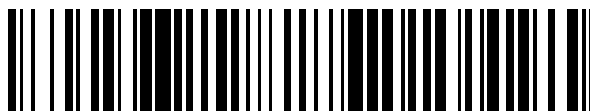


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 109**

51 Int. Cl.:

C12P 19/04	(2006.01)
C12P 19/00	(2006.01)
C12P 19/14	(2006.01)
C08B 37/00	(2006.01)
D21C 5/00	(2006.01)
C08H 8/00	(2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.01.2015 PCT/IB2015/000030**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **23.07.2015 WO15107413**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.01.2015 E 15706523 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.09.2018 EP 3094734**

54 Título: **Proceso para el fraccionamiento de oligosacáridos a partir de desechos agrícolas**

30 Prioridad:

16.01.2014 IN 155MU2014

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

14.03.2019

73 Titular/es:

**LALI, ARVIND MALLINATH (100.0%)
DBT-ICT Centre for Energy Biosciences Institute
of Chemical Technology (Deemed University)
Nathalal Parikh Marg Matunga (East)
Mumbai 400 019, IN**

72 Inventor/es:

**ODANETH, ANNAMMA ANIL y
PEDNEKAR, MUKESH PRABHAKAR**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 704 109 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

Proceso para el fraccionamiento de oligosacáridos a partir de desechos agrícolas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un proceso secuencial quimio-enzimático continuo, eficiente y económico para el fraccionamiento de oligosacáridos en arabinoxilooligosacáridos, xilooligosacáridos y celooligosacáridos, adecuados para aplicaciones comerciales, a partir de desechos agrícolas.

10

Antecedentes de la invención

Los oligosacáridos forman un grupo importante de hidratos de carbono poliméricos que se usan ampliamente como aditivos alimentarios y complementos nutricionales. Los oligosacáridos están compuestos por unidades de azúcares monoméricas unidas por un enlace glicosídico con un grado de polimerización de 2 a 10. Se hidrolizan fácilmente mediante ácido o enzima a sus respectivos constituyentes de azúcar monoméricos. Los oligosacáridos proporcionan varios beneficios para la salud que los hacen útiles como aditivos alimentarios. Las propiedades fisicoquímicas y fisiológicas del oligosacárido varían dependiendo de la mezcla de oligosacáridos producida. Los oligosacáridos que tienen un grado de polimerización de 3 a 10 son prebióticos, con bajo valor colorante y se usan como fibra dietética soluble.

15

20

Los oligosacáridos se producen mediante métodos no enzimáticos o métodos enzimáticos. Los métodos no enzimáticos implican la extracción de oligosacáridos a partir de una fuente natural y síntesis química usando monosacáridos o disacáridos como material de partida. Los métodos enzimáticos implican la síntesis de oligosacáridos usando glucosidasas y glucotransferasas como catalizador y la hidrólisis enzimática de polisacáridos en oligosacáridos.

25

La producción de oligosacáridos a partir de desechos agrícolas conduce al aprovechamiento de desechos agrícolas, tales como cáscara, salvado, vainas, cascarilla, mazorcas y torta de semillas oleaginosas, que de otro modo se usan como piensos. Estos desechos contienen principalmente celulosa y hemicelulosa junto con proteínas, fitoquímicos y lignina. Todos estos constituyentes están dispuestos en una matriz polimérica compleja que impide el acceso a los polisacáridos para la hidrólisis. Sin embargo, el tratamiento termoquímico proporciona biomasa susceptible que, cuando se somete adicionalmente a hidrólisis enzimática controlada, ayuda a conseguir un alto rendimiento de oligosacáridos de propiedades deseadas. La producción de oligosacáridos bioactivos a partir de desechos agrícolas fácilmente disponibles proporciona beneficios prometedores para la industria basada en la agricultura.

30

35

Las técnicas anteriores proporcionan diversos métodos para la fabricación de oligosacáridos a partir de biomasa. Estos métodos implican el uso de células microbianas o enzimas para descomponer la biomasa en oligosacáridos. Sin embargo, los métodos descritos en la técnica anterior requieren enzimas específicas para la producción de oligosacáridos. Los métodos descritos en la técnica anterior producen una mezcla de oligosacáridos que requieren operaciones posteriores para su purificación, lo que aumenta el coste de producción.

40

El documento US5246840 desvela un método para la síntesis de oligosacáridos mediante el uso de glucosidasas y glucotransferasas como catalizadores. La síntesis de oligosacáridos se consiguió mediante la combinación de la síntesis catalizada por glucosidasas de oligosacáridos más cortos con la síntesis catalizada por glucotransferasas de oligosacáridos superiores.

45

El documento US4677198 desvela un proceso para la preparación de productos que contienen oligosacáridos a partir de biomasa, que proporciona el uso de ácido clorhídrico para la hidrólisis parcial de biomasa en productos que contienen oligosacáridos fácilmente fermentables y una fácil recuperación del ácido. Estos oligosacáridos se sometieron adicionalmente a fermentación para la preparación de productos como el etanol.

50

El documento JP2008136376 describe un proceso para la producción de xilooligosacáridos ácidos, a partir de salvado de trigo/arroz. En este proceso, se obtuvieron xilooligosacáridos ácidos después del tratamiento con agua caliente, en condiciones ácidas con un intervalo de pH de 1,0-4,0 o en condiciones alcalinas con un intervalo de pH de 9,0-13,0 de salvado de trigo o salvado de arroz a una temperatura entre 100-150 °C seguido de un tratamiento de intercambio iónico. El proceso produce xilooligosacáridos ácidos, con un grado de polimerización de 2-5.

55

El documento EP1304412 desvela un método para la producción de xilooligosacáridos a partir de pulpa lignocelulósica usando enzimas, que comprende la hidrólisis enzimática de la pulpa de lignocelulosa usando hemicelulasas seguidas de la separación por membrana para obtener una fracción no permeada con una alta concentración de mezcla de xilooligosacáridos-lignina que se trata adicionalmente.

60

El documento US4908311 desvela un método para obtener celooligosacárido a partir de una sustancia a base de celulosa mediante enzimas. La celulasa producida por un microorganismo perteneciente al género *Cellvibrio* se usó como catalizador para la descomposición enzimática del material de celulosa. La hidrólisis enzimática en

65

combinación con el reactor de filtración de membrana ayuda a la retirada de inhibidores y a la acumulación de celooligosacáridos.

5 El documento US7947656 describe un proceso para la producción de celooligosacáridos mediante la descomposición enzimática de un material de celulosa. El proceso consiste en la descomposición del material celulósico, que tiene un grado promedio de polimerización no mayor que 700 y un tamaño de partícula promedio que no es mayor que 100, usando celulasa para producir celooligosacáridos selectivamente.

10 El documento US20110020498 desvela un proceso para la preparación de oligosacáridos de (arabino) xilano a partir de salvado de trigo usando endoxilanasas. El proceso adicional incluye el desalmidonado, desproteinización seguida de hidrólisis enzimática con endoxilanasas de *Bacillus subtilis*. La purificación del oligosacárido de (arabino) xilano se realizó con cromatografía de intercambio iónico. Este proceso produjo oligosacáridos de (arabino) xilano con un grado de polimerización promedio de entre 4 y 10 con un grado promedio de sustitución de arabinosa de entre 0,15 y 0,35 y tiene buenas propiedades organolépticas y de color.

15 El documento US20100021975 describe un proceso para la producción de xilooligosacáridos mediante extracción cáustica en frío de la pulpa obtenida después del proceso de cocción. El proceso implica la extracción cáustica en frío de xilano seguida de un proceso de separación por membrana para obtener el retenido enriquecido con xilano. Esta fracción de xilano se procesa adicionalmente mediante hidro-termólisis e hidrólisis enzimática para la conversión del xilano en xilooligosacáridos.

20 El documento US20090062232 describe un método para la preparación de xilooligosacáridos de alta pureza a partir de material vegetal que comprende el tratamiento con álcali y el tratamiento con presión y calor del material vegetal seguido de separación sólido-líquido. El residuo sólido se sometió adicionalmente a hidrólisis enzimática usando xilanasas. El extracto de sacárido en bruto se concentró seguido de la desalinización y el tratamiento de con carbón activo para producir una composición de xilooligosacáridos de alta pureza sin sustancias absorbentes de UV ni impurezas colorantes.

25 El documento US20110244073 describe un método para la preparación de arabinoxilano y arabinoxilooligosacáridos. El proceso para la preparación de arabinoxilano hidrosoluble incluye el tratamiento con agua caliente de arabinoxilano no extraído con agua en presencia de amilasa termoestable, seguido de la adición de etanol a la concentración final de 70/30 (v/v) de etanol/agua después de enfriar a 70 °C.

30 El documento US5633032 describe un método para la preparación de extractos de cereales. En este proceso, el material de salvado de cereal obtenido de la molienda se sometió a un tratamiento con álcali a una temperatura de 70-80 °C seguido de una separación sólido-líquido. El residuo insoluble se trató nuevamente con peróxido de hidrógeno alcalino a 70-80 °C seguido de una separación sólido-líquido. Después, la fracción soluble se secó por pulverización y se usó como adhesivo y agente espesante.

35 El documento US20120231147 se refiere a la producción de xilooligosacáridos mediante auto-hidrólisis de productos de grano. En este proceso, la fibra de maíz separada de los destiladores y los granos secos con solubles (DDGS) se sometieron a auto-hidrólisis usando agua desionizada a una temperatura en el intervalo de 140-220 °C para proporcionar un extracto que contiene xilooligosacáridos, monosacáridos y ácido. Este extracto se hidrolizó adicionalmente usando ácido para formar monosacáridos.

40 El documento US20120232264 describe un proceso de dos etapas para el tratamiento de biomasa. La primera etapa del proceso implica el tratamiento de la biomasa con agua presurizada a una temperatura entre 100 y 200 °C para liberar hemicelulosa como xilooligosacáridos. En la segunda etapa, el residuo insoluble se trató nuevamente con agua presurizada a una temperatura de 200 a 300 °C para obtener celooligosacáridos. De este modo, los xilooligosacáridos y celooligosacáridos obtenidos se hidrolizaron adicionalmente usando un catalizador ácido sólido para generar xilosa y glucosa, respectivamente.

45 El documento US20120115192 proporciona un proceso de producción de azúcares fermentables a partir de biomasa usando un sistema multienzimático de múltiples etapas. En este proceso, la biomasa se trató en primer lugar con álcali al 5 % al 10 % a una temperatura que oscila entre 50 y 200 °C a una presión de 1 a 20 bar (1 a 2000 kPa) para la retirada de la hemicelulosa dejando atrás residuo de celulosa. Además, la hemicelulosa se precipitó mediante la adición de disolvente de etanol. De este modo, la hemicelulosa precipitada y la celulosa después se hidrolizaron enzimáticamente usando una preparación de xilanasas y celulasas para la producción de azúcares fermentables.

50 Los métodos descritos anteriormente producen xilooligosacáridos o celooligosacáridos a partir de biomasa usando métodos enzimáticos y químicos. Los métodos enzimáticos implican el tratamiento de la biomasa con enzimas modificadoras de la pared celular tales como la amilasa, la glucoamilasa, la proteasa, la pulunasa y la lipasa para la retirada del almidón y de componentes no hidratos de carbono. Posteriormente, el hidrato de carbono contenido en la biomasa se hidroliza usando xilanasas o celulasas para producir xilooligosacáridos o celooligosacáridos, respectivamente. El proceso de dos etapas descrito en la técnica anterior aumenta el coste global de producción ya

que requiere pretratamientos químicos para la extracción de polisacáridos, seguidos de su hidrólisis en oligosacáridos usando enzimas específicas.

5 F. Peng et al.: "*Fractional purification and bioconversion of hemicelluloses*", *BIOTECHNOLOGY ADVANCES*, vol. 30, n.º 4, 2012, páginas 879-903, analiza la purificación fraccionada y la bioconversión de hemicelulosas. Se mencionan el tratamiento de la hemicelulosa con agua, los tratamientos alcalino y enzimático y el aislamiento fraccionado y la purificación de hemicelulosas.

10 T. Boonwong et al.: "*Agricultural Wastes Potential (Pineapple Crown, Durian Peel and Sugarcane Leaves) on Reducing Sugar Production by Using Sulfuric Acid Pretreatment Following Enzymatic Hydrolysis*", *KKU RESEARCH JOURNAL, KHON KAEN UNIVERSITY*, vol. 19, n.º 3, 2014, páginas 361-370, enseña el tratamiento con ácido sulfúrico de desechos agrícolas seguido de hidrólisis enzimática.

15 L. RIOS DE SOUZA MOREIRA et al.: "*The hydrolysis of agro-industrial residues by holocellulose-degrading enzymes*", *BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY*, vol. 43, n.º 2, 2012, páginas 498-505, enseña el tratamiento de holocelulosa con agua seguido de un tratamiento enzimático.

20 El documento WO-A-/9103566 desvela un proceso para la hidrólisis de hemicelulosa en el que el material vegetal se somete a un tratamiento con agua seguido de acidificación y tratamiento enzimático. No se menciona el aislamiento de arabinoxiloligosacáridos y celooligosacáridos.

25 El documento WO-A-2013/101650 enseña un proceso de múltiples etapas para la hidrólisis de material lignocelulósico tal como desechos agrícolas que comprende un tratamiento con agua y un tratamiento enzimático con el fin de producir xilooligosacáridos. En una etapa adicional, estos oligosacáridos se convierten en glucosa.

Sumario de la invención

30 La presente invención se refiere a un proceso para el fraccionamiento de oligosacáridos, en el que el proceso comprende someter la holocelulosa, producida a partir de desechos agrícolas, con un medio acuoso a una temperatura que oscila entre 100 y 140 °C durante 20 a 40 minutos para obtener un extracto acuoso que comprende arabinoxilooligosacáridos solubles y una fracción sólida insoluble. La fracción sólida insoluble, recuperada del extracto acuoso, se mezcla posteriormente con una solución alcalina de concentración molar de entre 0,2 y 2,5 M, a una temperatura que oscila entre 100 y 150 °C en el reactor durante 20-40 minutos para obtener extracto de hemicelulosa. El extracto de hemicelulosa se filtra para obtener xilooligosacáridos como filtrado y celulosa como residuo. El residuo de celulosa se trata con una solución enzimática de pH 5,0 y una temperatura en el intervalo de 45 a 55 °C durante 2 horas, para hidrolizar la celulosa en celooligosacáridos. Un objeto de la presente invención es proporcionar un proceso para obtener arabinoxilooligosacáridos solubles, xilooligosacáridos solubles y celooligosacáridos solubles que tengan un grado de polimerización superior a 4.

40 La presente invención proporciona un proceso para el fraccionamiento de oligosacáridos a partir de desechos agrícolas en el que el proceso comprende el tratamiento de la holocelulosa, obtenida a partir de desechos agrícolas, con agua a una temperatura que oscila entre 100 y 140 °C durante 30 minutos, para obtener un extracto acuoso que contiene arabinoxilooligosacáridos.

45 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un proceso para la producción de xilooligosacáridos a partir de una fracción sólida insoluble en agua usando un proceso termoalcalino desprovisto de enzimas tales como arabinoxilanasas y xilanasas.

50 Uno de los objetivos de la presente invención es producir celooligosacáridos solubles que tengan un grado de polimerización superior a 4, mediante hidrólisis enzimática controlada del residuo de celulosa.

55 Por tanto, la presente invención proporciona un tratamiento por etapas de holocelulosa, obtenida a partir de desechos agrícolas, con agua, álcali y enzima para producir corrientes de productos separados que contengan arabinoxilooligosacáridos, xilooligosacáridos y celooligosacáridos solubles, respectivamente. La presente invención es rentable puesto que todas las extracciones químicas se realizan en condiciones más suaves. La invención preventiva también elimina el requisito de una etapa adicional para la purificación de oligosacáridos, ya que el proceso genera corrientes de productos separadas que contienen diferentes oligosacáridos.

Breve descripción de los dibujos

60 La invención se describirá adicionalmente con respecto a lo siguiente en la que:

65 La Figura 1 proporciona una representación esquemática de la producción de oligosacárido a partir de holocelulosa, preparada a partir de residuo agrícola. La holocelulosa se trata con agua a una temperatura entre 100 y 140 °C en el reactor 1 durante 20-40 minutos para formar un extracto acuoso. Después, el extracto acuoso se somete a separación sólido-líquido para producir una fracción soluble que contiene arabinoxilooligosacáridos

y una fracción sólida insoluble. La fracción sólida insoluble, obtenida a partir del reactor 1, se somete a una solución alcalina de concentración molar que oscila entre 0,2 y 2,5 M a una temperatura entre 100 y 150 °C en el reactor 2; seguido de una separación sólido-líquido para obtener la fracción 2 soluble, que contiene xilooligosacáridos y un residuo insoluble de naturaleza celulósica. El residuo de celulosa se somete a hidrólisis enzimática controlada, en agua acidificada de pH 5,0 y a una temperatura en el intervalo de 45-55 °C en el Reactor 3 durante 2 horas para la producción de celooligosacáridos.

Descripción detallada de la invención

Definiciones:

El término "holocelulosa" utilizado en el presente documento se refiere a la fracción de hidratos de carbono obtenida a partir del tratamiento previo con álcali de material lignocelulósico que incluye celulosa, un componente básico común hecho de azúcar (glucosa) que es el biopolímero más abundante, así como hemicelulosa.

La expresión "extracto acuoso" utilizada en el presente documento se refiere al extracto obtenido mediante un proceso de mezcla de la holocelulosa con un medio acuoso en condiciones controladas.

La expresión "fracción sólida insoluble" utilizada en el presente documento se refiere a la fracción obtenida mediante la filtración del extracto acuoso.

La expresión "extracto de hemicelulosa" utilizada en el presente documento se refiere al extracto obtenido mediante el proceso de extracción en el que la fracción sólida insoluble se trata con la solución alcalina.

La presente invención se refiere a un proceso de fraccionamiento para oligosacáridos a partir de desechos agrícolas. También proporciona tratamientos químico-enzimáticos por etapas de la holocelulosa, obtenida a partir de desechos agrícolas, para producir arabinoxilooligosacáridos, xilooligosacáridos y celooligosacáridos en corrientes de productos separados que pueden transformarse adicionalmente en productos de aplicabilidad comercial. El proceso descrito proporciona una alta eficiencia en términos de tiempo para la producción de oligosacáridos. Las condiciones de reacción suaves y la mejor utilización de las enzimas hacen que la presente invención sea económicamente más beneficiosa que los métodos descritos en la técnica anterior.

La presente invención proporciona un proceso para el fraccionamiento de oligosacáridos a partir de desechos agrícolas en condiciones controladas, tales como la temperatura, el pH, el tiempo de contacto y otros parámetros para conseguir un oligosacárido fraccionado por etapas.

Otro objeto de la invención es proporcionar un tratamiento por etapas de holocelulosa para proporcionar corrientes de productos separados que contengan arabinoxilooligosacáridos, xilooligosacáridos y celooligosacáridos solubles.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un proceso rentable que tenga condiciones más suaves sin la necesidad de procesos de purificación para obtener el producto deseado.

Otro objetivo más de la presente invención es proporcionar un proceso mucho más limpio y que consuma poca energía para la hidrólisis de hemicelulosa y celulosa, dando como resultado el fraccionamiento de oligosacáridos con mejor calidad y alto rendimiento.

De acuerdo con la presente invención, los arabinoxilooligosacáridos se obtienen a partir de holocelulosa usando un tratamiento con agua. En una realización de la presente invención, la relación sólido-líquido de la holocelulosa con el agua está en la relación de 1:10 (p/v) para formar la suspensión. Posteriormente, la suspensión se somete a hidrólisis en condiciones controladas.

En la presente invención, la hidrólisis de holocelulosa se realiza a una temperatura en el intervalo de 100-140 °C durante 20-40 minutos, preferentemente 30 minutos para obtener un extracto acuoso. La separación sólido-líquido se realiza para recuperar la fracción soluble que contiene arabinoxilooligosacáridos del extracto acuoso dejando atrás la fracción sólida.

De acuerdo con la presente invención, la etapa del proceso para el aislamiento de xilooligosacáridos comprende un tratamiento termoalcalino de la fracción sólida, obtenida a partir del tratamiento con agua, seguido de una separación sólido-líquido para producir un extracto de hemicelulosa que contiene xilooligosacáridos.

El proceso para obtener extracto de hemicelulosa comprende tratar/mezclar la fracción sólida, obtenida después de la separación sólido-líquido del extracto acuoso obtenido en la etapa anterior, con una solución alcalina, que tiene una concentración de entre 0,2 y 2,5 M a una temperatura que oscila entre 100-150 °C en el reactor durante 20-40 minutos, preferentemente durante 30 minutos.

En una realización de la presente invención, el álcali se selecciona entre el grupo que consiste en NaOH, KOH, H₂O₂ y LiOH.

5 De acuerdo con la presente invención, el proceso para el fraccionamiento de oligosacáridos a partir de desechos agrícolas comprende la separación de la celulosa insoluble del extracto hemicelulósico soluble por filtración. A continuación, el residuo de celulosa insoluble se suspende en agua y el pH de la suspensión se ajusta a 4,5-5,5 usando ácido.

10 En otra realización de invención, el pH ácido de la suspensión de celulosa se ajusta mediante el uso de ácido, en el que dicho ácido se selecciona entre un grupo que consiste en H₂SO₄, HNO₃, HCl y CH₃COOH.

La hidrólisis de la celulosa, obtenida después del tratamiento termoalcalino de la fracción sólida insoluble, se realiza usando una enzima en condiciones controladas de una temperatura en el intervalo de 45-55 °C durante 2 horas.

15 En una realización de la presente invención, la enzima utilizada para la hidrólisis de celulosa se selecciona entre un grupo que consiste en endo-glucanasas, endo-xilanasas, mananasas y galactanasas, preferentemente endo-glucanasas.

20 En otra realización más de la presente invención, las endo-glucanasas se usan en el proceso a una concentración que oscila entre 10-100 UPF/g de celulosa, preferentemente 40.

25 La hidrólisis enzimática de la celulosa se realiza a una temperatura en el intervalo de 45-55 °C y a un pH en el intervalo de 4,5-5,5 durante 2 horas seguida de filtración, para la conversión de celulosa en celooligosacáridos. El residuo de celulosa se seca a una temperatura en el intervalo de 40-60 °C.

30 La presente invención permite que los oligosacáridos se aislen en forma sustancialmente pura a partir de otros componentes de la biomasa. Otra ventaja de la presente invención es que puede utilizarse para producir polisacáridos macromoleculares con distribuciones de peso molecular bien definidas y características conocidas, tales como solubilidad alcalina o en agua. El oligosacárido producido mediante el proceso de la presente invención puede utilizarse como componentes de alimentos, piensos, productos farmacéuticos o polímeros. El uso de un método termoquímico suave para el aislamiento de arabinoxilanos garantiza que los restos de tamaños moleculares superiores se aislen intactos de los materiales de desechos agrícolas. La presente invención permite la producción de arabinoxilooligosacáridos solubles, xilooligosacáridos solubles y celooligosacáridos solubles con un grado de polimerización superior a 4. Los costes operativos del proceso también son bajos, ya que no se requieren preparaciones de enzimas puras (arabinoxilanasas, endoxilanasas) para la producción de arabinoxilooligosacáridos y xilooligosacáridos. El esquema de producción actual garantiza una recuperación de múltiples productos a partir de la holocelulosa y, por tanto, aumenta el valor económico global de los desechos agrícolas. Una combinación de métodos destinados a valorar productos fenólicos y los otros componentes de los desechos agrícolas puede tener un gran valor comercial para la industria de procesamiento agrícola.

40 Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración de la presente invención y no tienen por objeto limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplos

45 (1) Preparación de arabinoxilooligosacáridos

50 Se pesaron 100 g de holocelulosa, obtenida de desechos agrícolas, y se mezclaron con agua en una relación 1:10. La suspensión se cargó en el reactor y la hidrólisis se realizó a una temperatura de 120°C durante 30 minutos. El extracto acuoso se sometió después a separación sólido-líquido usando una malla de nylon para obtener un filtrado de arabinoxilooligosacáridos y una fracción sólida insoluble. El filtrado se sometió adicionalmente a precipitación con disolvente para obtener arabinoxilooligosacáridos puros. La fracción sólida insoluble se secó a 50 °C. Peso de la fracción sólida insoluble: 53 g, peso de arabinoxilooligosacáridos: 40 g.

55 Tabla 1: Efecto del tiempo sobre la extracción de arabinoxilooligosacáridos con una relación de sólido a líquido de 1:25

Tiempo (min)	Extracción de arabinoxilooligosacárido (% p/p de arabinoxilano en holocelulosa)
20	45,31
30	65,44
45	60,41

Tabla 2: Efecto de la temperatura sobre la extracción de arabinoxilooligosacáridos con una relación de sólido a líquido de 1:10

Temperatura (°C)	Extracción de arabinoxilooligosacáridos (% p/p de arabinoxilano en holocelulosa)
100	82
120	84
140	81

5 (2) Preparación de xilooligosacáridos

Se trataron 50 g de fracción sólida insoluble con solución de hidróxido de sodio, 0,5 M, en una relación de 1:10 a 120 °C durante 30 minutos para obtener un extracto de hemicelulosa. El extracto hemicelulósico se filtró después a través de una tela de nylon para separar los xilooligosacáridos y el residuo de celulosa insoluble. Los xilooligosacáridos puros se recuperaron mediante precipitación con disolvente. Peso de los xilooligosacáridos: 18 g; Peso del residuo: 25 g.

Tabla 3: Efecto de la concentración de álcali sobre la extracción de xilooligosacáridos con una relación de sólido a líquido de 1:10

Concentración de álcali, (M)	Extracción de xilooligosacáridos (% p/p de xilano en la fracción sólida insoluble)
0,25	60
0,5	78
1,25	75
2,5	76

15

Tabla 4: Efecto de la temperatura sobre la extracción de xilooligosacáridos con una relación de sólido a líquido de 1:10

Temperatura, (°C)	Extracción de xilooligosacáridos (% p/p de xilano en la fracción sólida insoluble)
80	42
100	62
120	77
150	45

Tabla 5: Efecto del tiempo sobre la extracción de xilooligosacáridos con una relación de sólido a líquido de 1:10

Tiempo (min)	Extracción de xilooligosacáridos (% p/p de xilano en la fracción sólida insoluble)
20	58
30	80
40	82

20

(3) Preparación de celooligosacáridos

Se mezclaron 10 g de residuo de celulosa insoluble con agua en una relación 1:10 para preparar la suspensión de celulosa y el pH de la suspensión se ajustó a pH 4,8 mediante la adición de HCl. Se solubilizó celulosa, 40 UPF/g de celulosa, en agua acidificada y después se añadió a la suspensión de celulosa. La hidrólisis enzimática se realizó a 50 °C durante 2 horas. El hidrolizado enzimático que contenía celooligosacáridos se separó después por filtración. Peso de celooligosacáridos: 2,6 g

25

Tabla 6: Efecto de la concentración de enzima sobre la extracción de celooligosacáridos

Actividad enzimática, UPF/g de celulosa	Extracción de celooligosacárido (DP>4) (% p/p de hidratos de carbono en celulosa)
10	23
20	28
40	32
100	25

30

REIVINDICACIONES

1. Un proceso secuencial para el fraccionamiento de diferentes oligosacáridos a partir de holocelulosa, que comprende:
- 5
- a) mezclar holocelulosa con un medio acuoso a una temperatura que varía de 100 a 140 °C durante 20 a 40 min, preferentemente durante 30 min, para obtener un extracto acuoso que contiene arabinoxilooligosacáridos solubles y una fracción sólida insoluble;
 - 10 b) tratar la fracción sólida obtenida a partir de la etapa (a) con una solución alcalina acuosa, a una temperatura en el intervalo de 100 a 150 °C durante 20 a 40 min, preferentemente durante 30 min, para obtener un extracto de hemicelulosa que comprende xilooligosacáridos solubles y un residuo de celulosa;
 - c) suspender el residuo de celulosa obtenido a partir de la etapa (b) en solución acuosa de ácido para obtener una suspensión de celulosa; y
 - 15 d) tratar la suspensión de celulosa obtenida a partir de la etapa (c) con una enzima a una temperatura controlada en el intervalo de 45 a 55 °C durante el período de 2 horas para obtener extracto de celulosa que contiene celooligosacáridos solubles.
2. El proceso como se reivindica en la reivindicación 1, en el que dicha holocelulosa es obtenible a partir de desechos agrícolas que comprenden cáscara, salvado, vainas, cascarilla, mazorcas y torta de semillas oleaginosas.
- 20
3. El proceso como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la holocelulosa se mezcla con el medio acuoso en una relación de 1:10 (p/v) a 120 °C.
4. El proceso como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la fracción sólida de la etapa (a) se trata con solución alcalina a 120 °C.
- 25
5. El proceso como se reivindica en la reivindicación 1 y la reivindicación 3, en el que dicha solución alcalina tiene una concentración en el intervalo de 0,2 M-2,5 M, mucho más preferentemente 0,5 M.
- 30
6. El proceso como se reivindica en la reivindicación 1, en el que la relación de celulosa a agua para preparar la suspensión de celulosa es de 1:10 (p/v).
7. El proceso como se reivindica en la reivindicación 1, en el que dicha enzima se selecciona entre el grupo que consiste en endo-glucanasas, endo-xilanasas, mananasas y galactanasas, más preferentemente endo-glucanasa.
- 35
8. El proceso como se reivindica en la reivindicación 7, en el que dicha endo-glucanasa utilizada en el proceso tiene una concentración en el intervalo de 10 a 100 UPF/g de celulosa, mucho más preferentemente 40 UPF/g de celulosa.
- 40
9. El proceso como se reivindica en la reivindicación 1, en el que los arabinoxilooligosacáridos solubles, los xilooligosacáridos solubles y los celooligosacáridos solubles obtenibles mediante el proceso tienen un grado de polimerización superior a 4.

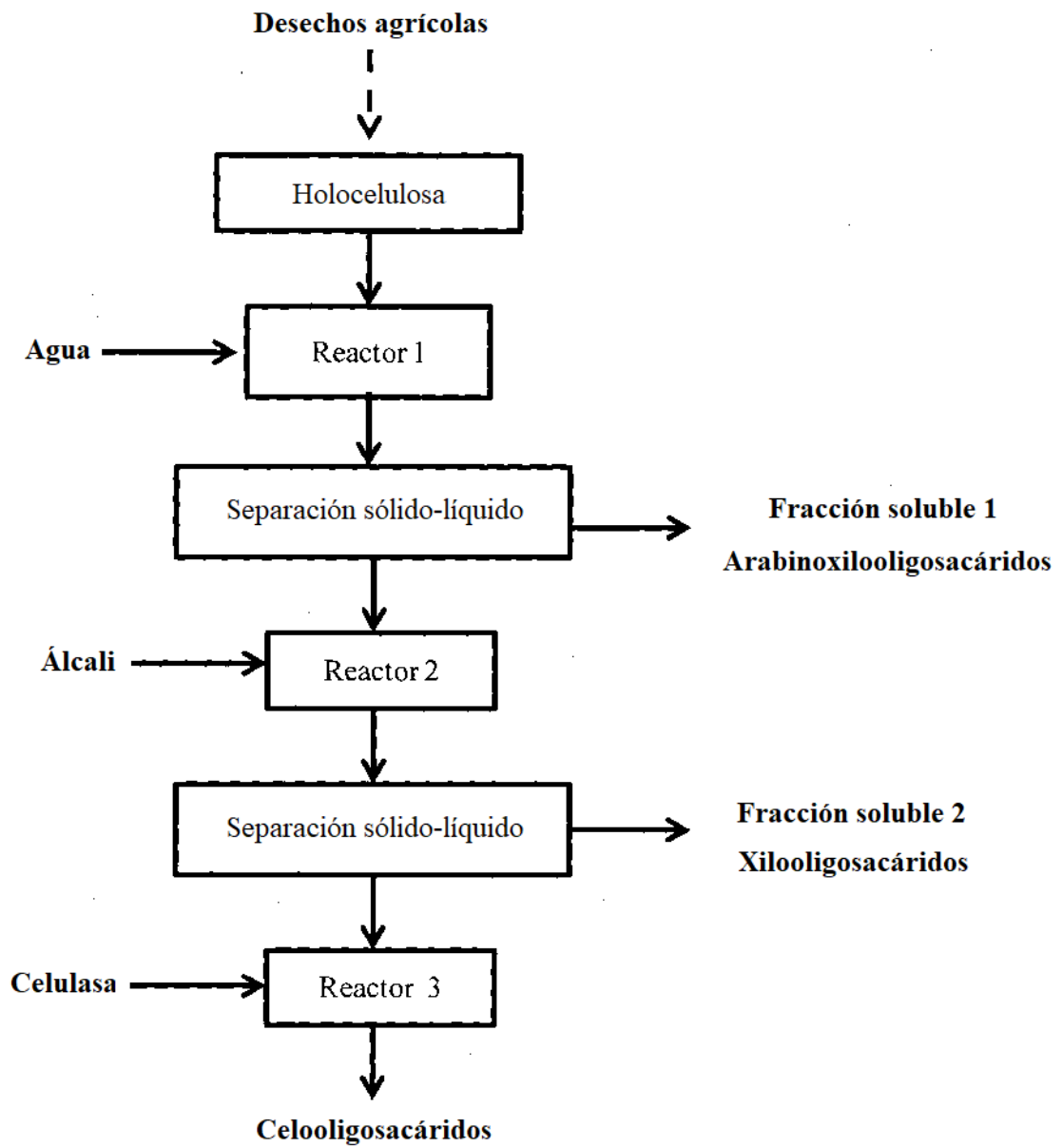


FIGURA 1