



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 346 124**

② Número de solicitud: 200900117

⑤ Int. Cl.:
C07H 3/06 (2006.01)
B01D 61/14 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **15.01.2009**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **08.10.2010**

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
08.10.2010

⑦ Solicitante/s: **Universidad de Vigo
Campus Universitario - Lagoas Marcosende
36310 Vigo, Pontevedra, ES**

⑦ Inventor/es: **González Muñoz, María Jesús;
Gullón Estévez, Patricia;
Moure Varela, Andrés;
Domínguez González, Herminia y
Parajó Liñares, Juan Carlos**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Proceso para la purificación de xilooligosacáridos basado en el empleo de la diafiltración.**

⑦ Resumen:

Proceso para la purificación de xilooligosacáridos basado en el empleo de la diafiltración.

La presente invención, titulada "Proceso para la purificación de xilooligosacáridos basado en el empleo de la diafiltración", reivindica un procedimiento aplicable a la purificación de xilooligosacáridos obtenidos mediante degradación hidrolítica (por vía química y/o enzimática) de la fracción hemicelulósica de biomasa vegetal en medio acuoso. Los licores de hidrólisis contienen xilooligosacáridos junto con otros componentes no deseados, que deben ser eliminados para permitir la utilización de los xilooligosacáridos con fines alimentarios. Este objetivo se consigue por medio de diafiltración (eventualmente, en combinación con otras operaciones de naturaleza físico-química que se describen en el texto de la solicitud). Se reivindica la utilización de las fracciones conteniendo xilooligosacáridos purificados como ingredientes alimentarios con propiedades prebióticas, aplicables en la nutrición humana y en la alimentación animal.

ES 2 346 124 A1

DESCRIPCIÓN

Proceso para la purificación de xilooligosacáridos basado en el empleo de la diafiltración.

5 Sector de la técnica

La invención plantea la aplicación de técnicas básicas de la Química y de la Ingeniería Química (operaciones de concentración y separación) a la purificación de disoluciones obtenidas por procesamiento químico de biomasa vegetal rica en hemicelulosas. Por las aplicaciones alimentarias del producto final y por tratarse del desarrollo de un proceso químico, el objeto de esta patente también está relacionado con áreas de la técnica como la Tecnología de los Alimentos, Ingeniería de los Alimentos e Ingeniería de Procesos.

Estado de la técnica

La biomasa vegetal tiene una estructura heterogénea y una composición variable en función de su origen. Sus componentes incluyen polisacáridos (celulosa, hemicelulosas y pectinas), compuestos fenólicos libres (extraíbles sin reacción química) o ligados (formando parte de macromoléculas), proteínas, componentes inorgánicos y otras fracciones de poca importancia para los fines de esta invención. Algunos tipos de biomasa (como maderas de frondosas, salvados y determinados residuos agrícolas) tienen hemicelulosas principalmente constituidas por xilano (formado por unidades de xilosa unidas por enlaces β 1-4), en donde los monómeros estructurales pueden estar sustituidos (por ejemplo, con azúcares, compuestos fenólicos, ácidos urónicos o metil urónicos, y/o grupos acetilo). Información relevante sobre estos puntos aparece publicada en los siguientes trabajos: Ebringerová, A.; Heinze, T., Xylan and xylan derivatives-biopolymers with valuable properties. 1. Naturally occurring xylans: structures, isolation procedures and properties, *Macromol. Rapid Commun.* 2000, 21, 542-556; y Ebringerová, A.; Hromádková, Z.; Heinze, T., Hemicellulose, *Adv. Polym. Sci.* 2005, 186, 1-67.

La hidrólisis parcial por vía química de las hemicelulosas conteniendo xilano puede conducir a mezclas de composición compleja, formadas por polímeros derivados del xilano de menor peso molecular que el polímero original, xilooligómeros, xilosa, otros monosacáridos, subproductos de reacción de los monosacáridos (por ejemplo, furfural e hidroximetilfurfural), ácido acético, metanol, componentes inorgánicos, compuestos nitrogenados, fracciones extraíbles presentes en la materia prima y otros componentes de menor interés para la finalidad de esta patente. Alternativa o complementariamente, pueden generarse xilooligosacáridos mediante enzimas con actividad xilanásica, que pueden actuar sobre biomasa nativa conteniendo xilano, sobre fracciones de biomasa enriquecidas en xilano por procesamiento químico previo, o sobre disoluciones que procedan del fraccionamiento químico de biomasa en donde aparezcan fracciones poliméricas solubles derivadas del xilano. Información complementaria sobre este tema puede encontrarse en los siguientes artículos: Vázquez, M. J.; Alonso, J. L.; Domínguez, H.; Parajó, J. C., Xylooligosaccharides. Manufacture and applications, *Trends Food Sci. Technol.* 2000, 11, 387-393; y Moure, A.; Gullón, P.; Domínguez, H.; Parajó, J. C., Advances in the manufacture, purification and applications of xylooligosaccharides as food additives and nutraceuticals, *Proc. Biochem.* 2006, 41, 1913-1923. Más específicamente, se han publicado datos sobre la producción de xilooligosacáridos por la acción directa de xilanasas sobre zuros de maíz (Katapodis, P.; Christakopoulos, P., Enzymic production of feruloyl xylo-oligosaccharides from corn cobs by a family 10 xylanase from *Thermoascus aurantiacus*, *LWT-Food Sci. Technol.* 2008, 41, 1239-1243), por tratamiento directo de materiales lignocelulósicos en medio acuoso (Carvalho, F.; Garrote, G.; Parajó, J. C.; Pereira, H.; Girio, F. M., Kinetic modeling of brewery's spent grain autohydrolysis, *Biotechnol. Prog.* 2005, 21, 233-243; Garrote, G.; Domínguez, H.; Parajó, J. C., Production of substituted oligosaccharides by hydrolytic processing of barley husks, *Ind. Eng. Chem. Res.* 2004, 43, 1608-1614) y por procesamiento enzimático de licores de autohidrólisis (Vegas, R.; Alonso, J. L.; Domínguez, H.; Parajó, J. C., Enzymatic processing of rice husk autohydrolysis products for obtaining low molecular weight oligosaccharides, *Food Biotechnol.* 2008, 22, 31-46; Vázquez, M. J.; Alonso, J. L.; Domínguez, H.; Parajó, J. C., Enzymatic processing of crude xylooligomer solutions obtained by autohydrolysis of *Eucalyptus* wood, *Food Biotechnol.* 2002, 16, 91-105).

Los xilooligosacáridos se obtienen en medios que también contienen otros productos no deseados. Esto es particularmente cierto en los casos donde los xilooligosacáridos se obtienen por métodos basados en el procesamiento químico de biomasa vegetal nativa, donde la composición de los medios puede ser muy compleja. Puede encontrarse información sobre este punto en las siguientes referencias: Garrote, G.; Kabel, M. A.; Schols, H. A.; Falqué, E.; Domínguez, H.; Parajó, J. C., Effects of *Eucalyptus globulus* wood autohydrolysis conditions on the reaction products. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 9006-9013; y Garrote, G.; Falqué, E.; Domínguez, H.; Parajó, J. C., Autohydrolysis of agricultural residues: study of reaction byproducts, *Biores. Technol.* 2007, 98, 1951-1957.

Para obtener xilooligosacáridos de calidad alimentaria se necesita purificar los productos de reacción, aplicando distintos procedimientos físico-químicos, como los que se incluyen en las siguientes referencias: Parajó, J. C.; Domínguez, H.; Alonso, J. L.; Vázquez, M. J.; Garrote, G., Proceso para la purificación de oligosacáridos obtenidos a partir de biomasa, Patente española con número de solicitud P200102313, fecha de solicitud 22.10.2001, fecha de aplicación: 01.07.2003; Vázquez, M. J.; Alonso, J. L.; Domínguez, H.; Parajó, J. C., Production and refining of soluble products from *Eucalyptus globulus* glucuronoxylan, *Collect. Czech. Chem. Comm.* 2007, 72, 307-320; Vázquez, M. J.; Alonso, J. L.; Domínguez, H.; Parajó, J. C., Enhancing the potential of oligosaccharides from corncob autohydrolysis as prebiotic food ingredients, *Ind. Crops Prod.* 2006, 24, 152-159; Vázquez, M. J.; Garrote, G.; Alonso, J. L.; Domínguez, H.; Parajó, J. C., Refining of autohydrolysis liquors for manufacturing xylooligosaccharides: evaluation of operational strategies, *Biores. Technol.* 2005, 96, 889-896.

La bibliografía científica y técnica está prestando una atención creciente a la aplicación de tecnologías de membrana para la generación de xilooligosacáridos (Freixo, M. R.; Norberta de Pinho, M., Enzymatic hydrolysis of beechwood xylan in a membrane reactor, *Desalination*, 2002, 149, 237-242; González-Muñoz, M. J.; Domínguez, H.; Parajó, J. C., Depolymerization of xylan-derived products in an enzymatic membrane reactor, *J. Membr. Sci.* 2008, 320, 224-231), para su concentración (Yuan, Q. P.; Zhang, H.; Qian, Z. M.; Yang, X. J., Pilot-plant production of xylo-oligosaccharides from corncob by steaming, enzymatic hydrolysis and nanofiltration, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2004, 79, 1073-1079) o para su purificación (Vegas, R.; Moure, A.; Domínguez, H.; Parajó, J. C.; Alvarez, J. R.; Luque, S., Purification of oligosaccharides from rice husk autohydrolysis liquors by ultra- and nano-filtration, *Desalination* 2006, 199, 541-543; Vegas, R.; Alonso, J. L.; Domínguez, H.; Parajó, J. C., Manufacture and refining of oligosaccharides from industrial solid wastes, *Ind. Eng. Chem. Res.* 2005, 44, 614-620; Vegas, R.; Luque, S.; Alvarez, J. R.; Alonso, J. L.; Domínguez, H.; Parajó, J. C., Membrane-assisted processing of xylooligosaccharide-containing liquors, *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 5430-5436; Gullón, P.; González-Muñoz, M. J.; Domínguez, H.; Parajó, J. C., Membrane processing of liquors from *Eucalyptus globulus* autohydrolysis, *J. Food Eng.* 2008, 87, 257-265). No se ha encontrado información bibliográfica sobre la purificación de xilooligosacáridos por procesos basados en diafiltración, un modo de operación que presenta ventajas respecto a otras alternativas de procesamiento con membranas, al mejorar la purificación, limitar la polarización por concentración (con el consecuente aumento del flujo de permeado), y disminuir el consumo energético y el gasto de disolvente.

La diafiltración es un modo de operación en que se lleva a cabo una ultrafiltración o nanofiltración con aporte de disolvente añadido. El disolvente puede añadirse continuamente con el mismo caudal que el permeado (modo de operación que se conoce como diafiltración a volumen constante), añadirse continuamente con un caudal menor que el del permeado (modo de operación que se conoce como diafiltración a volumen variable), o bien añadirse por lotes a tiempos de operación determinados (modo de operación que se conoce como diafiltración discontinua). Cualquiera de estos modos de operación resulta aplicable a la invención que se reivindica. La bibliografía cita aplicaciones de la diafiltración en los siguientes campos: aislamiento de hemicelulosas (Krawczyk, H.; Persson, T.; Andersson, A.; Jönsson, A. S., Isolation of hemicelluloses from barley husks, *Food Bioprod. Proc.* 2008, 86, 31-36; Andersson, A.; Persson, T.; Zacchi, G.; Staalbrand, H.; Joensson, A. S., Comparison of diafiltration and size-exclusion chromatography to recover hemicelluloses from process water from thermomechanical pulping of spruce, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2007, 137-140, 971-983), refinado de medios fermentativos (Wang, L.; Yang, G.; Xing, W.; Xu, N., Mathematic model of the yield for diafiltration processes, *Sep. Purif. Technol.* 2008, 59, 206-213), separación de polifenoles y azúcares (Wei, D. S.; Hossain, M.; Saleh, Z. S., Separation of polyphenolics and sugar by ultrafiltration: effects of operating conditions on fouling and diafiltration, *Int. J. Chem. Biomolec. Eng.* 2008, 1, 10-17), desmineralización de permeados de leche y suero (Suárez, E.; Lobo, A.; Alvarez-Blanco, S.; Riera, F. A.; Álvarez, R., Utilization of nanofiltration membranes for whey and milk ultrafiltration permeate demineralization, *Desalination* 2006, 199, 345-347), recuperación de oligosacáridos a partir de leche (Martínez-Ferez, A.; Guadix, A.; Guadix, E. M., Recovery of caprine milk oligosaccharides with ceramic membranes, *J. Membr. Sci.* 2006, 276, 23-30), y purificación de mezclas de galactooligosacáridos comerciales (Goulas, A. K.; Kapasakalidis, P. G.; Sinclair, H. R.; Rastall, R. A.; Grandison, A. S., Purification of oligosaccharides by nanofiltration, *J. Membr. Sci.* 2002, 209, 321-335). Ninguna de estas aplicaciones se solapa con la purificación de xilooligosacáridos contenidos en medios de hidrólisis de biomasa, tema objeto de esta invención.

Cabe destacar que, una vez purificados, los xilooligosacáridos tienen carácter de moléculas bioactivas, con poder prebiótico y con otras propiedades biológicas que dependen de su naturaleza química (particularmente, del grado de sustitución, tipo de sustituyentes y distribución de pesos moleculares). Puede encontrarse información sobre estos temas en las referencias Vázquez, M. J.; Alonso, J. L.; Domínguez, H.; Parajó, J. C., Xylooligosaccharides. Manufacture and applications, *Trends Food Sci. Technol.* 2000, 11, 387-393; y Moure, A.; Gullón, P.; Domínguez, H.; Parajó, J. C., Advances in the manufacture, purification and applications of xylooligosaccharides as food additives and nutraceuticals, *Proc. Biochem.* 2006, 41, 1913-1923.

En base a lo anterior, resulta de interés un proceso de purificación de disoluciones en donde los xilooligosacáridos estuviesen en presencia de compuestos no deseados, y que deberían ser eliminados para permitir la aplicación de los mencionados xilooligosacáridos para fines alimentarios. Para ello, la presente invención se centra en un proceso formado por tratamientos físico-químicos, en los que la diafiltración juega un papel fundamental para conseguir un grado de pureza que permita desarrollar aplicaciones en el ámbito alimentario.

Descripción detallada de la invención

El proceso considerado consiste en someter a los licores de degradación hidrolítica de hemicelulosas de materiales lignocelulósicos ricos en xilano a una secuencia de etapas de purificación, según el Proceso 1 o el Proceso 2 que se describen a continuación.

El Proceso 1, destinado principalmente a la purificación de medios conteniendo xilooligosacáridos de alto grado de polimerización, consta de:

- a) una o varias etapas de concentración (opcionales, llevadas a cabo por evaporación a vacío, evaporación rotatoria, ultrafiltración operando en modo concentración o nanofiltración operando en modo concentración, de manera que se obtenga una disolución concentrada en xilooligosacáridos); haciéndose notar que si se emplean ultrafiltración o nanofiltración para fines de concentración, la membrana debe poseer un

ES 2 346 124 A1

tamaño molecular de corte suficientemente pequeño para limitar las pérdidas de xilooligosacáridos en el permeado,

- b) tratamiento de los medios originales o de los licores concentrados que surgen del procesamiento indicado en el apartado a) por diafiltración a volumen constante, a volumen variable o discontinua, empleando membranas con un tamaño de corte adecuado para permitir el paso a su través de impurezas de bajo peso molecular, reteniendo los oligosacáridos con grados de polimerización por encima de un valor definido,
- c) procesamiento de los licores retenidos operando en las condiciones del apartado b) en una o varias etapas (opcionales) de ultrafiltración o nanofiltración, operando en modo concentración, de modo que se obtenga una disolución concentrada en xilooligosacáridos,
- d) tratamiento (opcional) del retenido obtenido en los apartados b) ó c) con adsorbentes y/o resinas de cambio iónico, en una o varias etapas, para eliminar compuestos no-sacáridos presentes en el medio,
- e) la deshidratación de las disoluciones obtenidas en los apartados b), c) ó d) por tecnologías convencionales, como la evaporación a vacío, la liofilización o la atomización, para obtener una fracción purificada conteniendo xilooligosacáridos.

El Proceso 2, destinado principalmente a la purificación de medios conteniendo xilooligosacáridos cuyo peso molecular se desea reducir, consta de:

- a) una o varias etapas de concentración (opcionales, llevadas a cabo por evaporación a vacío, evaporación rotatoria, ultrafiltración operando en modo concentración o nanofiltración operando en modo concentración, de modo que se obtenga una disolución concentrada en xilooligosacáridos),
- b) una o varias etapas de diafiltración de los licores originales o de los concentrados obtenidos en el apartado a), para eliminar componentes no deseados de bajo peso molecular,
- c) procesamiento de los licores diafiltrados obtenidos en el apartado b) en una o varias etapas (opcionales) de ultrafiltración o nanofiltración, operando en modo concentración, de modo que se obtenga una disolución concentrada en xilooligosacáridos,
- d) una etapa de tratamiento de los medios concentrados obtenidos en las condiciones de los apartados b) ó c) con enzimas que presenten actividad xilanásica, a fin de reducir el grado de polimerización de los xilooligosacáridos,
- e) procesamiento del medio de reacción obtenido en las condiciones del apartado d) en una o varias etapas de ultrafiltración, nanofiltración o diafiltración, de modo que se obtenga una disolución concentrada en xilooligosacáridos,
- f) tratamiento (opcional) de las disoluciones refinadas obtenidas en el apartado e) con adsorbentes y/o resinas de cambio iónico, en una o varias etapas, para eliminar compuestos no-sacáridos presentes en el medio,
- g) deshidratación de las disoluciones obtenidas en el apartado f) por tecnologías convencionales, como la evaporación a vacío, la liofilización o la atomización, para obtener una fracción purificada conteniendo xilooligosacáridos.

Un posible modo de realización del Proceso 1 se describe a continuación en el Ejemplo 1.

Ejemplo 1

Se parte de licores del procesamiento acuoso de madera de eucalipto, obtenidos en las condiciones de operación recomendadas en el artículo siguiente: Gullón, P.; González-Muñoz, M. J.; Domínguez, H.; Parajó, J. C.; Membrane processing of liquors from *Eucalyptus globulus* autohydrolysis, J. Food Eng. 2008, 87, 257-265; con la salvedad de que se realizó un pretratamiento acuoso a 130°C para eliminar extractos, y que la temperatura máxima del tratamiento hidrolítico de las hemicelulosas se fijó en 175°C. La composición de los licores se midió empleando los métodos descritos en la misma referencia, llegándose a los siguientes resultados de concentración (medidos como gramos de componente por cada 100 g de solutos no volátiles): glucosa 0.31, xilosa 5.29, arabinosa 2.04, ácido acético 1.82, glucooligosacáridos (medidos como glucosa) 1.71, xilooligosacáridos (medidos como xilosa) 53.1, sustituyentes acetilo (medidos como ácido acético) 12.5, sustituyentes urónicos (medidos como ácido galacturónico) 16.5, otros componentes no volátiles 8.55. Empleando agua como disolvente añadido, los licores se sometieron a diafiltración discontinua en 3 etapas sucesivas, en que se alcanzaron relaciones de volúmenes de concentración de 1.67, 1.67 y 3.35 volúmenes de retenido/volumen inicial, respectivamente. La composición del concentrado resultante se midió empleando los métodos a los que se aludió anteriormente, llegándose a los siguientes resultados de concentración (medidos como gramos de componente por cada 100 g de solutos no volátiles): glucosa 0.04, xilosa 1.29, arabinosa

0.44, ácido acético 0.31, glucooligosacáridos (medidos como glucosa) 2.52, xilooligosacáridos (medidos como xilosa) 67.4, sustituyentes acetilo (medidos como ácido acético) 14.5, ácidos urónicos y otros componentes no volátiles, 12.99). A continuación, se realizó una etapa de adsorción con la resina comercial IRA-96 (cambiadora de aniones), operando con una relación másica de 7.5 g licor/g resina. La composición de la disolución (medida como gramos de componente por cada 100 g de solutos no volátiles) fue la siguiente: glucosa 0.002, xilosa 1.89, arabinosa 0.65, ácido acético 0.21, glucooligosacáridos (medidos como glucosa) 4.43, xilooligosacáridos (medidos como xilosa) 67.4, sustituyentes acetilo (medidos como ácido acético) 14.5, sustituyentes urónicos (medidos como ácido galacturónico) 7.45, otros componentes no volátiles 3.7. Puede observarse que la suma de xilooligosacáridos y sus sustituyentes (grupos arabinosil, grupos acetilo, grupos urónicos) ha aumentado su proporción respecto al total de solutos no volátiles desde 82.1% en los licores crudos de autohidrólisis hasta 89.6% en los productos finales. Si se considera también la presencia de glucooligosacáridos, que potencialmente pueden tener propiedades prebióticas, la proporción de oligosacáridos totales (glucooligosacáridos y xilooligosacáridos sustituidos) respecto al total de solutos no volátiles aumenta desde un 83.8% en los licores crudos de autohidrólisis hasta un 94%. Estos datos ponen de manifiesto los efectos de purificación obtenidos con el proceso que se reivindica, y que suman la eliminación selectiva de monosacáridos y de otros componentes no deseados. A fin de confirmar el carácter prebiótico de los productos purificados, éstos se emplearon como fuente de carbono para el cultivo de cepas de bacterias probióticas (*Bifidobacterium adolescentis* CECT 5781, equivalente a ATCC 15703; *Bifidobacterium longum* CECT 4503, equivalente a ATCC 15707; *Bifidobacterium infantis* CECT 4551, equivalente a ATCC 15697; y *Bifidobacterium breve* CECT 4839, correspondiente a ATCC 15700). Todas las cepas se obtuvieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España). En condiciones de anaerobiosis, se elaboraron medios de cultivo conteniendo 5 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de peptona y 10 g/L del producto liofilizado obtenido en el proceso. Se tomaron alícuotas de este medio, que se depositaron en tubos de cultivo herméticos antes de su esterilización en autoclave. Posteriormente, se inocularon con las bacterias anteriormente citadas y se incubaron a 37°C sin agitación. Al cabo de 12 y 24 horas se realizaron recuentos de células al microscopio, que confirmaron la susceptibilidad de las fuentes de carbono empleadas para el crecimiento celular. En una nueva serie de experimentos, se llevaron a cabo fermentaciones utilizando las mismas condiciones de cultivo que las descritas anteriormente, pero empleando como inoculo heces humanas. Al cabo de 96 horas de incubación se procedió al análisis de las muestras por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (según el procedimiento citado con anterioridad) lo que reveló el consumo completo de oligosacáridos.

Un posible modo de realización del Proceso 2 se describe a continuación en el Ejemplo 2.

Ejemplo 2

Se parte de licores del procesamiento acuoso de cáscaras de arroz, obtenidos en las condiciones de operación recomendadas en el artículo siguiente: González-Muñoz, M. J.; Domínguez, H.; Parajó, J. C., Depolymerization of xylan-derived products in an enzymatic membrane reactor, J. Membr. Sci. 2008, 320, 224-231, con la salvedad de que el procesamiento hidrotérmico se realizó isotérmicamente a 185°C durante 20 minutos. La composición de los licores se midió empleando los métodos descritos en la misma referencia, llegándose a los siguientes resultados de concentración (medidos como gramos de componente por cada 100 g de solutos no volátiles): glucosa 0.68, xilosa 2.92, arabinosa 3.53, ácido acético 3.80, glucooligosacáridos (medidos como glucosa) 9.03, xilooligosacáridos (medidos como xilosa) 43.1, sustituyentes arabinosil (medidos como arabinosa) 2.35, sustituyentes acetilo (medidos como ácido acético) 2.90, sustituyentes urónicos (medidos como ácido galacturónico) 4.26, otros componentes no volátiles 31.25. Empleando agua como disolvente añadido, los licores se sometieron a diafiltración continua, hasta llegar a una relación de 1 volumen de disolvente añadido/volumen inicial. La composición del concentrado resultante se midió empleando los métodos a los que se aludió anteriormente, llegándose a los siguientes resultados de concentración (medidos como gramos de componente por cada 100 g de solutos no volátiles): glucosa 0.39, xilosa 1.38, arabinosa 1.63, ácido acético 1.70, glucooligosacáridos (medidos como glucosa) 11.2, xilooligosacáridos (medidos como xilosa) 48.2, sustituyentes arabinosil (medidos como arabinosa) 2.65, sustituyentes acetilo (medidos como ácido acético) 3.57, sustituyentes urónicos (medidos como ácido galacturónico) 4.93, otros componentes no volátiles 26.04. Esta disolución se concentró empleando una membrana de nanofiltración hasta obtener una relación volumen final/volumen inicial de 5, obteniéndose un concentrado con la siguiente composición: glucosa 0.20, xilosa 0.42, arabinosa 0.43, ácido acético 0.41, glucooligosacáridos (medidos como glucosa) 13.1, xilooligosacáridos (medidos como xilosa) 53.8, sustituyentes arabinosil (medidos como arabinosa) 3.34, sustituyentes acetilo (medidos como ácido acético) 4.20, sustituyentes urónicos (medidos como ácido galacturónico) 5.21, otros componentes no volátiles 19.34. Esta disolución se empleó para llevar a cabo una etapa de hidrólisis enzimática con xilanasas comerciales (manteniendo una actividad de 685 Unidades Internacionales/kg licor en medio a pH 7), que se prolongó durante 48 horas a 55°C. El medio de reacción se sometió a ultrafiltración operando en modo concentración, obteniéndose un permeado con las siguientes concentraciones (medidas como gramos de componente por cada 100 g de solutos no volátiles): glucosa 1.06, xilosa 0.79, arabinosa 0.70, ácido acético 1.27, glucooligosacáridos (medidos como glucosa) 13.2, xilooligosacáridos (medidos como xilosa) 60.9, sustituyentes arabinosil (medidos como arabinosa) 3.34, sustituyentes acetilo (medidos como ácido acético) 4.33, sustituyentes urónicos (medidos como ácido galacturónico) 4.88, otros componentes no volátiles 10.8. Esta disolución se puso en contacto con la resina comercial IRA-96 (cambiadora de aniones), operando con una relación másica de 15 g licor/g resina, obteniéndose una disolución con la siguiente composición (medida como gramos de componente por cada 100 g de solutos no volátiles): glucosa 1.07, xilosa 0.60, arabinosa 0.81, ácido acético 2.16, glucooligosacáridos (medidos como glucosa) 14.6; xilooligosacáridos (medidos como xilosa) 68.2; sustituyentes arabinosil (medidos como arabinosa) 2.88; sustituyentes acetilo (medidos como ácido acético) 3.85, sustituyentes urónicos (medidos como ácido galacturónico) 4.85, otros componentes no volátiles 3.16. La disolución resultante se liofilizó, obteniéndose un polvo blanco-amarillento. Puede observarse que la suma de xilooligosacáridos y sus sustituyentes

ES 2 346 124 A1

yentes (grupos arabinosil, grupos acetilo, grupos urónicos) ha aumentado su proporción respecto al total de solutos no volátiles desde un 59.4% en los licores crudos de autohidrólisis hasta un 79.8% en el producto final. Si se considera también la presencia de glucooligosacáridos, que potencialmente pueden tener propiedades prebióticas, la proporción de oligosacáridos totales (glucooligosacáridos y xilooligosacáridos sustituidos) respecto al total de solutos no volátiles
5 aumenta desde un 70.6% en los licores crudos de autohidrólisis hasta el 94.4% en el producto final. Estos datos ponen de manifiesto los efectos de purificación obtenidos con el proceso que se reivindica, y que suponen la eliminación selectiva de monosacáridos y de otros componentes no deseados. A fin de confirmar el carácter prebiótico de los productos purificados obtenidos en el Ejemplo 2, éstos se emplearon como fuente de carbono para el cultivo de las mismas cepas de bacterias probióticas citadas en el Ejemplo 1, elaborándose medios de cultivo en condiciones de anaerobiosis
10 que contenían 5 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de peptona y 10 g/L del producto liofilizado obtenido en el Ejemplo 2. Se tomaron alícuotas de este medio, que se depositaron en tubos de cultivo herméticos antes de su esterilización en autoclave. Posteriormente, se inocularon con las bacterias anteriormente citadas y se incubaron a 37°C sin agitación. Al cabo de 12 y 24 horas se realizaron recuentos de células al microscopio, que confirmaron la susceptibilidad de las
15 fermentaciones utilizando las mismas condiciones de cultivo que las descritas en el párrafo anterior, pero empleando como inóculo heces humanas. Al cabo de 96 horas de incubación se procedió al análisis de las muestras por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (según el procedimiento citado con anterioridad), confirmándose el consumo completo de oligosacáridos.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. El proceso de purificación de oligosacáridos contenidos en los licores de degradación hidrolítica de hemicelulosas de materiales lignocelulósicos ricos en xilano, consistente en: una o varias etapas de concentración (opcionales),
tratamiento de los medios originales o de los licores concentrados que surgen del procesamiento indicado anteriormente por diafiltración, procesamiento (opcional) de los licores retenidos en una o varias etapas de ultrafiltración o nanofiltración, procesamiento posterior (opcional) de los licores procesados con adsorbentes y/o resinas de cambio iónico, y deshidratación de las disoluciones resultantes, para obtener un producto sólido purificado conteniendo
10 xilooligosacáridos.

15 2. El proceso de purificación de oligosacáridos contenidos en los licores de degradación hidrolítica de hemicelulosas de materiales lignocelulósicos ricos en xilano consistente en: una o varias etapas de concentración (opcionales),
tratamiento de los medios originales o de los licores concentrados que surgen del procesamiento indicado anteriormente por diafiltración, procesamiento (opcional) de los licores retenidos en una o varias etapas de ultrafiltración o nanofiltración, tratamiento de los medios procesados con enzimas que presenten actividad xilanásica, procesamiento
del medio de reacción así obtenido en una o varias etapas de ultrafiltración, nanofiltración o diafiltración, de modo que se obtenga una disolución concentrada en xilooligosacáridos, tratamiento (opcional) de los correspondientes concentrados con adsorbentes y/o resinas de cambio iónico en una o varias etapas, y deshidratación de las disoluciones para
20 obtener un producto sólido purificado conteniendo xilooligosacáridos.

3. La utilización de los productos purificados obtenidos según el proceso descrito en la reivindicación 1 como
25 ingredientes alimentarios con propiedades prebióticas, aplicables a la alimentación humana o animal.

4. La utilización de los productos purificados obtenidos según el proceso descrito en la reivindicación 2 como
30 ingredientes alimentarios con propiedades prebióticas, aplicables a la alimentación humana o animal.

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 346 124

② Nº de solicitud: 200900117

③ Fecha de presentación de la solicitud: 15.01.2009

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C07H 3/06** (2006.01)
B01D 61/14 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	NABARLATZ, D. et al. Purification of xylooligosaccharides from almond shells by ultrafiltration. <i>Separation and Purification Technology</i> . 2007, nº 53, pp. 235-243. Ver Abstract y Conclusions.	1-2
Y	WO 9928490 A1 (NOVO NORDISK A/S) 10.06.1999, página 2, líneas 20-32; página 6, líneas 20-29; página 13, líneas 5-12, 16-18; página 19, líneas 8-10; página 23, líneas 5-7; página 24, líneas 1-4; página 25, líneas 3-6.	1
Y	VÁZQUEZ, M.J. et al. Enzymatic processing of crude xylooligomer solution obtained by autohydrolysis of eucalyptus wood. 2002. Vol. 16, nº 2, pp. 91-105. Ver Abstract e Introduction.	2
X		3,4
Y	GOULAS, A.K., et al. Purification of oligosaccharides by nanofiltration. <i>Journal of Membrane Science</i> . 2002. Nº 209, pp. 321-335. Ver Abstract, Introduction y pp. 331 (punto 4.3).	1
X		3,4
Y	GULLÓN, P. et al. Membrane processing of liquors from Eucalyptus globulus autohydrolysis. <i>Journal of Food Engineering</i> , 2008. Nº 87, pp. 257-265. Ver Abstract e Introduction.	1
X		3,4
Y	VEGAS, R. et al. Evaluation of nanofiltration for refining soluble products from rice husk xylan. <i>Bioresource Technology</i> . 2008. Nº 99, pp. 5341-5351. Ver abstract e Introduction.	1
X		3,4

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
24.09.2010

Examinador
J. López Nieto

Página
1/5

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07H, B01D

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.09.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1, 2	SÍ
	Reivindicaciones 3, 4	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-4	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	NABARLATZ, D. Et al. Purification of xylooligosaccharides from almond shells by ultrafiltration Separation and Purification Technology. 2007, nº53, pp.235-243. Ver Abstract y Conclusions.	--
D02	WO 9928490 A1	10-06-1999
D03	VÁZQUEZ, M.J. et al. Enzymatic processing of crude xylooligomer solution obtained by autohydrolysis of eucalyptus wood. 2002.Vol.16, nº2, pp. 91-105. Ver Abstract e Introduction.	--
D04	GOULAS, A.K., et al. Purification of oligosaccharides by nanofiltration. Journal of Membrane Science. 2002. nº 209, pp.321-335. Ver Abstract, Introduction y pp.331 (punto 4.3)	--
D05	GULLÓN, P. et al. Membrane processing of liquors from Eucalyptus globulus autohydrolysis. Journal of Food Engineering, 2008. nº 87, pp.257-265. Ver Abstract e Introduction.	--
D06	VEGAS, R. et al. Evaluation of nanofiltration for refining soluble products from rice husk xylan. Bioresource Technology. 2008.nº99, pp.5341-5351. Ver abstract e Introduction.	--

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La invención se refiere a un procedimiento para purificar oligosacáridos contenidos en licores de degradación hidrolítica de materiales lignocelulósicos ricos en xilano, para ello se someten los licores a un proceso de diafiltración y a una deshidratación de la disolución resultante para obtener un producto sólido purificado que contiene los xilooligosacáridos. (reiv.1)

Puede realizarse un paso de tratamiento con xilanasa después de una diafiltración y antes de otros pasos de purificación (nanofiltración, ultrafiltración o diafiltración) (reiv.2)

Se reivindica también el uso del producto obtenido como ingrediente alimentario con propiedades prebióticas (reiv. 3 y 4)

En el estado de la técnica no se ha encontrado ningún procedimiento idéntico al contenido en las reivindicaciones 1 y 2, por lo tanto dichas reivindicaciones cumplen el requisito de novedad. Sin embargo, diversos documentos del estado de la técnica muestran la aplicación de las técnicas de ultrafiltración y nanofiltración, para purificar diferentes tipos de oligosacáridos, concretamente los documentos D01, D05 y D06 se refieren a purificación de xilooligosacáridos obtenidos por hidrólisis de residuos agrícolas ricos en xilano:

En el documento D01 se llevan a cabo procesos de ultrafiltración, con membranas de diferentes, características para purificar xilooligosacáridos obtenidos por autohidrólisis de cáscaras de almendra (alto contenido en xilano) (Abstract) En las conclusiones de este documento se indica que las membranas poliméricas con MWCO de 1kDa permiten separar los xilooligosacáridos de las impurezas de lignina, indicándose expresamente que esto permite la purificación de los xilooligosacáridos mediante diafiltración continua (Conclusions).

El documento D02 se refiere a un método para producir soluciones de oligosacáridos que consiste en someter al sustrato a un tratamiento enzimático seguido de nanofiltración (pág.2, lín.20-32) indicándose que dicho proceso de nanofiltración puede consistir en diafiltración (pág.13, lín 5-12; pág.19, lín.8-10; pág.23, lín.5-7; pág.24, lín.1-4; pág.25, lín.3-6)

En el documento D02 se menciona también la utilización de evaporación u osmosis inversa para aumentar el contenido en sustancia seca mediante eliminación de agua de las soluciones provenientes del procesos de nanofiltración (pág.13, lín. 16-18)

Hoja adicional

Teniendo en cuenta el estado de la técnica divulgado en D01 y (D02 o D04), sería una posibilidad obvia para un experto en la materia la utilización de diafiltración para purificar xilooligosacáridos a partir de los licores de degradación hidrolítica de soluciones ricas en xilano (D01) así como la posterior deshidratación si se quisiera que producto final fuese sólido, tal como se indica en D02. Por lo tanto, la reivindicación 1 carece de actividad inventiva.

Por otra parte, en el documento D03 se indica la utilización de enzimas con actividad xilanasa para tratar licores procedentes de la autohidrólisis de madera de eucalipto a fin de obtener xilooligosacáridos que puedan ser utilizados como ingredientes alimentarios con efecto prebiótico (abstract) Sería obvio para un experto en la materia la utilización de esta actividad enzimática en el proceso de purificación objeto de la invención.

Por lo tanto, la invención según la reivindicación 2 carece de actividad inventiva con respecto al estado de la técnica divulgado por D01 y D03.

La utilización de xilooligosacáridos como ingredientes alimentarios con efecto prebiótico es ampliamente conocida en el estado de la técnica: D03 (abstract, introduction) D05(Introduction) D06(introduction) Por lo tanto, las reivindicaciones 3 y 4 carecen de novedad.

El documento D04 se refiere a un proceso de purificación de oligosacáridos mediante diafiltración (abstract; pág.331 punto 4.3)

Los documentos D05-D06 se refieren a procesos de purificación de licores de hidrólisis de restos agrícolas ricos en xilano mediante ultrafiltración y nanofiltración para verificar su capacidad para refinar y/o concentrar oligosacáridos.

Por lo tanto, los documentos D04-D06 serían relevantes para valorar la actividad inventiva de la invención en la forma en que se refleja en el Informe sobre el Estado de la Técnica.