

CARACTERIZACIÓN DE XILO-OLIGOSACÁRIDOS

Caracterización de Xilo-oligosacáridos (XOS), extraídos de café pergamino y bagazo de caña de azúcar, mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y ESI-IT

Javier Andrés Ardila Delgado

Trabajo de Grado para Optar por el título de químico

Directora:

Marianny Yajaira Combariza Montañez

Ph. D. en Química Analítica Ambiental

Co-director:

Jeferson Augusto Valencia Dávila

Ph. D. en Química

Universidad Industrial de Santander

Facultad de ciencias

Escuela de Química

Bucaramanga

2019

Dedicatoria

A mis padres Luz Elena y Hermes, quienes con esfuerzo y amor me apoyaron durante este proceso de aprendizaje. A mis hermanos Rubén y Juan Pablo por su compañía durante todos estos años.

Agradecimientos

Al Grupo de Investigación en Fisicoquímica Teórica y Experimental (GIFTEX) quienes me acogieron y gracias a la guía de la Dr. Marianny Yajaira Combariza fue posible dar por culminado este proyecto.

A mis tutores Jeferson Valencia, Sebastian Ramírez y Luis Miguel Díaz, quienes con su conocimiento y consejos forjaron las bases que le dieron forma a cada escalón de este proceso.

A mi compañero de trabajo Cristian Martínez, por su amistad y apoyo hasta el último día de este proyecto.

Por último, a la persona que me ha apoyado de forma incondicional y ha cambiado la forma en que veo la vida, Fernanda Rozo Rincón.

Tabla de Contenido

Introducción	16
1. Objetivos	19
1.1. Objetivo general	19
1.2. Objetivos específicos	19
2. Marco teórico	20
2.1. Microbiota intestinal	20
2.2. Probióticos y prebióticos.....	21
2.3. Oligosacáridos.....	22
2.3.1. Prebióticos convencionales	23
2.4. Biomasa y xilo-oligosacáridos.....	23
2.5. Obtención de xilo-oligosacáridos	25
2.5.1. Métodos químicos.....	25
2.5.2. Métodos enzimáticos.	26
2.5.3. Autohidrólisis.....	26
2.6. Caracterización de XOS.....	27
2.6.1. Ionización por electronebulización (ESI).	28
2.6.2. Ionización por desorción láser asistida por una matriz (MALDI).	28
2.6.3. Nomenclatura para el análisis de carbohidratos en MS.....	29

CARACTERIZACIÓN DE XILO-OLIGOSACÁRIDOS	7
2.7. Antecedentes	31
3. Metodología	32
3.1. Muestras.....	33
3.2. ETAPA I: Purificación y fraccionamiento de xilo-oligosacáridos (XOS).....	34
3.3. ETAPA II: Caracterización de xilo-oligosacáridos por espectrometría de masas	35
3.3.1. Preparación de la muestra.	35
3.3.1.1. MALDI-TOF/MS.....	35
3.3.1.2. ESI-IT/MS.....	35
3.4. ETAPA III: Derivatización de xilo-oligosacáridos.....	36
4. Análisis de resultados	38
4.1. Purificación y fraccionamiento de los xilo-oligosacáridos	38
4.2. Caracterización química por MALDI- TOF/MS de las muestras no derivatizadas.....	39
4.2.1. Caracterización por MALDI- TOF/MS de un estándar de xilano.	39
4.2.2. Caracterización por MALDI- TOF/MS del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar.....	42
4.2.3. Caracterización por MALDI- TOF/MS del hidrolizado de pergamino de café.....	46
4.2.4. Caracterización por MALDI- TOF/MS de la muestra de pergamino de café purificada. ..	50
4.2.4.1. Fragmentación de xilo-oligosacáridos con estructura Xyl_n	52
4.3. Caracterización química por ESI-IT/MS de las muestras no derivatizadas.....	54
4.3.1. Caracterización por ESI-IT/MS de la muestra de pergamino de café purificada.	55
4.3.2. Fragmentación de xilo-oligosacáridos con estructura Xyl_nAc_n	58

4.4. Derivatización de Xilo- oligosacáridos.....	63
4.4.1. Caracterización por MALDI-TOF/MS de la muestra de pergamino de café purificada (per-O-metilación).	63
4.4.2. Caracterización por ESI-IT/MS de la muestra de pergamino de café purificada (per-O-metilación).	65
5. Conclusiones	70
Referencias Bibliográficas	72

Lista de Tablas

Tabla 1. Estructuras identificadas como aductos de sodio en la muestra de bagazo de caña de azúcar (licor crudo) por espectrometría de masas MALDI-TOF	44
Tabla 2. Estructuras identificadas como aductos de sodio en la muestra de pergamino de café (licor crudo) por espectrometría de masas MALDI-TOF.....	48
Tabla 3. Estructuras identificadas como aductos de sodio en la muestra de café pergamino purificado, por espectrometría de masas MALDI-TOF.....	51
Tabla 4. Estructuras identificadas como aductos de amonio, por espectrometría de masas ESI-IT, del café pergamino purificado.	57
Tabla 5. Estructuras atribuidas a los aductos de sodio del café pergamino purificado (metilación)	65
Tabla 6. Estructuras atribuidas a los aductos de NH_4^+ del café pergamino purificado(metilación)	68

Lista de Figuras

Figura 1. Estructura esquemática del xilano	25
Figura 2. Tipos de fragmentación de oligosacáridos	30
Figura 3. Tubo para ultrafiltración <i>Microsep Advance</i> de <i>Pall Laboratory</i>	34
Figura 4. Esquema de la reacción de per-O-metilación de xilo- oligosacáridos	37
Figura 5. Comparación de espectros MALDI del bagazo de caña, a) usando cartuchos de corte molecular <3000 Da y b) sin realizar fraccionamiento con cartuchos de corte molecular	38
Figura 6. Espectro de masas MALDI de un estándar comercial de xilano, modo de ionización positivo, a) <i>full scan</i> y b) <i>zoom</i> región del espectro entre m/z 250-800.....	41
Figura 7. Espectro de masas MALDI del hidrolizado del bagazo de caña de azúcar, modo de ionización positivo, a) <i>full scan</i> y b) <i>zoom</i> m/z 700-1100.....	43
Figura 8. Estructura química posible del ion $Xyl_3Ac_2MeGlcA$, observado en el espectro de masas del bagazo de caña (hidrolizado) como un aducto de sodio en m/z 711	45
Figura 9. Espectro de masas MALDI del hidrolizado del pergamino de café (licor crudo), modo de ionización positivo, a) <i>full scan</i> y b) <i>zoom</i> en la región entre m/z 700-1100.....	47
Figura 10. Estructura química posible del ion $Xyl_3Ac_2MeGlcA$, observado en el espectro de masas del pergamino de café (hidrolizado) como un aducto de sodio en m/z 711	49
Figura 11. Espectro de masas MALDI-TOF, <i>full scan</i> , de la muestra purificada de pergamino de café, modo de ionización positivo	50

Figura 12. Espectro de masas MALDI-MS/MS de los iones $[M+Na]^+$ del pergamino de café. (a) Xyl_3 (m/z 437), (b) Xyl_4 (m/z 569).....	53
Figura 13. Espectro de masas ESI de la muestra de pergamino de café purificada, modo de ionización positivo, a) <i>full scan</i> y b) <i>zoom</i> de m/z 700-1100.....	56
Figura 14. Espectro de masas ESI-MS/MS del ion $[M+NH_4]^+$ Xyl_4Ac_1 (m/z 606).....	59
Figura 15. Vías de fragmentación posibles para los isómeros del ion m/z 606	60
Figura 16. Espectro de masas ESI-MS/MS del ion $[M+NH_4]^+$ Xyl_5Ac_2 (m/z 780).....	61
Figura 17. Vías de fragmentación posibles para los isómeros del ion en m/z 780	62
Figura 18. Espectro de masas MALDI de la muestra de pergamino de café ultra purificada derivatizada (per-O-metilación), modo de ionización positivo, a) <i>full scan</i> y b) <i>zoom</i> m/z 700-1100	64
Figura 19. Espectro de masas ESI de la muestra de pergamino de café ultra purificada derivatizada (per-O-metilación), modo de ionización positivo, a) <i>full scan</i> y b) <i>zoom</i> m/z 700-1100.....	67
Figura 20. Esquema de la per-O-metilación del ion $[M + Na]^+$ 479.15 correspondiente a la estructura Xyl_3Ac_1	69

Lista de Símbolos y Abreviaturas

Ac	Acetilo
ACN	Acetonitrilo
AGV	Ácidos grasos de cadena corta o ácidos grasos volátiles
<i>ca.</i>	<i>Circa</i> (Aproximadamente)
CID	Disociación inducida por colisión
DHB	Ácido 2,5-dihidroxibenzoico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Grado de polimerización
<i>e.g</i>	<i>Exempli Gratia</i> (Por ejemplo)
ESI	<i>Electrospray Ionization</i> (Ionización por electronebulización)
FOS	Fructo-oligosacáridos
GlcA	Ácido glucurónico
GOS	Galacto-oligosacáridos
Hex	Hexosa
HMF	Hidroximetilfurfural
<i>i.e.</i>	<i>Id Est</i> (Es decir)
IMO	Isomalto-oligosacáridos
INTERFASE	Grupo de Investigación en Tecnologías de valorización de Residuos y Fuentes Agrícolas e industriales para la Sustentabilidad Energética
IT	<i>Ion-Trap</i> (Trampa de iones)
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i> (ionización por desorción láser asistida por una matriz)
MeGlcA	Ácido 4-O-metilglucurónico
MO	Malto-oligosacáridos
MS	Espectrometría de masas

MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
Nd-YAG	Neodymium-doped yttrium aluminium garnet (granate de itrio y aluminio dopado con impurezas de neodimio)
Ram	Ramnosa
RMN	Resonancia magnética nuclear
TFA	Ácido trifluoroacético
TOF	<i>Time-of-Flight</i> (Tiempo de vuelo)
XOS	Xilo-oligosacáridos
Xyl	Xilosa

Resumen

TÍTULO: CARACTERIZACIÓN DE XILO-OLIGOSACÁRIDOS (XOS), EXTRAÍDOS DE CAFÉ PERGAMINO Y BAGAZO DE CAÑA DE AZÚCAR, MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF Y ESI-IT*

AUTOR: JAVIER ANDRÉS ARDILA DELGADO**

PALABRAS CLAVES: XILO-OLIGOSACÁRIDOS, ESPECTROMETRÍA DE MASAS, PREBIÓTICOS, MALDI-TOF y ESI-IT.

DESCRIPCIÓN:

El interés actual de la industria por ofrecer “alimentos funcionales” ha impulsado la búsqueda de nuevos alimentos, que además de satisfacer las necesidades nutricionales aporten un beneficio extra a la salud. En Colombia la producción de café y azúcar generan gran cantidad de biomasa residual rica en hemicelulosa que contiene en su estructura el biopolímero xilano, la cual al ser tratada mediante autohidrólisis se obtiene oligosacáridos de xilosa que presentan actividad como prebióticos alimenticios. Las principales ventajas del consumo de xilo-oligosacáridos son favorecer el intestino, mejorar el sistema inmune y reducir enfermedades. El reto actual con estos compuestos es el de caracterizar su estructura, por tanto, se utilizó la espectrometría de masas como herramienta para obtener información relacionada con el grado de polimerización, tipo y número de sustituyentes en las diferentes familias de xilo-oligosacáridos. Para las muestras hidrolizadas de bagazo de caña y pergamino de café se identificó diferentes familias de oligómeros, conformadas principalmente por una cadena de unidades de xilosa (Xyl) donde se unen grupos laterales como el ácido metilglucorónico (MeGlcA) y hasta cuatro grupos acetilo (XylAc₀₋₄MeGlcA). Para la muestra de pergamino de café purificada apta para consumo se logró identificar oligosacáridos de xilosa acetilados, con un grado de polimerización DP=3-19. Los XOS obtenidos mediante autohidrólisis fueron per-O-metilación con el fin de confirmar las especies propuestas.

* Trabajo de grado

** Facultad de Ciencias, Escuela de Química. Directora: Marianny Yajaira Combariza Montañez, Ph. D. en Química Analítica Ambiental. Co-director: Jeferson Augusto Valencia Dávila, Ph.D. en Química

Abstract

TITLE: CHARACTERIZATION OF XYLO-OLIGOSACCHARIDES, EXTRACTED FROM PARCHMENT COFFEE AND BAGASSE FROM SUGARCANE, BY MALDI-TOF AND ESI-IT MASS SPECTROMETRY.*

AUTHOR: JAVIER ANDRÉS ARDILA DELGADO**

KEYWORDS: XYLO-OLIGOSACCHARIDES, MASS SPECTROMETRY, PREBIOTICS, MALDI-TOF and ESI-IT.

DESCRIPTION:

The current interest of the industry to offer "functional foods" has boosted the search for new foods, in addition to satisfying nutritional needs provide an extra benefit to health. In Colombia, the production of coffee and sugar generates a large amount of residual biomass rich in hemicellulose that contains xylan biopolymer in your structure, that treated by autohydrol obtains xylose oligosaccharides that have activity as food prebiotics. The main advantages of the consumption of xylo-oligosaccharides are favor the intestine, improve the immune system and reduce diseases. The current challenge with these compounds is to characterize their structure, therefore, mass spectrometry was used as a tool to obtain information related to the degree of polymerization, type and number of substituents in the different families of xyl-oligosaccharides. For the hydrolyzed samples of sugar cane bagasse and parchment coffee, different families of oligomers were identified, consisting mainly of a chain of xylose units (Xyl) where side groups such as methylglucuronic acid (MeGlcA) and up to four acetyl groups (XylAc₀₋₄MeGlcA). For the purified parchment coffee sample suitable for consumption, acetylated xylose oligosaccharides were identified, with a degree of polymerization DP = 3-19. The XOS obtained by autohydrolysis were per-O-methylation in order to confirm the proposed species.

* Bachelor Thesis

** Faculty of Sciences, school of Chemistry. Director: Marianny Yajaira Combariza Montañez, Ph.D. in Environmental Analytical Chemistry. Co-director: Jeferson Augusto Valencia Dávila, Ph.D. in chemistry

Introducción

El creciente interés de la industria de alimentos por proporcionar productos que aparte de satisfacer las necesidades nutricionales aporten un beneficio extra a la salud, ha impulsado la búsqueda de nuevas fuentes de compuestos nutraceuticos. La industria agrícola genera un volumen creciente de desechos sólidos que en muchos casos se convierten en problemas medioambientales, de los cuales se pueden obtener sustancias útiles para la generación de productos de valor agregado para usos alimenticios. La biomasa lignocelulósica está compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina (Jain, Kumar, & Satyanarayana, 2015), entre estas la hemicelulosa es rica en el polímero xilano del cual se pueden obtener xilo-oligosacáridos (XOS), carbohidratos de cadena corta, que pueden ser beneficiosos para la salud. Las principales ventajas del consumo de XOS son la estimulación selectiva del crecimiento de la microbiota intestinal beneficiosa, la reducción de la glucosa y el colesterol en sangre, la reducción de las enzimas procarcinógenas en el tracto gastrointestinal, la mayor absorción de minerales del intestino grueso y la inmunoestimulación (Samanta et al., 2015).

Los principales mercados de alimentos y suplementos alimenticios se encuentran en países del primer mundo como Estados Unidos, Europa y Japón, con un porcentaje de ventas de 33.6, 28.2 y 20.9% respectivamente (Granato, Branco, Cruz, Faria, & Shah, 2010). En países como Canadá, la evolución del mercado de suplementos alimenticios es lenta a causa de diferentes procesos regulatorios, mientras que en China, India y América Latina el mercado es creciente pero limitado por factores como el subdesarrollo y los bajos ingresos (Granato et al., 2010). En Colombia, la industria cafetera y azucarera constituyen pilares destacados de la economía. La producción de café registrada en agosto del 2018 fue de 1.258.000 millones de sacos de 60 kg de

café verde cada uno (Federación Nacional de Cafeteros, 2018); y para junio de 2018 se produjeron 193,300 toneladas de azúcar (Asocaña, 2018).

El consumo regular de carbohidratos no digeribles, como los xilo-oligosacáridos (XOS) tiene efectos favorables en la salud humana. En general, estos efectos están relacionados con una prevención o disminución de enfermedades metabólicas (Qiang, YongLie, & QianBing, 2009). Los XOS, presentan características específicas que benefician la salud de sus consumidores, actúan como prebióticos *i.e.*, estimulan selectivamente el crecimiento o la activación de ciertas bacterias presentes en el colon (*Lactobacilos* y *Bifidobacterias*), favoreciendo el control de enfermedades crónicas como la obesidad y la diabetes, por lo que son carbohidratos de gran interés en la industria alimenticia (Gibson & Roberfroid, 1995). Los XOS son mezclas de oligosacáridos formadas por unidades de xilosa unidas a través de enlaces β -(1→4) glucosídicos, que pueden presentar ramificaciones secundarias como grupos acetilo, ácido urónico y ácido fenólico (Aachary & Prapulla, 2011). Dependiendo de la fuente de donde se obtienen y de su proceso de extracción, la composición y estructura de los XOS puede variar. Generalmente, los xilo-oligosacáridos se extraen de residuos agrícolas como mazorca de maíz, almendras, olivo, cáscara de arroz, trigo y paja de cebada, por procesos hidrolíticos en medio ácido o básico y por procesos catalizados por enzimas (Nabarlatz, Ebringerová, & Montané, 2007). Debido a la importancia emergente de los XOS en la industria de alimentos, estudios relacionados con la cinética de su producción, así como su caracterización molecular van en aumento (Matamoros Fernández, Obel, Scheller, & Roepstorff, 2003; Ana Reis, Rosa, Domingues, Domingues, & Coimbra, 2003).

La caracterización estructural de estos oligómeros es de fundamental importancia, pero también es un proceso complejo desde el punto de vista analítico. Los avances en las técnicas de ionización suave en espectrometría de masas proporcionan una herramienta eficaz para la caracterización

molecular de biomoléculas como los XOS (Zaia, 2004). Por medio de la ionización por electronebulización (ESI) y la ionización por desorción láser asistida por una matriz (MALDI) se caracterizaron los xilo-oligosacáridos producidos mediante autohidrólisis ácida del bagazo de caña de azúcar y del pergamino de café, fraccionados mediante ultrafiltración.

Una vez finalizada la hidrólisis, se identificó diferentes familias de oligómeros, conformadas principalmente por una cadena de unidades de xilosa (Xyl) donde se unen grupos laterales como el ácido metilglucorónico (MeGlcA) y hasta cuatro grupos acetilo (XylAc₀₋₄MeGlcA). Los espectros de masas MALDI-TOF y ESI-IT, en modo de ionización positivo, se componen de aductos de sodio monocargados $[M+Na]^+$ en un rango de m/z 300-3100 y aductos de amonio $[M+NH_4]^+$ en un rango de m/z 300-1800, respectivamente. Para la muestra de interés, pergamino de café purificado, se logró identificar familias de xilo- oligosacáridos en el rango de m/z 400-2900, compuestos por una cadena principal de unidades de xilosa (diferencia de 132 Da) con un grado de polimerización de DP = 3-19 y presencia de grupos acetilo (diferencias de 42 Da). Además, se logró observar especies con hasta diez acetilos como grupos laterales en sus estructuras. Los XOS se sometieron a una per-O-metilación con el fin de confirmar las especies propuestas.

1. Objetivos

1.1. Objetivo general

Caracterizar xilo-oligosacáridos (XOS) extraídos del pergamino de café y bagazo de caña de azúcar mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y ESI-IT.

1.2. Objetivos específicos

Implementar metodologías de purificación/fraccionamiento de xilo-oligosacáridos que permitan su análisis por espectrometría de masas.

Desarrollar métodos de análisis basados en espectrometría de masas MALDI y ESI en modo ion positivo para el estudio de xilo-oligosacáridos.

Implementar métodos de derivatización de xilo-oligosacáridos y estudiar los productos de reacción mediante espectrometría de masas tándem (MS/MS).

2. Marco teórico

2.1. Microbiota intestinal

La microbiota intestinal es un conjunto de microorganismos, en su mayoría bacterias, localizados de manera natural en el tracto intestinal de los seres vivos pluricelulares en relación simbiótica con ellos (OKAZAKI, FUJIKAWA, & MATSUMOTO, 1990). Estos microorganismos son taxonómicamente complejos y forman una comunidad dinámica la cual en algún momento se consideró perjudicial. Sin embargo, investigaciones actuales demuestran que estas comunidades desempeñan un papel fundamental en la salud humana. Estos microorganismos, están involucrados en la proliferación de las células intestinales humanas, ayudan a mantener la homeostasis y previenen gran número de enfermedades, como la inflamación intestinal y la obesidad (Hattori & Taylor, 2009). Se estima que la microbiota está compuesta por *ca.* 10^{12} células bacterianas por gramo de heces, en un individuo humano promedio (Hattori & Taylor, 2009).

El tracto intestinal inferior está formado por el intestino delgado, el intestino grueso y el ano. En el intestino grueso las condiciones son más favorables para el crecimiento bacteriano, por lo que el número de bacterias (particularmente anaerobias) es mayor en esta zona debido a la baja concentración de oxígeno y a la alta cantidad de nutrientes disponibles. En el intestino delgado, el tránsito de alimentos es más rápido y en consecuencia la cantidad de bacterias es menor (Iannitti & Palmieri, 2010).

La actividad de estos organismos tiene un gran impacto en la nutrición y en la salud del huésped a través del suministro de nutrientes, la conversión de metabolitos y las interacciones con las células. La acción colectiva de la microbiota intestinal contribuye al equilibrio energético, la

nutrición, regulación del sistema inmune y el fortalecimiento contra patógenos del hospedero. Es decir, la microbiota intestinal ejerce un "efecto barrera" que defiende al huésped de la colonización por patógenos oportunistas (Candela, Maccaferri, Turrone, Carnevali, & Brigidi, 2010).

Las comunidades microbianas del intestino grueso obtienen su energía de componentes de la dieta que no se metabolizan en el tracto intestinal superior, produciendo ácidos grasos de cadena corta (AGV), CO₂, H₂ y CH₄. Las cantidades y los tipos de carbohidratos no digeribles en la dieta humana influyen tanto en los productos metabólicos como en las poblaciones bacterianas detectadas en las heces humanas. Los carbohidratos no digeribles, como la inulina y los fructo-oligosacáridos (FOS), son usados ampliamente como prebióticos para estimular la microbiota intestinal. Las bifidobacterias, son beneficiosas para la salud, debido a sus potenciales interacciones con el sistema inmune y con patógenos, por lo que son consideradas como los probióticos de mayor interés (Flint, Duncan, Scott, & Louis, 2007).

2.2. Probióticos y prebióticos

Los probióticos se definen como microorganismos vivos (bacterias) que se adicionan a los productos alimenticios, los cuales, tras un consumo regular en la dieta, pueden llegar a generar beneficios en la salud del consumidor. Los probióticos más utilizados actualmente en la industria alimenticia son taxonómicamente similares a los que se encuentran naturalmente en el tracto intestinal, como las bacterias del género *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y levaduras. Estos microorganismos poseen ciertas características funcionales como: 1) resistencia al pH ácido del tracto gastrointestinal; 2) capacidad de adhesión a las células epiteliales intestinales; 3) simbiosis;

4) no patogenicidad; 5) adaptabilidad nutricional y 6) rápida curva de crecimiento (Tomasik & Tomasik, 2003).

Sin embargo, algunos microorganismos no presentan todas las características funcionales anteriores lo que resulta en una limitada colonización del intestino grueso. Por esta razón, una alternativa para promover el crecimiento de estos microorganismos son los alimentos funcionales conocidos como prebióticos, los cuales aparte de su valor nutritivo, constituyen una fuente de energía para las bacterias de la microbiota intestinal, estimulando su crecimiento y mejorando la salud y el bienestar de los consumidores. Entre los prebióticos comúnmente utilizados se encuentran las pectinas, la goma de avena, el almidón, la polidextrosa y los oligosacáridos; algunos polialcoholes como el lactitol, el manitol, el sorbitol y el xilitol también son utilizados como prebióticos (Tomasik & Tomasik, 2003). La mayor parte de los estudios con prebióticos se centran en los fructo-oligosacáridos (FOS), los galacto-oligosacáridos (GOS), la oligo-fructosa y la maltodextrina, por su alta efectividad para promover el crecimiento de las bacterias del tipo *Bifidobacterium*.

2.3. Oligosacáridos

El interés mundial en los oligosacáridos ha aumentado desde que se les atribuyó características de prebióticos. Los oligosacáridos se extraen de algas, hongos y plantas superiores. Los prebióticos han demostrado gran efectividad en la proliferación de la microbiota intestinal, pues mejora el sistema inmune y ayuda a prevenir enfermedades. También se han encontrado aplicaciones importantes de los prebióticos en la administración de fármacos, cosméticos y en la agricultura (Okazaki, Fujikawa, & Matsumoto, 1990). Los oligosacáridos son carbohidratos de bajo peso

molecular con grados de polimerización (DP) entre 3 y 10. Estas sustancias se fermentan en el colon por la acción de bacterias endógenas que los utilizan como fuente de carbono para liberar energía, sustratos metabólicos y ácidos carboxílicos de cadena corta (Weijers, Franssen, & Visser, 2008). La estabilidad de los prebióticos depende de la cantidad de monosacáridos, y los tipos de enlaces que los unen, en general, este tipo de biomoléculas tiene gran diversidad estructural que depende de su origen.

2.3.1. Prebióticos convencionales. Hay una gran variedad de oligosacáridos usados como prebióticos, entre los más comunes están los fructo-oligosacáridos (FOS), gluco-oligosacáridos (GOS), isomalto-oligosacáridos (IMO), galacto-oligosacáridos, isomaltulosa, lactosacarosa, malto-oligosacáridos (MO) y xilo-oligosacáridos (XOS). Estos oligosacáridos se encuentran en una amplia variedad de alimentos como leche, miel, jugo de caña de azúcar, lentejas, remolacha entre otros. Por otro lado, los xilo-oligosacáridos se extraen principalmente del salvado de trigo, cáscaras de cebada, granos gastados de cervecería, entre otras fuentes (Patel & Goyal, 2011).

2.4. Biomasa y xilo-oligosacáridos

Con el crecimiento exponencial de la población mundial, existe la necesidad de producir alimentos de gran valor nutricional a un menor costo. Desde este punto de vista, el uso de millones de toneladas de residuos de biomasa, generados anualmente por actividades agroindustriales, puede ser una estrategia que permita no solo generar productos de valor sino también disminuir la emisión de residuos. Por ejemplo, la producción estimada de caña de azúcar en Brasil fue de 596,600 millones de toneladas para la temporada 2012/2013, si se considera que por cada tonelada de caña

se producen 135 kg de biomasa residual, la producción de bagazo de caña en Brasil fue de *ca.* 80,500 millones de toneladas, en ese periodo de tiempo (Carvalho, Neto, da Silva, & Pastore, 2013). Este es solo un ejemplo de la abundancia de biomasa vegetal en el planeta, particularmente en el trópico. La biomasa está compuesta principalmente por biopolímeros complejos como la hemicelulosa, la celulosa y la lignina. Mediante una separación selectiva de estos principales componentes de la biomasa es posible producir bioproductos útiles.

Generalmente, los xilo-oligosacáridos (XOS), se obtienen por hidrólisis del xilano, y son oligómeros que contienen de dos a diez moléculas de xilosa unidas por enlaces β -(1 \rightarrow 4) glucosídicos. Las unidades estructurales de los XOS presentan sustituciones en las posiciones C-2 o C-3, de un anillo arabinofuranosil, ácido 4-O-metilglucurónico, acetilo o sustituyentes fenólicos (Véase Figura 1). La estructura de los xilo-oligosacáridos depende de la fuente y de la manera como se extraen de la biomasa de origen (Moure, Gullón, Domínguez, & Parajó, 2006). Los xilanos están contenidos en la hemicelulosa y representan entre el 25 y 35% de la biomasa seca en tejidos leñosos, y hasta un 50% en algunos tejidos de granos de cereales. Estos compuestos son considerados alimentos funcionales por su capacidad para estimular la función intestinal, en algunos casos se han utilizado también como edulcorantes para alimentos dietéticos bajos en calorías y para el consumo de personas con diabetes. Además, de los efectos mencionados, el consumo regular de XOS reduce las concentraciones de glucosa y el colesterol en sangre, mejora la absorción de minerales y estimula el sistema inmune (Samanta et al., 2015).

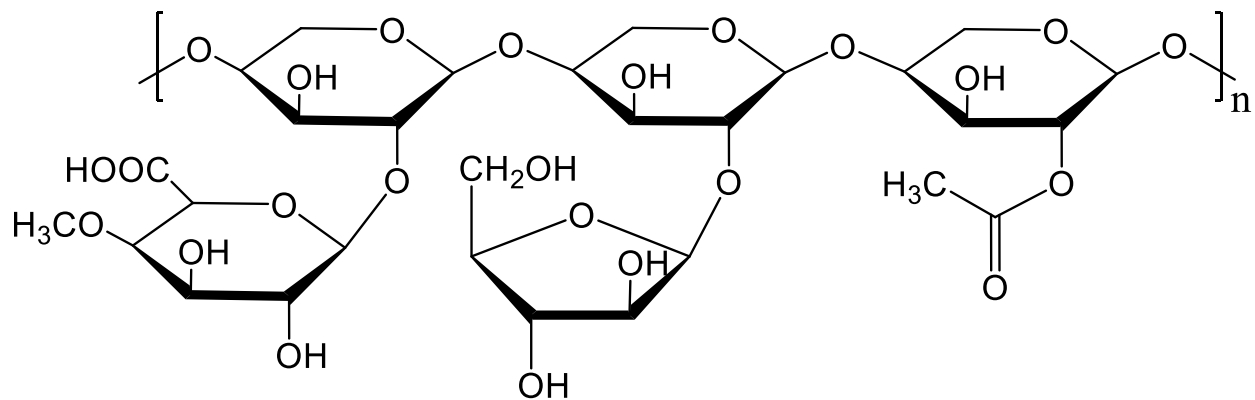


Figura 1. Estructura esquemática del xilano (Carvalho et al., 2013).

2.5. Obtención de xilo-oligosacáridos

Con el objetivo de producir prebióticos a partir de residuos agrícolas, se han investigado varios métodos para extraer xilo-oligosacáridos por medio de procesos eficientes y económicos. Generalmente, estos compuestos son obtenidos a partir de residuos ricos en hemicelulosa, mediante métodos químicos y/o enzimáticos, o a través de autohidrólisis directa a alta temperatura y presión (Jain et al., 2015).

2.5.1. Métodos químicos. En este tipo de métodos, los XOS se extraen por hidrólisis de la biomasa en medio alcalino o ácido. Para la extracción en medio alcalino se usan bases fuertes como hidróxido de potasio (KOH), hidróxido de sodio (NaOH), hidróxido de calcio $\text{Ca}(\text{OH})_2$ o hidróxido de amonio (NH_4OH); mientras que, para la extracción en medio ácido, el ácido sulfúrico (H_2SO_4), 0,1- 0,5 M, es el más reportado. Con este tratamiento, también son producidas sustancias adicionales, productos de la descomposición térmica de los glúcidos como exceso de

monosacáridos de xilosa, furfural, hidroximetilfurfural (HMF), productos fenólicos y aromáticos, que son tóxicos y perjudiciales para aplicaciones alimentarias, por lo que típicamente el proceso amerita una posterior purificación mediante tratamientos fisicoquímicos (Akpinar, Erdogan, & Bostanci, 2009).

2.5.2. Métodos enzimáticos. Los XOS también se pueden obtener utilizando enzimas específicas que actúan selectivamente sobre la estructura del xilano. En contraste con la hidrólisis química, la degradación enzimática es reconocida por su especificidad, asociada a una mínima cantidad de subproductos indeseados. Por lo general, el método enzimático se lleva a cabo en dos etapas: inicia con un pre-tratamiento alcalino con NaOH o KOH, seguido de la hidrólisis por medio de la enzima xilanasa (Akpinar, Ak, Kavas, Bakir, & Yilmaz, 2007). El rendimiento de obtención de XOS varía según la fuente de xilano, la actividad enzimática y las condiciones de incubación como el pH, el tiempo de hidrólisis y la temperatura.

2.5.3. Autohidrólisis. Materiales lignocelulósicos de diferentes fuentes vegetales como mazorcas de maíz, semillas de olivo, cáscaras de arroz y trigo, han sido sometidos a tratamientos hidrotérmicos o autohidrólisis, mostrando buenos resultados en la obtención de XOS (Nabarlatz et al., 2007). El proceso de autohidrólisis se lleva a cabo en equipos especializados (reactores) bajo condiciones de temperatura y presión específicas. Las moléculas de xilano de la hemicelulosa se descomponen en moléculas más pequeñas debido a la influencia de los iones hidronio (H_3O^+) derivados de la autoionización del agua, lo que induce la depolimerización y la desacetilación del xilano generando ácido acético, lo cual a su vez estimula la producción de iones hidronio que contribuyen al proceso de autohidrólisis. Este proceso deja la celulosa y la lignina en fase sólida

sin alteración en su estructura. La autohidrólisis tiene lugar en medios ligeramente ácidos debido a la escisión parcial de los grupos acetilo, que liberan ácido acético. Este método no requiere el uso de compuestos químicos corrosivos para la extracción de XOS (Nabarlatz, Farriol, & Montané, 2005).

2.6. Caracterización de XOS.

Las características y la estructura de los XOS varían de acuerdo con la biomasa de procedencia y con el método de extracción utilizado. Para comprender las propiedades fisicoquímicas y biológicas de este tipo de prebióticos, es de gran importancia conocer su estructura química, obteniendo información de las posiciones concretas de sus grupos laterales ramificados como grupos acetilo, ácido urónico o ácido fenólico. Sin embargo, el estudio de la estructura de los XOS no es trivial, debido a la gran variedad de isómeros estructurales posibles, además, estos compuestos pueden ser co-extraídos con otros, por lo que para su análisis se requiere una purificación previa de la muestra.

Para el análisis estructural de los XOS provenientes de materia prima rica en xilano, recientemente se han utilizado técnicas de espectrometría de masas (MS), como la desorción por láser asistida por una matriz (MALDI) y la ionización por electronebulización (ESI), acopladas a analizadores de masas como el tiempo de vuelo (TOF) y la trampa iónica (IT) cuadrupolar, respectivamente. En algunos casos, estas técnicas se han acoplado a técnicas de separación (Ana Reis et al., 2002), pero el uso directo de MS es atractivo para el análisis de carbohidratos debido a la posibilidad de realizar pruebas tándem (MS/MS), ya que permite obtener información sobre la secuencia y ubicación de los sustituyentes en la cadena principal de los polímeros.

2.6.1. Ionización por electronebulización (ESI). En esta técnica, la ionización ocurre a presión atmosférica, a diferencia de MALDI donde la ionización se lleva a cabo en condiciones de vacío. La muestra es disuelta en un sistema de solventes polares que se hace pasar por un capilar, en cuya punta se aplica una diferencia de potencial, produciendo una fina niebla de gotas cargadas en su superficie. Con ayuda de nitrógeno como gas de secado, el disolvente se evapora progresivamente disminuyendo el tamaño de las gotas y aumentando el número de especies cargadas del analito sobre la superficie. Finalmente, se cree que la transferencia de estas especies a la fase gaseosa puede transcurrir a través del modelo de evaporación iónica o el de carga residual. ESI puede operarse en modo de ionización positivo o negativo, cambiando el voltaje que se aplica en la punta del capilar. En esta técnica de ionización se forman especies multicargadas del tipo $[M+nH]^{n+}$ y $[M-nH]^{n-}$, comunes en especies con múltiples grupos polares e ionizables. De igual forma, es común la formación de aductos aniónicos o catiónicos (Carmen, Gómez, & González, 2010).

2.6.2. Ionización por desorción láser asistida por una matriz (MALDI). La ionización MALDI se produce por una desorción mediante un láser ultravioleta de Nd: YAG ($\lambda = 355$ nm) del analito previamente co-cristalizado con una matriz orgánica, *i.e.*, un compuesto orgánico de bajo peso molecular, capaz de absorber radiación en la región que emite el láser y ayudar la desorción/ionización del analito. Se cree que inicialmente ocurre una ionización primaria caracterizada por procesos de formación de iones, seguida de una ionización secundaria, donde ocurren transferencias y recombinación de cargas. La ionización MALDI se produce a través de un agrupamiento de excitones de la matriz en fase sólida que concentran la energía para generar su ionización. Las especies radicales resultantes (cationes o aniones) reaccionan con especies

neutras de la matriz para formar iones deprotonados/protonados, los cuales pueden transferir su carga al analito. La formación de iones también puede ocurrir a través del modelo conocido como “*lucky survivors*” propuesto por Karas (Karas, Glückmann, & Schäfer, 2000); en este caso, se asume que los iones son preformados en fase líquida y por consecuencia existen antes del proceso de ablación, aunque muchos de estos iones se recombinan con sus contraiones en fase sólida, de manera que, solo algunos logran escapar de este proceso y ser detectados. MALDI es una fuente de ionización pulsada por lo que es más tolerante a las sales y contaminantes en comparación con ESI, lo que facilita la preparación de la muestra y permite obtener espectros de masas libres de impurezas. A diferencia de ESI, MALDI se caracteriza por generar especies monocargadas, deprotonadas o protonadas y aductos con metales alcalinos (Carmen, Gómez, & González, 2010).

2.6.3. Nomenclatura para el análisis de carbohidratos en MS. Los procesos de fragmentación por medio de espectrometría de masas tándem han contribuido a la identificación estructural de los carbohidratos. La nomenclatura para identificar las especies generadas luego de las rupturas de los enlaces fue propuesta por Domon & Costello, e involucra etiquetar el fragmento con el extremo no reductor con letras mayúsculas (A, B, C) mientras que el fragmento con el extremo reductor del oligosacárido se identifica con las últimas letras del alfabeto (X, Y, Z); los subíndices indican las unidades de monosacáridos contenidos en el fragmento del oligosacárido (Véase Figura 2). En esta nomenclatura, la fragmentación del anillo se etiqueta con las letras A y X donde los subíndices corresponden al número del enlace que se rompe en el anillo, el cual se asigna en el sentido de las agujas del reloj (Domon & Costello, 1988). La escisión de residuos sucesivos se etiquetan A_m , B_m y C_m , con $m=1$ para el extremo no reductor y X_n , Y_n y Z_n , con $n=1$ para el residuo del extremo reductor.

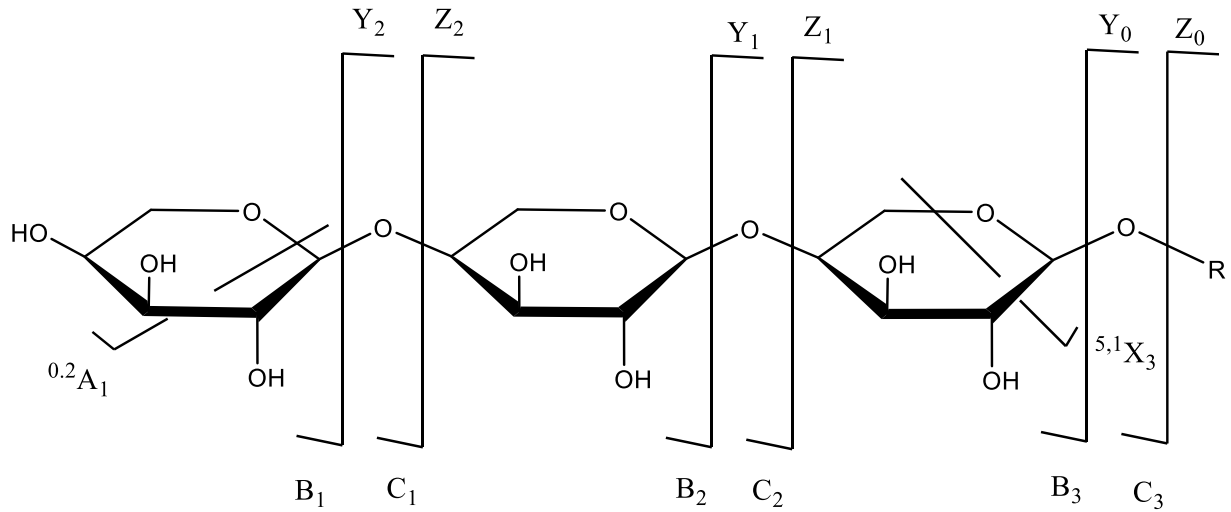


Figura 2. Tipos de fragmentación de oligosacáridos (Domon & Costello, 1988).

Mientras que la fragmentación del enlace glucosídico proporciona información sobre la secuencia del oligómero, los iones generados a través del rompimiento de un anillo son muy útiles para determinar las posiciones del enlace y las ramificaciones (*e.g.*, grupos acetilo). Por ejemplo, la presencia de iones $^{0,2}A$ 60 Da (pérdida de $C_2H_4O_2$) y la pérdida de $^{0,3}A$ 90 Da ($C_3O_3H_6$) con una intensidad menor comparada con la intensidad del ion molecular, es un indicador típico para un enlace 1-4 en hexosas, con el extremo reductor de la molécula o el precursor respectivo (C). Un grupo acetilo se indicaría con la presencia de un ion $^{0,2}A$ 102 (60 + 42) Da más bajo. Los iones tipo $^{0,2}X$ se identifican por una pérdida de 104 Da, de iones tipo C, los cuales son característicos para desoxi-hexosas unidas por enlaces glucosídicos tipo 1-2, como por ejemplo la ramnosa (Zaia, 2004).

2.7. Antecedentes

Con el aumento progresivo de los desechos agrícolas, se ha incentivado la búsqueda de procesos que permitan utilizar esta materia prima para generar productos adicionales. Durante el procesamiento de la caña de azúcar, por cada 100 toneladas de azúcares totales que llegan a la planta para su posterior tratamiento, se generan 134 toneladas de residuos de caña (Basanta, Delgado, Martínez, Vázquez, & Vázquez, 2007). Por esta razón, se buscan estrategias que permitan dar un valor agregado a estos residuos, y aprovechar al máximo todos los subproductos generados durante el proceso. Se han reportado métodos de recuperación a partir de tratamientos de hidrólisis, para obtener un grupo en concreto de xilo-oligosacáridos con potencial uso en la industria alimentaria como aditivos prebióticos.

La caracterización de estos productos es un reto analítico, resultado del interés científico y comercial en la explotación de material vegetal obtenido a partir de desechos industriales. La importancia de dicha caracterización radica en que las propiedades funcionales y aplicaciones de los XOS, dependen de su estructura. Diferentes técnicas analíticas han sido utilizadas para la caracterización de los oligosacáridos, *e.g.*, análisis por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de la hemicelulosa de la madera, rica en xilo-oligosacáridos, mostraron que estaban compuestos de los siguientes elementos estructurales de β -(1 \rightarrow 4) D-xilopiranosilo: no sustituidos (50% en moles), 2-O-acetilados (13% en moles), 3-O-acetilados (21% en moles), 2,3 -di-O-acetilado (6% en moles) y [MeGlcA α - (1 \rightarrow 2)] [3-O-acetilado] (10% en moles). (Teleman, Lundqvist, Tjerneld, Stålbrand, & Dahlman, 2000).

Otros estudios, han empleado la espectrometría de masas para determinar la masa molecular de cada oligómero en la mezcla y haciendo uso de la fragmentación de los iones formados, obtener

información estructural sobre la composición, la ramificación y el tipo de enlace que une los monosacáridos. Algunos estudios han reportado el uso de estas técnicas para el análisis de xilo-oligosacáridos,; en un análisis de XOS obtenidos a partir del árbol *Eucalyptus globulus* (una de las especies más utilizadas en la industria del papel) se utilizó ESI- MS/MS y se logró identificar xilo-oligosacáridos neutros acetilados (Xyl_nAc_m) y xilo-oligosacáridos ácidos ($Xyl_nAc_mMeGlcA$, y $Xyl_nAc_mMeGlcAHex$) (Ana Reis et al., 2005). En otro estudio, xilo-oligosacáridos extraídos de la pulpa de oliva o aceituna fueron caracterizados mediante ESI-MS y ESI-MS/MS, permitiendo distinguir rutas de fragmentación producidas tanto en el extremo reductor como en el extremo no reductor de la cadena de xilano, obteniéndose información de la localización de los sustituyentes a lo largo de la cadena (Ana Reis, Coimbra, Domingues, Ferrer-Correia, & Domingues, 2004). Los xilo-oligosacáridos extraídos de la pulpa de oliva también fueron caracterizados por MALDI/MS, encontrando oligosacáridos neutros de xilosa (Xyl_n , $n=3-7$), oligosacáridos ácidos sustituidos con un grupo ácido glucurónico (Xyl_nGlcA , $n=3-5$), dos grupos ácido glucurónico (Xyl_nGlcA_2 , $n=2-3$), algunos oligosacáridos ácidos sustituidos con ácido 4-O-metilglucurónico ($Xyl_nMeGlcA$, $n=2-4$) y grupos acetilo (Ac) (Ana Reis et al., 2002).

Ante los beneficios mencionados previamente, en este proyecto de investigación se caracterizaron los XOS de nuevas fuentes, como lo son el bagazo de la caña de azúcar y el pergamino de café extraídos por autohidrólisis, estos son residuos agrícolas típicos que se producen abundantemente en el país y que podrían tener un uso adicional como prebióticos.

3. Metodología

3.1. Muestras

Las muestras de xilo-oligosacáridos crudos (sin derivatización, ni fraccionamiento) de pergamino de café y bagazo de caña de azúcar, la muestra de pergamino de café purificada y el estándar de xilano comprado en *Biosynth Carbosynth*, fueron suministradas por la Dra. Debora Nabarlatz, directora del Grupo de Investigación en Tecnologías de Valorización de Residuos y Fuentes Agrícolas e Industriales para la Sustentabilidad Energética – (INTERFASE), Grupo de Investigación que hace parte de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad Industrial de Santander.

Los XOS fueron extraídos mediante autohidrólisis ácida en un reactor Parr de la serie 4848 de acero inoxidable de 1 galón, en agua desionizada a 179 °C durante 23 minutos de reacción. Al finalizar el tiempo de reacción, el residuo sólido de la hidrólisis se separó de la fase líquida por filtración, se lavó con agua a una temperatura de 40 °C aproximadamente (tres lavados consecutivos con 15 mL cada uno) y, luego se secó a 105 °C en un horno durante 24 horas (Nabarlatz et al., 2007). Los xilo-oligosacáridos producidos mantienen una fracción importante de los grupos acetilo unidos, y esto les confiere características distintas, como solubilidad muy alta en agua.

La muestra de pergamino de café purificada fue obtenida por una ruta de purificación planteada por el estudiante de pregrado en Ingeniería Química José Guerrero (Guerrero, J, y Nabarlatz, 2018), con el fin de disminuir los compuestos indeseados del hidrolizado crudo de pergamino de café: 1) Tratamiento con carbón activado para eliminar furfural y compuestos fenólicos derivados de la lignina; 2) Tratamiento con resina catiónica con el fin de pre-tratar el licor para el uso de

resina aniónica; y 3) Tratamiento con resina aniónica con el fin de refinar el hidrolizado y obtener un color transparente.

De acuerdo con los antecedentes expuestos y los objetivos planteados se siguió el siguiente plan de trabajo para desarrollar la propuesta.

3.2. ETAPA I: Purificación y fraccionamiento de xilo-oligosacáridos (XOS)

La purificación y el fraccionamiento de los oligosacáridos crudos disueltos en ACN/agua (1:1, v/v) en una concentración de 0.5 mg/mL, se realizó mediante ultrafiltración con centrifuga, utilizando cartuchos de cortes de pesos moleculares de <math><3.000</math> y 10.000, PALL laboratorio (Véase Figura 3), los cuales poseen una membrana de filtración de polietersulfona modificada. Las partículas más grandes que el tamaño de los poros de la membrana se retuvieron en el depósito de la muestra mientras que las soluciones y las partículas más pequeñas pasaron a través del receptor de filtrado. El objetivo de este procedimiento fue obtener fracciones limpias, con distribuciones uniformes de peso molecular, que pudieran ser ionizados de manera eficiente por medio de las dos fuentes de ionización que se emplearon en este proyecto de investigación (MALDI y ESI).

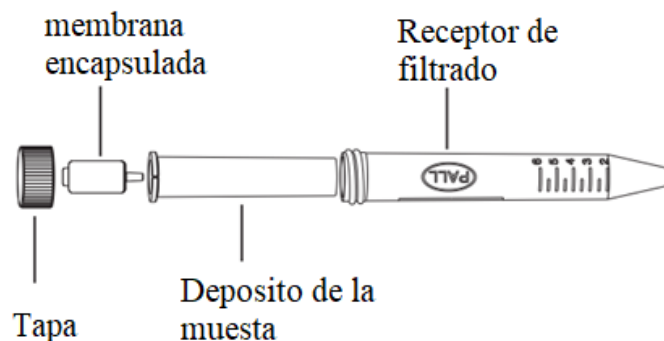


Figura 3. Tubo para ultrafiltración *Microsep Advance* de *Pall Laboratory* (Pall, 2014).

3.3. ETAPA II: Caracterización de xilo-oligosacáridos por espectrometría de masas

Los xilo-oligosacáridos obtenidos por hidrólisis y los productos obtenidos por derivatización, fueron preparados de acuerdo con el siguiente protocolo para su análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF y ESI-IT. Los datos se tomaron en el Laboratorio de Espectrometría de Masas localizado en el primer piso del Edificio de Investigaciones en el parque Tecnológico de Guatiguará, de la Universidad Industrial de Santander.

3.3.1. Preparación de la muestra.

3.3.1.1. MALDI-TOF/MS. La caracterización de los XOS obtenidos a partir del bagazo de la caña de azúcar y del pergamino de café, por medio de MS MALDI-TOF, se realizó en un espectrómetro de masas Bruker MALDI-TOF/TOF, ultrafleXtreme (Bruker Daltonics, Billerica, MA), equipado con un láser Smart Beam de Nd:YAG ($\lambda = 355$ nm), con frecuencia de 1 kHz y una energía máxima de salida de ca., 85 μ J por disparo, de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Se utilizó ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) como matriz MALDI en concentración de 5 mg/mL, en ACN/H₂O (70/30, v/v, 0,1% TFA). Las muestras fueron preparadas en una solución de ACN/H₂O (1:1, v/v) con una concentración final de 0.5 mg/mL, la matriz y el analito fueron mezclados en relación molar 1:1 y se depositó 1 μ L de esta mezcla sobre el portamuestras MALDI para su análisis (A. Reis, Domingues, Ferrer-Correia, & Coimbra, 2003).

3.3.1.2. ESI-IT/MS. La caracterización de los XOS obtenidos de bagazo de caña de azúcar y pergamino de café por espectrometría de masas ESI, en modo de ionización positivo, se realizó en

un espectrómetro de masas Bruker ESI-MS/MS *Ion Trap Amazon*. Las muestras se prepararon en una solución de ACN/H₂O (1:1, v/v) con 1% de hidróxido de amonio, con una concentración final de 0.01 mg/mL.

Una vez obtenidos los espectros de masas se procedió a realizar los experimentos *tandem*, MALDI-TOF/TOF y ESI-IT MSⁿ, los cuales mediante un análisis detallado de la fragmentación de enlaces glucosídicos y de los anillos de los oligosacáridos, permitieron obtener información sobre la composición estructural de los xilo-oligosacáridos. El primer tipo de fragmentación brinda información sobre la secuenciación de los oligómeros, mientras que el segundo tipo ofrece información sobre la posición de los sustituyentes presentes. Además, se analizó la información obtenida para los productos derivados de la reacción de metilación.

3.4. ETAPA III: Derivatización de xilo-oligosacáridos

La derivatización de los XOS es una estrategia que permite encontrar el tipo de enlace glucosídico que une a los monosacáridos y en algunos casos la ubicación de los sustituyentes o ramificaciones. La reacción que ocurre se muestra en la Figura 4.

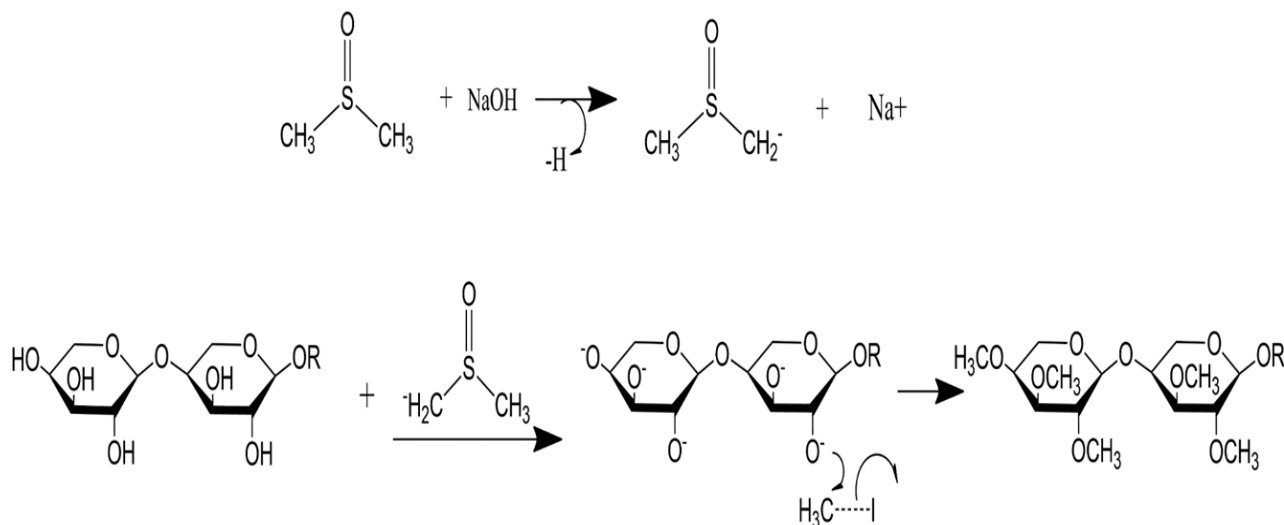


Figura 4. Esquema de la reacción de per-O-metilación de xilo- oligosacáridos

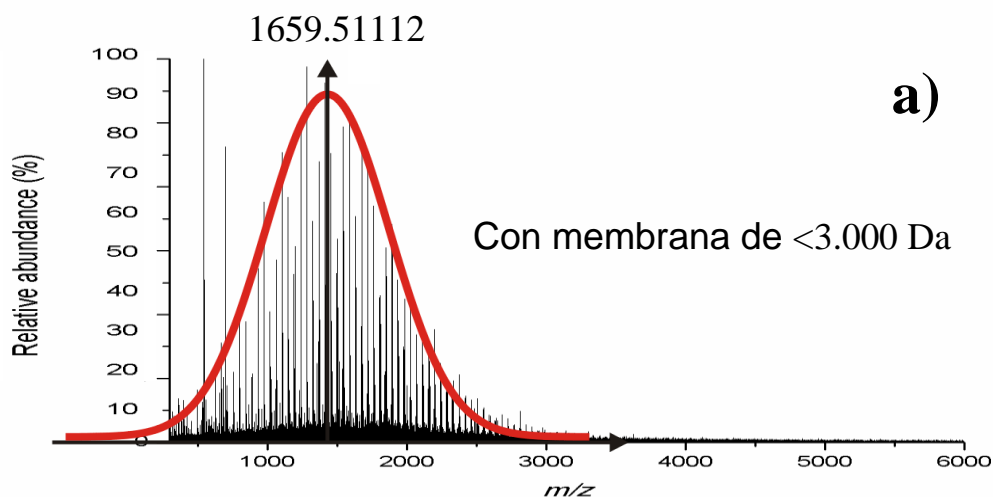
Metilación: Los grupos hidroxilo de los XOS son per-O-metilados a través de un proceso de derivatización simple (Ciucanu & Kerek, 1984; Ciucanu & Caprita, 2007). Con la permetilación no solo se observa un aumento significativo en la intensidad de la señal, sino que adicionalmente, permite localizar cadenas laterales en isómeros. Debido a que los puntos de ramificación de los restos de la cadena principal no están metilados durante la derivatización, se pueden distinguir de los residuos no ramificados por una diferencia de masa de 14 Da ($-\text{CH}_3 - \text{H}$), por punto de ramificación. A aproximadamente 4 mg de muestra de Xilo- oligosacáridos del pergamino de café, se agregó 500 μL de suspensión de dimetilsulfóxido con 20 mg de hidróxido de sodio (DMSO-NaOH) y 200 μL de yoduro de metilo (CH_3I); la mezcla se dejó bajo agitación constante en un vórtex durante 60 minutos, luego se agregó 1 mL de agua gota a gota, para detener la reacción, y se realizó la extracción del analito con 1 mL de cloroformo, la fase orgánica se lavó con alícuotas de agua. Se dejó secar a temperatura ambiente y el residuo se disolvió en una mezcla de ACN/agua para su posterior análisis por MS.

4. Análisis de resultados

4.1. Purificación y fraccionamiento de los xilo-oligosacáridos

Se analizaron extractos de xilo-oligosacáridos (XOS) obtenidos a partir de dos fuentes agrícolas, pergamino de café y bagazo de caña de azúcar, los XOS fueron caracterizados por espectrometría de masas MALDI-TOF y ESI-IT. Previo al análisis por MS, las muestras diluidas en una mezcla ACN/agua (1:1, 0.5 mg/mL) fueron purificadas/fraccionadas mediante ultrafiltración en centrífuga. Dicha purificación permite obtener fracciones limpias, con distribuciones uniformes de pesos moleculares, que pueden ser ionizadas de manera eficiente por la fuente de ionización MALDI y ESI.

Se encontró que los xilo-oligosacáridos presentes en la muestra de bagazo de caña de azúcar, presentaban distribuciones de pesos moleculares de hasta 3 kDa, lo cual permitió determinar el peso molecular promedio de la muestra, como se muestra en la Figura 5.



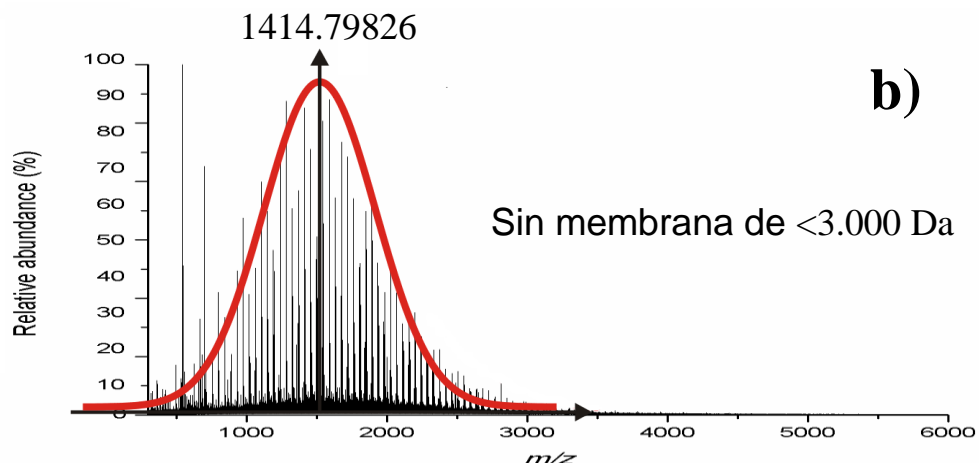


Figura 5. Comparación de espectros MALDI del bagazo de caña, a) usando cartuchos de corte molecular <3000 Da y b) sin realizar fraccionamiento con cartuchos de corte molecular

Como se puede observar en la Figura 5., los espectros de masas MALDI para la muestra de bagazo de caña de azúcar, presentan una distribución gaussiana similar, es decir, la muestra de XOS sin previo tratamiento de purificación, no presenta compuestos con pesos moleculares mayores que 3000 Da, por lo tanto, no se hace necesario el uso de cartuchos de corte molecular de <10000 Da; para los demás ensayos, en la etapa de purificación de la muestra solo se utilizó los filtros de 3000 Da.

4.2. Caracterización química por MALDI- TOF/MS de las muestras no derivatizadas

4.2.1. Caracterización por MALDI- TOF/MS de un estándar de xilano. Inicialmente, se tomó un estándar comercial de xilano de bajo peso molecular, con el fin de obtener una identificación confirmatoria de las especies que posiblemente se encontrarían en las muestras de

interés. El estándar se preparó siguiendo el método descrito en la Sección 3.3.1.1. de la metodología, para la caracterización de la muestra por espectrometría de masas MALDI-TOF. En la Figura 6., se muestra el espectro de masas en modo de ionización positivo, a) *full scan* y b) una ampliación en la región de m/z 250-800. El uso de la matriz, ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), ha sido reportada en numerosos estudios realizados a diversas muestras de xilo-oligosacáridos, *e.g.*, estudios de xilo-oligosacáridos extraídos de Madera de Abedul (Brasseur et al., 2014), caracterización de xilo-oligosacáridos extraídos de trigo del género *Triticum aestivum* (Matamoros Fernández et al., 2003), análisis de xilo-oligosacáridos extraídos de pulpa de oliva o aceituna (Ana Reis et al., 2002), entre otros.

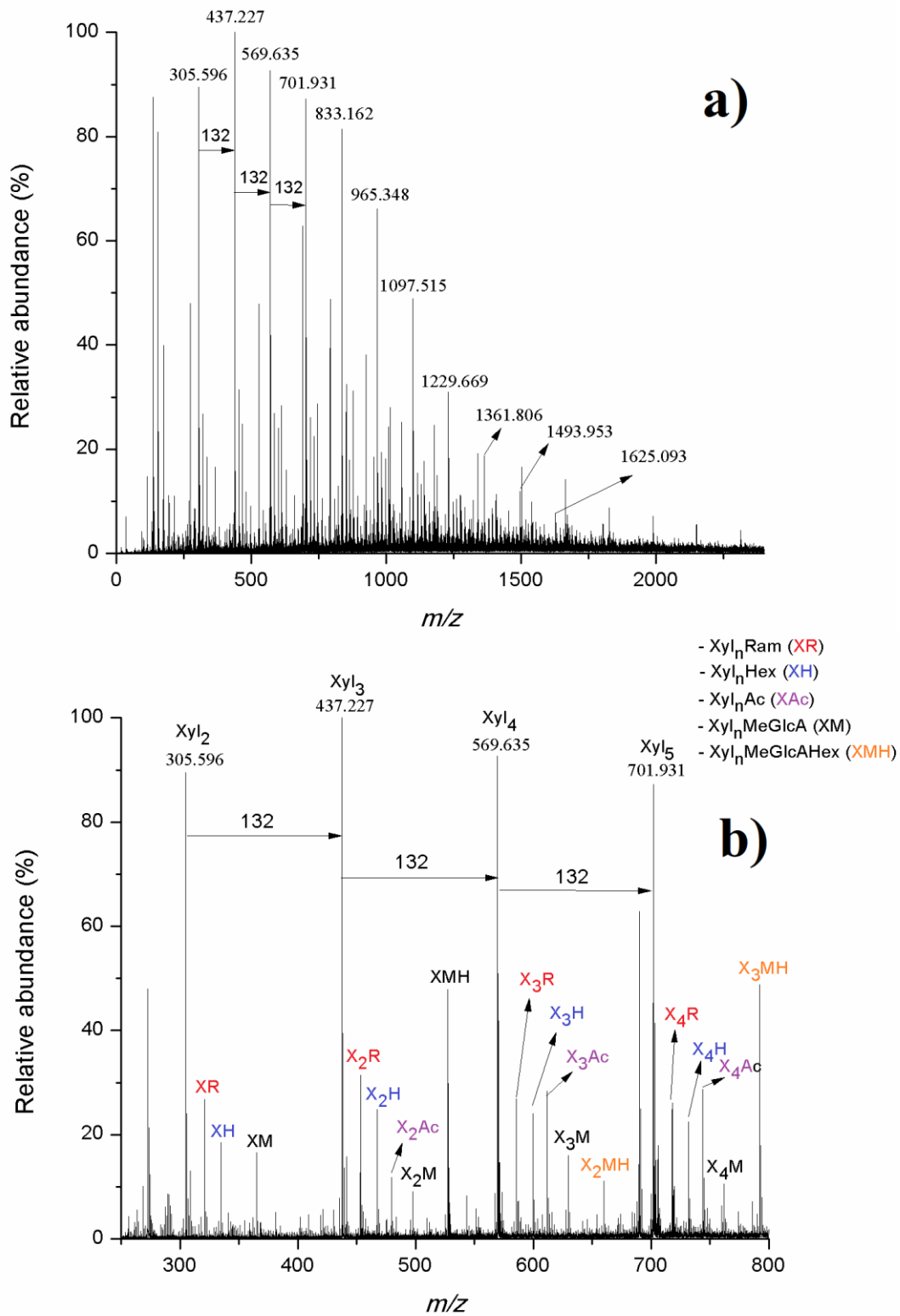


Figura 6. Espectro de masas MALDI de un estándar comercial de xilano, modo de ionización positivo, a) *full scan* y b) *zoom* región del espectro entre m/z 250-800

En la Figura 6. a), se pueden apreciar aductos de sodio $[M + Na]^+$ con familias formadas por monómeros de xilosa (Xyl_n , $n = 2-12$) con diferencias por unidad de 132 Da y en la Figura 6. b), familias con un único grupo lateral acetilo (Xyl_nAc , $n = 3-12$) con aumento de 42 Da y familias con un grupo lateral diferente unido al extremo no reductor de la cadena de xilosa, se observan familias unidas a un residuo de ramnosa (Xyl_nRam , $n = 1-10$) con aumento de 14 Da, familias unidas a un residuo de hexosa galactosilo (Galactosa) y/o glucosilo (glucosa) (Xyl_nHex , $n = 1-10$) con aumento de 30 Da, familias con un residuo ácido 4-O-metilglucorónico ($Xyl_nMeGlcA$, $n = 1-8$) con aumento de 58 Da y familias con un residuo ácido 4-O-metilglucorónico y con un residuo de hexosa ($Xyl_nMeGlcAHex$, $n = 1-9$), con un aumento de 88 Da.

4.2.2. Caracterización por MALDI- TOF/MS del hidrolizado de bagazo de caña de azúcar.

La muestra de bagazo de caña de azúcar (licor crudo) se analizó por espectrometría de masas MALDI-TOF obteniendo como resultado el espectro de masas que se muestra en la Figura 7. a), en la parte b), se muestra un *zoom* del espectro en la zona de m/z 700 a 1100. Las especies identificadas como aductos de sodio $[M+Na]^+$ en el bagazo de caña de azúcar están organizadas en la Tabla 1.

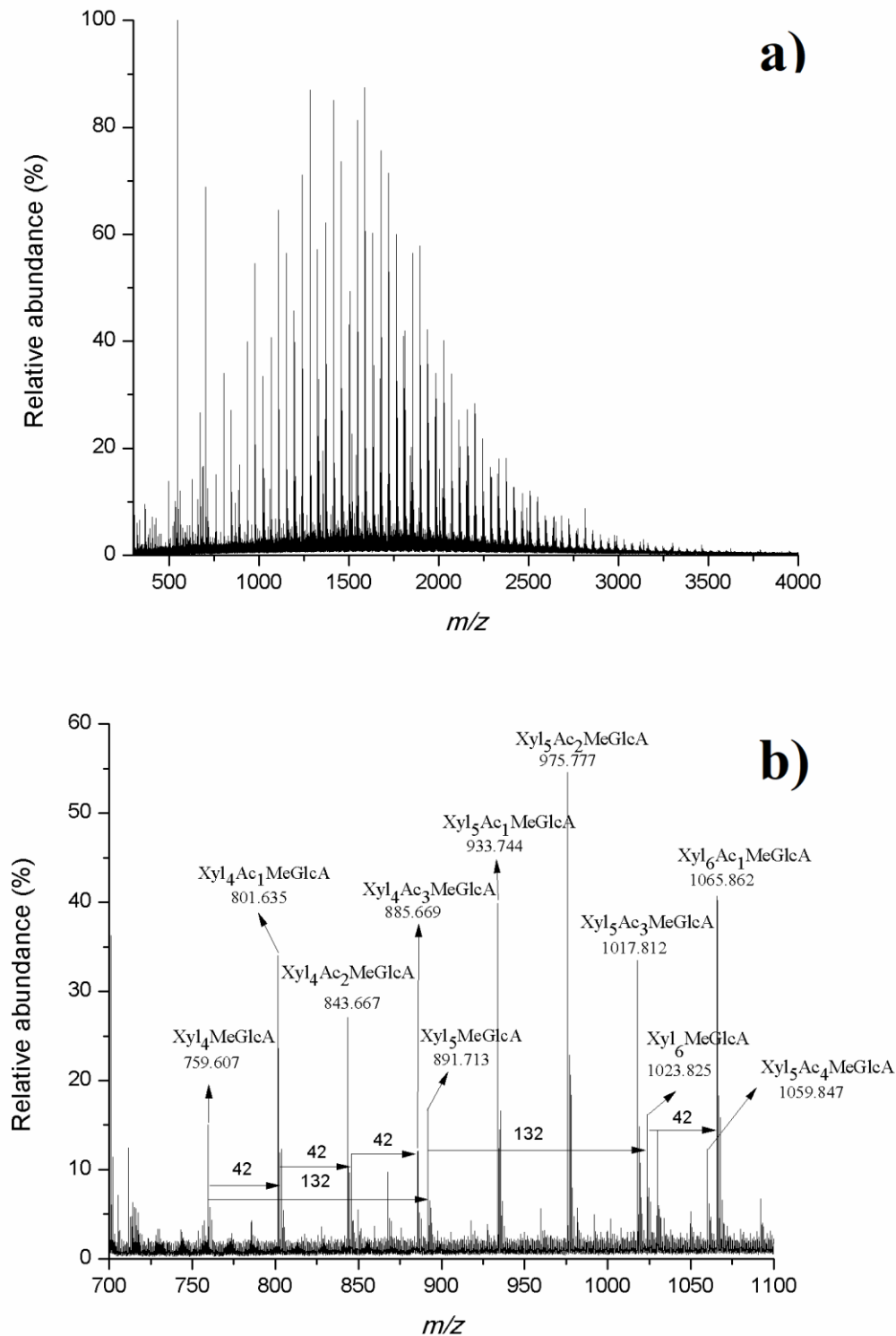


Figura 7. Espectro de masas MALDI del hidrolizado del bagazo de caña de azúcar, modo de ionización positivo, a) *full scan* y b) *zoom m/z 700-1100*

Tabla 1.

Estructuras identificadas como aductos de sodio en la muestra de bagazo de caña de azúcar (licor crudo) por espectrometría de masas MALDI-TOF

[M + Na] ⁺	n O-grupo acetilo				
	0	1	2	3	4
Xyl₁MeGlcA	363.539				
Xyl₂MeGlcA	495.489	537.489			
Xyl₃MeGlcA	627.526	669.544	711.568		
Xyl₄MeGlcA	759.607	801.635	843.667	885.669	
Xyl₅MeGlcA	891.713	933.744	975.777	1017.812	1059.847
Xyl₆MeGlcA	1023.825	1065.862	1107.90	1149.930	1191.970
Xyl₇MeGlcA	1155.941	1197.998	1240.013	1282.047	1324.088
Xyl₈MeGlcA	1288.061	1330.102	1372.130	1414.163	1456.200
Xyl₉MeGlcA	1420.175	1462.262	1504.243	1546.276	1588.314
Xyl₁₀MeGlcA	1552.287	1594.365	1636.360	1678.400	1720.427
Xyl₁₁MeGlcA	1684.399	1726.453	1768.471	1810.505	1852.539
Xyl₁₂MeGlcA	1816.501	1858.556	1900.580	1942.615	1984.651
Xyl₁₃MeGlcA	1948.611	1990.659	2032.689	2074.734	2116.762
Xyl₁₄MeGlcA	2080.715	2122.752	2164.820	2206.836	2248.874
Xyl₁₅MeGlcA	2212.815	2254.868	2296.907	2338.941	2380.983
Xyl₁₆MeGlcA	2344.935	2386.752	2428.032	2470.061	2512.088
Xyl₁₇MeGlcA	2476.052	2518.091	2560.119	2602.163	2644.204
Xyl₁₈MeGlcA	2608.172	2650.191	2692.253	2734.303	2776.347
Xyl₁₉MeGlcA	2740.293	2782.360	2824.342	2866.446	2908.411
Xyl₂₀MeGlcA	2872.396	2914.469	2956.522	2998.529	
Xyl₂₁MeGlcA	3004.565	3046.539	3088.699	3130.719	

Las familias identificadas en la muestra de bagazo de caña de azúcar corresponden a 21 oligómeros de la familia XylMeGlcA (Grado polimerización (DP) 1-21), 20 oligómeros tipo XylAc₁MeGlcA (DP=2-21), 19 oligómeros XylAc₂MeGlcA (3-21), 18 oligómeros XylAc₃MeGlcA (DP=4-21) y 15 oligómeros XylAc₃MeGlcA (DP=5-19). Las familias de

oligosacáridos aumentan en 132 Da por residuo de xilosa a lo largo de la cadena y por 42 Da por unidad de grupos acetilo, tal como se muestra en la Figura 7 b).

En la Figura 8 se ilustra de forma esquemática la estructura propuesta para uno de los iones encontrados en la muestra de bagazo de caña de azúcar.

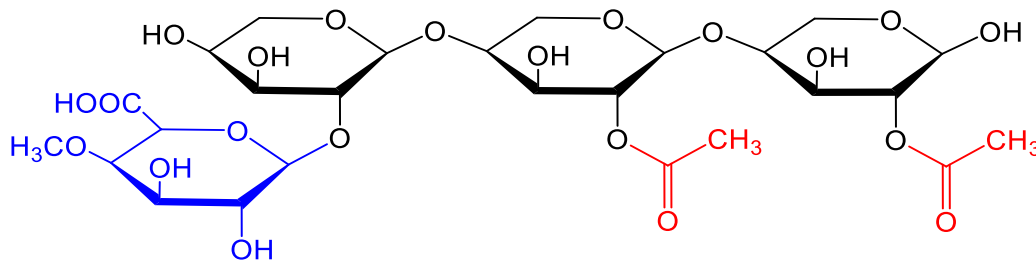


Figura 8. Estructura química posible del ion $\text{Xyl}_3\text{Ac}_2\text{MeGlcA}$, observado en el espectro de masas del bagazo de caña (hidrolizado) como un aducto de sodio en m/z 711

En reportes de la literatura sobre la composición de XOS en el bagazo de caña de azúcar, identificaron en su mayoría oligosacáridos de bajo peso molecular como aductos de sodio: xilobiosa (m/z 305.25), xilotriosa (m/z 437.69), xilotetraosa (m/z 569.51) y xilopentosa (m/z 701.78); además, de especies sustituidas por el ácido metilglucurónico y por un monómero de arabinosa (Reddy & Krishnan, 2016). Los iones reportados por los autores estaban presentes por debajo de m/z 1000, esto fue atribuido a que utilizaron una hidrólisis enzimática a partir de la enzima xilanasa de *Bacillus subtilis* KCX006, para la extracción de los XOS del material lignocelulósico. La enzima cruda xilanasa de *Bacillus subtilis* KCX006, contenía actividades de endoxilanasa, α -L-arabinosidasa y esterasa; la endoxilanasa es la enzima involucrada en la

conversión del polisacárido de xilano a oligosacáridos de xilosa (XOS), por otro lado, la arabinosidasa y la esterasa actúan en los puntos de ramificación en el esqueleto del xilano unido a los residuos de arabinosa y acetilo, respectivamente.

4.2.3. Caracterización por MALDI- TOF/MS del hidrolizado de pergamino de café. Los xilo-oligosacáridos obtenidos por autohidrólisis ácida del pergamino de café fueron analizados por la técnica MALDI/MS, utilizando la metodología descrita en la Sección 3.3.1.1. Se obtuvo el espectro de masas en modo de ionización positivo que se muestra en la Figura 9., en este caso, también se muestra el espectro en *full scan* y un *zoom* de la región entre m/z 700 y 1100. Además, todos los iones del pergamino de café (licor crudo) identificados en este ensayo, se encuentran en la Tabla 2.

Al comparar los oligosacáridos encontrados en las dos muestras analizadas, se puede concluir que tanto el bagazo de la caña de azúcar como el pergamino de café, sin tratamiento previo (licor crudo), presentan las mismas especies de xilo-oligosacáridos (XOS).

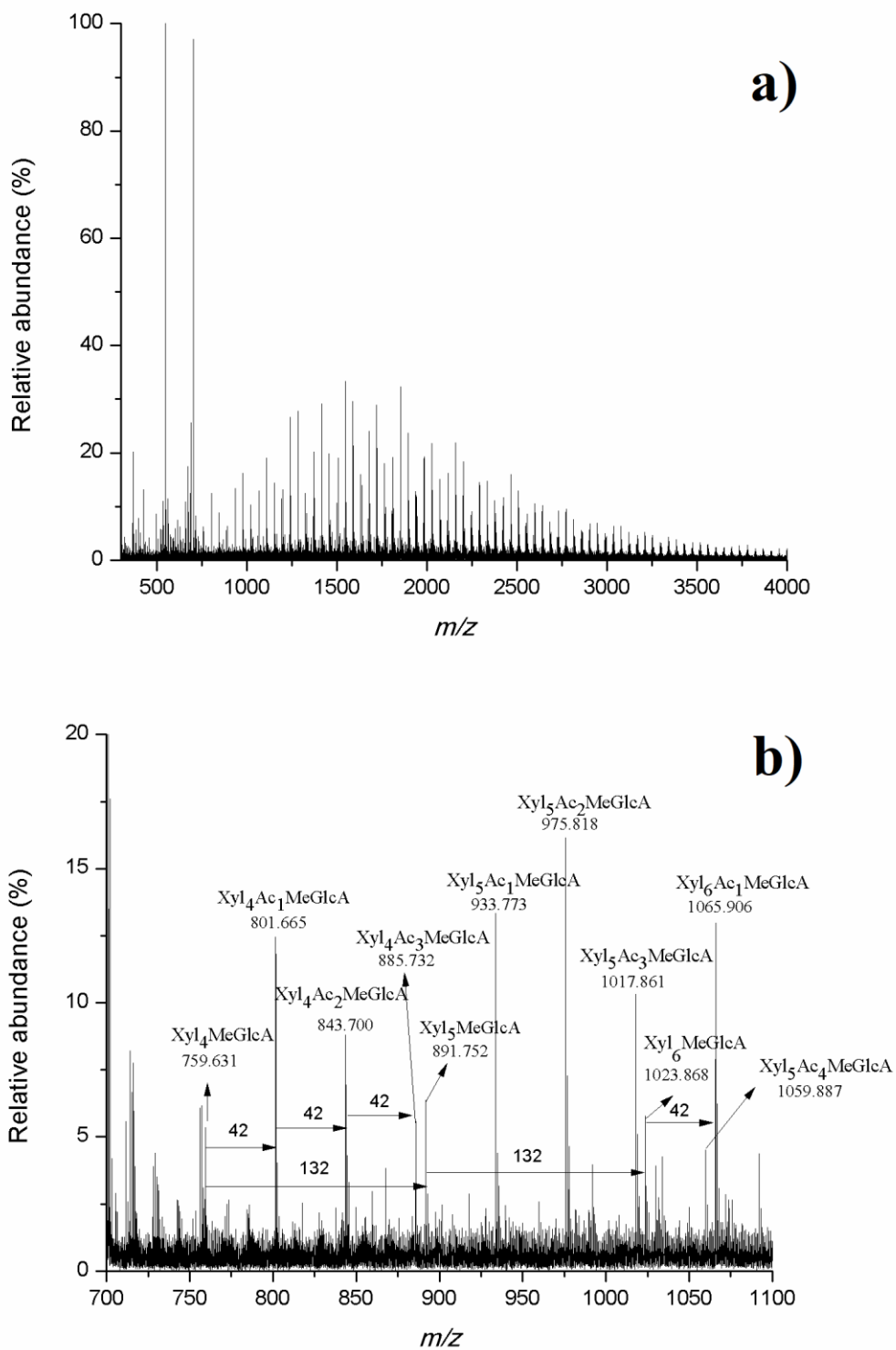


Figura 9. Espectro de masas MALDI del hidrolizado del pergamino de café (licor crudo), modo de ionización positivo, a) *full scan* y b) *zoom* en la región entre m/z 700-1100

Tabla 2.

Estructuras identificadas como aductos de sodio en la muestra de pergamino de café (licor crudo) por espectrometría de masas MALDI-TOF

[M + Na] ⁺	n O-grupo acetilo				
	0	1	2	3	4
Xyl₁MeGlcA	363.546				
Xyl₂MeGlcA	495.505	537.505			
Xyl₃MeGlcA	627.554	669.574	711.586		
Xyl₄MeGlcA	759.631	801.665	843.700	885.732	
Xyl₅MeGlcA	891.752	933.773	975.818	1017.861	1059.887
Xyl₆MeGlcA	1023.868	1065.906	1107.938	1149.976	1192.018
Xyl₇MeGlcA	1155.971	1197.927	1240.066	1282.096	1324.133
Xyl₈MeGlcA	1288.117	1330.148	1372.182	1414.218	1456.252
Xyl₉MeGlcA	1420.212	1462.266	1504.298	1546.337	1588.370
Xyl₁₀MeGlcA	1552.335	1594.380	1636.419	1678.458	1720.486
Xyl₁₁MeGlcA	1684.405	1726.489	1768.539	1810.572	1852.603
Xyl₁₂MeGlcA	1816.531	1858.601	1900.650	1942.684	1984.717
Xyl₁₃MeGlcA	1948.644	1990.675	2032.774	2074.800	2116.837
Xyl₁₄MeGlcA	2080.754	2122.824	2164.901	2206.912	2248.952
Xyl₁₅MeGlcA	2212.920	2254.937	2296.980	2338.971	2380.964
Xyl₁₆MeGlcA	2344.925	2386.758	2428.037	2470.057	2512.091
Xyl₁₇MeGlcA	2476.059	2518.097	2560.129	2602.167	2644.214
Xyl₁₈MeGlcA	2608.179	2650.194	2692.259	2734.313	2776.357
Xyl₁₉MeGlcA	2740.295	2782.365	2824.346	2866.446	2908.412
Xyl₂₀MeGlcA	2872.396	2914.469	2956.522	2998.529	
Xyl₂₁MeGlcA	3004.674	3046.632	3088.763	3130.851	

En la Figura 9. a), se identificó aductos de sodio monocargados [M+Na]⁺ en un rango masas de m/z 300- 3100. En la Figura 9. b), se puede observar que las señales separadas por 42 unidades corresponden a familias de oligosacáridos con diferente número de grupos acetilo, mientras que una separación de 132 unidades corresponde a la adición de una unidad de xilosa en la cadena. Además, se identificó la presencia de diferentes familias de oligómeros conformadas

principalmente de una cadena de unidades de xilosa (Xyl), a la cual se unen grupos laterales como el ácido metilglucorónico (MeGlcA) y hasta cuatro grupos acetilo (XylAc₀₋₄MeGlcA). La distribución corresponde a 21 oligómeros de la familia XylMeGlcA (grado polimerización (DP) 1-21), 20 oligómeros tipo XylAc₁MeGlcA (DP=2-21), 19 oligómeros XylAc₂MeGlcA (3-21), 18 oligómeros XylAc₃MeGlcA (DP=4-21) y 15 oligómeros XylAc₃MeGlcA (DP=5-19).

Estos resultados concuerdan con las familias con un residuo ácido 4-O-metilglucorónico (Xyl_nMeGlcA, n = 1-8) sin ningún sustituyente encontradas en el estándar de xilano y con el reporte de Ana Reis *et al*, quienes reportaron la caracterización de xilo-oligosacáridos (XOS) extraídos de madera de *Eucalyptus globulus*, observaron las mismas especies que fueron identificadas en este proyecto de investigación (Ana Reis et al., 2005).

En la Figura 10 se ilustra de forma esquemática la estructura propuesta para el ion encontrado en la muestra de pergamino de café (hidrolizado). Las familias de XOS en las dos muestras son las mismas debido al método de extracción empleado.

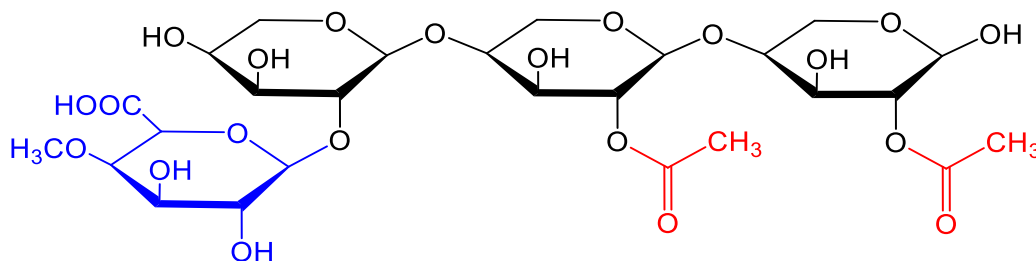


Figura 10. Estructura química posible del ion Xyl₃Ac₂MeGlcA, observado en el espectro de masas del pergamino de café (hidrolizado) como un aducto de sodio en m/z 711

4.2.4. Caracterización por MALDI- TOF/MS de la muestra de pergamino de café purificada. La caracterización por espectrometría de masas MALDI-TOF de la muestra de pergamino de café se realizó siguiendo la metodología descrita en la Sección 3.3.1.1. En la Figura 11, se muestra el espectro de masas MALDI-TOF, modo de ionización positivo, obtenido para la muestra de pergamino de café purificado, y en la Tabla 3, se encuentran todos los iones identificados en dicho espectro.

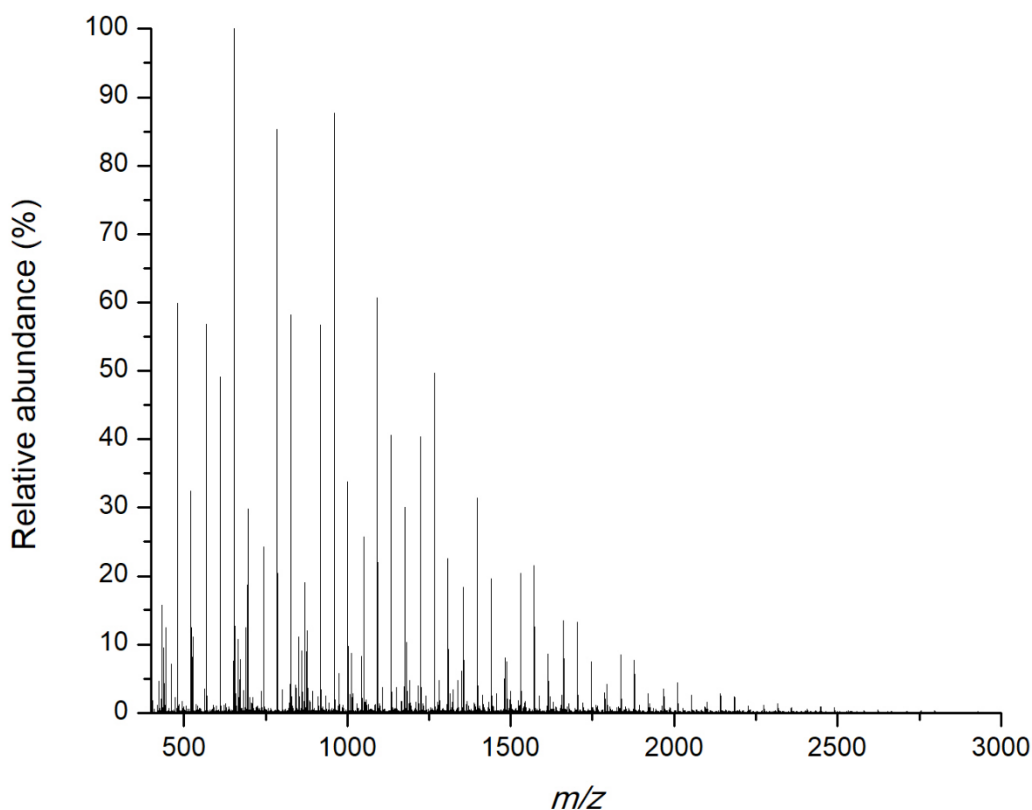


Figura 11. Espectro de masas MALDI-TOF, *full scan*, de la muestra purificada de pergamino de café, modo de ionización positivo

Como se puede observar en la Figura 11 y en la Tabla 3, y comparando con los resultados mostrados en la Figura 9 y en la Tabla 2, después del procedimiento de purificación que se le realizó a la muestra de pergamino de café crudo para la obtención de XOS neutros, también se logró identificar familias de oligosacáridos en el rango de m/z 400-2900, compuestos por una cadena principal de unidades de xilosa (diferencia de 132 Da) con un grado de polimerización de DP = 3-19, y la presencia de grupos acetilo (diferencias de 42 Da), se logró observar especies con hasta diez acetilos como grupos laterales en su estructura.

Tabla 3.

Estructuras identificadas como aductos de sodio en la muestra de café pergamino purificado, por espectrometría de masas MALDI-TOF.

[M+Na] ⁺	n O-grupo acetilo										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Xyl ₃	437.120	479.129	521.136	563.143							
Xyl ₄	569.126	611.171	653.182	695.195	737.224						
Xyl ₅		743.217	785.228	827.240	869.253						
Xyl ₆		875.271	917.275	959.285	1001.299	1043.311					
Xyl ₇		1007.301	1049.321	1091.333	1133.346	1175.361	1217.360				
Xyl ₈			1181.365	1223.379	1265.390	1307.400	1349.374				
Xyl ₉			1313.394	1355.424	1397.436	1439.448	1481.458	1523.466			
Xyl ₁₀			1445.453	1487.489	1529.478	1571.492	1613.501	1655.514			
Xyl ₁₁				1619.507	1661.527	1703.535	1745.545	1787.581	1829.589		
Xyl ₁₂				1751.551	1793.562	1835.575	1877.586	1919.595	1961.599		
Xyl ₁₃					1925.609	1967.614	2009.624	2051.632	2093.646	2135.624	
Xyl ₁₄						2099.652	2141.658	2183.673	2225.673	2267.675	
Xyl ₁₅						2231.271	2273.700	2315.704	2357.723	2399.726	
Xyl ₁₆						2363.686	2405.719	2447.737	2489.739	2531.741	2573.637
Xyl ₁₇							2537.735	2579.767	2621.761	2663.771	
Xyl ₁₈								2711.804	2753.779	2795.774	2837.786
Xyl ₁₉								2843.808	2885.760	2927.799	

En la muestra de pergamino de café purificada se logra apreciar la remoción o el desplazamiento del grupo ácido (MeGlcA) presente en las moléculas de XOS encontradas en las muestras que provenían directamente de la etapa de la autohidrólisis ácida, además, se logran observar una

mayor cantidad de sustituyentes correspondientes al grupo acetilo a medida que el grado de polimerización aumenta en las estructuras encontradas, llegando a observarse hasta 10 sustituyentes acetilo para la cadena compuesta por 19 residuos de xilosa de la cadena principal. Los iones Xyl_3 m/z 437 y Xyl_4 m/z 569, además de los iones $\text{Xyl}_{3-7}\text{Ac}_1$ fueron encontrados en el estándar de la sección 4.2.1.

4.2.4.1. Fragmentación de xilo-oligosacáridos con estructura Xyl_n . Con el objetivo de confirmar las estructuras propuestas de cada una de las familias de iones identificados anteriormente, se realizaron ensayos MS/MS con disociación inducida por colisión (CID). En la Figura 12, se muestran los patrones de fragmentación para los iones 437.06 y 569.3, los cuales corresponden a $[\text{M} + \text{Na}]^+ \text{Xyl}_n$ con $n = 3,4$; iones identificados en la muestra de pergamino de café purificado. Para la identificación de cada uno de los fragmentos formados por CID se utilizó la nomenclatura propuesta por Domon y Costello, descrita anteriormente (Domon & Costello, 1988).

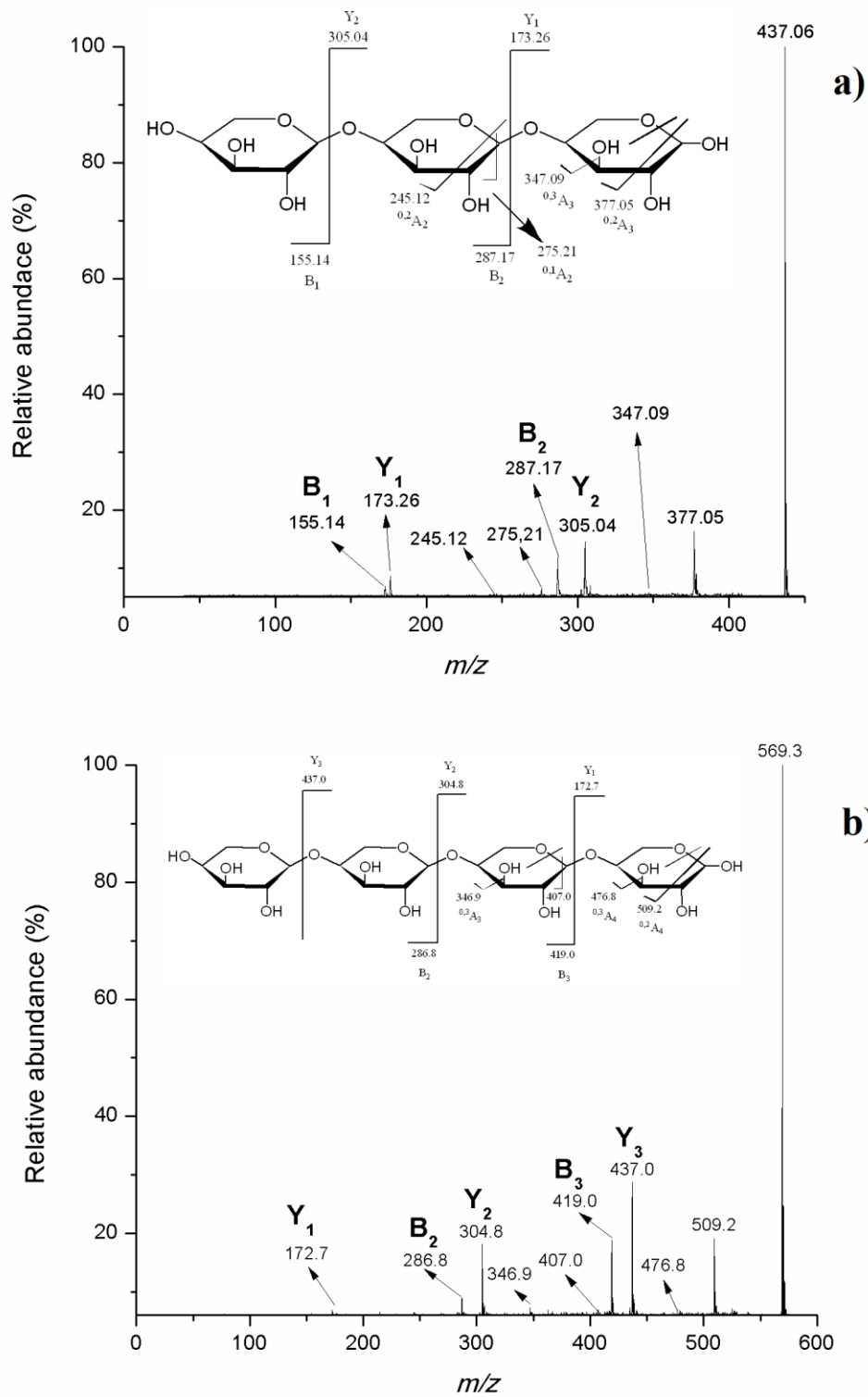


Figura 12. Espectro de masas MALDI-MS/MS de los iones $[M+Na]^+$ del pergamino de café. (a) Xyl₃ (m/z 437), (b) Xyl₄ (m/z 569)

Como se muestra en la Figura 12, se obtuvieron los patrones de fragmentación de algunos iones de interés identificados previamente en la muestra de XOS de pergamino de café, las rutas de fragmentación muestran principalmente el rompimiento del enlace glucosídico entre los residuos de xilosa y la escisión de dos enlaces a través de un anillo.

Los espectros MS/MS de los iones $[M + Na]^+ Xyl_n$, m/z 437 y 569, para $n = 3,4$; (Véase Figura 12), mostraron una serie de iones fragmentos diferenciados por 132 Da, las cuales son atribuidas a escisiones glucosídicas (fragmentos Y/B) y a escisiones en algunos de los anillos (fragmentos de tipo A). Además, se observan iones $^{0,2}A$ ($M - 60$) e iones $^{0,3}A$ ($M - 90$), que corresponden a escisiones de anillos que indican que estas unidades de monosacáridos presentan en su estructura un enlace β -(1 \rightarrow 4).

En el espectro MS/MS del Xyl_3 , m/z 437 (Véase Figura 12 a)), los fragmentos de tipo B corresponden a los iones m/z 155 (B_1) y m/z 287 (B_2); los fragmentos de tipo Y corresponden a los iones m/z 173 (Y_1) y m/z 305 (Y_2). Los fragmentos del tipo A se observaron en los residuos 2 y 3 del lado reductor, estando presente los iones con pérdida de 30 Da ($^{0,1}A_2$), iones con pérdida de 60 Da ($^{0,2}A_2$, $^{0,2}A_3$) y iones con pérdida de 90 Da ($^{0,3}A_3$). El espectro MS/MS del Xyl_4 m/z 569, (Véase Figura 12 b)) de manera similar, presenta iones del tipo Y e iones del tipo B, separados por 132 Da, los cuales corresponden a cortes en el enlace glucosídico; además, también se observó la presencia de iones fragmentos típicos correspondientes a fragmentos de anillo del tipo $^{0,1}A_3$ (-30 Da), $^{0,3}A_3$ (-90 Da), $^{0,2}A_4$ (-60 Da) y $^{0,3}A_4$ (-90 Da).

4.3. Caracterización química por ESI-IT/MS de las muestras no derivatizadas

4.3.1. Caracterización por ESI-IT/MS de la muestra de pergamino de café purificada. La muestra de pergamino de café de más alta pureza, suministrada por la Dra. Debora Nabarlatz, fue preparada de manera individual como se describió en la Sección 3.3.1.2. de la metodología. En la Figura 13 a), se muestra el espectro de masas ESI-IT, obtenido en modo de ionización positivo, en la parte b) se muestra un *zoom* del espectro de masas en la región de m/z 700 a 1100.

En la Tabla 4, se encuentran los compuestos identificados por espectrometría de masas ESI-IT, en la muestra de pergamino de café purificada. Los compuestos identificados por MS ESI-IT están en un rango de masas de m/z 300-1800, en comparación con los espectros MALDI en modo de ionización positivo, donde se identificó compuestos en un rango de masas entre m/z 300 -3000.

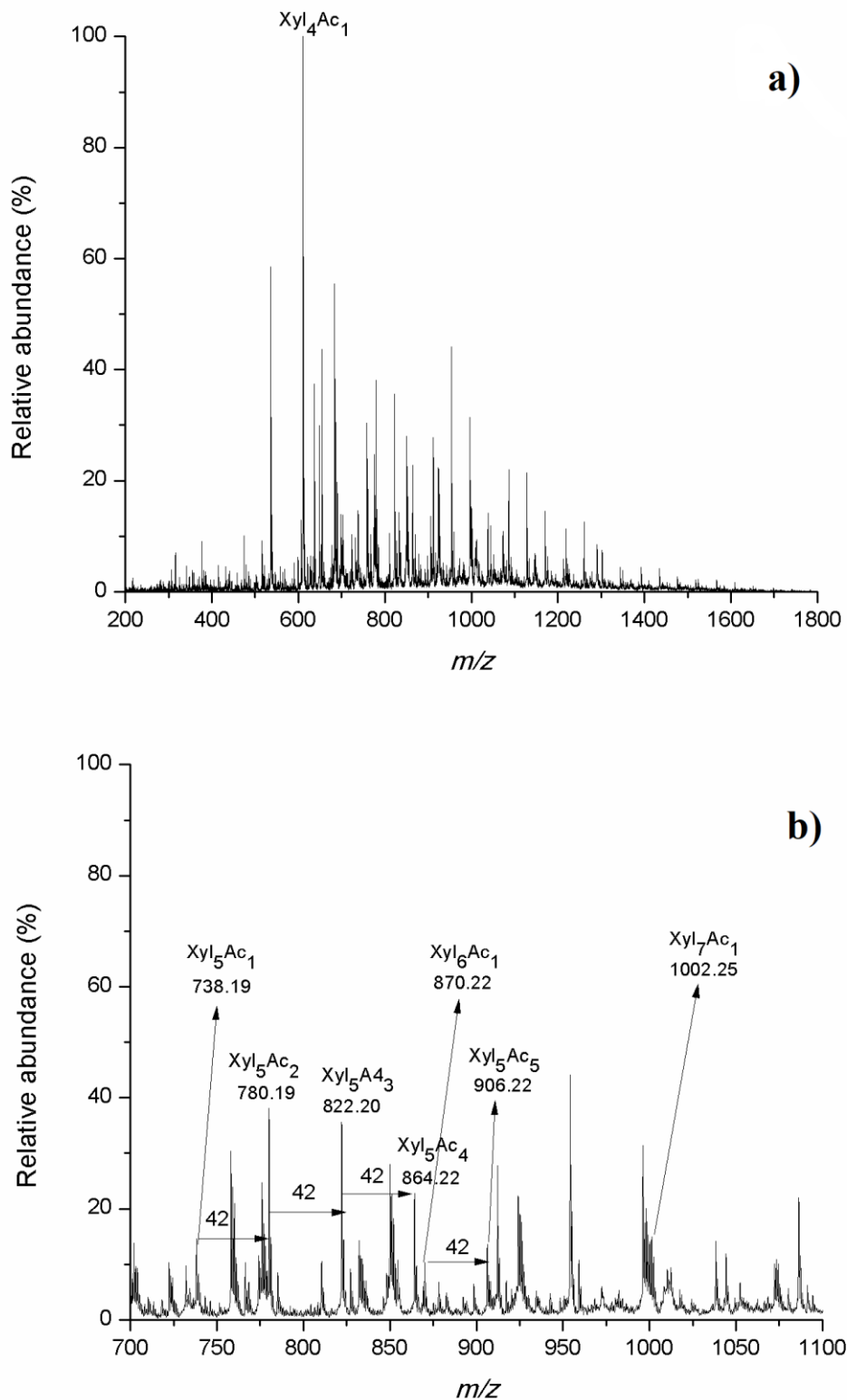


Figura 13. Espectro de masas ESI de la muestra de pergamino de café purificada, modo de ionización positivo, a) *full scan* y b) *zoom* de m/z 700-1100

Tabla 4.

Estructuras identificadas como aductos de amonio, por espectrometría de masas ESI-IT, del café pergamino purificado.

[M+NH ₄] ⁺	n O-grupo acetilo							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Xyl₂		342.13	384.63	426.21	468.31			
Xyl₃	432.09	474.05	516.07	558.08			684.09	
Xyl₄	564.09	606.10	648.11	690.14	732.17	774.13	816.34	
Xyl₅		738.19	780.19	822.20	864.22	906.22	948.35	
Xyl₆		870.22	912.25	954.26	996.29	1038.30	1080.32	1122.35
Xyl₇		1002.25	1044.25	1086.32	1128.34	1170.35	1212.38	1254.36
Xyl₈		1134.38	1176.37	1218.36	1260.40	1302.41	1344.42	1386.44
Xyl₉		1266.38	1308.35	1350.41	1392.44	1434.45	1476.46	1518.47
Xyl₁₀			1440.50	1482.45	1524.47	1566.48	1608.47	1650.52
Xyl₁₁			1572.38		1656.37	1698.48	1740.52	1782.38

Comparando los resultados obtenidos por espectrometría de masas ESI-IT para el pergamino de café purificado (Véase Figura 13 y Tabla 4) con los resultados obtenidos por MS MALDI-TOF (Véase Figuras 9 y 11, Tablas 2 y 3), se puede observar que en el análisis vía ESI-IT, los compuestos identificados presentaron valores de m/z menores, comparados con la misma muestra analizada por MALDI-TOF. Esto indica que los xilo- oligosacáridos de altos pesos moleculares tienen baja eficiencia de ionización por MS ESI-IT. Se ha reportado en la literatura que la eficiencia de ionización en espectrometría de masas MALDI-TOF para oligómeros de carbohidratos neutros, es constante a medida que aumenta el tamaño de la molécula, en contraste con la eficiencia de ionización de estos mismo compuestos en una fuente de ionización como ESI, donde la eficiencia de ionización disminuye con el tamaño de la molécula (Zaia, 2004).

Los iones monocargados en ESI corresponden a especies $[M + NH_4]^+$, cuya formación está influenciada por el agente cationizante (NH₄OH), asignados a 2 oligómeros conformados

exclusivamente de xilosa (Xyl_n , $n=3,4$) sin ningún sustituyente con m/z 432.09 y m/z 564.09, respectivamente. El resto de las especies identificadas están sustituidas por hasta 7 grupos acetilo del tipo (Xyl_nAc_{0-7}), donde el ion conformado por 11 xilasas y 7 grupos acetilo ($Xyl_{11}Ac_7$), es el de mayor peso molecular. Además, se observó el ion $[M+Na]^+$ m/z 611.43, correspondiente a Xyl_4Ac_1 , siendo este último el ion pico de base. Si comparamos estos los resultados obtenidos por ESI, con los resultados de espectrometría de masas MALDI para la misma muestra de pergamino de café purificado, podemos observar que son las mismas especies diferenciadas por 5 unidades de masa, debido al aducto que se forma en cada caso, ya sea con Na^+ o con NH_4^+ (Véase Figura 13 b)).

4.3.2. Fragmentación de xilo-oligosacáridos con estructura $XylnAcn$. Se tomaron dos iones representativos de la muestra de pergamino de café purificada, con estructuras Xyl_4Ac_1 (m/z 606) y Xyl_5Ac_2 (m/z 780), para las pruebas de fragmentación (CID), las cuales permitirían conocer las posiciones de los grupos laterales (Ac). Se observó que la principal vía de fragmentación de estas moléculas es la escisión del enlace glucosídico, pero antes de esta ruptura, se da la pérdida de un residuo de amoniaco (NH_3), luego de esta pérdida, el ion queda protonado $[M+H]^+$. Además, se observó la formación de iones del tipo B/C. En la Figura 14 se muestra el espectro MS/MS del aducto de amonio Xyl_4Ac_1 (m/z 606) y, en la Figura 15, se muestran algunas posibles rutas de fragmentación de los isómeros estructurales del ion m/z 606.

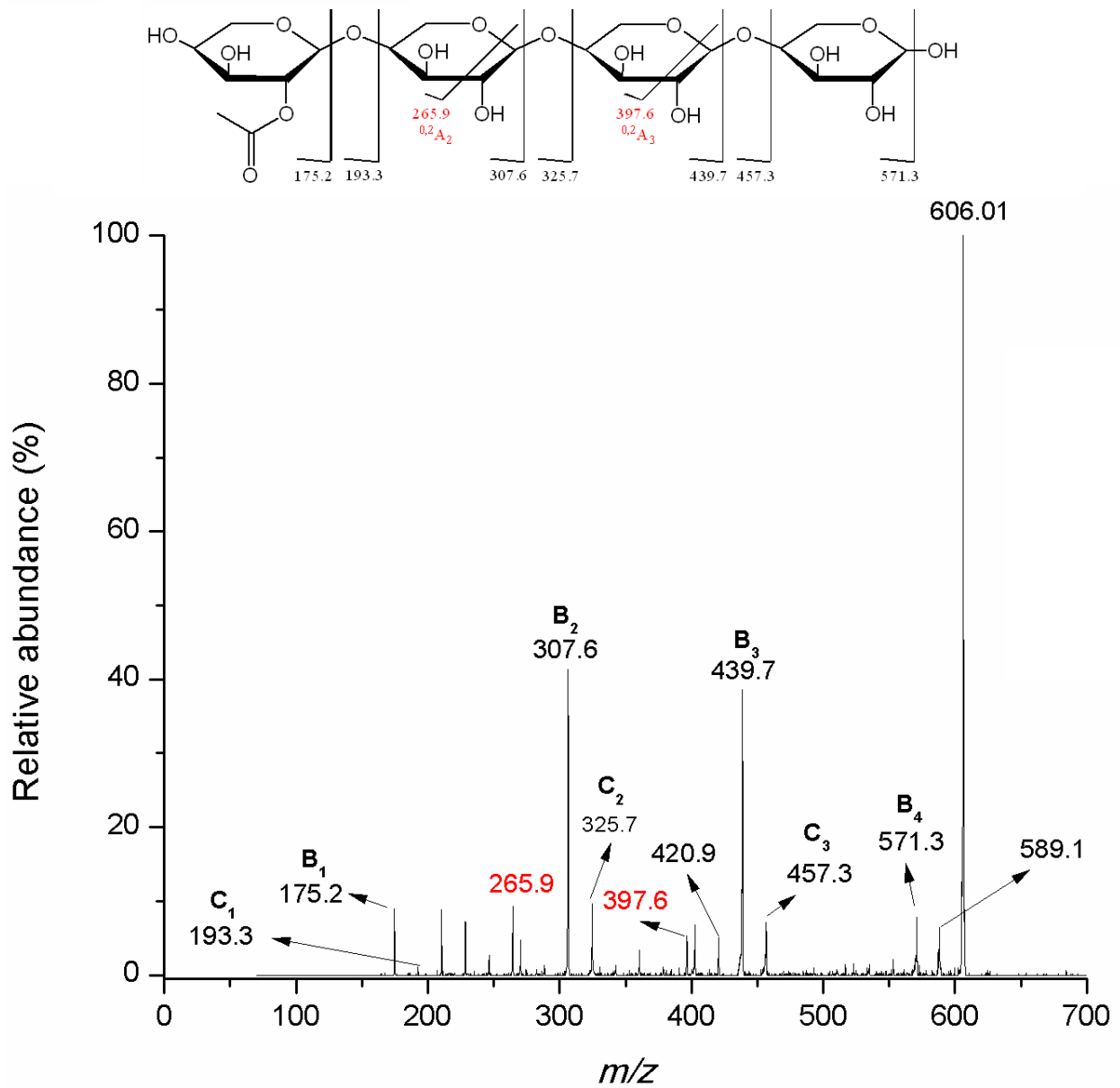


Figura 14. Espectro de masas ESI-MS/MS del ion $[M+NH_4]^+$ Xyl₄Ac₁ (m/z 606)

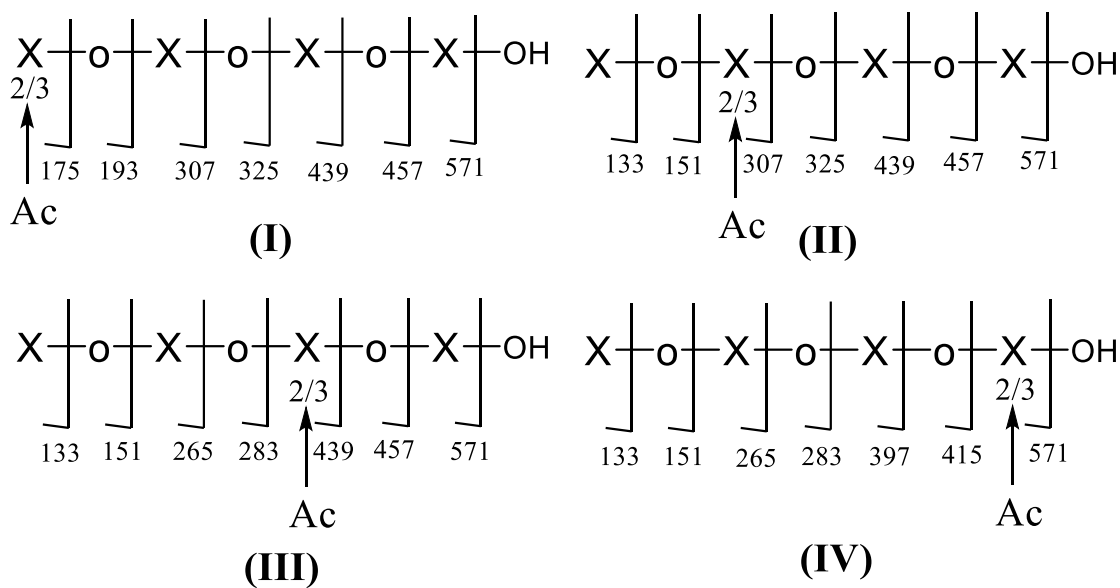


Figura 15. Vías de fragmentación posibles para los isómeros del ion m/z 606

En la Figura 14, se puede observar el ion m/z 589, que corresponde a la pérdida de una molécula neutra de NH_3 , es decir, la formación del ion protonado. Los iones de tipo B se observaron en m/z 571 (B_4), 439 (B_3), 307 (B_2) y 175 (B_1). Los iones de tipo C se observaron en m/z 457 (C_3), 325 (C_2), y 193 (C_1). La estructura planteada para la fragmentación del ion Xyl_4Ac_1 (m/z 606) presenta una relación con los iones fragmento que se encontraron en el espectro de masas, pues los iones tipo B y C son los que se presentan de manera preferente. Además, en el espectro MS/MS se pueden observar iones formados por escisiones a través de anillo de algún monómero de xilosa ($^{0,2}A_n$); aun así, no es posible identificar si el grupo acetilo se encuentra en la posición C_2 o C_3 del residuo de xilosa del extremo no reductor. Sin embargo, es posible que los 8 isómeros estructurales del ion m/z 606 (Véase Figura 15), aporten a la abundancia de cada ion fragmento.

En el caso del ion conformado por Xyl_5Ac_2 (m/z 780), del mismo modo se pudo identificar la tendencia a formar iones del tipo B y C a lo largo de la cadena principal. Se observó el ion m/z 763

atribuido a la pérdida de NH₃, igual que en el caso anterior. Para el isómero representado en la Figura 16 se logra identificar la mayoría de los iones fragmentos encontrados en el espectro MS/MS del ion *m/z* 780, aun así, debido a la complejidad del espectro MS/MS del ion [M+NH₄]⁺ Xyl₅Ac₂ (*m/z* 780), no se logró asignar los iones que se muestran en color azul, *m/z* 216.9 y 349.0.

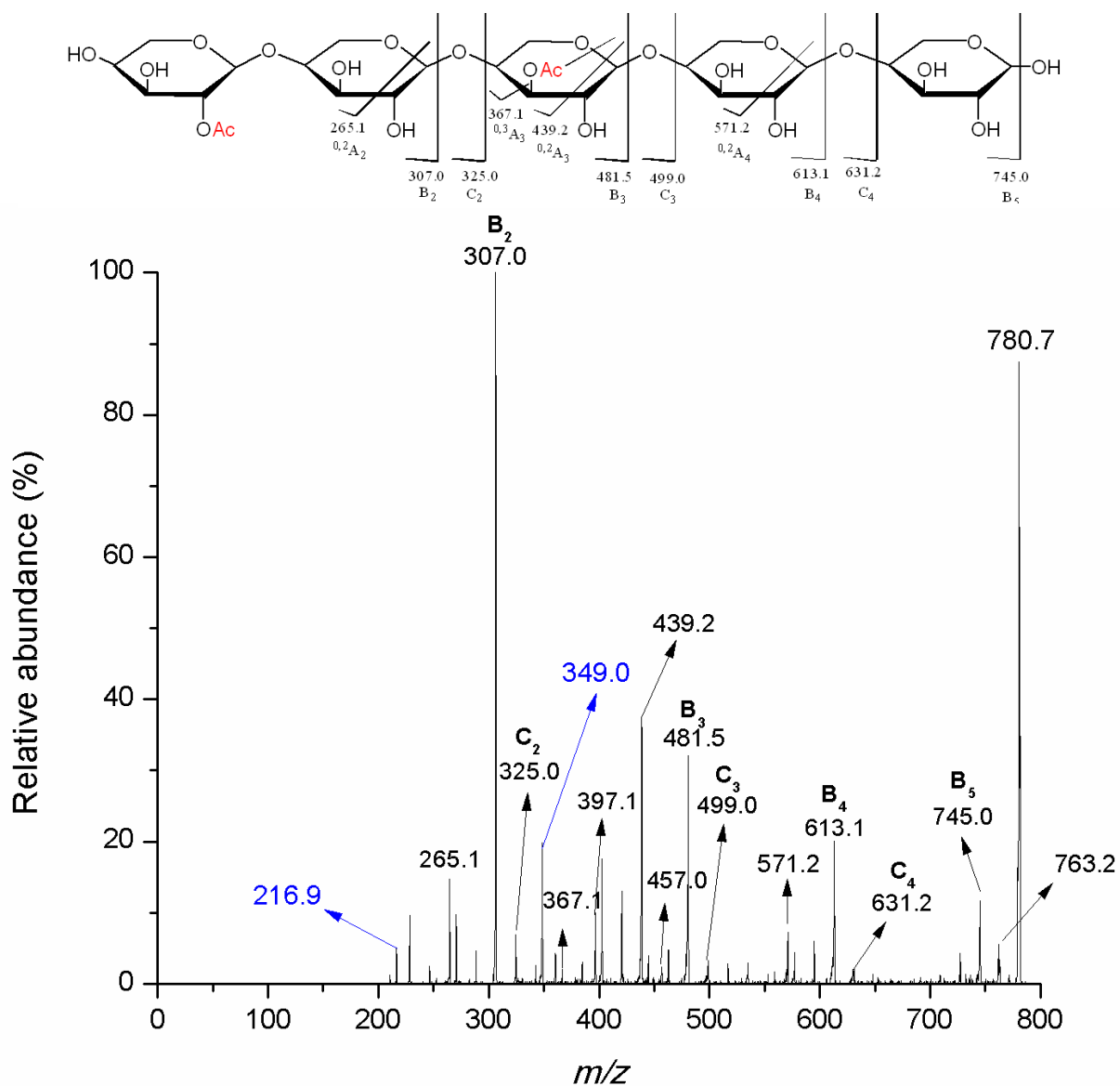


Figura 16. Espectro de masas ESI-MS/MS del ion [M+NH₄]⁺ Xyl₅Ac₂ (*m/z* 780)

Se cree que isómeros (II) es el ion que aporta una mayor abundancia a la intensidad del espectro debido a la preferencia a obtener escisiones de los enlaces glucosídicos con el isómero (IV) de la Figura 17. Los 2 grupos acetilos se pueden ubicar en los 3 primeros residuos de xilosa del lado no reductor de la cadena, esto debido a que los iones tipo B₃ (*m/z* 481), B₄ (*m/z* 613), B₅ (*m/z* 745), C₃ (*m/z* 499) y C₄ (*m/z* 631) de los 18 isómeros son los mismos y se pueden identificar en el espectro MS/MS obtenido. Los iones fragmento *m/z* 216.9 y 349.0 no pueden explicarse por la estructura propuesta en la Figura 16 que corresponde al isómero (II), pero pueden atribuirse a los isómeros (I) para el ion *m/z* 216.9 y a los isómeros (I, III y VI) para el ion *m/z* 349.0 de la Figura 17. Las escisiones de anillo tipo A vistas en esta estructura también pueden atribuirse a escisiones glucosídicas de otros isómeros.

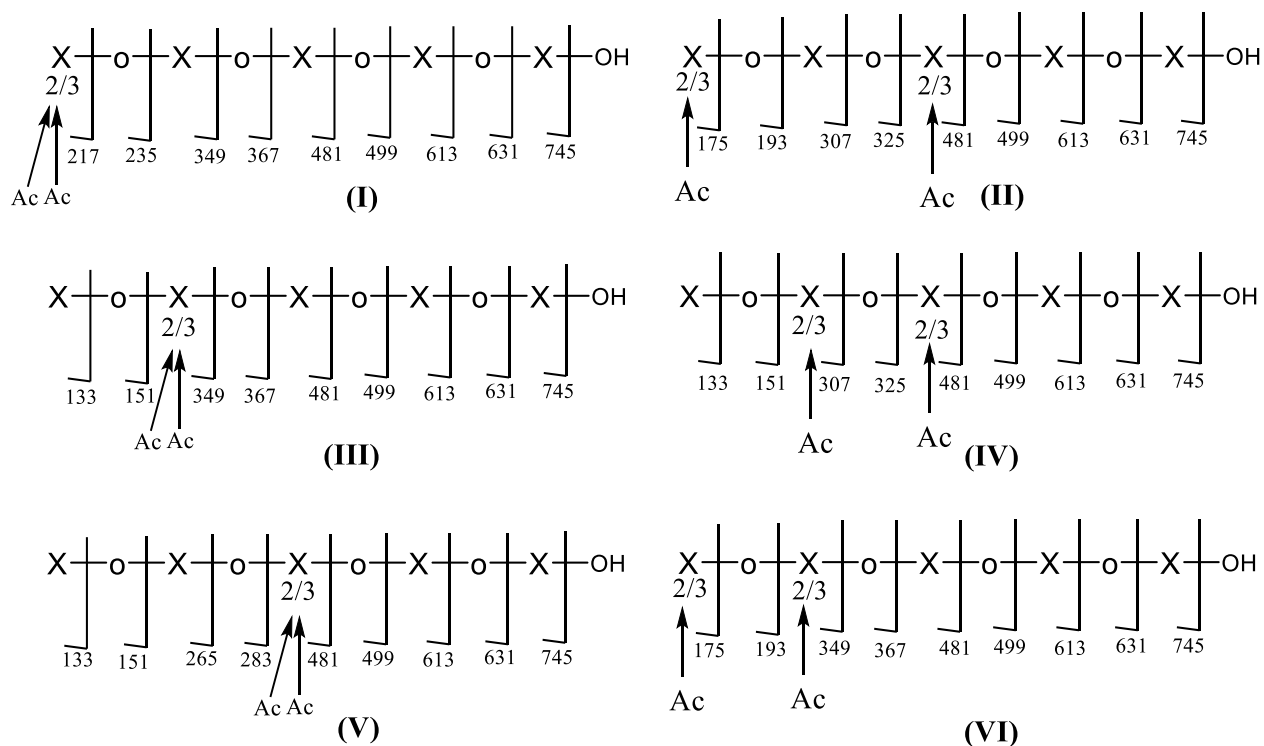


Figura 17. Vías de fragmentación posibles para los isómeros del ion en *m/z* 780

4.4. Derivatización de Xilo- oligosacáridos

4.4.1. Caracterización por MALDI-TOF/MS de la muestra de pergamino de café purificada (per-O-metilación). La permetilación seguida por análisis por espectrometría de masas se realizó para obtener información de las estructuras con respecto al número de residuos de ramificación de grupos acetilo y su disposición a lo largo de la cadena lineal de xilosa. La permetilación se realizó por el método descrito previamente con buenos porcentajes de rendimiento, alrededor de 98.8 ± 1.1 % (Ciucanu, I., Kerek, 1984), descrito en la metodología Sección 3.4. La introducción de grupos metilo (CH_3) reemplaza los grupos hidroxilo libres de la cadena principal de xilosa con el resultado de que los monómeros con ramificaciones se metilarán en menos posiciones que los no ramificados. Esto permite identificar los residuos ramificados de los no ramificados mediante una disminución de 14 unidades en masa por punto de ramificación (Matamoros Fernández et al., 2003). El espectro MALDI del café pergamino purificado se muestra en la Figura 18 a), donde se observa una distribución similar a la encontrada en la muestra no derivada, y, las especies encontradas se resumen en la Tabla 5.

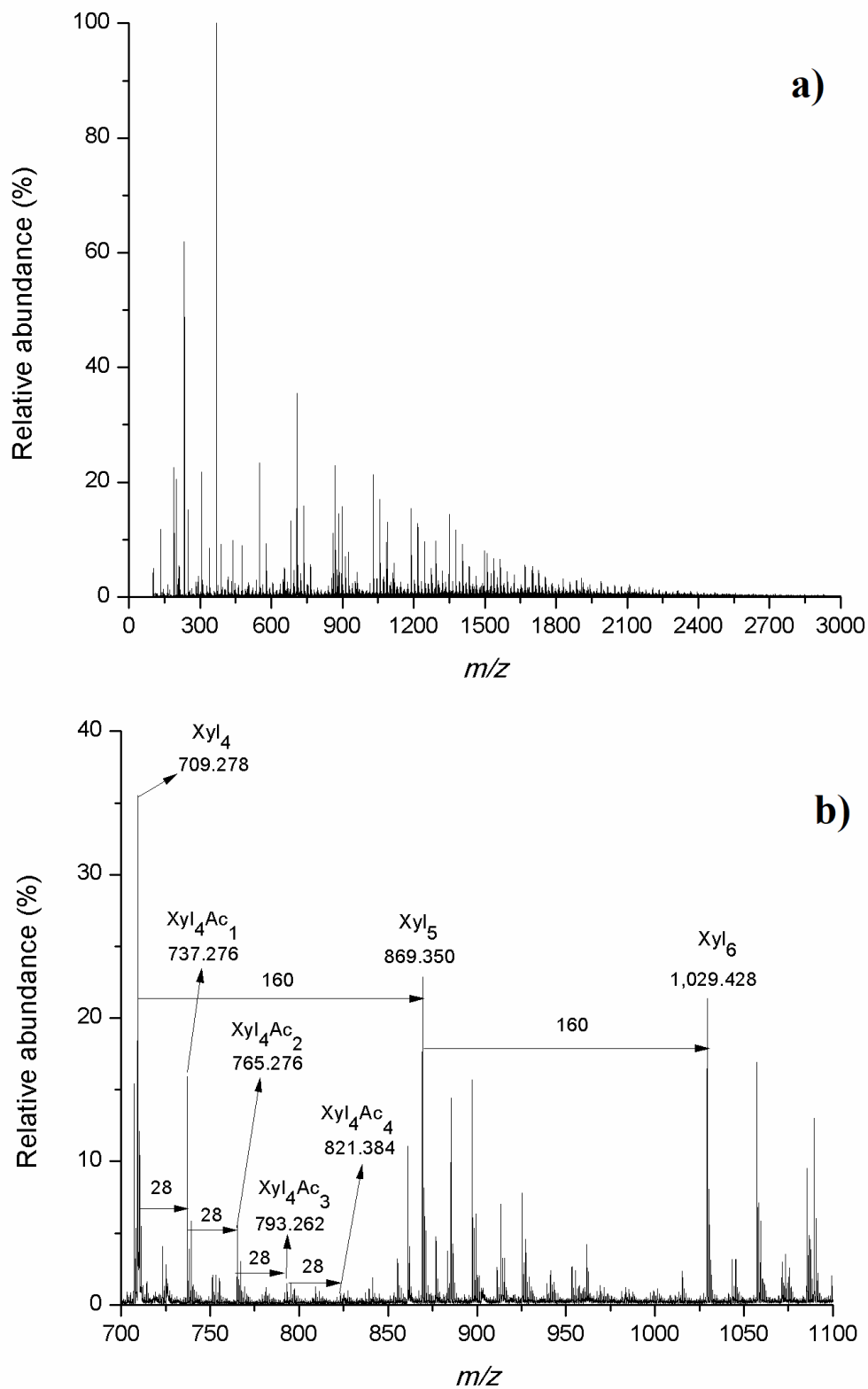


Figura 18. Espectro de masas MALDI de la muestra de pergamino de café ultra purificada derivatizada (per-O-metilación), modo de ionización positivo, a) full scan y b) zoom m/z 700-1100

Tabla 5.

Estructuras atribuidas a los aductos de sodio del café pergamino purificado (metilación)

[M+Na] ⁺	n O-grupo acetilo				
	0	1	2	3	4
Xyl₂	389.154	417.148	445.001		
Xyl₃	549.214	577.213	605.205	633.254	661.292
Xyl₄	709.278	737.276	765.276	793.262	821.384
Xyl₅	869.350	897.349	925.348	953.332	981.354
Xyl₆	1029.428	1057.426	1085.429	1113.430	1141.412
Xyl₇	1189.505	1217.507	1245.506	1273.510	1301.481
Xyl₈	1349.588	1377.587	1405.584	1433.580	1461.571
Xyl₉	1509.659	1537.664	1565.663	1593.652	1621.703
Xyl₁₀	1669.731	1697.729	1725.736	1753.723	1781.706
Xyl₁₁	1829.914	1857.802	1885.790	1913.806	1941.789
Xyl₁₂	1989.869	2017.856	2045.878	2073.859	2101.856
Xyl₁₃	2149.936	2177.914	2205.919	2233.985	2261.888
Xyl₁₄	2309.955	2337.989	2365.994	2393.955	

En la Figura 18 a), se observa una distribución similar a la encontrada en la muestra no derivada (Véase Figura 11). Se logra encontrar iones del tipo [M + Na]⁺ con 13 especies Xyl_n con DP = 2-14 y familias del tipo Xyl_nAc₁₋₄ con igual grado de polimerización. En este caso se logra apreciar diferencias de 160 Da por cada residuo de xilosa y diferencias de 28 Da por cada unidad adicional de grupo acetilo atribuidas a la diferencia entre COCH₃ (43 g/mol) - CH₃ (15 g/mol) Figura 18 b).

4.4.2. Caracterización por ESI-IT/MS de la muestra de pergamino de café purificada (per-O-metilación). Se caracterizó la muestra de pergamino de café obtenida después de la reacción de

per-O-metilación por espectrometría de masas ESI-IT, se muestra en espectro obtenido en la Figura 19. Comparando las especies encontradas (ordenadas en la Tabla 6) para esta muestra, se obtuvieron las mismas especies que su homólogo espectro en MALDI-TOF con la diferencia de que los iones están presentes como aductos de amonio $[M+NH_4]^+$ en un rango de m/z 400-1800. La diferencia de las dos técnicas de ionización es debida a la baja eficiencia de ionización para moléculas de masas moleculares altas en los espectros ESI, posiblemente causado por el tipo de analizador que usa. Los instrumentos IT se caracterizan por tener una elevada sensibilidad y obtener una rápida adquisición de datos, sin embargo, los analizadores IT tienen una resolución limitada y una relativamente baja capacidad de atrapar iones.

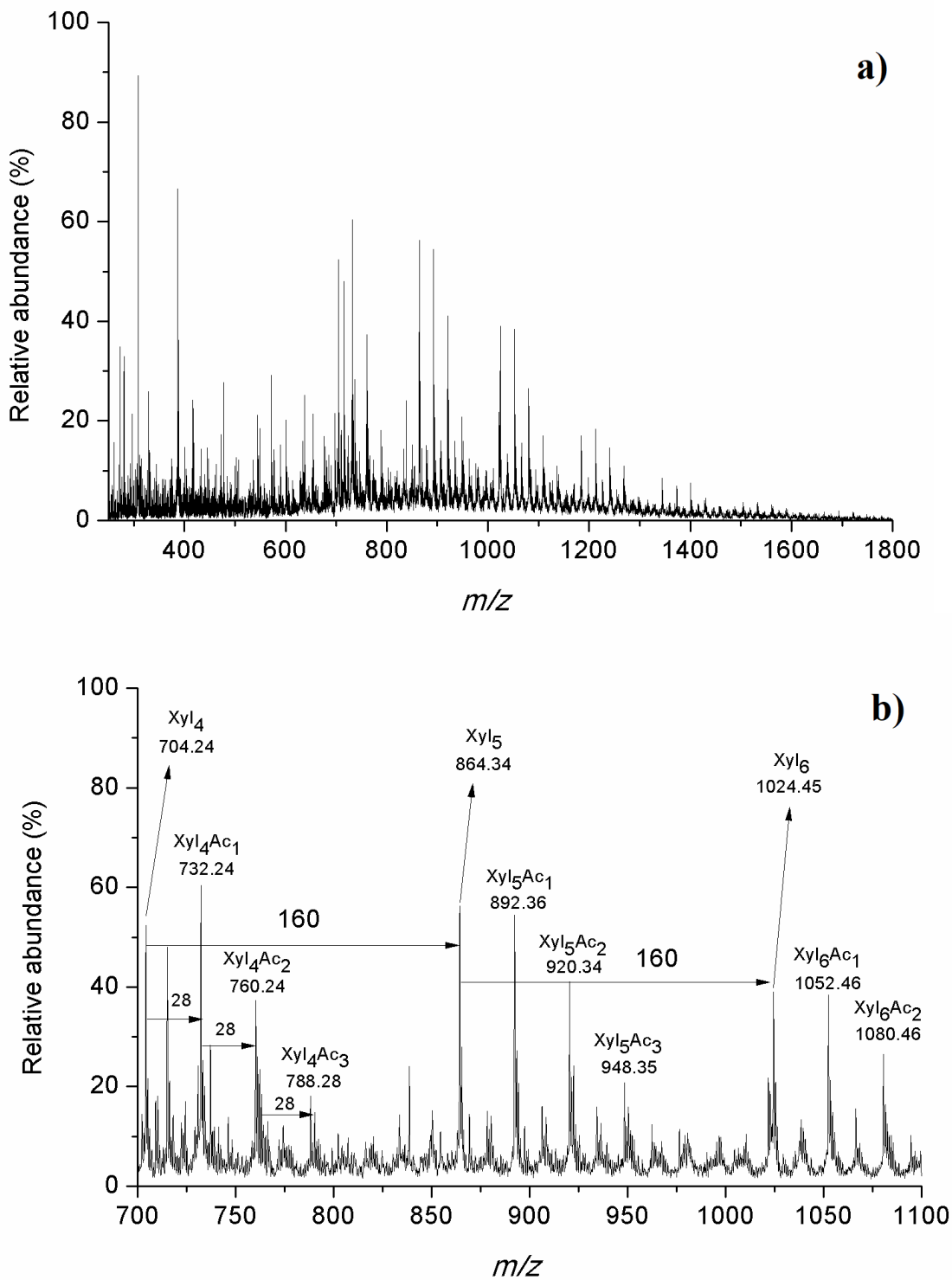


Figura 19. Espectro de masas ESI de la muestra de pergamino de café purificada derivatizada (per-O-metilación), modo de ionización positivo, a) full scan y b) zoom m/z 700-1100

Tabla 6.

Estructuras atribuidas a los aductos de NH_4^+ del café pergamino purificado(metilación)

$[M+NH_4]^+$	n O-grupo acetilo				
	0	1	2	3	4
Xyl₂	384.08	412.00	440.13		
Xyl₃	544.14	572.17	600.16	628.13	
Xyl₄	704.24	732.24	760.24	788.28	816.25
Xyl₅	864.34	892.36	920.34	948.35	976.35
Xyl₆	1024.45	1052.46	1080.46	1108.47	1136.44
Xyl₇	1184.55	1212.45	1240.49	1268.57	1296.59
Xyl₈	1344.60	1372.60	1400.62	1428.50	1456.57
Xyl₉	1504.61	1532.65	1560.60	1588.63	1616.55
Xyl₁₀	1664.77	1692.92	1720.60	1748.75	

De acuerdo a los datos anteriores, realizar la per-O-metilación de los xilo-oligosacáridos y posterior análisis por MS, se logra identificar que las especies propuestas en la muestra de pergamino de café no derivatizada son las que se encuentran presentes en esta muestra de oligosacáridos, debido a la cantidad de grupos metilo que se introducen en la molécula. Esto se evidencia en la Figura 20 donde al realizar la per-O-metilación del ion m/z 479 se confirma la estructura a la que corresponde el compuesto.

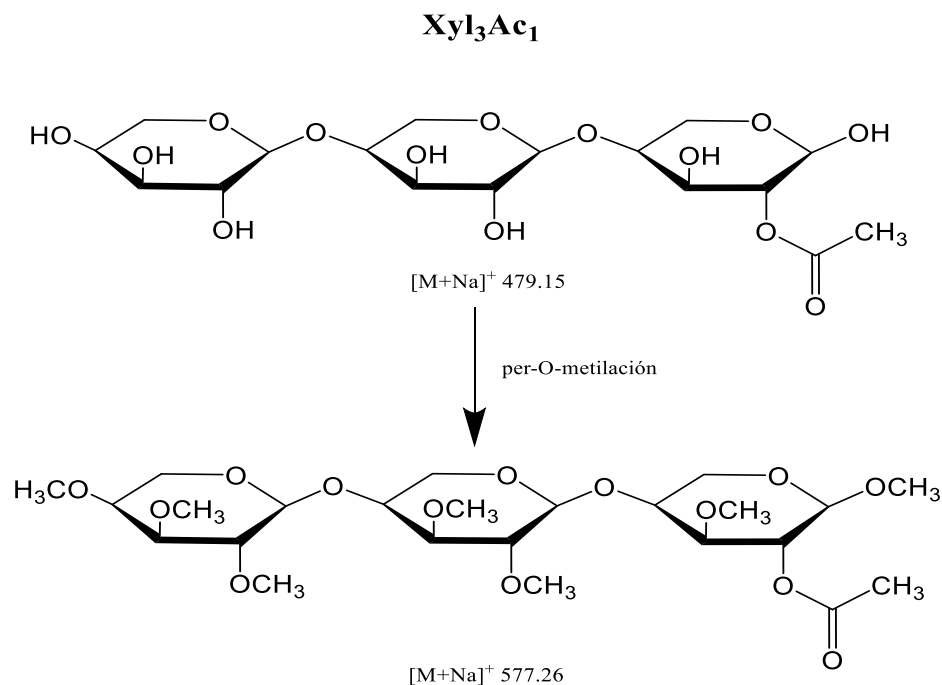


Figura 20. Esquema de la per-O-metilación del ion $[M + Na]^+$ 479.15 correspondiente a la estructura Xyl₃Ac₁

El ion $[M+Na]^+$ compuesto por Xyl₃Ac₁ con m/z 479 dispone de siete grupos hidroxilo que pueden ser per-O-metilados con el uso del yoduro de metilo (CH₃I) en las condiciones adecuadas, en la Figura 20 se observa que las 7 posiciones disponibles para la per-O-metilación son remplazadas, aumentando la masa molecular de la molécula en 7 unidades de CH₃. En un reporte anterior se utilizó esta estrategia para obtener información estructural sobre el número de residuos de ramificación de arabinosa y su disposición espacial a lo largo de la estructura principal de xilosa de oligosacáridos extraídos de trigo del género *Triticum aestivum* (Matamoros Fernández et al., 2003).

5. Conclusiones

La espectrometría de masas MALDI-TOF y ESI-IT demostraron ser una herramienta valiosa para la caracterización de xilo-oligosacáridos obtenidos por auto hidrólisis ácida, debido que estos oligosacáridos se producen de manera aleatoria durante la hidrólisis obteniendo una gran variedad de xilo-oligosacáridos.

Los espectros de masas MALDI-TOF y ESI-IT fueron similares, mostrando una distribución de xilo-oligosacáridos formados por aductos de sodio $[M + Na]^+$ y aductos de amonio $[M + NH_4]^+$, respectivamente. Se diferencian en que la ionización por electrospray tiene menor eficiencia de ionización para moléculas de mayor peso molecular.

Las muestras analizadas por MALDI-TOF provenientes del hidrolizado sin purificación de pergamino de café y de bagazo de caña de azúcar presentaron una composición similar de xilo-oligosacáridos. La distribución corresponde a 21 oligómeros de la familia XylMeGlcA Grado polimerización (DP=1-21), 20 oligómeros tipo XylAc₁MeGlcA (DP=2-21), 19 oligómeros XylAc₂MeGlcA (3-21), 18 oligómeros XylAc₃MeGlcA (DP=4-21) y 15 oligómeros XylAc₃MeGlcA (DP=5-19), en un rango de m/z 300- 3100.

La muestra de pergamino de café purificada analizada por MALDI-TOF logró identificar familias de oligosacáridos $[M+Na]^+$ en el rango de m/z de 400-2900, compuestos por una cadena principal de unidades de xilosa (diferencia de 132 Da) con un grado de polimerización de DP =3-19 y presencia de grupos acetilo (diferencias de 42 Da) llegando a observarse especies con hasta

diez acetilos como grupos laterales. Por su parte esta muestra analizada por ESI-IT logró identificar iones $[M + NH_4]^+$ conformados por dos oligómeros conformados exclusivamente de xilosa (Xyl_n , $n=3,4$) y el resto de las especies sustituidas por hasta 7 grupos acetilo del tipo (Xyl_nAc_{0-7}) con DP= 3-11, con un menor rango de masa m/z 400-1800.

Las fragmentaciones de algunos iones $[M + Na]^+$ por medio de las dos técnicas de ionización produjeron tanto escisiones glucosídicas como escisiones a través de los anillos. Fragmentaciones producidas por MALDI-TOF formaban preferiblemente escisiones glucosídicas del tipo Y / B y escisiones en los anillos de tipo A. Por su parte fragmentaciones por ESI-IT mostraban que la principal vía de fragmentación de estas moléculas se da por escisiones del enlace glucosídico, pero antes de esto se da la pérdida de un residuo de amoniaco (NH_3) con el cual el ion queda protonado $[M + H]^+$. Se observaron preferentemente la formación de iones del tipo B/C y iones tipo A atribuidos a escisiones de anillo.

La cantidad de sustituyentes que contenía la cadena principal del xilo-oligosacárido aumentaba la dificultad para analizar los espectros CID, debido a que la diversidad estructural de los carbohidratos es tan alta que a mayor número de sustituyentes acetilo (Ac) la estructura podía tener gran cantidad de isómeros que aportaban en cierta medida a la abundancia de los iones fragmento generados, infiriendo que el alcance analítico no es suficiente para lograr una caracterización completa de todos los componentes de este tipo de mezclas complejas.

La per-O-metilación de los xilo-oligosacáridos permitió confirmar las estructuras propuestas para los oligosacáridos presentes en las muestras de café y bagazo.

Referencias Bibliográficas

- Aachary, A. A., & Prapulla, S. G. (2011). Xylooligosaccharides (XOS) as an Emerging Prebiotic: Microbial Synthesis, Utilization, Structural Characterization, Bioactive Properties, and Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(1), 2–16. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00135.x>
- Akpinar, O., Ak, O., Kavas, A., Bakir, U., & Yilmaz, L. (2007). Enzymatic production of xylooligosaccharides from cotton stalks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5544–5551. <https://doi.org/10.1021/jf063580d>
- Akpinar, O., Erdogan, K., & Bostanci, S. (2009). Production of xylooligosaccharides by controlled acid hydrolysis of lignocellulosic materials. *Carbohydrate Research*, 344(5), 660–666. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2009.01.015>
- Asocaña. (2018). Balance azucarero colombiano Asocaña 2000 - 2018. Retrieved from <http://www.asocana.org/modules/documentos/5528.aspx>
- Basanta, R., Delgado, M. A. G., Martínez, J. E. C., Vázquez, H. M., & Vázquez, G. B. (2007). Sostenibilidad Del Reciclaje De Residuos De La Agroindustria Azucarera: Una Revisión Sustainable Recycling of Waste From Sugarcane Agroindustry: a Review. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(4), 293–305. <https://doi.org/10.1080/11358120709487704>
- Brasseur, C., Bauwens, J., Tarayre, C., Mattéotti, C., Thonart, P., Destain, J., ... De Pauw, E. (2014). MALDI-TOF ms analysis of cellodextrins and xylo-oligosaccharides produced by hindgut homogenates of reticulitermes santonensis. *Molecules*, 19(4), 4578–4594.

<https://doi.org/10.3390/molecules19044578>

Candela, M., Maccaferri, S., Turrioni, S., Carnevali, P., & Brigidi, P. (2010). Functional intestinal microbiome, new frontiers in prebiotic design. *International Journal of Food Microbiology*, *140*(2–3), 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.04.017>

Carmen, M., Gómez, M., & González, M. B. (2010). Espectrometría de masas y análisis de biomarcadores. *Monografías de La Real ...*, 113–168. Retrieved from <http://analesranf.com/index.php/mono/article/view/1066>

Carvalho, A. F. A., Neto, P. de O., da Silva, D. F., & Pastore, G. M. (2013). Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, *51*(1), 75–85. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.11.021>

Ciucanu, I., Kerek, F. (1984). *Carbohydrate Research*, *131* (1Y84) 209-217, *131*, 209–217.

Ciucanu, I., & Caprita, R. (2007). Per-O-methylation of neutral carbohydrates directly from aqueous samples for gas chromatography and mass spectrometry analysis. *Analytica Chimica Acta*, *585*(1), 81–85. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.12.015>

Domon, B., & Costello, C. E. (1988). A systematic nomenclature for carbohydrate fragmentations in FAB-MS/MS spectra of glycoconjugates. *Glycoconjugate Journal*, *5*(4), 397–409. <https://doi.org/10.1007/BF01049915>

Federación Nacional de Cafeteros. (2018). Producción Colombiana de café. Retrieved from https://www.federaciondecafeteros.org/particulares/es/quienes_somos/119_estadisticas_hist

oricas/

Flint, H. J., Duncan, S. H., Scott, K. P., & Louis, P. (2007). Interactions and competition within the microbial community of the human colon: Links between diet and health: Minireview. *Environmental Microbiology*, 9(5), 1101–1111. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01281.x>

Gibson, G. L. E. Y. Y. R., & Roberfroid, M. B. (1995). Dietary Modulation of the Human Colonie Microbiota : Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition*, 125(6), 1401–1412.

Granato, D., Branco, G. F., Cruz, A. G., Faria, J. de A. F., & Shah, N. P. (2010). Probiotic dairy products as functional foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(5), 455–470. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00120.x>

Guerrero, J, y Nabarlatz, D. (2018). Evaluación de Metodologías Para la Purificación de Hidrolizados de Biomasa Lignocelulósica Residual de la Agroindustria Colombiana (tesis de pregrado). *Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga*, 1–89.

Hattori, M., & Taylor, T. D. (2009). The human intestinal microbiome: A new frontier of human biology. *DNA Research*, 16(1), 1–12. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsn033>

Iannitti, T., & Palmieri, B. (2010). Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clinical Nutrition*, 29(6), 701–725. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2010.05.004>

Jain, I., Kumar, V., & Satyanarayana, T. (2015). Xylooligosaccharides: an economical prebiotic from agroresidues and their health benefits. *Indian Journal of Experimental Biology*,

53(March), 131–142. Retrieved from
[http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/30744/1/IJEB 53\(3\) 131-142.pdf](http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/30744/1/IJEB_53(3)_131-142.pdf)

Karas, M., Glückmann, M., & Schäfer, J. (2000). Ionization in matrix-assisted laser desorption/ionization: Singly charged molecular ions are the lucky survivors. *Journal of Mass Spectrometry*, 35(1), 1–12. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9888\(200001\)35:1<1::AID-JMS904>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9888(200001)35:1<1::AID-JMS904>3.0.CO;2-0)

Matamoros Fernández, L. E., Obel, N., Scheller, H. V., & Roepstorff, P. (2003). Characterization of plant oligosaccharides by matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 38(4), 427–437. <https://doi.org/10.1002/jms.455>

Moure, A., Gullón, P., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2006). Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochemistry*, 41(9), 1913–1923. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.05.011>

Nabarlatz, D., Ebringerová, A., & Montané, D. (2007). Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 69(1), 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.08.020>

Nabarlatz, D., Farriol, X., & Montané, D. (2005). Autohydrolysis of almond shells for the production of xylo-oligosaccharides: Product characteristics and reaction kinetics. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 44(20), 7746–7755. <https://doi.org/10.1021/ie050664n>

OKAZAKI, M., FUJIKAWA, S., & MATSUMOTO, N. (1990). Effect of Xylooligosaccharide on the Growth of Bifidobacteria. *Bifidobacteria and Microflora*, 9(2), 77–86.

https://doi.org/10.12938/bifidus1982.9.2_77

Pall, L. (2014). Microsep™ Advance Centrifugal Devices. *Pall Corporation*. Retrieved from <https://shop.pall.com/us/en/laboratory/microsep-advance-centrifugal-devices-with-omega-membrane-10k-blue-100/pkg--zidMCP010C46>

Patel, S., & Goyal, A. (2011). Functional oligosaccharides: Production, properties and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(5), 1119–1128. <https://doi.org/10.1007/s11274-010-0558-5>

Qiang, X., YongLie, C., & QianBing, W. (2009). Health benefit application of functional oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*, 77(3), 435–441. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.03.016>

Reddy, S. S., & Krishnan, C. (2016). Production of high-pure xylooligosaccharides from sugarcane bagasse using crude b -xylosidase-free xylanase of *Bacillus subtilis* KCX006 and their bi fi dogenic function. *LWT - Food Science and Technology*, 65, 237–245. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.08.013>

Reis, A., Coimbra, M. A., Domingues, P., Ferrer-Correia, A. J., & Domingues, M. R. M. (2004). Fragmentation pattern of underivatised xylo-oligosaccharides and their alditol derivatives by electrospray tandem mass spectrometry. *Carbohydrate Polymers*, 55(4), 401–409. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2003.11.001>

Reis, A., Coimbra, M. A., Domingues, P., Ferrer-Correia, A. J., Rosário, M., & Domingues, M. (2002). Structural characterisation of underivatised olive pulp xylo-oligosaccharides by mass spectrometry using matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray ionisation.

Rapid Communications in Mass Spectrometry, 16(22), 2124–2132.
<https://doi.org/10.1002/rcm.839>

Reis, A., Domingues, M. R. M., Ferrer-Correia, A. J., & Coimbra, M. A. (2003). Structural characterisation by MALDI-MS of olive xylo-oligosaccharides obtained by partial acid hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*, 53(1), 101–107. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(03\)00007-9](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(03)00007-9)

Reis, A., Pinto, P., Evtuguin, D. V., Neto, C. P., Domingues, P., Ferrer-Correia, A. J., & Domingues, M. R. M. (2005). Electrospray tandem mass spectrometry of underivatized acetylated xylo-oligosaccharides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 19(23), 3589–3599. <https://doi.org/10.1002/rcm.2234>

Reis, A., Rosa, M., Domingues, M., Domingues, P., & Coimbra, M. A. (2003). Positive and negative electrospray ionisation tandem mass spectrometry as a tool for structural characterisation of acid released oligosaccharides from olive pulp glucuronoxylans, 338, 1497–1505. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(03\)00196-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(03)00196-4)

Samanta, A. K., Jayapal, N., Jayaram, C., Roy, S., Kolte, A. P., Senani, S., & Sridhar, M. (2015). Xylooligosaccharides as prebiotics from agricultural by-products: Production and applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 5(1), 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.bcdf.2014.12.003>

Teleman, A., Lundqvist, J., Tjerneld, F., Stålbrand, H., & Dahlman, O. (2000). Characterization of acetylated 4-O-methylglucuronoxylan isolated from aspen employing ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research*, 329(4), 807–815. <https://doi.org/10.1016/S0008->

6215(00)00249-4

Tomasik, P. J., & Tomasik, P. (2003). Probiotics and prebiotics. *Cereal Chemistry*, 80(2), 113–117. <https://doi.org/10.1094/CCHEM.2003.80.2.113>

Weijers, C. A. G. M., Franssen, M. C. R., & Visser, G. M. (2008). Glycosyltransferase-catalyzed synthesis of bioactive oligosaccharides. *Biotechnology Advances*, 26(5), 436–456. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.05.001>

Zaia, J. (2004). Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrometry Reviews*, 23(3), 161–227. <https://doi.org/10.1002/mas.10073>