

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 703**

51 Int. Cl.:

**A23K 10/38** (2006.01)

**A23L 29/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2009 PCT/FI2009/051017**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.06.2010 WO2010070207**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2009 E 09832997 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.02.2017 EP 2370475**

54 Título: **Producción de una composición de sacárido que comprende glucanos y mananos mediante hidrólisis alcalina y de ácido de células de levadura**

30 Prioridad:

**18.12.2008 FI 20080665**

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

**17.07.2017**

73 Titular/es:

**GLYKOS FINLAND OY (100.0%)**

**Viiinkaari 6**

**00790 Helsinki, FI**

72 Inventor/es:

**SAARINEN, JUHANI;**

**NIEMELÄ, RITVA;**

**HELIN, JARI;**

**NATUNEN, JARI y**

**HILTUNEN, JUKKA**

74 Agente/Representante:

**CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes**

ES 2 624 703 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Producción de una composición de sacárido que comprende glucanos y mananos mediante hidrólisis alcalina y de ácido de células de levadura.

5

La presente invención se refiere a un método de producción de una composición inmunoestimuladora que comprende una fracción de sacárido, comprendiendo el método las etapas de hidrólisis de células de levadura y recuperación de la fracción soluble. La fracción de sacárido que comprende la composición obtenida de este modo puede incorporarse como un componente de alimento o bebida o puede usarse como un producto farmacéutico para el tratamiento de afecciones específicas.

10

## ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los glucanos, particularmente beta (1-3)-glucanos, se han estudiado muy ampliamente, y se ha demostrado que tienen una diversidad de actividades farmacológicas, incluyendo, pero sin limitación, actividad anti-colesterolémica, actividad hipoglucémica, y estimulación de la sistema inmune. Por esta razón, los productos que comprenden beta-glucano se han utilizado como aditivos para piensos en la producción de aves de corral, animales, peces o crustáceos. Los glucanos son polímeros insolubles. La presente memoria descriptiva revela materiales derivados de levaduras novedosos que comprenden cantidades aumentadas de carbohidratos de levadura solubles en agua hidrolizados y otras moléculas solubles.

15

20

La pared celular de *Saccharomyces cerevisiae* se compone principalmente de glucano unido a beta, que es principalmente una estructura principal de unidades de glucosa unidas a beta(1-3), con un componente secundario de ramificación inter e intramolecular a través de enlaces a beta (1- 6). Los glucanos de levadura en la técnica anterior son en su mayor parte polímeros insolubles en agua. La presente memoria descriptiva revela materiales derivados de levaduras novedosos que comprenden cantidades aumentadas de diversos carbohidratos de levadura hidrolizados solubles en agua que incluyen material polimérico específico que comprende glucosa unida a  $\beta$ 6 como estructura principal, y materiales solubles de  $\alpha$ -manosa y otras moléculas solubles con un tamaño molecular específico.

25

30

El material derivado de levadura de la técnica anterior se ha descrito para comprender glicoproteínas insolubles en mananos o posiblemente como oligosacáridos. La presente memoria descriptiva reveló materiales de  $\alpha$ -manosa novedosos con un tamaño molecular específico principalmente en el intervalo de polisacáridos de bajo peso molecular. Los materiales solubles de  $\alpha$ -manosa son, en una realización preferida, el componente de carbohidrato principal. Las fracciones novedosas tienen además características útiles que incluyen claridad, sabor y olor reducidos, especialmente cuando la levadura se produce a partir de levadura usada de la producción de cerveza.

35

Debido al amplio uso de levaduras en la industria alimentaria y cervecera, así como en la producción de alcohol de grado industrial, las células de levadura gastadas son un subproducto industrial importante. Los productos derivados de la levadura tienen por sí mismos un considerable valor comercial, por ejemplo, en productos tales como extractos de levadura, agentes saporíferos, potenciadores del sabor, tales como monofosfato de guanosina y monofosfato de inosina, y en la fabricación de enzimas, productos químicos finos y productos para su uso en las industrias bioquímica y farmacéutica, tales como trehalosa, timidina, nucleósidos y nucleótidos, etc. La levadura de desechos de la industria cervecera es una fuente importante de beta-glucanos.

40

45

Además, otras especies de levadura son también útiles como fuente de beta-glucanos o glicanos que contienen manosa, incluyendo, pero si limitación, otras cepas de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*, otras levaduras usando procesos de fermentación de alimentos o bebidas, tales como otras especies de *Sacchomyces*, incluyendo, por ejemplo, cepas *Saccharomyces carlsbergiensis*, *Kluyveromyces fragilis*, y *Candida*, tal como *Candida utilis*. Todas estas cepas de levadura pueden producirse utilizando cultivo en nutrientes de calidad alimentaria, por fermentación discontinua o por fermentación continua.

50

La purificación de beta-glucanos de levadura y otros organismos se ha investigado ampliamente, y se conoce una diversidad de métodos. La mayoría de estos se basan en la insolubilidad del beta (1-3)-glucano en disolventes alcali o en disolventes orgánicos. Los principales métodos conocidos son:

55

(a) Extracción a alta temperatura con hidróxido de sodio concentrado, seguido de extracción a alta temperatura con ácido y precipitación con etanol (por ejemplo, Manners, D. J. et al., *Biochem. J.* 135 19-30 (1973), Jamas, S. et al., Pat. de Estados Unidos n.º 4.810.646, n.º 5.028.703, y N.º 5.250.436). Muchos de

estos protocolos requieren una homogeneización preliminar de las células de levadura, y muchos requieren repetición múltiple de cada etapa de extracción.

5 (b) Extracción con hidróxido sodico concentrado, seguido de extracción ácida a alta temperatura y tratamiento enzimático para modificar o purificar el glucano (véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente Checa N.º 890038 de Masler, L. et al., que informa de la purificación de beta-glucano por extracción con ácido alcalino, seguido de tratamiento con enzimas que tienen actividad amilasa).

(c) Extracción de preparaciones de la pared celular de levadura resultado de la autólisis o degradación enzimática de la levadura con fenol concentrado:agua (1:1) (véase, por ejemplo, la Pat. de Estados Unidos N.º 4.138.479 de Truscheit, E. et al.).

10 (d) Extracción con disolventes orgánicos tales como isopropanol, etanol, acetona o metanol, en solitario o en presencia de álcali (véanse, por ejemplo, las Publicaciones de Patentes Japonesas n.º 7051081, 6340701, 5295003 y 3002202; Solicitud de Patente Europea n.º 515216).

Se sabe que el tratamiento con ácido reduce el número de enlaces beta (1-6) en el material de glucano y esto da como resultado un aumento de la viscosidad.

La pared celular de la levadura se compone principalmente de:

20 (i) glucano unido a beta (1-3) fibrilar, alcalino insoluble, con ramificaciones laterales de glucano unido a beta (1-6).

(ii) glucano unido a beta (1-3) soluble en álcali con ramificaciones laterales de glucano unido a beta (1-6).

(iii) beta (1-6)-glucano soluble en ácido amorfo, con enlaces beta (1-3) intermitentes.

(iv) manano soluble en álcali amorfo unido a proteínas.

25 Los métodos existentes para aislar los beta-glucanos usan comúnmente un proceso de extracción con ácido alcalino de múltiples etapas. Las etapas de extracción con álcalis eliminan la mayor parte del material amorfo de manoproteína y glucano, y las etapas de extracción con ácido posteriores eliminan el glucógeno y la mayor parte de las ramificaciones beta (1-6) del glucano unido a beta (1-3) predominantemente fibrilar. A veces se usa una etapa de extracción por disolvente final para eliminar los lípidos.

30 Los métodos de glucano implican una fuerte extracción alcalina y opcionalmente un tratamiento con ácido débil para obtener glucanos unidos a beta3 insolubles principalmente. El presente método incluye una hidrólisis de ácido más eficaz, preferiblemente a temperaturas elevadas para producir material más soluble y una hidrólisis alcalina para mejorar la solubilización, la reacción alcalina se utiliza para extraer el material soluble en álcali, pero la fracción soluble no se descarta aún se conserva. El presente método comprende además etapas de separación y/o fraccionamiento para eliminar el material insoluble que incluye probablemente  $\beta$ 3-glucano, y opcionalmente reciclar el material insoluble en la etapa de hidrólisis para producir carbohidratos más solubles, y para eliminar materiales de bajo peso molecular, tales como monosacáridos u oligosacáridos de bajo peso molecular, o prácticamente todos los oligosacáridos y la eliminación de sales. Se sabe que los tratamientos de ácido y alcalinos producen sales.

40 Está claro que, dado el precio de venta al por menor del glucano para algunas aplicaciones, el coste de producción de glucano usando los métodos publicados o patentados existentes no es comercialmente viable. Estos métodos tienen al menos una desventaja importante, están dirigidos a producir solamente la forma fibrilar, insoluble en álcali, de glucano. Otras formas de glucano y el manano presentes en la pared celular se eliminan como subproductos del proceso. Estos representan una cantidad adicional de glucano, que podría haber aumentado significativamente el rendimiento del glucano, y que puede ser funcionalmente importante. Además, después o entre los tratamientos de hidrólisis, se desechan los componentes solubles mientras que se conserva el glucano insoluble, en su mayor parte beta (1-3). El método de producción de la presente memoria descriptiva puede usarse para producir una estructura de enlace  $\beta$ 6-glucosa soluble que comprende materiales carbohidratos o sacáridos para, usarse en o como composiciones inmunoestimuladoras y/o moduladoras. La mayor solubilidad y la reducción de la cantidad de estructuras de  $\beta$ 3-glucanos distinguen los presentes materiales solubles de los materiales que contienen  $\beta$ -glucosa conocidos.

55 El manano es un polímero compuesto por unidades de manosa. En las levaduras, el manano se asocia a proteínas tanto en la superficie externa de la pared celular de la levadura, en forma de un polisacárido mucilaginoso, como en la membrana celular interna. Generalmente representa aproximadamente el 20-50 % del peso seco de la pared celular. El manano está unido a una cadena núcleo-péptido como un oligómero o polímero. El complejo contiene aproximadamente el 5-50 % de proteínas. El manano oligomérico está unido directamente a serina y treonina, mientras que el manano polimérico está unido a la asparagina a través de N-acetilglucosamina. En el complejo

mano-proteína, las unidades de manosa están unidas por enlaces alfa-1,6, alfa-1,2 y alfa-1,3. El presente método produjo mananos solubles concentrados y manosa glicanos, que tienen actividades biológicas útiles y características distintas en el análisis de RMN.

- 5 Se ha sugerido que los manano-oligosacáridos (MOS) se han liberado de las paredes celulares de levadura por acción proteolítica. El manano producido por proteólisis puede tener alto peso molecular, contener proteínas alergénicas y probablemente tener un gran peso molecular y mala solubilidad. Dichos productos de tipo MOS liberados tienen una utilidad limitada. En una realización específica, el presente método puede incluir etapas enzimáticas y proteolíticas adicionales. Se observa que en los presentes métodos, la hidrólisis alcalina beta elimina  
10 glicopéptidos de manosa unidos a O y/o unidos a N. Se observa además que los materiales peptídicos pueden tener efectos negativos de la estructura del producto e incluso tener inmunología negativa.

Los mananos más solubles y útiles de acuerdo con la presente memoria descriptiva se unen eficazmente a patógenos bacterianos del tracto intestinal y bloquean su capacidad para colonizar el tracto intestinal. Por ejemplo,  
15 *E. coli*, *Salmonella* spp. y *Vibrio cholera* tienen proteínas sobre su superficie (lectinas) que se unen a los residuos de azúcar de manosa de los mananos. La presente memoria descriptiva reveló composiciones de sacáridos activos novedosas que comprenden la mayoría de glicanos con un peso molecular mayor que el oligosacárido y capaces de tener una presentación polivalente y oligovalente de epítomos de oligosacáridos. El presente método produjo además grandes cantidades de secuencias de oligosacáridos terminales útiles para la unión de patógenos. La utilidad de los  
20 epítomos de carbohidratos oligovalentes y polivalentes para terapias anti-adhesión y tratamientos contra infecciones, o para interacciones con receptores de lectina de la superficie celular se conoce bien en la técnica y se revisa con frecuencia, por ejemplo, por K-A. Karlsson, y en la publicación de Nathan Sharon desde Beachey 1981 (Beachey, E. H. (1981) *J. Infect. Dis.* 143, 325-345). Los glicanos polivalentes se usan para la antiadhesión para prevenir la unión de patógenos al tejido del paciente. Por definición, el oligosacárido contiene menos de 10 residuos de monosacárido,  
25 Pm menor que 1700, mientras que el presente material comprende una cantidad principal de carbohidratos mayor de aproximadamente 5000 Da. Los presentes materiales son útiles contra los patógenos y microbios nocivos debido a la alta valencia que mejora la unión y la solubilidad de los glicanos de manosa novedosos.

Existe una clara necesidad en la técnica de un método rápido y económico de extracción de fracciones de sacáridos,  
30 que evite la pérdida de glucanos y mananos solubles en álcali, que tenga una mejora recuperación de glucanos y mananos, y que dé como resultado una preparación biológicamente activa.

Ahora se ha descubierto sorprendentemente que la composición inmunoestimuladora soluble que contiene la fracción de sacárido se puede aislar usando un sencillo procedimiento que implica dos etapas de hidrólisis, y que se  
35 obtienen excelentes rendimientos de un producto soluble con alta actividad inmunoestimuladora. La hidrólisis se puede complementar mediante tratamiento con enzimas u otros agentes o tratamiento mecánico, neumático o hidrostático o con calor y, si se desea, las propiedades de la fracción de sacárido pueden modificarse mediante tratamiento de ácido, grado de homogeneización o variando el tipo de enzima utilizada.

#### 40 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Un diagrama de flujo de una realización de un proceso para la producción de una composición inmunoestimuladora soluble que contiene una fracción de sacárido de acuerdo con la presente memoria descriptiva.

45 Figura 2. Un diagrama de flujo de otra realización para un proceso para la producción de una composición inmunoestimuladora soluble que contiene una fracción de sacárido de acuerdo con la presente memoria descriptiva.

Figura 3. Cuantificación de componentes de carbohidratos solubles por RMN. El material preparado como se muestra en el Ejemplo 1 (A) y una muestra de material de levadura hidrolizada de ácido comercial (B) se disolvieron en óxido de deuterio. Se añadieron 0,5  $\mu\text{mol}$  de éster metílico de fenilalanina (PheCOOMe) para el estándar de cuantificación. Se indican protones de PheCOOMe y señales de manano de levadura cuantificadas por integración.

50 Figura 4. Cromatograma del péptido Superdex de la fracción de sacárido derivatizada 2-AB analizada a 336 nm. Los estándares derivatizados 2-AB de dextrano 5000 y dextrano 1000 se eluyen en este sistema a 10,5 min y 15,8 min, respectivamente. La abundancia relativa del material con PM >5000 Da y entre 1000-5000 Da se calculó a partir del área del cromatograma como se indica en la figura.

55

## RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se define por las reivindicaciones.

La invención se refiere a un método para la producción de una composición inmunoestimuladora soluble en agua que contiene una fracción de sacárido, que comprende las etapas de:

- 5
- i) proporcionar material celular de levadura,
  - ii) someter dicho material celular de levadura a una hidrólisis con un álcali a un pH de aproximadamente 9 a 14 y una temperatura de aproximadamente 10 °C a 100 °C durante aproximadamente 10 min a 18 horas, y un ácido a un pH de aproximadamente 1,5 a 4, y una temperatura de aproximadamente 30 °C a 100 °C
  - 10 durante aproximadamente 1 a 48 horas para liberar mananos y glucanos del material celular de levadura, neutralizando el material,
  - iii) separar las fracciones solubles e insolubles en agua del material obtenido en la etapa ii), y, opcionalmente,
  - iv) someter la fracción soluble en agua de la etapa iii) a una etapa adicional de fraccionamiento,

15 en el que la fracción soluble en agua comprende mananos y beta-1,6 glucanos, y en el que la fracción soluble en agua es sustancialmente inodora e insípida.

Preferiblemente, la invención se refiere al método, en el que el material obtenido en la etapa ii) se pone en contacto adicionalmente con una solución acuosa y preferiblemente se mezcla en dicha solución acuosa.

La invención se refiere a una composición de manano de levadura soluble obtenida de acuerdo con los métodos de la invención.

25 Los inventores tienen una solicitud PCT anterior que describe productos de levadura en soluto con ácido optimizados, en comparación con estos, la presente invención reveló materiales con mayor contenido en sacáridos de mananos y β6-glucanos por encima del 14 %, o incluso más, mientras que la solicitud anterior tenía aproximadamente un 2 % de materiales de manosa. Para permitir una cuantificación más precisa por el mismo método, los productos de hidrólisis de ácido anteriores se compararon por RMN en la figura 3 y el EJEMPLO 2

30 mostrando que el material anterior contenía sólo aproximadamente el 12 % de los materiales de manosa de la presente memoria descriptiva. Además, cuando el material anterior contenía al menos un 10 % de oligosacáridos de manosa, el presente material no contiene en las fracciones preferidas prácticamente ningún oligosacárido. Por lo tanto, la cantidad de manano polivalente más útil se aumentó aproximadamente 10 veces mediante el nuevo proceso que incluye incluyendo hidrólisis de base/alcalina.

35 Aunque la levadura gastada de la industria de fermentación es especialmente útil en el presente proceso, se comprenderá claramente que el proceso es aplicable a cualquier fuente, tal como otras levaduras usadas en las industrias alimentaria y de fermentación. Estas incluyen, pero sin limitación, levaduras utilizadas en la producción de agentes transmisores de viscosidad, emulsionantes, fibras, películas, sustancias de recubrimiento, soportes para

40 cromatografía de afinidad y electroforesis en gel, en medios de cultivo celular, como almohadillas de filtro y en cemento. También son ampliamente utilizadas como espesantes alimentarios y como fuente de fibra dietética, y como vehículos y agentes de revestimiento en productos farmacéuticos. La presente memoria descriptiva está dirigida a levaduras derivadas de procesos de fermentación para la producción de alimentos o bebidas para seres humanos. Los tipos preferidos de levadura incluyen levaduras derivadas de la industria alcohólica.

45 El término "levadura" significa aquí microbio eucariota cultivable que tiene carbohidratos útiles para la producción de una composición inmunoestimuladora de glicano/sacárido por métodos de acuerdo con la invención, en una realización preferida, la levadura es una especie de hongo.

50 El experto en la técnica podrá determinar fácilmente las condiciones más adecuadas en la que el proceso de la invención puede aplicarse a otras especies de levadura.

El experto en la técnica será consciente de que para algunas aplicaciones de la composición inmunoestimuladora soluble que contiene la fracción de sacárido producida usando el método de la invención se proporciona

55 ventajosamente en forma seca. La preparación se seca adecuadamente por cualquier proceso adecuado, incluyendo, pero sin limitación, liofilización, tambor secador de rodillos, secado al horno, secado por pulverización, secado en anillo o secado usando un equipo formador de película, y cualquiera de los dos puede usarse sin procesamiento adicional, o puede molerse usando cualquier técnica adecuada a un tamaño de partícula preferiblemente de menos de 20 micrómetros. Para otras aplicaciones, es adecuado un producto húmedo, tal como

una pasta viscosa, y la preparación puede usarse sin procesamiento adicional o después de interrupción mecánica para aumentar su viscosidad y para reducir el tamaño de partícula.

De acuerdo con un aspecto, la especificación proporciona una composición inmunoestimuladora soluble que  
5 contiene la fracción de sacárido producida por el proceso de la invención. La composición inmunoestimuladora soluble que, en forma seca, contiene una fracción de sacárido, comprende preferiblemente  $\beta$ 1-6 glucano (por ejemplo, un 0,001-10 %, más preferiblemente un 0,005-5 %, y mucho más preferiblemente un 0,01-3 %, y mucho más preferiblemente un 0,01-1,5 % del peso seco) y manano (por ejemplo, un 1-50 %, más preferiblemente un 2-50 %, incluso más preferiblemente un 3-50 %, incluso más preferiblemente un 4-50 %, incluso más preferiblemente  
10 un 4-40 %, incluso más preferiblemente un 5-35 %, y mucho más preferiblemente 5-25 % del peso seco, incluso más preferiblemente entre un 10-20 % p/), preferiblemente en forma soluble en agua con las características de RMN de acuerdo con la invención.

La preparación o composición puede comprender preferiblemente beta 1-6, y 1-4, más preferiblemente beta 1-6  
15 glucano y mananos y menos del 8 %, o preferiblemente esencialmente está desprovisto de beta 1-3 glucanos o contiene menor cantidad de beta 1-3 glucanos. La composición comprende preferiblemente menos del 50 % de beta 1-6 glucano de la cantidad de  $\beta$ 3glucano, más preferiblemente menos del 30 % de beta 1-6 glucano de la cantidad de  $\beta$ 3glucano, incluso más preferiblemente menos del 25 % de beta 1-6 glucano, preferiblemente del 5 al 25 % de  $\beta$ 6-glucano de la cantidad de  $\beta$ 3glucano.  
20

La composición inmunoestimuladora soluble que contiene la fracción de sacárido se puede usar en solitario. Sin embargo, se proporcionará más comúnmente junto con otros componentes.

Se comprenderá claramente que la composición obtenida a partir del método de la invención es generalmente  
25 adecuada para su uso en productos para los que se sabe que son útiles los beta-glucanos y mananos. En los mismos casos, puede ser deseable o necesaria una purificación adicional, y si se pueden usar las etapas de purificación conocidas *per se*.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

También se entiende que cualquier intervalo numérico mencionado en el presente documento incluye todos los valores desde el valor inferior al valor superior. Por ejemplo, si se establece un intervalo de concentración como del 1 % al 50 %, se pretende que valores tales como del 2 % al 40 %, del 10 % al 30 %, o del 1 % al 3 %, etc., se  
30 enumeren expresamente en esta memoria descriptiva. Estos son únicamente ejemplos de lo que se pretende específicamente, y todas las posibles combinaciones de valores numéricos entre el valor más bajo y el valor más alto enumerados deben considerarse expresamente establecidas en esta solicitud.  
35

A menos que se indique otra cosa, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, condiciones de reacción, etc., utilizados en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones deben entenderse como modificados en  
40 todos los casos por el término "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos expuestos en la siguiente memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretende obtener mediante la presente invención. Como mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de los equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe al menos ser interpretado a la luz del número de  
45 dígitos significativos informados y aplicando técnicas de redondeo ordinarias.

Por la expresión "composición inmunoestimuladora que contiene fracción de sacárido" como se usa en el presente documento, se entiende una composición inmunoestimuladora que contiene una fracción de sacárido que estimula  
50 (por ejemplo, tiene un efecto mitógeno sobre, o induce o aumenta la expresión de citocina por un linfocito de vertebrado y/o otros, activa los glóbulos blancos, especialmente los macrófagos).

Por la expresión "fracción de sacárido", como se usa en el presente documento, se entiende una fracción soluble obtenida por los métodos de la presente invención y que contiene hidratos de carbono, oligosacáridos y otras moléculas de azúcar derivadas de los materiales celulares de levadura.  
55

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, se entiende por "sabor" cualquier sabor que sea salado, amargo, dulce, agrio, alcalino, umami, astringente, seco, muy fuerte, fresco, caliente, ardiente, ácido, picante, acre y/o metálico. Dicho sabor debe incluir todos y cada uno de los sabores, así como cualquiera y todos los regustos. Una vez más, esta lista no es exhaustiva, como reconocerá un experto en la técnica.

Por la expresión "sustancialmente insípido", como se usa en el presente documento, se entiende un compuesto o composición que no tiene sustancialmente sabor tras la ingestión inicial.

- 5 Por la expresión "sustancialmente inodora" como se utiliza en el presente documento, se entiende un compuesto o composición que no tiene sustancialmente olor tras la exposición o inhalación nasal inicial a través de una nariz.

La sustancia o composición farmacéutica de acuerdo con la memoria descriptiva puede administrarse de cualquier manera adecuada, aunque es preferible usar la administración oral.

10

El término "tratamiento" usado en el presente documento se refiere tanto al tratamiento con el fin de curar o aliviar una enfermedad o afección, como al tratamiento con el fin de prevenir el desarrollo de una enfermedad o una afección, también denominado tratamiento profiláctico. En una realización preferida, el tratamiento profiláctico por anti-adhesión que reduce la carga patógena, en otra realización preferida, el tratamiento profiláctico es un  
15 tratamiento inmunomodulador con aumento de una expresión de citocina o quimiocina. El tratamiento puede realizarse de forma aguda o crónica.

El término "paciente", como se utiliza en el presente documento, se refiere a cualquier mamífero humano o no humano que necesite tratamiento de acuerdo con la memoria descriptiva.

20

La nomenclatura de los carbohidratos sigue esencialmente las recomendaciones de la Comisión IUPAC-IUB sobre Nomenclatura Bioquímica. Los enlaces se indican con estructura de anómero y posiciones de enlace o versiones acortadas, por ejemplo, beta1,3, beta(1,3) o beta1-3, o  $\beta$ 1-3 o  $\beta$ 3 que significan lo mismo para las estructuras de acuerdo con la memoria descriptiva. Se supone que Glc (glucosa), Man (manosa), Gal, GlcNAc, GalNAc, NeuAc y  
25 NeuGc son de la configuración D, Fuc de la configuración L, y todos los azúcares presentes en la forma piranosa.

De acuerdo con la memoria descriptiva especificación, es posible incorporar la sustancia de acuerdo con la memoria descriptiva, opcionalmente junto con un vehículo, en una composición farmacéutica adecuada para el tratamiento de una afección debida a la presencia de un patógeno, tal como un virus o una bacteria, en un paciente, en una  
30 realización preferida en el tracto gastrointestinal o en el tracto respiratorio de un paciente, o para usar la sustancia de acuerdo con la especificación en un método para el tratamiento de tal afección. Los ejemplos de afecciones tratables de acuerdo con la memoria descriptiva son enfermedades infecciosas y diarreas.

La composición farmacéutica puede comprender también otras sustancias, tal como un vehículo inerte, o adyuvantes  
35 farmacéuticamente aceptables, vehículos, conservantes, etc., que se conocen bien por los expertos en la técnica.

Además, la sustancia se puede administrar junto con otros fármacos o sustancias terapéuticas o composiciones preferiblemente dirigidas a la inmunoestimulación y/o terapia de anti-adhesión.

Además, es posible utilizar la sustancia con el fin de identificar una o más adhesinas por cribado para secuencias que se unen a la sustancia. Dichas secuencias pueden ser, por ejemplo, proteínas o carbohidratos. La proteína de  
40 unión a carbohidratos puede ser una lectina o una enzima de unión a carbohidratos. El cribado se puede realizar, por ejemplo, mediante cromatografía de afinidad o métodos de reticulación por afinidad.

#### *Tratamientos antiinfecciosos por anti-adhesión*

45 Los mananos más solubles y útiles se unen eficazmente a patógenos bacterianos del tracto intestinal y bloquean su capacidad para colonizar el tracto intestinal. Por ejemplo, E. coli, Salmonella spp. y Vibrio cholera tienen proteínas sobre su superficie (lectinas) que se unen a los residuos de azúcar de manosa de los mananos. Parte de los inventores han demostrado que el tracto gastrointestinal humano contiene receptores para la diarrea de unión a manosa que causan los patógenos tal como la diarrea que causa E. coli, que también tienen receptores que se unen  
50 a manosa y glicanos, especialmente estructuras que comprenden Man $\alpha$ 3Man (PCT FI2003/00528). Los presentes inventores revelaron composiciones de sacáridos activos novedosas que comprenden la mayoría de glicanos con un peso molecular mayor que el oligosacárido y capaces de tener una presentación polivalente y oligovalente de epítomos de oligosacáridos. El presente método produjo además grandes cantidades de secuencias de oligosacáridos terminales útiles para la unión de patógenos. La utilidad de los epítomos de carbohidratos  
55 oligovalentes y polivalentes para terapias anti-adhesión y tratamientos contra infecciones, o para interacciones con receptores de lectina de la superficie celular se conoce bien en la técnica y se revisa con frecuencia, por ejemplo, por K-A. Karlsson, y en la publicación de Nathan Sharon desde Beachey 1981 (Beachey, E.H (1981) J. Infect. Dis. 143, 325-345). Los glicanos polivalentes se usan para la antiadhesión para prevenir la unión de patógenos al tejido del paciente. La adhesión de microorganismos es una primera etapa en la patogénesis de infecciones, donde la

especificidad de las adhesinas del agente infeccioso, y las estructuras receptoras, tales como las estructuras de glicano expresadas por las células epiteliales del órgano diana huésped son determinantes importantes de la gama de huésped y el tropismo tisular del patógeno. Con el fin de tratar una enfermedad o una afección debida a la presencia de un patógeno en el tracto gastrointestinal de un paciente, es posible utilizar la sustancia de acuerdo con la memoria descriptiva para la anti-adhesión, es decir, para inhibir la unión del patógeno a los receptores en el epitelio intestinal del paciente. Cuando la sustancia o composición farmacéutica de acuerdo con la memoria descriptiva se administra, competirá con el receptor en la unión de las bacterias, y todas o algunas de las bacterias presentes en el tracto gastrointestinal se unirán entonces a la sustancia de acuerdo con la memoria descriptiva en lugar de al receptor en el epitelio gástrico. Las bacterias pasarán entonces a través de los intestinos y saldrán del paciente unidas a la sustancia de acuerdo con la memoria descriptiva, dando como resultado una reducción del efecto de las bacterias sobre la salud del paciente.

De acuerdo con la memoria descriptiva, es posible tratar enfermedades debidas a la presencia de patógenos diarreogénicos, especialmente diarreas por anti-adhesión e inmunoestimulación.

#### *Tratamiento por inmunoestimulación*

La presente memoria descriptiva está dirigida a tratamientos de inmunoestimulación preferiblemente con el fin de estimular el sistema inmunitario para su protección contra patógenos. En una realización preferida, esta inmunoestimulación tiene el objetivo de inducir glóbulos blancos, tales como macrófagos, contra microbios patógenos, tales como virus, bacterias y/o hongos. En otra realización preferida, la inmunoestimulación se utiliza para equilibrar las reacciones inmunitarias para prevenir afecciones perjudiciales, tales como afecciones autoinmunes y/o alérgicas. El equilibrio de la inmunoestimulación se dirige típicamente a la activación e inactivación de poblaciones de células de linfocitos T auxiliares específicas. La inmunoestimulación está, en una realización preferida, mediada por un factor específico que incluye moléculas de quimiocinas o citocinas, tales como interleucina y/o interferón, y el efecto de la inmunoestimulación puede medirse como un cambio del factor o factores y/o como el efecto antimicrobiano de los glóbulos blancos.

Como se usa en el presente documento, el término "composición" significa una composición que se puede administrar a un ser humano que se ingiere por vía oral por el ser humano, barras, píldoras, cápsulas, administradas a un animal de compañía, que se ingiere por vía oral por un animal de compañía, complementos para un animal de compañía, comida para mascotas, comida para perros, comida para gatos, golosinas, galletas, piel cruda, golosinas, masticables, rellenos, salsa, bebidas, agua complementaria, y combinaciones de los mismos. La composición puede estar mojada, ser húmeda y/o seca.

Todos los porcentajes, partes y relaciones, como se usan en el presente documento, son en peso de la composición total, a menos que se especifique otra cosa. Todos los pesos que se refieren a los ingredientes enumerados se basan en el nivel activo y, por lo tanto, no incluyen disolventes o subproductos, que puedan estar incluidos en los materiales disponibles en el mercado, a menos que se especifique lo contrario.

Las especies de levadura adecuadas, que se utilizarán como material celular de levadura, de la presente memoria descriptiva incluyen, pero sin limitación, cepas de levadura de especies de *Saccharomyces* y de *Saccharomyces cerevisiae* (incluyendo cepas de levadura de panadero y cepas de levadura de cerveza), cepas *Kluyveromyces fragilis*, y *Candida*, tal como *Candida utilis*, y combinaciones de los mismos. Otras cepas de levadura, para y utilizadas como material celular de levadura, que son fuentes adecuadas de composición inmunoestimuladora soluble que contiene una fracción de sacárido incluyen preferiblemente especies de levadura de calidad alimentaria, tales como *Saccharomyces delbruekii*, *Saccharomyces rosei*, *Saccharomyces microellipsodes*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces polysporus*, *Candida albicans*, *Candida cloacae*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Hansenula wingei*, *Hansenula arni*, *Hansenula henricii*, *Hansenula Americana*, y combinaciones de las mismas. Estas cepas de levadura pueden producirse utilizando cultivo en nutrientes de calidad alimentaria, por fermentación discontinua o por fermentación continua.

Específicamente, el proceso de acuerdo con la presente memoria descriptiva se refiere a un método de producción de una composición inmunoestimuladora soluble que contiene una fracción de sacárido. En una realización ilustrada, el método o producción o proceso incluye una primera etapa de proporcionar material celular de levadura, por ejemplo, levadura de cerveza, (típicamente del 5 % al 50 %, del 5 % al 40 %, del 10 % al 30 %, particularmente del 15 % al 25 %, y más particularmente del 17 % al 23 % o del 19 % al 21 % de contenido seco, mucho más preferiblemente aproximadamente un 20 % de contenido seco), seguido de someter el material celular de levadura a etapas de hidrólisis con un álcali y un ácido para liberar mananos y glucanos del material celular de levadura.

En una realización preferida se utiliza la levadura de cerveza o crema de levadura de cerveza. Dicho material de levadura incluye materiales no solubles derivados de plantas, especialmente materiales no solubles derivados de plantas que comprenden polisacáridos vegetales tales como sacáridos de hemicelulosa y materiales de  $\beta$ -glucanos derivados de plantas, tales como beta-glucanos de cereal, preferiblemente el cereal es un cereal utilizado en un proceso de producción de cerveza, mucho más preferiblemente cebada. En otra realización preferida, el material producido a partir de la levadura de cerveza comprende cantidades mayores de materiales de levadura de cerveza y está desprovisto de o comprende sólo una cantidad menor de hidratos de carbono vegetales. En otra realización preferida, cualquier levadura fermentada con un material base de plantas o derivado de plantas es adecuada para el uso como material celular de levadura.

*Condiciones de reacción de la hidrólisis alcalina y ácida*

La memoria descriptiva está dirigida a una reacción alcalina capaz de mejorar el sabor y el olor del producto soluble, preferiblemente cuando la hidrólisis alcalina se realiza en combinación con la hidrólisis ácida. La memoria descriptiva se dirige además a la combinación de hidrólisis alcalina y ácida, cuando el tratamiento alcalino es capaz de mejorar la cantidad de mananos solubles, en una realización preferida, causando la liberación de glicanos unidos a N mediante una reacción de eliminación, y/o liberando glicanos unidos a O por una reacción de beta eliminación.

Estas reacciones reducen los péptidos/proteínas unidas a glicanos y mejoran la calidad del producto. Se sabe que los enlaces peptídicos a glicano pueden escindirise mediante diversas bases, por ejemplo, en NaOH aproximadamente 0,1-0,2 M, e incubación de varias horas a aproximadamente 48 horas, o a una temperatura elevada, tal como aproximadamente 50-70 grados de Celsius durante aproximadamente 0,5 a 8 horas, preferiblemente aproximadamente 2-8 horas a 50-60 grados de Celsius, que son condiciones preferidas suponiendo un ajuste del pH a un valor correspondiente de aproximadamente 13 debido a la capacidad tamponante del material de levadura.

La hidrólisis con un álcali puede realizarse adecuadamente a un pH de al menos 9, al menos 9,5, particularmente al menos 9,7, y más particularmente al menos 10, más particularmente al menos 10,5, y más particularmente al menos 11,5. La hidrólisis con un álcali puede realizarse adecuadamente a un pH de aproximadamente 11 a aproximadamente 14, preferiblemente a un pH de aproximadamente 12 a aproximadamente 13, mucho más preferiblemente a un pH de aproximadamente 12,5. La hidrólisis con un álcali puede realizarse adecuadamente a un pH entre aproximadamente 9,0 y 11, o un pH entre aproximadamente 11,0 y 13, o un pH entre aproximadamente 9,0 y 13.

El reactivo alcalino preferido para la hidrólisis es hidróxido sódico, se puede usar otro material alcalino aceptable para los alimentos, tal como otros hidróxidos de metal alcalino, especialmente hidróxido potásico KOH o hidróxidos de metales alcalinotérreos, preferiblemente  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  o  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  o mezclas de los mismos, de carbonatos, tales como carbonato sódico  $(\text{Na})_2\text{CO}_3$  o potásico  $(\text{K})_2\text{CO}_3$  o cálcico  $\text{CaCO}_3$ , o en una realización específica, amoniaco  $\text{NH}_3$ . Se prefieren reactivos alcalinos que contengan sodio para materiales de levadura cervecera. En una realización específica, el proceso incluye la producción de iones fosfato tales como la hidrólisis ácida por ácido fosfórico, y además incluye la etapa en la que se desala, y/o se neutraliza y/o se hidroliza de forma alcalina y precipita de forma alcalina la sal, tal como  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  que precipita fosfatos como fosfatos  $\text{Ca}^{2+}$ . La etapa de desalación de precipitación puede realizarse en el contexto de la etapa de separación, separando la sal fosfato precipitada y el material insoluble, o antes de la etapa de fraccionamiento.

La hidrólisis con un ácido puede realizarse adecuadamente a un pH de menos de 4,5, particularmente menor de 3,5, e incluso más particularmente menor de 2,5. La hidrólisis con un ácido puede realizarse adecuadamente a un pH de aproximadamente 1 a 4, preferiblemente a un pH de aproximadamente 2 a aproximadamente 3, más preferiblemente a un pH entre aproximadamente 2,1 y 2,8, más preferiblemente a un pH entre aproximadamente 2,2 y 2,7, mucho más preferiblemente a un pH de aproximadamente 2,3, 2,4 o 2,5.

La temperatura para realizar la hidrólisis, preferiblemente tanto alcalina como ácida, puede realizarse adecuadamente, al menos preferiblemente, a temperaturas elevadas que son preferiblemente al menos 30 °C, incluso más preferiblemente 40 °C, incluso más preferiblemente al menos 45 °C, al menos 50 °C, particularmente al menos 60 °C, más particularmente al menos 70 °C, e incluso más particularmente al menos 75 °C.

En una realización preferida, las etapas de hidrólisis alcalina se realizan a temperaturas de 0 °C a 100 °C, más preferiblemente a un intervalo de temperatura inferior de 0 °C a 60 °C, e incluso más preferiblemente de 10 °C a aproximadamente 90 °C, y en una realización preferida, de 10 °C a aproximadamente 50 °C. Las temperaturas

cercanas a 50 °C, de 30 °C a 65 °C, más preferiblemente de 40 °C a 55 °C, e incluso más preferiblemente de 45 °C a 55 °C se prefieren especialmente para la hidrólisis alcalina, especialmente en el contexto de levaduras de cerveza e hidróxido sódico.

Las reacciones de hidrólisis pueden realizarse con tiempos de reacción de unos pocos minutos, por ejemplo, 5 min, 5 especialmente para la hidrólisis alcalina, a varios días para la hidrólisis ácida.

La hidrólisis ácida se realiza, en una realización preferida, durante al menos 2 horas, particularmente durante al menos 3 horas, más particularmente durante al menos 5 horas, particularmente al menos 6 horas, y más particularmente al menos de 7 a 8 horas, e incluso más particularmente durante al menos 8-24 horas. La hidrólisis  
10 puede realizarse adecuadamente durante menos de 48 horas, más preferiblemente menos de 32 horas, o más preferiblemente en menos de 24 horas, más preferiblemente menos de 12 horas, particularmente menos de 10 horas, e incluso más particularmente menos de 9 horas. La hidrólisis, en una realización preferida, se realiza durante 2 a 6 horas, preferiblemente durante 3 a 5 horas, y mucho más preferiblemente aproximadamente 4 horas.

La hidrólisis ácida se realiza preferiblemente y con un ácido a un pH de aproximadamente 2 a 3 y una temperatura  
15 de aproximadamente 30 °C a 90 °C durante aproximadamente 2 a 48 horas.

La hidrólisis alcalina se realiza, en una realización preferida, durante al menos 1 minuto, más preferiblemente al menos 5 minutos, más preferiblemente al menos 10 minutos, más preferiblemente al menos 30 minutos, más preferiblemente de al menos al menos aproximadamente 10 minutos a 1 hora, más preferiblemente de 15 minutos a  
20 45 minutos, de 20 minutos a aproximadamente 40 minutos, o aproximadamente 30 minutos.

En otra realización preferida, el tiempo de reacción se aumenta y se usa menor temperatura y/o concentración alcalina, y la reacción dura al menos 1 hora, más preferiblemente al menos 1,5 horas, más particularmente durante al menos 2 horas, más particularmente durante al menos 3 horas, particularmente al menos 4 horas, y más  
25 particularmente al menos de 5 a 8 horas, e incluso más particularmente durante al menos 1-4 horas, o al menos 1-8 horas. La hidrólisis puede realizarse adecuadamente durante menos de 48 horas, más preferiblemente menos de 24 horas, más preferiblemente menos de 12 horas, particularmente menos de 10 horas, e incluso más particularmente menos de 9 horas. La hidrólisis, en una realización preferida, se realiza durante 1 a 6 horas, preferiblemente durante 1 a 5 horas, y mucho más preferiblemente, aproximadamente 1-3 horas.

Se sabe que una temperatura más alta, tal como 55 °C o más, puede aumentar las reacciones de caramelización, y favorecen menos a ciertos productos, el producto con el requisito de productos de caramelización menos coloreados se realiza preferiblemente a temperaturas inferiores con tiempos de reacción más largos.  
30

La hidrólisis con álcali puede realizarse adecuadamente durante al menos 10 min, 30 min, 1 hora, en particular al menos 2 horas, y al menos 3, 4, 5, 6, 7 u 8 horas. La hidrólisis puede realizarse adecuadamente durante menos de 12 horas, particularmente menos de 10 horas, e incluso más particularmente menos de 9, 8, 7, 6, 5, 4 o 3 horas. La hidrólisis con un ácido se puede realizar adecuadamente durante 1 a 8 horas, de 2 a 6 horas, preferiblemente durante 3 a 5 horas, y mucho más preferiblemente aproximadamente 4 horas. La hidrólisis con un ácido puede  
40 realizarse adecuadamente durante al menos 30 min, 1 hora, en particular al menos 2 horas, y al menos 3,4,5,6, 7 u 8 horas.

En una realización preferida, la hidrólisis alcalina se realiza sometiendo el material celular de levadura a una hidrólisis con un álcali a un pH de aproximadamente 9 a 13 y a una temperatura de aproximadamente 10 °C a 90 °C  
45 durante aproximadamente 10 min a 8 horas.

#### *Concentración preferida de ácido en la reacción*

La presente memoria descriptiva se refiere al uso de una cantidad mínima del ácido y la base. Las concentraciones  
50 finales preferidas del ácido en el proceso dependen de la cantidad de material seco en la mezcla de reacción. En una realización preferida, la cantidad de materia prima de levadura como material seco es de aproximadamente el 5-70 %, más preferiblemente el 5-50 %, más preferiblemente el 5-30 %, aún más preferiblemente el 10-25 %, incluso más preferiblemente el 15-25 %, o aproximadamente el 20 %. Se sabe que la levadura gastada preferiblemente concentrada procedente del proceso de fermentación, tal como la levadura de cervecería gastada, se usa con una  
55 concentración que comprende la cantidad preferida de peso seco de levadura, tal como aproximadamente el 20 % de peso seco. En otra realización, en medio concentrado como aproximadamente el 30 % de peso seco, o en otra realización en forma altamente concentrada, como aproximadamente el 40 % en peso seco. Las concentraciones en el intervalo medio preferidas son del 20 al 40 % de peso seco, más preferiblemente del 22 al 38 %, más preferiblemente del 25 al 35 %, aún más preferiblemente del 27 al 33 % de peso seco. Las concentraciones en el

intervalo alto preferidas son del 30 al 60 % en peso seco, incluso más preferiblemente del 30 al 50 % en peso seco, incluso más preferiblemente del 32 al 48 %, incluso más preferiblemente del 35 al 45 %. En una realización preferida, el presente proceso incluye una hidrólisis ácida y alcalina preferida y se usa una concentración preferida de material seco de levadura, más preferiblemente concentraciones en el intervalo medio o alto o con cualquier combinación de las mismas. Se prefieren las altas concentraciones para mejorar la eficacia del proceso y la eficiencia energética.

Se sabe que el efecto óptimo del ácido se obtiene ajustando el pH del material de levadura añadiendo ácido y/o base concentrada al material de levadura. El ácido o base concentrada puede tener una concentración de 0,1 a 10 M, preferiblemente de 0,5 M a aproximadamente 8 M. La concentración del ácido o base es varios o un orden de magnitud mayor que la concentración de ácido administrada deseada por el volumen de reacción.

La presente memoria descriptiva está dirigida a bajas cantidades de ácido optimizadas de aproximadamente 0,1 a 0,75 M, más preferiblemente 0,1-0,5 M, y cantidades de ácido más altas que se usarán con una materia prima concentrada, o a intervalos de pH inferiores (por ejemplo, pH 0,5-1,5), con mayor concentración de aproximadamente 0,5 M a 1,5 M, más preferiblemente de 0,75 M a 1,25 M. En una realización preferida, se usan bajas cantidades de ácido y ácido fosfórico. Se sabe que con las concentraciones administradas más altas por volumen en la reacción (concentración final) de aproximadamente 0,3 M a aproximadamente 2,0 M, más preferiblemente de aproximadamente 0,3 M a aproximadamente 1,5 M, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 M, o de 0,75 M a 1,25 M, se prefieren cantidades superiores para obtener una mayor solubilización de los glicanos preferidos.

Las concentraciones finales preferidas administradas para ácidos inorgánicos fuertes preferidos; ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ); son de aproximadamente 0,3 M a aproximadamente 2,0 M, más preferiblemente de aproximadamente 0,3 M a aproximadamente 1,5 M, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 M, o de 0,75 M a 1,25 M, y se obtiene una solubilización más alta de los glicanos, cuando la reacción se realiza a una temperatura de aproximadamente 80 grados Celsius (preferiblemente entre 70-100 grados Celsius, aún más preferiblemente entre 70 y 95 grados Celsius, incluso más preferiblemente entre 75 y 85 grados Celsius). El tiempo de reacción preferido es aproximadamente 4 horas, preferiblemente de 2 a 8 horas, más preferiblemente de 3 a 5 horas, mucho más preferiblemente de 3,5 a 4,5 horas. En una realización preferida, el intervalo de concentración final se utiliza para ajustar el pH a un valor preferido preferiblemente entre pH 1,5-4,0, más preferiblemente entre 2,0 y 3,5, incluso más preferiblemente entre 2,0 y 3,0.

El alcalino se administra preferiblemente para obtener el pH preferido. La concentración alcalina administrada por volumen de reacción es preferiblemente de aproximadamente 0,01 M a aproximadamente 10 M, más preferiblemente de aproximadamente 0,050 M a aproximadamente 5,0 M, más preferiblemente de aproximadamente 0,05 M a aproximadamente 4,0 M.

Los ácidos preferidos incluyen ácidos inorgánicos tales como ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ), ácido clorhídrico y ácido sulfúricos. En una realización preferida, el ácido es ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ).

Se observa que si la temperatura se aumenta, la cantidad de ácido/álcali y el tiempo de reacción pueden disminuir, y viceversa.

El material obtenido se neutraliza preferiblemente usando un álcali, si la última de las etapas de hidrólisis implica un ácido, y con un ácido si la última etapa de hidrólisis implica un álcali. El ácido y el álcali son preferiblemente adecuados para uso humano o animal, preferiblemente de calidad alimentaria.

En una realización preferida, la memoria descriptiva se dirige a un método en el que al menos la hidrólisis ácida y alcalina, y opcionalmente las etapas de neutralización se realizan en un recipiente o recipiente de reacción. Se sabe que esto es beneficioso ya que aumenta la eficacia y reduce los costes del proceso.

El material obtenido, preferiblemente neutralizado, que contiene tanto fracciones insolubles como solubles, de la etapa de hidrólisis se diluye adicionalmente en menor contenido/concentración de materia seca de lo que se usó en la etapa de hidrólisis y el material se pone en contacto con una solución acuosa durante un tiempo adecuado, preferiblemente de aproximadamente 30 min a aproximadamente 2 horas, más preferiblemente de aproximadamente 45 min a 1 h 15 min, y mucho más preferiblemente durante aproximadamente 1 hora. El contacto del material hidrolizado, y preferiblemente neutralizado, con una solución acuosa, consiste en aumentar la solubilización de los componentes solubles del material (véanse las figuras 1 y 2).

En una realización alternativa, el material celular de levadura se separa en componentes insolubles y solubles antes de la etapa de hidrólisis, la hidrólisis con un álcali y un ácido se realiza para componentes de material celular de levadura separados, y las fracciones solubles se separan del material celular de levadura hidrolizado y las fracciones solubles se combinan. Antes de combinar los componentes solubles, ambos componentes pueden ponerse en contacto con una solución acuosa para mejorar la solubilización de las fracciones solubles. Realizaciones alternativas de la memoria descriptiva y mostradas en la figura 2.

En una realización alternativa, el material celular de levadura se trata primero con un álcali, opcionalmente neutralizado, los componentes solubles e insolubles se separan y se realiza la etapa de hidrólisis ácida para los componentes separados. Se sabe que el material insoluble se hidroliza preferiblemente en condiciones con una mayor cantidad de ácido y/o una temperatura de reacción más alta y/o un tiempo de reacción más largo. Después de la hidrólisis ácida se combinan los componentes solubles. Antes de combinar los componentes solubles, ambos componentes pueden ponerse en contacto con una solución acuosa para mejorar la solubilización de las fracciones solubles.

En una realización alternativa, el material celular de levadura se trata primero con un ácido, opcionalmente neutralizado, los componentes solubles e insolubles se separan y se realiza la etapa de hidrólisis alcalina para los componentes separados. Se sabe que el material insoluble se hidroliza preferiblemente en condiciones con una mayor cantidad de base y/o una temperatura de reacción más alta y/o un tiempo de reacción más largo. Después de la hidrólisis alcalina se combinan los componentes solubles. Antes de combinar los componentes solubles, ambos componentes pueden ponerse en contacto con una solución acuosa para mejorar la solubilización de las fracciones solubles.

En otra realización, el material celular de levadura se puede separar en componentes solubles e insolubles que pueden procesarse con etapas de hidrólisis de acuerdo con la memoria descriptiva y los materiales obtenidos de esta manera pueden combinarse, por ejemplo, antes y después de la etapa de neutralización, ponerse en contacto con una solución acuosa, mezclarse y fraccionarse en fracciones solubles e insolubles. La fracción soluble obtenida de este modo incorpora una composición inmunoestimuladora soluble que contiene una fracción de sacárido de acuerdo con la memoria descriptiva.

El material obtenido, preferiblemente neutralizado, y opcionalmente diluido en un menor contenido/concentración de materia seca que se usó en la etapa de hidrólisis, se separa en una fracción soluble e insoluble, preferiblemente por centrifugación o filtración y se desecha o se recicla en la etapa de hidrólisis el material insoluble en solución (acuosa) (véanse las figuras 1 y 2).

La fracción soluble obtenida puede someterse a una etapa de fraccionamiento, mediante un método cromatográfico y/o un método de solución de separación de fases y/o ultrafiltración con un criterio de exclusión de cierto tamaño. Los métodos cromatográficos incluyen, pero sin limitación, absorción de impurezas cargadas y/o lipófilas (hidrófobas), cromatografía de exclusión por tamaño, o cromatografía de afinidad.

La ultrafiltración se puede realizar con exclusión de tamaño o corte con 1000 Da, 2000 Da, o con un corte de peso molecular de 3000 Da o superior. El corte preferido es de aproximadamente 1000 Da, el corte más preferido es de aproximadamente 3000 Da y el corte más preferido es de aproximadamente 2000 Da. La sal, las impurezas de degradación, y otras moléculas pequeñas, tales como monómeros de sacáridos, se filtran y los componentes inmunoestimuladores de sacáridos se retienen en la fracción soluble fraccionada y concentrada.

Los métodos de fraccionamiento preferidos incluyen métodos industriales con capacidad adecuada y que pueden fraccionar las moléculas preferidas, preferiblemente filtración en gel, ultrafiltración o precipitación, incluso más preferiblemente precipitación o ultrafiltración.

Los métodos de precipitación preferidos incluyen la precipitación con un disolvente, preferiblemente a baja temperatura, a partir del producto de hidrólisis ácida y alcalina, que contiene opcionalmente una cantidad sustancial de sales de las etapas de hidrólisis o del producto desalado.

El fraccionamiento preferido se realiza para separar las moléculas menos activas, una fracción de bajo peso molecular del producto, preferiblemente las moléculas de bajo peso molecular son menores de aproximadamente 500-5000 Da. En una realización preferida, las moléculas de bajo peso molecular a separar tienen un peso molecular inferior a 500 Da, incluso más preferiblemente tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 1000 Da,

incluso más preferiblemente tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 2000 Da, incluso más preferiblemente tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 3000. Los inventores revelaron que la mayor parte de las moléculas de sacáridos activas son sustancialmente mayores de 5000 Da en comparación con el Pm definido por el polímero de glucosa estándar. Por lo tanto, se prefiere en una realización específica aumentar la  
5 velocidad de la etapa de fraccionamiento, por ejemplo, la filtración, y eliminar el material de bajo peso molecular mediante el método de eliminación de moléculas aún más grandes, preferiblemente tienen un peso molecular inferior a aproximadamente 4000 Da, incluso eliminar moléculas con un peso molecular por debajo de 5000 Da. Se sabe que los niveles de corte 2000 y 3000 eliminan los oligosacáridos, que son menos útiles como moléculas monovalentes y los péptidos, que no se desean para las características de textura del producto.

10

La memoria descriptiva se dirige especialmente a nuevos productos fraccionados producidos por los procesos de fraccionamiento por tamaño que tienen esencialmente moléculas con peso molecular por encima de las fracciones de bajo peso molecular eliminadas, preferiblemente al menos por encima de 500 Da, incluso más preferiblemente por encima de 1000 Da, incluso más preferiblemente por encima de 2000 Da, o mucho más preferiblemente por  
15 encima de 3000 Da, y en una realización específica de procesos de alta eficacia de producción se elimina la fracción con Pm por debajo de 5000 Da o más preferiblemente 4000 Da.

La etapa de ultrafiltración puede realizarse forzando un extracto producido a partir de los procesos descritos en el presente documento, tal como una fracción soluble, a través de un ultrafiltro bajo presión. Adecuadamente, el  
20 ultrafiltro comprende una o más membranas semipermeables. La membrana semipermeable o ultrafiltro puede tener un corte de peso molecular de, por ejemplo, al menos 1000 Da, particularmente al menos 1500 Da, e incluso más particularmente al menos 2000 Da. En algunas realizaciones puede ser preferible utilizar al menos 3000 Da para métodos de alta eficacia, incluso un corte de 4000 o más, incluso más preferiblemente un corte de 5000 Da o más. Debe entenderse que el ultrafiltro puede tener un corte del peso molecular de cualquier valor entre los citados en el  
25 presente documento incluyendo, pero sin limitación, un corte de peso molecular de 500 Da, 1000 Da, 1500 Da, 2000 Da, 2500 Da y 3000 Da, y en una realización específica 3500 Da, 4000 Da, 4500 Da y 5000 Da. Las membranas de ultrafiltro adecuadas incluyen, pero sin limitación, membranas de fibras huecas disponibles en A/G Technology Corp, Needham, Mass, o filtros de membrana de celulosa de Millipore. Se sabe que el experto puede ensayar y optimizar el corte adecuado para separar la fracción de bajo peso molecular deseada para la ultrafiltración utilizando  
30 membranas de filtración disponibles y estándares de peso molecular adecuados que incluyen preferiblemente peso molecular de carbohidratos estándar con residuos de monosacáridos hexosa.

En una realización preferida, el corte de los filtros moleculares es un valor práctico similar al corte de la membrana de celulosa, más preferiblemente la membrana de celulosa Millipore de Pm 1000 Da o la membrana de celulosa  
35 Millipore de 3000 Da, o en otra forma de realización preferida, el corte correspondiente al corte similar correspondiente a membranas con un corte nominal (basado en el corte de membranas con Pm 1000 y 3000) de entre 500-2500 Da, más preferiblemente 500-2000 Da, más preferiblemente 1000-2000 Da y mayor intervalo (más cerca del corte de 3000), 2000-5000 Da, más preferiblemente entre 2000-4000, o más preferiblemente entre 2500 y 3500 Da. Se sabe que las membranas de ultrafiltración pueden retener una pequeña parte de las moléculas de Pm  
40 inferior y dejar pasar moléculas de Pm alto.

La etapa de ultrafiltración puede incluir opcionalmente el paso de la fracción soluble a través de dos o más ultrafiltros de diferentes cortes de peso molecular. La fracción final comprende una composición de sacárido enriquecido en la que una mayoría de sacáridos tienen un peso molecular que está entre los cortes de peso molecular de los  
45 ultrafiltros, para dicha fracción el límite inferior es el tamaño de la fracción de Pm inferior que se eliminará de acuerdo con la memoria descriptiva.

La fracción soluble puede someterse adicionalmente a una etapa de fraccionamiento para purificar, aislar o separar la fracción de sacárido. La purificación, aislamiento o separación puede realizarse de la manera similar a la descrita  
50 anteriormente o en los Ejemplos.

La composición inmunoestimuladora soluble que contiene la fracción de sacárido obtenida de acuerdo con la memoria descriptiva es sustancialmente inodora e insípida. Estas características son útiles cuando la composición inmunoestimuladora soluble que contiene la fracción de sacárido se utiliza en la preparación de complementos  
55 alimenticios, productos farmacéuticos y nutracéuticos. La fracción de sacárido inodora e insípida (inmunoestimuladora) obtenida de acuerdo con la memoria descriptiva puede usarse en la preparación de complementos alimenticios, aditivos, productos farmacéuticos y nutracéuticos.

La fracción de sacárido de la composición inmunoestimuladora soluble de acuerdo con la presente memoria

descriptiva comprende típicamente mananos, beta 1,6 glucanos y menos del 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o del 0,1 % o del 0,05 % de beta-1,3 glucano de materia seca. En una realización más preferida, la fracción de sacárido está esencialmente desprovista de beta-1,3-glucano.

5 Este proceso ilustrado descrito anteriormente se muestra en el diagrama de flujo de la figura 1 y un proceso alternativo en la figura 2.

En una realización preferida de producción de una composición inmunoestimuladora soluble que contiene una fracción de sacárido, el método comprende las etapas de proporcionar material celular de levadura, preferiblemente  
 10 un material celular de levadura de cerveza, y someter el material celular de levadura a una hidrólisis con un álcali a un pH de aproximadamente 12 a 13 y una temperatura de aproximadamente 20 °C a 60 °C o de aproximadamente 60 °C a 90 °C durante aproximadamente 0,5 a 5 horas y un ácido a un pH de aproximadamente 2 a 3 a una temperatura de aproximadamente 70 °C a 90 °C durante aproximadamente 3 a 5 horas, seguido de la neutralización del material obtenido, poner en contacto el material con una solución acuosa de manera que se mejore la  
 15 solubilización de los componentes solubles, preferiblemente en la menor concentración o el contenido de materia seca en el que se usó el material celular de levadura en las etapas de hidrólisis, separar las fracciones solubles e insolubles del material obtenido, y someter la fracción soluble de la etapa anterior a fraccionamiento con ultrafiltración, preferiblemente utilizando un corte de aproximadamente 1000 a 2000 o 3000 Da, y reducir la fracción ultrafiltrada a un material sólido.

20 Las preparaciones y composiciones y fracciones de la memoria descriptiva se pueden secar por cualquier proceso adecuado incluyendo, pero sin limitación, liofilización, secado en tambor de rodillos, secado al horno, secado por pulverización, secado en anillo, y combinaciones de los mismos y/o secado usando un equipo formador de película, y cualquiera puede usarse sin procesamiento adicional, o puede molerse usando cualquier técnica adecuada.

25 En una realización, el material celular de levadura puede alterarse, o cualquier material en las etapas del método puede tratarse con calor y/o mecánicamente, neumáticamente y/o hidrostáticamente, de manera que la solubilidad de la fracción de sacárido se aumente y/o para liberar mananos y glucanos del material celular de levadura y/o liberar mananos y glucanos de un material obtenido en cualquier etapa del método. El material celular de levadura,  
 30 por ejemplo, la levadura de cerveza o la crema celular de cerveza, puede homogeneizarse antes de la etapa i) del método de la presente memoria descriptiva. En una realización alternativa, se puede realizar homogeneización física y/o tratamiento térmico o tratamiento neumático, mecánico y/o hidrostático para cualquier material obtenido en el método de la memoria descriptiva.

35 Los métodos de purificación, aislamiento o fraccionamiento preferidos incluyen la eliminación de parte de los componentes no sacáridos principales tales como 1) desalación, en una realización preferida por precipitación de sal, tal como precipitación de fosfato por iones de calcio u otros, o usando ultrafiltración, 2) eliminación de moléculas iónicas o moléculas hidrófobas por adsorbentes específicos tales como matrices hidrófobas o de intercambio iónico, y/o 3) eliminación del material no soluble.

40 La purificación o fraccionamiento aumenta el contenido de sacáridos de la fracción de sacárido. La desalación por ultrafiltración después de una fuerte hidrólisis de ácido fosfórico aumenta la cantidad de sacáridos en la preparación. Preferiblemente, la fracción soluble obtenida, preferiblemente por ultrafiltración, y que contiene la fracción de sacárido, es sustancialmente insípida e inodora y muy adecuada para aditivos y complementos alimenticios y  
 45 bebidas y composiciones farmacéuticas.

#### Fraccionamiento, purificación o aislamiento de fracciones de sacáridos solubles

La presente memoria descriptiva se dirige también a fracciones de sacáridos purificadas o enriquecidas que  
 50 comprenden uno o varios de los sacáridos, con un aumento de la actividad biológica e inmunoestimuladora.

Los métodos de purificación preferidos incluyen los siguientes y sus combinaciones:

55 a) métodos cromatográficos tales como

- i. Cromatografías para la absorción de impurezas cargadas y/o lipófilas (hidrófobas)
- ii. Cromatografía de exclusión por tamaños, especialmente filtración en gel para eliminar las impurezas de bajo peso molecular
- iii. Cromatografías de afinidad con matrices que se unen a los sacáridos o parte de los mismos,

preferiblemente cromatografía sobre carbón activado

y/o

- 5 b) métodos de solución de separación de fases tales como extracción con disolventes y/o precipitación de impurezas o sacáridos. En una realización preferida se utiliza un disolvente orgánico para la precipitación, preferiblemente un alcohol o cetona, tal como metanol o etanol, más preferiblemente etanol; o se usa acetona para la precipitación de los sacáridos de tamaño preferido, y/o
- 10 c) centrifugación y separación de la solución y el precipitante, y/o
- d) procedimientos químicos o enzimáticos para degradar componentes no deseados, preferiblemente una hidrólisis alcalina suave para degradar las impurezas alcalinas lábiles y/o la hidrólisis enzimática de
- sacáridos del tipo glucógeno/almidón que comprenden Glcα.

Pueden usarse disolventes, por ejemplo los mencionados anteriormente, para precipitar y/o lavar materiales de cualquier etapa del presente método. En una realización, una etapa de hidrólisis alcalina se realiza en presencia de un disolvente, preferiblemente un alcohol, tal como etanol.

15

En una realización, pueden usarse enzimas para degradar componentes celulares y/o aumentar la extracción de sacárido durante el método de producción de la composición inmunoestimuladora soluble que contiene la fracción de sacárido.

- 20 La etapa enzimática puede utilizar una proteasa de alto pH a un pH alcalino, por ejemplo, a un pH de al menos 8,5, particularmente al menos 9, y más particularmente de al menos 9,2. El pH también puede ser adecuadamente inferior a 10,5, particularmente menor de 10, e incluso más particularmente menor de 9,5. El tratamiento de proteasa puede realizarse adecuadamente a una temperatura de al menos 45 °C y particularmente al menos 50 °C. El tratamiento de proteasa puede realizarse adecuadamente a una temperatura de menos de 70 °C, particularmente
- 25 menos de 65 °C, y más particularmente menos de 60 °C. El tratamiento de proteasa puede realizarse adecuadamente durante al menos 5 horas, particularmente al menos 8 horas, más particularmente al menos 10 horas, incluso más particularmente al menos 12 horas. El tratamiento de proteasa puede realizarse adecuadamente durante menos de 48 horas, particularmente menos de 36 horas, más particularmente menos de 24 horas, e incluso más particularmente menos de 18 horas. La etapa enzimática de la proteasa se precede o se sigue por incubación
- 30 con glucoamilasa (por ejemplo, de especies de *Aspergillus*), una amilasa (por ejemplo, de especies *Aspergillus*), una amilasa (por ejemplo, α-amilasas de *Bacillus subtilis*, *Aspergillus oryzae*; amiloglucosidasas de *Aspergillus niger* o moho *Rhizopus*) y/o una lipasa (por ejemplo, lipasa de *Pseudomonas cepacia*, *Candida rugosa* y *Mucor javanicus*; típicamente de aproximadamente el 0,05 %-1 % en peso). La incubación con glucoamilasa, amilasa y/o lipasa se realiza adecuadamente a pH neutro o ligeramente ácido y a temperatura elevada. Por ejemplo, el pH puede variar adecuadamente de al menos 3,5, particularmente de al menos 4, e incluso más particularmente de al menos 4,5. El
- 35 pH también puede variar adecuadamente de menos de 7, particularmente menos de 6, e incluso más particularmente menos de 5,5. La temperatura para realizar la incubación con glucoamilasa, amilasa y/o lipasa puede variar adecuadamente de al menos 40 °C, particularmente al menos 45 °C, y más particularmente al menos 50 °C. La temperatura también puede variar adecuadamente de menos de 70 °C, particularmente menos de 65 °C,
- 40 más particularmente menos de 60 °C. Pueden usarse adecuadamente temperaturas de al menos 60 °C, al menos 65 °C, al menos 70 °C, al menos 75 °C, al menos 80 °C, al menos 85 °C, o al menos 90 °C, particularmente si la proteasa, amilasa o lipasa es una enzima termoestable. La incubación con la proteasa alcalina también se puede seguir o preceder por incubación con una combinación de una glucoamilasa y una lipasa, una combinación de una amilasa y una lipasa, o una combinación de una glucoamilasa, una amilasa y una lipasa.

45

De manera adecuada, la proteasa de alto pH puede tener una actividad proteolítica óptima a un pH por encima de 7. Las proteasas adecuadas incluyen, pero sin limitación, las obtenidas de *Actinidia chinensis*, *Ananas comosus*, *Aspergillus* spp. (por ejemplo, *A. niger*, *A. niger* var. *awamori*, *A. oryzae*, *A. sojae*, *A. melleus*), *Bacillus* spp. (por ejemplo, *B. subtilis*, *B. alcalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. halodurans*, *B. lentus*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus*, *B. thermoproteolyticus*), *Carica papaya*, *Cryphonectria parasitica*, *Endothia parasitica*, *Ficus glabrata*, *Kluyveromyces lactis*, *Penicillium citrinum*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus niveus*, de ternero, cable o estómagos de bueyes o páncreas porcinos, y combinaciones de los mismos. Las proteasas adecuadas pueden incluirse, pero sin limitación, enzimas disponibles en el mercado, tales como subtilisina Carlsberg, subtilisina BPN<sup>1</sup>, subtilisina Novo, subtilisina 309, subtilisina 147 y subtilisina 168, Alcalase<sup>™</sup>, Savinase<sup>™</sup>, Primase<sup>™</sup>, Duralase<sup>™</sup>, Durazym<sup>™</sup>, Esperase<sup>™</sup>, y Kannase<sup>™</sup> (disponibles en Novo Nordisk A/S); Maxatase<sup>™</sup>, Maxacal<sup>™</sup>, Maxapem<sup>™</sup>, Optimase<sup>™</sup>, Properase<sup>™</sup>, Purafect<sup>™</sup>, Purafect OxP<sup>™</sup>, FN2<sup>™</sup>, y FN3<sup>™</sup> (disponibles en Genencor International Inc.); y Validase<sup>™</sup> AFP, concentrado Validase<sup>™</sup> FP, Validase<sup>™</sup> FP 500, Validase<sup>™</sup> FP II, concentrado Validase<sup>™</sup> TSP, concentrado de proteasa alcalina, Bromelaína (disponible en Valley Research, South Bend, Ind.), y combinaciones de los mismos.

Amilasas adecuadas incluyen aquellas de origen vegetal, animal, bacteriano o fúngico, y combinaciones de las mismas. Las amilasas incluyen, pero sin limitación, glucoamilasas o  $\alpha$ -amilasas obtenidas de *Bacillus* spp., (por ejemplo, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. subtilis*, *B. stearothermophilus*), *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger* var. *awamori*, *Microbacterium imperiale*, *Thermomonospora viridis*, malta de cebada (*Hordeum* spp.), páncreas porcino (*Sus* spp.), y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de amilasas útiles incluyen, pero sin limitación, amilasas disponibles en el mercado tales como Glucoamylase Concentrate, Duramyl™, Termamyl™, Fungamyl™ y BAN™ (disponibles en Novo Nordisk A/S); Rapidase™ y Purastar™ (disponibles en Genencor International Inc.); y Validase™ BAA, Validasem™ HT340L, Validase™ FAA, Validase™ AGS, Validase™ GA, Validase™ RGA (disponibles en Valley Research, South Bend, Ind.), y combinaciones de los mismos. La amilasa puede usarse adecuadamente a una concentración final de al menos el 0,001 %, particularmente al menos el 0,01 %, e incluso más particularmente al menos el 0,02 %. La amilasa puede usarse adecuadamente a una concentración final de menos del 0,1 %, particularmente menos del 0,05 %, e incluso más particularmente menos del 0,1 %.

15

Las lipasas útiles incluyen, pero sin limitación, lipasas de *Humicola* (sinónimo *Thermomyces*), por ejemplo, de *H. lanuginosa* (*T. lanuginosus*), *H. insolens*, una lipasa de *Pseudomonas*, por ejemplo, de *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes*, *P. cepacia*, *P. stutzeri*, *P. fluorescens*, *Pseudomonas* sp. cepa SD 705, *P. wisconsinensis*, una lipasa de *Bacillus*, por ejemplo, de *B. subtilis*, *B. stearothermophilus* o *B. pumilus* (documento WO 91/16422); *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Candida lipolytica*, *Candida rugosa*, *Mucor javanicus*, *Penicillium roqueforti*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus niveus*, *Rhizopusoryzae*, *Rhizopus arrhizus*, y combinaciones de los mismos. Las enzimas de lipasa disponibles en el mercado incluyen, pero sin limitación, Lipolase™ y Lipolase Ultra™ (Novo Nordisk A/S), y Lipasa 8000 fúngica y Lipasa 250 pancreática (disponible en Valley Research, South Bend, Ind.).

25

#### *Composiciones novedosas*

Las estructuras de las composiciones se estudiaron por RMN como se muestra en el EJEMPLO 2 y por cromatografía en el EJEMPLO 3.

30

La memoria descriptiva está dirigida a una nueva composición inmunoestimuladora soluble que contiene una fracción de sacárido y en la que la fracción de sacárido comprende mananos y beta-1,6 glucanos y menos del 1 % de beta-1,3 glucano de materia seca, y preferiblemente la cantidad de  $\beta$ 3-glucanos es inferior al 50 % de los  $\beta$ 6-glucanos, y en la que la composición es sustancialmente inodora e insípida.

35

Las composiciones de sacárido preferidas son solubles, preferiblemente al menos el 95 % solubles, incluso más preferiblemente el 98 % solubles, incluso más preferiblemente el 99 % solubles, y mucho más preferible el 100 % solubles en agua al menos como solución al 1 % p/p, en una realización también como una solución al 1,5 % o al 2,0 %. En una realización preferida, la solubilidad total de la composición está entre el 98 % y el 100 %, preferiblemente el 100 % como solución al 1 % p/p en agua.

40

Los inventores usaron espectrometría de RMN para revelar cantidades de componentes de manano y  $\beta$ 6-glucano solubles específicos de acuerdo con la memoria descriptiva. La RMN se calibró con un patrón interno y la cantidad de epítopos de monosacáridos se analizó a partir de las integrales del espectro de RMN que revelaban los siguientes componentes, como se muestra en el EJEMPLO 2 y la figura 3.

45

La composición preferida comprende  $\beta$ 1-6 glucano soluble raro al 0,001-10 %, más preferiblemente al 0,005-5 %, aún más preferiblemente al 0,01-3 %, e incluso más preferiblemente al 0,01-1,5 % p/p, y en una realización preferida, aproximadamente al 0,32 % p/p del peso seco.

50

La composición preferida comprende manano soluble novedoso al 1-50 %, más preferiblemente al 2-50 %, incluso más preferiblemente al 3-50 %, incluso más preferiblemente al 4-50 %, incluso más preferiblemente al 4-40 %, incluso más preferiblemente al 5-35 %, mucho más preferiblemente al 5-25 % o al 10-20 % p/ del peso seco, y en una realización preferida, aproximadamente al 14 % p/p.

55

Los datos revelaron que el método aumentó sustancialmente la cantidad de manano soluble pero no el  $\beta$ 6-glicano en la composición en comparación con un método de hidrólisis de ácido optimizado para aumentar la cantidad de moléculas solubles. En una realización preferida, la nueva composición comprende manano soluble y  $\beta$ 6-glucano en una relación de 4,4  $\mu$ mol a 0,016  $\mu$ mol (del 14 % al 0,32 %). Esto es muy diferente de la relación de la comparación con los métodos que utilizan sólo la hidrólisis ácida y que producen muchos menos manosa glucanos.

La fracción de sacárido resultante de los métodos de la memoria descriptiva comprenden mananos:glucanos en una relación de 14:0.32 o superior a 40:1 o  $\beta$ -glucano o  $\beta$ -glucanos o, preferiblemente menor del 20 % p/p, más preferiblemente menor del 10 % p/p, más preferiblemente menor del 5 % p/p, más preferiblemente menor del 4 %, incluso más preferiblemente menor del 3,5 %, incluso más preferiblemente menor del 2,5 %, mucho más preferiblemente menor del 2,3 % de los mananos en una base de peso seco.

La cantidad de  $\beta$ -glucano y manano solubles era en una realización preferida al menos aproximadamente del 14 % p/p, más preferiblemente al menos aproximadamente del 15 % p/p del peso seco de la composición, y se puede aumentar sustancialmente mediante optimización y/o eliminación de almidón, preferiblemente al menos al 19 % p/p.

El producto resultante de los métodos de la memoria descriptiva comprende al menos aproximadamente el 10 %, particularmente al menos aproximadamente el 14 %, más particularmente al menos el 15 % de sacáridos, aún más particularmente al menos aproximadamente el 16 % de sacáridos del producto total en una base de sólido seco (p/p), en el que los sacáridos son materiales de oligo/polisacárido solubles de  $\beta$ -glucano y  $\alpha$ -manosa, preferiblemente esencialmente polisacáridos. La composición comprende un residuo de almidón opcionalmente soluble de aproximadamente el 5 al 50 %, preferiblemente del 10-25 %. En una realización preferida, el almidón se elimina, por ejemplo, por tratamiento con amilasa, y la cantidad de materiales de oligo/polisacárido solubles de  $\beta$ -glucano y  $\alpha$ -manosa aumenta en consecuencia.

La fracción de sacárido resultante de los métodos de la memoria descriptiva comprenden al menos un 75 %, particularmente al menos un 80 % y más particularmente al menos un 85 % de los mananos de los sacáridos de  $\beta$ -glucano y  $\alpha$ -manano de pared celular totales en una base de sólidos secos.

En una realización específica, la fracción de sacárido resultante de los métodos de la memoria descriptiva comprende al menos el 1 %, en particular al menos el 2 %, más particularmente al menos el 2,2 % y más particularmente al menos el 2,3 % de beta 1-6 glucanos de los sacáridos totales en una base de sólidos secos.

El producto también comprende adecuadamente menos del 8 %, en particular menos del 2 %, más particularmente menos del 1 %, más particularmente menos del 0,5 %, más particularmente menos del 0,1 %, incluso más particularmente menos del 0,06 % de  $\beta$ 1-3 -glucanos de los sacáridos de  $\beta$ 6-glucano y  $\alpha$ -manano de pared celular totales en una base de sólidos secos.

El producto también comprende adecuadamente menos del 8 %, en particular menos del 2 %, más particularmente menos del 1 %, más particularmente menos del 0,5 %, más particularmente menos del 0,1 %, incluso más particularmente menos del 0,05 %, incluso más particularmente menos del 0,01 % de  $\beta$ 1-3-glucanos de la masa de composición total en una base de sólidos secos.

Los datos de RMN revelaron adicionalmente las características estructurales principales del  $\alpha$ -manano soluble, como se muestra en la figura 3 y el Ejemplo 2. La composición comprende estructuras terminales  $\text{Man}\alpha 3(\text{Man}\alpha 2)_m\text{Man}\alpha 6$  - , y  $\text{Man}\alpha 2\text{Man}\alpha 6$ - y  $\text{Man}\alpha 2(\text{Man}\alpha 2)_n\text{Man}\alpha 6$ , en las que m y n son números enteros de 1 a 10, independientemente, y las estructuras  $\text{Man}\alpha 6$  pueden formar un vehículo polivalente que comprende un polímero de los residuos  $\text{Man}\alpha 6$ , y preferiblemente hay una cantidad aproximadamente equimolar de las estructurales terminales finales no reductoras de  $\text{Man}\alpha 2$ - y  $\text{Man}\alpha 3$ , preferiblemente, de forma similar según como observarse a partir de un espectro de RMN.

#### *Distribuciones de tamaño de los nuevos mananos y glucanos solubles*

Al menos el 80 % (p/p), particularmente al menos el 85 % (p/p), más particularmente al menos el 90 % (p/p), incluso más particularmente al menos el 91 % (p/p) de los mananos totales en la fracción de sacárido pueden tener un peso molecular por encima de 3000 Da.

En una realización preferida, los mananos y glucanos tienen un peso molecular de al menos 500 Da, más preferiblemente al menos 1000 Da.

Los inventores estudiaron adicionalmente las composiciones preferidas por cromatografía de filtración en gel como se muestra en la figura 4, véase también el Ejemplo 3, y la composición preferida comprende la mayor parte de materiales de sacárido de glucano y manano eluyendo entre el volumen vacío y la posición del marcador de Pm del polisacárido hexosa de 5000 Da, y eluyendo opcionalmente una porción menor del material entre marcadores de Pm de 1000 y 5000 Da, cuando el marcador de Pm de 5000 eluye a aproximadamente 10,5 min, y el marcador Pm de

aproximadamente 15,8 min forman la columna Superdex Peptide 10/300 GL con un volumen de elución total de 18 ml y una longitud de columna de 30 cm, y cuando los hidratos de carbono se analizan como estructuras finales reductoras marcadas con diaminobenceno (2-AB).

5 Los datos analizados en el EJEMPLO 3 revelaron que la composición preferida comprende al menos aproximadamente el 50 %, más preferiblemente al menos aproximadamente el 70 %, incluso más preferiblemente al menos aproximadamente el 73 %, más preferiblemente al menos aproximadamente el 80 % en moles, y en la realización preferida, al menos aproximadamente el 85 %, más preferiblemente al menos aproximadamente el 87 % de materiales mayores de 5000 Da y aproximadamente el 13-20 % en moles de materiales que eluyen entre  
10 marcadores de Pm de 1000 y 5000 Da.

En base a la cantidad molar y la distribución del peso molecular, puede estimarse que la presente composición comprende cantidades muy pequeñas de materiales de oligosacáridos, especialmente después de la filtración en gel con un corte de 1000 Da, e incluso más preferiblemente con un corte de 2000 Da o 3000 Da. En base al peso, la  
15 composición comprende al menos aproximadamente el 91 % (p/p) de sacáridos solubles, preferiblemente materiales de manano, incluyendo los tres tipos de  $\alpha$ -manano, mayores de 5000 Da, más preferiblemente al menos el 95 % p/p, incluso más preferiblemente al menos el 97 % p/p, más preferiblemente al menos el 98 % p/p, y mucho más preferiblemente al menos el 95 % p/p. Se sabe que esto es muy diferente de los productos de hidrólisis ácida optimizados para la composición de oligosacáridos solubles de una solicitud de patente PCT anterior de los  
20 inventores que comprende preferiblemente al menos más del 10 % de oligosacáridos de manano específicos.

Específicamente, la composición preferida de polisacárido de mayor peso molecular de la presente memoria descriptiva comprende menos del 10 %, más preferiblemente menos del 5 %, más preferiblemente menos del 2 % p/p de oligosacáridos de Man $\alpha$ 3Man $\alpha$ 2-manosa u otros sacáridos de manosa que eluyen entre 12-16 minutos como  
25 sacáridos no derivatizados cuando se calcula como porción del total de los sacáridos que comprenden Man $\alpha$ 3Man $\alpha$ 2-manosa.

La memoria descriptiva reveló que es posible producir un polisacárido soluble con peso molecular relativamente como se muestra por el experimento de filtración en gel. La composición preferida comprende en su mayor parte  
30 materiales de sacárido que eluyen al volumen vacío de la columna Superdex y otra porción mayor que eluye como un alto hombro del pico en el volumen vacío a aproximadamente 7 min, preferiblemente como se muestra en la figura 4. La memoria descriptiva se dirige a los materiales de polisacárido solubles que tienen un patrón de absorbancia y absorbencias similares a los conjugados marcados con 2AB, como se muestra en la figura 4, en las condiciones experimentales de filtración en gel y etiquetado del Ejemplo 3.

35 *Realizaciones específicas*

La memoria descriptiva está dirigida a nuevas composiciones de acuerdo con la memoria descriptiva, el peso molecular de las estructuras está por encima de 4000 Da o 5000 Da y el material es soluble en agua.  
40

La memoria descriptiva está dirigida a una nueva composición en forma esencialmente seca. Se sabe que las composiciones son especialmente útiles en forma seca. La forma seca contiene preferiblemente menos del 30 %, más preferiblemente menos del 20 %, aún más preferiblemente menos del 10 % y mucho más preferiblemente menos del 5 % de agua, preferiblemente al menos cuando la composición se produce o se empaqueta.  
45

La memoria descriptiva se dirige a un complemento alimenticio, producto farmacéutico o nutracéutico que comprende la composición de acuerdo con la memoria descriptiva.

La memoria descriptiva se refiere a una composición terapéutica que comprende una composición seleccionada de  
50 un grupo: una medicina, una composición nutricional clínica, que tiene actividad farmacéutica, una composición terapéutica nutracéutica con actividad farmacéutica para su uso como medicamento.

La memoria descriptiva se dirige a una composición terapéutica en la que la composición es para el uso de profilaxis o tratamiento de una enfermedad en la que se necesita actividad inmunomoduladora y/o terapia de anti-adhesión  
55 contra patógenos.

La memoria descriptiva está dirigida al uso de una composición de cualquiera de las reivindicaciones para la producción de un medicamento para un tratamiento de una afección que necesita terapia inmunomoduladora o terapia antiadhesiva.

La memoria descriptiva se refiere a métodos de tratamiento que implican una etapa de administración de una composición terapéutica a un paciente.

- 5 Se contempla que las preparaciones y composiciones de acuerdo con la presente memoria descriptiva tienen valor en, por ejemplo, complementos alimenticios, productos farmacéuticos (por ejemplo, mejora de la respuesta inmune), piensos para animales y nutracéuticos. Por ejemplo, una composición terapéutica o un medicamento, un alimento o un pienso para animales pueden contener adecuadamente de 0,050 g a 50 g, más preferiblemente de 0,1 g a 30 g de preparación/kg de alimento o pienso. De manera adecuada, la preparación puede comprender al menos el 0,005  
10 %, en particular al menos el 0,01 %, más particularmente al menos el 0,02 %, más particularmente al menos el 0,05 %, e incluso más particularmente al menos el 0,1 % y menos del 5 %, en particular menos del 2 %, más particularmente menos del 0,5 %, e incluso más particularmente menos del 0,3 % del peso total del alimento o pienso, en una base peso/peso. Los piensos para animales adecuados incluyen, pero sin limitación, piensos para ganado vacuno, caballos, cerdos, aves de corral, peces (por ejemplo, crustáceos, mariscos), aves y mascotas (por  
15 ejemplo, gato, perro). Una composición líquida puede contener un 0,1 % -1 % en peso de la preparación de acuerdo con la presente memoria descriptiva. También hay numerosos usos para las composiciones inmunoestimuladoras solubles que contienen fracción de sacárido o la fracción de sacárido elaborada en solitario de acuerdo con la presente memoria descriptiva. Por ejemplo, se pueden usar composiciones inmunoestimuladoras solubles que contienen una fracción de sacárido o una fracción de sacárido en solitario en la industria de alimentación animal,  
20 teniendo ventajosamente la capacidad de unirse a micotoxinas y también a bacterias patógenas, impidiendo que las bacterias colonicen el tracto intestinal.

En una realización preferida, la memoria descriptiva se dirige a composiciones terapéuticas/medicamentos/alimentos/piensos altamente eficaces que comprenden menos del 2 % (peso/peso) de la  
25 composición, incluso más preferiblemente menos del 1 %, y mucho más preferiblemente menos del 0,5 %, siendo, en una realización preferida, la concentración activa entre el 0,0001 %-2 %, más preferiblemente entre el 0,001 %-1 %, incluso más preferiblemente entre el 0,001 %-0,5 %, incluso más preferiblemente entre el 0,001 %-0,1 %, incluso más preferiblemente entre el 0,001 %-0,05 %, incluso más preferiblemente entre el 0,001 %-0,04 %, incluso más preferiblemente entre el 0,001 %-0,025 %, e incluso más preferiblemente entre el 0,001 %-0,01 %. Estas  
30 concentraciones altamente eficaces son especialmente preferidas para la inmunomodulación. En una realización preferida, las composiciones para antiadhesión se aplican en las concentraciones anteriores multiplicadas por 5, por ejemplo, entre el 0,0005 %-10 %, y el 0,005-5 %, y el 0,005 %-0,2 % y el 0,005 %-0,05 %, o multiplicadas por 10, por ejemplo, el 0,0010 %-20 %, y el 0,010-10 %, y el 0,010 %-0,4 %, y el 0,01 %-0,1 %. En el caso de que el producto sea un complemento, la concentración se contará preferiblemente como concentraciones finales de formulación para  
35 el uso por el paciente humano o animal. Se sabe que la presente composición con cantidades crecientes de compuestos eficaces puede usarse en dosis más bajas reduciendo costes y posibles efectos secundarios de los tratamientos.

Por ejemplo, el complemento (alimenticio) que comprende composiciones inmunoestimuladoras solubles que  
40 contiene fracciones de sacáridos o fracciones de sacáridos en solitario elaboradas de acuerdo con la presente memoria descriptiva, puede utilizarse adecuadamente como estimuladores inmunes en alimentos y bebidas animales y humanos, productos farmacéuticos o emolientes, agentes para reducir el colesterol. Si se añaden a un emoliente, loción o crema y se usan para tratar una afección, las composiciones inmunoestimuladoras solubles que contienen una fracción de sacárido o fracciones de sacáridos en solitario, pueden estar presentes adecuadamente a  
45 una concentración (p/p) de al menos el 0,05 %, en particular al menos el 0,1 %, y más particularmente al menos el 0,5 %, y menos del 10 %, particularmente menos del 5 %, y más particularmente menos del 2 %. Convenientemente, las composiciones inmunoestimuladoras solubles, que contienen una fracción de sacárido o fracciones de sacáridos en solitario elaboradas de acuerdo con la presente memoria descriptiva, pueden usarse para tratar eccema, por ejemplo, por incorporación en una crema, loción o emoliente. El eccema incluye varias afecciones de inflamación de  
50 la piel, incluyendo la dermatitis atópica ("eccema atópico"), y afecta de aproximadamente el 10 % a aproximadamente el 20 % de la población mundial durante la infancia. El eccema parece ser una respuesta anormal del sistema inmunológico del cuerpo.

Por lo tanto, en un aspecto de la memoria descriptiva, las realizaciones preferidas incluyen, pero sin limitación,  
55 composiciones para nutrición o terapia, que incluyen preferiblemente, por ejemplo, una composición alimenticia, composiciones de complementos alimenticios, composiciones alimenticias dietéticas, una composición farmacéutica que incluye composiciones de fármacos recetados y de venta libre, composiciones nutricionales clínicas, composiciones de medicamentos tópicos, composiciones de medicina natural, una composición nutracéutica y aditivos nutracéuticos. Las composiciones están dirigidas para el uso por el sujeto o paciente que necesita la

composición, preferiblemente por humanos o animales, y mucho más preferiblemente por un sujeto humano. Se considera que los conceptos de medicamento o producto farmacéutico de acuerdo con la memoria descriptiva incluyen fármacos recetados y fármacos de venta libre, composiciones terapéuticas de nutrición clínica, composiciones de medicina tópica, composiciones de medicina natural, una composición nutracéutica con efecto terapéutico, y aditivos nutracéuticos con propiedades terapéuticas.

También es posible utilizar la sustancia de acuerdo con la memoria descriptiva en una materia alimenticia, o en una composición nutricional, tanto para seres humanos como para animales, por ejemplo en alimentos, leche, yogur, u otro producto lácteo, composiciones de bebidas y alimentos para lactantes. La composición nutricional o alimento descrito aquí no es leche humana natural. Se prefiere usar la sustancia de acuerdo con la memoria descriptiva como parte de un alimento denominado funcional o funcionalizado. Dicho alimento funcional tiene un efecto positivo sobre la salud de la persona o del animal mediante un efecto inmunoestimulador o inhibiendo o previniendo la unión de patógenos a células o tejidos diana, especialmente en el tracto gastrointestinal. La sustancia de acuerdo con la memoria descriptiva puede ser una parte de alimento definido o una composición alimenticia funcional. El alimento funcional puede contener otros ingredientes alimentarios conocidos aceptados por las autoridades que controlan los alimentos, como la Food and Drug Administration en Estados Unidos. La sustancia de acuerdo con la memoria descriptiva puede usarse también como aditivo nutricional, preferentemente como un alimento o un aditivo de bebida para producir un alimento funcional o una bebida funcional. Los alimentos y las composiciones alimenticias o complementos contienen al menos algunos nutrientes principales regulares tales como grasas, proteínas y carbohidratos, y preferiblemente nutrientes requeridos en cantidades bajas tales como vitaminas, minerales y sales.

La memoria descriptiva se dirige además al uso de las nuevas fracciones de sacáridos en métodos para la producción de composiciones farmacéuticas y/o terapéuticas y/o nutracéuticas, preferiblemente cuando las composiciones están dirigidas para el uso para el sujeto o paciente que necesita inmunomodulación o inmunoestimulación o tratamiento anti-infeccioso.

El presente aditivo alimentario o complemento (funcional o alimenticio) que comprende una composición inmunoestimuladora soluble que contiene una fracción de sacárido o una fracción de sacárido en solitario fabricada o preparada por el método de la memoria descriptiva, puede administrarse por vía oral o enteral. La forma en la que se administrará (por ejemplo, polvo, comprimido, cápsula, suspensión, solución, emulsión) el aditivo alimentario o el complemento que comprende una composición inmunoestimuladora soluble que contiene una fracción de sacárido dependerá del paciente y del tratamiento particular. La cantidad de preparación, complemento o composición que se va a administrar se determinará individualmente, y se basará en parte en la consideración de la afección del sujeto, la salud general del sujeto, y la gravedad del trastorno inmunoestimulador que se trata o alivia.

El complemento o aditivo que comprende una composición inmunoestimuladora soluble que contiene una fracción de sacárido o una fracción de sacárido en solitario, puede administrarse por vía oral, en forma líquida o sólida, ya sea a temperatura ambiente o enfriada, o por vía enteral a través de un tubo de alimentación. La composición inmunoestimuladora soluble que contiene la fracción de sacárido, o cualquier complemento o aditivo que comprende la misma, se puede administrar en solitario, en un vehículo biológicamente aceptable (por ejemplo, solución salina o agua) con otros ingredientes tales como vitaminas y minerales, o como parte de un alimento nutricional completo. Por ejemplo, la composición inmunoestimuladora soluble que contiene la fracción de sacárido o la fracción de sacárido en solitario, puede administrarse como un componente en un alimento líquido de alto contenido en fibra para alimentación oral o enteral, por goteo continuo o intermitente en un tubo de alimentación (por ejemplo nasogástrico, nasoduodenal, yeyunal). La preparación que comprende la composición inmunoestimuladora soluble que contiene la fracción de sacárido o la fracción de sacárido en solitario de la presente memoria descriptiva o cualquier complemento o aditivo que comprende la misma, puede incluir opcionalmente otros componentes, que se determinarán principalmente por la manera en la que se administrará la composición. Por ejemplo, una preparación o composiciones debe administrarse por vía oral en forma de comprimido o polvo, que puede incluir, además de una composición inmunoestimuladora soluble que contiene una fracción de sacárido, una carga (por ejemplo, almidón de maíz, sacarosa, lactosa), un aglutinante (por ejemplo carboximetilcelulosa, goma arábiga, gelatina), un adyuvante, un agente saporífero, un agente colorante y/o un material de recubrimiento (por ejemplo, cera o plastificante), y/u otros complementos nutricionales. Una preparación que comprende una composición inmunoestimuladora soluble que contiene una fracción de sacárido que se va a administrar en forma líquida puede incluir una composición fabricada por el método de la memoria descriptiva y, opcionalmente, un agente emulsionante, un diluyente (por ejemplo agua, solución salina estéril) y/o colorante o agente saporífero, o puede combinarse en una fórmula de alimentación completa que se va a administrar por vía oral o por tubo de alimentación en el tracto digestivo. Una fórmula de alimentación completa puede contener todos los requisitos nutricionales. Por ejemplo, tal fórmula de alimentación para administración oral o enteral podría contener una composición inmunoestimuladora soluble que

contiene una fracción de sacárido fabricada por el método de la memoria descriptiva, agua, una fuente de carbohidrato (por ejemplo, sacarosa, almidón de maíz hidrolizado), un aceite (por ejemplo, aceite maíz o soja), fuentes seleccionadas de vitaminas (por ejemplo, colina, cloruro, ácido ascórbico, acetato de alfa-tocofenilo, niacinamida, pantotenato cálcico, tiamina, riboflavina, filoquinona, cianocobalamina, vitamina D<sub>3</sub>); fuentes 5 seleccionadas de minerales (por ejemplo, citrato potásico, cloruro de magnesio, fosfato de calcio tribásico, citrato sódico, cloruro de potasio, sulfato de cinc); una fuente de proteína (por ejemplo, aislado de proteína de soja, caseinato de calcio) y lecitina.

Purificación adicional

10

La memoria descriptiva se dirige además a una fracción de sacárido soluble obtenida de acuerdo con el método de la invención o una fracción de sacárido soluble obtenida mediante una etapa de purificación adicional a partir de dicha fracción. La purificación adicional se puede seleccionar preferiblemente del grupo de eliminación de proteínas, lípidos, moléculas aromáticas o moléculas iónicas por métodos cromatográficos, preferiblemente métodos hidrófobos 15 o de intercambio iónico o de fase inversa, o fraccionamiento de tamaño adicional. La purificación adicional está preferiblemente dirigida al aislamiento de materiales de manano y/o b-glicano opcionalmente con un componente de almidón soluble. En una realización específica, el almidón se degrada por amilasa en realizaciones preferidas después de al menos una de las etapas de hidrólisis, preferiblemente después de la hidrólisis ácida y la glucosa y/o maltooligosacáridos resultantes se eliminan por fraccionamiento de acuerdo con la memoria descriptiva o por 20 fraccionamiento separado.

La memoria descriptiva se dirige además al uso de la fracción de sacáridos para su uso en la inmunoestimulación en seres humanos o animales, y para su uso en la fabricación de un alimento o bebida o producto terapéutico o farmacéutico o medicamento para la inmunoestimulación y/o la antiadhesión en seres humanos o animales.

25

La memoria descriptiva se dirige además al método que comprende además el uso de la fracción soluble de la etapa iii) o iv) en un alimento humano o pienso animal.

La memoria descriptiva se dirige además al método que comprende además el uso de la fracción soluble de la etapa 30 iii) o iv) en un producto seleccionado de un complemento alimenticio, producto farmacéutico, cosmético y nutracéutico.

La memoria descriptiva se dirige además a la composición derivada de levadura soluble que comprende una fracción de sacárido o una composición de sacárido purificada adicional para su uso en la inmunoestimulación en seres 35 humanos o animales y/o para su uso en la fabricación de un alimento o bebida para la inmunoestimulación en seres humanos o animales, preferiblemente en la que el alimento es un alimento sólido o un producto lácteo o producto alimenticio que comprende componentes de la leche o una fórmula para lactantes o en la que

40 la bebida es una bebida terapéutica o producto de bebida láctea o fórmula infantil o una composición para producir un producto de bebida láctea o una fórmula para lactantes añadiendo líquido.

Procesos de alto rendimiento usando ácidos y bases

45 Proceso general

*Hidrólisis alcalina por encima de pH 9*

El proceso preferido incluye un tratamiento alcalino combinado con hidrólisis ácida fuerte.

50

Los tratamientos alcalinos preferidos incluyen una solución alcalina de tratamiento con un pH de reacción final por encima de 8, más preferiblemente por encima de 9, más preferiblemente por encima de 9,5, incluso más preferiblemente por encima de 10, incluso más preferiblemente por encima de 11, incluso más preferiblemente por encima de 11, incluso más preferiblemente por encima de 12, incluso más preferiblemente 13 o incluso más preferiblemente hasta por encima de 13,5. El intervalo preferido de las condiciones alcalinas varía de un pH de 9 a 55 14, más preferiblemente de 9,5 a 13,5. El tiempo del tratamiento alcalino es de 10 min a 24 h, más preferiblemente de 0,5 h a 18 h, para reacciones cortas, incluso más preferiblemente de 1 h a 12 h, en una realización preferida, entre 1 y 8 horas, y en otra realización preferida, para una reacción rápida de entre 1 y 6 horas, incluso más preferiblemente entre 1,5 y 3,5 horas, mucho más preferiblemente aproximadamente 2,25 horas con un margen de

+/-1 hora, +/- 0,5 horas, +/- 0,25 horas. Las reacciones largas preferidas son de entre 8-30 horas, más preferiblemente entre 8-24 horas, más preferiblemente entre 8-20 horas

Las temperaturas preferidas para las reacciones alcalinas son entre 0-100 grados Celsius, más preferiblemente entre 10-90 grados Celsius. La temperaturas preferidas para reacciones moderadas son de 0-60 grados Celsius, preferiblemente entre 10-60 grados, para un intervalo más bajo (en una realización que incluye reacciones de lavado), preferiblemente entre 10-45 grados, preferiblemente entre 15-40 grados, más preferiblemente entre 18-35 grados, mucho más preferiblemente entre 20-30 grados Celsius, y para un intervalo superior para reacciones moderadas optimizadas para evitar la degradación de entre 35-60 grados Celsius, más preferiblemente entre 40-60 grados, más preferiblemente entre 45-60 grados Celsius. Los intervalos superiores preferidos son entre 60-100 grados Celsius, más preferiblemente entre 65-100 grados Celsius, más preferiblemente entre 70-100 grados Celsius, más preferiblemente entre 70-95 grados Celsius, y mucho más preferiblemente entre 70-90 grados Celsius, o aproximadamente 80 grados Celsius, con un margen de +/- 7, más preferiblemente 5 y mucho más preferiblemente 4 grados.

15

*Optimización de la hidrólisis alcalina y orden de la hidrólisis ácida/alcalina*

Los ejemplos 12 y 13 muestran ejemplos que presentan procesos altamente eficaces de hidrólisis de alto rendimiento para la producción y el efecto de la hidrólisis alcalina optimizada de la Tabla 1 con alto contenido de manosa que se muestra en la Tabla 2.

20

Proceso general

El proceso preferido incluye un tratamiento alcalino combinado con hidrólisis ácida fuerte.

25

*Reacciones moderadas con lavado que incluye alcalinos fuertes*

Los tratamientos alcalinos incluyen las condiciones alcalinas moderadas con intervalos preferidos bajos o cercanos a la temperatura ambiente que incluyen y están dentro de 0 a 60 grados de Celsius, más preferiblemente entre 10-45 grados. Las condiciones moderadas incluyen el lavado con un disolvente que no disuelve el polisacárido, incluyendo preferiblemente, soluciones razonablemente seguras y disolventes no tóxicos tales como alcohol, preferiblemente etanol, que contienen soluciones que contienen el alcalino, por ejemplo, entre pH 9-14, más preferiblemente entre pH 9-13, más entre pH 9-12,5, más entre pH 9,5-12, más preferiblemente entre pH 10-12 o aproximadamente 11,0. Los tiempos de reacción son muy rápidos de 0,1 a 3 h, o más preferiblemente de 0,5 a 2 h, o una reacción rápida entre 1 y 6 horas e intervalos preferidos en la misma. El alcohol preferido es etanol, la función del disolvente es mantener los polisacáridos en estado sólido al tiempo que tienen algunos efectos de hidrólisis y lavado. La concentración de la base, tal como hidróxido alcalino, tal como NaOH, está preferiblemente entre 1 mM o 1 M, preferiblemente aproximadamente 0,1 M con un intervalo de +/- 0,7 M (está entre 0,3-1,7 M), más preferiblemente +/- 0,5 M, más preferiblemente +/- 0,3 M. La concentración de etanol está preferiblemente entre 65-95 %, más preferiblemente entre 70-90 %, más preferiblemente entre 73-87 %, más preferiblemente entre 75-85 %, o aproximadamente 80 %. La concentración de etanol se ajusta para mantener el alcalino en la solución.

30

35

La Tabla 2 muestra que el lavado con alcalino puede aumentar sorprendentemente la pureza del producto manano de la hidrólisis ácida de aproximadamente el 15 a aproximadamente el 20 %. Esto dará lugar a un aumento considerable en el rendimiento. En una realización específica, el lavado alcalino se realiza después de la hidrólisis ácida.

45

*Tratamiento de hidrólisis alcalina fuerte media*

Los inventores revelaron que las reacciones alcalinas fuertes medias producen eficazmente una composición de glicano altamente pura. Por ejemplo, el ejemplo 14 y la Tabla 2 muestran que la mayor cantidad relativa (pureza) de mananos, el 23,5 % (p/p) de producto extraído, se obtiene en un proceso en el que el material de levadura se hidroliza primero a pH 10 y luego a pH 2,5, de acuerdo con el Ejemplo 12. Se obtiene también una pureza elevada de mananos, 19,3 % (p/p), cuando las etapas de hidrólisis se invierten, como se describe en el Ejemplo 13.

50

En una realización preferida por separado, la memoria descriptiva se dirige a la reacción en la que la hidrólisis ácida se sigue en primer lugar de hidrólisis alcalina y en la otra realización, se realiza preferiblemente una hidrólisis alcalina en primer lugar y después una hidrólisis ácida. Se prefieren las reacciones de hidrólisis alcalina fuerte media debido al alto rendimiento de los mananos puros y debido a reacciones secundarias limitadas tales como la

55

coloración.

La hidrólisis alcalina fuerte media se realiza, por ejemplo, entre un pH 8,5 -14, más preferiblemente entre pH 8,5-13, más entre pH 9-12,5, más entre pH 9-12, más preferiblemente entre pH 9,0-11,5, incluso más preferiblemente entre pH 9,0-11, o aproximadamente 10 con un margen de +/- 0,7, más preferiblemente 0,5 y mucho más preferiblemente 0,3 unidades de pH (por ejemplo, pH entre 9,7 y 10,3). Preferiblemente, las temperaturas de reacción para la hidrólisis alcalina fuerte media en los mayores intervalos de temperatura están entre 60-100 grados Celsius, más preferiblemente entre 65-100 grados Celsius, más preferiblemente entre 70-100 grados Celsius, más preferiblemente entre 70-95 grados Celsius, y mucho más preferiblemente entre 70-90 grados Celsius, o aproximadamente 80 grados Celsius, con un margen de +/- 7, más preferiblemente 5 y mucho más preferiblemente 4 grados. Los tiempos de reacción son de 10 min a 24 h, más preferiblemente de 0,5 h a 18 h, para reacciones cortas, incluso más preferiblemente de 1 h a 12 h, en una realización preferida, entre 1 y 8 horas, y en otra realización preferida, para una reacción rápida de entre 1 y 6 horas, incluso más preferiblemente entre 1,5 y 3,5 horas, mucho más preferiblemente aproximadamente 2,25 horas con un margen de +/-1 hora, +/- 0,5 horas, +/- 0,25 horas. En una realización separada, las reacciones largas preferidas son de entre 8-30 horas, más preferiblemente entre 8-24 horas, más preferiblemente entre 8-20 horas.

#### *Tratamiento de hidrólisis alcalina fuerte*

20 Los inventores revelaron que las reacciones alcalinas fuertes producen eficazmente las mayores cantidades de la composición de glicano preferida. Por ejemplo, el ejemplo 14 y la Tabla 2 muestran que el mayor rendimiento total de los mananos preferidos y las mayores cantidades de extracto total se obtienen con las condiciones alcalinas más elevadas con pH 13.

25 La hidrólisis alcalina fuerte se realiza, por ejemplo, entre un pH 11 -14, más preferiblemente entre pH 11,5-14, más entre pH 11,5-14, más entre pH 12-14, más preferiblemente entre pH 13 con un margen de +/- 0,7, más preferiblemente 0,5 y mucho más preferiblemente 0,3 unidades de pH (por ejemplo, pH entre 9,7 y 10,3).

Preferiblemente, las temperaturas y tiempos de reacción son como se definen para la hidrólisis alcalina fuerte. En una realización preferida por separado, la memoria descriptiva se dirige a la reacción preferida en la que la hidrólisis alcalina se sigue primero por hidrólisis ácida (rendimiento total de manano más alto por encima del 5 % en los ejemplos 12 y 13), y en la otra realización, se realiza preferiblemente la hidrólisis ácida primero y luego la hidrólisis alcalina. Se prefieren las reacciones de hidrólisis alcalina fuerte debido al mayor rendimiento de los mananos relativamente puros.

35

#### *Concentración preferida de ácido en la reacción*

La presente memoria descriptiva se refiere al uso de una cantidad mínima del ácido y la base. Las concentraciones finales preferidas del ácido en el proceso dependen de la cantidad de material seco en la mezcla de reacción. En una realización preferida, la cantidad de materia prima de levadura como material seco es de aproximadamente el 5-70 %, más preferiblemente el 5-50 %, más preferiblemente el 5-30 %, aún más preferiblemente el 10-25 %, incluso más preferiblemente el 15-25 %, o aproximadamente el 20 %. Se sabe que la levadura gastada preferiblemente concentrada procedente del proceso de fermentación, tal como la levadura de cervecera gastada, se usa con una concentración que comprende la cantidad preferida de peso seco de levadura, tal como aproximadamente el 20 % de peso seco. En otra realización, en medio concentrado como aproximadamente el 30 % de peso seco, o en otra realización en forma altamente concentrada, como aproximadamente el 40 % en peso seco. Las concentraciones en el intervalo medio preferidas son del 20 al 40 % de peso seco, más preferiblemente del 22 al 38 %, más preferiblemente del 25 al 35 %, aún más preferiblemente del 27 al 33 % de peso seco. Las concentraciones en el intervalo alto preferidas son del 30 al 60 % en peso seco, incluso más preferiblemente del 30 al 50 % en peso seco, incluso más preferiblemente del 32 al 48 %, incluso más preferiblemente del 35 al 45 %. En una realización preferida, el presente proceso incluye una hidrólisis ácida y alcalina preferida y se usa una concentración preferida de material seco de levadura, más preferiblemente concentraciones en el intervalo medio o alto o con cualquier combinación de las mismas. Se prefieren las altas concentraciones para mejorar la eficacia del proceso y la eficiencia energética. Estas concentraciones de materias primas de levadura o similares son preferidas para la hidrólisis alcalina.

La presente memoria descriptiva está dirigida a bajas cantidades de ácido optimizadas de aproximadamente 0,1 a 0,75 M, más preferiblemente 0,1-0,5 M, y cantidades de ácido más altas que se usarán con una materia prima concentrada, o a intervalos de pH inferiores (por ejemplo, pH 0,5-1,5), con mayor concentración de

aproximadamente 0,5 M a 1,5 M, más preferiblemente de 0,75 M a 1,25 M. En una realización preferida, se usan bajas cantidades de ácido y ácido fosfórico. Se sabe que con las concentraciones administradas más altas por volumen en la reacción (concentración final) de aproximadamente 0,3 M a aproximadamente 2,0 M, más preferiblemente de aproximadamente 0,3 M a aproximadamente 1,5 M, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 M, o de 0,75 M a 1,25 M, se prefieren cantidades superiores para obtener una mayor solubilización de los glicanos preferidos.

Las concentraciones finales preferidas administradas para ácidos inorgánicos fuertes preferidos; ácido clorhídrico, ácido sulfúrico o ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ); son entre 0,10 M a aproximadamente 2,0 M, de aproximadamente 0,3 M a aproximadamente 2,0 M, más preferiblemente de aproximadamente 0,30 M a aproximadamente 1,5 M, preferiblemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 M, o de 0,75 M a 1,25 M, y se obtiene una solubilización más alta de los glicanos, cuando la reacción se realiza a una temperatura de aproximadamente 80 grados Celsius (preferiblemente entre 70-100 grados Celsius, aún más preferiblemente entre 70 y 95 grados Celsius, incluso más preferiblemente entre 75 y 85 grados Celsius). El tiempo de reacción preferido es aproximadamente 4 horas, preferiblemente de 2 a 8 horas, más preferiblemente de 3 a 5 horas, mucho más preferiblemente de 3,5 a 4,5 horas. En una realización preferida, el intervalo de concentración final se utiliza para ajustar el pH a un valor preferido preferiblemente entre pH 1,5-4,0, más preferiblemente entre 2,0 y 3,5, incluso más preferiblemente entre 2,0 y 3,0.

#### 20 *Hidrólisis ácida y alcalina combinada*

La memoria descriptiva está dirigida a someter el material celular de levadura a una hidrólisis con un álcali a un pH de aproximadamente 9 a 14 y a una temperatura de aproximadamente 10 a 100 °C durante aproximadamente 10 minutos a 8 horas y un ácido a un pH de aproximadamente 1,5 a 4 y una temperatura de aproximadamente 30 a 100 °C durante aproximadamente 1 a 48 horas, neutralizar el material, poner opcionalmente en contacto el material con una solución acuosa. En una realización preferida, la hidrólisis con un álcali se realiza a un pH de aproximadamente 9 a 13 y a una temperatura de aproximadamente 10 a 90 °C durante aproximadamente 10 minutos a 8 horas, y la hidrólisis ácida se realiza a un pH de aproximadamente 2 a 3 y una temperatura de aproximadamente 30 a 90 °C durante aproximadamente 3 a 48 °C.

La memoria descriptiva se dirige además a un método de hidrólisis con la hidrólisis con un álcali a un pH de aproximadamente 9 a 13 y a una temperatura de aproximadamente 10 °C a 90 °C durante aproximadamente 10 min a 8 horas y la hidrólisis ácida se realiza a un pH de aproximadamente 2 a 3 y a una temperatura de aproximadamente 30 a 90 °C durante aproximadamente 3 a 48 horas. La memoria descriptiva se dirige además a un método de hidrólisis en el que la hidrólisis con un álcali a un pH de aproximadamente 9 a 13 y una temperatura de aproximadamente 50 °C a 100 °C durante aproximadamente 0,5 horas a 8 horas, y la hidrólisis ácida se realiza a un pH de aproximadamente 2 a 3 y a una temperatura de aproximadamente de 60 a 90 °C durante aproximadamente 1 a 4 horas.

La memoria descriptiva se dirige además al método de hidrólisis, en el que la hidrólisis alcalina se realiza por lavado con una solución alcalina a pH 9-13 de 0,1 a 3 h, más preferiblemente entre 10-45 grados. La memoria descriptiva se dirige además al método de hidrólisis, en el que la hidrólisis alcalina se realiza entre un pH de 9-12,5, con un tiempo de reacción de 1 h a 12 horas, en intervalos de temperatura entre 60 y 100 grados Celsius. La memoria descriptiva se dirige además al método de hidrólisis, en el que la hidrólisis alcalina se realiza entre un pH de 11,5-14, con un tiempo de reacción de 1 h a 12 horas, en intervalos de temperatura entre 60 y 100 grados Celsius.

La memoria descriptiva se dirige además a una composición de manano de levadura soluble, en la que la fracción de sacárido comprende beta1-6 glucano al 0,001 - 10 %, más preferiblemente al 0,005 - 5 % y más preferiblemente al 0,01 - 3 %, y mucho más preferiblemente al 0,01 - 5 % del peso seco. La composición comprende manano al 5-25 % o al 10-20 % p/p del peso seco y la cantidad de  $\beta$ 6-glucano o  $\beta$ -glucanos es menor del 5 % p/p del peso seco. La composición comprende al menos aproximadamente el 80 % en moles de materiales mayores de 5000 Da y como máximo el 20 % en moles de peso molecular de materiales de entre 1000 y 5000 Da, como se muestra por el experimento de filtración en gel Superdex, más preferiblemente hay al menos un 85 % de material, más preferiblemente al menos un 90 % del material de más de 5000 Da. La memoria descriptiva se dirige además a la composición, en la que la cantidad de sacáridos que comprenden Man $\alpha$ 3Man $\alpha$ 2 es al menos el 5 % de todos los epítomos de manosa, y más preferiblemente al menos el 8 % de todos los epítomos de manosa, y más preferiblemente al menos el 10 % de todos los epítomos de manosa, más preferiblemente al menos el 15 % de todos los epítomos de manosa, más preferiblemente al menos el 17 % de todos los epítomos de manosa, más preferiblemente al menos aproximadamente el 20 % de todos los epítomos de manosa, más preferiblemente al

menos aproximadamente el 23 % de todos los epítomos de manosa (o estructuras), más preferiblemente al menos aproximadamente el 25 % de todos los epítomos de manosa (o estructuras), más preferiblemente al menos aproximadamente el 28 % de todos los epítomos (o estructuras) de manosa, como se muestra en los ejemplos y la Tabla 4. La memoria descriptiva se dirige a la composición, en la que la composición tiene una relación de manano/almidón de al menos aproximadamente 0,95 y una relación de manano/polipéptido de al menos aproximadamente 0,5 en base a las integrales de señal de protón H1 (como se define en el ejemplo 14) y a otras relaciones preferidas para estos.

La memoria descriptiva se dirige especialmente a la composición preferida en la que las composiciones se producen utilizando los métodos de acuerdo con la memoria descriptiva.

La memoria descriptiva se dirige además al pretratamiento de los materiales que incluyen uno o varios seleccionados del grupo: 1) Autólisis, preferiblemente incubando la materia prima de levadura a pH entre aproximadamente 3-7, más preferiblemente entre 3,5 y 6,5, incluso más preferiblemente entre 4 y 6,5 durante al menos aproximadamente 0,5-48 h, más preferiblemente 1-24 h, aún más preferiblemente 2-16 h, a temperaturas de 20 a 85 grados Celsius, más preferiblemente 30 a 80 grados Celsius, en realizaciones preferidas entre 30 y 60 grados de Celsius o entre 60 y 85 grados Celsius. El material de levadura intacta (pH de aproximadamente 6) se trató térmicamente en los ejemplos 12 y 13 y mostró algunos buenos resultados en el Ejemplo 14. La presente memoria descriptiva se dirige adicionalmente al uso del lavado alcalino como pretratamiento antes de la hidrólisis ácida y alcalina fuerte con buenos efectos como se presupone por los ejemplos 12 y 13.

El documento JP2006169514 es un antecedente relativamente cercano con respecto a la hidrólisis alcalina, sin embargo, el proceso utiliza una reacción ácida muy corta para precipitar la proteína, perdiendo de este modo el material y conduciendo el proceso a una fracción que contiene cantidades de glucano sustancialmente más altas (sin mananos unidos a proteína/péptido). El documento US2005020490 tiene el objetivo de producir fracciones puras de manano o glucano sin b6-glucano y la presente hidrólisis ácida con respecto a materiales de levadura completos preferiblemente sin fraccionamiento.

La invención se describirá ahora con detalle a título de referencia solamente a los siguientes ejemplos no limitantes.

### EJEMPLO 1

Procesamiento de levadura de cerveza de acuerdo con el proceso mostrado en el método de la figura 1

El material celular de levadura (suspensión que consiste en aproximadamente el 20 % de materia seca) se trató con NaOH a pH 12 o 12,5 o 13 durante 2 horas a +80 °C y después se enfrió a temperatura ambiente. Después, el material se trató con ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) a pH 2,5 durante 4 horas a +80 °C, y después se neutralizó con NaOH a temperatura ambiente.

El material se diluyó al 1 % de materia seca con agua y se incubó en agitación suave a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se centrifugó (3000 o 4000 rpm, 1811 o 3220 rcf, 5-20 min a TA), y la fracción insoluble se descartó. El sobrenadante se sometió a ultrafiltración en una célula de ultrafiltración agitada (Millipore) con membranas de ultrafiltración (celulosa regenerada, Millipore) NMWL 1000 o 3000.

Se liofilizó el material soluble por encima de PM de 1000 o 3000 (dependiendo de la membrana en uso).

El material de levadura hidrolizado con ácido comercial se trató con NaOH 50 mM en etanol al 80 %. Los lavados se desecharon y se preparó una solución al 1 % a partir de la fracción insoluble en etanol al 80 % en agua y se incubó como se ha descrito anteriormente.

### Tratamiento con Glucanex

El material celular de levadura se hidrolizó con álcali y se trató con Glucanex (lisando enzimas de *Trichoderma harzianum*, 1,18 U/g, Sigma) 1-4 mg/ml a +37 °C durante 6-23 horas. El tratamiento se terminó por incubación a +80 °C durante 0,5 h. A continuación, el material tratado con ácido y material se procesó adicionalmente como se describe en el Ejemplo 1.

*Método para precipitar fosfatos*

Los fosfatos generados en material celular de levadura hidrolizado con ácido después de la neutralización se precipitaron con una cantidad molar cuantitativa de  $\text{CaCl}_2$  en una solución ligeramente alcalina a pH 8.

*Método general para precipitar productos solubles para fraccionamiento*

- 5 Los componentes solubles de material de levadura después de la hidrólisis ácida se precipitan con altas concentraciones (típicamente al menos el 80 %) de disolventes de baja toxicidad, tales como alcoholes, preferiblemente EtOH o acetona, típicamente a temperaturas de aproximadamente 1-25 grados Celsius, más preferiblemente entre 1-8 grados Celsius, a partir de una solución de agua concentrada de los productos solubles tal como un 1 %, y realizando preferiblemente la precipitación de una preparación que contiene sales o de una preparación de material de levadura después de la hidrólisis ácida y precipitación de  $\text{CaCl}_2$ . La precipitación se optimiza para el aislamiento de los materiales de levadura solubles como precipitado y para el fraccionamiento de materiales de menor peso molecular del producto.
- 10
- 15 El precipitado puede contener sales que pueden eliminarse por ejemplo, por filtración o precipitación, por ejemplo, fosfatos por iones  $\text{Ca}^{2+}$  después de la resolución de la fracción soluble precipitada.

La fracción soluble de material celular de levadura hidrolizada con ácido o la fracción soluble precipitada de  $\text{CaCl}_2$  del material celular de levadura hidrolizada con ácido se incubó con acetona, esencialmente en las condiciones anteriores, el precipitado es el producto en el método de acuerdo con la memoria descriptiva.

20

## EJEMPLO 2

La cantidad de componentes carbohidrato solubles en el producto producido de acuerdo con el Ejemplo 1 se comparó con un material de levadura hidrolizado con ácido comercial. Se disolvieron 5 mg (peso seco) del producto del tipo del Ejemplo 1 y el material de levadura comercial en 0,7 ml de óxido de deuterio al 99,9 %. Después de 1 h de tiempo de disolución, se eliminó cualquier materia insoluble por centrifugación. Se tomaron 600  $\mu\text{l}$  de solución y se añadieron 0,5  $\mu\text{mol}$  de éster metílico de fenilalanina en óxido de deuterio en ambas soluciones como un estándar de cuantificación de patrón interno. Los espectros de  $^1\text{H}$  RMN unidimensionales se recogieron usando un espectrómetro Varian 500 MHz operado a 296 K.

25

30

Los espectros de RMN se presentan en la figura 3. Ambos espectros muestran los componentes de carbohidrato solubles esperados: Almidón, mananos de levadura y  $\beta$ 1,6-glucanos de levadura. El almidón se detecta por la señal H-1 del residuo  $\text{Glc}\alpha$ 1-4 a 5,40 ppm. Las unidades de manano de levadura revelan señales H-1 claramente asignables a 5,0-5,3 ppm: (-2) $\text{Man}\alpha$ 1-2 H-1 a 5,30 ppm, H-1 de  $\text{Man}\alpha$ 1-3 terminal a 5,14 ppm, H-1 de (-6)(-2) $\text{Man}\alpha$ 1-6 a 5,12 ppm y H-1 de (-2) $\text{Man}\alpha$ 1-6 a 5,10 ppm. La señal grande a 5,05 ppm contiene las señales H-1 de (-6) $\text{Man}\alpha$ 1-2,  $\text{Man}\alpha$ 1-2 terminal, así como de (-3) $\text{Man}\alpha$ 1-2. Los  $\beta$ 1,6-glucanos de levadura se revelan por la señal H-1 del residuo  $\text{Glc}\beta$ 1,6 a 4,53 ppm.

35

La cantidad de los componentes carbohidrato solubles se estimó comparando las señales de hidrógeno aromático del éster metílico de fenilalanina con las señales H-1 de mananos. Los hidrógenos de posición meta y para se utilizaron para el análisis. El almidón no se midió. Basándose en este análisis, 5 mg (peso seco) del producto del Ejemplo 1 (figura 3A) produjeron 4,4  $\mu\text{mol}$  (0,7 mg) de residuos  $\text{Man}\alpha$ , mientras que los 5 mg (peso seco) del material de levadura comercial (figura 3B) produjeron 0,54  $\mu\text{mol}$  (0,09 mg) de residuos  $\text{Man}\alpha$ . Por lo tanto, la parte soluble del material del Ejemplo 1 contiene el 14 % en peso/peso de manosa y el material comercial el 1,8 % p/p (% en peso basado en peso seco).

40

45

Tanto el material preparado como se presenta en el Ejemplo 1 como el material de levadura hidrolizado con ácido comercial contenían  $\beta$ 1,6-glucanos como se reveló por la señal H-1 de  $\text{Glc}\beta$ 1,6 a 4,53 ppm. Se encontró que ambos materiales portaban aproximadamente 0,1  $\mu\text{mol}$  (0,016 mg) de residuos  $\text{Glc}\beta$  por 5 mg de la muestra seca. La cantidad de  $\beta$ 6-glucano soluble era aproximadamente el 0,32 % (p/p) de la masa seca total de la composición.

50

Sólo se observaron en ambos materiales trazas de  $\beta$ 1,3-glucanos (menos de 1/5 o un 20 % de la cantidad de  $\beta$ 1,6-glucanos). La cantidad de materiales solubles que contenían estructuras de  $\beta$ 3-glucosa era, por lo tanto, de aproximadamente el 0,0604 % en cierta preparación, y dependiendo del proceso, puede eliminarse totalmente. Se sabe que este material es soluble y puede contener otras estructuras y es muy diferente de los materiales de  $\beta$ 3-glucano de levadura habituales.

55

## EJEMPLO 3

El perfil de tamaño de los componentes carbohidrato solubles en el material preparado como se presenta en el Ejemplo 1 se obtuvo por aminación reductora con 2-aminobenzamida seguida de cromatografía de filtración en gel. Se disolvió 1 mg del material del producto en 1 ml de tampón borato sódico 0,2 M que contenía 100  $\mu$ mol de 2-aminobenzamida y cianoborohidruro sódico 0,5 M. La mezcla de reacción se dejó reposar a 37 °C durante 22 h. Se sometió a cromatografía una alícuota de 0,2 mg del material del producto en columna de Superdex Peptide 10/300 GL eluida a 1 ml/min con bicarbonato de amonio 100 mM. El material marcado de elución se detectó por UV a 336 nm. La columna se normalizó mediante la aplicación de patrones de dextrano marcados de forma similar en condiciones cromatográficas idénticas.

10

La figura 4 muestra el patrón de elución de los carbohidratos del material del producto. Las posiciones de elución de los patrones de dextrano 5000 y dextrano 1000 se indican en la figura. La fracción de sacárido soluble obtenida a partir de muestras preparadas de acuerdo con el Ejemplo 1 tenía aproximadamente el 74 % (preparada con álcali y ácido; corte de 1000 Da) y el 87 % (preparada con ácido y álcali; corte de 3000 Da) de >5000 Da y el 26 % y el 13 % de 1000-5000 Da de oligo y polisacáridos, respectivamente, calculados como área del cromatograma de Superdex Peptide del material soluble derivado de AB (unidades de absorbancia a 336 nm multiplicado por el volumen de elución).

15

## EJEMPLO 4

20

Las actividades inmunomoduladoras del material preparado como se presenta en el Ejemplo 1 pueden medirse *in vitro* mediante ensayos de glóbulos blancos humanos esencialmente como se describe por Savolainen J, Nieminen K, Laaksonen K, Laiho T, Jacobsen L, Lahesmaa R, Terho EO, Valovirta E. Allergen-induced in vitro expression of IL-18, SLAM and GATA-3 mRNA in PBMC during sublingual immunotherapy. *Allergy* 62: 949-53 (2007) Y Wan CP, Park CS, Lau BH. A rapid and simple microfluorometric phagocytosis assay. *J. Immunol. Methods*. 162: 1 (1993) Y Busetto S, Trevisan E, Patriarca P, Menegazzi R. A single-step, sensitive flow cytofluorometric assay for the simultaneous assessment of membrane-bound and ingested *Candida albicans* in phagocytosing neutrophils. *Cytometry A*. 58: 201 (2004).

25

Para medir el perfil de modulación de citocinas de la fracción soluble de material celular de levadura procesado de acuerdo con la presente memoria descriptiva, se aíslan células mononucleares (PBMC) de sangre periférica humana. Las PBMC se aplican sobre placas de cultivo celular y se incuban en presencia de diversas concentraciones del material preparado de acuerdo con la figura 1 o 2 o el Ejemplo 1 (por ejemplo, 0,1, 1, 10 y 100  $\mu$ g/ml). Específicamente, las PBMC se pueden recoger de seres humanos que padecen reacciones alérgicas, y las PBMC pueden estimularse con el alérgeno pertinente. Los cultivos se incuban en condiciones típicas, por ejemplo, a +37 °C en atmósfera humidificada con CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de un tiempo de incubación adecuado (por ejemplo, 24-72 h), se recogen las células y los sobrenadantes. El ARN total se puede extraer de las células para medir los niveles individuales de ARNm de citocinas, por ejemplo, por técnicas de PCR. Como alternativa, a partir de los sobrenadantes del cultivo celular, las citocinas se miden a nivel de proteína, por ejemplo, por técnicas luminométricas. Las citocinas informativas incluyen, por ejemplo, las interleucinas 4, 5, 10, 12, 13, 18, así como interferón- $\gamma$ .

30

35

40

El material preparado como se muestra en el Ejemplo 1 estimula la actividad fagocítica de los macrófagos. Esto se mide usando macrófagos obtenidos de ratones o seres humanos, o usando líneas celulares de tipo macrófago. Los macrófagos se cultivan y después se dispensan en, por ejemplo, placas de 96 pocillos, y se incuban para permitir que las células se adhieran a los pocillos en presencia de una fracción soluble. Los patógenos conjugados con fluoresceína, por ejemplo, partículas de *E. coli* o células vivas de *C. albicans*, se añade y se incuban durante un período de tiempo adecuado para permitir que se produzca fagocitosis. La fluorescencia extracelular puede inactivarse mediante la adición de azul de tripano, lo que hace que la fluorescencia verde típica de las células marcadas con fluoresceína se vuelva de color rojo. Las células fagocitadas conservan la fluorescencia verde. Por lo tanto, la actividad de la fagocitosis de los macrófagos se mide por la intensidad de la fluorescencia verde asociada a las células fluorescentes ingeridas. La fluorescencia se puede medir directamente en los pocillos a 485 nm de excitación y 530 nm de emisión. Como alternativa, la actividad de fagocitosis se mide por citometría de flujo, donde de nuevo la fluorescencia verde indica células patógenas ingeridas y patógenos extracelulares de fluorescencia roja.

50

55

## EJEMPLO 5

Para medir la actividad inmunomoduladora del producto del tipo del Ejemplo 1 *in vivo*, se establece un ensayo con animales de ratón esencialmente como se describe en Smith AG, Sheridan PA, Harp JB, Beck MA. Diet-induced

obese mice have increased mortality and altered immune responses when infected with influenza virus. J Nutr. 137: 1236 (2007). Un grupo de ratones se alimenta con pienso estándar complementado con el material del Ejemplo 1 durante un período de tiempo adecuado, preferiblemente varias semanas. Un grupo de control de ratones se alimenta con pienso estándar solamente. Los parámetros típicos se miden, incluyendo la ingesta de pienso y el peso corporal. Específicamente, se miden los niveles de citocinas e IgA, así como la actividad de fagocitosis de los macrófagos aislados de la sangre. Los experimentos histológicos se realizan opcionalmente para analizar las células inmunitarias del tracto intestinal.

Con el fin de analizar el efecto de la dieta sobre la resistencia a patógenos, se establece un ensayo de estimulación. Los ratones son estimulados, por ejemplo, por una cepa adecuada del virus de la influenza. Se sigue la supervivencia de los ratones. Si se utiliza una cepa no letal en la estimulación, se sigue la gravedad de la infección, por ejemplo, títulos víricos en el tracto respiratorio o inmunohistología de antígenos víricos en pulmón y cerebro. Se usa un grupo control de ratones que obtienen pienso estándar.

#### 15 EJEMPLO 6

Uso de una composición inmunoestimuladora soluble que contiene una fracción de sacárido en la Producción de Tentempiés Saludables

20 La composición inmunoestimuladora soluble que contiene la fracción de sacárido del Ejemplo 1 o la fracción de sacárido en solitario se añade al 0,5 % (p/p) y al 1 % (p/p) en galletas, barras de aperitivos y artículos de panadería. La composición inmunoestimuladora soluble que contiene una fracción de sacárido complementó galletas, barras de aperitivos y artículos de panadería que tienen más efectos inmunoestimuladores que las galletas, barras de aperitivos y artículos de panadería que no contienen una composición inmunoestimuladora soluble que contiene una fracción de sacárido. Después de la ingestión de las galletas, barras de aperitivos y artículos de panadería complementados, se espera que la composición inmunoestimuladora soluble que contiene la fracción de sacárido estimule el sistema inmunitario del tracto intestinal y beneficie al estado inmunitario del consumidor.

#### EJEMPLO 7

30

La crema de la pared celular de levadura de cerveza se procesa de acuerdo con el Ejemplo 1, y la fracción soluble se separa y se seca por pulverización o se liofiliza. La fracción de sacárido puede aislarse adicionalmente, por ejemplo, por métodos cromatográficos de los Ejemplos.

35 La composición o fracción de sacárido es una resina G.R.A.S. por la FDA. La composición puede utilizarse para complementar en una amplia variedad de alimentos con una fuente natural de alta calidad de beta 1,6) glucanos y mananos. Este material biológicamente activo estimula el sistema inmunológico de un ratón y protege contra infecciones víricas, bacterianas y de otros microbios.

#### 40 EJEMPLO 8

Uso de extractos en pienso para animales

Se produce una composición inmunoestimuladora soluble que contiene una fracción de sacárido de acuerdo con el Ejemplo 1.

Esta composición se utiliza para complementar las dietas de cerdos de destete, por ejemplo, 28 días después del destete. El complemento se mezcla con el pienso del cerdo y utiliza añadido en varias dosis, por ejemplo, el 0,05 %, 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,5 % o el 2 % del pienso total.

50

Las dietas de control contienen antibióticos. Los cerdos después del destete (17-22 días de edad) se asignan al azar a la dieta de control o dieta de tratamiento en base al peso corporal. Después del período de ensayo se pesan los cerdos. En un experimento de estimulación se usa diarrea causada por E. coli, tal como K88 e coli.

#### 55 EJEMPLO 9

Bebidas y alimentos funcionales

La composición inmunoestimuladora soluble que contiene la fracción de sacárido de acuerdo con la presente

memoria descriptiva se puede añadir a bebidas o alimentos (por ejemplo, yogur) para mejorar la salud de los seres humanos propensos a la infección tales como individuos inmunocomprometidos, atletas en entrenamiento intensivo y, personas con estilos de vida agitados o que sufren de problemas del tracto gastrointestinal. Una formulación adecuada para su uso como bebida no alcohólica es: el 25 % de contenido de zumo de zanahoria, tomate y/o naranja al 1 % (p/v) de composición inmunoestimuladora soluble que contiene una preparación de fracción de sacárido o una fracción de sacárido al 1 % en solitario.

## EJEMPLO 10

10 Uso de la composición inmunoestimuladora soluble que contiene la fracción de sacárido del Ejemplo 2 en el Tratamiento del Eccema.

Un grupo seleccionado de niños que padecen eccema que no responde a los tratamientos de loción cutánea aceptados actualmente se trata con una loción que contiene, por ejemplo, una suspensión al 1 % de la composición inmunoestimuladora soluble que contiene la fracción de sacárido del Ejemplo 2. La loción se aplica dos veces al día. La piel es evaluada semanalmente por un dermatólogo para determinar la mejoría de las lesiones y el dolor. Se espera que la composición inmunoestimuladora soluble que contiene la loción de fracción de sacárido disminuya las lesiones asociadas al dolor y acelere la curación de las lesiones.

## 20 EJEMPLO 11

El efecto de las composiciones novedosas para la unión de patógenos se optimiza mediante estudios de superposición de composiciones inmovilizadas en fase sólida (por ejemplo, como neoglicolípidos) por *E. coli* marcado que causa diarrea y observando la unión a composiciones producidas en el ejemplo 1 y/o por otros métodos preferidos de la presente memoria descriptiva, o patógenos que causan diarrea animal, e inhibiendo la unión de las bacterias a las composiciones o a glicanos receptores naturales, especialmente neoglicolípidos o lípidos que comprenden Mana, como se describe en el documento PCT FI2003/00528.

## EJEMPLO 12

30 Se valoró el material celular de levadura (suspensión consistente en aproximadamente un 20 % de materia seca) con NaOH a) pH 7, b) pH 10 o c) pH 13, y luego se incubó durante 2,25 horas a +80 °C. La reacción de control se realizó incubando material de levadura intacto (pH aprox. 6) de manera similar. Después, las soluciones se enfriaron a temperatura ambiente y se trataron con ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) a pH 2,5 durante 4,25 horas a +80 °C, y después se neutralizaron con NaOH a temperatura ambiente.

Las soluciones se diluyeron al 1 % de materia seca con agua y se incubaron en agitación suave a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se centrifugó (3000 o 4000 rpm, 1811 o 3220 rcf, 5-20 min a TA), y la fracción insoluble se descartó. El sobrenadante se sometió a ultrafiltración en una célula de ultrafiltración agitada (Millipore) con membranas de ultrafiltración (celulosa regenerada, Millipore) NMWL 1000 o 3000, y el retentado se liofilizó. Los rendimientos de estas extracciones se presentan en la Tabla 1. Los resultados muestran que se obtiene un claro aumento en el rendimiento del material de >1000 Da cuando el material de levadura se trata en primer lugar en una solución alcalina. Más drásticamente, si el material de levadura se somete a hidrólisis a pH 13, se obtiene un aumento de 2,7 veces en el material de >1000 Da.

## 45 EJEMPLO 13

El material celular de levadura (suspensión consistente en aproximadamente un 20 % de materia seca) se trató con ácido fosfórico ( $H_3PO_4$ ) a pH 2,5 durante 4,25 horas a +80 °C. Después, las soluciones se enfriaron a temperatura ambiente y se valoraron con NaOH a) pH 7, b) pH 10 o c) pH 13, y después se incubaron durante 2,25 horas a +80 °C. Después, la reacción se neutralizó con NaOH a temperatura ambiente. La reacción de control A incluyó solamente la etapa de hidrólisis ácida. Se realizó otro control, en el que el material hidrolizado con ácido se liofilizó y se lavó con una solución de NaOH 0,1 M (pH nominal 13) en etanol al 80 %. Se desecharon los lavados.

55 Se prepararon soluciones de un por ciento (peso/volumen) por materia seca en agua y se incubaron en agitación suave a temperatura ambiente durante 2 horas. La mezcla se centrifugó (3000 o 4000 rpm, 1811 o 3220 rcf, 5-20 min a TA), y la fracción insoluble se descartó. El sobrenadante se sometió a ultrafiltración en una célula de ultrafiltración agitada (Millipore) con membranas de ultrafiltración (celulosa regenerada, Millipore) NMWL 1000 o 3000, y el retentado se liofilizó. Los rendimientos de estas extracciones se presentan en la Tabla 1. Los resultados

muestran un claro aumento en el rendimiento del material de >1000 Da cuando se incluye una hidrólisis alcalina. El lavado del material de levadura hidrolizado con ácido liofilizado con una solución de etanol alcalino elimina parte del material de >1000 Da material ya que el rendimiento es menor que en el material hidrolizado con ácido. Sin embargo, como se muestra en el Ejemplo 14 a continuación, estos no son principalmente mananos, ya que el rendimiento relativo del manano es más alto en el material lavado con etanol alcalino.

#### EJEMPLO 14

La cantidad de componentes carbohidrato solubles en los productos producidos de acuerdo con los Ejemplos 12 y 13 se analizó por RMN. Se disolvieron 5 mg (peso seco) de cada producto y 1,0  $\mu$ mol de éster metílico de fenilalanina en 0,6 ml de óxido de deuterio al 99,9 %. Los espectros de  $^1\text{H}$  RMN unidimensionales se recogieron usando un espectrómetro Varian 500 MHz operado a 296 K. Se integraron las señales H-1 de manano como se enumeran en el Ejemplo 2, y su área se comparó con el área integrada de protones aromáticos del anillo de fenilalanina. Los resultados de este análisis cuantitativo se presentan en la Tabla 2.

Este análisis muestra que la mayor cantidad relativa (pureza) de mananos, el 23,5 % (p/p) de producto extraído, se obtiene en un proceso en el que el material de levadura se hidroliza primero a pH 10 y luego a pH 2,5, de acuerdo con el Ejemplo 12. Se obtiene también una cantidad elevada de mananos, 19,3 % (p/p), cuando las etapas de hidrólisis se invierten, como se describe en el Ejemplo 13. Sin embargo, el mayor rendimiento total de los mananos preferidos y las mayores cantidades de extracto total se obtienen con las condiciones alcalinas más elevadas con pH 13.

La relación de mananos con respecto a almidón también se estimó a partir de los espectros de RMN. Estos datos se recopilan en la Tabla 3. Esta relación se calculó a partir de las áreas integradas de señales H-1 de manano y áreas integradas de señales H-1 derivadas de almidón (H-1 de Glc $\alpha$ 1-4 5,40 ppm, H-1 de Glc $\alpha$ 1-6 4,97 ppm). Aquí, es evidente que los procesos que incluyen una hidrólisis alcalina seguida de una hidrólisis ácida producen la proporción manano/almidón más elevada. Además, se prefieren condiciones con hidrólisis alcalina fuerte media, y el lavado y calentamiento a pH neutro o a aproximadamente 6 (material intacto) muestran mejoría. Las relaciones de manano/almidón preferidas basadas en señales de RMN de protón H1 son al menos aproximadamente 0,85, más preferiblemente al menos aproximadamente 0,90, más preferiblemente al menos aproximadamente 0,95, más preferiblemente al menos aproximadamente 1,0, más preferiblemente al menos aproximadamente 1,1, más preferiblemente al menos aproximadamente 1,2, más preferiblemente al menos aproximadamente 1,25, más preferiblemente al menos aproximadamente 1,3, más preferiblemente al menos aproximadamente 1,3, más preferiblemente al menos aproximadamente 1,4, más preferiblemente al menos aproximadamente 1,5, más preferiblemente al menos aproximadamente 1,6, más preferiblemente al menos aproximadamente 1,7, más preferiblemente al menos aproximadamente 1,8. Aproximadamente indica variaciones de aproximadamente 0,1 unidad, más preferiblemente 0,05 unidades, más preferiblemente aproximadamente 0,03 unidades.

Se estimó la relación de mananos con respecto al material polipeptídico comparando las áreas de señal de manano con un área de señal de protón alifático de 0,8 - 1,0 ppm. Esta área de señal de RMN de protón muestra principalmente señales de protón de metilo de aminoácidos alifáticos, por ejemplo, valina, leucina e isoleucina. Los datos de la relación manano/polipéptido se presentan en la Tabla 3. Los valores representan la relación de la integral de señales H1 de Manosa con respecto a la integral de señales de protón alifático a 0,8 - 1,0 ppm (señales de protón de metilo). De los métodos de extracción usados aquí, los procesos que incluyen una etapa de hidrólisis (pH 10) parecen producir la cantidad más baja de señales de material alifático. El procedimiento de lavado también produce material de bajo contenido de proteínas. Estos productos son preferidos como materiales de bajo contenido de proteínas con alto contenido de carbohidratos. El mayor contenido de material peptídico (péptido/proteína) relativo de la hidrólisis alcalina más fuerte indicará un glicopéptido soluble también con una capacidad de presentación de glicano polivalente útil, cuando se considera la cantidad de manosa en las preparaciones. Las señales en los productos de pH más alto indicarán también un componente de proteína posiblemente soluble. Debe destacarse que este análisis no pretende dar una relación en masa real de manano/proteína, sino un índice de eficacia relativo para los métodos de extracción para producir mananos de pureza más alta.

Las relaciones de manano/(poli)péptido preferidas basadas en señales de RMN de protón H1 son al menos aproximadamente 0,45, más preferiblemente al menos aproximadamente 0,40, más preferiblemente al menos aproximadamente 0,45, más preferiblemente al menos aproximadamente 0,5, más preferiblemente al menos aproximadamente 0,55, más preferiblemente al menos aproximadamente 0,60, más preferiblemente al menos aproximadamente 0,65, mucho más preferiblemente al menos aproximadamente 0,70. Aproximadamente indica variaciones de aproximadamente 0,1 unidad, más preferiblemente 0,05 unidades, más preferiblemente

aproximadamente 0,03 unidades.

Los espectros de RMN también permiten una estimulación de las relaciones de unión a Man. Estas se calculan a partir de las áreas de señal integradas de 5,31 ppm (H-1 -2Man $\alpha$ 1-2), 5,14 ppm (H-1 de Man $\alpha$ 1-3 terminal), 5,11 ppm (H-1 de -2,6Man $\alpha$ 1-6 y H-1 de -2Man $\alpha$ 1-6) y 5,04 ppm (H-1 de -6Man $\alpha$ 1-2, H-1 de Man $\alpha$ 1-2 terminal y H-1 de -3Man $\alpha$ 1-2). Estas áreas integradas se recopilan en la Tabla 4. Además, se ha calculado la proporción de señal a 5,14 ppm (que comprende H-1 de Man $\alpha$ 1-3 terminal) con respecto a todas las señales H-1 de Man. Los datos muestran que el proceso disminuye ligeramente su cantidad relativa de Man $\alpha$ 3Man $\alpha$ 2 terminal dependiendo de la resistencia alcalina dando preferencia a la hidrólisis alcalina fuerte media. Por otro lado, los productos formados a alta resistencia alcalina están más separados entre Man $\alpha$ 3 como con Man $\alpha$ 3Man $\alpha$ 2Man $\alpha$ 2, y tienen actividades biológicas útiles.

EJEMPLO 15 Aumento de la solubilidad, falta de sabor y olor

Los productos del ejemplo 12 y 13 se solubilizan en soluciones al 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 %. Se observa una alta y mayor solubilidad con materiales procesados con ácido y alcalino. La presente memoria descriptiva se dirige especialmente a materiales que son solubles o esencialmente solubles como soluciones de agua al 2, 3, 4, 5 o 6 % a temperatura ambiente. La presente memoria descriptiva está dirigida especialmente a productos altamente solubles de hidrólisis alcalina fuerte y fuerte media que son solubles (o esencialmente al menos el 95 %, más preferiblemente el 97 % solubles) al menos con concentraciones al 2 %, incluso más preferiblemente al 4 %, aún más preferiblemente al 5 %, incluso más preferiblemente al 6 %.

Para ensayar el sabor y el olor, las presentes preparaciones se disuelven en agua pura en forma de soluciones con concentraciones al 1 %, 0,5 %, 0,1 % y 0,01 %. Las personas normales sanas prueban el sabor y el olor y normalmente no observan ningún (o sustancialmente ningún) olor o sabor con productos a concentraciones inferiores al 0,5 %, o concentraciones inferiores al 0,1 %. La solución al 1 % puede tener algún sabor u olor, pero esto se evita en procesos mejores.

Tabla 1. Rendimientos de extracción de productos de levadura solubles como se describe en el Ejemplo 12 y el Ejemplo 13.

| Muestra  | Rendimiento (mg)/gramo de materia seca de levadura |
|--|--|
| pH 7 - pH 2,5 - 1 % - MWCO1000                                 | 139,5  |
| pH 10 - pH 2,5 - 1 % - MWCO1000                                | 139,4  |
| pH 13 - pH 2,5 - 1 % - MWCO1000                                | 280,5  |
| intacto - pH 2,5 - 1 % - MWCO1000                              | 104,9  |
| pH 2,5 - 1 % - MWCO1000  | 160,7  |
| pH 2,5 - liofilización - lavado con NaOH/EtOH - 1 % - MWCO1000 | 137,5  |
| pH 2,5 - pH 7 - 1 % - MWCO1000                                 | 160,7  |
| pH 2,5 - pH 10 - 1 % - MWCO1000                                | 191,6  |
| pH 2,5 - pH 13 - 1 % - MWCO1000                                | 314,8  |

Tabla 2. Rendimientos de los mananos de levadura preparados como se describe en los Ejemplos 12 y 13. La cuantificación se realizó mediante un experimento con RMN de protón como se describe en el Ejemplo 14.

| Muestra  | Rendimiento de Man (mg/5 mg de producto) | Rendimiento de Man (% p/p) |
|--|--|----------------------------|
| pH 7 - pH 2,5 - 1 % - MWCO1000                                 | 0,52                                     | 10,4                       |
| pH 10 - pH 2,5 - 1 % - MWCO1000                                | 1,17                                     | 23,5                       |
| pH 13 - pH 2,5 - 1 % - MWCO1000                                | 0,90                                     | 18,1                       |
| intacto - pH 2,5 - 1 % - MWCO1000                              | 0,82                                     | 16,3                       |
| pH 2,5 - 1 % - MWCO1000  | 0,46                                     | 9,3                        |
| pH 2,5 - liofilización - lavado con NaOH/EtOH - 1 % - MWCO1000 | 0,75                                     | 14,9                       |
| pH 2,5 - pH 7 - 1 % - MWCO1000                                 | 0,71                                     | 14,1                       |
| pH 2,5 - pH 10 - 1 % - MWCO1000                                | 0,97                                     | 19,3                       |
| pH 2,5 - pH 13 - 1 % - MWCO1000                                | 0,67                                     | 13,5                       |

Tabla 3. Relación de mananos en los extractos de levadura en comparación con almidón y material de tipo polipéptido. Las abundancias se midieron a partir de los espectros de RMN de protón como se describe en el Ejemplo 14. La relación de manano/material polipeptídico pretende describir la relación dentro de esta serie de extracción, es decir, la eficacia de los tipos de extracción mostrados para aislar mananos. Es una relación no cuantitativa de manano/proteína.

5

| Muestra  | Relación manano/almidón | Relación manano/material polipeptídico |
|--|-------------------------|--|
| pH 7 - pH 2,5 - 1 % - MWCO1000                                 | 0,83                    | 0,22                                   |
| pH 10 - pH 2,5 - 1 % - MWCO1000                                | 1,59                    | 0,70                                   |
| pH 13 - pH 2,5 - 1 % - MWCO1000                                | 1,78                    | 0,33                                   |
| intacto - pH 2,5 - 1 % - MWCO1000                              | 0,96                    | 0,35                                   |
| pH 2,5 - 1 % - MWCO1000  | 0,82                    | 0,32                                   |
| pH 2,5 - liofilización - lavado con NaOH/EtOH - 1 % - MWCO1000 | 0,90                    | 0,48                                   |
| pH 2,5 - pH 7 - 1 % - MWCO1000                                 | 0,95                    | 0,42                                   |
| pH 2,5 - pH 10 - 1 % - MWCO1000                                | 1,26                    | 0,66                                   |
| pH 2,5 - pH 13 - 1 % - MWCO1000                                | 0,65                    | 0,33                                   |

Tabla 4. Relación de residuos de Man en los extractos de levadura preparados como se describe en los Ejemplos 12 y 13. El área integrada de la señal 5,31 ppm (-2Man $\alpha$ 1-2 H-1) se ajustó en 100.

|  | -2Man $\alpha$ 1-2 H-1<br>5,31 ppm | Man $\alpha$ 1-3 H-1<br>5,14 ppm | -2,6Man $\alpha$ 1-6 H-1<br>-2Man $\alpha$ 1-6 H-1<br>5,11 ppm | -6Man $\alpha$ 1-2 H-1<br>Man $\alpha$ 1-2 H-1<br>-3Man $\alpha$ 1-2 H-1<br>5,04 ppm | Man $\alpha$ 1-3 % |
|--|------------------------------------|----------------------------------|--|--|--------------------|
| pH 7 - pH 2,5 - 1 % - MWCO1000                               | 100,00                             | 179                              | 97,0   | 191  | 31,6               |
| pH 10 - pH 2,5 - 1 % - MWCO1000                              | 100,00                             | 170                              | 106,0  | 191  | 30,0               |
| pH 13 - pH 2,5 - 1 % - MWCO1000                              | 100,00                             | 125                              | 88,0   | 125  | 28,5               |
| Intacto - pH 2,5 - 1 % - MWCO1000                            | 100,00                             | 175                              | 87,0   | 187  | 31,9               |
| pH 2,5 - 1 % - MWCO1000                                      | 100,00                             | 153                              | 86,0   | 180  | 29,5               |
| pH 2,5-liofilización - lavado con NaOH/EtOH - 1 % - MWCO1000 | 100,00                             | 146                              | 92,0   | 170  | 28,7               |
| pH 2,5 - pH 7 - 1 % - MWCO1000                               | 100,00                             | 172                              | 90,0   | 184  | 31,5               |
| pH 2,5 - pH 10 - 1 % - MWCO1000                              | 100,00                             | 162                              | 92,0   | 174  | 30,7               |
| pH 2,5 - pH 13 - 1 % - MWCO1000                              | 100,00                             | 129                              | 87,0   | 155  | 27,4               |

10

**REIVINDICACIONES**

1. Método para la producción de una composición inmunoestimuladora soluble en agua que contiene una fracción de sacárido, que comprende las etapas de:
- 5
- i) proporcionar material celular de levadura,
  - ii) someter dicho material celular de levadura a una hidrólisis con un álcali a un pH de 9 a 14 y a una temperatura de 10 °C a 100 °C durante 10 minutos a 18 horas
  - 10 y un ácido a un pH de 1,5 a 4 y a una temperatura de 30 °C a 100 °C durante 1 a 48 horas para liberar mananos y glucanos de material celular de levadura, y opcionalmente neutralizar el material,
  - iii) separar las fracciones solubles e insolubles en agua del material obtenido en la etapa ii), y, opcionalmente,
  - iv) someter la fracción soluble en agua de la etapa iii) a una etapa adicional de fraccionamiento,
- 15 en el que la fracción soluble en agua comprende mananos y beta-1,6 glucanos, y en el que la fracción soluble en agua es sustancialmente inodora e insípida.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la solubilidad en agua del producto es al menos el 95 %.
- 20 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el material no se fracciona entre la hidrólisis ácida y alcalina en la etapa ii).
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el material obtenido en la etapa ii) se pone en contacto adicionalmente con una solución acuosa y se mezcla preferiblemente en dicha solución acuosa.
- 25 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que la composición producida comprende
- a. Al menos el 1-50 % en peso seco de manano;
  - 30 b. una composición de manano de levadura soluble que comprende el 0,001 - 10 % de beta-1,6 glucano; y
  - c. menos del 0,1 % p/p en peso seco de beta-1,3 glucano o la cantidad de beta-1,3 glucano es menor del 30 % de la cantidad de  $\beta$ 1,6 glucano.
- 35 6. El método según la reivindicación 1 para la producción de una composición inmunoestimuladora soluble en agua que contiene una fracción de sacárido, que comprende las etapas de:
- i) proporcionar material celular de levadura,
  - 40 ii) someter dicho material celular de levadura a una hidrólisis con un álcali a un pH de 9 a 14 y a una temperatura de 10 °C a 100 °C durante 10 minutos a 18 horas
  - y un ácido a un pH de 1,5 a 4 y a una temperatura de 30 °C a 100 °C durante 1 a 48 horas, neutralizar el material, opcionalmente poner en contacto el material con una solución acuosa,
  - iii) separar la fracción soluble en agua del material obtenido,
  - 45 iv) someter la fracción soluble en agua de la etapa iii) a fraccionamiento con ultrafiltración, y
  - v) reducir la fracción ultrafiltrada a un material sólido.
7. El método según la reivindicación 6, en el que la composición producida comprende
- a. Al menos el 1-50 % en peso seco de manano;
  - 50 b. una composición de manano de levadura soluble que comprende el 0,001 - 10 % de beta-1,6 glucano;
  - c. menos del 0,1 % p/p en peso seco de beta-1,3 glucano o la cantidad de beta-1,3 glucano es menor del 30 % de la cantidad de beta-1,6 glucano; y
  - d. en el que los mananos y/o glucanos tienen un peso molecular de al menos 1.000 Da o se han obtenido por eliminación de la ultrafiltración separable en fracciones con membrana con un corte de al menos
  - 55 500 Da.
8. El método según la reivindicación 6, en el que la hidrólisis se realiza con un álcali a un pH de 9 a 13 y a una temperatura de 10 °C a 90 °C durante 10 minutos a 8 horas, y la hidrólisis ácida se realiza a un pH de 2 a 3 y a una temperatura de 30 °C a 90 °C durante 3 a 48 horas.

9. Una composición de manano de levadura soluble obtenida mediante el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
- 5 10. El método según la reivindicación 6, en el que la hidrólisis es con un álcali a un pH de 9 a 13 y a una temperatura de 50 °C a 100 °C durante 0,5 h a 8 horas, y la hidrólisis ácida se realiza a un pH de 2 a 3 y una temperatura de 60 °C a 90 °C durante 1 a 4 horas.
11. El método según la reivindicación 6, en el que la hidrólisis alcalina se realiza por lavado con solución  
10 alcalina a pH 9-13 de 0,1 a 3 h, preferiblemente en un intervalo de temperatura entre 10-45 °C.
12. El procedimiento según la reivindicación 6, en el que la hidrólisis alcalina se realiza entre pH 11,5-14, con un tiempo de reacción de 1 h a 12 horas, y en intervalos de temperatura de entre 60-100 °C.

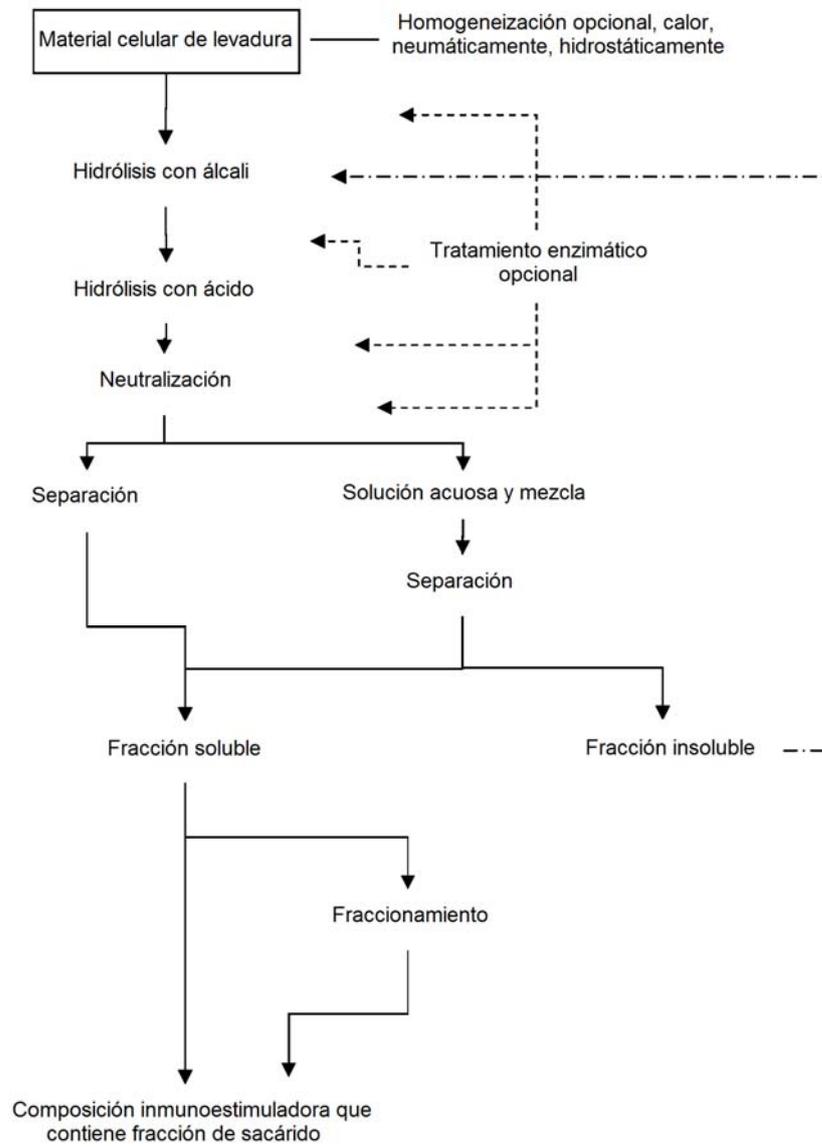


Figura 1

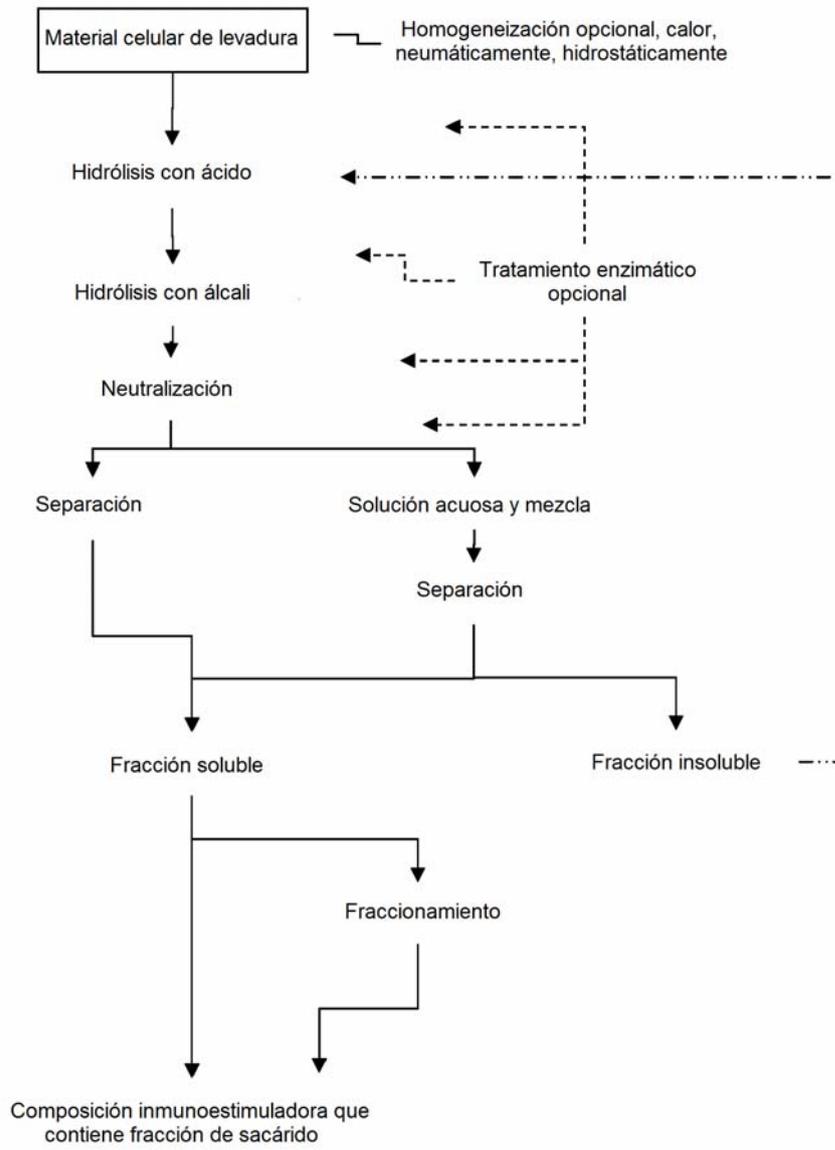


Figura 2

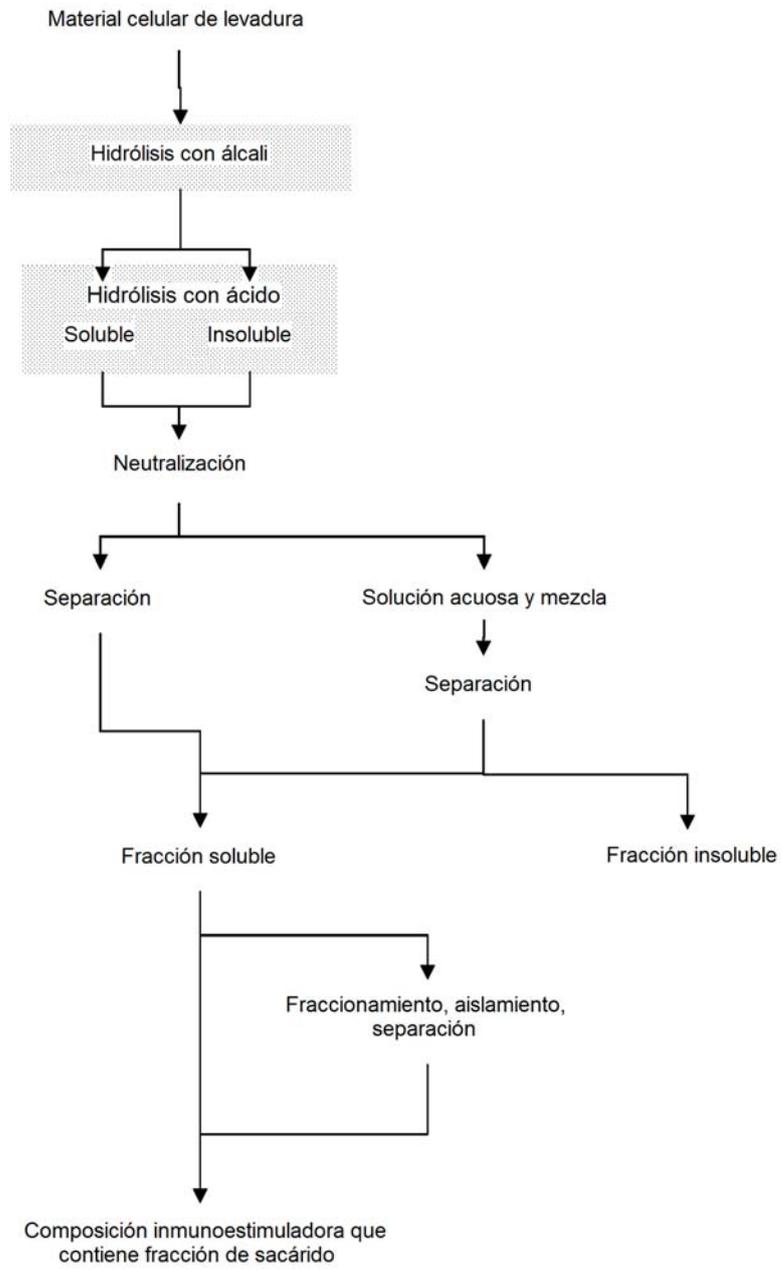


Figura 2 (cont.)

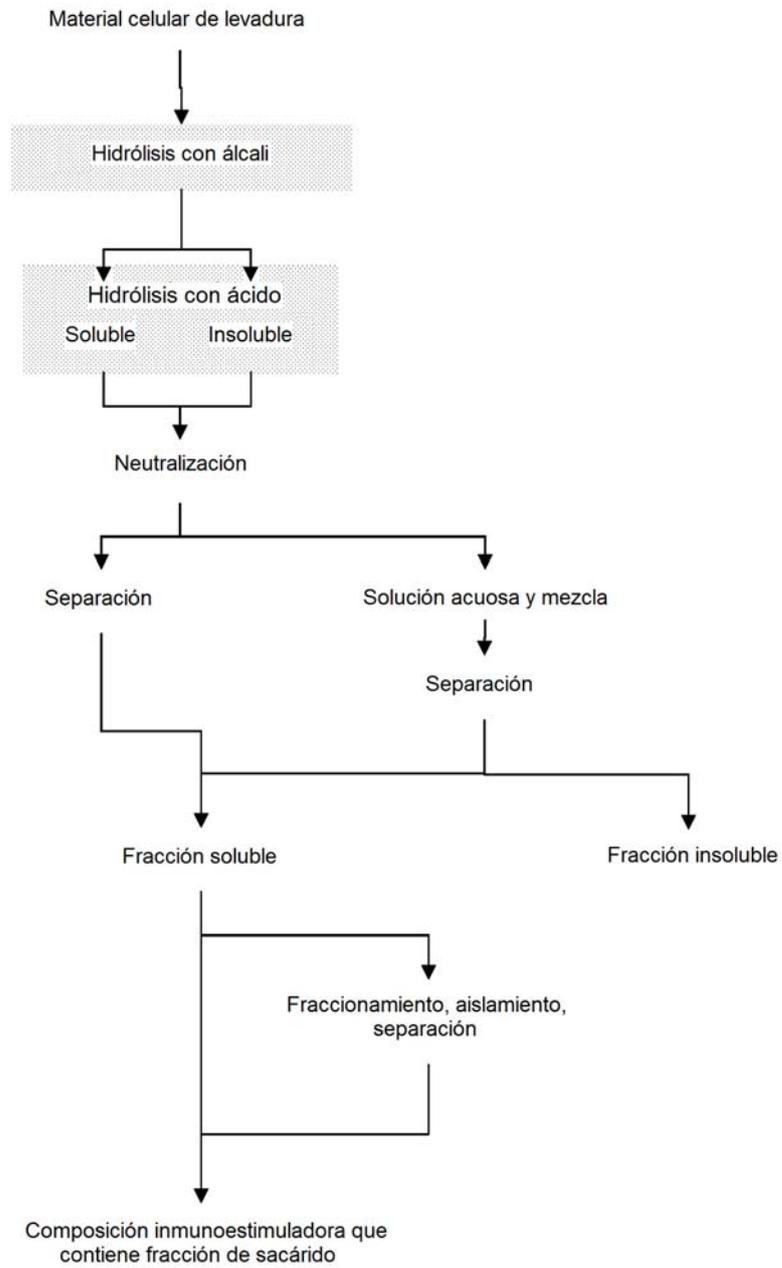


Figura 2 (cont.)

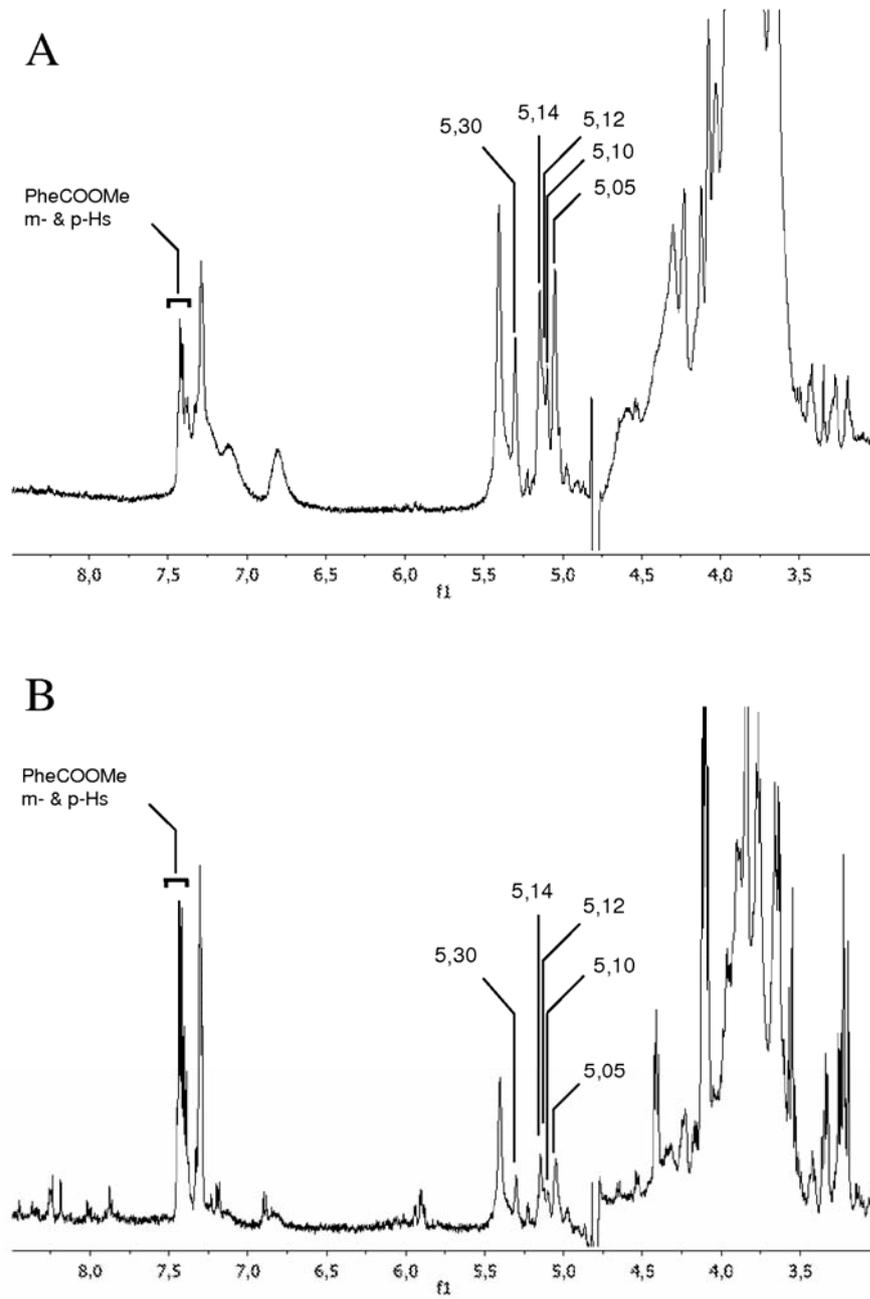


Figura 3

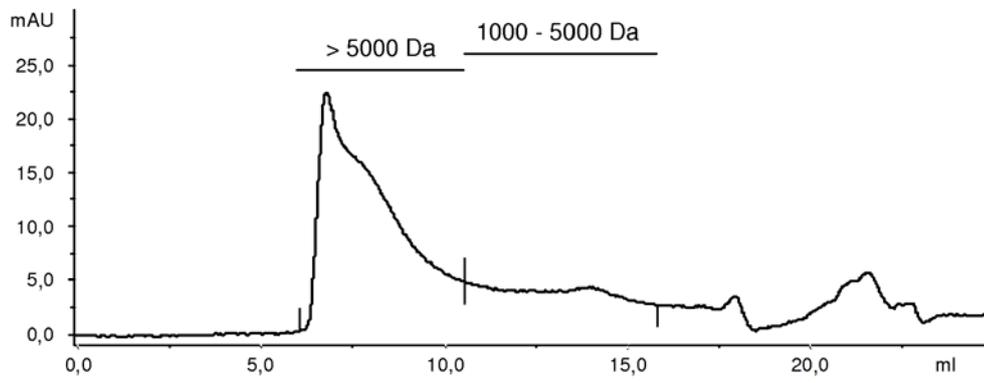


Figura 4