorables (Gómez *et al.*, 2014).

Los métodos mencionados no son excluyentes y se pueden combinar en función de los objetivos perseguidos.

### **1.5. Propiedades biológicas de interés de los oligosacáridos**

#### **1.5.1. Efectos prebióticos de los POS.**

Estudios de fermentación *in vitro* muestran que los oligosacáridos pécticos son selectivamente consumidos por ciertos tipos bacterianos. Los RhaGalAOS son fermentados por *Bacteroides* spp. mientras que *Clostridium* spp. muestran baja afinidad por este tipo de oligómeros (Van Laere *et al.*, 2000). Los AraGalOS y AraOS son utilizados selectivamente por *Bifidobacterium*. La fermentabilidad de los POS viene determinada por sus características fisicoquímicas, como el grado de metilación (DM), el DP o el grado de esterificación (DE). Las bacterias *Bifidobacterium angulatum*, *B. infantis* y *Bifidobacterium adolescentis* utilizan, preferentemente, los POS de bajo DM (Olano-Martín *et al.* (2002)). Extractos de POS de DP 3-7 favorecen selectivamente el crecimiento de *Bifidobacterium*, mientras que no afectan al de *Bacteroides* y *Clostridium* (Mandalari *et al.*, 2007). *Bifidobacterium longum* y *Bacteroides vulgatus* utilizan selectivamente AraOS de  $DP > 3$  de una mezcla de composición heterogénea (Suzuki *et al.*, 2004). Onumpai *et al.* (2011) obtuvieron mezclas de OGalA de DP en rangos de 2-10 y de 4-23 y demostró que el OGalA metilado promovía el crecimiento de *Faecalibacterium prausnitzii*, una bacteria productora de butirato (Larsen *et al.*, 2019). El grado



de esterificación (DE) parece ser un factor limitante sobre el crecimiento celular y aumenta la digestibilidad de los POS en comparación con las pectinas (Olano-Martin *et al.*, 2002).

Los beneficios de los POS dependen de interacciones complejas entre bacterias, observándose mecanismos de sinergia, antagonismo y competitividad. Algunas bacterias capaces de metabolizar ciertos POS producen compuestos que benefician otras bacterias incapaces de utilizar los POS. Muchos estudios *in vivo* e *in vitro* se han dedicado a describir los patrones de fermentación y los efectos metabólicos de diversas pectinas y POS (Gullón *et al.*, 2009), siendo de gran utilidad el trabajo con inóculos fecales.

POS obtenidos de naranjas de Valencia fueron utilizados en los inóculos fecales humanos por bifidobacteria, aumentando su proliferación y su producción de acetato, butirato y propionato (Hotchkiss *et al.* (2007)). La utilización de un extracto de POS obtenido a partir de bagazo de manzana por parte de bacterias presentes en heces humanas resultó en un cambio en las poblaciones de los microorganismos, aumentando el crecimiento de *Bifidobacterium*, *Clostridium coccoides*, *Eubacterium rectale* y *Bacteroides-Prevotella* (Gullón *et al.*, 2011). Además, aumentó la producción de propionato, inhibidor de la síntesis hepática de colesterol (Amaral *et al.*, 1992) y regulador de la respuesta de insulina postprandial (Leclère *et al.*, 1994). En humanos, se sabe que la administración de POS a infantes en las fórmulas infantiles favorece el crecimiento de lactobacilli y bifidobacteria en el intestino (Fanaro *et al.*, 2005; Magne *et al.*, 2008). También demuestra beneficios la administración de mezclas de prebióticos a enfermos en fases tempranas de VIH-1, promoviendo el crecimiento de bifidobacteria y disminuyendo las poblaciones de patógenos como *Clostridium lituseburense* y *Clostridium histolyticum* (Gori *et al.*, 2011).

### **1.5.2. Otras propiedades biológicas de los POS**

Los POS presentan múltiples propiedades de interés biológico, que quedan recogidas en numerosos estudios. Las pectinas y POS proporcionan protección a las células del colon de la toxina Shiga secretada por la cepa patogénica *E. coli* O157:H7 (Olano-Martín, 2003). Además, estimulan la apoptosis de células de adenocarcinoma en el colon humano (Olano-Martin *et al.*, 2003). Los oligosacáridos ácidos obtenidos de fuentes naturales bloquean la adherencia de cepas patogénicas de *E. coli* sobre células uroepiteliales (Guggenbichler *et al.*, 1997). Li *et al.* (2010) obtuvieron POS a partir de la fruta del espino chino que, en ratones, disminuyeron los niveles de colesterol y de triglicéridos en sangre, activaron la superóxido dismutasa e inhibieron la síntesis y acumulación de malondialdehído, marcador de estrés oxidativo. En ensayos *in vivo*, los POS producen efectos sinérgicos junto con otros oligosacáridos no digeribles (FOS y GalOS), potenciando la inmunomodulación (Gullón *et al.*, 2013). Zhu *et al.* (2019) obtuvieron POS a partir del fruto de *Actinidia arguta* que mostraron *in vitro* un efecto inhibitorio de la

glicación, proceso no enzimático que altera la función de diversas biomoléculas. Yeung *et al.* (2021) obtuvieron, a partir de la pectina de oca, POS de bajo peso molecular con actividad antioxidante y antiinflamatoria mejorada con respecto a la pectina. Además, estos POS promovieron el crecimiento de *L. rhamnosus* y *B. longum* y la producción de SCFAs e inhibieron la producción de NO inducida por LPS y la expresión de los mRNAs de IL-1 $\beta$  e IL-6 mediante la regulación negativa de la vía de NF- $\kappa$ B.

La capacidad antioxidante es una de las propiedades más llamativas de los POS, que disminuye el estrés oxidativo implicado en el desarrollo de enfermedades de gran impacto clínico. Esta propiedad ha sido estudiada por varios grupos de investigación (Li *et al.* (2014); Chen *et al.* (2016); Ogutu y Mu (2017)), observando que la actividad antioxidante aumenta al degradar las pectinas (Chen *et al.*, 2016) y que es dosis-dependiente, incrementándose a medida que la concentración de POS aumenta (Hosseini-Abari *et al.* 2021). La presencia de grupos funcionales carboxilo, hidroxilo y metoxilo puede potenciar el efecto antioxidante de los compuestos fenólicos (Chen *et al.*, 2020), y la abundancia de ácido galacturónico podría ser central en la potencia de la capacidad antioxidante (Wang *et al.*, 2016).

Xue *et al.* (2021) demostraron que las mezclas de POS ricas en OGalA de DP 2-4 mostraban la mejor actividad antibacteriana, comparándolas con otras mezclas ricas en moléculas de mayor peso molecular. Finalmente, Rajulapati *et al.* (2021) demostraron que los ácidos di- y trigalacturónico (insaturados y metilados o no metilados) presentan una alta biocompatibilidad con células sanas de riñón humano (HEK293) y citotoxicidad contra células de cáncer de colon HT29, siendo el efecto anticancerígeno mayor en los OGalA y en mPOS frente a los POS no metilados.

De acuerdo con los resultados mencionados y para avanzar en el establecimiento de las interrelaciones estructura-función, se deberían obtener nuevas mezclas de oligogalacturónidos bien definidas y caracterizadas, empleando procesos de producción sostenibles y respetuosos con el medio ambiente. La reducción del DP supone una mejoría de muchas propiedades biológicas y prebióticas. Por otro lado, causan un aumento de solubilidad de los POS, haciéndolos aplicables a más alimentos funcionales, incluyendo los líquidos. Gamonpilas *et al.* (2021) demostraron que es necesario reducir el peso molecular de las pectinas para conseguir una mejora de sus propiedades, incluyendo aquí la solubilidad y las propiedades biológicas. Los tratamientos enzimáticos podrían ser una alternativa adecuada para alcanzar los objetivos planteados de reducir el grado de polimerización y mejorar las propiedades biológicas y de solubilidad.

## **2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**

### **2.1. Objetivos**

El objetivo general del trabajo fue el desarrollo de un proceso verde y sostenible destinado a la obtención de mezclas de oligogalacturónidos de bajo peso molecular usando cáscaras de limón como materia prima, así como la evaluación de algunas propiedades biológicas de interés de los productos obtenidos. Con este estudio se pretende, también, contribuir al desarrollo de la economía circular mediante el uso y valorización de un subproducto agroindustrial y a la obtención de nuevos ingredientes funcionales destinados a la salud humana.

Para alcanzar ese objetivo, se plantearon una serie de objetivos parciales, que se fueron abordando de manera secuencial:

- Estudio de la recuperación de los azúcares solubles presentes en la materia prima mediante el empleo de un sistema de extracción multietapa en flujo cruzado usando agua como disolvente.
- Estudio del procesamiento hidrotérmico del sólido libre de azúcares para la obtención de licores ricos en mezclas de oligosacáridos con amplio rango de tamaños moleculares.
- Estudio de la producción de oligogalacturónidos de bajo grado de polimerización mediante hidrólisis enzimática de los productos obtenidos empleando pectinasas (“DP tailoring”).
- Evaluación preliminar de propiedades biológicas de interés.

### **2.2. Plan de trabajo**

Para alcanzar los objetivos, se llevaron a cabo las tareas que se enumeran a continuación:

Tarea 1.- Preparación de un lote de la cáscara de limón y caracterización química,

Tarea 2.- Estudio del proceso de extracción de los azúcares libres mediante proceso de lixiviación en flujo cruzado de tres etapas.

Tarea 3.- Estudio del proceso de producción de mezclas de POS mediante tratamiento hidrotérmico en reactores de 0.6 y 3.75L.

Tarea 4.- Puesta a punto y determinación de la actividad poligalacturonasa de preparados comerciales.

Tarea 5.- Estudio de la hidrólisis enzimática de los productos (“DP tailoring”) para la obtención de oligogalacturónidos de bajo tamaño molecular.

Tarea 6.- Evaluación de la actividad antioxidante y antihiper glucémica de los productos obtenidos.

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. Materia prima**

Para realizar el trabajo se partió de un lote de limones *Primofiori*, de origen español, de 2ª categoría y calibre 58/67, que se cortaron por la mitad y se exprimieron manualmente intentando

simular el proceso industrial de producción de zumo de limón. Posteriormente, se molió la corteza con una trituradora doméstica obteniéndose un lote de sólidos lo suficientemente grande para llevar a cabo todo el plan experimental. En adelante, denominaremos RCL (residuo de cáscara de limón) a este sólido triturado.

### **3.2. Determinación de humedad**

La determinación de la humedad de los sólidos es un protocolo que ha de aplicarse en muchas fases del proyecto. Se fundamenta en cuantificar la pérdida de peso que se produce al someter una muestra del sólido a una temperatura suficientemente alta como para conseguir la evaporación de toda su agua. Tras pesar en un recipiente una cantidad de material sólido, normalmente 1 g, se deposita el recipiente en una estufa a  $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$  hasta peso constante (24-48 h, normalmente). Posteriormente, se enfría en un desecador con gel de sílice y se vuelve a pesar. La diferencia de peso se corresponde al agua perdida en el proceso de secado en la estufa. El cálculo de la humedad se realiza posteriormente aplicando la siguiente ecuación:

$$H = \frac{PRMH - PRMS}{PRMH - PRS}$$

donde PRMH es el peso del recipiente con el material húmedo inicial, PRMS, el del recipiente con el material seco y PRS, el del recipiente seco.

### **3.3. Determinación del contenido en cenizas**

La cáscara de limón contiene cenizas en cantidad variable que se determinan mediante incineración en un horno de mufla a  $575^{\circ}\text{C}$ , calcinándose la materia orgánica. En un crisol de peso seco conocido se introduce una cantidad de RCL de 1-5 g de humedad conocida. El crisol se lleva al horno de mufla a una temperatura de  $100\text{-}150^{\circ}\text{C}$  y se aumenta la temperatura hasta  $575^{\circ}\text{C}$  de manera gradual. Se mantiene el crisol en el horno hasta peso constante (4-6 h) y, posteriormente, se enfría en un desecador con gel de sílice, tras lo cual se pesa. El contenido en cenizas se calcula con la siguiente ecuación:

$$CC = \frac{PRC - PRS}{(PRMH - PRS) * (1 - H)} * 100$$

donde PRC es el peso en gramos del recipiente seco con cenizas, PRS es el peso en gramos del recipiente seco, PRMH es el peso en gramos del recipiente seco con la muestra húmeda inicial y H es la humedad de la muestra. El ensayo se realiza por duplicado.

### **3.4. Determinación de contenido en extractos en etanol del RCL**

Para la determinación de su contenido en extractos, se tomó una alícuota de RCL y se sometió a secado total para, posteriormente, moler la muestra hasta un tamaño de partícula inferior a 0.5 mm. Al sólido molido resultante (aproximadamente 2,5 g), se le realizó, finalmente, una extracción en Soxhlet durante 12-24h usando 100 mL de etanol al 80% de calidad P.A.

Transcurrido el tiempo de extracción, se recuperó el sólido y se dejó a secar para eliminar el etanol residual. Por otro lado, la mezcla del balón, que contiene extractos y disolvente, se sometió a evaporación en un rotavapor con el fin de acabar de secar por completo los extractos. Finalmente, se enfrió el balón en un desecador y se pesó, para conocer así el porcentaje de extractos solubles en etanol del RCL.

### **3.5. Extracción acuosa del RCL en 3 etapas**

La primera fase del procesamiento del RCL consistió en la extracción multietapa de los azúcares libres empleando agua como agente extractor. Dicha etapa (también denominada extracción sólido-líquido o lixiviación) se llevó a cabo sobre el RCL con dos objetivos: i) recuperar los azúcares libres presentes en la cáscara con el fin de que puedan ser empleados como sustratos en otros procesos químicos y/o biotecnológicos; y ii) evitar su descomposición durante el tratamiento hidrotérmico con la consiguiente generación de impurezas. En un tanque de vidrio de capacidad 8 L, se mezclaron una masa definida de RCL (3,3 kg) y agua destilada, calculada para alcanzar una relación líquido-sólido (RLS) de 10 kg de agua/kg de sólido seco. A continuación, se arrancó el agitador y el tanque se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante un tiempo prefijado. Al final de esta primera etapa de extracción, se separó el sólido del líquido almacenándose esta última en congelador con el fin de usarla futuros trabajos de investigación, ya fuera del alcance de este TFM. Por su parte, la fracción sólida residual se prensó con el fin de recuperar la mayor cantidad de extractos retenidos en su interior. Las dos siguientes etapas de la extracción se realizaron fijando una RLS de 20 g/g, manteniendo la agitación durante un mínimo de 15 minutos. El acoplamiento de estas dos etapas adicionales garantiza un lavado y eliminación efectiva de la mayor parte de los azúcares presentes en la materia prima. En adelante, denominaremos como STH a los sólidos exentos de azúcares libres resultantes de este proceso de extracción multietapa.

### **3.6. Hidrólisis ácida cuantitativa (HAC)**

La HAC sirve para caracterizar sólidos de origen vegetal y, en este caso, se aplicó a los sólidos procedentes de la extracción acuosa (STH), a los sólidos remanentes de la extracción en Soxhlet y a la materia prima original (RCL). Para aplicar este protocolo, primero se secó el sólido en una estufa hasta alcanzar una humedad inferior al 20% y posteriormente se molió hasta un tamaño de partícula inferior a 0,5 mm.

El método de la hidrólisis ácida se compone de dos etapas. En una primera etapa, se trata la muestra con  $H_2SO_4$  al 72 %, rompiéndose los polisacáridos a oligómeros. Para ello, se incubaba la muestra con el ácido concentrado durante 1 h a 30°C y con agitación periódica. En la segunda etapa, se disminuye la concentración del  $H_2SO_4$  a 4% por adición de agua y se lleva la suspensión a un autoclave durante 1 h a 2 atm, consiguiéndose así romper los oligómeros a

monómeros. El líquido resultante de esta segunda etapa se neutraliza y se filtra, y a continuación se analiza mediante cromatografía líquida de alta eficacia (C.L.A.E.) para determinar su concentración en azúcares (glucosa, xilosa y arabinosa), ácido acético y opcionalmente furfural (F) y 5-hidroximetilfurfural (HMF). A partir de la concentración de monómeros al final del tratamiento se puede determinar la cantidad y perfil de polisacáridos presentes en la muestra inicial.

### **3.7. Determinación de ácidos urónicos**

Los ácidos urónicos son componentes de las hemicelulosas y de las pectinas que son altamente resistentes a la hidrólisis en medio ácido y no se liberan durante la HAC, de manera que, para su determinación, se utilizó el conocido como método espectrofotométrico de Blumenkrantz (Blumenkrantz y Asboe-Hansen, 1973).

Para ello, se partió de una muestra procedente de la segunda etapa de la HAC, que se diluyó en agua destilada hasta una relación 1:15. A continuación, se mezclaron, en baño de hielo, 0,5 mL de dicha disolución con 3 mL de disolución de tetraborato sódico (12,5 mM en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Posteriormente, se homogeneizaron las muestras y se hirvieron durante 10 min. Luego se dejaron enfriar y se les añadieron 0,1 mL de m-fenilfenol (0,15% en NaOH 0,5 % p/p). Para continuar, se preparó un blanco al que se le añadieron 0,1 mL de NaOH al 0,5% p/p, en vez de m-fenilfenol. Una vez preparado el blanco, se incubaron todas las muestras en oscuridad durante 30 min y se les midió su absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 520 nm.

Con la ayuda de rectas de calibrado realizadas a partir de muestras de ácido galacturónico se determinó la concentración de ácidos urónicos (ácido galacturónico y ácido glucurónico) en las muestras, expresándolas como equivalentes de ácido galacturónico, por ser este el más abundante en las cáscaras de limón.

### **3.8. Tratamiento hidrotérmico de los STH**

Con el objetivo de obtener mezclas de oligosacáridos a partir de los STH, se sometieron muestras de los mismos a tratamiento hidrotérmico, empleando para ello reactores presurizados Parr de acero inoxidable de 0,6 L y 3,75 L con agitación por turbina a 150 rpm y distintas relaciones líquido-sólido (RLS) y temperaturas máximas (T<sub>máx</sub>), de acuerdo con el plan experimental preestablecido (ver Resultados y Discusión). Para cada experimento, se introdujo la mezcla reaccionante previamente calculada, se cerró el reactor y se sometió a calentamiento hasta alcanzar la temperatura máxima deseada (en el intervalo 145-165°C). Una vez alcanzada la temperatura, se comenzó la fase de refrigeración y, tras el enfriamiento, se abrió el reactor y se recuperaron las fases líquida y sólida para su posterior cuantificación y análisis. Con el fin de poder comparar los resultados de tratamientos con distintas condiciones de reacción, los

efectos combinados del tiempo de tratamiento y de la  $T_{\text{máx}}$  en procesos no isoterms se midieron mediante el cálculo del factor  $R_0$ , o severidad cuya expresión es:

$$R_0 = \int_0^t e^{[T(t)-T_{ref}/w]} dt$$

donde  $t$  se refiere al tiempo que transcurre hasta alcanzar la temperatura deseada,  $T(t)$ ,  $T_{ref}$  es la temperatura de referencia (100°C), y  $w$  es un parámetro determinado empíricamente relacionado con la energía de activación de la reacción y su valor es, normalmente, 14,75.

A la fase líquida resultante de este proceso se le denomina “licores de tratamiento hidrotérmico” y contiene productos de fragmentación de pectinas y otros polisacáridos (básicamente oligosacáridos de tamaño molecular variable y monosacáridos) además de productos de descomposición de azúcares y compuestos derivados de otras fracciones (proteína, sales, fenoles, etc.).

### **3.9. Posthidrólisis ácida de los licores**

Las técnicas cromatográficas empleadas para cuantificar monosacáridos como xilosa, galactosa, glucosa o arabinosa en licores no permiten determinar el contenido en oligosacáridos. Para ello, estas cadenas han de ser reducidas a monómeros mediante el empleo de lo que se conoce como posthidrólisis ácida.

Para aplicar este método, se deposita, en un frasco, un volumen de  $H_2SO_4$  cercano a 0,3 g y se añade licor hasta que la concentración de ácido disminuye al 4%. A continuación, los frascos preparados se pesan y se llevan a un autoclave donde se tratan a 2 atm durante 20 min. Tras dejarlos enfriar en un baño de agua fría, se pesan de nuevo para calcular las pérdidas en el proceso, se filtra su contenido y el líquido clarificado se analiza por C.L.A.E. La comparación entre la muestra analizada por pinchazo directo en el cromatógrafo y la muestra analizada después de la posthidrólisis ácida nos informa del aumento en la concentración de monómeros como glucosa, xilosa y arabinosa, que procederá de los oligosacáridos presentes en la muestra original.

### **3.10. Posthidrólisis enzimática de licores**

Este protocolo de análisis se aplica para caracterizar químicamente aquellos componentes presentes en los licores que son resistentes a la hidrólisis en medio ácido y que, por tanto, no pueden ser determinados mediante la posthidrólisis ácida.

Para llevar a cabo la posthidrólisis enzimática, se depositaron, en matraces Erlenmeyer, 12 g de licor y se añadieron 0,123 mL de preparado enzimático Viscozyme, 0,307 mL de Celluclast, 0,307 mL de tampón acetato de sodio 0,05M y unas perlas de Timol (bactericida que impide la proliferación de microorganismos en el licor). A continuación, se dejaron los matraces en agitación a 37°C durante 44 h y, pasado este tiempo, se incubaron durante 5 min a 100°C con

el objetivo de parar la reacción. A continuación, se centrifugó su contenido a 4000 rpm durante 10 min y, tras la centrifugación, se filtró la fase líquida para su posterior análisis por C.L.A.E.

### **3.11. Determinación de contenido seco de muestras líquidas**

El contenido seco se define como la relación entre la masa de residuo sólido seco presente en una muestra de licor y la propia masa del licor. Este valor se obtiene secando hasta peso constante en una estufa, una muestra de fase líquida o de licor de tratamiento hidrotérmico. El procedimiento consiste en pesar entre 1 y 5 g de licor en un recipiente seco de peso conocido. A continuación, se coloca el recipiente con el licor en la estufa de 105°C hasta alcanzar un peso constante (normalmente 24-72 h). Pasado este tiempo, se enfría el recipiente en un desecador con gel de sílice y se pesa. A partir de los datos obtenidos, se calcula el contenido seco usando la siguiente ecuación:

$$CS = \frac{PRMS - PRS}{PRMH - PRS}$$

donde PRMS es el peso del recipiente con la muestra seca, PRS es el peso del recipiente seco y PRMH es el peso del recipiente con la muestra de licor.

### **3.12. Determinación de azúcares reductores mediante el método de DNS**

Para este método se necesita preparar una disolución de DNS compuesta por agua (500 g), disolución de NaOH 2N (200 g), tartrato de potasio tetrahidratado (300 g) y ácido dinitrosalicílico (10 g). Primero se disuelve el tartrato potásico con ayuda de un imán y luego se va añadiendo el DNS.

Este método se utiliza para la determinación de la presencia del grupo carbonilo libre (C=O) en los azúcares reductores de una muestra. La sucesión de reacciones que permiten la detección de estos grupos funcionales es la siguiente: i) oxidación del grupo aldehído a carboxilo, ii) reducción del ácido 3, 5-dinitrosalicílico (DNS) a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico. Para la correcta interpretación de los resultados han de realizarse los blancos necesarios por la relativa baja especificidad de la reacción.

Se deposita 1 mL de muestra en cada tubo de ensayo y se añade 1 mL de DNS. Se tapan los tubos de ensayo con papel de aluminio para evitar la evaporación y se hierven durante 10 min. Se enfrían los tubos en un baño de agua fría y se mide la absorbancia de cada muestra en un espectrofotómetro a longitud de onda de 575 nm.

### **3.13. Determinación de actividades enzimáticas de dos preparados enzimáticos comerciales**

Para la obtención de oligosacáridos de bajo DP se usaron dos preparados enzimáticos de la casa comercial Novozymes: Viscozyme y Pectinex Ultra SP-L. Los ensayos de determinación de



actividad enzimática tienen como propósito cuantificar la actividad poligalacturonasa, arabinanasa y arabinogalactanasa en los preparados.

En primer lugar, se elaboraron rectas de calibrado con disoluciones de ácido D-galacturónico, arabinosa y galactosa a concentraciones en el intervalo 0,2-2,8 g/L en tampón acetato sódico 0,05 M ( $T_{AcNa0,05M}$ ). Las muestras patrón se elaboraron con 0,8 mL de las disoluciones y 0,2 mL de  $T_{AcNa0,05M}$ . A continuación, se les añadió 1 mL de disolución de DNS, se homogeneizaron y se hirvieron durante 10 min en un baño de agua a 100°C. Pasado este tiempo se retiraron las muestras, se dejaron enfriar en un baño frío y se les añadieron 10 mL de agua destilada. Luego se homogeneizaron y se midió su absorbancia a 575 nm de longitud de onda. Para finalizar, se representaron las absorbancias frente a la concentración de las muestras obteniéndose así las rectas de calibrado.

Para continuar, se prepararon disoluciones de ácido poligalacturónico (PG), arabinano (AR) y arabinogalactano (ARG) al 0,5% p/v en  $T_{AcNa0,05M}$  (pH = 5) y distintas diluciones de los preparados enzimáticos. Luego, a 0,8 mL de las disoluciones de sustrato se les añadieron 0,2 mL de las diluciones de preparado enzimático, se dejaron reaccionar a  $T=37^{\circ}C$  durante 20 min y se les realizó el ensayo de DNS según lo descrito en el párrafo anterior. Las absorbancias obtenidas esta vez deben procesarse teniendo en cuenta los valores de absorbancia propios de los preparados enzimáticos y de los sustratos utilizados y los valores definitivos se interpolan en las rectas patrón para determinar las actividades enzimáticas de las diluciones de los preparados utilizados. Por último, se representan las actividades enzimáticas frente al grado de dilución del preparado y las gráficas elaboradas permiten determinar la actividad enzimática.

### **3.14. Determinación de propiedades biológicas:**

#### **➤ Capacidad Antioxidante**

Para determinar la capacidad antioxidante de las muestras se utilizó la metodología empleada por Gullón *et al.* (2017). Los métodos enumerados a continuación son todos espectrofotométricos y se llevan a cabo en oscuridad.

1. Método del DPPH ( $\alpha$ ,  $\alpha$ -Diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl Radical Scavenging): de acuerdo con este método, el radical estable DPPH es reducido por los compuestos antioxidantes de las muestras problema. Los detalles de este método pueden verse en el artículo de Gadow *et al.* (1997).
2. Método del ABTS: se basa en la capacidad de los antioxidantes para eliminar el radical ABTS. Se utilizó el método de Re *et al.*, (1999)
3. Método del FRAP (Poder antioxidante o de reducción del hierro): este método se basa en la capacidad de la muestra para reducir el complejo  $Fe^{3+}$ -TPTZ a  $Fe^{2+}$ -TPTZ y el protocolo detallado fue publicado por Benzie e Strain (Benzie y Strain, 1996).

### ➤ **Capacidad Antihiperглиcémica**

Para determinar la capacidad antihiperглиcémica se utilizaron dos métodos distintos: ensayo de inhibición de  $\alpha$ -amilasa (Laoufi *et al.* (2017)) y de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa (Ferreira-Santos *et al.* (2020)). Para ello, se hicieron distintas diluciones de las muestras problema, determinando el porcentaje de inhibición para cada concentración. Esto permite elaborar una gráfica a partir de la cual se calcula la concentración de muestra que produce un 50% de inhibición ( $IC_{50}$ ).

### **3.15. Determinación del TPC**

El contenido total de fenoles (TPC) de las mezclas de oligogalacturónidos se determinó con el método de Folin-Ciocalteu (Singleton y Rossi, 1965). El TPC se expresa en equivalentes de ácido gálico e informan acerca del contenido en fenoles del producto, grupos funcionales con propiedades redox responsables en parte de la actividad antioxidante.

### **3.16. Hidrólisis Enzimática de licores**

Los licores procedentes del tratamiento hidrotérmico en condiciones óptimas fueron sometidos a tratamientos enzimáticos con distintas cargas enzimáticas de los dos preparados enzimáticos por separado. Se tomaron muestras a distintos tiempos y se caracterizaron para determinar las condiciones óptimas de la hidrólisis enzimática.

En este procedimiento se utilizan matraces Erlenmeyer en los que se deposita el volumen calculado de licor, de tampón acetato de sodio 2M ( $T_{AcNa2M}$ ) y del preparado enzimático, obteniendo un volumen final de 50 mL. Basándonos en las pruebas experimentales de determinación de actividades enzimáticas realizadas, se establece la relación enzima-sustrato para alcanzar las cargas enzimáticas deseadas, o sea, la cantidad de enzima por gramo de licor que debe haber en el medio de reacción. Para calcular el volumen de licor empleado, se ha de tener en cuenta el volumen total de muestra que va a ser retirado en el experimento, el cual no debe superar un 10% del volumen total inicial de licor, ya que esto alteraría la carga enzimática y las condiciones experimentales iniciales. Se calcula el volumen de tampón que hay que añadir para alcanzar una concentración de 0,05M en el medio de reacción, partiendo de  $T_{AcNa2M}$ . Para cada experimento se prepara un control, en el que se sustituye el volumen de licor por volumen de agua, manteniendo constantes las proporciones entre licor (agua en este caso), tampón y preparado enzimático. Una vez preparado el contenido de los matraces, estos se cierran con un tapón y se llevan al agitador, donde permanecerán durante el tiempo total del experimento a una temperatura de 37°C y agitación de 150 rpm. Las muestras tomadas a distintos tiempos son analizadas mediante los procedimientos de PHA, PHE, CS y Determinación de azúcares reductores mediante el método de DNS.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Composición química de la materia prima

La primera fase de este trabajo fue la preparación de un lote de cáscaras de limón y su caracterización química detallada.

Para ello se adquirió, en el comercio local, una partida de 20 kg de limones *Primofiori* que se cortaron a la mitad y se exprimieron manualmente, generando así una masa de cáscaras de limón que finalmente se trituraron con una picadora doméstica.

Una vez obtenido el producto triturado (en adelante, residuo de cáscara de limón o RCL), se sometió a etapa de extracción en Soxhlet con el fin de determinar su contenido en extractos y la composición de estos y de la fracción insoluble. La Tabla 1 muestra la composición del RCL. Como se puede ver, las cáscaras de limón contienen un 27,8% de extractos solubles en etanol al 80%, de los cuales el 40,2% es glucosa y el 15,84% es fructosa, encontrándose, además, pequeñas cantidades de arabinosa y sacarosa.

Por su parte, la fracción insoluble (FIA) está formada fundamentalmente por galacturonano, galactano y arabinano y glucano, siendo los tres primeros, los principales componentes de la pectina y el último, la fracción de polisacáridos constituida principalmente por la celulosa de la pared celular.

Componente	Contenido (g/100 g RCL)
Cenizas	4,87 ± 0,06
Extractos* (E)	27,84 ± 3,17
Fracción insoluble en alcohol* (FIA)	72,16 ± 3,17
Composición de los extractos	
Contenido (g/100 g E)	
Sacarosa	1,21 ± 0,07
Glucosa	40,20 ± 0,55
Galactosa	0,42 ± 0,00
Arabinosa	3,44 ± 3,72
Fructosa	15,84 ± 0,66
Composición de la FIA	
Contenido (g/100 g FIA)	
Galacturonano	28,36 ± 0,77
Glucano	21,19 ± 0,72
Galactano	13,85 ± 0,49
Arabinano	9,17 ± 0,31
Grupos acetilo	1,39 ± 0,04
Residuo insoluble en ácido	2,70 ± 0,29

Tabla 1. Composición de la materia prima. \* Etanol 80% \*Polisacáridos (glucano, galacturonano, galactano, arabinano y grupos acetilo) están expresados como equivalentes en monómeros.

### 4.2. Extracción acuosa de los azúcares libres

La Figura 2 muestra el esquema del proceso desarrollado en este trabajo. Como se puede ver, se comienza con la extracción de los azúcares libres presentes en la materia prima. El objetivo de la extracción de los azúcares es triple: i) se evita su degradación durante el procesamiento

hidrotérmico posterior, minimizando así la generación de impurezas en los licores, ii) se obtienen mezclas ricas en azúcares que pueden emplearse posteriormente como sustratos en la producción de distintos productos, sea por vía fermentativa o sea por vía química y, iii) se consigue un mejor aprovechamiento de las fracciones que componen la materia prima.

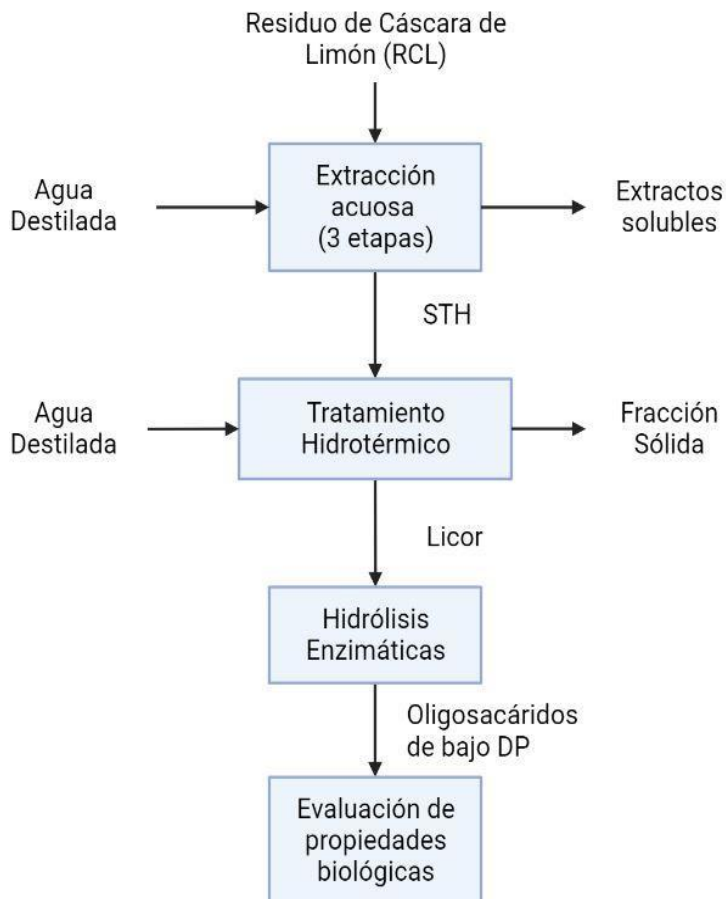


Figura 2. Diagrama de proceso propuesto para la obtención de oligosacáridos con bajo DP a partir del RCL.

Siguiendo el esquema de la Figura 2, la primera parte del trabajo fue la puesta a punto de un proceso de extracción multietapa en flujo cruzado. En los primeros experimentos se llevó a cabo la extracción a temperatura ambiente (aprox. 18°C) usando un sistema agitado mecánicamente y empleando una relación líquido-sólido de 10 g/g RCL seco, siendo ésta la mínima relación que permitía mantener un medio perfectamente mezclado y, a la vez, obtener unas disoluciones de azúcares lo más concentradas posible. Para cada una de las etapas se tomaron muestras de la fase líquida a distintos tiempos y se analizaron mediante C.L.A.E. La Figura 3 muestra la evolución con el tiempo del contenido en sacarosa, glucosa y fructosa a lo largo de cada una de las tres etapas. Como se puede ver en la Figura 3.1, se obtuvieron unos licores con un contenido máximo en azúcares totales (glc+fru+sac) de 20 g/L en un periodo muy corto de tiempo (30 min), si bien desde un tiempo de 5-10 min la concentración apenas varía, lo que indica una cinética de proceso muy favorable, que podría deberse a una buena agitación del medio y al reducido tamaño de partícula empleado. Por todo esto, en principio, no

resultaría interesante, desde un punto de vista económico, llevar a cabo la extracción a temperaturas superiores.

A pesar de los resultados obtenidos, por la propia naturaleza de este tipo de operaciones de extracción sólido-líquido, todavía quedarían restos de azúcares en la fase sólida. Por ello, se llevaron a cabo 2 nuevas etapas empleando la misma carga de disolvente (agua destilada) que en la primera etapa. La Figura 3.2 muestran la evolución del contenido de los azúcares en estas dos etapas. Como era de esperar, las concentraciones de azúcares bajan significativamente (de 6 g/L en la etapa 2 y <2 g/L en la etapa 3), siendo indetectable la concentración de sacarosa en el medio. Finalmente, para eliminar trazas se aplicó una última etapa de lavado final a una RLS de 20 g/g, obteniéndose así un sólido exento de azúcares libres que se empleó como materia prima en la etapa de procesamiento hidrotérmico (sólido para tratamiento hidrotérmico, STH), cuya composición se muestra en la Tabla 2.

Asumiendo que el máximo de concentración de azúcares se alcanza en el minuto 30, se fijó este tiempo como tiempo de operación para el resto del trabajo.

Asimismo, dado que las concentraciones de azúcares en las fases líquidas de las etapas 2 y 3 resultaron ser muy bajas (y por tanto serían corrientes muy poco aprovechables), para preparar un lote de cáscara extraída para la siguiente etapa de tratamiento hidrotérmico, dichas etapas de extracción se realizaron finalmente empleando una RLS=20 g/g, con el fin de garantizar una eliminación total de los azúcares del RCL.

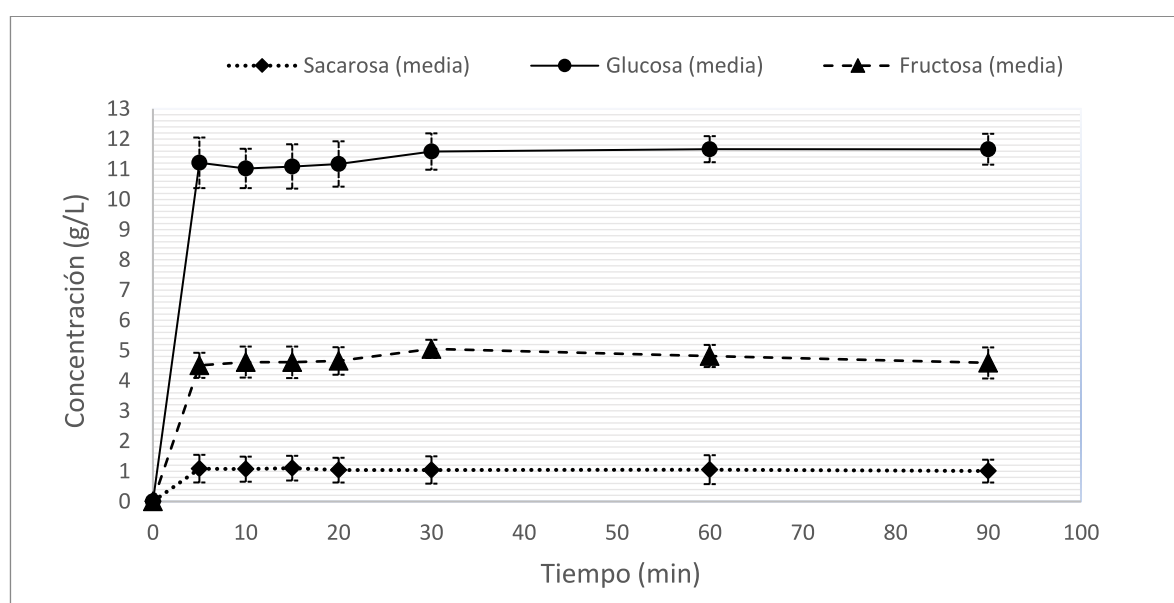


Figura 3.1. Concentración de sacarosa, glucosa y fructosa en función del tiempo durante la primera etapa de la extracción a temperatura ambiente RLS = 10 g/g (los puntos se corresponden a los promedios de los resultados de las tres réplicas del experimento).

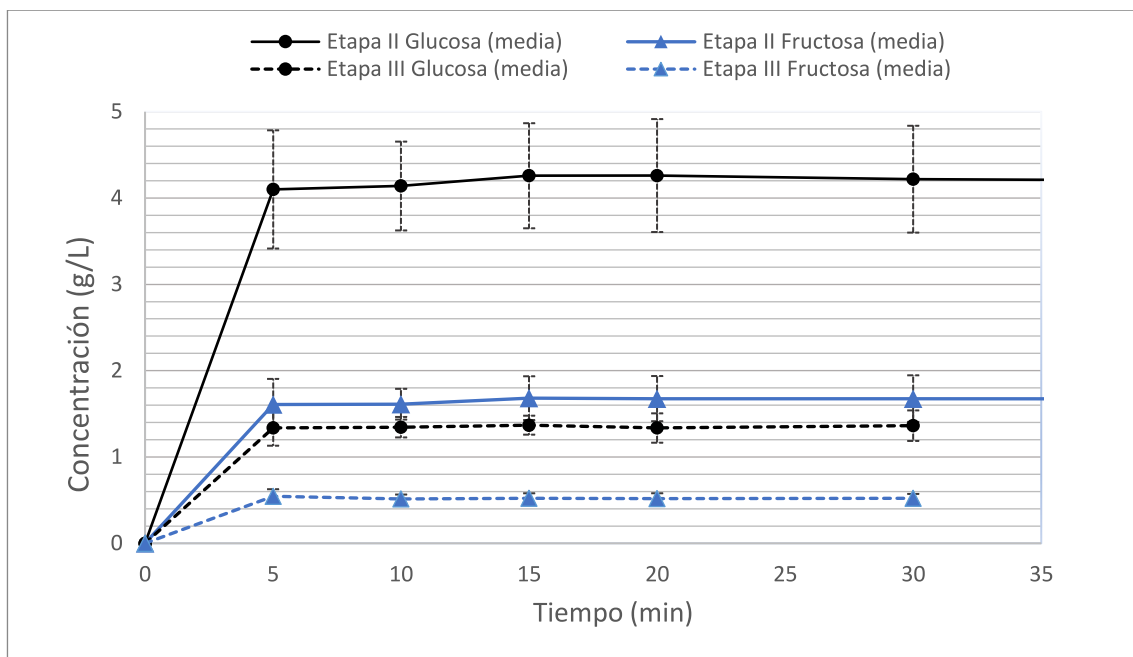


Figura 3.2. Concentración de sacarosa, glucosa y fructosa en función del tiempo en la segunda y tercera etapa de la extracción a temperatura ambiente y RLS = 10 g/g (los puntos se corresponden a los promedios de los resultados de las tres réplicas del experimento).

#### 4.3. Procesamiento hidrotérmico de las cáscaras extraídas (STH)

Antes de comenzar con el estudio de los efectos del tratamiento hidrotérmico, el STH se caracterizó químicamente obteniéndose los resultados mostrados en la Tabla 2.

Compuesto	Contenido (g/100 g STH seco; media $\pm$ SD)
Galacturonano	27,55 $\pm$ 1,15
Glucano	24,47 $\pm$ 0,49
Galactano	13,82 $\pm$ 0,17
Ramnosa	10,43 $\pm$ 0,18
Arabinano	2,40 $\pm$ 0,17
Grupos Acetilo	1,87 $\pm$ 0,17

Tabla 2. Contenido en polisacáridos y grupos acetilo del STH (expresados como equivalentes en monómeros).

Como se puede ver, la composición del STH es muy similar a la que se observa para la fracción insoluble en alcohol del RCL, siendo el galacturonano el principal componente del STH, con un contenido de 27,55  $\pm$  1,15 g/g STH seco frente a 28,36  $\pm$  0,77 g/g, encontrado en la FIA.

A continuación, y con el objetivo de obtener licores ricos en oligosacáridos, se sometieron muestras del sólido libre de azúcares (STH) a una etapa de tratamiento hidrotérmico en régimen no isoterma hasta temperaturas máximas en el intervalo 145-165°C y RLS=12 g/g, condiciones seleccionadas en base a estudios previos. La Tabla 3 muestra la composición de los licores obtenidos en este primer conjunto de experimentos.

Como se puede comprobar, a medida que se aumentó la severidad del tratamiento, aumentó también el contenido en solutos no volátiles en los licores (CNV), como consecuencia del incremento en la solubilización de las distintas componentes de la materia prima.

Simultáneamente, se observa también una mayor generación de monosacáridos como resultado de un mayor grado de hidrólisis de los fragmentos inicialmente solubilizados. A pesar de ello, el contenido en monosacáridos totales fue relativamente bajo variando entre 0,92 y 2,23 g/L.

T <sub>máx</sub> (°C)	145	150	155	160	165
Factor de severidad (R <sub>0</sub> )	2,24	2,40	2,53	2,65	2,75
Monómeros (g/L)					
Ácido galacturónico	0,05	0,07	0,17	0,18	0,22
Glucosa	0,29	0,27	0,33	0,34	0,34
Galactosa	0,07	0,08	0,13	0,16	0,21
Ramnosa	0,18	0,18	0,22	0,26	0,30
Arabinosa	0,38	0,43	0,68	0,96	1,22
Ácido acético	0,04	0,03	0,04	0,04	0,04
Oligómeros* (g/L)					
OGalA	24,06	23,98	24,44	23,72	22,25
GOS	0,83	1,16	1,16	1,19	1,35
GalOS+XOS	3,61	5,14	4,37	4,51	4,78
RamnOS	0,77	1,22	1,01	1,07	1,16
AraOS	8,47	9,67	8,50	8,31	8,09
Grupos acetilo	0,40	0,83	0,53	0,60	0,69
CNV** (g/g Licor)	0,045	0,046	0,048	0,048	0,048
INV*** (% b.s.)	13,61	7,11	12,54	14,49	16,10

Tabla 3. Composición de los licores obtenidos a RLS=12 g/g y diferentes severidades; \*Cadenas con amplio intervalo de grado de polimerización, incluidos polímeros; \*\* CNV: compuestos no volátiles; \*\*\* INV: Impurezas no volátiles

También se pudo observar que el máximo de concentración de OGalA (24,44 g/L) se alcanzó cuando se trató la muestra a T<sub>máx</sub>=155°C, siendo este un valor ligeramente superior al obtenido anteriormente por Gómez *et al.* (2013). Hay que indicar también que a esa temperatura se consiguió la mayor ratio OGalA/AraOS (2,87 g/g) en los licores, un hecho importante dado que el objetivo del trabajo es obtener un producto lo más enriquecido posible en oligogalacturonidos. Asimismo, a esa temperatura, los licores presentaron un contenido en compuestos no volátiles de 0,048 g/g licor y un nivel de impurezas no volátiles de 12,5% (significativamente inferior al 18% publicado anteriormente por Gómez *et al.*, 2013). Bajo estas condiciones, se alcanzaron valores de conversión de galacturonano en OGalA y de arabinano en AraOS (calculados asumiendo la recuperación total de la fracción líquida) cercanos al 100%. Sin embargo, como era de esperar, la solubilización del glucano fue inferior al 7%. Este comportamiento es habitual en este tipo de tratamientos; como se dijo, el glucano está formado principalmente por la celulosa de la pared celular vegetal y es altamente resistente al tratamiento hidrotérmico, observándose porcentajes de solubilización inferiores a 10% en estudios con pulpa de remolacha (Martínez *et al.*, 2009), madera de pino (González Muñoz, Santos y Parajó, 2011) o eucalipto (Garrote *et al.*, 2007), mientras que la pectina, que es menos resistente, permite alcanzar valores mucho más altos de solubilización de galacturonano y arabinano.

En términos porcentuales (expresado como g producto/100 g residuo seco) el producto obtenido a  $T_{\text{máx}}=155^{\circ}\text{C}$  presentó la siguiente composición: oligogalacturónidos, 51,5%; arabinooligosacáridos, 17,9%, GalOS, 9,2% y monosacáridos, 4%.

A continuación, con el objetivo de incrementar la concentración de productos en los licores y con ello reducir costes de procesado (concentración y deshidratación) de los mismos, se llevaron a cabo nuevos experimentos a la misma temperatura ( $T_{\text{máx}}=155^{\circ}\text{C}$ ) pero a una relación líquido-sólido=10 g/g, el mínimo valor que permite mantener un buen grado de mezcla dentro del reactor con este tipo de materias primas. La Tabla 4 muestra la composición de los licores obtenidos. Como se puede deducir de los datos de la tabla, una reducción en la RLS (comparando la primera y segunda columna) permitió incrementar la concentración de oligómeros en un valor que va desde 15% en AraOS hasta un 21% en OGalA, lo que indica que los porcentajes de conversión apenas se vieron afectadas por la RLS.

Cabe también indicar que el contenido en impurezas no volátiles (expresadas como porcentaje sobre residuo seco) fue similar en ambos experimentos (11,37 a RLS=12 g/g y 10,21 a RLS=10 g/g), indicando que un aumento de la concentración inicial de cáscara de limón no se traduce en una mayor generación de impurezas.

Posteriormente, para estudiar el escalado del proceso, se llevaron a cabo experimentos en un reactor de 1 gal (3,75L) de capacidad operando a una severidad equivalente y con la misma RLS=10g/g.

Sin embargo, se pudo comprobar que no es factible llevar a cabo el proceso en este reactor con una RLS tan reducida. La razón es que el sistema de agitación no asegura un movimiento adecuado de la masa reaccionante observándose que parte de la misma se mantiene depositada en el fondo del vaso sufriendo sobrecalentamiento por contacto con la pared del reactor que provoca una aceleración en la generación de productos de descomposición.

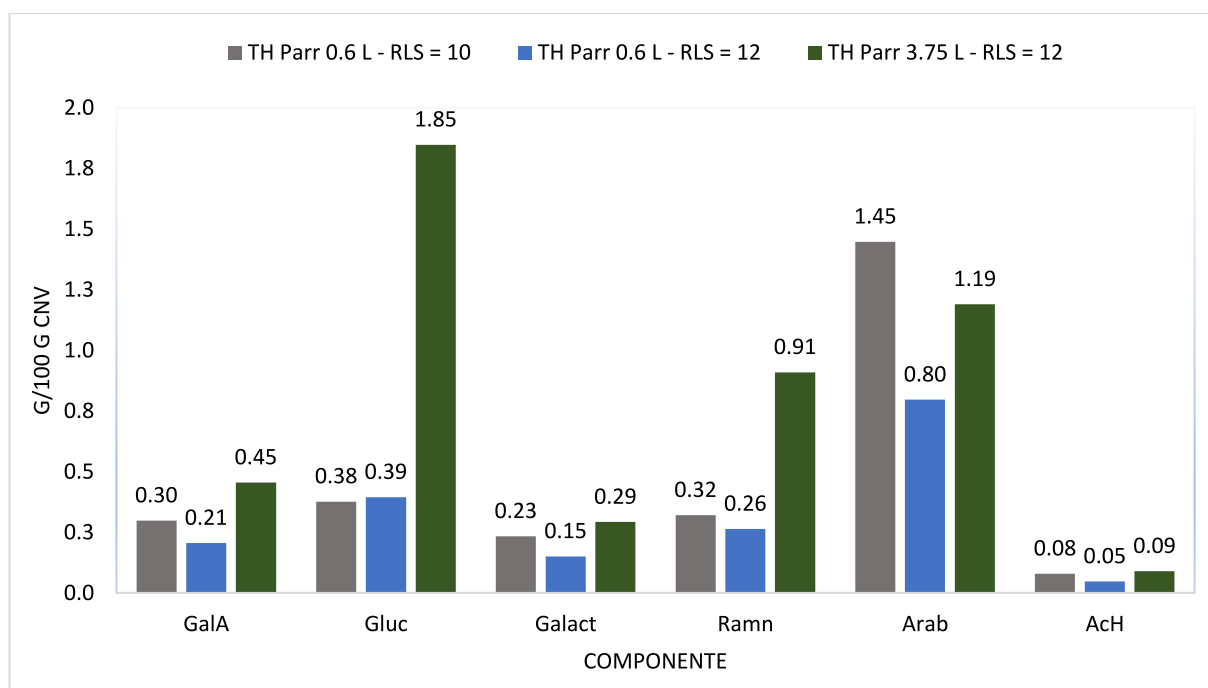
Por todo ello, para llevar a cabo el escalado fue necesario trabajar con una RLS=12 g/g. La Tabla 4 muestra también la composición de los licores obtenidos en los experimentos realizados en este reactor de mayor tamaño y, como se puede ver, los resultados son similares en ambos reactores, si bien, en el reactor de mayor tamaño se observa una ligeramente menor producción de oligosacáridos (37,8 vs 41,4 g/L) y mayor producción de monosacáridos (2,6 vs 0,9 g/L). En todo caso, tal y como se puede observar en la Figura 4, la composición del producto seco (expresada en fracciones másicas) no se vio apenas afectada ni por la relación líquido-sólido ni por el tamaño del reactor empleado.



T <sub>máx</sub> (°C)	155	155	155
Factor de severidad (R <sub>0</sub> )	2,48±0,08	2,44±0,05	2,42±0,03
RLS (g/g)	12	10 (igual masa)	12
Volumen reactor (L)	0,6	0,6	3,75
<b>Monómeros (g/L)</b>			
Ácido galacturónico	0,10±0,10	0,17±0,01	0,29±0,03
Glucosa	0,19±0,21	0,21±0,09	0,88±0,03
Galactosa	0,07±0,08	0,13±0,01	0,16±0,02
Ramnosa	0,12±0,14	0,18±0,05	0,51±0,01
Arabinosa	0,38±0,43	0,80±0,02	0,64±0,05
Ácido acético	0,02±0,02	0,04±0,00	0,08±0,06
<b>Oligómeros (g/L)</b>			
OGalA	24,38±0,09	29,57±0,34	23,32±0,22
GOS	1,30±0,20	1,54±0,03	1,15±0,04
GalOS+XOS	4,46±0,12	5,36±0,44	4,65±0,05
RamnOS	1,14±0,19	1,36±0,14	0,57±0,04
AraOS	8,72±0,31	10,04±0,18	7,88±0,22
Grupos acetilo	0,50±0,03	0,58±0,05	0,49±0,06
CNV (g/g Licor)	0,047±0,001	0,056±0,002	0,047±0,002
INV (% base seca)	11,37±1,66	10,21±1,90	14,09±0,44

Tabla 4. Composición de los licores obtenidos en el segundo grupo de experimentos de tratamiento hidrotérmico (datos expresados como media de dos y cuatro repeticiones en el caso de los tratamientos en reactor de 0,6 L y 3,75 L, respectivamente, ± desviación estándar).

Por último, cabe comentar que el proceso resultó altamente reproducible obteniéndose resultados con desviaciones estándar muy bajas (ver Tabla 4). Una vez fijadas las condiciones óptimas para el tratamiento hidrotérmico (RLS = 12 g/g y T<sub>máx</sub> = 155°C) se preparó un lote de licores en el reactor de 3,75L con el objetivo de abordar la siguiente etapa del proceso propuesto.



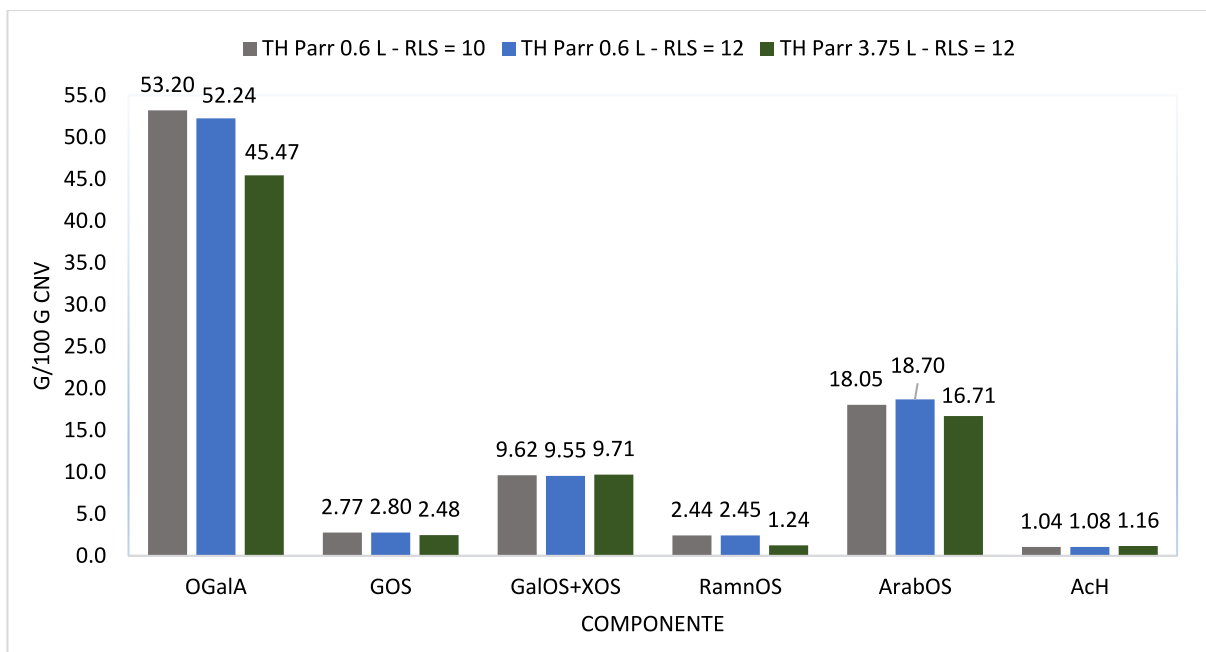


Figura 4. Composición de los licores obtenido en los experimentos de la Tabla 4, expresados como fracciones másicas de monómeros (Figura 4 sup.) y de oligómeros (Figura 4 inf.).

#### 4.4. Hidrólisis enzimática de los licores

Como se comentó anteriormente, de acuerdo con los resultados de trabajos previos, los licores obtenidos por TH de cáscaras de limón contienen fragmentos de pectinas con amplio rango de DP (el 78% del OGalA estaba formando parte de fragmentos con DP>13 (Gómez *et al.*, 2016)). Por ello, llegados a este punto se propuso la aplicación de una etapa de hidrólisis enzimática con la finalidad principal de reducir el tamaño de los productos y obtener, así, mezclas de OGalA de bajo DP con la mínima generación posible de ácido galacturónico. Este planteamiento se fundamenta en dos ideas: i) se ha publicado que los OGalA de bajo DP presentan propiedades biológicas de interés y, en algunos casos, sus propiedades son mejores que las de los polisacáridos de partida (ver Introducción), y ii) los OGalA de bajo DP son más fácilmente caracterizables desde el punto de vista químico por lo que es más fácil establecer relaciones estructura-función.

##### 4.4.1. Determinación de las actividades enzimáticas de los preparados comerciales

Para llevar a cabo la hidrólisis enzimática de los productos obtenidos mediante tratamientos hidrotérmicos, se utilizaron dos preparados comerciales de pectinasas: Viscozyme y Pectinex Ultra SP-L que previamente hubo que caracterizar siguiendo los protocolos estándar antes expuestos. La Figura 5 muestra los resultados obtenidos en los ensayos de determinación de actividad endopoligalacturonasa de ambos preparados.

Como se observa en la gráfica, Viscozyme muestra una actividad endopoligalacturonasa superior a la de Pectinex Ultra SP-L, teniendo valores promedio de 1546,25 U/mL y 1277,20 U/mL, respectivamente. Ambos preparados presentan también actividades arabinanasa y arabinogalactanasa, pero sus valores fueron muy bajos si se comparan con la actividad endopoligalacturonasa.

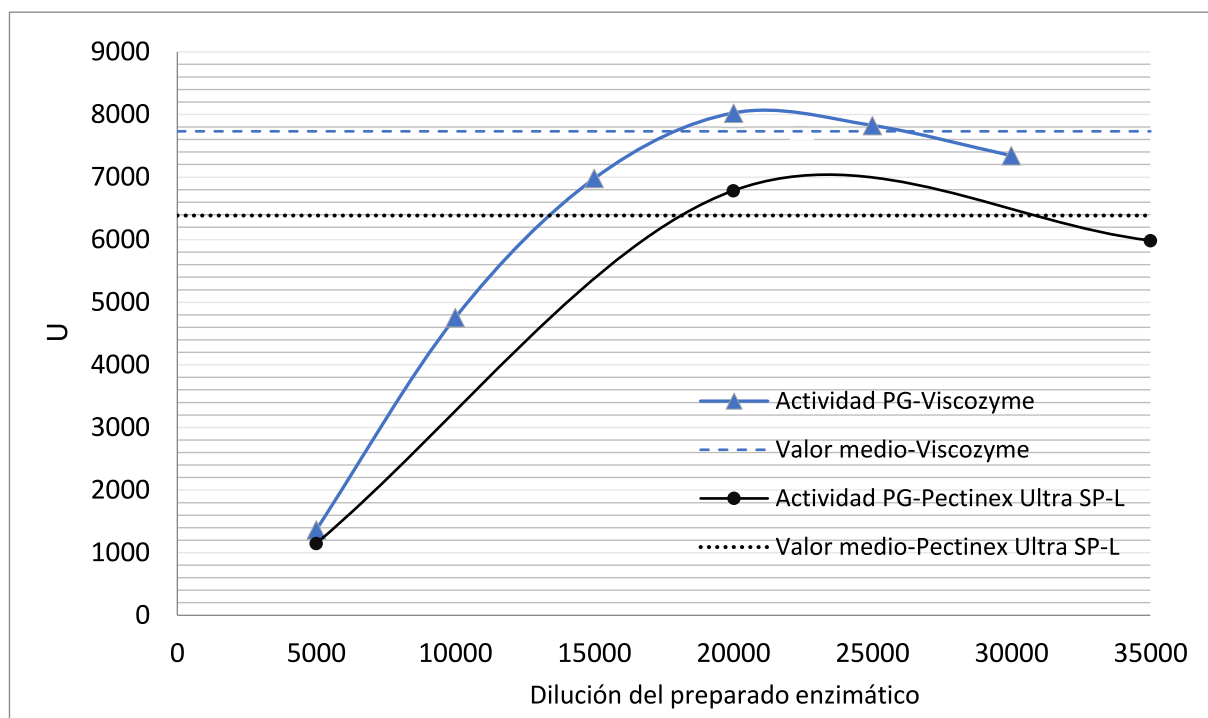


Figura 5. Actividad endopoligalacturonasa expresada en unidades enzimáticas (U) en función del factor de dilución de los preparados comerciales de pectinasas Viscozyme y Pectinex Ultra SP-L.

#### 4.4.2. Ensayos de hidrólisis enzimática de los productos (“DP tailoring”).

Los experimentos de hidrólisis enzimática se llevaron a cabo con los dos preparados enzimáticos (Viscozyme y Pectinex Ultra SP-L) en condiciones fijadas de pH=5 y T=37°C empleando cargas de enzima de 0,4 y 0,8 U/mL y tomándose muestras a distintos tiempos de reacción (0, 2, 4, 6 y 8 h). Posteriormente, se caracterizaron las muestras empleando los métodos descritos en la sección de metodología (PHA, PHE, CS y Determinación de azúcares reductores con DNS). Cabe indicar que las cargas de enzimas y los tiempos de reacción se fijaron en base a los resultados obtenidos en experimentos previos de tanteo.

La Figura 6 muestra la evolución en el tiempo de contenido en oligogalacturónidos y ácido galacturónico en los experimentos realizados. La información recogida en ambas gráficas proporciona información sobre la despolimerización de los oligogalacturónidos en presencia de los preparados enzimáticos.

Como se puede observar, a medida que se incrementa la carga de enzimas y el tiempo de reacción, se reduce el contenido en OGaA (polímero, Figura 6 sup.) y aumenta la concentración

de ácido galacturónico (monómero, Figura 6 inf.) como consecuencia de la hidrólisis de las cadenas por parte de las endopoligalacturonasas y exopoligalacturonasas, actuando estas últimas en el extremo no reductor de las cadenas (Uhlig, 1998).

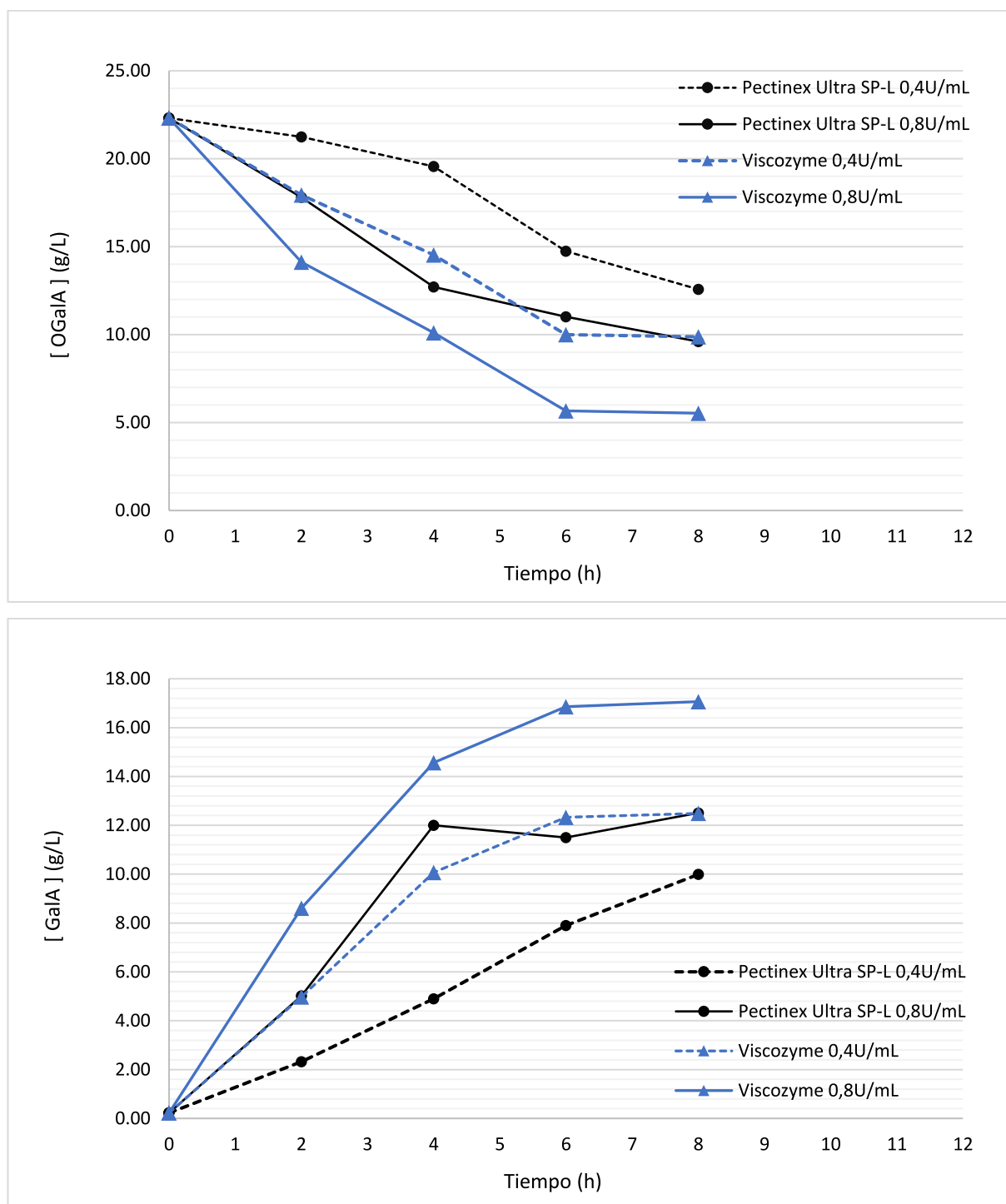


Figura 6. Evolución de la concentración de OGalA (Figura 6 sup.) y de GalA (Figura 6 inf.) en función del tiempo de hidrólisis enzimática usando Viscozyme o Pectinex Ultra SP-L con cargas 0,4 y 0,8 U/mL.

Al comparar ambos preparados, se observa que, a igual carga de enzima, el preparado Pectinex Ultra SP-L lleva a valores de degradación de oligosacáridos a monómeros inferior, lo cual es un resultado de interés puesto que, para los objetivos del proyecto, los productos deseados son

los oligogalacturónidos de bajo DP. En cualquier caso, cabe comentar que cuando se trabaja con Viscozyme y con cargas de enzima de 0,8 U/mL, se genera una gran cantidad de ácido galacturónico, un resultado que, aunque no es el objetivo del trabajo, podría ser de interés puesto que este monómero y sus derivados pueden ser también utilizados en la industria alimentaria (como acidificantes), en la industria química (como agentes de lavado y como surfactantes biodegradables) y en la industria farmacéutica (para la producción de vitamina C (Molnár *et al.*, 2010)).

Para terminar, se estimó la evolución del grado de polimerización medio de los productos generados a lo largo del proceso, lo cual, combinando información sobre el contenido en oligómeros, en monómeros y en azúcares reductores y empleando la expresión:

$$\text{DP medio estimado} = \text{OST}/(\text{ART}-\text{MS})$$

donde OST es la concentración molar en oligosacáridos totales, ART es la concentración molar de azúcares reductores totales (medidos como equivalentes de GalA) y MS la concentración molar de monosacáridos. La Figura 7 muestra la evolución con el tiempo del DP medio estimado con dicho método.

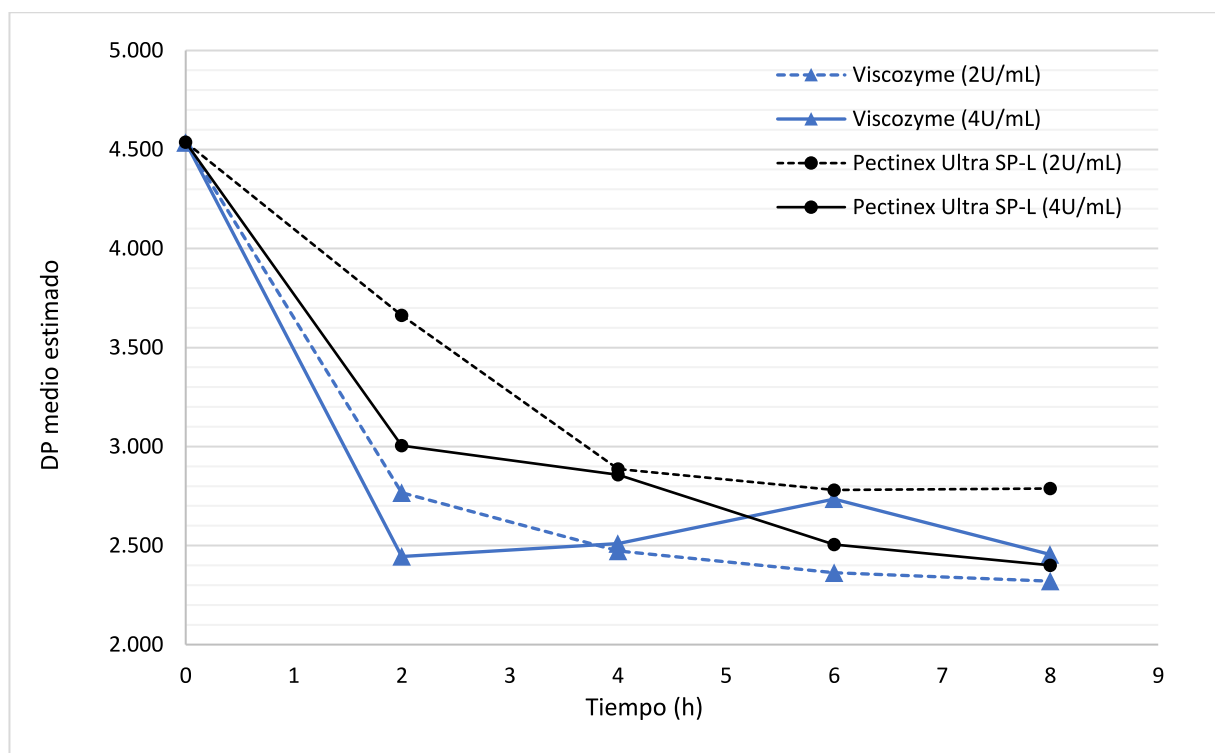


Figura 7. Variación del DP medio estimado para los oligosacáridos en función del tiempo de tratamiento de hidrólisis enzimática.

Como se puede ver, todas las curvas tienden a un valor constante comprendido en el intervalo 2.3-2.8, un resultado que está en concordancia con el hecho de que estos tipos de enzimas pierden actividad a medida que se reduce el grado de polimerización de los sustratos disponibles, de tal forma que apenas hidrolizan el ácido digalacturónico y lo hacen muy

lentamente con el trigalacturónico (Uhlig, 1998). Estos resultados deberán ser confirmados mediante técnicas analíticas avanzadas como HPAEC-PAD y/o MALDI-TOF-MS, trabajo que queda fuera del alcance de este proyecto.

En base a los resultados obtenidos, se seleccionó el preparado enzimático Pectinex Ultra SP-L para generar mezclas de oligogalacturónidos con los que realizar ensayos de evaluación de propiedades biológicas. Como se puede observar en la Figura 7, la utilización de Pectinex Ultra SP-L con carga enzimática 0,4 U/mL es la opción que proporciona una ruptura más moderada de los oligogalacturónidos, obteniéndose fragmentos con DP estimados de aproximadamente 3,7 al cabo de 2 h y de en torno a 2,9 al cabo de 4 h.

#### 4.5. Evaluación de propiedades biológicas de los oligosacáridos obtenidos

Para esta fase del proyecto, se prepararon mezclas de oligogalacturónidos mediante hidrólisis enzimáticas de los licores de TH utilizando el preparado Pectinex Ultra SP-L con carga de 0,4 U/mL y tiempos de reacción de 2h y 4h y se les determinó su capacidad antioxidante (ver Tabla 5) y la antiglicémica.

	t=2h		t=4h	
	mg E/g producto	Desv Est	mg E/g producto	Desv Est
TPC (EAG)	14,003	0,013	13,585	0,012
ABTS (ET)	36,547	0,048	36,156	0,041
DPPH (ET)	9,361	0,005	8,640	0,001
FRAP (ET)	7,301	0,019	6,674	0,016

Tabla 5. Actividades antioxidantes de las muestras ensayadas expresadas en concentración de equivalentes de ácido gálico (TPC) y de Trolox (DPPH, FRAP).

Los valores indican que las mezclas de oligogalacturónidos producidas sí que muestran actividad antioxidante. El contenido total de fenoles en el producto está en torno a los 14 mg de equivalentes de ácido gálico por cada gramo de contenido seco y no hay apenas diferencia entre las 2h y las 4h de hidrólisis enzimática. Estos valores son similares a los que obtuvieron Hua, Yi-fei y Zhi-qin (2018) al estudiar distintos tejidos de mandarina, determinando un contenido en fenoles totales de entre 8,25 y 15 mg por gramo de residuo de pulpa. En cuanto a los ensayos de DPPH y FRAP, los valores en la Tabla 5 están expresados en mg de equivalentes de Trolox (ET) por gramo de contenido seco (CS), si bien en la bibliografía es más común encontrar estos datos expresados en nmol de ET por gramo de muestra (nmol ET/g). Sabiendo que el Trolox presenta un peso molecular de 250,29 g/mol, podemos calcular los nmol ET/g peso seco según los distintos procedimientos de evaluación utilizados. El ensayo de ABTS reporta valores de 146018,6 nmol ET/g CS al cabo de 2h y prácticamente el valor no cambia para t=4h. Los estándares de esta prueba son distintos a los de los procedimientos de DPPH y FRAP, por lo

que es normal encontrar valores tan distintos. En el ensayo de DPPH se obtuvieron valores de 37400,6 nmol ET/g CS al cabo de 2h y de 34519,9 nmol ET/g CS al cabo de 4h. En el caso del ensayo de FRAP, se obtuvieron valores de 29170,2 nmol ET/ g CS al cabo de 2h y de 26665,1 nmol ET/g CS al cabo de 4h de hidrólisis enzimática.

Di Matteo *et al.* (2021) obtuvieron mediante el ensayo de ABTS valores de 20003 nmol ET/g de peso fresco de limón, significativamente menores que los obtenidos para los productos de hidrólisis, lo cual es de esperar.

Los ensayos de capacidad antihiperlipidémica de las mezclas resultó en valores nulos de dicha propiedad, por lo que se descarta la posible aplicación de los productos obtenidas en el tratamiento de enfermedades como la diabetes.

## 5. CONCLUSIONES

A partir de los resultados de las distintas fases del trabajo se pueden extraer varias conclusiones:

- La cáscara de limón es rica en azúcares libres y galacturonano y puede procesarse siguiendo tecnologías limpias y procesos escalables con el fin de obtener distintos tipos de productos de interés.
- La extracción acuosa del residuo de la cáscara de limón se puede llevar a cabo con una RLS=10 g/g de cáscara, con un sistema de agitación mecánico y a temperatura ambiente, obteniéndose en la primera etapa y en un corto periodo de tiempo, unos licores con un contenido en azúcares libres cercano a los 20 g/L que podrían emplearse como sustratos en procesos de fermentación, entre otros.
- Cuando se someten muestras de RCL libre de extractos a tratamiento hidrotérmico en régimen no isoterma hasta temperatura máxima de 155°C y con una RLS=12 g/g se obtienen licores con altos contenidos en oligogalacturónidos (en torno a 50 %) y bajos contenidos en impurezas no volátiles (14%).
- Los preparados enzimáticos Viscozyme y Pectinex Ultra SP-L muestran una actividad principal poligalacturonasa siendo el preparado Pectinex Ultra SP-L una opción preferible para la obtención de oligogalacturónidos de bajo DP, ya que permite obtener fragmentos de OGaLA de DP<4 en 2h y de DP en torno a 3 al cabo de 4h de hidrólisis enzimática con baja generación de ácido galacturónico con la consiguiente pérdida de oligómeros.
- Los productos obtenidos presentaron una elevada actividad antioxidante, aunque no actividad antihiperlipidémica.

De cara a proyectos futuros, sería de interés llevar a cabo trabajos destinados a elevar la pureza de los productos obtenidos (por ejemplo, mediante el empleo de tecnologías de membrana) así

como evaluar mediante técnicas *in vitro* su potencial prebiótico y otras propiedades biológicas adicionales.

## **Bibliografía**

1. Al-Tamimi, M. a. H. M., Palframan, R. J., Cooper, J. M., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2006a). *In vitro* fermentation of sugar beet arabinan and arabino-oligosaccharides by the human gut microflora. *Journal of Applied Microbiology*, 100(2), 407-414. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02780.x
2. Amaral, L., Morgan, D., Stephen, A. M., & Whiting, S. (1992). Effect of propionate on lipid-metabolism in healthy-human subjects. *Faseb Journal*, 6(5), A1655.
3. Andoh, A., Bamba, T., & Sasaki, M. (1999). Physiological and anti-inflammatory roles of dietary fiber and butyrate in intestinal functions. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 23(5S), S70-S73. doi:10.1177/014860719902300518
4. Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70-76. doi:10.1006/abio.1996.0292
5. Blanco-Pérez, F., Steigerwald, H., Schülke, S., Vieths, S., Toda, M., & Scheurer, S. (2021). The dietary fiber pectin: Health benefits and potential for the treatment of allergies by modulation of gut microbiota. *Current Allergy and Asthma Reports*, 21(10), 43. doi:10.1007/s11882-021-01020-z
6. Burana-osot, J., Soonthornchareonnon, N., Chaidedgumjorn, A., Hosoyama, S., & Toida, T. (2010). Determination of galacturonic acid from pomelo pectin in term of galactose by HPAEC with fluorescence detection. *Carbohydrate Polymers*, 2(81), 461-465. doi:10.1016/j.carbpol.2010.03.001
7. Carvalho, A. F. A., Neto, P. d. O., da Silva, D. F., & Pastore, G. M. (2013). Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 51(1), 75-85. doi:10.1016/j.foodres.2012.11.021
8. Chen, J., Yang, J., Ma, L., Li, J., Shahzad, N., & Kim, C. K. (2020). Structure-antioxidant activity relationship of methoxy, phenolic hydroxyl, and carboxylic acid groups of phenolic acids. *Scientific Reports*, 10(1), 1-9.
9. Chen, R., Jin, C., Tong, Z., Lu, J., Tan, L., Tian, L., et al. (2016). Optimization extraction, characterization and antioxidant activities of pectic polysaccharide from tangerine peels. *Carbohydrate Polymers*, 136, 187-197.



10. Coenen, G., Kabel, M. A., Schols, H. A., & Voragen, A. G. J. (2008). CE-MSn of complex pectin-derived oligomers. *Electrophoresis*, 29(10), 2101-2111. doi:10.1002/elps.200700465
11. Combo, A. M. M., Aguedo, M., Goffin, D., Wathelet, B., & Paquot, M. (2012). Enzymatic production of pectic oligosaccharides from polygalacturonic acid with commercial pectinase preparations. *Food and Bioprocess Processing*, 90(3), 588-596. doi:10.1016/j.fbp.2011.09.003
12. Cook, M. D., Allen, J. M., Pence, B. D., Wallig, M. A., Gaskins, H. R., White, B. A., et al. (2016). Exercise and gut immune function: Evidence of alterations in colon immune cell homeostasis and microbiome characteristics with exercise training. *Immunology and Cell Biology*, 94(2), 158-163. doi:10.1038/icb.2015.108
13. Corzo, N., Alonso, J. L., Azpiroz, F., Calvo, M. A., Cirici, M., Leis, R., et al. (2015). Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos. *Nutrición Hospitalaria*, 31(1), 99-118.
14. Di Matteo, A., Di Rauso Simeone, G., Cirillo, A., Rao, M. A., & Di Vaio, C. (2021). Morphological characteristics, ascorbic acid and antioxidant activity during fruit ripening of four lemon (*Citrus limon* (L.) burm. F.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 276, 109741. doi:https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109741
15. Falck, P., Precha-Atsawan, S., Grey, C., Immerzeel, P., Stålbrand, H., Adlercreutz, P., et al. (2013b). Xylooligosaccharides from hardwood and cereal xylans produced by a thermostable xylanase as carbon sources for *Lactobacillus brevis* and *Bifidobacterium adolescentis*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(30), 7333-7340. doi:10.1021/jf401249g
16. Fanaro, S., Jelinek, J., Stahl, B., Boehm, G., Kock, R., & Vigi, V. (2005). Acidic oligosaccharides from pectin hydrolysate as new component for infant formulae: Effect on intestinal flora, stool characteristics, and pH. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 41(2), 186-190.
17. Finegold, S. M., Sutter, V. L., & Mathisen, G. E. (1983). CHAPTER 1 - normal indigenous intestinal flora. In D. J. Hentges (Ed.), *Human intestinal microflora in health and disease* (pp. 3-31). Academic Press. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123412805500070>
18. Franks, A. H., Harmsen, H. J., Raangs, G. C., Jansen, G. J., Schut, F., & Welling, G. W. (1998). Variations of bacterial populations in human feces measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3336-3345. doi:10.1128/AEM.64.9.3336-3345.1998

19. Gamonpilas, C., Buathongjan, C., Kirdsawasd, T., Rattanaprasert, M., Klomtun, M., Phonsatta, N., et al. (2021). Pomelo pectin and fiber: Some perspectives and applications in food industry. *Food Hydrocolloids*, 120, 106981. doi:10.1016/j.foodhyd.2021.106981
20. Garrote, G., Kabel, M. A., Schols, H. A., Falqué, E., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2007). Effects of eucalyptus globulus wood autohydrolysis conditions on the reaction products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(22), 9006-9013. doi:10.1021/jf0719510
21. Gérard, P. (2016). Gut microbiota and obesity. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 73(1), 147-162. doi:10.1007/s00018-015-2061-5
22. Gibson, G. R., Hutkins, R., Sanders, M. E., Prescott, S. L., Reimer, R. A., Salminen, S. J., et al. (2017). Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 14(8), 491-502. doi:10.1038/nrgastro.2017.75
23. Gilbert, J. A., Blaser, M. J., Caporaso, J. G., Jansson, J. K., Lynch, S. V., & Knight, R. (2018). Current understanding of the human microbiome. *Nature Medicine*, 24(4), 392-400. doi:10.1038/nm.4517
24. Gómez, B., Gullón, B., Remoroza, C., Schols, H. A., Parajó, J. C., & Alonso, J. L. (2014). Purification, characterization, and prebiotic properties of pectic oligosaccharides from orange peel wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(40), 9769-9782. doi:10.1021/jf503475b
25. Gómez, B., Gullón, B., Yáñez, R., Parajó, J. C., & Alonso, J. L. (2013). Pectic oligosaccharides from lemon peel wastes: Production, purification, and chemical characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(42), 10043-10053. doi:10.1021/jf402559p
26. Gómez, B., Yáñez, R., Parajó, J. C., & Alonso, J. L. (2016). Production of pectin-derived oligosaccharides from lemon peels by extraction, enzymatic hydrolysis and membrane filtration. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 91(1), 234-247. doi:10.1002/jctb.4569
27. González-Molina, E., Domínguez-Perles, R., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2010). Natural bioactive compounds of citrus limon for food and health. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51(2), 327-345. doi:10.1016/j.jpba.2009.07.027
28. González-Muñoz, M. J., Santos, V., & Parajó, J. C. (2011). Purification of oligosaccharides obtained from pinus pinaster hemicelluloses by diafiltration. *Null*, 27(1-3), 48-53. doi:10.5004/dwt.2011.2047

29. Goodrich, J. K., Waters, J. L., Poole, A. C., Sutter, J. L., Koren, O., Blekhman, R., et al. (2014). Human genetics shape the gut microbiome. *Cell*, 159(4), 789-799. doi:10.1016/j.cell.2014.09.053
30. Gori, A., Rizzardini, G., Van't Land, B., Amor, K. B., Van Schaik, J., Torti, C., et al. (2011). Specific prebiotics modulate gut microbiota and immune activation in HAART-naïve HIV-infected adults: Results of the "COPA" pilot randomized trial. *Mucosal Immunology*, 4(5), 554-563.
31. Guggenbichler, J. P., De Bettignies-Dutz, A., Meissner, P., Schellmoser, S., & Jurenitsch, J. (1997). Acidic oligosaccharides from natural sources block adherence of *Escherichia coli* on uroepithelial cells. *Pharmaceutical and Pharmacological Letters*, 7(1), 35-38.
32. Gullón, B., Gómez, B., Martínez-Sabajanes, M., Yáñez, R., Parajó, J. C., & Alonso, J. L. (2013). Pectic oligosaccharides: Manufacture and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 30(2), 153-161. doi:10.1016/j.tifs.2013.01.006
33. Gullón, B., Gullón, P., Sanz, Y., Alonso, J. L., & Parajó, J. C. (2011). Prebiotic potential of a refined product containing pectic oligosaccharides. *LWT-Food Science and Technology*, 44(8), 1687-1696.
34. Hosseini Abari, A., Amini Rourani, H., Ghasemi, S. M., Kim, H., & Kim, Y. (2021). Investigation of antioxidant and anticancer activities of unsaturated oligo-galacturonic acids produced by pectinase of *Streptomyces hydrogenans* YAM1. *Scientific Reports*, 11(1), 8491. doi:10.1038/s41598-021-87804-9
35. Hotchkiss, A. T., Manderson, K., Tuohy, K. M., Widmer, W. W., Nunez, A., Gibson, G. R., et al. (2007). Bioactive properties of pectic oligosaccharides from sugar beet and Valencia oranges. Paper presented at the Proceedings of the 233rd ACS National Meeting, Chicago, IL, USA, pp. 25-29.
36. Huang, X., Li, D., & Wang, L. (2017). Characterization of pectin extracted from sugar beet pulp under different drying conditions. *Journal of Food Engineering*, 211, 1-6. doi:10.1016/j.jfoodeng.2017.04.022
37. Karl, J. P., Margolis, L. M., Madslie, E. H., Murphy, N. E., Castellani, J. W., Gundersen, Y., et al. (2017). Changes in intestinal microbiota composition and metabolism coincide with increased intestinal permeability in young adults under prolonged physiological stress. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 312(6), G559-G571. doi:10.1152/ajpgi.00066.2017
38. Karlsson, F. H., Fåkk, F., Nookaew, I., Tremaroli, V., Fagerberg, B., Petranovic, D., et al. (2012). Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nature Communications*, 3(1), 1245. doi:10.1038/ncomms2266

39. Kostic, A., Chun, E., Robertson, L., Glickman, J., Gallini, C., Michaud, M., et al. (2013). *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host & Microbe*, 14(2), 207-215. doi:10.1016/j.chom.2013.07.007
40. Kumar, A., & Chauhan, G. S. (2010). Extraction and characterization of pectin from apple pomace and its evaluation as lipase (steapsin) inhibitor. *Carbohydrate Polymers*, 82(2), 454-459. doi:10.1016/j.carbpol.2010.05.001
41. Larsen, N., Bussolo de Souza, C., Krych, L., Barbosa Cahú, T., Wiese, M., Kot, W., et al. (2019). Potential of pectins to beneficially modulate the gut microbiota depends on their structural properties. *Frontiers in Microbiology*, 0 doi:10.3389/fmicb.2019.00223
42. Leclere, C. J., Champ, M., Boillot, J., Guille, G., Lecannu, G., Molis, C., et al. (1994). Role of viscous guar gums in lowering the glycemic response after a solid meal. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 59(4), 914-921.
43. Li, T., Li, S., Dong, Y., Zhu, R., & Liu, Y. (2014). Antioxidant activity of penta-oligogalacturonide, isolated from haw pectin, suppresses triglyceride synthesis in mice fed with a high-fat diet. *Food Chemistry*, 145, 335-341.
44. Li, T., Li, S., Du, L., Wang, N., Guo, M., Zhang, J., et al. (2010). Effects of haw pectic oligosaccharide on lipid metabolism and oxidative stress in experimental hyperlipidemia mice induced by high-fat diet. *Food Chemistry*, 121(4), 1010-1013.
45. LOZUPONE, C. A., STOMBAUGH, J. I., GORDON, J. I., JANSSON, J. K., & KNIGHT, R. (2012). Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature (London)*, 489(7415), 220-230. doi:10.1038/nature11550
46. Ma, J., Tong, P., Chen, Y., Wang, Y., Ren, H., Gao, Z., et al. (2022). The inhibition of pectin oligosaccharides on degranulation of RBL-2H3 cells from apple pectin with high hydrostatic pressure assisted enzyme treatment. *Food Chemistry*, 371, 131097. doi:10.1016/j.foodchem.2021.131097
47. Magne, F., Hachelaf, W., Suau, A., Boudraa, G., Bouziane-Nedjadi, K., Rigottier-Gois, L., et al. (2008). Effects on faecal microbiota of dietary and acidic oligosaccharides in children during partial formula feeding. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 46(5), 580-588.
48. Mandalari, G., Nueno Palop, C., Tuohy, K., Gibson, G. R., Bennett, R. N., Waldron, K. W., et al. (2007). In vitro evaluation of the prebiotic activity of a pectic oligosaccharide-rich extract enzymatically derived from bergamot peel. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(5), 1173-1179. doi:10.1007/s00253-006-0561-9

49. Manderson, K., Pinart, M., Tuohy, K. M., Grace, W. E., Hotchkiss, A. T., Widmer, W., et al. (2005). In vitro determination of prebiotic properties of oligosaccharides derived from an orange juice manufacturing by-product stream. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8383-8389. doi:10.1128/AEM.71.12.8383-8389.2005
50. Martínez Sabajanes, M., Yáñez, R., Alonso, J. L., & Parajó, J. C. (2012). Pectic oligosaccharides production from orange peel waste by enzymatic hydrolysis. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(4), 747-754. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02903.x
51. Martínez, M., Gullón, B., Schols, H. A., Alonso, J. L., & Parajó, J. C. (2009). Assessment of the production of oligomeric compounds from sugar beet pulp. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 48(10), 4681-4687. doi:10.1021/ie8017753
52. Molnár, E., Nemestóthy, N., & Bélafi-Bakó, K. (2010). Utilisation of bipolar electro dialysis for recovery of galacturonic acid. *Desalination*, 250(3), 1128-1131. doi:https://doi.org/10.1016/j.desal.2009.09.124
53. Naqash, F., Masoodi, F. A., Rather, S. A., Wani, S. M., & Gani, A. (2017). Emerging concepts in the nutraceutical and functional properties of pectin—A review. *Carbohydrate Polymers*, 168, 227-239. doi:10.1016/j.carbpol.2017.03.058
54. Ogutu, F. O., & Mu, T. (2017). Ultrasonic degradation of sweet potato pectin and its antioxidant activity. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 726-734.
55. Olano-Martin, E., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2002). Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. *Journal of Applied Microbiology*, 93(3), 505-511. doi:1719 [pii]
56. Olano-Martin, E., Mountzouris, K. C., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2000). In vitro fermentability of dextran, oligodextran and maltodextrin by human gut bacteria. *The British Journal of Nutrition*, 83(3), 247-255. doi:10.1017/s0007114500000325
57. Olano-Martin, E., Rimbach, G. H., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2003). Pectin and pectic-oligosaccharides induce apoptosis in in vitro human colonic adenocarcinoma cells. *Anticancer Research*, 23(1A), 341-346.
58. Olano-Martin, E., Williams, M. R., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2003). Pectins and pectic-oligosaccharides inhibit escherichia coli O157:H7 shiga toxin as directed towards the human colonic cell line HT29. *FEMS Microbiology Letters*, 218(1), 101-105. doi:10.1111/j.1574-6968.2003.tb11504.x
59. Onumpai, C., Kolida, S., Bonnin, E., & Rastall, R. A. (2011). Microbial utilization and selectivity of pectin fractions with various structures. *Applied and Environmental Microbiology*, doi:10.1128/AEM.00179-11

60. Rajulapati, V., Dhillon, A., & Goyal, A. (2021). Enzymatically produced pectic-oligosaccharides from fruit waste of citrus reticulata (mandarin) peels display cytotoxicity against colon cancer cells. *Bioresource Technology Reports*, 15, 100740. doi:10.1016/j.biteb.2021.100740
61. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. doi:10.1016/s0891-5849(98)00315-3
62. Remón, J., Li, T., Chuck, C. J., Matharu, A. S., & Clark, J. H. (2019). Toward renewable-based, food-applicable prebiotics from biomass: A one-step, additive-free, microwave-assisted hydrothermal process for the production of high purity xylo-oligosaccharides from beech wood hemicellulose. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 7(19), 16160-16172. doi:10.1021/acssuschemeng.9b03096
63. Sabajanes, M. M., Yáñez, R., Alonso, J. L., & Parajó, J. C. (2012). Pectic oligosaccharides production from orange peel waste by enzymatic hydrolysis. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(4), 747-754. doi:10.1111/j.1365-2621.2011.02903.x
64. Samanta, A. K., Jayapal, N., Jayaram, C., Roy, S., Kolte, A. P., Senani, S., et al. (2015). Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 5(1), 62-71. doi:10.1016/j.bcdf.2014.12.003
65. Scher, J. U., Szczesnak, A., Longman, R. S., Segata, N., Ubeda, C., Bielski, C., et al. (2013). Expansion of intestinal prevotella copri correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *eLife*, 2 doi:10.7554/eLife.01202
66. Sender, R., Fuchs, S., & Milo, R. (2016). Are we really vastly outnumbered? revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell*, 164(3), 337-340. doi:10.1016/j.cell.2016.01.013
67. Shreiner, A. B., Kao, J. Y., & Young, V. B. (2015). The gut microbiome in health and in disease. *Current Opinion in Gastroenterology*, 31(1), 69-75. doi:10.1097/MOG.000000000000139
68. Suzuki, Y., Tanaka, K., Amano, T., Asakura, T., & Muramatsu, N. (2004). Utilization by intestinal bacteria and digestibility of arabino-oligosaccharides in vitro. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 73(6), 574-579. doi:10.2503/jjshs.73.574
69. Thakur, B. R., Singh, R. K., Handa, A. K., & Rao, D. M. A. (1997). Chemistry and uses of pectin — A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 37(1), 47-73. doi:10.1080/10408399709527767

70. TRASANDE, L., BLUSTEIN, J., LIU, M., CORWIN, E., COX, L. M., & BLASER, M. J. (2013). Infant antibiotic exposures and early-life body mass. *International Journal of Obesity*, 37(1), 16-23. doi:10.1038/ijo.2012.132
71. Uhlig, H. (1998). *Industrial enzymes and their applications* | wiley. Retrieved Jul 7, 2022, from <https://www.wiley.com/en-us/Industrial+Enzymes+and+Their+Applications-p-9780471196600>
72. Ursell, L. K., Metcalf, J. L., Parfrey, L. W., & Knight, R. (2012). Defining the human microbiome. *Nutrition Reviews*, 70(suppl\_1), S38-S44. doi:10.1111/j.1753-4887.2012.00493.x
73. Van Laere, K. M., Hartemink, R., Bosveld, M., Schols, H. A., & Voragen, A. G. (2000). Fermentation of plant cell wall derived polysaccharides and their corresponding oligosaccharides by intestinal bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5), 1644-1652. doi:10.1021/jf990519i
74. Von Gadow, A., Joubert, E., & Hansmann, C. F. (1997). Comparison of the antioxidant activity of rooibos tea (*aspalathus linearis*) with green, oolong and black tea. *Food Chemistry*, 60(1), 73-77.
75. Wang, J., Hu, S., Nie, S., Yu, Q., & Xie, M. (2016). Reviews on mechanisms of in vitro antioxidant activity of polysaccharides. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016
76. Westerbeek, E. A., van den Berg, Jolice P, Lafeber, H. N., Fetter, W. P., Boehm, G., Twisk, J. W., et al. (2010). Neutral and acidic oligosaccharides in preterm infants: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 91(3), 679-686.
77. Xue, L., Long, J., Lu, C., Li, X., Xu, X., & Jin, Z. (2021). Immobilization of polygalacturonase for the preparation of pectic oligosaccharides from mango peel wastes and assessment of their antibacterial activities. *Food Bioscience*, 39, 100837. doi:10.1016/j.fbio.2020.100837
78. Yapo, B. M., Robert, C., Etienne, I., Wathélet, B., & Paquot, M. (2007). Effect of extraction conditions on the yield, purity and surface properties of sugar beet pulp pectin extracts. *Food Chemistry*, 100(4), 1356-1364. doi:10.1016/j.foodchem.2005.12.012
79. Yeung, Y. K., Kang, Y., So, B. R., Jung, S. K., & Chang, Y. H. (2021). Structural, antioxidant, prebiotic and anti-inflammatory properties of pectic oligosaccharides hydrolyzed from okra pectin by fenton reaction. *Food Hydrocolloids*, 118, 106779.
80. ZHANG, H., YANG, Y., & ZHOU, Z. (2018). Phenolic and flavonoid contents of mandarin (*citrus reticulata blanco*) fruit tissues and their antioxidant capacity as evaluated by DPPH

and ABTS methods. *Journal of Integrative Agriculture*, 17(1), 256-263.  
doi:[https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61664-2](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61664-2)

81. Zheng, P., Zeng, B., Zhou, C., Liu, M., Fang, Z., Xu, X., et al. (2016). Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism. *Molecular Psychiatry*, 21(6), 786-796. doi:10.1038/mp.2016.44
82. Zhu, R., Wang, C., Zhang, L., Wang, Y., Chen, G., Fan, J., et al. (2019). Pectin oligosaccharides from fruit of *actinidia arguta*: Structure-activity relationship of prebiotic and antiglycation potentials. *Carbohydrate Polymers*, 217, 90-97. doi:10.1016/j.carbpol.2019.04.032