

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 416 086**

51 Int. Cl.:

A23L 1/308 (2006.01)

A23L 1/10 (2006.01)

A23L 1/16 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2009 E 09821427 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2013 EP 2355670**

54 Título: **Alimento que contiene arabinosilano y oligosacáridos**

30 Prioridad:

10.12.2008 US 201517 P

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

30.07.2013

73 Titular/es:

**KATHOLIEKE UNIVERSITEIT LEUVEN (50.0%)
K.U. Leuven R&D Minderbroedersstraat 8a - bus
5105
3000 Leuven , BE y
FUGEIA NV (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BROEKAERT, WILLEM;
COURTIN, CHRISTOPHE;
DAMEN, BRAM y
DELCOUR, JAN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 416 086 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

Alimento que contiene arabinoxilano y oligosacáridos.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones nutricionales, más en concreto a suplementos alimentarios y productos alimentarios procesados, enriquecidos con arabinoxilano-oligosacáridos y que comprenden también arabinoxilanos no extraíbles de agua o arabinoxilanos hidrosolubles, o ambos. Preferiblemente, dichas composiciones nutricionales comprenden arabinoxilano-oligosacáridos y arabinoxilanos no extraíbles de agua.

Antecedentes de la invención

10 La invención se refiere al efecto positivo sobre la salud gastrointestinal de alimentos, ingredientes alimentarios o suplementos nutricionales con composiciones concretas de arabinoxilanos. El arabinoxilano (AX), también denominado pentosano, es un importante constituyente de la pared celular de muchas especies vegetales. Por ejemplo, en los granos de cereales, el AX constituye 5-10% del peso seco de los granos. En general, el AX de los cereales consiste en un esqueleto de restos D-xilopiranosilo beta-(1-4)-enlazados (xilosa), algunos de los cuales están mono-
15 o disustituidos con restos alfa-L-arabinofuranosilo (arabinosa) (Izydorczyk y Biliaderis, 1995). La proporción de arabinosa a xilosa (proporción A/X o grado medio de sustitución de arabinosa) en el AX de cereales varía de 0,10 a más de 1,0, dependiendo del tejido y de la especie vegetal. Además, pueden estar unidos más sustituyentes secundarios a los restos xilosa, tales como cadenas laterales de acetilo, alfa-glucuronilo, alfa-4-O-metilglucuronilo, galacturonilo, xilosilo, ramnosilo, galactosilo, o glucosilo, o cadenas laterales de oligosacáridos cortos (Izydorczyk y Biliaderis, 1995; Andersson y Aman, 2001). Están presentes ácidos hidroxicinámicos, principalmente ácido ferúlico, y
20 en menor grado, ácido deshidrodiferúlico, ácido p-cumárico, o ácido sinápico, también como sustituyentes, y en general estarán enlazados en la posición C-(O)-5 de las unidades de arabinosa terminales (Izydorczyk y Biliaderis, 1995; Andersson y Aman, 2001). El AX en cereales aparece en dos formas, una forma extraíble de agua, también denominada WE-AX, y una forma no extraíble de agua (WU-AX) muy probablemente debido a interacciones covalentes o no covalentes con moléculas de AX vecinas y otros componentes de la pared celular, tales como proteínas, celulosa o lignina (Andersson y Aman, 2001; Courtin y Delcour, 2002). En los granos de trigo, los AX presentes en la aleurona y los tejidos de revestimiento de las semillas principalmente son AX no extraíbles de agua (WU-AX) y tienen una proporción A/X baja (de aproximadamente 0,1 a 0,4), mientras que los AX de los tejidos del pericarpo son WU-AX, con una alta proporción A/X (de aproximadamente 1,0 a 1,3) (Andersson y Aman, 2001; Barron *et al.*, 2007). Los AX en los tejidos endospermicos del trigo son WU-AX o WE-AX con una proporción A/X intermedia (de aproximadamente 0,5 a 0,7) (Izydorczyk y Biliaderis, 1995; Andersson y Aman, 2001).

Parte de los WU-AX en los granos de cereales pueden solubilizarse mediante un tratamiento con endoxilanas a dosis baja. Los AX solubilizados con enzimas (ES-AX) y solubilizados con álcalis (AS-AX) tienen propiedades fisicoquímicas similares a los WE-AX (Courtin y Delcour, 2002). En la presente, el grupo de WE-AX, AS-AX y ES-AX se denominan AX hidrosolubles (WS-AX).

35 Los prebióticos son compuestos, habitualmente oligosacáridos, que no pueden ser digeridos por enzimas del tracto gastrointestinal superior, sino que son fermentados selectivamente por algunos tipos de bacterias intestinales en el intestino grueso (Gibson y Roberfroid, 1995; Roberfroid, 1988; Van Loo, 2004). La ingestión de prebióticos provoca un desplazamiento en la composición de la población bacteriana intestinal, generalmente caracterizada por un aumento relativo de especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Este desplazamiento en la microbiota intestinal está asociado con una mejor salud general, menos infecciones intestinales, mejor absorción de los minerales, y
40 supresión del inicio del cáncer de colon (Van Loo, 2004; Macfarlane *et al.*, 2006).

La fermentación de prebióticos por las bacterias colónicas produce un aumento en la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA), tales como acetato, propionato, butirato y lactato, que actúan como sumideros de electrones de la respiración en el entorno anaerobio del intestino. La presencia de SCFA en el intestino contribuye a disminuir el pH, mejora la biodisponibilidad del calcio y del magnesio, e inhibe las bacterias potencialmente perjudiciales (Teitelbaum y Walker, 2002; Wong *et al.*, 2006). Entre los SCFA, el butirato es el que tiene mayor interés, puesto que el butirato es una fuente de energía preferida para los colonocitos (Roediger, 1982), estimula las células epiteliales del colon, y así aumenta la capacidad absorbente del epitelio (Topping y Clifton, 2001), e inhibe el crecimiento de células del carcinoma colónico, *in vitro* e *in vivo* (Scheppach *et al.*, 1995). Las propiedades
50 supresoras del cáncer de las fibras dietéticas parece correlacionarse con su capacidad para generar butirato tras la fermentación colónica (Perrin *et al.*, 2001).

La estimulación selectiva por los prebióticos de ciertas bacterias colónicas, tales como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, que generalmente emplean vías sacarolíticas para alimentar sus necesidades energéticas, en algunos casos es pareja a la supresión de la fermentación de proteínas en el colon (van Nuenen *et al.*, 2003; De Preter *et al.*, 2004; Geboes *et al.*, 2005). Una menor fermentación de proteínas en el colon es un resultado deseado, puesto que las vías de degradación de aminoácidos en bacterias dan como resultado la producción de catabolitos potencialmente tóxicos, tales como amoniaco, aminas, fenoles, indoles y tioles, algunos de los cuales se han implicado en el cáncer de intestino (Bone *et al.*, 1976; Johnson, 1977; Visek, 1978) y en la exacerbación de

enfermedades, tales como la colitis ulcerosa (Ramakrishna *et al.*, 1991).

Las preparaciones de xilo-oligosacáridos (XOS, oligosacáridos que consisten en unidades de D-xilopiranosilo β -1,4-enlazadas) con predominancia de oligosacáridos con un grado de polimerización (DP) de 2-3 (xilobiosa y xilotriosa), han demostrado provocar un aumento significativo en el nivel de bifidobacterias y SCFA en las heces y el ciego de ratas (documento EP 0265970B1; Campbell *et al.*, 1997; Hsu *et al.*, 2004), y el colon de seres humanos (Okazaki *et al.*, 1990). Estas preparaciones de XOS ricas en xilobiosa también suprimen los síntomas tempranos de la carcinogénesis de colon inducida por productos químicos en ratas (Hsu *et al.*, 2004) y potencian la absorción de calcio en el colon (Toyoda *et al.*, 1993). Los experimentos descritos en el documento WO2006/002495 han proporcionado pruebas de que los oligosacáridos derivados de arabinoxilano, también denominados arabinoxilano-oligosacáridos o AXOS, con un DP medio (avDP) intermedio que varía de 5 a 50, tienen mejores propiedades prebióticas que AXOS con un avDP mayor, y son menos dulces que las preparaciones de AXOS con un avDP menor. La adición de dichas preparaciones de AXOS a la dieta provoca un aumento significativo en el número de bifidobacterias presentes en el ciego de pollos, el ciego de ratas, y las heces de seres humanos (documento WO2006/002495).

Los prebióticos, incluyendo AXOS, generalmente son oligosacáridos hidrosolubles que pueden incorporarse con facilidad en una amplia gama de productos alimentarios sin afectar de forma perceptible a su sabor o textura. Por tanto, en general los prebióticos se consideran ingredientes particularmente adecuados para la preparación de alimentos procesados con bajo contenido en fibra dietética. En efecto, la adición de prebióticos permite conferir a estos alimentos ciertos beneficios para la salud asociados con la presencia de fibra dietética, sin alterar su aspecto atractivo, sabor ni textura. Por otra parte, los alimentos ricos en fibra dietética, tales como alimentos de cereales integrales o alimentos enriquecidos con salvado, generalmente no están suplementados con oligosacáridos prebióticos.

En el contexto de la presente invención, se demostró que los arabinoxilanos no extraíbles de agua, tales como los contenidos en el trigo integral y los alimentos enriquecidos con salvado, son un sustrato particularmente adecuado para la formación de ácido butírico en el intestino grueso. Además, se descubrió, de forma sorprendente, que un consumo combinado de arabinoxilano no extraíble de agua y arabinoxilano-oligosacáridos tiene un efecto sinérgico sobre la producción de ácido butírico en el intestino grueso. Este descubrimiento indica que, independientemente de su alto contenido en fibra dietética, resulta beneficioso suplementar los alimentos existentes que contienen cantidades sustanciales de arabinoxilanos no extraíbles de agua, tales como trigo integral y alimentos enriquecidos con salvado, con arabinoxilano-oligosacáridos. Por otra parte, el efecto sinérgico de los arabinoxilano-oligosacáridos y los arabinoxilanos no extraíbles de agua sobre la producción de butirato intestinal permite preparar alimentos que contienen arabinoxilanos no extraíbles de agua que, en combinación con los arabinoxilano-oligosacáridos, proporcionan, tras su ingestión, unos niveles deseables de butirato en el intestino grueso, al mismo tiempo que tienen un sabor y una textura agradables. Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a composiciones nutricionales, que incluyen productos alimentarios, que contienen niveles adecuados de arabinoxilanos no extraíbles de agua y arabinoxilano-oligosacáridos que, tras su ingestión, proporcionan una producción intestinal deseable de butirato. Además, se ha observado que el consumo de una composición nutricional que comprende arabinoxilanos no extraíbles de agua y arabinoxilano-oligosacáridos estimula la producción de butirato, mientras que suprime en gran medida la fermentación de proteínas en el intestino grueso. Así, en un segundo aspecto, la presente invención se refiere a composiciones nutricionales que comprenden arabinoxilanos no extraíbles de agua y arabinoxilano-oligosacáridos que, tras su ingestión, proporcionan la producción de butirato y la inhibición de la fermentación de proteínas en el intestino grueso.

El documento WO 2008/098320 se refiere a métodos para aumentar el nivel de arabinoxilo-oligosacáridos solubles en la cerveza para mejorar el sabor y/o la sensación en la boca de dicha cerveza.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona composiciones nutricionales, más en concreto suplementos alimentarios y productos alimentarios procesados, enriquecidos con arabinoxilano-oligosacáridos, y que comprenden además arabinoxilanos no extraíbles de agua o arabinoxilanos hidrosolubles, o ambos. Preferiblemente, dichas composiciones nutricionales comprenden arabinoxilano-oligosacáridos y arabinoxilanos no extraíbles de agua.

Descripción detallada

Listado de figuras

Figura 1: Efecto de diferentes tipos de arabinoxilanos y sus combinaciones aditivas sobre la concentración de acetato (A), propionato (B) y butirato (C) en el colon de ratas después de 14 días de alimentación. Las concentraciones se expresan en mmol por kg sobre la base del peso fresco del contenido colónico. Las barras de error indican la desviación estándar. Las diferentes letras sobre las barras indican las diferencias significativas a $p < 0,05$.

Figura 2: Efecto de diferentes tipos de arabinoxilanos y sus combinaciones aditivas sobre las concentraciones

sumadas de isovalerato e isobutirato en el colon de ratas después de 14 días de alimentación. Las concentraciones se expresan en mmol por kg sobre la base del peso fresco del contenido colónico. Las barras de error indican la desviación estándar. Las diferentes letras sobre las barras indican las diferencias significativas a $p < 0,05$.

5 Figura 3: Efecto de diferentes tipos de arabinoxilanos y sus combinaciones a dosis totales iguales sobre la concentración de acetato (A), propionato (B) y butirato (C) en el ciego de ratas después de 14 días de alimentación. La denominación "Triple" indica la combinación de AXOS, WU-AX y WS-AX. Las concentraciones se expresan en μmol por ciego. El recuadro representa los cuartiles 0,25 y 0,75; la mediana es el cuadrado negro dentro del recuadro; las líneas se trazan en los valores mínimo y máximo.

10 Figura 4: Efecto de diferentes tipos de arabinoxilanos y sus combinaciones aditivas a dosis totales iguales sobre las concentraciones sumadas de isovalerato e isobutirato en el colon de ratas después de 14 días de alimentación. La denominación "Triple" indica la combinación de AXOS, WU-AX y WS-AX. Las concentraciones se expresan en μmol por ciego. El recuadro representa los cuartiles 0,25 y 0,75; la mediana es el cuadrado negro dentro del recuadro; las líneas se trazan en los valores mínimo y máximo.

Descripción

15 Tal como se emplea en la presente, "arabinoxilano-oligosacáridos" o "AXOS" se refiere a oligosacáridos de arabinoxilanos que comprenden una cadena principal de unidades de D-xilopiranosilo β -1,4-enlazadas, a las cuales pueden unirse unidades de O-2 y/o O-3 α -L-arabinofuranosilo. Las preparaciones de AXOS derivadas de arabinoxilanos generalmente contienen oligosacáridos de D-xilopiranosido β -1,4-enlazados no sustituidos (xilo-oligosacáridos o XOS), así como oligosacáridos de D-xilopiranosido β -1,4-enlazados sustituidos con L-arabinofuranosilo, y las mezclas que contienen ambas entidades moleculares también se denominan AXOS. Para los fines de la presente invención, se prefiere que el grado medio de sustitución de arabinosa de los arabinoxilano-oligosacáridos varíe entre 0,15 y 1,0, más preferiblemente entre 0,15 y 0,50. Preferiblemente, el grado medio de polimerización de los arabinoxilano-oligosacáridos varía entre 3 y 50, más preferiblemente entre 3 y 20, por ejemplo entre 3 y 10 o entre 3 y 8. Generalmente, los arabinoxilano-oligosacáridos o AXOS pueden solubilizarse en una cantidad suficiente de agua a una temperatura entre 70 °C y 100 °C, y permanecen solubles después de enfriar hasta 70 °C y la adición de etanol hasta una concentración final del 70% (en v/v) a 70 °C. Los arabinoxilano-oligosacáridos adecuados para su uso en el método según la presente invención pueden obtenerse mediante la hidrólisis parcial de arabinoxilanos extraídos de cereales o de materiales derivados de cereales. Más preferiblemente, los arabinoxilano-oligosacáridos se obtienen mediante la hidrólisis de arabinoxilanos procedentes de salvado, por ejemplo salvado de trigo o centeno.

Tal como se emplea en la presente, los "arabinoxilanos hidrosolubles" o "WS-AX" se refieren a moléculas de arabinoxilanos, que pueden solubilizarse en una cantidad suficiente de agua a una temperatura de entre 70 °C y 100 °C, pero que se hacen insolubles después de enfriar hasta 70 °C y la adición de etanol hasta una concentración final del 70% (en v/v) a 70 °C. Estos arabinoxilanos hidrosolubles preferiblemente tienen un grado medio de sustitución de arabinosa entre 0,15 y 1,0, más preferiblemente entre 0,15 y 0,70. El grado de polimerización de estos arabinoxilanos hidrosolubles generalmente es mayor que 50 y puede aumentar hasta 15000, correspondiente a un peso molecular de aproximadamente 2 millones. Dada la viscosidad extremadamente alta de WS-AX de alto peso molecular, se prefiere que el WS-AX que se vaya a utilizar en la presente invención tenga un grado medio de polimerización de entre 50 y 1000, más preferiblemente entre 50 y 500, por ejemplo entre 100 y 400. Los WS-AX están presentes en la naturaleza en muchos cereales y harinas de cereales. Se encuentran cantidades particularmente altas de WS-AX en la mayoría de las variedades de centeno, y en casos más raros, en algunas variedades de trigo, tales como por ejemplo la variedad Yumai-34, así como en harina, harina fina, salvado u otras fracciones de molienda derivadas de estos. Además, el contenido en WS-AX de la harina, la harina fina, el salvado u otras fracciones de molienda de un cereal puede aumentar mezclando una cantidad apropiada de una preparación enzimática que comprende actividad endoxilanasas en dicha harina, harina fina o salvado, y después incubando dicha mezcla humedecida durante un periodo de tiempo apropiado. Durante el periodo de incubación, una fracción de los arabinoxilanos no extraíbles de agua comprendidos en dicha harina, harina fina o salvado se solubilizan. Preferiblemente, dicha preparación enzimática comprende también al menos una endoxilanasas que es muy selectiva para WU-AX. Preferiblemente, la preparación enzimática se añade en una cantidad suficiente para aumentar el contenido en WS-AX en la harina, harina fina, salvado u otras fracciones de molienda de un cereal en al menos 25%, preferiblemente al menos 50%, más preferiblemente al menos 100%, y hasta 500%, mientras que el contenido en WU-AX se reduce en la cantidad correspondiente. El WS-AX también puede obtenerse de harina, harina fina, salvado u otra fracción de molienda de un cereal que contenga arabinoxilanos no extraíbles de agua, tratando dicho material de cereal con una disolución acuosa alcalina a un pH en exceso de 11. La disolución alcalina provoca la solubilización de parte del arabinoxilano no extraíble de agua, y los arabinoxilanos solubilizados se comportan como WS-AX y se denominan arabinoxilanos solubilizados con álcalis (AS-AX).

Tal como se emplea en la presente, "arabinoxilanos no extraíbles de agua" o "WU-AX" se refiere a moléculas de arabinoxilano que no pueden solubilizarse en agua a una temperatura entre 70 °C y 100 °C. Estos arabinoxilanos no extraíbles de agua preferiblemente pueden tener un grado medio de sustitución de arabinosa entre 0,1 y 1,3, más preferiblemente entre 0,35 y 1,0. El grado medio de polimerización de estos arabinoxilanos no extraíbles de agua

generalmente es mayor que 200. Los WU-AX están presentes en cantidades relativamente altas en la mayoría de los cereales y en la harina, harina fina y/o salvado derivado de estos. En particular, el salvado es una buena fuente de WU-AX.

5 Tal como se utiliza en la presente, "amilasa termoestable" se refiere a una enzima amilasa (EC 3.2.1.1) cuya temperatura óptima para la actividad es al menos 70 °C, tal como entre 70 °C y 80 °C, o tal como entre 80 °C y 90 °C, o tal como entre 90 °C y 100 °C.

El término "cereal", en el contexto de la presente invención, se refiere a plantas de la familia botánica de las Poáceas que incluye, pero no se limita a especies tales como el trigo, la cebada, la avena, el centeno, el sorgo, el maíz y el arroz.

10 El término "salvado" en el contexto de la presente invención, significa una fracción molida derivada del grano del cereal enriquecida en cualquiera o todos los tejidos que se seleccionan de aleurona, pericarpio, revestimiento de la semilla, sepalos y pétalos, comparado con el correspondiente grano de cereal intacto.

15 Tal como se emplea en la presente, "tamaño de ración" se refiere a la porción recomendada de un producto alimentario que se va a consumir en una sola comida. Generalmente, la información sobre el tamaño de ración se proporciona en el envase de la mayoría de los productos alimentarios como un elemento de la etiqueta nutricional. Para ciertos productos alimentarios, una práctica consiste en envasar los productos alimentarios en unidades individuales que comprenden una cantidad de producto alimentario que se corresponde al tamaño de ración.

20 Tal como se utiliza en la presente, un "producto alimentario procesado" se refiere a cualquier tipo de producto alimentario que resulte de la transformación de ingredientes brutos en alimentos para ser consumidos por seres humanos. Los alimentos procesados en general son producidos por la industria alimentaria de forma que son adecuados para el consumo con o sin un procesamiento mínimo posterior. Las etapas de procesamiento posteriores se limitan, por ejemplo, a añadir un líquido, tal como agua o leche y/o calentar el producto. Estos alimentos procesados generalmente se comercializan en un envase especializado, que comprende un único o múltiples tamaños de ración del producto alimentario. Además, el envase de los alimentos procesados porta una etiqueta alimentaria que proporciona información sobre los ingredientes del producto y su composición nutricional, así como el tamaño de ración recomendado del producto. Los ejemplos de alimentos procesados incluyen productos horneados, productos lácteos, productos de pasta, cereales listos para consumir, preparaciones de frutas, zumos de fruta, néctares, batidos, productos cárnicos procesados y pasteles, incluyendo productos de chocolate. En una realización particular, los alimentos procesados incluyen alimentos procesados para gatos y perros, tales como preparaciones enlatadas o pienso extrusionado embolsado.

35 Tal como se emplea en la presente, "productos horneados" se refiere a cualquier tipo de producto horneado preparado a partir de masa, masa de pastel o rebozado, de carácter blando o crujiente, de tipo blanco, ligero o negro. La masa o el rebozado generalmente es una masa o un rebozado de harina fina que comprende harina de trigo o harina fina de trigo y/u otros tipos de harinas, harinas finas o almidones, tales como harina fina de maíz, almidón de maíz, harina de centeno, harina fina de centeno, harina fina de avena, harina de avena, harina fina de soja, harina de sorgo, harina fina de sorgo, almidón de arroz, harina fina de arroz, harina de patata, harina fina de patata o almidón de patata. La masa o el rebozado generalmente se leuda mediante la adición de un cultivo microbiano adecuado, preferiblemente un cultivo de levaduras, tal como un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadero) o mediante la adición de un agente leudante químico, tal como bicarbonato de sodio. La masa puede ser fresca, congelada o semihorneada. Los productos horneados basados en masa comestible preferidos incluyen pan (en particular pan blanco, de trigo, de harina integral, bajo en carbohidratos, moreno, de múltiples granos, negro y de centeno), generalmente en forma de rebanadas, bollos o panecillos, y más preferiblemente pan de molde, bollos de hamburguesas, pan francés de tipo baguette, pan de pita, tortillas, pasteles, tortitas, galletas, galletas saladas, masa para pasteles, pan crujiente, pan al vapor, masa para pizzas y similares. La masa o el rebozado también pueden comprender otros ingredientes para masas convencionales, por ejemplo, proteínas, tales como leche o leche en polvo, gluten y soja; huevos (huevos enteros, yema de huevo o clara de huevo); manteca, tal como aceite o grasa granulada; un oxidante, tal como ácido ascórbico, bromato de potasio, yodato de potasio, azodicarbonamida (ADA) o persulfato de amonio; un agente reductor, tal como L-cisteína; un azúcar; una sal, tal como cloruro de sodio, acetato de calcio, sulfato de sodio o sulfato de calcio. La masa puede comprender también un emulgente, tal como mono- o diglicéridos, ésteres del ácido diacetiltartárico de mono- o diglicéridos, ésteres de azúcares de ácidos grasos, ésteres de poliglicerol de ácidos grasos, ésteres de ácido láctico de monoglicéridos, ésteres de ácido acético de monoglicéridos, estearatos de polioxitileno, fosfolípidos, lecitina y lisolecitina.

55 La presente invención se basa en los descubrimientos de un estudio comparativo de los efectos de diferentes tipos de moléculas de arabinosilano y sus combinaciones sobre los parámetros relacionados con la salud gastrointestinal. En un modelo animal, que resulta predictivo para los seres humanos y otros vertebrados monogástricos, los efectos relacionados con la salud intestinal y prebióticos de la administración de polisacáridos de xilano o arabinosilano varían según las propiedades fisicoquímicas y el peso molecular de estas moléculas. Se descubrió, de forma sorprendente, que la administración combinada de AXOS y WU-AX a través de la dieta produjo un aumento

sinérgico en la producción de butirato en el intestino grueso. Este descubrimiento fue de particular interés dada la importancia del butirato como principal fuente de energía para las células epiteliales del colon y considerando las pruebas cada vez mayores de que la capacidad de formar butirato en el intestino grueso se correlaciona con las propiedades supresoras de cáncer de colon de carbohidratos no digeribles (Perrin *et al.*, 2001; McIntosh *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 2006).

Así, un primer objeto de la presente invención es proporcionar una nueva composición nutricional que comprende cantidades apropiadas de AXOS y WU-AX, en la que la administración gastrointestinal de dicha composición nutricional proporciona un aumento deseado en la producción de butirato en el intestino grueso. La composición nutricional de la invención puede estar en cualquier forma adecuada para la administración humana, y en particular es adecuada para la administración al tracto gastrointestinal. Normal y preferiblemente, esto implica composiciones adecuadas para la administración oral, aunque una composición para la administración directa en el intestino, tal como un catéter o tubo de vía, también forma parte de la invención. La composición nutricional de la invención también puede estar en una forma adecuada para la administración oral a gatos o perros, que en el mundo occidental cada vez se alimentan más con pienso para mascotas muy procesado.

Preferiblemente, dicha composición nutricional comprende, sobre una base de peso seco, entre 1% (en p/p) y 80% (en p/p) de AXOS, y entre 1% (en p/p) y 35% (en p/p) de WU-AX. Más preferiblemente, el contenido en AXOS de dicha composición nutricional es mayor que 1,5% (en p/p), lo más preferiblemente mayor que 2,5% (en p/p), tal como por ejemplo, mayor que 3%, 4%, 5%, 7,5% o 10% (en p/p) sobre una base de peso seco. También se prefiere más que el contenido en WU-AX de dicha composición nutricional sea mayor que 1,5% (en p/p), lo más preferiblemente mayor que 2,5% (en p/p), tal como por ejemplo, mayor que 3%, 4%, 5%, 7,5% o 10% (en p/p) sobre una base de peso seco. Opcionalmente, una composición nutricional según la presente invención comprende además entre 0,75% (en p/p) y 80% (en p/p) de WS-AX. Más preferiblemente, dicha composición nutricional comprende más del 1% (en p/p), más preferiblemente más del 1,25% (en p/p), tal como por ejemplo, más del 1,5%, 2% o 3% (en p/p) de WS-AX sobre una base de peso seco.

En una realización preferida, la composición nutricional de la presente invención es un suplemento alimentario. Preferiblemente, dicho suplemento alimentario comprende entre 5% (en p/p) y 80% (en p/p) de AXOS, y entre 2,5% (en p/p) y 35% (en p/p) de WU-AX sobre una base de peso seco. Más preferiblemente, el contenido en AXOS de dicho suplemento alimentario es mayor que 5% (en p/p), más preferiblemente mayor que 10% (en p/p), por ejemplo, mayor que 20%, 30% o 40% (en p/p), y preferiblemente no mayor que 80% (en p/p), por ejemplo, menor que 70% (en p/p) o 60% (en p/p) en peso seco. También se prefiere más que el contenido en WU-AX de dicho suplemento alimentario sea mayor que 2,5% (en p/p), más preferiblemente mayor que 5% (en p/p), por ejemplo, mayor que 10%, 15% o 20% (en p/p), y preferiblemente no mayor que 35% (en p/p), por ejemplo, menor que 30% (en p/p) o 25% (en p/p) en peso seco.

Opcionalmente, dicho suplemento alimentario puede comprender también entre 1% (en p/p) y 80% (en p/p) de WS-AX. Más preferiblemente, el contenido en WS-AX de dicho suplemento alimentario es mayor que 5% (en p/p), más preferiblemente mayor que 10% (en p/p), por ejemplo, mayor que 20%, 30% o 40% (en p/p), y preferiblemente no mayor que 80% (en p/p), por ejemplo, menor que 70% (en p/p), 60% o 50% (en p/p) en peso seco.

En total, el suplemento alimentario según la presente invención comprende preferiblemente entre 20% (en p/p) y 90% (en p/p), más preferiblemente entre 30% (en p/p) y 80% (en p/p), por ejemplo, entre 40% (en p/p) y 70% (en p/p) de arabinosilanos y AXOS en peso seco. El resto pueden ser otros carbohidratos no digeribles, almidón, azúcares, proteínas, minerales, grasas, colorantes, conservantes y similares.

El suplemento alimentario de la presente invención puede estar en una forma para la administración separada, tal como una cápsula, un comprimido, un polvo, un sobre, una composición líquida o una forma similar. Este suplemento puede comprender también uno o más adyuvantes, vehículos o excipientes adecuados para su uso en suplementos alimentarios, así como uno o más componentes adicionales y/o aditivos descritos anteriormente.

El suplemento alimentario también puede estar en forma de un polvo, una composición líquida o una forma similar, que se añade o se mezcla con un alimento adecuado o un vehículo líquido o sólido adecuado, para la preparación de un alimento o bebida que esté listo para consumir. Por ejemplo, el suplemento alimentario puede estar en forma de un polvo que puede mezclarse o suspenderse, por ejemplo, en agua, leche y zumo de fruta, entre otros. También puede estar en forma de un polvo o líquido que puede mezclarse con alimentos sólidos o con alimentos con un alto contenido en agua, tales como queso blando o alimentos fermentados, por ejemplo, yogur.

En otra realización preferida, la composición nutricional de la presente invención es un producto alimentario procesado, que incluye productos bebibles. Preferiblemente, este producto alimentario procesado comprende entre 1% (en p/p) y 25% (en p/p) de AXOS, y entre 1% (en p/p) y 25% (en p/p) de WU-AX sobre una base de peso seco. Más preferiblemente, el contenido en AXOS de dicho producto alimentario procesado es mayor que 1,5% (en p/p), lo más preferiblemente mayor 2,5% (en p/p), tal como por ejemplo, mayor que 3%, 4%, 5%, 7,5% o 10% (en p/p), y preferiblemente no mayor que 25% (en p/p), por ejemplo, menor que 20% (en p/p) o 15% (en p/p) en peso seco. También se prefiere más que el contenido en WU-AX de dicho suplemento alimentario sea mayor que 1,5% (en p/p), lo más preferiblemente mayor que 2,5% (en p/p), tal como por ejemplo, mayor que 3%, 4%, 5%, 7,5% o 10% (en p/p),

y preferiblemente no mayor que 25% (en p/p), por ejemplo, menor que 20% (en p/p) o 15% (en p/p) en peso seco.

Opcionalmente, dicho producto alimentario procesado puede comprender también entre 0,75% (en p/p) y 15% (en p/p) de WS-AX. Más preferiblemente, el contenido en WS-AX de dicho producto alimentario procesado es mayor que 1% (en p/p), más preferiblemente mayor que 1,25% (en p/p), por ejemplo, mayor que 1,5%, 2% o 3% (en p/p), y preferiblemente no mayor que 15% (en p/p), por ejemplo, menor que 12% (en p/p) o 10% (en p/p) en peso seco.

En una realización más preferida, dicho producto alimentario procesado comprende entre 1 y 15 g de WU-AX, y entre 1 y 10 g de AXOS por tamaño de ración de dicho producto alimentario procesado. Más preferiblemente, dicho producto alimentario procesado comprende más de 1, más preferiblemente más de 2 g, por ejemplo, más de 2,5, 3 o 4 g de AXOS por tamaño de ración, y preferiblemente no más de 10 g, por ejemplo, menos de 8 g o 5 g de AXOS por tamaño de ración. También se prefiere más que dicho producto alimentario procesado comprenda más de 1, más preferiblemente más de 2 g, por ejemplo, más de 2,5, 3, 4, 5 o 6 g de WU-AX por tamaño de ración, y preferiblemente no más de 15 g, por ejemplo, menos de 12 o 10 g de WU-AX por tamaño de ración. Opcionalmente, dicho producto alimentario procesado comprende además entre 0,3 y 10 g de WS-AX por ración. Preferiblemente, dicho producto alimentario procesado comprende más de 0,3, más preferiblemente más de 0,75 g, por ejemplo, más de 1, 1,5, 2, 2,5, 3 o 4 g de WS-AX por ración, y preferiblemente no más de 10 g, por ejemplo, menos de 8 o 5 g de WS-AX por ración.

En una realización concreta, los productos alimentarios procesados según la presente invención son productos horneados, tales como pan, galletas, galletas para el desayuno, galletas saladas, pasteles, pizzas, tartas, magdalenas, pastelitos, incluyendo pastelitos para tostadora, entre otros. El tamaño de ración de estos productos varía según el producto. El tamaño de ración del pan varía generalmente entre 80 y 100 g, mientras que el tamaño de ración de las galletas, galletas para el desayuno, tartas y pastelitos generalmente es entre 30 y 50 g. El tamaño de ración de las galletas generalmente es entre 15 y 30 g. Estos productos horneados pueden comprender rellenos, revestimientos y/o coberturas; sin embargo, cuando se determina el contenido en AXOS, WS-AX o WU-AX sobre una base de peso seco para estos productos, el peso seco de estos rellenos, revestimientos y/o coberturas debe restarse del peso total del producto alimentario procesado. En otra realización concreta, un producto alimentario procesado según la presente invención es un cereal listo para consumir, que incluye barritas de cereales, muesli y granola. Los tamaños de ración típicos de los cereales listos para consumir varían entre 30 y 50 g; este tamaño de ración no incluye la leche u otros productos lácteos o sustitutos de lácteos que puedan añadirse a los cereales. En otra realización concreta, un producto alimentario procesado según la presente invención es un producto de pasta. Los tamaños de ración típicos para los productos de pasta varían entre 80 y 125 g de pasta seca, excluyendo cualquier salsa, queso, carne u otros ingredientes añadidos. En otra realización concreta, un producto alimentario procesado según la presente invención es un producto lácteo, tal como leche, bebida a base de leche, yogur, yogur para beber y queso blando, entre otros. El tamaño de ración del yogur varía entre 100 y 200 g, mientras que una ración típica de leche, bebidas a base de leche y yogur para beber es de aproximadamente 200 g. En general, los tamaños de ración de los productos de queso blando varían entre 100 y 150 g. En otra realización concreta, un producto alimentario procesado según la presente invención es una bebida a base de frutas, tal como un batido. El tamaño de ración de la bebida a base de frutas generalmente es entre 150 y 300 g.

Un segundo objeto de la presente invención es proporcionar el uso de cualquiera de las composiciones nutricionales descritas anteriormente para estimular la producción de butirato en el intestino tras la administración gastrointestinal de dichas composiciones nutricionales. Sin querer estar limitados por ninguna teoría, se supone que esta mayor producción de butirato es el resultado de una acción moduladora sobre la microflora intestinal de la presencia combinada en el intestino de WU-AX y AXOS.

Además, de forma interesante se ha descubierto que la administración combinada de AXOS y WS-AX a través de la dieta tiene un sorprendente potente efecto inhibitor sobre la fermentación de las proteínas intestinales, combinado con un efecto positivo sobre la producción de ácido butírico. Así, en un tercer objeto, la presente invención proporciona una composición nutricional enriquecida con AXOS y WS-AX. Preferiblemente, dicha composición nutricional comprende, sobre una base de peso seco, entre 1% (en p/p) y 80% (en p/p) de AXOS, y entre 1% (en p/p) y 80% (en p/p) de WS-AX. Más preferiblemente, el contenido en AXOS de dicha composición nutricional es mayor que 1,5% (en p/p), lo más preferiblemente mayor que 2,5% (en p/p), tal como por ejemplo, mayor que 3%, 4%, 5%, 7,5% o 10% (en p/p) sobre una base de peso seco. También se prefiere más que el contenido en WS-AX de dicha composición nutricional sea mayor que 1,5% (en p/p), lo más preferiblemente mayor que 2,5% (en p/p), tal como por ejemplo, mayor que 3%, 4%, 5%, 7,5% o 10% (en p/p) sobre una base de peso seco. Opcionalmente, una composición nutricional según la presente invención comprende además entre 1% (en p/p) y 35% (en p/p) de WU-AX en peso seco. Más preferiblemente, dicha composición nutricional comprende más del 1% (en p/p), más preferiblemente más del 1,25% (en p/p), tal como por ejemplo, más del 1,5%, 2% o 3% (en p/p) de WU-AX sobre una base de peso seco.

En una realización preferida, la composición nutricional según el tercer objeto de la presente invención es un suplemento alimentario. Preferiblemente, dicho suplemento alimentario comprende entre 10% (en p/p) y 80% (en p/p) de AXOS, y entre 10% (en p/p) y 80% (en p/p) de WS-AX sobre una base de peso seco. Más preferiblemente, el contenido en AXOS de dicho suplemento alimentario es mayor que 10% (en p/p), por ejemplo, mayor que 20%, 30%

o 40% (en p/p), y preferiblemente no mayor que 80% (en p/p), por ejemplo, menor que 70%, 60% o 50% (en p/p) de peso seco. También se prefiere más que el contenido en WS-AX de dicho suplemento alimentario sea mayor que 2,5% (en p/p), más preferiblemente mayor que 10% (en p/p), por ejemplo, mayor que 20%, 30% o 40% (en p/p), y preferiblemente no mayor que 80% (en p/p), por ejemplo, menor que 70%, 60% o 50% (en p/p) en peso seco.

5 Opcionalmente, dicho suplemento alimentario puede comprender también entre 1% (en p/p) y 35% (en p/p) de WU-AX. Más preferiblemente, el contenido en WU-AX de dicho suplemento alimentario es mayor que 1,5% (en p/p), lo más preferiblemente mayor que 2,5% (en p/p), tal como por ejemplo, mayor que 3%, 4%, 5%, 7,5% o 10% (en p/p), y preferiblemente no mayor que 25% (en p/p), por ejemplo, menor que 20% (en p/p) o 15% (en p/p) de peso seco.

10 En total, el suplemento alimentario según la presente invención comprende preferiblemente entre 20% (en p/p) y 90% (en p/p), más preferiblemente entre 30% (en p/p) y 80% (en p/p), por ejemplo, entre 40% (en p/p) y 70% (en p/p) de arabinosilanos y AXOS en peso seco. El resto pueden ser otros carbohidratos no digeribles, almidón, azúcares, proteínas, minerales, grasas, colorantes, conservantes y similares.

15 El suplemento alimentario de la presente invención puede estar en una forma para la administración separada, tal como una cápsula, un comprimido, un polvo, un sobre, una composición líquida o una forma similar. Este suplemento puede comprender también uno o más adyuvantes, vehículos o excipientes adecuados para su uso en suplementos alimentarios, así como uno o más componentes adicionales y/o aditivos descritos anteriormente.

20 El suplemento alimentario también puede estar en forma de un polvo, una composición líquida o una forma similar, que se añade o se mezcla con un alimento adecuado o un vehículo líquido o sólido adecuado, para la preparación de un alimento o bebida que esté listo para consumir. Por ejemplo, el suplemento alimentario puede estar en forma de un polvo que puede mezclarse o suspenderse, por ejemplo, en agua, leche y zumo de fruta, entre otros. También puede estar en forma de un polvo o líquido que puede mezclarse con alimentos sólidos o con alimentos con un alto contenido en agua, tales como queso blando o alimentos fermentados, por ejemplo, yogur.

25 En otra realización preferida, la composición nutricional según el tercer objeto de la presente invención es un producto alimentario procesado. Preferiblemente, este producto alimentario procesado comprende entre 0,75 y 15% (en p/p) de WS-AX, y entre 1,0 y 15% de AXOS sobre una base de peso seco. Más preferiblemente, el contenido en AXOS de dicho producto alimentario procesado es mayor que 1,5% (en p/p), lo más preferiblemente mayor que 2,5% (en p/p), tal como por ejemplo, mayor que 3%, 4%, 5%, 7,5% o 10% (en p/p), y preferiblemente no mayor que 25% (en p/p), por ejemplo, menor que 20% (en p/p) o 15% (en p/p) de peso seco. También se prefiere más que el contenido en WS-AX de dicho suplemento alimentario sea mayor que 0,75% (en p/p), lo más preferiblemente mayor que 2,5% (en p/p), tal como por ejemplo, mayor que 3%, 4%, 5%, 7,5% o 10% (en p/p), y preferiblemente no mayor que 15% (en p/p), por ejemplo, menor que 12% (en p/p) en peso seco.

30 Opcionalmente, dicho producto alimentario procesado puede comprender también entre 0,75% (en p/p) y 15% (en p/p) de WU-AX. Más preferiblemente, el contenido en WU-AX de dicho producto alimentario procesado es mayor que 1% (en p/p), más preferiblemente mayor que 1,25% (en p/p), por ejemplo, mayor que 1,5%, 2% o 3% (en p/p), y preferiblemente no mayor que 15% (en p/p), por ejemplo, menor que 12% (en p/p) o 10% (en p/p) en peso seco.

35 En una realización preferida, dicho producto alimentario procesado según el tercer objeto de la presente invención es un producto alimentario procesado que comprende entre 0,3 y 15 g de WS-AX, y entre 1 y 10 g de AXOS por tamaño de ración de dicho producto alimentario procesado. Preferiblemente, dicho producto alimentario procesado comprende más de 1 g, más preferiblemente más de 2 g, por ejemplo, más de 3 g o 4 g de AXOS por tamaño de ración, y preferiblemente no más de 10 g, por ejemplo, menos de 8 g o 5 g de AXOS por ración. Preferiblemente, dicho producto alimentario procesado comprende más de 0,3, más preferiblemente más de 0,75 g, por ejemplo, más de 1, 2, 3 o 4 g de WS-AX por tamaño de ración, y preferiblemente no más de 10 g, por ejemplo, menos de 8 g de WS-AX por ración. Opcionalmente, dicho producto alimentario procesado comprende además entre 0,3 y 20 g de WU-AX por ración. Preferiblemente, dicho producto alimentario procesado comprende más de 0,5, más preferiblemente más de 0,75 g, por ejemplo, más de 1, 2, 3 o 5 g de WU-AX por ración, y preferiblemente no más de 15 g, por ejemplo, menos de 10 g de WU-AX por ración.

40 En una realización concreta, los productos alimentarios procesados según el tercer objeto de la presente invención son productos horneados, tales como pan, galletas, galletas para el desayuno, galletas saladas, pasteles, pizzas, magdalenas, pastelitos, incluyendo pastelitos para tostadora, entre otros. Estos productos horneados pueden comprender rellenos, revestimientos y/o coberturas; sin embargo, cuando se determina el contenido en AXOS, WS-AX o WU-AX sobre una base de peso seco para estos productos, el peso seco de estos rellenos, revestimientos y/o coberturas debe restarse del peso total del producto alimentario procesado. En otra realización concreta, un producto alimentario procesado según el tercer objeto de la presente invención es un cereal listo para consumir, que incluye barritas de cereales, muesli y granola. En otra realización concreta, un producto alimentario procesado según el tercer objeto de la presente invención es un producto de pasta. En otra realización concreta, un producto alimentario procesado según el tercer objeto de la presente invención es un producto lácteo, tal como leche, bebida a base de leche, yogur, yogur para beber y queso blando, entre otros. En otra realización concreta, un producto alimentario procesado según el tercer objeto de la presente invención es una bebida a base de frutas, tal como un batido.

5 La presente invención proporciona además el uso de preparaciones enriquecidas en AXOS para la producción de cualquiera de las composiciones nutricionales según se especificó anteriormente. Preferiblemente, dicha preparación enriquecida en AXOS comprende más del 15% (en p/p), más preferiblemente más del 30% (en p/p), lo más preferiblemente más del 40% (en p/p), por ejemplo, más del 50%, 60% o 70% (en p/p) y hasta 99% (en p/p), tal como hasta 90 u 85% (en p/p) de AXOS sobre una base de peso seco. Se prefiere que el grado medio de sustitución de arabinosa del AXOS en esta preparación varíe entre 0,15 y 1,0, más preferiblemente entre 0,15 y 0,50, lo más preferiblemente entre 0,15 y 0,30. Preferiblemente, el grado medio de polimerización del AXOS comprendido en dicha preparación varía entre 3 y 50, más preferiblemente entre 3 y 20, por ejemplo entre 3 y 10 o entre 3 y 8.

10 La presente invención también proporciona el uso de una preparación rica en WU-AX para la producción de cualquiera de las composiciones nutricionales que contienen WU-AX según se especificó anteriormente. Preferiblemente, dichas preparaciones enriquecidas en WU-AX comprenden más del 10% (en p/p), más preferiblemente más del 15% (en p/p), lo más preferiblemente más del 20% (en p/p), por ejemplo, más del 30% o 40% (en p/p) y hasta 60% (en p/p), tal como hasta 50% o 45% (en p/p) de WU-AX sobre una base de peso seco. En una realización preferida, dicho material rico en WU-AX es salvado de un cereal, tal como salvado de trigo, centeno, 15 maíz o arroz. En una realización más preferida, los componentes hidrosolubles se extraen de dicho salvado para aumentar la concentración relativa de WU-AX en dicho salvado. En una realización aún más preferida, una fracción sustancial del material de proteína o de salvado, o de ambos, se extrae de dicho salvado, por ejemplo, utilizando una proteasa y una amilasa, respectivamente.

20 La presente invención proporciona además el uso de materiales ricos en WS-AX para la producción de composiciones nutricionales que contienen WS-AX según se especificó anteriormente. Este material rico en WS-AX puede ser una harina, una harina fina u otra fracción de molienda de una variedad de trigo, tal como Yumai-34, o centeno naturalmente rico en WS-AX. Generalmente, dicha harina, harina fina u otra fracción de molienda del trigo o centeno comprende entre 1,5% y 8% (en p/p) de WS-AX sobre una base de peso seco. Como alternativa, puede utilizarse un material derivado de cereales procesado para estar enriquecido en WS-AX. Preferiblemente, dichas 25 preparaciones enriquecidas en WS-AX comprenden más del 15% (en p/p), más preferiblemente más del 30% (en p/p), lo más preferiblemente más del 40% (en p/p), por ejemplo, más del 50%, 60% o 70% (en p/p) y hasta 99% (en p/p), tal como hasta 90 o 85% (en p/p) de WS-AX sobre una base de peso seco. Además, los materiales de cereales, tales como harina, harina fina u otra fracción de molienda de un cereal, pueden procesarse de modo que al menos parte del WU-AX comprendido en dicho material de cereal se transforma en WS-AX. Preferiblemente, dicho 30 material de cereal se trata utilizando una preparación de endoxilanasa exógena a una dosis que permite aumentar al menos en 100% y hasta 500%, el contenido en WS-AX naturalmente presente en dicha fracción de cereal. Es posible que el tratamiento con endoxilanasa de dicho material de cereal pueda realizarse durante la producción del producto alimentario procesado.

35 El contenido en AXOS de una composición nutricional de la presente invención se determina preferiblemente como la suma de toda la xilosa y arabinosa unida en la fase soluble obtenida después de extraer dicha composición nutricional con agua caliente a una temperatura entre 95 °C y 100 °C durante al menos 30 minutos en presencia de una amilasa termoestable, y a la cual, después de enfriar hasta 70 °C, se ha añadido etanol hasta una concentración final de etanol/agua 70/30 (en v/v). El contenido en WU-AX de una composición nutricional según la presente invención se mide preferiblemente como la suma de toda la arabinosa y la xilosa unidas retenidas en el residuo 40 obtenido después de extraer dicha composición nutricional con agua caliente a una temperatura entre 95 °C y 100 °C durante al menos 30 minutos en presencia de una amilasa termoestable, seguido de un enfriamiento del extracto hasta 70 °C. El contenido en WS-AX de una composición nutricional de la presente invención se determina preferiblemente como la suma de toda la arabinosa y la xilosa unidas en la fase soluble obtenida después de extraer dicha composición nutricional con agua caliente a una temperatura entre 95 °C y 100 °C durante al menos 30 45 minutos en presencia de una amilasa termoestable y después enfriar dicho extracto hasta 70 °C, menos el contenido en AXOS comprendido en dicha composición nutricional. Los métodos para medir WU-AX y AXOS en las composiciones nutricionales se describen más a fondo en el ejemplo 1.

La invención se ilustra más a fondo mediante las realizaciones ilustrativas descritas a continuación.

Realizaciones ilustrativas

50 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Efecto sobre los parámetros intestinales de preparaciones de WU-AX, WS-AX y AXOS y sus combinaciones aditivas

Materiales y métodos

Preparación de AXOS

55 El AXOS fue preparado por FUGEIA NV (Leuven, Bélgica) a partir de salvado de trigo mediante un tratamiento con endoxilanasa (véase Swennen *et al.*, 2006). Después de un aclarado utilizando una centrifuga de disco y después de la inactivación con calor de la enzima, el sobrenadante se filtró y se purificó haciéndolo pasar sobre resinas de

intercambio aniónico y de intercambio catiónico. Por último, la disolución se concentró y se secó por pulverización. Las etapas de aclarado y de purificación con resinas de intercambio iónico no son fundamentales para las propiedades del AXOS descrito en la presente invención. La composición y la caracterización de la preparación de AXOS se muestra en la tabla 1.

5 Preparación de WS-AX

El WS-AX se preparó a partir de salvado de trigo comercial tratando el salvado de trigo suspendido en agua desmineralizada (8 litros de agua por kg de materia seca) con una amilasa comercial (BAN 480 L, Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca; 1 ml de preparación de enzima por kg de materia seca) a 70° C con agitación constante durante 90 minutos, seguido por una filtración y un enjuagado a fondo del residuo con agua desmineralizada. El salvado sin almidón entonces se suspendió en agua desmineralizada (10 litros de agua por kg de materia seca) y se trató con xilanasa comercial (Multifect CX 12 L, Danisco, Copenhagen, Dinamarca; 0,25 ml de preparación de enzima por kg de materia seca) a 50 °C con agitación constante durante 8 h. La fase líquida se recuperó después de una filtración. Después de la inactivación de la enzima mediante el tratamiento del filtrado durante 10 minutos a 90 °C, la disolución se concentró en un evaporador de película descendente, y por último se secó en un secador de pulverización. La composición y la caracterización de la preparación de WS-AX se muestra en la tabla 1.

Preparación de WU-AX

El WU-AX se preparó a partir de salvado de trigo comercial tratando el salvado de trigo suspendido en agua desmineralizada (10 litros de agua por kg de materia seca) con una amilasa comercial (Termamyl 120 L, Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca; 1 ml de preparación de enzima por kg de materia seca) a 90° C durante 90 minutos. Después de enfriar la pasta hasta 50 °C, el pH de la pasta se adaptó a pH 6,0 mediante la adición de HCl y se trató con una proteasa comercial (Neutrase 0.8 L, Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca; 40 ml de preparación de enzima por kg de materia seca) a 50° C con agitación constante durante 4 h. La pasta se calentó hasta 100 °C y se mantuvo a esta temperatura durante 10 minutos. Después de enfriar hasta 60 °C, la pasta se filtró, el residuo se lavó a fondo con agua desmineralizada, y por último se secó en un liofilizador. La composición y la caracterización de la preparación de WU-AX se muestra en la tabla 1.

Caracterización de los sacáridos

Se determinó el contenido en sacáridos totales, sacáridos de extremo reductor, y monosacáridos libres mediante un análisis cromatográfico de gases-líquidos, según se describe en Courtin *et al.*, (2000). Para la determinación del contenido en sacáridos totales, se hidrolizaron 40 mg de muestras secas suspendidas en 2,5 ml de agua destilada, o 2,5 ml de extractos acuosos que contienen sacáridos de las mezclas, mezclando con 2,5 ml de ácido trifluoroacético 4,0 M e incubando a 110 °C durante 60 minutos. Después de la hidrólisis, la mezcla se filtró y después 3,0 ml del filtrado se trataron añadiendo 1,0 ml de una disolución de patrón interno (100 mg de beta-D-alosa en 100 ml de una disolución de ácido benzoico saturada al 50%), 1,0 ml de disolución de amoníaco (al 25% en v/v) y 3 gotas de 2-octanol. Los monosacáridos fueron reducidos a alditoles mediante la adición de 200 µl de una disolución de borohidruro de sodio (200 mg de borohidruro de sodio en 1,0 ml de amoníaco 2 M), y la muestra se incubó durante 30 minutos a 40 °C. La reacción se detuvo mediante la adición de 400 µl de ácido acético glacial. Para la reacción de acetilación, se añadieron 500 µl de la muestra que contiene los alditoles a 5,0 ml de anhídrido acético y 500 µl de 1-metilimidazol. Después de 10 minutos se retiró el exceso de anhídrido acético mediante la adición de 900 µl de etanol a la muestra. Después los acetatos de alditol se concentraron en la fase orgánica mediante la adición de agua (10 ml) y una disolución de hidróxido de potasio (2 veces 5,0 ml de una disolución 7,5 M, con un descanso intermedio de unos pocos minutos). Se añadió una disolución de azul de bromofenol (500 µl, al 0,04% en p/v) como indicador para la fase acuosa. Se separaron partes alícuotas de 1 µl de la fase orgánica que contenía los acetatos de alditol formados mediante una cromatografía de gases en una columna polar Supelco SP-2380 (30 m x 0,32 mm D.I.; 0,2 µm de espesor de película) (Supelco, Bellefonte, PA, EEUU) en un cromatógrafo Agilent (serie Agilent 6890, Wilmington, DE, EEUU) equipado con un automuestreador, un puerto de inyección de reparto (proporción de reparto 1:10) y un detector de ionización de llama. Los monosacáridos purificados D-glucosa, D-manosa, D-galactosa, D-xilosa y L-arabinosa se trataron en paralelo con cada conjunto de muestras con objetivos de calibración, y la calibración tomó en cuenta la degradación parcial de los patrones de monosacáridos durante la etapa de hidrólisis (6% para la D-glucosa, 8% para la D-manosa, 6% para la D-galactosa, 11% para la D-xilosa, y 5% para la L-arabinosa).

Para la determinación del contenido en sacáridos de extremo reductor, se mezclaron 40 mg de muestras secas suspendidas en agua, o 2,5 ml de extractos acuosos que contienen sacáridos de las muestras, con 500 µl de un patrón interno (100 mg de beta-D-alosa en 100 ml de una disolución de ácido benzoico saturada al 50%), 50 µl de disolución de amoníaco (al 25% en v/v) y 9 gotas de 2-octanol. Los sacáridos fueron reducidos a alditoles mediante la adición de 200 µl de una disolución de borohidruro de sodio (200 mg de borohidruro de sodio en 1,0 ml de amoníaco 2 M), y la muestra se incubó durante 30 minutos a 40 °C. La reacción se detuvo mediante la adición de 400 µl de ácido acético glacial. Una parte alícuota de 2,5 ml de la muestra que contiene los sacáridos reducidos se hidrolizó mediante la adición de 500 µl de ácido trifluoroacético (al 99%), y la muestra se incubó a 110 °C durante 60 minutos. Después de la hidrólisis, se realizó un análisis de acetilación y de cromatografía de gases como se

describió anteriormente. Los monosacáridos purificados D-glucosa, D-manosa, D-galactosa, D-xilosa y L-arabinosa se trataron en paralelo con cada conjunto de muestras con objetivos de calibración.

5 Para la determinación del contenido en monosacáridos libres, se mezclaron 40 mg de muestras secas suspendidas en agua, o 2,5 ml de extractos acuosos que contienen sacáridos de las muestras, con 500 µl de un patrón interno (100 mg de beta-D-aloza en 100 ml de una disolución de ácido benzoico saturada al 50%), 50 µl de disolución de amoniaco (al 25% en v/v) y 9 gotas de 2-octanol. Los sacáridos fueron reducidos a alditoles mediante la adición de 200 µl de una disolución de borohidruro de sodio (200 mg de borohidruro de sodio en 1,0 ml de amoniaco 2 M), y la muestra se incubó durante 30 minutos a 40 °C. La reacción se detuvo mediante la adición de 400 µl de ácido acético glacial. Una parte alícuota de 2,5 ml de la muestra que contiene los sacáridos reducidos se acetiló y se analizó 10 mediante una cromatografía de gasas como se describió anteriormente. Los monosacáridos purificados D-glucosa, D-manosa, D-galactosa, D-xilosa y L-arabinosa se trataron en paralelo con cada conjunto de muestras con objetivos de calibración.

Para los análisis descritos anteriormente se obtuvieron los siguientes valores:

15 · %totxil, %totara, %totgal, %totman, %totglu son las concentraciones de xilosa, arabinosa, galactosa, manosa y glucosa total (polimérica y libre), respectivamente, según se determina mediante el procedimiento de análisis de sacáridos totales.

· %redxil, %redara, %redgal, %redman, %redglu son las concentraciones de xilosa, arabinosa, galactosa, manosa y glucosa de extremo reductor, respectivamente, según se determina mediante el procedimiento de análisis de sacáridos de extremo reductor.

20 · %xillibre, %aralibre, %gallibre, %manlibre %glulibre son las concentraciones de xilosa, arabinosa, galactosa, manosa y glucosa libres, respectivamente, según se determina mediante el procedimiento de análisis de monosacáridos libres.

El contenido en glucosa unida no celulósica, galactosa unida, manosa unida, xilosa unida y arabinosa unida se calculó mediante las fórmulas (1), (2), (3), (4) y (5), respectivamente:

25 (1) $(\%totglu - \%glulibre) \cdot 162/180$

(2) $(\%totgal - \%gallibre) \cdot 162/180$

(3) $(\%totman - \%manlibre) \cdot 162/180$

(4) $(\%totxil - \%xillibre) \cdot 132/150$

(5) $(\%totara - \%aralibre) \cdot 132/150$

30 El contenido en arabinoxilano o AXOS (%AX/AXOS) en la muestra se calculó mediante la fórmula (6):

(6) $(\%totxil - \%redxil) \cdot 132/150 + (\%totara - \%aralibre) \cdot 132/150 + (\%redxil - \%xillibre)$

El grado medio de polimerización (avDP) del arabinoxilano o AXOS se calculó utilizando la fórmula (7):

(7) $(\%totxil - \%xillibre + \%totara - \%aralibre) / (\%redxil - \%xillibre)$

La proporción de arabinosa a xilosa (proporción A/X) del arabinoxilano o AXOS se calculó utilizando la fórmula (8):

35 (8) $(\%totara - \%aralibre) / (\%totxil - \%xillibre)$

Determinación del contenido en WU-AX, WS-AX y AXOS

Se determinó el contenido en WU-AX, WS-AX y AXOS en una muestra, por ejemplo, una muestra alimentaria, mediante el siguiente conjunto de análisis paralelos.

La cantidad total de AX o AXOS (TOT-AX/AXOS) en una muestra se determinó como sigue:

40 · Se pesan de forma precisa tres partes alícuotas de 40 mg de la muestra seca con un contenido en materia seca conocido.

· Se determina el contenido en sacáridos totales, sacáridos de extremo reductor y monosacáridos libres para cada una de las muestras de 40 mg, respectivamente.

45 · Se calcula el %TOT-AX/AXOS como el %AX/AXOS utilizando la anterior fórmula (6) sobre la base de 40 mg (multiplicado por el porcentaje de materia seca) de la muestra original.

ES 2 416 086 T3

La cantidad total de AX hidrosoluble (= WS-AX + AXOS) en una muestra se determina mediante el siguiente procedimiento:

- 5
- Se pesan de forma precisa aproximadamente 500 mg de la muestra seca con un contenido en materia seca conocido, se trasladan a un tubo de centrifuga con tapón y se añaden 10,8 ml de tampón MES/TRIS 50 mM (pH 8,2).
 - Se colocan los tubos en un baño de agua hirviendo, se añaden 15 µl de una α-amilasa termoestable (Termamyl 120 LS, Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca) en cuanto la temperatura del líquido de los tubos es de al menos 80 °C, y se incuba durante 30 minutos a 95-100 °C.
 - Se enfría hasta 60-70 °C.
- 10
- Se añaden 29,2 ml de agua (precalentada a 60 °C) y se incuban los tubos en un baño de agua a 70 °C durante 20 minutos con agitación y otros 20 minutos sin agitación.
 - Se centrifugan los tubos a 4.000 x g durante 15 minutos.
 - Se recogen 35 ml del sobrenadante y se trasladan a un tubo de centrifuga limpio.
 - Se centrifugan los tubos a 10.000 x g durante 15 minutos.
- 15
- Se recogen 30 ml del sobrenadante.
 - Se determina el contenido en sacáridos totales, sacáridos de extremo reductor y monosacáridos libres sobre las partes alícuotas de 2,5 ml de las muestras de sobrenadante aclaradas.
 - Se calcula el %WS-AX/AXOS como el %AX/AXOS utilizando la anterior fórmula (6), suponiendo un peso seco de la muestra de 1000*2,5/40 mg (multiplicado por el porcentaje de materia seca) de la muestra original.
- 20
- Se determinó la cantidad total de AX o AXOS soluble en etanol (ETS-AX/AXOS) en una muestra mediante el siguiente procedimiento:
- Se pesan de forma precisa aproximadamente 500 mg de la muestra seca con un contenido en materia seca conocido, se trasladan a un tubo de centrifuga con tapón y se añaden 10,8 ml de tampón MES/TRIS 50 mM (pH 8,2).
- 25
- Se colocan los tubos en un baño de agua hirviendo, se añaden 15 µl de una α-amilasa termoestable (Termamyl 120 LS, Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca) en cuanto la temperatura del líquido de los tubos es de al menos 80 °C, y se incuba durante 30 minutos a 95-100 °C.
 - Se enfría hasta 60-70 °C.
- 30
- Se añaden 29,2 ml de etanol al 96% (en v/v)/agua (precalentado a 60 °C) de forma que la concentración final de etanol es del 70% (en v/v), y se incuban los tubos en un baño de agua a 70 °C durante 20 minutos con agitación y otros 20 minutos sin agitación.
 - Se centrifugan los tubos a 4.000 x g durante 15 minutos.
 - Se recogen 35 ml del sobrenadante y se trasladan a un tubo de centrifuga limpio.
 - Se centrifugan los tubos a 10.000 x g durante 15 minutos.
- 35
- Se recogen 30 ml del sobrenadante.
 - Se evapora el disolvente en un instrumento Rotavap hasta que quedan aproximadamente 3 ml en el matraz. Se añaden 10 ml de agua destilada a 70 °C, se agita bien y se trasladan a un cilindro medidor. Se añaden 10 ml más de agua destilada al matraz del rotavapor, se agita bien y se trasladan al mismo cilindro medidor. Se ajusta el líquido en el cilindro medidor a 30 ml mediante la adición de agua destilada.
- 40
- Se determina el contenido en sacáridos totales, sacáridos de extremo reductor y monosacáridos libres sobre las partes alícuotas de 2,5 ml del líquido recogido en el cilindro medidor.
 - Se calcula el %ETS-AX/AXOS como el %AX/AXOS utilizando la anterior fórmula (6), suponiendo un peso seco de la muestra de 1000*2,5/40 mg (multiplicado por el porcentaje de materia seca) de la muestra original.
- Se calcula el %WU-AX utilizando la fórmula (9):
- 45
- (9) %WU-AX = %TOT-AX/AXOS - %WS-AX/AXOS

Se calcula el %WS-AX utilizando la fórmula (10):

$$(10) \%WS-AX = \%WS-AX/AXOS - \%ETS-AX/AXOS$$

Se calcula el %AXOS utilizando la fórmula (11):

$$(11) \%AXOS = \%ETS-AX/AXOS$$

5 *Determinación del contenido en humedad y cenizas*

Se analizó el contenido en humedad y cenizas según los métodos AACC 44-19 y 08-01, respectivamente (métodos aprobados de the American Association of Cereal Chemist, 10ª edición, 2000, The Association, St. Paul, MN, EEUU).

Determinación del contenido en proteínas

10 Se determinó el contenido en nitrógeno y el contenido en proteínas deducido según el método de combustión de Dumas, utilizando un sistema de análisis de proteínas Dumas automático (EAS varioMax N/CN, Eit, Gouda, Países Bajos) que sigue una adaptación de método oficial de AOAC para la determinación de proteínas (Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, 16ª edición, 1995, método 990.03, AOAC Washington DC, EEUU). El contenido en proteínas fue deducido multiplicando el contenido en nitrógeno por el factor 6,25.

15 *Condiciones de ensayo de los animales*

Se obtuvieron ratas macho de 6 semanas (Wistar) en Elevage Janvier (Le Genest-St-Isle, Francia) y se asignaron aleatoriamente a 6 grupos de 10 ratas cada uno. Las ratas se alojaron en jaulas con fondo de alambre de acero inoxidable (2 ratas por jaula) en una sala con el ambiente controlado (22 °C) con un ciclo de luz-oscuridad de 14-10 h. Las ratas accedieron libremente al agua y a pienso (10 mm) de la dieta "control" (tabla 2) durante 6 días. Después de 6 días de adaptación con la dieta control, las ratas se asignaron aleatoriamente a uno de los 6 grupos de tratamiento diferentes (10 ratas/grupo), y los grupos pudieron acceder libremente al pienso (10 mm) durante 14 días de una de las 6 dietas descritas en la tabla 2.

Los animales se pesaron y se midió la ingesta de alimento 3 veces semanales. Después de 14 días de tratamiento, todos los animales se pesaron y se eutanizaron mediante asfixia con dióxido de carbono. Después los animales se diseccionaron para recoger el contenido del colon y ciego.

30 *Análisis de los ácidos grasos de cadena corta.* A viales que contenían muestras intestinales (2 g) se les añadió lo siguiente: 0,5 ml de ácido sulfúrico 9,2 M, 0,4 ml de ácido 2-metilhexanoico al 0,75% (en v/v) (patrón interno), 0,4 g de NaCl y 2 ml de éter dietílico. Después de agitar los viales durante 2 minutos, los viales se centrifugaron (3 min a 3000 x g), y la fase de éter dietílico se trasladó a viales de vidrio. La fase de éter dietílico que contenía los ácidos orgánicos se analizó en un cromatógrafo de gases-líquidos equipado con una columna EC-1000 Econo-Cap (Alltech, Laame, Bélgica; dimensiones: 25 m x 0,53 mm, espesor de la película 1,2 µm; polietilenglicol modificado con ácido como fase líquida) y un detector de ionización de llama. Se empleó nitrógeno como gas vehículo a un caudal de 20 ml por minuto, y la temperatura de la columna y la temperatura del inyector se ajustaron a 130 °C y 195 °C, respectivamente. Se calcularon las concentraciones de SCFA basándose en patrones con concentraciones conocidas de los diferentes ácidos. Se empleó el ácido 2-metilhexanoico como patrón interno (Van de Wiele *et al.*, 2007).

40 *Análisis estadístico.* Se analizó el efecto de las dietas sobre diferentes parámetros mediante el ensayo de Kruskal-Wallis no paramétrico con un nivel de confianza del 95% utilizando el programa informático Analyse-it, versión 2.07. En caso de observar un efecto estadísticamente significativo para el factor dieta, se analizan las diferencias entre las dietas con una protección de error de Bonferroni con un nivel de confianza del 95%.

Resultados

45 Las ratas se utilizaron como modelo *in vivo* para estudiar el efecto de la inclusión en la dieta de diferentes tipos de arabinosilanos en mamíferos. Para este fin, se formaron y caracterizaron preparaciones de arabinosilano-oligosacáridos de bajo peso molecular (AXOS), arabinosilano hidrosoluble de alto peso molecular (WS-AX) y arabinosilano no extraíble de agua de alto peso molecular (WU-AX) (tabla 1). Las diferentes preparaciones se añadieron solas o en combinaciones aditivas a las diferentes dietas (tabla 2), y se evaluó una gama de parámetros relacionados con la salud intestinal después de un periodo de alimentación de 14 días.

No se observaron diferencias significativas en el peso corporal ni en la ingesta de alimento diaria entre los diferentes tratamientos.

50 Puesto que el aumento en los niveles de SCFA intestinales es una característica de la existencia de desplazamientos en la microflora intestinal inducidos por la ingesta de compuestos prebióticos (Macfarlane *et al.*, 2006), se midió la concentración de los principales SCFA, acetato, propionato y butirato, en el ciego y el colon de

ratas de los diferentes grupos de tratamiento. Además, puesto que se forman los SCFA ramificados isobutirato e isovalerato durante el catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina, y isoleucina y, así, se consideran un indicador de la fermentación de proteínas en el intestino (Mortensen *et al.*, 1992; Macfarlane y Macfarlane, 1995), se evaluaron los niveles de SCFA ramificados en el ciego y el colon de ratas. Los datos para los niveles de SCFA en el ciego y el colon se muestran en las tablas 3 y 4, respectivamente, y en las figuras 1 y 2 para los niveles de SCFA del colon. En las tablas 3 y 4, los datos se expresan sobre una base de peso fresco y seco del contenido del ciego o del colon. Además, puesto que algunas de las dietas provocaron un aumento significativo en la cantidad de contenido del ciego y, aunque en un grado menor, del contenido del colon, los datos también se expresaron como μmol de SCFA por ciego o por colon. Esta última presentación de los datos se considera que es biológicamente más pertinente, puesto que refleja la fermentación intestinal total y no se ve influida por las variaciones relacionadas con la dieta en la cantidad de digerido intestinal presente en los animales. Los cambios más marcados se observaron para la producción de butirato en el ciego (tabla 3) y el colon (tabla 4, figura 1C). El WS-AX por sí mismo provocó un aumento en el butirato producido por ciego y por colon con relación a la dieta control, y esto aumentó significativamente en la combinación de WS-AX con AXOS en el ciego y el colon con relación a la dieta con WS-AX solo. La combinación de WU-AX con AXOS también condujo a un aumento significativo en la cantidad de butirato producido por ciego con relación al WU-AX solo, excediendo la producción de butirato observada en la combinación WS-AX + AXOS. Los mayores niveles de butirato se encontraron en el ciego y el colon de las ratas que consumieron la dieta suplementada con la combinación de WU-AX, WS-AX y AXOS.

Se observaron unas reducciones significativas en los niveles de SCFA ramificados colónicos en todos los grupos que consumieron dietas que contenían WS-AX, solo o en combinación con AXOS o con AXOS y WU-AX. Los niveles de SCFA ramificados aumentaron en las ratas que consumieron la dieta que contenía WU-AX, pero estos niveles mayores se redujeron en las ratas que consumieron la combinación de WU-AX y AXOS, en especial en el colon.

Ejemplo 2: Efecto sobre los parámetros intestinales de preparaciones de WU-AX, WS-AX y AXOS y sus combinaciones a dosis totales iguales

Materiales y métodos

Preparación de AXOS

El AXOS fue preparado por FUGEIA NV (Leuven, Bélgica) a partir de salvado de trigo mediante un tratamiento con endoxilanas fundamentalmente como se describe en Swennen *et al.* (2006). Después de un aclarado utilizando una centrífuga de disco y después de la inactivación con calor de la enzima, el sobrenadante se filtró y se purificó haciéndolo pasar sobre resinas de intercambio aniónico y de intercambio catiónico. Por último, la disolución se concentró y se secó por pulverización. Las etapas de aclarado y de purificación con resinas de intercambio iónico no son fundamentales para las propiedades del AXOS descrito en la presente invención. La composición y la caracterización de la preparación de AXOS se muestra en la tabla 5.

Preparación de WU-AX

El WU-AX se preparó a partir de salvado de trigo comercial tratando el salvado de trigo suspendido en agua desmineralizada (1:10, en p/v) con una amilasa comercial (Termamyl 120 L, Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca; 1 ml por kg de salvado de trigo) a 90° C durante 90 minutos. Después de hervir (20 min) y de una centrifugación, el residuo sin almidón (DR) se lavó con agua y se resuspendió en agua desmineralizada (1:12, en p/v). El pH de la pasta se adaptó a pH 5,0 mediante la adición de HCl y la pasta se trató con una proteasa comercial (Neutrase 0.8 L, Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca; 80 ml kg de DR) a 55° C con agitación constante durante 4 h. La pasta se calentó hasta 100 °C y se mantuvo a esta temperatura durante 30 minutos. Después de enfriar hasta 60 °C, la pasta se filtró, el residuo se lavó a fondo con agua desmineralizada, y por último se secó en un liofilizador. La composición y la caracterización de la preparación de WU-AX se muestra en la tabla 1.

Preparación de WS-AX

Se suspendió en agua harina de endospermo de trigo comercial (1:5, en p/v) y se trató con Termamyl 120L (Novozymes, 60 ml por kg de harina de trigo) a 90° C durante 60 minutos. Después de hervir (20 min) y de una centrifugación de la suspensión, el residuo sin almidón (DR) se lavó con agua y se resuspendió en agua desionizada (1:5, en p/v). La suspensión se incubó a 50 °C y a un pH constante de 5,0 con agitación continua con Neutrase 0.8 L (Novozymes) a 20 ml por kg de DR durante 20 h. La enzima se inactivó mediante un hervido durante 30 min. Después de enfriar hasta 25 °C, la pasta se centrifugó y se rechazó el sobrenadante. El residuo sin almidón ni proteínas se lavó con agua y se resuspendió en agua desionizada. El pH de la suspensión se llevó a 12 mediante la adición de NaOH (8 M). La suspensión después se agitó durante 18 h a temperatura ambiente. Después del ajuste del pH a 7,0 mediante la adición de HCl (10 M), seguido de una centrifugación, los arabinosilanos solubilizados con álcalis (AS-AX) se recuperaron del sobrenadante. Los AS-AX del sobrenadante se precipitaron mediante la adición de etanol (3:1, en v/v), y los AS-AX precipitados se recogieron mediante filtración al vacío sobre un papel de filtro. El residuo se lavó después con acetona y éter dietílico. El éter residual se evaporó bajo una corriente de aire calentada a 50 °C. La composición y la caracterización de la preparación de WS-AX se muestra en la tabla 5.

Condiciones de ensayo de los animales

Se obtuvieron ratas macho de 6 semanas (Wistar) en Elevage Janvier (Le Genest-St-Isle, Francia). Las ratas se alojaron en jaulas de plástico con el fondo cubierto de serrín (2 ratas por jaula) en una sala con el ambiente controlado (22 °C) con un ciclo de luz-oscuridad de 14-10 h. Después de 6 días de adaptación con la dieta control (tabla 6), las ratas se asignaron aleatoriamente a uno de los 7 grupos de tratamiento diferente (10 ratas/grupo), y los grupos pudieron acceder libremente al pienso (10 mm) durante 14 días de una de las 7 dietas descritas en la tabla 6. Las ratas pudieron acceder libremente al agua y al pienso de la dieta apropiada.

Los animales se pesaron y se midió la ingesta de alimento 2 veces semanales. Después de 21 días de tratamiento, todos los animales se pesaron y se eutanzaron mediante asfixia con dióxido de carbono. Después los animales se diseccionaron para recoger el contenido del ciego.

Análisis

Para la determinación de los SCFA, se añadió lo siguiente a viales que contenían 300 mg de muestras intestinales: 200 µl de ácido sulfúrico 9,38 mol/l, 100 µl de ácido 2-metilhexanoico al 0,75% (en v/v) (patrón interno), 0,1 g de NaCl y 800 µl de éter dietílico. Después de agitar los viales durante 2 minutos, los viales se centrifugaron (2500 x g durante 5 minutos), y 1,0 µl de la fase de éter dietílico que contiene los ácidos orgánicos se trasladó a un vial de vidrio y se analizó mediante una cromatografía de gases según se describe en Van de Wiele *et al.* (2007).

Todos los demás análisis se realizaron como en el ejemplo 1.

Resultados

Las ratas se utilizaron como modelo *in vivo* para estudiar el efecto de la inclusión en la dieta de diferentes tipos de arabinosilanos en mamíferos. Para este fin, se formaron y caracterizaron preparaciones de arabinosilano-oligosacáridos de bajo peso molecular (AXOS), arabinosilano hidrosoluble de alto peso molecular (WS-AX) y arabinosilano no extraíble de agua de alto peso molecular (WU-AX) (tabla 5). Las diferentes preparaciones se añadieron solas o en combinaciones a las diferentes dietas, de modo que la suma de la concentración de AXOS y/o AX representa una dosis total igual del 5% en cada una de las dietas, excepto en la dieta control (tabla 6). Se evaluaron los parámetros relacionados con la salud intestinal después de un periodo de alimentación de 14 días.

Puesto que el aumento en los niveles de SCFA intestinales es una característica de la existencia de desplazamientos en la microflora intestinal inducidos por la ingesta de compuestos prebióticos (Macfarlane *et al.*, 2006), se midió la concentración de los principales SCFA, acetato, propionato y butirato, en el ciego para los diferentes grupos de tratamiento. Se observó una mayor producción de acetato en las dietas con solo AXOS añadido, solo WS-AX, AXOS combinado con WS-AX, y la triple combinación de AXOS, WS-AX y WU-AX (figura 3A). La cantidad de propionato producida por ciego no se vio muy afectada, pero se observó un aumento moderado para la dieta con AXOS en combinación con WS-AX (figura 3B). Como en el ejemplo 1, los cambios más marcados se observaron para la cantidad de butirato producido por ciego (figura 3C). AXOS y WS-AX por sí solos no afectaron a la producción de butirato del ciego cuando se compara con el control, mientras que la combinación de AXOS y WS-AX provocó un significativo aumento sinérgico de la producción de butirato del ciego. El WU-AX por sí solo provocó un aumento en la producción de butirato del ciego, pero WU-AX en combinación con AXOS y la triple combinación de AXOS, WS-AX y WU-AX produjo un fuerte aumento sinérgico de la producción de butirato.

Los SCFA ramificados isobutirato e isovalerato se forman durante el catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina, y isoleucina (Mortensen *et al.*, 1992; Macfarlane y Macfarlane, 1995) y se consideran un indicador de la fermentación de proteínas en el intestino. Por tanto, se evaluaron los contenidos del ciego de las ratas para los niveles de SCFA ramificados isobutirato e isovalerato. Se observaron reducciones en los niveles de SCFA ramificados en el ciego en los grupos que consumieron dietas que contenían solo AXOS, solo WS-AX, la combinación de AXOS y WS-AX, y la triple combinación de AXOS, WS-AX y WU-AX (figura 4).

Los efectos más deseado sobre los parámetros relacionados con la salud intestinal se observaron con las dietas que contenían una combinación de WS-AX y AXOS, una combinación de WU-AX y AXOS, o una combinación de WS-AX, AXOS y WU-AX. Con estas combinaciones, en particular con la combinación de WU-AX y AXOS y la combinación de WS-AX, AXOS y WU-AX, se observó un fuerte aumento sinérgico en la producción de butirato, el SCFA más beneficioso desde el punto de vista de la salud intestinal, en el intestino grueso. Con las dietas que contenían una combinación de AXOS y WS-AX y las dietas que contenían una combinación de WS-AX, AXOS y WU-AX, el aumento en los niveles de butirato vino acompañado de una reducción del nivel de SCFA ramificados, un marcador de la fermentación de proteínas intestinales no deseada.

Ejemplo 3: Producción de productos alimentarios procesados que contienen una combinación de WU-AX y AXOS

Se preparó un producto de cereal listo para consumir mezclando los siguientes ingredientes en un mezclador industrial:

| | |
|-------------------------------|-----|
| Harina de endospermo de trigo | 23% |
| Harina de maíz | 30% |
| Salvado de trigo | 25% |
| Preparación de AXOS | 7% |
| Sacarosa | 13% |
| Sal (NaCl) | 1% |
| Aceite vegetal | 1% |

5 En la anterior formulación, la preparación de AXOS es la misma que la utilizada en el ejemplo 2. La mezcla se extrusiona a través de un extrusor de doble tornillo convencional (Brabender) con un troquel de 1,2 mm y un cortador rotatorio para cortar el producto extrusionado. Durante la extrusión se introduce una dosificación de agua mediante un medidor de flujo hasta que se alcanza la consistencia deseada. En el momento en que se produce un producto de masa aceptable, se mantiene el flujo de agua en ese nivel mínimo aceptable. El producto extrusionado resultante después se seca.

Se prepara un producto alimentario de yogur mezclando los siguientes ingredientes:

| | |
|----------------------|-------|
| Yogur bajo en grasas | 84,2% |
| Salvado de trigo | 8,4% |
| Preparación de AXOS | 3,2% |
| Sacarosa | 4,2% |

10 En la anterior formulación, la preparación de AXOS es la misma que la utilizada en el ejemplo 2. Después de mezclar los ingredientes, el yogur se envasa en porciones individuales de 125 g.

Ejemplo 4: Producción de productos alimentarios que contienen una combinación de WU-AX, WS-AX y AXOS

15 Se preparó un producto alimentario de cereal listo para consumir mezclando los siguientes ingredientes en un mezclador industrial:

| | |
|-------------------------------|-----|
| Harina de endospermo de trigo | 22% |
| Harina integral de centeno | 31% |
| Salvado de trigo | 25% |
| Preparación de AXOS | 7% |
| Sacarosa | 13% |
| Sal (NaCl) | 1% |
| Aceite vegetal | 1% |

20 En la anterior formulación, la preparación de AXOS es la misma que la utilizada en el ejemplo 2. Por cada kg de la mezcla anterior se añaden 200 ml de una suspensión de agua que contiene 12 g de una preparación de endoxilanas (Grindamyl H640, Danisco, Copenhague, Dinamarca), se mezcla y se deja en reposo a temperatura ambiente durante 40 minutos. La mezcla se extrusiona a través de un extrusor de doble tornillo convencional (Brabender) con un troquel de 1,2 mm y un cortador rotatorio para cortar el producto extrusionado. El producto extrusionado resultante después se seca.

Tablas

Tabla 1: Composición y caracterización de las preparaciones de AXOS, WS-AX y WU-AX utilizadas en el ejemplo 1. Los parámetros de la composición se expresan como porcentaje (en p/p) sobre una base de peso seco. Proporción A/X: proporción de arabinosa a xilosa o grado medio de sustitución de arabinosa del arabinosilano; avDP: grado medio de polimerización del arabinosilano.

5

| | Preparación de AXOS | Preparación de WS-AX | Preparación de WU-AX |
|-------------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| ARABINOSILANO | | | |
| - xilosa unida | 68,2 | 45,8 | 28,2 |
| - arabinosa unida | 14,6 | 21,5 | 15,5 |
| - arabinosilano total | 85,2 | 67,3 | 43,7 |
| - proporción A/X | 0,21 | 0,47 | 0,55 |
| - avDP | 5 | 146 | >200 |
| OTROS CARBOHIDRATOS | | | |
| - glucosa unida no celulósica | 12,5 | 16,8 | 1,2 |
| - galactosa unida | 0,6 | 0,9 | 0,2 |
| - manosa unida | 0,2 | 0,7 | 1,5 |
| MONOSACÁRIDOS | | | |
| - xilosa | 1,2 | 0,2 | <0,1 |
| - arabinosa | 0,2 | 0,5 | <0,1 |
| - glucosa | 0,2 | 5,2 | <0,1 |
| OTROS COMPONENTES | | | |
| - proteínas | 0,4 | 3,5 | 10,4 |
| - cenizas | 0,5 | 0,2 | 4,4 |

Tabla 2: Composición de las diferentes dietas de las ratas (en g por 100 g) utilizadas en el ejemplo 1. Las concentraciones de las preparaciones de AXOS, WU-AX y WS-AX indicadas entre paréntesis fueron corregidas para su pureza según se calcula mediante su contenido total en AX/AXOS.

| | Control | WU-AX | WU-AX + AXOS | WS-AX | WS-AX + AXOS | WU-AX + WU-AX + AXOS |
|-----------------------------------|---------|-------------|--------------|-------------|--------------|----------------------|
| Almidón de maíz (pregelatinizado) | 73,50 | 66,30 | 63,28 | 68,16 | 65,94 | 58,74 |
| Preparación de AXOS | - | - | 2,22 (1,80) | - | 2,22 (1,80) | 2,22 (1,80) |
| Preparación de WU-AX | - | 9,14 (3,60) | 9,14 (3,60) | - | - | 9,14 (3,60) |
| Preparación de WS-AX | - | - | - | 5,34 (3,60) | 5,34 (3,60) | 5,34 (3,60) |
| Aislado de proteína de soja | 10,80 | 9,30 | 9,30 | 10,80 | 10,80 | 9,30 |
| Gluten de trigo | 5,00 | 5,00 | 5,00 | 5,00 | 5,00 | 5,00 |
| Aceite de soja | 3,50 | 3,20 | 3,20 | 3,50 | 3,50 | 3,20 |
| L-lisina | 0,45 | 0,50 | 0,50 | 0,45 | 0,45 | 0,50 |
| D,L-metionina | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 |

| | Control | WU-AX | WU-AX + AXOS | WS-AX | WS-AX + AXOS | WU-AX + WU-AX + AXOS |
|---------------------------------------|---------|-------|--------------|-------|--------------|----------------------|
| L-cisteína | 0,08 | 0,07 | 0,07 | 0,08 | 0,08 | 0,07 |
| L-treonina | 0,13 | 0,15 | 0,15 | 0,13 | 0,13 | 0,15 |
| L-triptófano | 0,07 | 0,07 | 0,07 | 0,07 | 0,07 | 0,07 |
| Premezcla de vitaminas | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| Premezcla de minerales/oligoelementos | 4,20 | 4,20 | 4,20 | 4,20 | 4,20 | 4,20 |
| Carbonato de calcio | 0,70 | 0,50 | 0,50 | 0,70 | 0,70 | 0,50 |
| Cr ₂ O ₃ | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 |
| Cloruro de colina | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 |
| Butilhidroxitoluol | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |

5 Tabla 3: Efecto de AXOS, WS-AX y WU-AX y sus combinaciones aditivas sobre las concentraciones de acetato, propionato, butirato y sobre las concentraciones sumadas de isovalerato e isobutirato (SCFA ramificados) en el ciego de ratas después de 14 días de alimentación. Las concentraciones se expresan en mmol por kg sobre una base de peso fresco (PF) del contenido del ciego, en mmol por kg sobre una base de peso seco (PS) del contenido del ciego, o en μ mol por ciego. Las diferentes letras detrás de los datos dentro de la misma columna indican una diferencia estadísticamente significativa a $p < 0,05$.

| Ciego | | | | |
|----------------------|--------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|---|
| | Acetato (mmol por kg de PF) | Propionato (mmol por kg de PF) | Butirato (mmol por kg de PF) | SCFA ramificados (mmol por kg de PF) |
| Control | 104,7 (b) | 24,1 (a) | 33,5 (c) | 3,1 (ab) |
| WU-AX | 112,2 (ab) | 23,5 (a) | 78,6 (ab) | 3,8 (a) |
| WU-AX + AXOS | 123,8 (ab) | 23,4 (a) | 108,8 (a) | 2,9 (ab) |
| WS-AX | 174,7 (a) | 30,1 (a) | 34,8 (c) | 0,2 (c) |
| WS-AX + AXOS | 133,3 (ab) | 20,4 (a) | 57 (bc) | 0,4 (c) |
| WU-AX + WS-AX + AXOS | 144,1 (ab) | 27,6 (a) | 102,7 (ab) | 1,5 (bc) |
| | Acetato (mmol por kg de PS) | Propionato (mmol por kg de PS) | Butirato (mmol por kg de PS) | SCFA ramificados (mmol por kg de PS) |
| Control | 556,8 (b) | 129 (a) | 184,5 (c) | 17,0 (bc) |
| WU-AX | 524,6 (b) | 110,4 (a) | 347,2 (b) | 17,9 (ab) |
| WU-AX + AXOS | 574,5 (b) | 110 (a) | 507,1 (a) | 13,6 (ab) |
| WS-AX | 987,5 (a) | 175,4 (a) | 204,8 (bc) | 1,1 (d) |
| WS-AX + AXOS | 717,8 (ab) | 112,8 (a) | 293,4 (ab) | 0,5 (cd) |
| WU-AX + WS-AX + AXOS | 731,2 (ab) | 140,9 (a) | 483,9 (a) | 6,4 (ab) |
| | Acetato (μ mol por ciego) | Propionato (μ mol por ciego) | Butirato (μ mol por ciego) | SCFA ramificados (μ mol por ciego) |
| Control | 194,4 (b) | 45,2 (b) | 63,4 (e) | 5,9 (a) |
| WU-AX | 255,9 (ab) | 55,3 (ab) | 181 (cd) | 8,7 (a) |

| | | | | |
|----------------------|-----------|-----------|-----------|---------|
| WU-AX + AXOS | 381,4 (a) | 77,3 (ab) | 366,5 (a) | 8,7 (a) |
| WS-AX | 754,5 (a) | 110,9 (a) | 140,1 (d) | 0,7 (b) |
| WS-AX + AXOS | 618 (ab) | 68,1 (ab) | 196 (c) | 0,4 (b) |
| WU-AX + WS-AX + AXOS | 699,1 (a) | 141,2 (a) | 459 (a) | 6 (ab) |

5

Tabla 4: Efecto de AXOS, WS-AX y WU-AX y sus combinaciones aditivas sobre las concentraciones de acetato, propionato, butirato y sobre las concentraciones sumadas de isovalerato e isobutirato (SCFA ramificados) en el colon de ratas después de 14 días de alimentación. Las concentraciones se expresan en mmol por kg sobre una base de peso fresco (PF) del contenido del colon, en mmol por kg sobre una base de peso seco (PS) del contenido del colon, o en μmol por colon. Las diferentes letras detrás de los datos dentro de la misma columna indican una diferencia estadísticamente significativa a $p < 0,05$.

| | Acetato (mmol por kg de PF) | Propionato (mmol por kg de PF) | Butirato (mmol por kg de PF) | SCFA ramificados (mmol por kg de PF) |
|----------------------|--------------------------------------|---|---------------------------------------|---|
| Control | 68,4 (a) | 12,5 (c) | 13,9 (d) | 2,5 (a) |
| WU-AX | 94,7 (a) | 17,9 (abc) | 46,1 (ab) | 2,4 (a) |
| WU-AX + AXOS | 104,6 (a) | 15,5 (abc) | 36,7 (bc) | 1,9 (a) |
| WS-AX | 93,3 (a) | 26 (a) | 22,1 (cd) | 0,6 (cd) |
| WS-AX + AXOS | 106,3 (a) | 14,1 (bc) | 37,3 (b) | 0,2 (d) |
| WU-AX + WS-AX + AXOS | 101,6 (a) | 19,8 (abc) | 58,2 (ab) | 1,5 (bc) |
| | Acetato (mmol por kg de PS) | Propionato (mmol por kg de PS) | Butirato (mmol por kg de PS) | SCFA ramificados (mmol por kg de PS) |
| Control | 213,7 (b) | 39,1 (b) | 47,6 (c) | 9,4 (a) |
| WU-AX | 285,7 (ab) | 53,9 (ab) | 141,9 (ab) | 7,8 (ab) |
| WU-AX + AXOS | 312,6 (ab) | 46,5 (b) | 102,4 (b) | 5,1 (bc) |
| WS-AX | 341 (ab) | 95,1 (a) | 69,8 (c) | 2,2 (de) |
| WS-AX + AXOS | 409,3 (a) | 54,2 (ab) | 136,9 (ab) | 0,7 (e) |
| WU-AX + WS-AX + AXOS | 368,4 (a) | 71,7 (a) | 193,2 (a) | 3,5 (cd) |
| | Acetato (μmol por colon) | Propionato (μmol por colon) | Butirato (μmol por colon) | SCFA ramificados (μmol por colon) |
| Control | 86,6 (b) | 14,3 (b) | 15 (d) | 2,7 (b) |
| WU-AX | 211,8 (ab) | 48,1 (a) | 116,4 (a) | 5,9 (a) |
| WU-AX + AXOS | 270,9 (a) | 40,5 (ab) | 86 (ab) | 4,3 (ab) |
| WS-AX | 141,3 (a) | 37,8 (ab) | 32,1 (c) | 1,2 (c) |
| WS-AX + AXOS | 209,5 (ab) | 25 (ab) | 77,4 (b) | 0,4 (c) |
| WU-AX + WS-AX + AXOS | 256,2 (a) | 52,3 (a) | 141 (a) | 2,8 (bc) |

10

Tabla 5: Composición y caracterización de las preparaciones de AXOS, WS-AX y WU-AX utilizadas en el ejemplo 2. Los parámetros de la composición se expresan como porcentaje (en p/p) sobre una base de peso seco. Proporción A/X: proporción de arabinosa a xilosa o grado medio de sustitución de arabinosa del arabinosilano; avDP: grado medio de polimerización del arabinosilano.

ES 2 416 086 T3

| | Preparación de AXOS | Preparación de WS-AX | Preparación de WU-AX |
|-------------------------------|---------------------|----------------------|----------------------|
| ARABINOXILANO | | | |
| - xilosa unida | 68,8 | 63,6 | 29,7 |
| - arabinosa unida | 14,6 | 29,4 | 17,8 |
| - arabinoxilano total | 83,4 | 81,3 | 41,3 |
| - proporción A/X | 0,21 | 0,45 | 0,57 |
| - avDP | 5 | >200 | >200 |
| OTROS CARBOHIDRATOS | | | |
| - glucosa unida no celulósica | 12,4 | 14,5 | 0,9 |
| - galactosa unida | 0,6 | 0,7 | 0,2 |
| - manosa unida | 0,2 | 0,8 | 1,5 |
| MONOSACÁRIDOS | | | |
| - xilosa | 1,2 | <0,1 | <0,1 |
| - arabinosa | 0,2 | <0,1 | <0,1 |
| - glucosa | 0,2 | <0,1 | <0,1 |
| OTROS COMPONENTES | | | |
| - proteínas | 0,4 | 1,8 | 10,4 |
| - cenizas | 0,5 | 0,4 | 5,7 |

Tabla 6: Composición de las diferentes dietas de las ratas (en g por 100 g) utilizadas en el ejemplo 2. Las concentraciones de las preparaciones de AXOS, WS-AX y WU-AX indicadas entre paréntesis se corrigieron para su pureza según se calcula mediante su contenido total en AX/AXOS.

| | Control | AXOS | WU-AX | AXOS + WU-AX | WS-AX | AXOS + WS-AX | AXOS + WU-AX + WS-AX |
|---------------------------------------|---------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|----------------------|
| Preparación de AXOS | 0,00 | 6,12 (5,00) | 0,00 | 3,80 (2,50) | 0,00 | 3,80 (2,50) | 2,06 (1,67) |
| Preparación de WU-AX | 0,00 | 0,00 | 12,58 (5,00) | 6,29 (2,50) | 0,00 | 0,00 | 4,17 (1,67) |
| Preparación de WS-AX | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 7,14 (5,00) | 3,57 (2,50) | 2,38 (1,67) |
| Almidón de maíz pregelatinizado | 74,54 | 68,42 | 62,88 | 65,65 | 67,40 | 67,88 | 66,22 |
| Aislado de proteína de soja | 14,00 | 14,00 | 14,00 | 14,00 | 14,00 | 14,00 | 14,00 |
| Gluten de trigo | 0,92 | 0,92 | 0,00 | 0,46 | 0,92 | 0,92 | 0,61 |
| L-lisina HCl | 0,36 | 0,36 | 0,36 | 0,36 | 0,36 | 0,36 | 0,36 |
| D,L-metionina | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 | 0,15 |
| L-cisteína | 0,12 | 0,12 | 0,12 | 0,12 | 0,12 | 0,12 | 0,12 |
| L-treonina | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 |
| L-triptófano | 0,07 | 0,07 | 0,07 | 0,07 | 0,07 | 0,07 | 0,07 |
| Premezcla de vitaminas | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 | 1,00 |
| Premezcla de minerales/oligoelementos | 4,20 | 4,20 | 4,20 | 4,20 | 4,20 | 4,20 | 4,20 |
| Fosfato de dicalcio | 0,70 | 0,70 | 0,70 | 0,70 | 0,70 | 0,70 | 0,70 |
| Cloruro de colina | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 | 0,20 |
| Butilhidroxitoluol | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |
| Aceite de soja | 3,50 | 3,50 | 3,50 | 3,50 | 3,50 | 3,50 | 3,50 |
| Cr ₂ O ₃ | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,02 |

Referencias bibliográficas

- Andersson, R. and Aman, P. (2001) Cereal arabinoxylan: occurrence, structure and properties. In *Advanced dietary fibre technology*, pp. 301-314 [BV McCleary and L Prosky, editors]. Oxford: Blackwell Science Ltd.
- Barron, C., Surget, A. and Rouau, X. (2007) Relative amounts of tissues in mature wheat (*Triticum aestivum* L.) grain and their carbohydrate and phenolic acid composition. *J. Cereal Sci.* 45: 88-96.
- Campbell J.M., Fahey, G.C., Wolf, B.W. (1997) Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rats. *J. Nutr.* 127:130-136
- Courtin CM, Broekaert WF, Swennen K, Lescroart O, Onagbesan O, Buyse J, Decuypere E, Van de Wiele T, Marzorati M, et al. Dietary inclusion of wheat bran arabinoxylooligosaccharides induces beneficial nutritional effects in chickens. *Cereal Chem.* 2008;85:607-13.
- Courtin, C.M. and Delcour, J.A. (2002). Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making. *J. Cereal Sci.* 35, 225-243.
- Courtin, C.M., Van den Broeck, H. and Delcour, J.A. (2000). Determination of reducing end sugar residues in oligo- and polysaccharides by gas liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 866, 97-104.
- De Preter V, Geboes K, Verbrugghe K, De Vuyst L, Vanhoutte T, Huys G, Swings J, Pot B, Verbeke K (2004) The in vivo use of the stable isotope-labelled biomarkers lactose-[15N]ureide and [2H4]tyrosine to assess the effects of pro- and prebiotics on the intestinal flora of healthy human volunteers. *Brit J Nutrition* 92: 439-446.
- Geboes K.P., De Peter V, Luybaerts A., Bammens B., Evenepoel P., Ghoos Y., Rutgeerts P., Verbeke K. (2005) Validation of lactose[15N,15N]ureide as a tool to study colonic nitrogen metabolism. *Am J Physiol* 288: G994-G999.
- Gibson, G.R. and Roberfroid M.B. (1995) Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 125: 1401-1412.
- Grasten S, Liukkonen K-H, Chrevatidis A, El-Nezami H, Poutanen K, Mykkanen H (2003) Effects of wheat pentosan and inulin on the metabolic activity of fecal microbiota and on bowel function in healthy humans. *Nutrition Research* 23: 1503-1514.
- Hsu C-K, Liao, J-W, Chung, Y-C, Hsieh, C-P, Chan, Y-C (2004) Xylooligosaccharides and fructooligosaccharides affect the intestinal microbiota and precancerous colonic lesions development in rats. *J. Nutr.* 134:1523-1528
- Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan JA, Prior RL. (2002) High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. *J Agric Food Chem.* 50:4437-4444.
- Izydorczyk MS, Billaderis CG. (1995) Cereal arabinoxylans: Advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydr Polym.* 28:33-48.
- Johnson K. A. (1977) The production of secondary amines by human gut bacteria and its possible relevance to carcinogenesis. *Med. Lab. Sci.* 34:131-143
- Kabel, M.A., Kortenoeven, L., Schols, H.A. & Voragen, A.G.J. (2002). In vitro fermentability of differently substituted xylo-oligosaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 6205-6210.
- Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt, E., Goodfellow, M. (Eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, United Kingdom, pp. 115-175.
- Macfarlane S and Macfarlane GT (1995) Proteolysis and amino acid fermentation. In: *Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, Physiology and Pathology*. Gibson GR Macfarlane GT (eds.) CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 75-100.
- Macfarlane S, Macfarlane GT, Cummings JH. (2006) Prebiotics in the gastrointestinal tract. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 24:701-14
- McIntosh GH, Royle PJ, Pointing G. (2001) Wheat aleurone flour increases cecal beta-glucuronidase activity and butyrate concentration and reduces colon adenoma burden in azoxymethane-treated rats. *J Nutr.* 131:127-131.
- Mortensen PB, Clausen MR, Bonnen H, Hove H, Holtug K. (1992) Colonic fermentation of ispaghula, wheat bran, glucose, and albumin to short-chain fatty acids and ammonia evaluated in vitro in 50 subjects. *J Parenter Enteral Nutr.* 16:433-439.
- Moura P, Barata R, Carvalheiro F, Girio F, Loureiro-Dias MC & Esteves MP (2007) In vitro fermentation of xylo-oligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *Lwt-Food Science and Technology* 40: 963-972.
- Muyzer, G., Dewaal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis-analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695-700.

- Okazaki M., Fujikawa, S., Matsumoto, N. (1990) Effect of xylooligosaccharides on the growth of bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora* 9:77-86
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L. (2001) Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem.* 49: 4619-4626
- Perrin P, Pierre F, Patry Y, Champ M, Berreur M, Pradal G, Bornet F, Meffah K, Menanteau J (2001) Only fibres promoting a stable butyrate producing colonic ecosystem decrease the rate of aberrant crypt foci in rats. *Gut* 48:53-61
- Ramakrishna B. S., Roberts-Thomas I. C., Pannall P. R., Roediger W.E.W. (1991) Impaired sulphation of phenol by the colonic mucosa in quiescent and active colitis. *Gut* 32:46-49
- Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, Krogius L, Palva A. (2004) Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J. Appl. Microbiol.* 97:1166-1177
- Roberfroid, M.B. (1998) Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties. *Brit. J. Nutr.* 80:S197-S202.
- Roediger WE (1982) Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon. *Gastroenterology* 83: 424-429.
- Satokari, R.M., Vaughan, E.E., Akkermans, A.D.L., Saarela, M. and De Vos, W.M. (2001) Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Env. Microbiol.* 67:504-513.
- Scheppach W, Barthram HP, Richter F (1995) Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. *Eur J Cancer* 31A:1077-1080.
- Swennen K, Courtin CM, Lindemans GCJE, (2006). Delcour JA. Large-scale production and characterisation of wheat bran arabinoxyloligosaccharides. *J Sci Food Agric.* 30;86:1722-31.
- Teitelbaum, J.E., Walker, W.A. (2002) Nutritional impact of pre- and probiotics as protective gastrointestinal organisms. *Annual Review of Nutrition* 22: 107-38
- Topping DL and Clifton PM (2001) Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev* 81:1031-1064
- Toyoda, Y., Hatakana, Y., Suwa, Y., (1993) Effect of xylooligosaccharides on calcium absorption. In Proc. of 47th Annual Meeting of Jpn Soc Nutr Food Sci, Tokyo, p109
- Van de Wiele T, Boon N, Possemiers S, Jacobs H, Verstraete W. (2007) Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects. *J Appl Microbiol.* 102:452-60.
- Van Loo, J.A.E. (2004) Prebiotics promote good health. The basis, the potential, and the emerging evidence. *J Clin Gastroenterol* 38: S70-S75.
- van Nuenen M.H.M.C., Meyer P.D., Venema K (2003) The effect of various inulins and *Clostridium difficile* on the metabolic activity of the human colonic microbiota in vitro. *Microbial Ecol. Health Dis.* 15: 137 – 14
- Visek WJ. (1978) Diet and cell growth modulation by ammonia. *Am J Clin Nutr* 31, Supp 10: S216-S220.
- Wong, J.M., de Souza, R., Kendall, C.W., Emam, A., Jenkins, D.J. (2006) Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* 40:235-243.
- Yamada H., Itoh, K., Morishita, Y., Taniguchi, H. (1993) Structure and properties of oligosaccharides from wheat bran. *Cereal Foods World* 38: 490-492

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un producto alimentario procesado que comprende, sobre una base de peso seco, entre 2,5% (en p/p) y 15% (en p/p) de arabinosanos no extraíbles de agua (WU-AX) y, sobre una base de peso seco, entre 2,5% (en p/p) y 15% (en p/p) de arabinosano-oligosacáridos (AXOS), en el que el contenido en WU-AX del producto alimentario procesado se corresponde con la suma de toda la arabinosa y la xilosa unidas retenidas en el residuo obtenido después de extraer dicho producto alimentario procesado con agua caliente a una temperatura entre 95 °C y 100 °C durante al menos 30 minutos en presencia de un amilasa termoestable, seguido de enfriar el extracto hasta 70 °C, y en el que el contenido en AXOS se determina como la suma de toda la arabinosa y la xilosa unidas en la fase soluble obtenida después de extraer dicho producto alimentario procesado con agua caliente a una temperatura entre 95 °C y 100 °C durante al menos 30 minutos en presencia de un amilasa termoestable, y al cual, después de enfriar hasta 70 °C, se le ha añadido etanol hasta una concentración final de etanol/agua 70/30 (en v/v).
- 10 2.- El producto alimentario procesado según la reivindicación 1, que comprende entre 1 y 15 g de WU-AX, y entre 1 y 5 g de AXOS por tamaño de ración de dicho producto alimentario procesado.
- 15 3.- El producto alimentario procesado según las reivindicaciones 1 o 2, que comprende entre 1% (en p/p) y 15% (en p/p) de arabinosanos hidrosolubles (WS-AX), en el que el contenido en WS-AX de dicho producto alimentario procesado se determina como la suma de toda la arabinosa y la xilosa unidas en la fase soluble obtenida después de extraer dicho producto alimentario procesado con agua caliente a una temperatura entre 95 °C y 100 °C durante al menos 30 minutos en presencia de un amilasa termoestable y después enfriar dicho extracto hasta 70 °C, menos el contenido en AXOS comprendido en dicho producto alimentario procesado.
- 20 4.- El producto alimentario procesado según la reivindicación 3, en el que dicho producto alimentario procesado es un producto alimentario que comprende entre 0,3 y 5 g de WS-AX por tamaño de ración de dicho producto alimentario procesado.
- 25 5.- El producto alimentario procesado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho producto alimentario procesado es un producto horneado.
- 6.- El producto alimentario procesado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho producto alimentario procesado es un cereal listo para consumir.
- 7.- El producto alimentario procesado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho producto alimentario procesado es un producto de pasta.
- 30 8.- El producto alimentario procesado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho producto alimentario procesado es un producto lácteo.
- 9.- El producto alimentario procesado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicho producto alimentario procesado es una bebida a base de fruta.
- 35 10.- Un suplemento alimentario que comprende, sobre una base de peso seco, entre 10% (en p/p) y 35% (en p/p) de WU-AX, y más del 5% (en p/p) y hasta 70% (en p/p) de AXOS, en el que el contenido en WU-AX del suplemento alimentario se corresponde con la suma de toda la arabinosa y la xilosa unidas retenidas en el residuo obtenido después de extraer dicho producto alimentario procesado con agua caliente a una temperatura entre 95 °C y 100 °C durante al menos 30 minutos en presencia de un amilasa termoestable, seguido de enfriar el extracto hasta 70 °C, y en el que el contenido en AXOS se determina como la suma de toda la arabinosa y la xilosa unidas en la fase soluble obtenida después de extraer dicho producto alimentario procesado con agua caliente a una temperatura entre 95 °C y 100 °C durante al menos 30 minutos en presencia de un amilasa termoestable, y al cual, después de enfriar hasta 70 °C, se le ha añadido etanol hasta una concentración final de etanol/agua 70/30 (en v/v).
- 40 11.- El suplemento alimentario según la reivindicación 10, que comprende además, sobre una base de peso seco, entre 5% (en p/p) y 70% (en p/p) de WS-AX, en el que el contenido en WS-AX de dicho suplemento alimentario se determina como la suma de toda la arabinosa y la xilosa unidas en la fase soluble obtenida después de extraer dicho producto alimentario procesado con agua caliente a una temperatura entre 95 °C y 100 °C durante al menos 30 minutos en presencia de un amilasa termoestable y después enfriar dicho extracto hasta 70 °C, menos el contenido en AXOS comprendido en dicho producto alimentario procesado.
- 45 12.- El uso de una preparación que comprende al menos 30% de AXOS con un grado de polimerización de entre 3 y 50, para la producción de un producto alimentario procesado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o un suplemento alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11.
- 50 13.- El uso de una preparación que comprende al menos 15% de WU-AX, para la producción de un producto alimentario procesado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o un suplemento alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11.
- 14.- El uso de una preparación que contiene WU-AX según la reivindicación 13, en el que dicha preparación es un

salvado de cereal.

15.- El uso de una preparación derivada de un cereal que contiene arabinoxilano que comprende, sobre una base de peso seco, entre 1,5 y 8% de WS-AX, para la producción de un producto alimentario procesado según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8.

- 5 16.- El uso de un producto alimentario procesado según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, o un suplemento alimentario según cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11, para estimular la producción de butirato en el intestino grueso.

FIGURAS

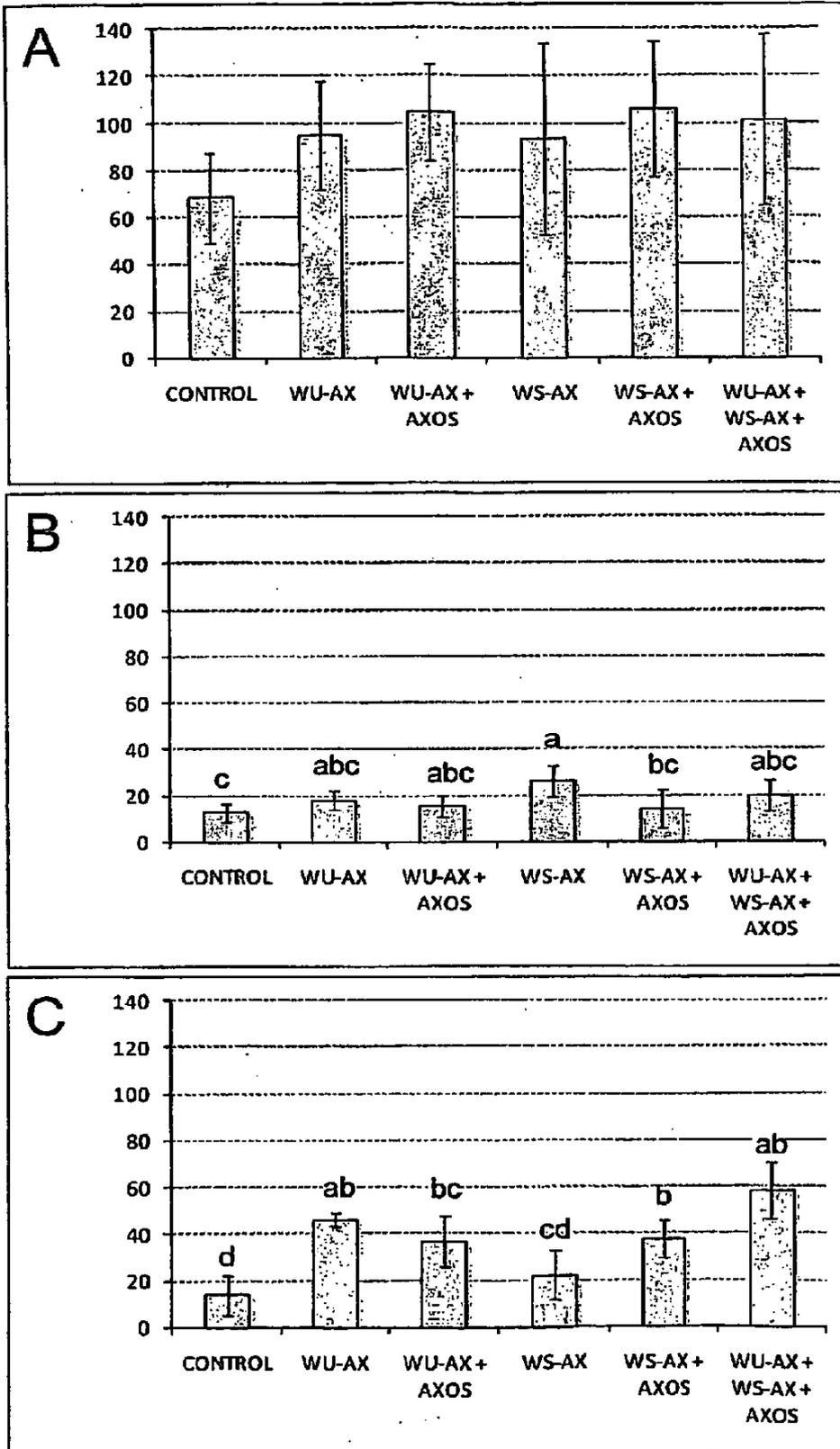


Figura 1

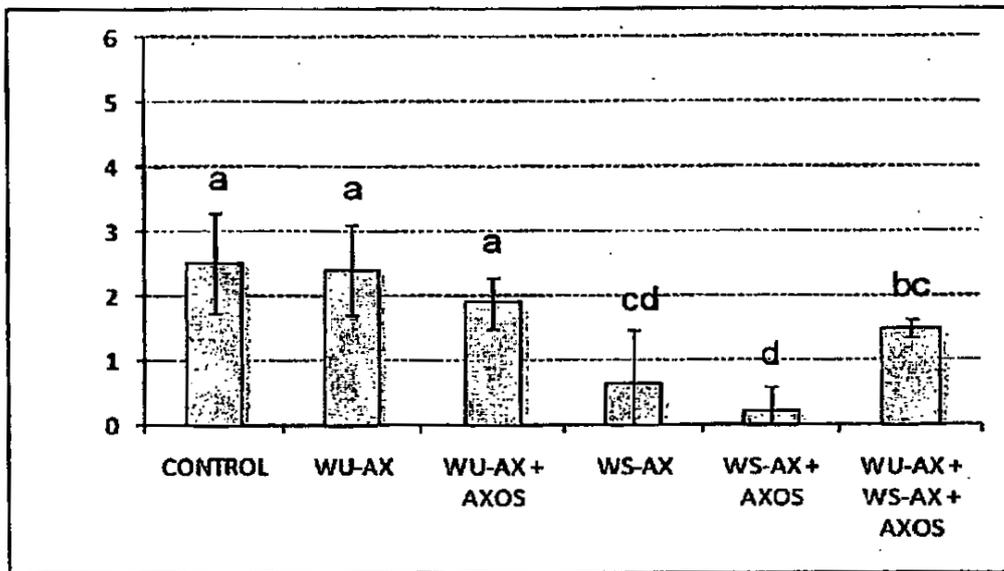
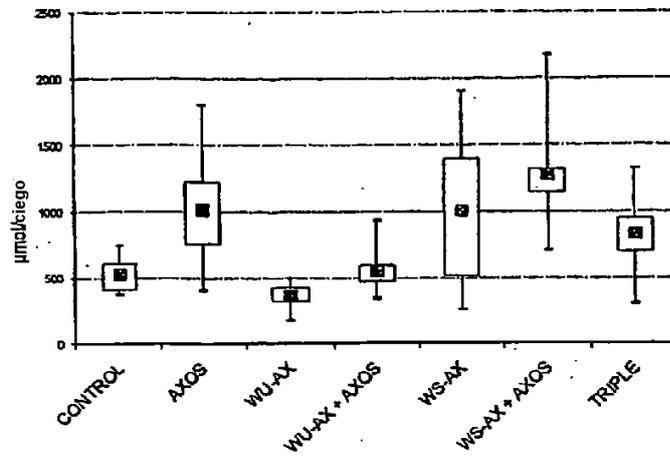
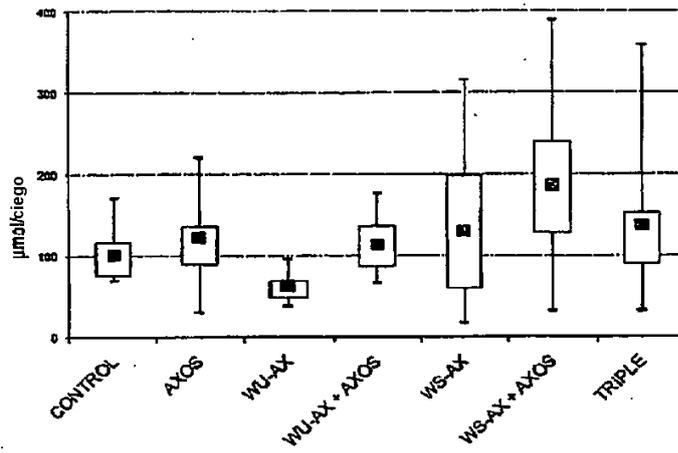


Figura 2

A



B



C

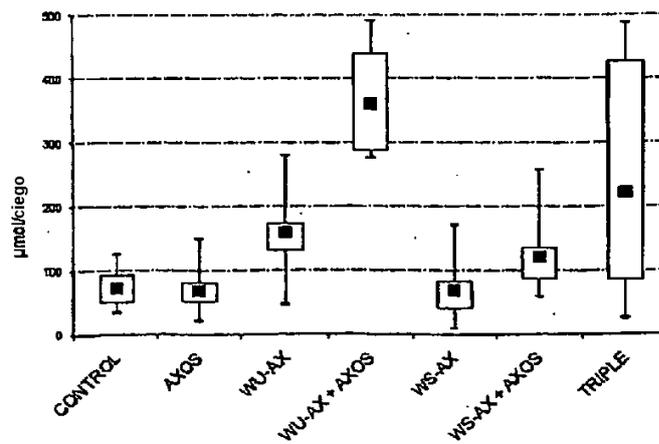


Figura 3

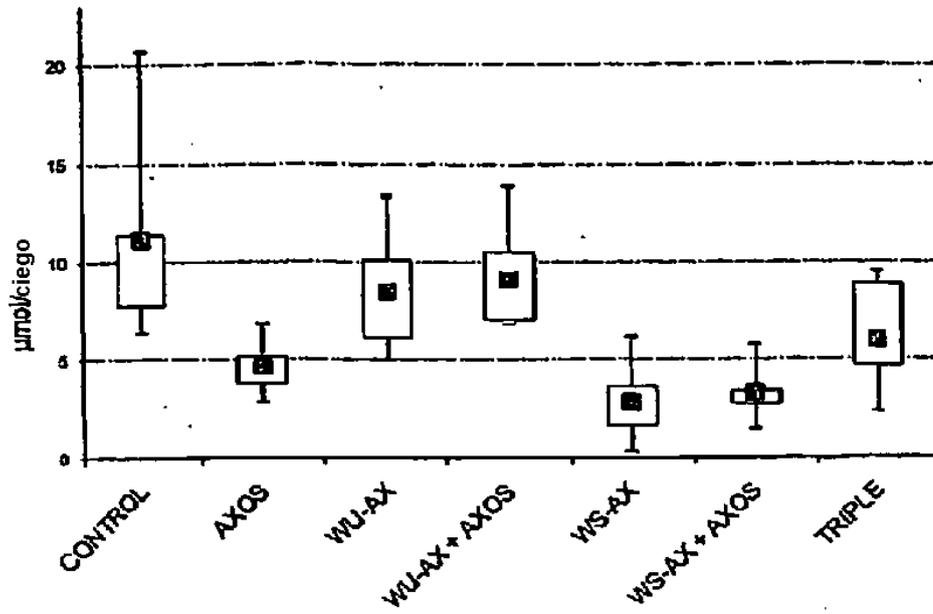


Figura 4