

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 430 644**

51 Int. Cl.:

C08B 37/14 (2006.01)

C13K 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2010 E 10720982 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2013 EP 2393838**

54 Título: **Método para elaborar pentosas y oligo/polisacáridos solubles con base pentosa a partir de cereales**

30 Prioridad:

09.02.2009 GB 0902018

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

21.11.2013

73 Titular/es:

**CARGILL, INCORPORATED (100.0%)
15407 McGinty Road West
Wayzata, MN 55391, US**

72 Inventor/es:

BROEKAERT, WILLEM

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 430 644 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

Método para elaborar pentosas y oligo/polisacáridos solubles con base pentosa a partir de cereales.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para el aislamiento y la extracción de material vegetal que contiene arabinoxilano, en particular material de cereales, de productos de despolimerización del arabinoxilano solubilizados, tal como pentosas y/u oligo/polisacáridos con base de pentosa, que se pueden usar como alimento, bebida, o ingredientes para alimentos o como sustratos para la fermentación o modificaciones químicas.

Antecedentes de la invención

10 Los cereales contienen 5-10% de arabinoxilano que junto con el almidón, la celulosa y el β -glucano constituyen los hidrocarburos más abundantes en los cereales. El arabinoxilano (AX) consiste en una cadena principal de unidades de D-xilopiranosida (xilosa) enlazadas en β -1,4 que son bien no sustituidas, bien monosustituidas con una única α -L-arabinofuranósida (arabinosa) en C-(O)-2 o en C-(O)-3, o bien disustituidos con unidades sencillas de α -L-arabinofuranósida en C-(O)-2 o en C-(O)-3 (Andersson y Aman 2001; Izydorczyk y Biliaderis, 1995). Las pentosas xilosa y arabinosa son, por lo tanto, los principales monómeros del AX y, por lo tanto, los AX se denominan también pentosanos. Los sustituyentes menos abundantes unidos a la posición C-(O)-2 de los restos xilosa pueden ser el ácido glucurónico, ácido 4-O-metil-glucurónico u oligómeros cortos que consisten en L-arabinosa, D-xilosa, D-galactosa, D-glucosa y/o ácidos urónicos, mientras que los grupos acetilo pueden estar enlazados en la posición C-(O)-2 y/o C-(O)-3 de los restos xilosa. Los ácidos hidroxicinámicos, principalmente el ácido ferúlico, y, en una menor extensión el ácido deshidrodiferúlico, ácido p-cumárico y ácido sinápico, también están presentes como sustituyentes y generalmente están unidos en la posición C-(O)-5 de las unidades terminales de la arabinosa (Andesson y Aman 2001; Izydorczyk y Biliaderis, 1995).

15 Los AX en los cereales son bien extraíbles en agua o bien no extraíbles en agua (Gruppen *et al.* 1992; Courtin y Delcour, 2001). Los AX no extraíbles en agua (abreviados generalmente como WU-AX por sus iniciales en inglés: water-unextractable AX) pueden ser parcialmente solubilizados en condiciones alcalinas o usando enzimas tales como las endoxilanasas. Los WU-AX se enlazan con grandes cantidades de agua. Los principales AX extraíbles en agua (abreviados generalmente como WE-AX por sus iniciales en inglés: water-extractable AX) naturales tienen masas moleculares muy elevadas (hasta 800.000 Dalton) dependiendo de la fuente y del método de extracción, y tienen un extraordinario potencial de formación de viscosidad. En los cereales la mayor parte de los AX son WU-AX. Especialmente el salvado, las partes exteriores de los granos de cereal, es rico en WU-AX.

20 Se ha demostrado que los oligosacáridos de arabinoxilanos (AXOS), oligosacáridos con base de pentosa derivados de los AX, presentan propiedades prebióticas (Cloetens *et al.* 2008; Courtin *et al.* 2008; Van Craeyveld *et al.* 2008). Los prebióticos son compuestos, generalmente oligosacáridos no glucosídicos, que no pueden ser digeridos por las enzimas del tracto gastrointestinal superior pero que son fermentados selectivamente por algunos tipos de bacterias intestinales en el intestino grueso (Gibson y Roberfroid, 1995; Roberfroid, 1998; Van Loo, 2004). La presencia de prebióticos en la dieta produce un desplazamiento en la composición y el metabolismo de la población bacteriana intestinal, caracterizada típicamente por un aumento relativo de las especies *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Este desplazamiento en la microbiota del intestino está asociado con una mejora de la salud general, reducción en las infecciones del intestino, aumento de los niveles de ácidos grasos de cadena corta intestinales, mejor absorción de minerales, mejor tránsito y supresión de la iniciación del cáncer de colon (Van Loo, 2004). Las preparaciones que contienen AXOS pueden encontrar por lo tanto una amplia utilización como ingredientes para alimentos, bebidas y productos alimenticios. Ni los AX ni la xilosa y arabinosa, sus componentes pentosa, son fermentados por cepas estándar del hongo *Saccharomyces cerevisiae* y, por lo tanto, no contribuyen a la producción de etanol por la fermentación de los cereales. Sin embargo, las cepas pueden ser modificadas de forma que puedan usar y fermentar xilosa y arabinosa (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2007). La pentosa xilosa también encuentra aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética y alimentaria y tiene un sustrato para la conversión enzimática o química a polioles, tal como xilitol, que pueden ser utilizados como un endulzante no cariogénico. La pentosa arabinosa se usa ampliamente como intermedio en la producción de productos farmacéuticos, tal como agentes antivirales análogos de los nucleósidos.

25 Se han propuesto varios métodos para aislar pentosas u oligosacáridos con base pentosa del salvado de los cereales.

30 Yamada *et al.* (1993) han descrito un método de extracción que implica la extracción química del salvado de trigo usando una disolución alcalina concentrada, seguida por neutralización, eliminación de las sales, hidrólisis enzimática con endoxilanasas y cromatografía en columna de carbono (Yamada *et al.*, 1993). Otros métodos que usan la extracción alcalina de los AX del salvado de trigo se describen en los documentos US-A-3.879.373 y WO98/31713. El principal inconveniente de estos métodos es que la etapa de extracción con elevada concentración alcalina es dañina para el medioambiente y requiere una eliminación costosa de compuestos químicos de las diferentes corrientes de productos. Los AX también han sido extraídos del salvado de cereales usando disoluciones alcalinas de peróxido (Maes y Delcour, 2001; Hollmann y Lindhauer, 2005) aunque estos métodos necesitan grandes

cantidades de peróxido de hidrógeno que es muy costoso. Los AX extraídos con disoluciones alcalinas tienen un peso molecular elevado y están desprovistos de sustituyentes ácido hidroxicinámico (Hollmann y Lindhauer, 2005), lo más probablemente debido a la saponificación del enlace de éster. La ausencia de sustituyentes ácido hidroxicinámico puede ser un inconveniente para el uso de dichas preparaciones en alimentos, bebidas y aplicaciones alimentarias, ya que los sustituyentes ácido hidroxicinámico confieren las propiedades antioxidantes deseadas a los AX o AXOS (Ohta *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 2005).

El documento WO02/067698 describe un método complejo para fraccionar el salvado tratando en primer lugar el salvado con enzimas hidrolizantes del almidón seguido por separación mecánica en una fracción insoluble en agua, una fracción rica en proteínas y una fracción rica en glucosa. La fracción insoluble en agua se trata a continuación con endoxilanasas o una mezcla que comprende endoxilanasas y otras enzimas, tales como glucanasas, celulasas, pectinasas o fitasas, y la fracción soluble resultante se purifica adicionalmente por ultrafiltración para obtener una fracción enriquecida en AXOS. Se han descrito varios procedimientos similares en los que el salvado se trata en primer lugar con una amilasa para convertir el almidón en maltodextrinas solubles en agua, en los que después se filtra la lechada y el residuo se trata con endoxilanasas para solubilizar los AXOS de bajo peso molecular (Maes *et al.*, 2004; Swennen *et al.*, 2006; WO2006/027529).

Se han desarrollado métodos no enzimáticos para el aislamiento de AXOS de bajo peso molecular a partir de subproductos de cereales que se basan en la autohidrólisis de los AX en disoluciones acuosas en condiciones de alta presión y alta temperatura. También se ha descrito la extracción de los WU-AX del salvado de cereal usando disoluciones ácidas a alta temperatura (Sanjust *et al.*, 2004; Palmarola-Adrados *et al.*, 2005), y estos métodos son generalmente más adecuados para producir pentosas más que oligosacáridos con base de pentosa, debido a la extensa hidrólisis catalizada por ácidos de los enlaces de polisacárido.

Palmarola-Adrados *et al.* (2005) han investigado la combinación de tratamiento ácido y tratamiento enzimático del salvado de trigo. Encontraron que el pretratamiento del salvado usando ácidos diluidos y alta temperatura aumenta la producción de glucosa cuando es seguido por tratamiento con una mezcla de enzimas que contiene celulasas y endoxilanasas. Sin embargo, el pretratamiento con ácidos diluidos a alta temperatura no produjo un aumento en el rendimiento de las pentosas. Los autores concluyeron que la endoxilanasas no era esencial en la mezcla enzimática y que durante la etapa de hidrólisis solo se liberó la glucosa extra (Palmarola-Adrados *et al.*, 2005).

Un objeto de la presente invención es proporcionar métodos más eficaces para la extracción y el aislamiento de productos de la despolimerización del arabinoxilano solubilizados, tales como pentosas y/u oligo/polisacáridos solubles basados en pentosa, a partir de un material vegetal que contiene arabinoxilano, tal como salvado de cereales, que son más eficaces y tienen un coste operacional global inferior que los métodos conocidos en la técnica anterior.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona un método para la extracción y el aislamiento de productos de la despolimerización del arabinoxilano solubilizados usando un material vegetal que contiene arabinoxilano como material inicial. Preferiblemente, dicho producto de la despolimerización de arabinoxilano solubilizados es uno cualquiera entre el arabinoxilano, oligosacáridos de arabinoxilano, xilosa y arabinosa solubles. Dicho método comprende mezclar dicho material vegetal que contiene arabinoxilano en agua y tratarlo con una concentración adecuada de una preparación de enzima endoxilanasas con el fin de despolimerizar enzimáticamente y solubilizar una fracción de los arabinoxilanos comprendidos en dicho material vegetal, en el que dicho tratamiento con endoxilanasas está seguido o precedido por un tratamiento ácido. Este tratamiento ácido comprende la incubación de dicho material vegetal en una mezcla acuosa acidificada con el fin de obtener una despolimerización y solubilización de otra fracción de los arabinoxilanos comprendidos en dicho material vegetal. Preferiblemente, dicha mezcla acidificada se obtiene añadiendo a dicha mezcla un ácido fuerte hasta una concentración final entre 0,02 y 0,4N. El método comprende además la separación de dicho material vegetal mezclado de una fracción soluble en agua que comprende al menos una parte de los productos de la despolimerización del arabinoxilano solubilizados.

Descripción detallada

Lista de figuras

Figura 1: representación esquemática de un método de fraccionamiento de un material vegetal que contiene arabinoxilano, tal como un salvado de cereal, en el que se aplican secuencialmente una etapa de solubilización enzimática del arabinoxilano y una etapa de solubilización ácida del arabinoxilano, sin una etapa puntual de separación de los productos solubles en agua/insolubles en agua.

Figura 2: representación esquemática de un método de fraccionamiento de un material vegetal que contiene arabinoxilano, tal como un salvado de cereal, en el que se aplican secuencialmente una etapa de solubilización enzimática del arabinoxilano y una etapa de solubilización ácida del arabinoxilano, con una etapa puntual de separación de los productos solubles en agua/insolubles en agua.

Descripción

La presente invención se basa en el descubrimiento de que la incubación de material vegetal que contiene arabinoxilano en una mezcla acuosa acidificada precedida por una incubación de dicho material vegetal en una mezcla que comprende una preparación de una enzima endoxilanasas permite la extracción y el aislamiento de una fracción importante de la cantidad total del arabinoxilano comprendido en dicho material vegetal en forma de productos de la despolimerización del arabinoxilano solubilizados. Preferiblemente, dicho producto de la despolimerización del arabinoxilano solubilizado es uno cualquiera entre arabinoxilano, oligosacáridos arabinoxilano, xilosa o arabinosa solubles. Sin embargo, el rendimiento del aislamiento de los productos de la despolimerización del arabinoxilano solubilizados usando el tratamiento con endoxilanasas y ácido combinados fue significativamente mayor que el obtenido con un tratamiento bien con una endoxilanasas o bien con un ácido solo.

Por lo tanto, en un primer objetivo, la presente invención proporciona un método para la extracción y el aislamiento de productos de la despolimerización del arabinoxilano solubilizados usando un material vegetal que contiene arabinoxilano como material de partida. Dichos productos solubles de despolimerización del arabinoxilano pueden ser bien arabinoxilano, oligosacáridos de arabinoxilano, xilosa o arabinosa solubles, o bien mezclas de dos o más de estos compuestos. Dicho método comprende la mezcla del material vegetal que contiene arabinoxilano en agua y el tratamiento con una concentración adecuada de una preparación de enzima endoxilanasas con el fin de despolimerizar enzimáticamente una fracción de los arabinoxilanos comprendidos en dicho material vegetal, en el que dicho tratamiento con endoxilanasas es seguido por un tratamiento ácido. Comprendiendo este tratamiento ácido la incubación de dicho material vegetal en una mezcla acuosa acidificada con el fin de obtener una despolimerización y disolución de otra fracción de los arabinoxilanos comprendidos en dicho material vegetal. El método comprende además la separación de una o más fracciones solubilizadas en agua de dicho material vegetal mezclado, comprendiendo dichas fracciones solubilizadas en agua al menos parte de los productos de la despolimerización del arabinoxilano solubilizados.

En un modo de realización preferido del método de la presente invención, el material vegetal que contiene arabinoxilano se mezcla en agua y se somete a dicho tratamiento con endoxilanasas con el fin de despolimerizar enzimáticamente y solubilizar una primera fracción de los arabinoxilanos comprendidos en dicho material vegetal. El tratamiento con endoxilanasas es seguido a continuación por dicho tratamiento ácido con el fin de despolimerizar y solubilizar una segunda fracción de los arabinoxilanos comprendida en dicho material vegetal. Las fracciones solubilizadas en agua que comprenden productos de la despolimerización del arabinoxilano solubilizados se pueden asilar en un solo momento o en varios momentos del procedimiento de extracción. Por ejemplo, después del tratamiento con endoxilanasas, la mezcla que contiene endoxilanasas de dicho material vegetal que contiene arabinoxilano puede ser acidificada con el fin de someter la mezcla a dicho tratamiento ácido. Después de la finalización del tratamiento ácido, la mezcla se separa en i) una fracción solubilizada en agua que comprende los productos de la despolimerización del arabinoxilano solubilizados tanto por el tratamiento enzimático como por el ácido, y ii) el residuo de material vegetal insoluble en agua. Alternativamente, dicho tratamiento con endoxilanasas es seguido por una separación de dicha mezcla en i) una primera fracción solubilizada en agua que comprende los productos de la despolimerización del arabinoxilano solubilizados enzimáticamente y ii) un primer resto de material vegetal insoluble en agua. Dicho primer resto vegetal insoluble en agua se vuelve a poner en suspensión a continuación en agua con el fin de obtener una segunda mezcla que se somete a dicho tratamiento ácido seguido por la separación de dicha segunda mezcla en iii) una segunda fracción solubilizada en agua que comprende los productos de despolimerización del arabinoxilano solubilizados y iv) un segundo resto de material vegetal insoluble en agua.

Preferiblemente, el material vegetal que contiene arabinoxilano usado como material de partida en cualquiera de los modos de realización anteriores del método según la presente invención, es salvado, subproductos de inflorescencia, subproductos del tallo o bagazo. Más preferiblemente, el material que contiene arabinoxilano es salvado, más preferiblemente salvado obtenido a partir de cereales, tales como trigo, trigo duro, centeno, avena, cebada, maíz, sorgo, o arroz. Más preferiblemente, el material vegetal que contiene AX es salvado de trigo (duro). Además, puede ser ventajoso que el material vegetal que contiene arabinoxilano usado en el método según la presente invención sea material vegetal desalmidonado. Más preferiblemente, dicho material vegetal desalmidonado se obtiene mezclando el material vegetal que contiene arabinoxilano en agua en presencia de una concentración adecuada de una α -amilasa y subsiguientemente separando el material vegetal desalmidonado insoluble de la fracción líquida que contiene el material solubilizado obtenido a partir del almidón.

Preferiblemente, el tratamiento con endoxilanasas como se usa en cualquiera de los modos de realización anteriores del método de la presente invención, implica la incubación de la mezcla con una preparación enzimática que contiene al menos actividad endoxilanasas. Los ejemplos de preparaciones comerciales con actividad endoxilanasas predominante incluyen, pero sin limitarse a ellos, Shearzyme™ 500L (Novozymes), Pentopan™ Mono BG (Novozymes), Pulpzyme™ (Novozymes), Ecopulp™ TX-200A (AB Enzymes), Veron™ 191 (AB Enzymes), Veron™ Special (AB Enzymes), Multifect™ CX 12 L (Genencor/Danisco), GrindamyI™ H640 (Danisco) y GrindamyI™ Powerbake™ (Danisco). La etapa de hidrólisis del arabinoxilano implica la incubación durante un periodo apropiado de tiempo tal como, pero sin limitarse a ellos, entre 1 y 24 horas, más preferiblemente entre 2 y 12 horas, por ejemplo entre 3 y 9 horas, de la lechada a las temperaturas y valores de pH recomendados por el desarrollador comercial de la preparación de la enzima endoxilanasas usada en la hidrólisis del arabinoxilano, generalmente a un

pH entre 4 y 9, tal como entre 4 y 6. Preferiblemente, la endoxilanasas dominante en dicha preparación de enzima endoxilanasas es una endoxilanasas con una alta selectividad por los WU-AX, con un factor de selectividad de sustrato (SSF_{CHROM}), según se define en Moers *et al.* (2005) que es al menos 2 o superior, preferiblemente al menos 3 o superior, tal como 4 o superior. La endoxilanasas dominante en dicha preparación de enzima endoxilanasas es preferiblemente una endoxilanasas de la familia 11 de las glicosil hidrolasas (Henrissat 1991). Otras actividades enzimáticas presentes en la preparación de enzima endoxilanasas pueden ser, pero sin limitarse a ellas, las actividades arabinofuranosidasas, beta-glucanasas, exoxilanasas, beta-xilasidasas y/o xilobiasas.

Preferiblemente, dicho tratamiento ácido como se aplica en cualquiera de los modos de realización anteriores del método de la presente invención, implica el uso de un ácido fuerte como, por ejemplo pero sin limitarse a ellos, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico o ácido sulfúrico, que se añade a la mezcla hasta una concentración final entre 0,02N y 0,4N, preferiblemente entre 0,02 y 0,2N, por ejemplo entre 0,02 y 0,1N. Preferiblemente, se determina la concentración de dicho ácido fuerte con respecto a la cantidad total de agua en la mezcla. Generalmente, la adición de un ácido fuerte a la mezcla produce un pH de la mezcla de aproximadamente 3, más preferiblemente por debajo de 2,5, lo más preferible por debajo de 2. Más preferiblemente, el ácido fuerte es ácido sulfúrico y se añade a la mezcla acuosa a una concentración entre 0,02 y 0,2N (0,01 y 0,1M), preferiblemente entre 0,02 y 0,1N (0,01 y 0,05M). La temperatura de la mezcla durante el tratamiento ácido está preferiblemente entre 80°C y 180°C, más preferiblemente entre 90°C y 160°, tal como entre 100 y 140°C, y el tiempo de incubación es entre 5 y 180 minutos. Los parámetros de pH, temperatura y tiempo de incubación se eligen de forma que se produzca la solubilización esencial de los arabinoxilanos, sin embargo los parámetros elegidos están en el límite de las condiciones que producen una formación excesiva de furfural y productos de Maillard coloreados cuando se aumenta la exigencia (cuanto menor sea el pH mayor es la exigencia, cuanto mayor sea la temperatura mayor es la exigencia y cuanto mayor sea el tiempo de incubación mayor es la exigencia). Por ejemplo, el ácido sulfúrico se añade a la mezcla con una concentración de 0,025M seguido por incubación de la mezcla a 120°C durante 45 minutos. Por solubilización esencial de los arabinoxilanos mediante tratamiento ácido se quiere decir que la concentración de ácido aplicada produce la extracción de una cantidad de productos de la despolimerización del arabinoxilano solubilizados en agua (arabinoxilano, oligosacáridos de arabinoxilanos, xilosa libre o arabinosa libre solubles, o una mezcla de ellos) a partir de un material vegetal que contiene arabinoxilano dado, que es al menos tres veces más que la obtenida a un pH entre 6 y 7, manteniendo cualquier otra condición de temperatura e incubación constante.

Las fracciones solubilizadas en agua aisladas en uno cualquiera de los modos de realización anteriores del método de la presente invención se separan preferiblemente a partir de dichas fracciones insolubles en agua usando bien un tamiz gravitacional, una prensa de filtro, un filtro rotatorio, un tamiz centrífugo, un filtro banda, un filtro a vacío, una prensa de tornillo, un decantador, una centrifugadora o un decantador centrífugo, o una combinación de estos medios de separación, o cualquier otro medio conocido por los expertos en la técnica.

Opcionalmente, las fracciones solubilizadas en agua que comprenden los productos de la despolimerización del arabinoxilano solubilizados obtenidos según uno cualquiera de los modos de realización anteriores del método de la presente invención se purifican adicionalmente usando técnicas de filtración o de cromatografía o combinaciones de ellas para eliminar los minerales y otras impurezas. Además, estas fracciones solubilizadas en agua pueden estar concentradas, preferiblemente después de dicha purificación adicional, usando medios para eliminar el agua, tal como un evaporador en capa fina o un evaporador de placas, filtración por ósmosis inversa, nanofiltración, o una combinación de estos medios de concentración. Estas fracciones solubilizadas en agua también se pueden secar o ser obtenidas en forma seca por otros medios, preferiblemente bien después de dicha purificación o bien después de dicha concentración, o de ambos, por ejemplo usando un equipo de secado por pulverización o por cristalización. Preferiblemente, las fracciones solubilizadas en agua que comprenden productos de la despolimerización del arabinoxilano solubilizados obtenidos según uno cualquiera de los modos de realización anteriores del método de la presente invención o las preparaciones derivadas de ellos por purificación adicional, comprenden en porcentaje de materia seca, al menos 40% (peso/peso), más preferiblemente al menos 50%, lo más preferiblemente al menos 60%, por ejemplo al menos 70% u 80% de productos de despolimerización del arabinoxilano. Siendo dichos productos de despolimerización del arabinoxilano solubles bien arabinoxilano, oligosacáridos de arabinoxilanos, xilosa y arabinosa solubles o bien mezclas de dos o más de estos compuestos.

Opcionalmente, una fracción soluble en agua que comprende productos de despolimerización del arabinoxilano solubilizados obtenidos según uno cualquiera de los modos de realización del método de la presente invención puede ser procesado usando técnicas de filtración o cromatografía con el fin de obtener preparaciones que comprenden una concentración aumentada de un producto de despolimerización del arabinoxilano solubilizado particular, bien arabinoxilano, oligosacáridos de arabinoxilanos, xilosa o arabinosa, en comparación con la concentración de este producto en dicha fracción solubilizada en agua. Por ejemplo, la fracción solubilizada en agua que comprende productos de despolimerización del arabinoxilano solubilizados se procesa con el fin de obtener una preparación enriquecida en xilosa o en arabinosa. Opcionalmente, las fracciones insolubles en agua obtenidas según cualquiera de los modos de realización anteriores del método según la presente invención se lavan con agua antes de cualquier tratamiento adicional. Dicha etapa de lavado puede comprender lavar la torta insoluble en agua con agua en un filtro, un filtro prensado, un filtro de banda, un tamiz o un decantador centrífugo, como prefiera el experto en la técnica. Preferiblemente, el lavado se realiza en un flujo a contracorriente entre la fracción insoluble en agua y el agua limpia.

Preferiblemente, el método de la presente invención que incluye cualquiera de sus modos de realización descritos en la presente memoria produce la extracción de al menos 50% (peso/peso), más preferiblemente al menos 60% (peso/peso), lo más preferiblemente al menos 70% (peso/peso) del arabinoxilano no extraíble en agua comprendido en el material que contiene arabinoxilano usado como material de partida.

5 Las preparaciones enriquecidas en arabinoxilano soluble y/o oligosacáridos de arabinoxilanos se pueden usar como comida, bebida o aditivos alimentarios. Dicha preparación se puede añadir a una comida, bebida o producto alimenticio, por ejemplo para mejorar el sabor, la sensación en boca o la textura del producto para obtener un beneficio saludable por medio de la ingestión del producto y/o para mejorar la eficacia de la utilización del alimento en animales. Se sabe que los oligosacáridos de arabinoxilanos son prebióticos, es decir una comida, bebida o
10 ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente al huésped estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de un número limitado de bacterias en la parte inferior del tracto gastrointestinal (Gibson y Roberfroid, 1995; Roberfroid, 1998; Van Loo, 2004).

Las preparaciones enriquecidas en las pentosas libres (xilosa y arabinosa) se pueden usar como comida, bebida o aditivo alimentario, como un sustrato para la fermentación microbiana para la producción de los productos de fermentación deseados, tales como etanol, o como sustrato para la conversión enzimática o química para producir otros productos químicos, tales como por ejemplo los polioles xilitol y arabitol.
15

En un primer modo de realización, la invención proporciona un procedimiento para el fraccionamiento de un material vegetal que contiene arabinoxilano a escala industrial que comprende las siguientes etapas (figura 1):

20 (a1) tratar el material vegetal que contiene arabinoxilano con agua caliente, opcionalmente en presencia de una mezcla de enzimas que comprende al menos una alfa amilasa, con el fin de extraer los compuestos solubles en agua y el almidón de dicho material vegetal que contiene arabinoxilano;

(b1) separar la mezcla de la etapa (a1) en una fracción insoluble en agua y una fracción solubilizada en agua que comprende los compuestos solubles en agua extraídos y el almidón solubilizado y/o los productos de la hidrólisis del almidón solubilizados, por filtración o por centrifugación;

25 (c1) mezclar la fracción insoluble en agua obtenida en la etapa (b1) con agua y añadir a la mezcla resultante una preparación enzimática que comprende al menos una endoxilanasas, e incubar dicha mezcla durante un periodo de tiempo apropiado con el fin de extraer una primera fracción de los productos de la despolimerización del arabinoxilano solubilizados de dicha fracción insoluble en agua;

30 (d1) añadir un ácido a la mezcla de la etapa (c1) e incubar la mezcla durante periodo de tiempo apropiado con el fin de extraer una segunda fracción de los productos de la despolimerización del arabinoxilano solubilizados de dicha fracción insoluble en agua;

(e1) separar la mezcla de la etapa (d1) en una fracción insoluble en agua y una fracción solubilizada en agua por filtración y/o centrifugación, comprendiendo dicha fracción solubilizada en agua ambas fracciones primera y segunda de productos de la despolimerización del arabinoxilano solubilizados.

35 Opcionalmente, la fracción solubilizada en agua de la etapa (e1) se procesa adicionalmente bien mediante la etapa (f1) y/o bien mediante la etapa (g1):

(f1) desmineralizar la fracción solubilizada en agua de la etapa (e1), por ejemplo usando resinas de intercambio iónico, electrodiálisis y/o filtración en membrana;

40 (g1) concentrar la fracción solubilizada en agua de la etapa (f1), o (e1) en el caso de que la etapa de desmineralización (f1) se haya omitido, por evaporación y/o filtración en membrana para obtener un sirope, opcionalmente seguido por secado o cristalización para obtener un producto seco.

El orden de las etapas (c1) y (d1) puede invertirse. En este caso las etapas (c1') y (d1') serían como sigue:

(c1') mezclar la fracción insoluble en agua obtenida en la etapa (b1) con agua y añadir a la mezcla resultante un ácido e incubar la mezcla durante un periodo de tiempo apropiado,

45 (d1') ajustar el pH de la mezcla de la etapa (c1') a un valor entre 4 y 9, seguido por adición de una mezcla enzimática que comprende al menos una endoxilanasas, e incubación de la mezcla durante un tiempo apropiado.

Sin embargo, se prefiere el orden de las etapas (c1) seguido por (d1) frente al orden de las etapas (c1') seguido por (d1'), porque el primero no precisa ajustar el pH y enfriar entre las dos etapas.

50 El rendimiento en dichos productos de la despolimerización del arabinoxilano solubilizados en la fracción solubilizada en agua de la etapa (e1) fue significativamente mayor que cuando se omitió cualquiera de las etapas (c1) o (d1') del tratamiento con endoxilanasas o el tratamiento ácido de cualquiera de las etapas (d1) o (c1').

En un segundo modo de realización particular, la invención proporciona un procedimiento para el fraccionamiento del material vegetal que contiene arabinosilano a escala industrial que comprende las siguientes etapas (figura 2):

5 (a2) tratar el material vegetal que contiene arabinosilano con agua caliente, opcionalmente en presencia de una mezcla de enzimas que comprende al menos una alfa amilasa, con el fin de extraer los compuestos solubles en agua y el almidón de dicho material vegetal que contiene arabinosilano;

(b2) separar la mezcla de la etapa (a2) en una fracción insoluble en agua y una fracción solubilizada en agua que comprende los compuestos solubles en agua y el almidón solubilizado y/o los productos de la hidrólisis del almidón solubilizado, por filtración o por centrifugación;

10 (c2) mezclar la fracción insoluble en agua obtenida en la etapa (b2) con agua y añadir a la mezcla resultante una preparación enzimática que comprende al menos una endoxilanasas, e incubar dicha mezcla durante un periodo de tiempo apropiado con el fin de extraer una primera fracción de los productos de la despolimerización del arabinosilano solubilizados de dicha fracción insoluble en agua;

15 (e2) separar la mezcla de la etapa (c2) en una fracción insoluble en agua y una fracción solubilizada en agua por filtración y/o centrifugación; comprendiendo dicha fracción solubilizada en agua dicha primera fracción de productos de la despolimerización del arabinosilano solubilizados.

Opcionalmente, la fracción solubilizada en agua de la etapa (e2) se procesa adicionalmente bien mediante la etapa (f2) y/o bien mediante la etapa (g2):

(f2) desmineralizar la fracción solubilizada en agua de la etapa (e2), por ejemplo usando resinas de intercambio iónico, electrodiálisis y/o filtración en membrana;

20 (g2) concentrar la fracción solubilizada en agua de la etapa (f2), o (e1) en el caso de que la etapa de desmineralización (f1) se haya omitido, por evaporación y/o filtración en membrana para obtener un sirope, opcionalmente seguido por secado o cristalización para obtener un producto seco;

25 (d3) mezclar la fracción insoluble en agua de la etapa (e2) con agua y añadir a la mezcla resultante un ácido, e incubar la mezcla durante un tiempo apropiado con el fin de extraer una segunda fracción de productos de la despolimerización del arabinosilano solubilizados de dicha fracción insoluble en agua;

(e3) separar la mezcla de la etapa (d3) en una fracción insoluble en agua y una fracción solubilizada en agua por filtración y/o centrifugación, comprendiendo dicha fracción solubilizada en agua dicha segunda fracción de productos de despolimerización del arabinosilano solubilizados.

30 Opcionalmente, la fracción solubilizada en agua de la etapa (e2) se procesa adicionalmente bien mediante la etapa (f3) y/o bien mediante la etapa (g3):

(f3) desmineralizar la fracción solubilizada en agua de la etapa (e3), por ejemplo usando resinas de intercambio iónico, electrodiálisis y/o filtración en membrana;

35 (g3) concentrar la fracción solubilizada en agua de la etapa (f3), o (e1) en el caso de que la etapa de desmineralización (f1) se haya omitido, por evaporación y/o filtración en membrana para obtener un sirope, opcionalmente seguido por secado o cristalización para obtener un producto seco.

40 Preferiblemente, el material vegetal que contiene arabinosilano usado en dichos modos de realización particulares primero y segundo es salvado, subproductos de la inflorescencia, subproductos del tallo o bagazo. Más preferiblemente, el material vegetal que contiene arabinosilano es salvado, más preferiblemente salvado obtenido a partir de cereales, tales como trigo, trigo duro, centeno, avena, cebada, maíz, sorgo, o arroz. Más preferiblemente, el material vegetal que contiene AX es salvado de trigo (duro).

45 Las etapas (a1) y (a2) se realizan preferiblemente a una temperatura entre 75°C y 120°C, preferiblemente entre 80°C y 110°C. Si se usa una alfa amilasa, se elige preferiblemente entre las alfa-amilasas estables térmicamente que tienen una temperatura óptima para la actividad alfa-amilasa en este intervalo de temperatura. Los ejemplos de preparaciones de amilasa comerciales con dichas propiedades incluyen, pero sin limitarse a ellas, Termamyl 120 L (Novozymes Dinamarca), BAN 480L (Novozymes, Dinamarca), Multifect AA 1200 L (Genencor/Danisco), Amylyve™ A 30 (Lyven, Francia), Gamalpha™ HT 120 L (AB Enzymes, Alemania) y Alphastar™ (Dyadic, Estados Unidos). Dichas preparaciones de amilasa estables térmicamente se obtienen a partir de bacterias como *Bacillus licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis* u hongos como *Aspergillus niger* o *A. oryzae*. El tiempo de incubación de las etapas (a1) y (a2) está entre 5 y 180 minutos.

50 Las etapas de solubilización enzimática del arabinosilano (c1), (d1') o (c2) implican la incubación de la mezcla con una preparación enzimática que contiene al menos actividad endoxilanasas. Los ejemplos de preparaciones comerciales con actividad endoxilanasas predominante incluyen, pero sin limitarse a ellas, Shearzyme™ 500L (Novozymes), Pentopan™ Mono BG (Novozymes), Pulpzyme™ (Novozymes), Ecopulp™ TX-200A (AB Enzymes), Veron™ 191 (AB Enzymes), Veron™ Special (AB Enzymes), Multifect™ CX 12L (Genencor/Danisco), Grindamyl™

H640 (Danisco) y Grandamyl™ Powebake™ (Danisco). La etapa de hidrólisis del arabinoxilano implica la incubación durante un periodo de tiempo apropiado tal como, pero sin limitarse a ellos, entre 1 y 24 horas, más preferiblemente entre 2 y 12 horas, por ejemplo entre 3 y 9 horas, de la lechada a las temperaturas y valores de pH recomendados por el desarrollador comercial de la preparación enzimática de endoxilanas usada para la hidrólisis del arabinoxilano, típicamente a un pH entre 4 y 8, tal como entre 4 y 6. Preferiblemente, la endoxilanas es una endoxilanas con alta selectividad por los WU-AX, con un factor de selectividad de sustrato (SSF_{CHROM}), como se define en Moers *et al.* (2005), que es al menos 2 o superior, preferiblemente al menos 3 o superior, tal como 4 o superior. La endoxilanas es preferiblemente una endoxilanas de la familia 11 de las glicosil hidrolasas (Henrissat 1991). Otras actividades enzimáticas presentes en la preparación de enzima endoxilanas pueden ser, pero sin limitarse a ellas, las actividades arabinofuranosidasas, beta-glucanasas, exoxilanas, beta-xilasidasas y/o xilobiasas.

Para las etapas (d1), (c1') y (d3) se añade a la mezcla un ácido fuerte, tal como por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico o ácido sulfúrico, hasta una concentración final entre 0,02N y 0,4N, preferiblemente entre 0,02 y 0,2N, por ejemplo entre 0,02 y 0,1N. Preferiblemente, la concentración de dicho ácido fuerte se determina con respecto a la cantidad total de agua en la mezcla. Típicamente, la adición de un ácido fuerte a la mezcla produce un pH de la mezcla por debajo de 3, más preferiblemente por debajo de 2,5, lo más preferiblemente por debajo de 2. Más preferiblemente, el ácido fuerte es ácido sulfúrico y la concentración es preferiblemente entre 0,02 y 0,10N (0,01 y 0,05M). La temperatura es entre 80°C y 180°C, preferiblemente entre 90°C y 160°C, tal como entre 100 y 140°C, y el tiempo de incubación es entre 5 minutos y 180 minutos. Los parámetros de pH, temperatura y tiempo de incubación se eligen de forma que se produzca la solubilización esencial de los arabinoxilanos, sin embargo los parámetros elegidos están en el límite de las condiciones que producen una formación excesiva de furfural y productos de Maillard coloreados cuando se aumenta la exigencia (cuanto menor sea el pH mayor es la exigencia, cuanto mayor sea la temperatura mayor es la exigencia y cuanto mayor sea el tiempo de incubación mayor es la exigencia). Por ejemplo, el ácido sulfúrico se añade a la mezcla con una concentración de 0,025M seguido por incubación de la mezcla a 120°C durante 45 minutos. Por solubilización esencial de los arabinoxilanos mediante tratamiento ácido se quiere decir que la concentración de ácido aplicada produce la extracción de una cantidad de productos de la despolimerización del arabinoxilano solubilizados en agua (arabinoxilano, oligosacáridos de arabinoxilanos, xilosa libre o arabinosa libre solubles, o una mezcla de ellos) a partir de un material vegetal que contiene arabinoxilano dado, que es al menos tres veces más que la obtenida a un pH entre 6 y 7 y con las mismas condiciones de temperatura e incubación.

Las fracciones solubilizadas en agua en las etapas (b1), (b2), (e1), (e2) y (e3) se separan preferiblemente a partir de dichas fracciones insolubles en agua usando bien un tamiz gravitacional, una prensa de filtro, un filtro rotatorio, un tamiz centrífugo, un filtro banda, un filtro a vacío, una prensa de tornillo, un decantador, una centrifugadora o un decantador centrífugo, o una combinación de estos medios de separación, o cualquier otro medio conocido por los expertos en la técnica. Las fracciones solubilizadas en agua de las etapas (e1), (e2) o (e3) están altamente enriquecidas en productos de despolimerización del arabinoxilano solubilizados y contienen en porcentaje de materia seca, al menos 40% (peso/peso), preferiblemente al menos 50%, tal como al menos 60%, o al menos 70% u 80% de productos de despolimerización del arabinoxilano solubilizados, en particular oligosacáridos de arabinoxilanos, xilosa y arabinosa.

Opcionalmente, las fracciones insolubles en agua de las etapas (b1), (b2), (e1), (e2) y (e3) se lavan con agua antes de cualquier tratamiento adicional. Dicha etapa de lavado puede comprender lavar la torta insoluble en agua con agua en un filtro, un filtro prensado, un filtro de banda, un tamiz o un decantador centrífugo, como prefiera el experto en la técnica. Preferiblemente, el lavado se realiza en un flujo a contracorriente entre la fracción insoluble en agua y el agua limpia.

Opcionalmente, los oligosacáridos de arabinoxilanos y los arabinoxilanos solubles de la fracción solubilizada en agua de las etapas (e1), (e2) o (e3) se post-hidrolizan adicionalmente a xilosa y arabinosa. Esto se obtiene por hidrólisis ácida mediante la adición de un ácido fuerte, tal como por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico o ácido sulfúrico hasta una concentración final entre 0,015N y 0,2N. Preferiblemente el ácido fuerte es ácido sulfúrico. La temperatura es entre 80°C y 180°C, preferiblemente entre 90°C y 160°C, tal como entre 100 y 140°C, y el tiempo de incubación es entre 5 minutos y 120 minutos.

Las etapas de desmineralización en las etapas (f1), (f2) y (f3) se pueden realizar usando técnicas tales como, pero sin limitarse a ellas, nanofiltración, ultrafiltración, cromatografía de intercambio iónico, electrodiálisis, cromatografía de exclusión por tamaños, cromatografía de absorción o una combinación de estos medios de separación, para eliminar minerales, proteínas y/u otras impurezas de forma que aumente la pureza de la preparación de AXOS o pentosa. Dichas técnicas de separación también se pueden usar para separar los AXOS de las pentosas y/o para separar adicionalmente la xilosa de la arabinosa.

La concentración en las etapas (g1), (g2) y (g3) se realiza para aumentar el contenido de sólidos secos de la preparación que contiene los AXOS y/o pentosas por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, usando un evaporador en capa fina o un evaporador de placas, filtración por ósmosis inversa, nanofiltración, o una combinación de estos medios de concentración. Cualquiera de dichas etapas de concentración también puede preceder a las etapas de desmineralización (f1), (f2) y/o (f3). Opcionalmente, la fracción solubilizada en agua condensada se puede secar por

ejemplo, pero sin limitarse a estos medios, usando un equipo de secado por pulverización, o se puede cristalizar en un cristizador, con el fin de obtener un producto seco.

Definiciones

En el contexto de la presente invención, el término “endoxilanasas” se refiere a una enzima que es capaz de hidrolizar los enlaces glicosilo internos que enlazan los restos xilosa en los polisacáridos que contienen xilosa. Dichos enlaces glicosilo pueden ser, por ejemplo, el enlace beta-1,4-glicosilo en las unidades beta-D-xilopiranosil-1,4-beta-D-xilopiranosilo de dichos polisacáridos. Las endoxilanasas se pueden obtener a partir de múltiples organismos, incluyendo especies de plantas, hongos (por ejemplo, especies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Disporotrichum*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Humicola*, *Trichoderma*) o bacterias (por ejemplo, especies de *Bacillus*, *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Nocardioopsis*, *Thermomyces*, *Thermotoga*) (véase por ejemplo los documentos WO92/17573, WO92/01793, WO91/19782 y WO94/21785). Las preparaciones de endoxilanasas disponibles comercialmente purificadas o parcialmente purificadas incluyen, pero sin limitarse a ellas, Frimase™ B210 (Puratos), Shearzyme™ (Novozymes), Biofeed Wheat™ (Novozymes), Pentopan™ Mono BG (Novozymes), Pentopan™ 500 BG (Novozymes), Pulpzyme™ (Novozymes), Ecopulp™ (AB Enzymes), Veron™ 191 (AB Enzymes), Veron™ Special (AB Enzymes), Multifect™ CX12L (Genencor/Danisco), Spezyme™ CP (Genencor/Danisco), Grindamyl™ H640 (Danisco) y Grindamyl™ Powerbake™ (Danisco).

El término “endoxilanasas con alta selectividad por los WU-AX” se refiere a una endoxilanasas cuyo valor del factor de selectividad de sustrato (SSF_{CHROM}), como se define en Moers *et al.* (2005), es al menos 2 o superior, preferiblemente al menos 3 o superior, tal como 4 o superior. El SSF_{CHROM} fue definido por Moers *et al.* (2005) como la relación entre la actividad de la enzima hacia los WU-AX y la actividad de la enzima hacia los WE-AX. La actividad endoxilanasas hacia los WU-AX se calculó por incubación en un sustrato cromogénico insoluble en agua con un intervalo de concentraciones de enzima en placas de microvaloración, seguido por medida colorimétrica del colorante liberado en el sobrenadante. Un enfoque similar usando un sustrato soluble en agua y precipitación en etanol de los fragmentos AX no hidrolizados se usó para calcular la actividad enzimática frente a los WE-AX (Moers *et al.* 2005). Las endoxilanasas de la familia 11 de las glicosil hidrolasas (Henrissat 1991) han demostrado que tienen una afinidad y/o selectividad elevadas por el arabinoxilano no extraíble en agua. Por lo tanto, las endoxilanasas de la familia 11 son particularmente adecuadas para usarlas en cualquier método según la presente invención.

El término “oligosacáridos de arabinoxilanos”, abreviado como AXOS, en el contexto de la presente invención, se refiere bien a xilo-oligosacáridos, bien a arabino-xilo-oligosacáridos o bien a mezclas de xilo-oligosacáridos y arabino-xilo-oligosacáridos. Los xilo-oligosacáridos se refieren a poli- u oligosacáridos que consisten únicamente en restos D-xilopiranosilo (xilosa) enlazados en beta-(1-4), con un grado de polimerización entre 2 y 100. Los arabino-xilo-oligosacáridos se refieren a poli- u oligosacáridos que consisten en un esqueleto de restos D-xilopiranosilo (xilosa) enlazados en beta-(1-4) con un grado de polimerización del esqueleto entre 1 y 100, con al menos un resto alfa-L-arabinofuranosilo (arabinosa) enlazado a uno de los restos xilosa del esqueleto por molécula. Otros sustituyentes, tales como cadenas laterales de acetilo, alfa-glucuronilo, alfa-4-O-metilglucuronilo, galacturonilo, xilosilo, ramnosilo, galactosilo o glucosilo, o cadenas laterales de oligosacáridos cortos, pueden estar unidos a uno o más de los restos xilosa, y ácidos hidroxicinámicos, tales como ácido ferúlico, ácido deshidrodiferúlico, ácido p-cumárico, ácido cafeico o ácido sinápico, pueden estar enlazados a una o más de las unidades de arabinosa.

Los arabinoxilanos solubles se refiere a polisacáridos que consisten en un esqueleto de restos D-xilopiranosilo (xilosa) enlazados en beta-(1-4) con un grado de polimerización del esqueleto superior a 100, con al menos un resto alfa-L-arabinofuranosilo (arabinosa) unido a uno de los restos el esqueleto por molécula. Otros sustituyentes, tales como cadenas laterales de acetilo, alfa-glucuronilo, alfa-4-O-metilglucuronilo, galacturonilo, xilosilo, ramnosilo, galactosilo o glucosilo, o cadenas laterales de oligosacáridos cortos, pueden estar unidos a uno o más de los restos xilosa, y ácidos hidroxicinámicos, tales como ácido ferúlico, ácido deshidrodiferúlico, ácido p-cumárico, ácido cafeico o ácido sinápico, pueden estar enlazados a una o más de las unidades de arabinosa.

El término “cereal” en el contexto de la presente invención se refiere a plantas de la familia botánica de las *Poaceae* incluyendo, pero sin limitarse a ellas, especies tales como trigo (duro), tritical, cebada, avena, centeno, sorgo, maíz y trigo.

El término “salvado”, en el contexto de la presente invención, significa una fracción de la molienda derivada del grano, sea obtenida por molienda húmeda o seca, que está enriquecida en cualquiera o en todos los tejidos elegidos entre aleurona, pericarpio y cáscara del grano, en comparación con el grano intacto correspondiente y/o que tiene una concentración inferior en almidón que el correspondiente grano intacto.

El término “subproductos de inflorescencia”, en el contexto de la presente invención, significa las fracciones enriquecidas en cualquiera o en todos los tejidos elegidos entre cascabillo, paja, sépalos, pericarpio, pétalos, vainas, zuros, pedúnculos, raquis y peciolos que se producen durante los procedimientos de trilla de las espigas, la trilla de frutos o el descascarillamiento de los granos para generar granos o semillas limpias.

El término “subproductos del tallo”, en el contexto de la presente invención, significa la principal fracción insoluble en agua obtenida después de la separación la fracción soluble en agua y la fracción insoluble en agua de una mezcla

acuosa preparada a partir de granos molidos, tal como se produce por ejemplo, pero sin limitarse a ellos, durante los procesos de elaboración de la cerveza o la producción de etanol a partir de granos.

5 El término “bagazo”, en el contexto de la presente invención, se refiere a la principal fracción insoluble en agua que se obtiene después de separar la fracción soluble en agua y la fracción insoluble en agua de una mezcla acuosa preparada a partir de granos molidos, tal como se produce durante, por ejemplo, pero estar limitados, al procedimiento de elaboración de la cerveza o la producción de etanol a partir de granos.

Los términos “soluble” o “solubilizado”, en el contexto de la presente invención, se refiere a soluble en agua como disolvente o solubilizado en agua como disolvente, respectivamente.

Modo de realización ilustrativo

10 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Sinergia entre la solubilización ácida y la solubilización enzimática del AX

Materiales y métodos

15 *Materiales.* Ecopulp® TX200A (ECX) es una preparación de endoxilanasa comercial de grado técnico de AB Enzymes (Darmstadt, Alemania) producido mediante la expresión recombinante de un mutante termófilico de un gen de una endoxilanasa de la familia 11 de las glicosil hidrolasas de *Hypocrea jecorina* (anamorfo de *Trichoderma longibrachiatum*, anteriormente *T. reesei*). Multifect® CX 12 (MFX) es una preparación de endoxilanasa comercial de uso alimentario de Genencor/Danisco (Palo Alto, Estados Unidos) producido mediante la expresión recombinante de un gen de una endoxilanasa de GHF11 de *Hypocrea jecorina* (anamorfo de *Trichoderma longibrachiatum*, anteriormente *T. reesei*).

20 *Métodos analíticos.* El contenido total de sacáridos se determinó por análisis cromatográfico gas-líquido de los acetatos de alditol después de la hidrólisis ácida de las muestras en ácido trifluoroacético 2N, seguido por reducción con borohidruro de sodio y acetilación con anhídrido acético, como ha sido descrito por Courtin *et al.* (2000). Se usó β-D-alosa como patrón interno y se incluyeron muestras de calibración que contenían los monosacáridos D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, D-xilosa y L-arabinosa con cada serie de muestras. El contenido de sacárido de extremo reductor se determinó por análisis cromatográfico gas-líquido de los acetatos de alditol después de la reducción con borohidruro de sodio seguida por la hidrólisis ácida y acetilación con anhídrido acético, como ha sido descrito por Courtin *et al.* (2000). El análisis del contenido de monosacáridos libres fue muy similar al de sacáridos totales (Courtin *et al.*, 2000), con la única diferencia de que las muestras no se hidrolizaron antes de la reducción y la acetilación a acetatos de alditol. Usando los resultados cromatográficos, la suma de los contenidos de AX poliméricos solubles en agua y de AXOS (AX/AXOS) se calculó por la fórmula (a). El grado medio de polimerización de los AX/AXOS (abreviado generalmente como avDP por sus iniciales en inglés) se calculó según se indica en la fórmula (b). La suma de AX/AXOS, arabinosa libre y xilosa libre (AX/AXOS + A + X) se calculó como se indica en la fórmula (c).

35 (a)
$$\text{arabinosa}_{\text{LIBRE}} + [\text{xilosa}_{\text{RED}} + \text{xilosa}_{\text{LIBRE}}] + 0,88 \times [\text{xilosa}_{\text{TOT}} - \text{xilosa}_{\text{RED}}] \quad \text{AX/AXOS} = 0,88 \times [\text{arabinosa}_{\text{TOT}} - \text{arabinosa}_{\text{LIBRE}}]$$

(b)
$$\text{arabinosa}_{\text{LIBRE}} + [\text{xilosa}_{\text{TOT}} - \text{xilosa}_{\text{LIBRE}}] / [\text{xilosa}_{\text{RED}} - \text{xilosa}_{\text{LIBRE}}] \quad \text{avDP} = \{[\text{arabinosa}_{\text{TOT}} - \text{arabinosa}_{\text{LIBRE}}] / [\text{xilosa}_{\text{RED}} - \text{xilosa}_{\text{LIBRE}}]\}$$

40 (c)
$$\text{arabinosa}_{\text{LIBRE}} + \text{xilosa}_{\text{LIBRE}} \quad \text{AX/AXOS} + A + X = \text{AX/AXOS}^* + \text{arabinosa}_{\text{LIBRE}} + \text{xilosa}_{\text{LIBRE}}$$

* Según la fórmula (a)

45 En las fórmulas anteriores, los subíndices TOT, RED y LIBRE se refieren a los contenidos total, del extremo reductor y de monosacáridos libres, respectivamente, y el factor 0,88 corrige la incorporación de agua durante la hidrólisis de los azúcares pentosa (Courtin *et al.* 2009).

50 *Determinación de la actividad de las enzimas.* La actividad endoxilanasas se determinó usando arabinoxilano reticulado con azurina insoluble en agua (comprimidos de Xylazyme AX, Megazyme, Bray, Irlanda) como se describe en la Hoja de Datos 9/95 de Megazyme. Se analizaron las enzimas en diluciones apropiadas en disolución tampón de acetato de sodio 25mM, pH 5,6, a 35°C durante 10 minutos. La absorbancia a 590 nm se midió usando un espectrofotómetro de UV/visible Ultraspec III (Farmacia Biotech, Uppsala, Suecia). Una unidad (U) de actividad

enzimática fue la cantidad de enzima necesaria para dar una absorbancia de 1,0 después de 10 minutos a 590 nm en las condiciones del análisis.

Resultados y discusión

- 5 Se puso en suspensión salvado de trigo en agua (10% peso/peso de materia seca) en un tanque agitado y la mezcla se calentó a 90°C. Se añadió una preparación de α -amilasa (Termamyl 120LS, Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca: 1 mL/kg de salvado) y se dejó reaccionar con agitación continua durante 90 minutos a 90°C para hidrolizar el almidón. La lechada se filtró y la torta de filtración se lavó con agua desmineralizada. El residuo lavado se denominó salvado de trigo desalmidonado. El rendimiento del salvado de trigo desalmidonado sobre el material inicial fue de 64,6% (peso/peso de materia seca).
- 10 El salvado de trigo desalmidonado se sometió a diferentes tratamientos ácidos, tratamientos con endoxilanas y combinaciones de tratamientos ácidos y tratamientos con endoxilanas, en algunos casos con ajustes de pH mediante adición de hidróxido de calcio. Las condiciones de tratamiento se especifican en la tabla 1. Después de los tratamientos especificados en la tabla 1, la agitación se filtró con un filtro de 100 μ m. Las muestras de los filtrados se hicieron bullir durante 10 minutos para inactivar las enzimas, se enfrió a temperatura ambiente y se centrifugó a 10.000 g durante 15 minutos para obtener un sobrenadante clarificado. Las fracciones de sobrenadante se liofilizaron y en ellas se analizaron los sacáridos totales, sacáridos de extremo reductor y monosacáridos libres. Los resultados de estos análisis se muestran en la tabla 2.

- 20 Como se observa en la tabla 2, la recuperación de los AX y AXOS solubles en agua, la arabinosa libre y la xilosa libre (AX/AXOS + A + X) es notablemente superior cuando se aplica una combinación de ambas etapas de solubilización de AX, ácida y enzimática. El aumento debido a la combinación de las etapas de solubilización de AX con ácido y con enzima ha sido observado tanto en las condiciones de tratamiento ácido menos exigentes (H_2SO_4 25mM, 95°C, 150 min) así como para las condiciones de tratamiento ácido más exigentes (H_2SO_4 25mM, 120°C, 45 min), pero es mayor en el último caso. Por ejemplo, la recuperación de AX/AXOS + A + X fue de 49,2% para el tratamiento ácido a 120°C solo, 38,7% para el tratamiento enzimático con MFX solo, 65,3% para la combinación del tratamiento enzimático con MFX y el tratamiento ácido a 120°C y 70,6% cuando el orden es el inverso (tabla 2). Por lo tanto, el aumento debido a la combinación de las etapas de solubilización de AX con ácido y con enzima se observa en el caso en el que la etapa de solubilización de AX enzimática es seguida por la etapa de solubilización de AX ácida, así como cuando el orden es el inverso. En el caso en el que se desee más hidrólisis de AX o AXOS solubilizado a xilosa y arabinosa se puede aumentar adicionalmente la exigencia de la concentración del ácido, de la temperatura o del tiempo de incubación.
- 30

Referencias

- AOAC, 1995. *Official Methods of Analysis*, 16th edition. Method 990.03. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA.
- Andersson, R. and Aman, P. (2001) Cereal arabinoxylan: occurrence, structure and properties. In: *Advanced dietary fibre technology*. pp. 301-314. McCleary, B. V. and Prosky, L., Eds. Blackwell Science Ltd, Oxford.
- Biely, P., Vrsanska, M., Tenkanen, M., Kluepfel, D. (1997) *J Biotechnol*, 57: 151-166
- Carvalho F., Esteves, M.P., Parajo J.C., Pereira, H., Girio, F.M. (2004) Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain. *Bioresource Technol* 91: 93-100
- Cloetens, L., De Preter, V., Swennen, K., Broekaert, W.F., Courtin, C.M., Delcour, J.A., Rutgeerts, P., and Verbeke, K. (2008) Dose-response effect of arabinoxyl-oligosaccharides on gastrointestinal motility and on colonic bacterial metabolism in healthy volunteers. *J. Am. Coll. Nutr.* 27:512-518.
- 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.

- Courtin, C.M. and Delcour, J.A. (2001) Relative Activity of Endoxylanases Towards Water-extractable and Water-unextractable Arabinoxylan. *J. Cereal Sci.* 33: 301-312.
- Courtin, C.M., K. Swennen, W.F. Broekaert, O. Lescroart, O. Onagbesan, J. Buyse, E. Decuypere, T. Van de Wiele, M. Marzoratti, W. Verstraete, G. Huyghebaert, and J.A. Delcour (2008). Dietary inclusion of wheat bran arabinoxyloligosaccharides has beneficial nutritional effects on chickens. *Cereal Chem.* 85: 607-613.
- Delcour, J.A., Van Win, H., Grobet, P.J., 1999. Distribution and structural variation of arabinoxylans in common wheat mill streams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47: 271–275.
- Garrote, G., Dominguez, H. and Parajo, J. C. (2002) Autohydrolysis of corncob: study of non-isothermal operation for xylooligosaccharide production. *J. Food Eng.* 52: 211-218.
- 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.
- Gruppen, H., Hamer, R.J. and Voragen, A.G.J. (1992). Water-unextractable cell wall material from wheat flour. II. Fractionation of alkali-extracted polymers and comparison with water-extractable arabinoxylans. *Journal of Cereal Science*, 16: 53-67.
- Hahn-Hägerdal B, Karhumaa K, Fonseca C, Spencer-Martins I, Gorwa-Grauslund MF (2007) Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl Microbiol Biotechnol* 74:937-953.
- Henrissat B (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino-acid sequence similarities. *Biochem. J.* 280:309-316.
- Hollmann J, Lindhauer MG (2005) Pilot-scale isolation of glucuronoarabinoxylans from wheat bran. *Carbohydr. Polym.* 59: 225–230
- Izydorczyk, M. S. and Biliaderis, C. G. (1995) Cereal arabinoxylans: Advances in structure and physicochemical properties. *Carbohydr. Polym.* 28: 33-48.
- Kabel, M. A., Carvalheiro, F., Garrote, G., Avgerinos, E., Koukios, E., Parajo, J. C., Girio, F. M., Schols, H. A. and Voragen, A. G. J. (2002) Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylo-oligosaccharides. *Carbohydr. Polym.* 50: 47-56.
- Lyon, T.P., Kesall, D.R., Murtogh, J.E. (1995) *The ethanol textbook*. Nottingham University Press.
- Maes, C., Delcour, J. A. (2001). Alkaline hydrogen peroxide extraction of wheat bran non-starch polysaccharides. *J. Cereal Sci.* 34: 29–35.
- Maes, C., Vangeneugden, B. and Delcour, J.A. (2004). Relative activity of two endoxylanases towards water-unextractable arabinoxylans in wheat bran. *J. Cereal Sci.* 39: 181-186.
- Meuser, F., Suckow, P. (1986) Non-starch polysaccharides. In *Chemistry and Physics of Baking*. Blanshard, J. M. V., Frazier, P. J., Galliard, T., Eds. Royal Society of London. London, UK. pp 43–61.

Moers, C, Celus, I., Brijs, K., Courtin, C. M., Delcour, J.A. (2005) Endoxylanase substrate selectivity determines degradation of wheat water-extractable and water-unextractable arabinoxylan. *Carbohydrate Research* 340: 1319-1327.

Ohta T, Semboku N, Kuchii A, Egashira Y & Sanada H (1997) Antioxidant activity of corn bran cell-wall fragments in the LDL oxidation system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45: 1644-1648.

Palmarola-Adrados, B., Choteborska, P., Galbe, M., Zacchi, G. (2005) Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. *Bioresource Technology* 96: 843-850.

Roberfroid, M.B. (1998) Prebiotics and synbiotics: concepts and nutritional properties. *Brit. J. Nutr.* 80:S197-S202.

Sanjust, E., Salis, A., Rescigno, A., Curreli, N., Rinaldi, A. (2004) Xylose production from durum wheat bran: enzymic versus chemical methods. *Food Sci. Tech. Int.* 10: 11-14.

Sorensen HR, Pedersen S, and Meyer AS (2006) Optimization, of reaction conditions for enzymatic viscosity reduction and hydrolysis of wheat arabinoxylan in an industrial ethanol fermentation residue. *Biotechnol. Prog.* 22: 505-513.

Swennen, K, Courtin, C.M., Lindemans GCJE, Delcour, J.A. (2006) Large-scale production and characterisation of wheat bran arabinoxyloligosaccharides. *J. Sci. Food Agric.* 86: 1722-1731.

Van Craeyveld, V., Swennen, K., Domez, E., Van de Wiele, T., Marzorati, M., Verstraete, W., Delaedt, Y., Onagbesan, O., Decuyper, E., Buyse, J., De Ketelaere, B., Broekaert, W.F., Delcour, J.A., and Courtin, C.M. (2008) Structurally different wheat-derived arabinoxyloligosaccharides have different prebiotic and fermentation properties in rats. *J. Nutr.* 138: 2348-2355.

Van Loo, J.A.E. (2004) Prebiotics promote good health. The basis, the potential, and the emerging evidence. *J Clin Gastroenterol* 38: S70-S75.

Ward, O.P. and Singh, A. (2002) Bioethanol technology: developments and perspectives. *Adv. Appl. Microbiol.* 51: 53:80.

Yamada H., Itoh, K., Morishita, Y., Taniguchi, H. (1993) Structure and properties of oligosaccharides from wheat bran. *Cereal Foods World* 38: 490-492.

Yuan XP, Wang J & Yao HY (2005) Antioxidant activity of feruloylated oligosaccharides from wheat bran. *Food Chemistry* 90: 759-764.

Tablas

5 **Tabla 1:** Especificación de las condiciones de tratamiento del salvado de trigo desalmidonado para el ejemplo experimental 1. La materia seca de las lechadas del primero y segundo tratamiento fue de 7% (peso/peso). MFX se refiere a la endoxilanasas Multifect CX 12L, MS es la materia seca del sustrato.

Nº de tratamiento	Primer tratamiento	Adaptación del pH después del primer tratamiento	Segundo tratamiento	Adaptación del pH después del segundo tratamiento
1	H ₂ SO ₄ 25mM, 150 min a 92°C	Ca(OH) ₂ 25mM	ninguno	ninguno
2	H ₂ SO ₄ 25mM, 45 min a 120°C	Ca(OH) ₂ 25mM	ninguno	ninguno
3	MFX (3 mL/kg DM), 6 horas a 50°C	ninguno	ninguno	ninguno
4	MFX (3 mL/kg DM), 6 horas a 50°C	ninguno	H ₂ SO ₄ 25mM, 150 min a 92°C	Ca(OH) ₂ 25mM
5	MFX (3 mL/kg DM), 6 horas a 50°C	ninguno	H ₂ SO ₄ 25mM, 45 min a 120°C	Ca(OH) ₂ 25mM
6	H ₂ SO ₄ 25mM, 150 min a 92°C	Ca(OH) ₂ 25mM	MFX (3 mL/kg DM), 3 horas a 50°C	ninguno
7	H ₂ SO ₄ 25mM, 45 min a 120°C	Ca(OH) ₂ 25mM	MFX (3 mL/kg DM), 3 horas a 50°C	Ninguno

Tabla 2: Análisis de la fracción solubilizada en agua después del tratamiento del salvado de trigo desalmidonado como se especifica en la tabla 1.

Tratamiento N° (véase tabla 1)	AX/AXOS+A+X ^a (% peso/peso)	AX/AXOS ^b (% p/p)	A+X ^c (% p/p)	avDP ^d	Recuperación de masa seca ^e (%)	Recuperación de AX/AXOS+A+X ^f (%)
1	42,2	23,5	18,7	25	15,0%	27,5%
2	52,0	31,2	20,8	14	21,8%	49,2%
3	64,8	64,3	0,5	6	13,7%	38,7%
4	56,1	41,6	14,5	6	21,3%	51,9%
5	56,5	37,4	19,1	5	26,6%	65,3%
6	55,3	38,8	16,5	4	20,5%	49,4%
7	58,5	40,7	17,8	4	27,7%	70,6%

^a AX/AXOS + A + X = suma del contenido de AX y AXOS solubles en agua, arabinosa libre y xilosa libre

5 ^b AX/AXOS = contenido de AX y AXOS solubles en agua

^c A + X = arabinosa y xilosa libres

^d avDP = grado medio de polimerización de los AX y AXOS solubles en agua

^e Expresado como porcentaje (% peso/peso) de materia seca de la fracción solubilizada en agua sobre la materia seca del salvado usado como material inicial en el procedimiento

10 ^f Calculado como (% de recuperación de materia seca) x (% AX/AXOS + A + X de la fracción solubilizada en agua) / (% AX/AXOS + A + X del salvado usado como material inicial)

REIVINDICACIONES

- 1.- Un método para la extracción y el aislamiento de productos de la despolimerización del arabinoxilano solubilizados, en el que un material vegetal que contiene arabinoxilano se mezcla en agua y se trata con una concentración apropiada de una preparación de enzima endoxilanasas con el fin de despolimerizar enzimáticamente una primera fracción de los arabinoxilanos comprendidos en dicho material vegetal y en el que dicho tratamiento enzimático es seguido por un tratamiento ácido que comprende la incubación de dicho material vegetal en una mezcla acuosa acidificada con el fin de obtener la despolimerización y solubilización de una segunda fracción de los arabinoxilanos comprendidos en dicho material vegetal; comprendiendo dicho método además separar de dicho material vegetal mezclado una fracción solubilizada en agua que comprende al menos parte de dichos productos de la despolimerización del arabinoxilano solubilizados.
- 2.- El método según la reivindicación 1, en el que después del tratamiento con endoxilanasas, la mezcla que contiene endoxilanasas de dicho material vegetal que contiene arabinoxilano se somete al tratamiento ácido, y en el que dicho tratamiento ácido es seguido por la separación de dicha mezcla en i) una fracción solubilizada en agua que comprende los productos de la despolimerización del arabinoxilano solubilizados, tanto por el tratamiento enzimático como por el ácido, y ii) el resto del material vegetal insoluble en agua.
- 3.- El método según la reivindicación 1, en el que el tratamiento con endoxilanasas es seguido por una separación de dicha mezcla en i) una primera fracción solubilizada en agua que comprende los productos de la despolimerización enzimática del arabinoxilano solubilizados y ii) un primer resto de material vegetal insoluble en agua, y en el que dicho primer resto vegetal insoluble en agua se vuelve a poner en suspensión en agua con el fin de obtener una segunda mezcla que se somete al tratamiento ácido seguido por la separación de dicha segunda mezcla en iii) una segunda fracción solubilizada en agua que comprende los productos de la despolimerización ácida del arabinoxilano solubilizados y iv) un segundo resto de material vegetal insoluble en agua.
- 4.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho tratamiento con endoxilanasas comprende el uso de una endoxilanasas con alta selectividad por el arabinoxilano no extraíble en agua.
- 5.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el tratamiento con endoxilanasas implica la incubación de la mezcla con una preparación de enzima endoxilanasas durante un periodo de 2 a 12 horas.
- 6.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el tratamiento ácido implica la adición a dicho material vegetal que contiene arabinoxilano mezclado de un ácido fuerte a una concentración entre 0,02 y 0,4N.
- 7.- El método según la reivindicación 6, en el que dicho tratamiento ácido implica el tratamiento de dicho material vegetal que contiene arabinoxilano mezclado durante 5 a 180 minutos.
- 8.- El método según las reivindicaciones 6 ó 7, en el que dicho tratamiento ácido implica el tratamiento de dicho material vegetal que contiene arabinoxilano mezclado a una temperatura entre 80 y 180°C.
- 9.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en el que dicho ácido fuerte se elige entre el grupo que consiste en ácido fosfórico, ácido clorhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico o ácido sulfúrico.
- 10.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que los productos de la despolimerización del arabinoxilano solubilizados son bien arabinoxilano, oligosacáridos de arabinoxilano, xilosa o arabinosa solubles o bien mezclas de dos o más de estos compuestos.
- 11.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dichas fracciones solubilizadas en agua separadas se separan adicionalmente usando filtración o técnicas cromatográficas o combinaciones de ellas para obtener preparaciones que comprenden una concentración aumentada de un producto solubilizado de la despolimerización del arabinoxilano en comparación con la concentración de este producto en dicha fracción solubilizada en agua.
- 12.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dichas fracciones solubilizadas en agua separadas se concentran usando medios para la eliminación del agua.
- 13.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que dicho material vegetal que contiene arabinoxilano es un material vegetal desalmidonado.
- 14.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que dicho material vegetal que contiene arabinoxilano se elige entre el grupo que consiste en salvado, subproductos de la inflorescencia, subproductos del tallo o bagazo, o combinaciones de ellos.
- 15.- El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que dichas fracciones solubilizadas en agua comprenden en porcentaje de materia seca, al menos 40% de uno o más entre los productos de despolimerización del arabinoxilano, arabinoxilano, oligosacáridos de arabinoxilanos, xilosa y arabinosa solubles.

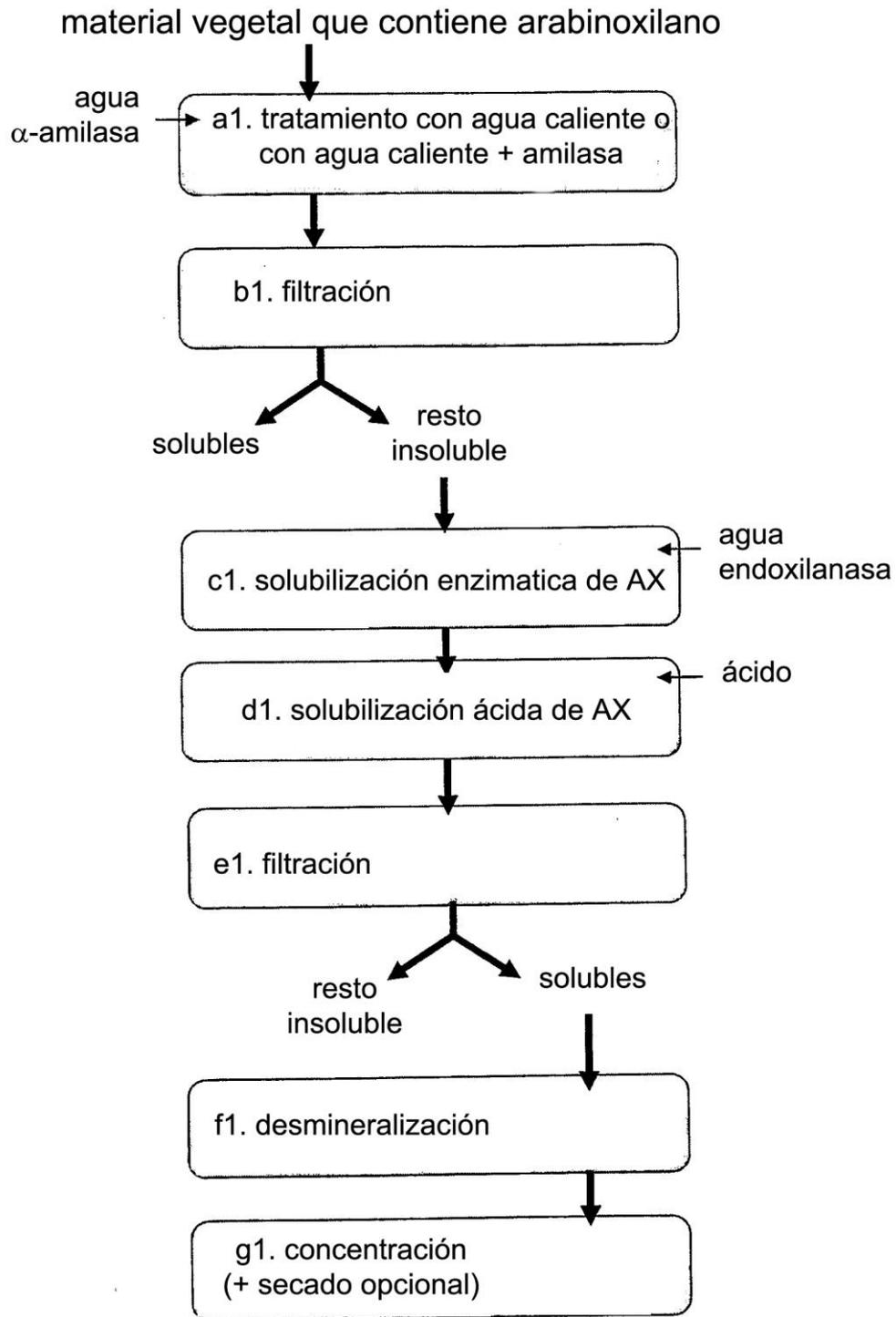


Figura 1

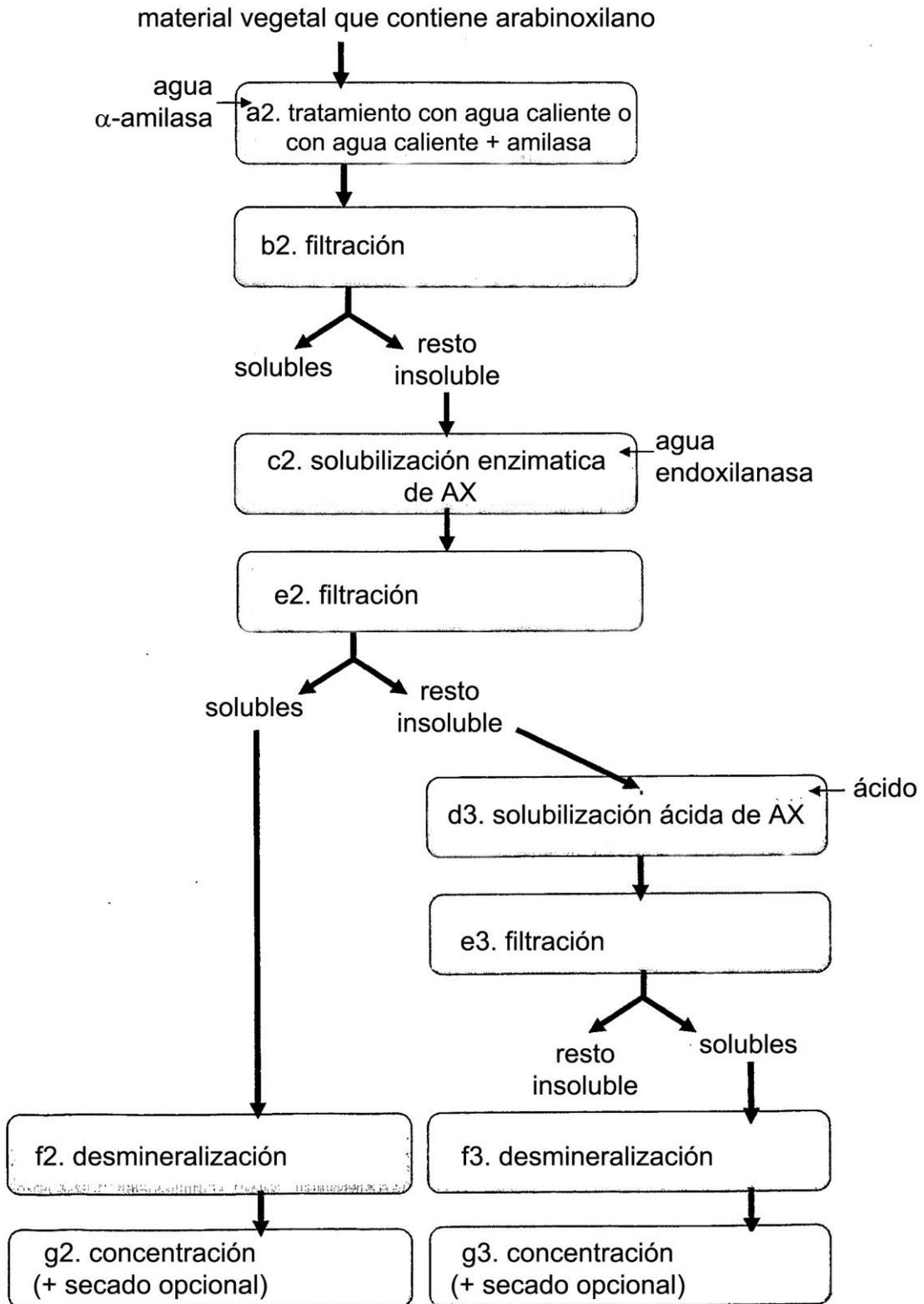


Figura 2