



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 348 990**

⑫ Número de solicitud: 200930001

⑮ Int. Cl.:

C12N 11/10 (2006.01) **C12N 9/10** (2006.01)

C12P 19/18 (2006.01) **C12N 9/24** (2006.01)

C12R 1/66 (2006.01) **C12R 1/645** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **11.03.2009**

③ Fecha de publicación de la solicitud: **21.12.2010**

Fecha de la concesión: **28.09.2011**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **10.10.2011**

⑤ Fecha de publicación del folleto de la patente:
10.10.2011

⑦ Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 85%)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad Autónoma de Madrid (UAM) (Titular al 15%)

⑦ Inventor/es: **Alcalde Galeote, Miguel;**
Gutiérrez Alonso, Patricia;
Fernández Lobato, María;
Fernández-Arrojo, Lucía;
Ballesteros Olmo, Antonio y
Plou Gasca, Francisco José

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

④ Título: **Biocatalizador inmovilizado basado en alginato para la biotransformación de carbohidratos.**

⑦ Resumen:

Biocatalizador inmovilizado basado en alginato para la biotransformación de carbohidratos.

Procedimiento de obtención de un biocatalizador, que comprende: inmovilizar una enzima fúngica por inclusión en un gel de alginato cálcico; y el secado posterior el biocatalizador inmovilizado obtenido en el paso (a). La invención también se refiere al biocatalizador obtenido por el procedimiento de la invención y que comprende enzimas fúngicas, preferiblemente fructosiltransferasa o β -fructofuranosidasa, inmovilizadas en alginato. Además la invención se refiere al uso de dicho biocatalizador para la biotransformación en las que el sustrato es una disolución concentrada de un carbohidrato y se puede llevar a cabo en un reactor continuo.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Biocatalizador inmovilizado basado en alginato para la biotransformación de carbohidratos.

5 La presente invención se refiere a biocatalizadores que comprenden enzimas inmovilizadas en alginato y a su procedimiento de obtención. Además, mediante el secado de dicho biocatalizador, la invención también se refiere al uso de dicho biocatalizador para la biotransformación en las que el sustrato es una disolución concentrada de un carbohidrato y se puede llevar a cabo en un reactor continuo. Por tanto, la presente invención se puede encuadrar dentro del campo de la industria biotecnológica.

10 **Estado de la técnica anterior**

Los carbohidratos son el material biológico muy abundante en la naturaleza, se pueden utilizar como materia prima para una gran variedad de procesos industriales, dando lugar a otros productos con mucho interés industrial y tecnológico. Para ello, las enzimas implicadas en su transformación tienen un enorme interés.

15 El campo de los oligosacáridos prebióticos, como ingredientes funcionales en alimentación y nutracéuticos, se ha desarrollado de manera espectacular en los últimos años, estos compuestos se obtienen mediante transformaciones enzimáticas de carbohidratos.

20 El término prebiótico fue introducido por Gibson y Roberfroid, quienes definieron a los prebióticos como ingredientes no digeribles de los alimentos que afectan beneficiamente al huésped por una estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de un limitado grupo de bacterias en el colon. Los prebióticos resisten la digestión en la parte superior del tracto intestinal, y se metabolizan por las bacterias endógenas del colon.

25 Las moléculas prebióticas líderes en el mercado son los fructooligosacáridos (FOS) (cfr. P.T. Sangeetha, M.N. Armes, S.G. Prapulla, *Trends Food Sci. Technol.*, 2005, vol. 16, pp. 442-457; A.V. Rao, *J. Nutr.*, 1998, vol. 80, pp. 1442S-1445S). Los FOS pueden ejercer una serie de efectos sobre la persona que los consume: control del estreñimiento por aumento de la masa fecal, reducción de los episodios de diarreas causadas por rotavirus, mejora de los síntomas de intolerancia a la lactosa, aumento de la absorción de calcio, disminución de la capacidad mutagénica de ciertas enzimas microbianas como la nitro-reductasa (asociadas con el cáncer de colon), posible reducción de enfermedades relacionadas con dislipemias, etc.

30 Los FOS que se comercializan actualmente están formados por moléculas de fructosa unidas por enlaces glicosídicos β -(2-1), con una molécula de glucosa terminal (cfr. J.W. Yun, *Enzyme Microb. Technol.*, 1996, vol. 19, pp. 107-117), abreviándose como GF_n, estando *n* típicamente comprendido entre 2 y 4 (1-kestosa, nistosa y ¹F-fructosilnistosa). Estudios recientes muestran que el mayor efecto prebiótico es ejercido por el trisacárido 1-kestosa, en comparación con compuestos de mayor peso molecular de la serie (cfr. O. Bañuelos *et al.*, *Anaerobe*, 2008, vol. 14, pp. 184-189).

35 Los FOS se obtienen por síntesis enzimática a partir de sacarosa, utilizando sacarosa 1-fructosiltransferasas (EC 2.4.1.9), beta-fructofuranosidasas -invertasas- (EC 3.2.1.26) o incluso levansacarosas (EC 2.4.1.10) (cfr. L.E. Trujillo *et al.*, *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, vol. 28, pp. 139-144). Empleando beta-fructofuranosidasas el rendimiento de productos de síntesis que se alcanza es muy bajo, representando éstos menos del 4% (p/p) del total de carbohidratos de la mezcla. Sin embargo, con fructosiltransferasas el rendimiento que se puede alcanzar es mucho mayor, alcanzando valores próximos al 55-60% (p/p) de FOS referido al peso total de azúcares (cfr. M. Antosova, M. Polakovic, *Chem. Pap.* 2001, vol. 55, pp. 350-358). En la actualidad, los FOS se producen industrialmente utilizando fructosiltransferasas del género *Aspergillus* (p. ej. *A. oryzae*, *A. japonicus*, *A. niger*, *A. aculeatus*, etc.) o *Aureobasidium* (p. ej. *A. pullulans*) para generar oligosacáridos de cadena corta, de 3 a 5 unidades (cfr. C. Vannieuwenburgh *et al.*, *Bioprocess Biosyst. Eng.*, 2002, vol. 25, pp. 13-20; C.S. Chien *et al.*, *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, vol. 29, pp. 252-257).

40 La producción a gran escala de oligosacáridos prebióticos sintetizados por vía enzimática puede verse favorecida si se inmoviliza la enzima en un soporte sólido. Este proceso facilita la separación del biocatalizador del medio con la consiguiente parada de la reacción, su reutilización y, en algunos casos, un aumento de su estabilidad operacional. Además, permite diseñar reactores continuos de diferente configuración (lecho fijo, lecho fluidizado, tanque agitado, etc.). Se han estudiado distintos métodos de inmovilización para enzimas que actúan sobre carbohidratos: adsorción, unión covalente, entrecruzamiento, granulación, atrapamiento, encapsulación, etc. En cuanto a los métodos de inmovilización por adsorción y granulación, éstos suelen ser inadecuados debido a que las reacciones tienen lugar en un medio acuoso y la enzima se desprende progresivamente del soporte (lixiviación).

45 Uno de los métodos de inmovilización más estudiados para enzimas glicosídicas es el atrapamiento en geles de alginato cálcico, debido a la facilidad para llevarlo a cabo, la ausencia de cambios conformacionales en la estructura de la enzima, el bajo precio de los materiales empleados y la elevada actividad recuperada. No obstante, esta metodología presenta todavía ciertos inconvenientes (cfr. U. Jahnz *et al.*, *Engineering and Manufacturing for Biotechnology*, 2001, vol. 4, pp. 293-307). Por un lado, la estabilidad mecánica del gel es limitada en reactores que presenten una alta tensión tangencial. Además, si se utilizan tampones fosfato o citrato, tiene lugar la pérdida de calcio, lo que origina un deterioro del biocatalizador. Por otro lado, el alginato puede ser biodegradado en el propio

reactor o durante el almacenamiento cuando se trabaja en condiciones no estériles. Un hecho muy notorio es que la actividad específica (más concretamente, la actividad por unidad de volumen) de los catalizadores basados en alginato no es muy alta, inferior a 10 U/ml gel (cfr. K.D. Reh *et al.*, *Enzyme Microb. Tech.*, 1996, vol. 19, pp. 518-524). Pero sin lugar a dudas el mayor inconveniente de los biocatalizadores basados en alginato consiste en la lixiviación de la enzima durante el transcurso de la biotransformación, ya que los poros de la red de alginato son excesivamente grandes para la mayor parte de las enzimas, siendo, por tanto, un método muy adecuado para la inmovilización de células enteras (viables o no). En algunos casos se ha descrito la eliminación del agua contenida en las esferas de alginato cálcico mediante un proceso de liofilización, sin embargo, en estos biocatalizadores tampoco se ha observado una reducción en el lixiviado de la enzima (cfr. S.S. Betigeri *et al.*, *Biomaterials*, 2002, vol. 23, pp. 3627-3636).

Dada la importancia industrial de los oligosacáridos prebióticos, es deseable proporcionar enzimas y procedimientos para su obtención, que sean viables industrialmente.

15 Descripción de la invención

La presente invención proporciona biocatalizadores inmovilizados y un procedimiento para la obtención de dichos biocatalizadores, donde una de sus aplicaciones es la producción de oligosacáridos prebióticos, principalmente 1-kestosa (GF2), nistosa (GF3), 1F-fructosilnistosa (GF4) y 1F-fructosil-fructosilnistosa (GF5). Estos oligosacáridos prebióticos pueden ser utilizados como ingredientes funcionales en productos alimenticios, alimentos infantiles y/o alimentación animal.

También, pueden tener otras aplicaciones, como puede ser la obtención de jarabes de fructosa como edulcorantes a partir de sacarosa.

25 Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de obtención de un biocatalizador (a partir de ahora procedimiento de la invención), que comprende:

- 30 a. inmovilizar una enzima fúngica por inclusión en un gel de alginato cálcico.
- b. secar el biocatalizador inmovilizado obtenido en el paso (a).

En una realización preferida del procedimiento de invención, el secado se lleva a cabo a una temperatura de entre 30 y 50°C, esta temperatura dependerá de la termoestabilidad de la enzima inmovilizada.

35 El término “enzima fúngica” se refiere en la presente invención a un enzima obtenida a partir de un microorganismo, más concretamente mediante hongos, mediante técnicas conocidas por cualquier experto en la materia.

Estas enzimas pueden tener diferente actividad dependiendo del tipo de transformación en la que actúen, por ejemplo, pero sin limitarse pueden tener actividad fructosiltransferasa, β -fructofuranosidasa, β -galactosidasa, α -amilasa o glucosa isomerasa.

En una realización preferida del procedimiento de la invención, la enzima es fructosiltransferasa o β -fructofuranosidasa.

45 Cuando la enzima es una fructosiltransferasa, preferiblemente procede de un hongo de género *Aspergillus* o *Aureobasidium*. Y más preferiblemente de la especie *Aspergillus aculeatus*.

Cuando la enzima es una β -fructofuranosidasa, preferiblemente procede de un hongo de género *Rhodotorula*, *Schwanniomyces*, *Xanthophyllomyces* o *Saccharomyces*. Y más preferiblemente de la especie *Rhodotorula gracilis*.

Un aspecto positivo del biocatalizador de la invención es que presenta una alta actividad volumétrica, comparándolo con el biocatalizador-gel obtenido en el paso (a) del procedimiento descrito, convirtiéndolo en candidato idóneo para producir oligosacáridos prebióticos en reactores de un volumen reducido. Otro aspecto importante, a nivel industrial, es la alta estabilidad operacional del biocatalizador: mantiene su actividad catalítica en el reactor de lecho fijo durante largos tiempos de funcionamiento (> 700 h), trabajando a temperaturas próximas a 35°C y empleando como corriente de alimentación una disolución de sacarosa de 600 g/l. Por otro lado, el biocatalizador de la invención no recupera su volumen inicial (previo al secado) cuando por él circula una solución concentrada de sacarosa (o de otro azúcar). Otra ventaja importante del biocatalizador seco frente al biocatalizador húmedo, es que las condiciones de almacenamiento son mucho menos exigentes, por su bajo contenido en agua, lo que lo hace más resistente a la biodegradación o contaminación microbiana. Además, el biocatalizador de la invención es también muy estable en presencia de disolventes orgánicos, incluyendo los de alta polaridad como el metanol. Este hecho podría conferir a los biocatalizadores de la invención excelente aplicabilidad en reacciones sintéticas en disolventes orgánicos. Por otro lado, la metodología desarrollada es aplicable a enzimas fuertemente glicosiladas, para las que los métodos de inmovilización covalente suelen dar lugar a valores muy bajos de actividad recuperada y actividad volumétrica.

Por tanto, y debido a las características que confiere el procedimiento de obtención al biocatalizador, un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un biocatalizador inmovilizado obtenible por el procedimiento de la invención y que comprende (a partir de ahora biocatalizador de la invención o de tipo DALGEE ("*Dried alginate-trapped enzyme*")):

- 5 - una enzima fúngica inmovilizada en un gel de alginato cálcico.

El biocatalizador de la invención puede ser utilizado industrialmente para la obtención de oligosacáridos sin requerir etapas de separación o purificación posteriores. Dicho biocatalizador, tanto en su estado de gel ("biocatalizador-gel"), previo al secado, como en su variante desecada, puede ser empaquetado en un reactor de lecho fijo para la producción en continuo de fructooligosacáridos. Para ello se puede emplear como corriente de entrada al reactor, una disolución concentrada de carbohidrato, por ejemplo de sacarosa. En una realización particular, los productos resultantes de la actividad fructosiltransferasa son fructooligosacáridos de la serie 1F (1-kestosa, nistosa, 1F -fructosilnistosa y 1F -fructosil-fructosilnistosa), y su relación molar puede controlarse variando el caudal en el reactor.

10 15 La presente invención conlleva un procedimiento de obtención de fructooligosacáridos viable industrialmente. Además, la composición del producto de reacción (en particular, su contenido en tri-, tetra-, penta- y hexasacáridos) puede ser regulada en función del tiempo de residencia del reactor.

20 25 La metodología presentada no sólo es aplicable a fructosiltransferasas, sino que puede extenderse a otras enzimas que actúan sobre carbohidratos. En particular, la beta-fructofuranosidasa de *Rhodotorula gracilis*, ATCC1416, fue inmovilizada siguiendo los pasos anteriormente descritos (ver ejemplos). Aunque esta enzima es capaz de formar fructooligosacáridos bajo condiciones específicas, su reacción principal es la hidrólisis de sacarosa. Este proceso es interesante para la obtención de jarabes de fructosa como edulcorantes a partir de sacarosa.

30 35 Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere al uso del biocatalizador de la invención, para la hidrólisis de carbohidratos.

El término "carbohidratos" se refiere en la presente invención a azúcares capaces de transformarse a otros compuestos como fructooligosacáridos, jarabe de fructosa, entre otros. Estos azúcares pueden ser, pero sin limitarse sacarosa, lactosa, maltosa, glucosa o almidón.

40 45 En una realización preferida, el biocatalizador de la invención se utiliza para la obtención de fructooligosacáridos o de jarabe de fructosa.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento de hidrólisis de carbohidratos, que comprende:

- empaquetar el biocatalizador de la invención en un reactor continuo de lecho fijo;
- alimentar el reactor continuo de lecho fijo del paso (a) con una disolución de carbohidrato en una concentración de entre 500 g/l y 700 g/l.

50 55 En una realización preferida del procedimiento de hidrólisis, la temperatura del reactor está entre 30°C y 40°C.

En otra realización preferida, cuando el carbohidrato es sacarosa y el biocatalizador es una fructosiltransferasa inmovilizada, en la reacción se obtienen fructooligosacáridos, que más preferiblemente se seleccionan de la lista que comprende trisacáridos, tetrasacáridos, pentasacáridos, hexasacáridos o cualquiera de sus combinaciones.

En otra realización preferida, cuando el carbohidrato es sacarosa y el biocatalizador es una β -fructofuranosidasa inmovilizada, en la hidrólisis se obtiene jarabe de fructosa.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. La siguiente descripción detallada, ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

60 65 La Fig. 1 representa el proceso de inmovilización utilizado para obtener el biocatalizador-gel que se describe en esta invención.

La Fig. 2 representa el diagrama de flujo de nuestro sistema de producción de FOS, tanto con el biocatalizador-gel (2A) como con el tipo DALGEE (2B).

La Fig. 3 muestra la composición de azúcares (en % p/p) de la corriente de salida del reactor con el biocatalizador-gel de la fructosiltransferasa de *Aspergillus aculeatus* durante 750 h. Las condiciones de reacción fueron: alimentación,

600 g/ de sacarosa; temperatura del reactor, 35°C; caudal de las corrientes de entrada y salida del sistema, 0.84 ml/h; volumen de biocatalizador-gel empleado, 25 ml.

La Fig. 4 muestra el efecto del caudal de trabajo en la composición de la mezcla de FOS a la salida del reactor (4A) y en la productividad volumétrica, expresada en gramos de FOS por litro de reactor y día (4B).

La Fig. 5 muestra el aspecto del biocatalizador-gel (imagen superior) y después de someterse al proceso de secado (DALGEE, imagen inferior).

Las Fig. 6 (6A y 6B) muestran las micrografías de microscopía electrónica de barrido (SEM) del biocatalizador tipo DALGEE.

La Fig. 7 muestra un cromatograma de una muestra obtenida de la corriente de salida del reactor con el biocatalizador DALGEE de la fructosiltransferasa de *Aspergillus aculeatus*. Concretamente, corresponde a la muestra tomada a las 622 horas de funcionamiento continuo del reactor.

La Fig. 8 muestra la composición de azúcares (en % p/p) de la corriente de salida del reactor con el biocatalizador DALGEE de la fructosiltransferasa de *Aspergillus aculeatus* durante 750 h. Las condiciones de reacción fueron: alimentación, 600 g/ de sacarosa; temperatura del reactor, 35°C; caudal de las corrientes de entrada y salida del sistema, 0.6 ml/h; volumen de biocatalizador-gel empleado, 1 ml.

La Fig. 9 muestra las productividades volumétricas, expresadas en gramos de FOS por litro de reactor y día, para las dos formas de biocatalizador de la fructosiltransferasa de *Aspergillus aculeatus*: biocatalizador-gel y DALGEE. Las condiciones de operación son las mismas que las descritas en la figura 6 para el biocatalizador-gel y en la figura 9 para el tipo DALGEE.

La Fig. 10 muestra el estudio de la lixiviación tanto del biocatalizador-gel como del tipo DALGEE de la fructosiltransferasa de *Aspergillus aculeatus*. En la parte superior se representa el protocolo de trabajo seguido y en la parte inferior la actividad enzimática en el sobrenadante tras los sucesivos ciclos de lavado.

La Fig. 11 muestra un cromatograma de una muestra obtenida de la corriente de salida del reactor con el biocatalizador tipo DALGEE de la beta-fructofuranosidasa de *Rhodotorula gracilis* ATCC1416. Concretamente, corresponde a la muestra tomada a las 48 horas de funcionamiento continuo del reactor.

35 Ejemplos

Ejemplo 1

*Inmovilización por atrapamiento de la fructosiltransferasa de *Aspergillus aculeatus**

40 Se prepararon 30 ml de una disolución de alginato sódico SG-300® al 4% (p/v) en agua. Para conseguir una solución homogénea, se sometió la mezcla a agitación vigorosa a temperatura ambiente. A continuación, se pesaron 25 g de la disolución de alginato y se le añadieron 25 ml de una disolución enzimática, previamente concentrada por ultrafiltración, que contiene una fructosiltransferasa de *Aspergillus aculeatus* (la disolución enzimática de partida es comercial, Pectinex Ultra-SPL®, procedente de Novozymes A/S, Dinamarca). La actividad final de la mezcla fue de aproximadamente 135 U/ml. Tras conseguir una mezcla homogénea (mediante agitación suave 100 rpm durante 40 mn.), la mezcla se dejó reposar 1 hora para eliminar las burbujas de aire y posteriormente, se goteó con ayuda de una bomba peristáltica LKB-Pump P-1 (Pfizer-Pharmacia, Canadá) sobre 250 ml de una disolución 0.2 M de CaCl₂ en tampón acetato sódico 50 mM (pH 5.6), manteniendo esta disolución bajo agitación magnética (200 rpm).

55 La Fig. 1 muestra un esquema del proceso de inmovilización utilizado. El diámetro de las esferas obtenidas fue de 3 mm (a este biocatalizador se le denomina “biocatalizador-gel”). Los factores que determinaron el tamaño del biocatalizador fueron la velocidad de goteo controlada por la bomba peristáltica y el diámetro del extremo final del tubo por el que goteaba la disolución. Una vez formadas las esferas de alginato cálcico, se mantuvieron durante al menos 20 min en la disolución de CaCl₂ para asegurar la resistencia mecánica del inmovilizado. Posteriormente el inmovilizado se sometió a dos ciclos de lavado (incubando las esferas durante 40 min en tampón acetato sódico 0.01 M pH 5.6, a temperatura ambiente y con agitación magnética suave) con el fin de eliminar enzima que no hubiera quedado convenientemente atrapada en el gel de alginato. Las esferas de alginato con la enzima inmovilizada se almacenaron a 4°C.

60 La pérdida de actividad en el proceso de gelificación se midió a partir de la determinación de la actividad del sobrenadante y los lavados, estimándose en un 50%. No obstante, esta actividad puede recuperarse y utilizarse para un posterior proceso de inmovilización. La actividad volumétrica del biocatalizador obtenido en este ejemplo de realización fue de 10 U/ml.

Para la determinación de la actividad fructosiltransferasa de la enzima soluble se valoró la liberación de azúcares reductores mediante el método del ácido dinitrosalicílico (DNS). El ensayo se realizó empleando una disolución de

ES 2 348 990 B1

sacarosa de 100 mg/ml, en placas de 96 pocillos de fondo plano y volumen de 200 μ l. En cada pocillo se depositaron 45 μ l de solución de sacarosa 100 g/l (preparada en tampón acetato sódico 0.02 M, pH 5.6) y 5 μ l de la disolución con enzima. La placa se incubó durante 20 minutos, a 35°C y 200 rpm en un incubador con agitación orbital (Vortemp 56, Labnet). Para la curva de calibrado se prepararon pocillos con distintas concentraciones de glucosa (de 0 a 2 g/l). Tras los 20 minutos, se añadieron 50 μ l de DNS 10 g/l y se incubó la placa durante 30 minutos a 80°C. Se llevaron a cabo dos controles: el primero en ausencia de enzima y el segundo en ausencia de sacarosa. Una vez que la microplaca se enfrió a temperatura ambiente, se añadieron 150 μ l de agua Milli-Q y se midió la absorbancia a 540 nm en un lector de microplacas. Todas las muestras se prepararon por triplicado para minimizar errores. Una unidad de actividad enzimática (U) se definió como aquella capaz de formar un μ mol de azúcar reductor por minuto bajo las 5 condiciones de reacción anteriormente descritas. Para determinar la actividad de la enzima inmovilizada se incubaron 10 a 35°C, en un tubo eppendorf, 5 esferas de biocatalizador con 0.5 ml de disolución de sacarosa 100 g/l. La mezcla de reacción se mantuvo a 200 rpm durante 20 min. A continuación, se pipetearon 50 μ l del sobrenadante a un pocillo de 15 la microplaca. Se añadieron 50 μ l de la disolución de DNS y se incubó la placa durante 30 min a 80°C. El resto del procedimiento es el mismo que el descrito anteriormente.

Ejemplo 2

Obtención de fructooligosacáridos en un reactor en lecho fijo con el biocatalizador-gel de la fructosiltransferasa de *Aspergillus aculeatus*

20 El biocatalizador del Ejemplo 1 se utilizó para empaquetar 25 ml de una columna de vidrio (Amersham Pharmacia XK 16/20), termostatizada a 35°C y conectada a una bomba isocrática de doble pistón (modelo 515, Waters). El biorreactor se dispuso como un reactor de lecho fijo, con una corriente de entrada y otra de salida. La solución de alimentación contenía 600 g/l de sacarosa en tampón 0.02 M acetato sódico (pH 5.6), que se mantuvo con agitación 25 magnética y termostatización a 35°C.

La disposición del sistema no incluía ninguna corriente de recirculación. La Fig. 2 representa los reactores de lecho fijo desarrollados para estos estudios.

30 Después del tiempo de estabilización del sistema, se comenzaron a recoger muestras a la salida de la columna. Las muestras fueron centrifugadas durante 5 min a 4300 x g usando un eppendorf con filtro Durapore® de 0.45 μ m (Millipore), y analizadas por cromatografía líquida de alta resolución. Se empleó una bomba cuaternaria (Delta 600, Waters) y una columna de Phenomenex, Luna NH2 5 μ m 100A (250 x 4.6 mm).

35 La columna se mantuvo termostatizada a 25°C gracias a un horno (Timberline Instruments, Inc). La fase móvil empleada fue una mezcla de acetonitrilo/agua, que fue desgasificada con un flujo continuo de Helio de 100 ml/min. Se empleó un detector evaporativo de *light-scattering* (ELSD, DDL 31 Eurosep) que operó a una temperatura de 85°C y con N₂ como gas nebulizador. El análisis de datos se llevó a cabo con el Software Millennium 32 de Waters. Los análisis se realizaron operando en modo gradiente según el siguiente programa de la Tabla 1:

	Tiempo (min)	Caudal (ml/min)	% Acetonitrilo	% H₂O
45	0	0.9	75	25
50	3	0.9	75	25
55	4	0.9	70	30
60	6	0.9	70	30
	8	0.9	60	40
	14	0.9	60	40
	14.5	0.9	75	25
	20	0.9	75	25

60 La Fig. 3 muestra resultados obtenidos para el reactor empaquetado con el biocatalizador-gel durante 750 horas. Concretamente se representa el porcentaje en peso referido al total de azúcares en la mezcla, a lo largo de 750 horas de 65 funcionamiento continuo del reactor. Esta gráfica muestra la alta estabilidad operacional del biocatalizador. La Tabla 2 muestra la composición media, en gramos por litro, de la corriente de salida del reactor a un caudal de 0,84 ml/h, una vez alcanzado el estado estacionario.

TABLA 2

Composición media de la corriente de salida del reactor empaquetado con el biocatalizador-gel, a un caudal de 0.84 ml/h

5

10

15

20

Producto	Concentración (g/l)
Fructosa	0.0
Glucosa	28.0
Sacarosa	395.6
1-Kestosa (GF ₂)	175.3
Nistosa (GF ₃)	1.0
¹ F-Fructosilnistrosa (GF ₄)	0.0
FOS totales	176.4

La Fig. 4 muestra cómo la composición de la salida del reactor puede regularse variando el tiempo de residencia, que en definitiva se controla a través del caudal. Como se aprecia en la figura de la parte superior, un mayor caudal representa un menor tiempo de residencia y en consecuencia una mayor proporción de los productos de bajo grado de polimerización (en particular, 1-kestosa) en la mezcla de la salida. Por el contrario, un menor caudal implica un mayor tiempo de residencia y por ende una mayor proporción de los FOS con grado de polimerización más elevado: tri-, tetra-, penta- y hexasacáridos. Asimismo, un mayor caudal supone un menor porcentaje de sacarosa convertida en productos. Por tanto, la productividad volumétrica del reactor (gramos de FOS totales por día y por litro de reactor) se vio alterada por el caudal de trabajo, como se indica gráficamente en la parte inferior de la Fig. 4.

Ejemplo 3

Obtención de biocatalizador tipo DALGEE de la fructosiltransferasa de Aspergillus aculeatus

35

40

45

50

55

El biocatalizador del Ejemplo 1 se dejó secar al aire en un cristalizador de vidrio, a 35°C, durante 3 días. Tras este tiempo, el diámetro de las esferas obtenidas fue de 1 mm, lo cual supone una reducción del volumen del biocatalizador del 96% (suponiendo las partículas esféricas). La pérdida de actividad en el proceso de secado, por partícula de biocatalizador, se estimó en un 50%. Sin embargo, la actividad volumétrica del biocatalizador seco fue de 140 U/ml, por lo que se produjo un aumento de aproximadamente 13 o 14 veces en la actividad volumétrica con respecto al biocatalizador-gel.

La Fig. 5 muestra el aspecto de las esferas de biocatalizador, antes y después del proceso de secado. Para realizar un estudio morfológico de los soportes, se empleó un microscopio electrónico de barrido (SEM) HITACHI TM1000 con un potencial acelerador de electrones de 15 kV, y un detector semiconductor BSE de alta sensibilidad. La Fig. 6 muestra la morfología de las partículas de biocatalizador seco. En la Tabla 1 se recogen los aspectos más sobresalientes del biocatalizador tipo DALGEE. Las propiedades texturales fueron estudiadas mediante porosimetría de mercurio, usando un porosímetro Fisons Instruments Pascal 140/240. Las muestras fueron incubadas a 60°C durante 24 h antes del análisis. El valor del ángulo de contacto de Hg (141°) y la tensión superficial (484 mN/m) fueron seleccionados para evaluar los datos Presión/volumen por la ecuación Washburn, asumiendo un modelo de poro cilíndrico. La distribución del tamaño de partícula fue determinada por análisis de la curva de intrusión. A partir de la porosidad del material y asumiendo partículas esféricas, el factor de empaquetamiento y la distribución del tamaño de partícula se calcularon de acuerdo con la teoría de Mayer-Stowe. El contenido en agua se determinó por el método Karl-Fischer. Se observa que los DALGEEs presentan un volumen de poro muy pequeño (0.072 cm³/g), con un máximo en la distribución de tamaños de poro de 8.3 nm. Este dato explica la baja lixiviación de los biocatalizadores tipo DALGEE, ya que la mayor parte de las enzimas no van a poder escapar a través de los poros.

TABLA 3

Características más destacadas del biocatalizador DALGEE

60

65

Actividad enzimática (U/ml)	140
Tamaño (diámetro) de partícula (mm)	1

Volumen de poro (cm ³ /g)	0.072
Diámetro medio de poro (nm)	8.3
Contenido en agua (% p/p)	1.5

Ejemplo 4

10 *Obtención de fructooligosacáridos en un reactor en lecho fijo con DALGEE de la fructosiltransferasa de Aspergillus aculeatus*

15 El biocatalizador del Ejemplo 3 se utilizó para empaquetar una columna de 1 ml (0.7 x 2.5 cm), termostatizada a 35°C y conectada a una bomba isocrática de doble pistón. La solución de alimentación contenía 600 g/l de sacarosa en tampón 0.02 M acetato sódico (pH 5.6), que se mantuvo con agitación magnética y termostatización a 35°C. La disposición del sistema no incluía ninguna corriente de recirculación. La Fig. 2 representa los reactores de lecho fijo desarrollados para estos ensayos. Después del tiempo de estabilización del sistema, se comenzó a recoger muestras a la salida de la columna. Las muestras fueron centrifugadas durante 5 min a 4300 x g usando un tubo Eppendorf con filtro Durapore® de 0.45 µm (Millipore), y analizadas por cromatografía líquida de alta resolución como se describe en el Ejemplo 2. La Fig. 7 muestra un cromatograma típico de la mezcla de reacción a la salida del reactor que contiene el biocatalizador DALGEE.

20 La Fig. 4 muestra cómo la composición de la salida del reactor puede regularse variando el tiempo de residencia, que en definitiva se controla a través del caudal. Como se aprecia en la figura de la parte superior, un mayor caudal representa un menor tiempo de residencia y en consecuencia una mayor proporción de los productos de bajo grado de polimerización (en particular, 1-kestosa) en la mezcla de la salida. Por el contrario, un menor caudal implica un mayor tiempo de residencia y por ende una mayor proporción de los FOS con grado de polimerización más elevado: tri-, tetra-, penta- y hexasacáridos. Asimismo, un mayor caudal supone un menor porcentaje de sacarosa convertida en productos. Por tanto, la productividad volumétrica del reactor (gramos de FOS totales por día y por litro de reactor) se vio alterada por el caudal de trabajo, como se indica gráficamente en la parte inferior de la Fig. 4.

25 En la parte inferior de la Fig. 8, se muestra la composición de la corriente de salida en %(p/p), referido al peso total de azúcares en la mezcla, a lo largo de 700 horas de funcionamiento continuo del reactor empaquetado con el biocatalizador DALGEE. Esta gráfica muestra la alta estabilidad operacional del biocatalizador, ya se observa cómo la actividad catalítica del reactor permanece prácticamente invariable a lo largo de casi todo el ensayo. En la Tabla 4 se recogen las concentraciones medias de los distintos carbohidratos a la salida del reactor, una vez alcanzado el estado estacionario, utilizando un caudal de 0.6 ml/h. El reactor resultó ser estable durante al menos 750 h de trabajo. La productividad obtenida se estimó en 3680 g FOS por día y litro de reactor, tal como se puede apreciar en la Fig. 9.

40 TABLA 4

50 *Composición media de la corriente de salida del reactor empaquetado con el biocatalizador DALGEE, a un caudal de 0.6 ml/h*

Producto	Concentración (g/l)
Fructosa	0.0
Glucosa	189.0
Sacarosa	124.8
1-Kestosa (GF ₂)	140.8
Nistosa (GF ₃)	103.5
¹ F-Fructosilnistosa (GF ₄)	33.1
¹ F-Fructosil-fructosilnistosa (GF ₅)	8.9
FOS totales	286.0

55 De esta forma, la Fig. 9 muestra las productividades volumétricas, expresada en gramos de FOS por litro de reactor y día, para las dos formas de biocatalizador, biocatalizador-gel y DALGEE, utilizando un caudal de 0.84 ml/h para el biocatalizador-gel y 0.60 ml/h para el DALGEE, durante las 750 horas de operación del biorreactor. Se aprecia que en el caso del biocatalizador-gel, la productividad es próxima a 100 g de FOS por litro de reactor y día, mientras que con el tipo DALGEE, alcanza un valor en torno a los 4000 g FOS por litro de reactor y día.

Ejemplo 5

Estudio de la lixiviación del biocatalizador-gel y DALGEE

5 Se sometió a los biocatalizadores inmovilizados de la fructosiltransferasa de *Aspergillus aculeatus* a sucesivos ciclos de lavado con solución tampón (acetato sódico 0.02 M pH 5.6). En cada ciclo se incubaban 10 partículas de biocatalizador durante 1 h, a 600 rpm y 35°C, con 500 µl de tampón. Tras cada lavado se extraían los 500 µl de solución, para evaluar la enzima liberada, y se sustituían por solución tampón fresca para el siguiente ciclo. El porcentaje de lixiviación tras el primer ciclo fue del 7.5% para el biocatalizador-gel y del 5% para el DALGEE. A partir del tercer 10 ciclo, la lixiviación puede considerarse despreciable, como se representa en la Fig. 10.

Ejemplo 6

*Obtención de biocatalizador tipo DALGEE de la beta-fructofuranosidasa de *Rhodotorula gracilis* ATCC1416*

15 Sobre 30 g de la disolución de alginato, preparada según se describe en el Ejemplo 1, se añadieron 30 ml de una disolución enzimática, de una beta-fructofuranosidasa extracelular de *Rhodotorula gracilis* ATCC1416. La producción de esta beta-fructofuranosidasa se llevó a cabo en cultivos de *Rhodotorula gracilis* ATCC1416 crecidos en medio mínimo para levaduras suplementado con maltosa. Los cultivos se realizaron en matraces de vidrio incubados a una 20 temperatura comprendida entre 28-30°C y con agitación orbital constante de 180-235 rpm. Las condiciones óptimas de crecimiento fueron 30°C y 235 rpm. Se obtuvo la fracción libre de células por centrifugación, y se concentró utilizando un sistema de filtración tangencial (filtro de 30 kDa). Finalmente, el concentrado se sometió a diálsis frente a HCl-Tris 20 mM pH 7 durante 2 horas a una temperatura de 4°C.

25 La actividad final de la mezcla fue de aproximadamente 12 U/ml. La preparación del biocatalizador-gel se realizó tal como se describe en el Ejemplo 1. La pérdida de actividad en el proceso de gelificación se midió a partir de la determinación de la actividad del sobrenadante y los lavados, estimándose en un 60%. La actividad volumétrica del biocatalizador obtenido en este ejemplo de realización fue de 0.8 U/ml. El biocatalizador obtenido se sometió a un proceso de secado como se describe en el Ejemplo 3 dando lugar a un biocatalizador tipo DALGEE. La pérdida de actividad en el proceso de secado, por partícula de biocatalizador, se estimó en un 45%. La actividad volumétrica del biocatalizador seco fue de 15 U/ml, por lo que se produjo un aumento de aproximadamente 18 veces en la actividad volumétrica con respecto al biocatalizador-gel.

Ejemplo 7

*Hidrólisis de sacarosa en un reactor en lecho fijo con DALGEE de la beta-fructofuranosidasa de *Rhodotorula gracilis* ATCC1416*

35 El biocatalizador del Ejemplo 6 se utilizó para empaquetar una columna de 1.5 ml (0.6 x 5.3 cm), termostatizada a 40 35°C y conectada a una bomba isocrática de doble pistón. La solución de alimentación contenía 600 g/l de sacarosa en tampón 0.02 M acetato sódico (pH 5.6), que se mantuvo con agitación magnética y termostatización a 35°C. Después del tiempo de estabilización del sistema, se comenzó a recoger muestras a la salida de la columna. Las muestras fueron analizadas como se describe en el Ejemplo 2. Utilizando un caudal de 0.6 ml/h, la composición media a la salida del reactor fue de: 124 g/l fructosa, 147 g/l glucosa, 317 g/l sacarosa, 12 g/l 6-kestosa. La Fig. 12 muestra 45 un cromatograma típico de la mezcla de reacción a la salida del reactor que contiene el biocatalizador DALGEE. El reactor empaquetado con el biocatalizador DALGEE beta-fructofuranosidasa de *R. gracilis* ATCC1416 mantuvo su actividad inicial durante al menos 48 horas. La productividad obtenida se estimó en 2600 g de azúcares reductores por día y litro de reactor.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de obtención de un biocatalizador, que comprende:

- 5 a. inmovilizar una enzima fúngica por inclusión en un gel de alginato cálcico.
b. secar el biocatalizador inmovilizado obtenido en el paso (a).

10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde el secado se lleva a cabo a una temperatura de entre 30 y 50°C.

15 3. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde la enzima es fructosiltransferasa o β -fructofuranosidasa.

15 4. Procedimiento según la reivindicación 3, donde la fructosiltransferasa se obtiene de un hongo de género *Aspergillus*.

5. Procedimiento según la reivindicación 4, donde el hongo es de la especie *Aspergillus aculeatus*.

20 6. Procedimiento según la reivindicación 3, donde la β -fructofuranosidasa obtiene de un hongo de género *Rhodotorula*.

7. Procedimiento según la reivindicación 6, donde el hongo es de la especie *Rhodotorula gracilis*.

25 8. Biocatalizador inmovilizado obtenible por el procedimiento descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y que comprende:

- una enzima fúngica inmovilizada en un gel de alginato cálcico.

30 9. Uso del biocatalizador según la reivindicación 8, para la hidrólisis de carbohidratos.

35 10. Uso del biocatalizador según la reivindicación 9, donde los carbohidratos son sacarosa, lactosa, maltosa, glucosa o almidón.

11. Uso del biocatalizador según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, para la obtención de fructooligosacáridos.

40 12. Uso del biocatalizador según cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, para la obtención de jarabe de fructosa.

13. Procedimiento de hidrólisis de carbohidratos, que comprende:

- 45 a. empaquetar un biocatalizador inmovilizado, descrito en la reivindicación 8, en un reactor de lecho fijo;
b. alimentar el reactor continuo de lecho fijo del paso (a) con una disolución de carbohidrato en una concentración de entre 500 g/l y 700 g/l.

50 14. Procedimiento según la reivindicación 13, donde la temperatura del reactor está entre 30°C y 40°C.

15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, donde el carbohidrato es sacarosa.

55 16. Procedimiento según la reivindicación 15, donde el biocatalizador es una fructosiltransferasa inmovilizada.

17. Procedimiento según la reivindicación 16, donde en la hidrólisis se obtiene fructooligosacáridos que se seleccionan de la lista que comprende trisacáridos, tetrasacáridos, pentasacáridos, hexasacáridos o cualquiera de sus combinaciones.

60 18. Procedimiento según la reivindicación 15, donde el biocatalizador es una β -fructofuranosidasa inmovilizada.

19. Procedimiento según la reivindicación 18, donde en la hidrólisis se obtiene jarabe de fructosa.

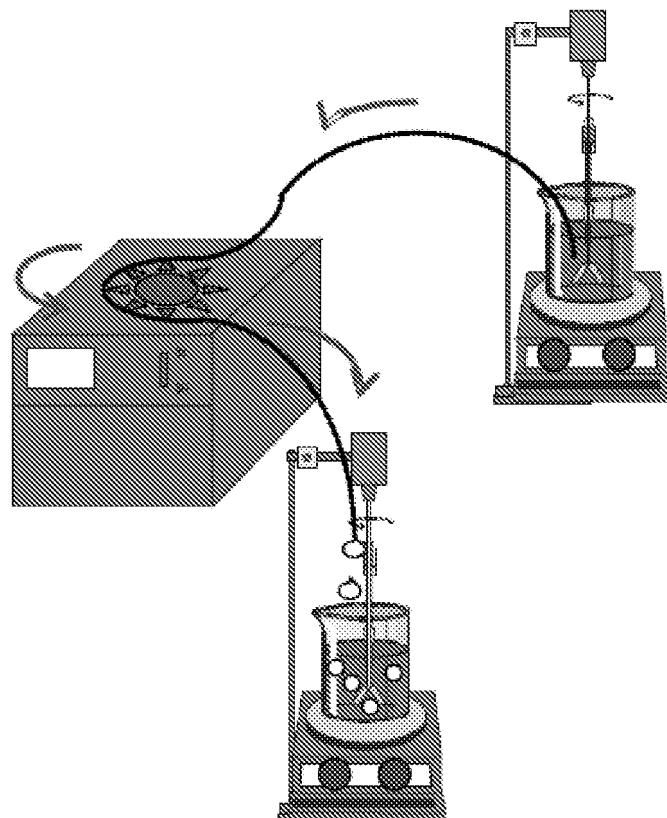


Figura 1

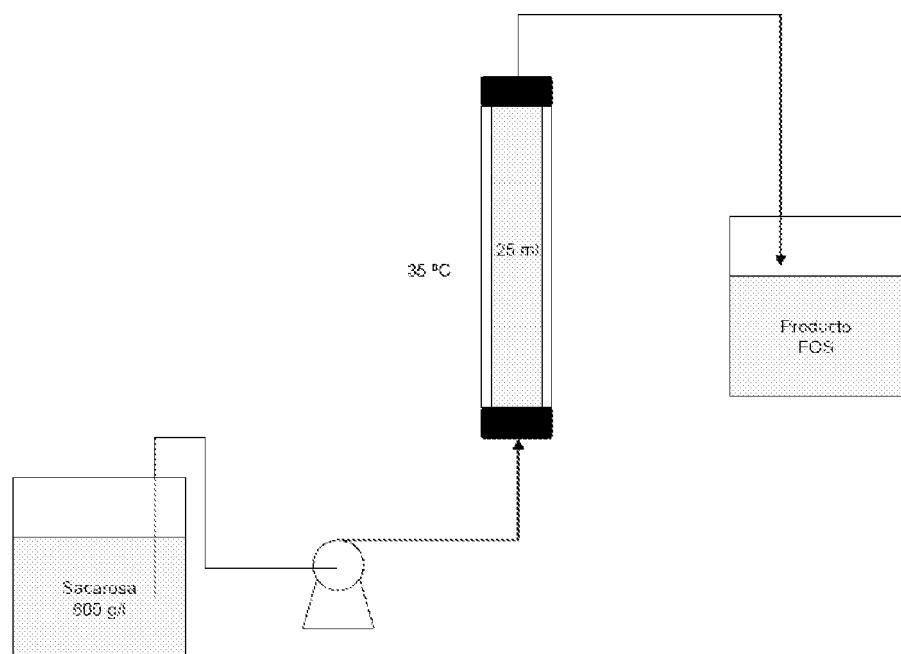


Figura 2. A
FIC

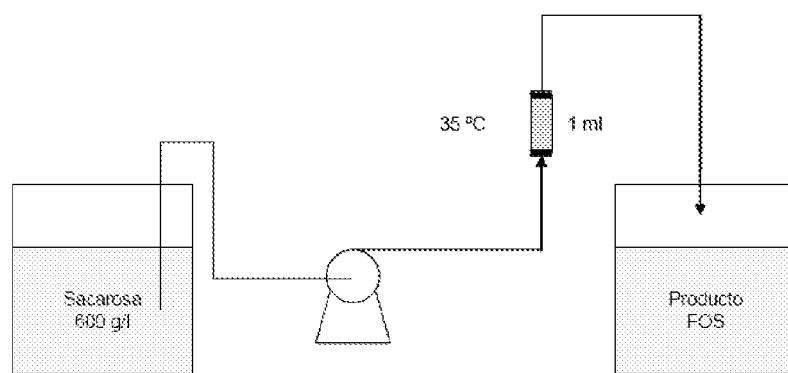


Figura 2. B

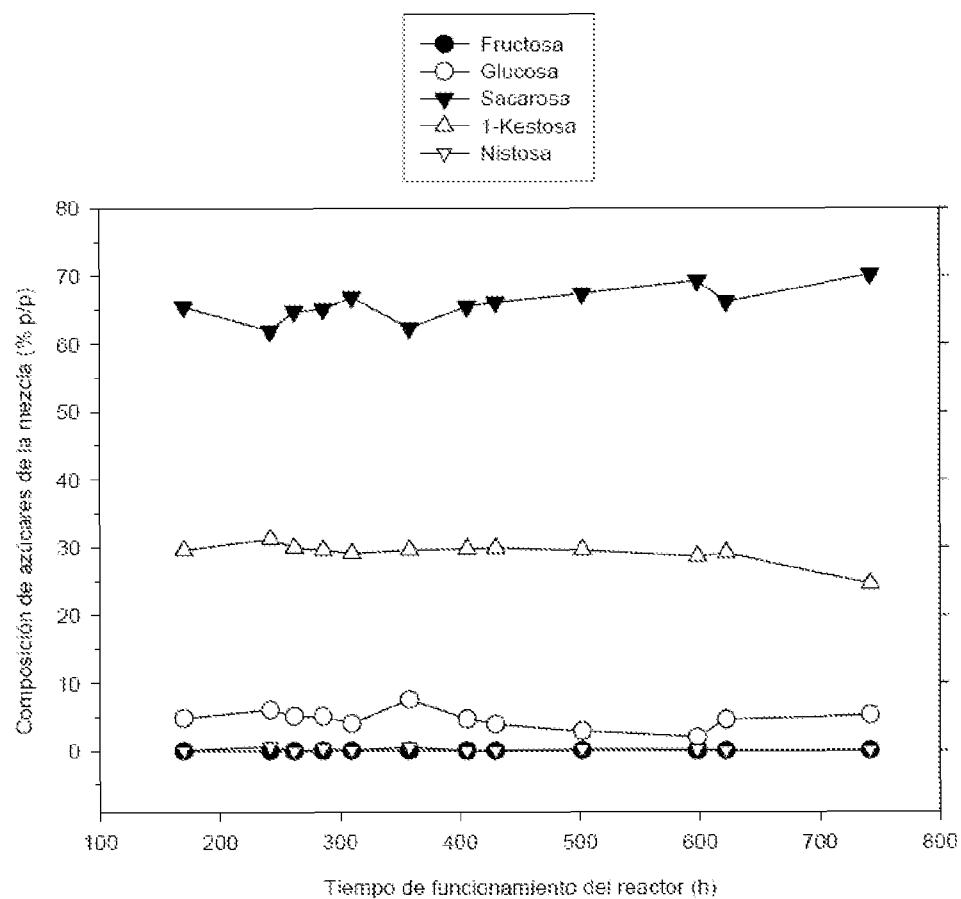


Figura 3

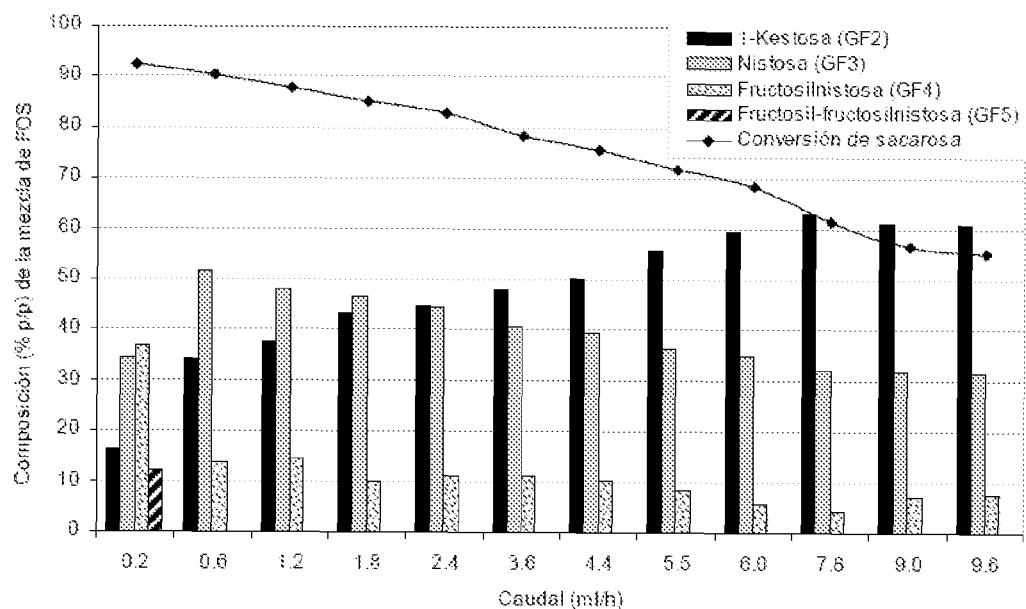


Figura 4. A

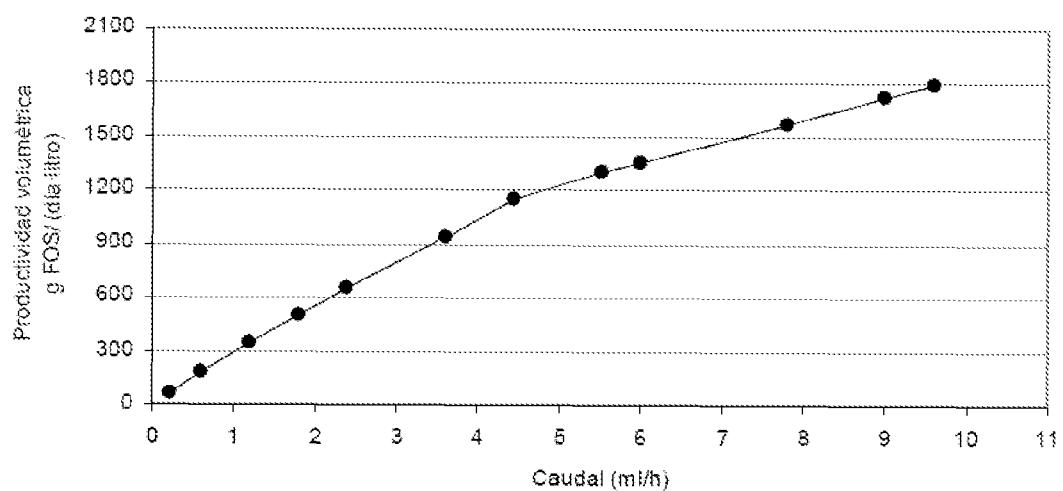


Figura 4. B

ES 2 348 990 B1

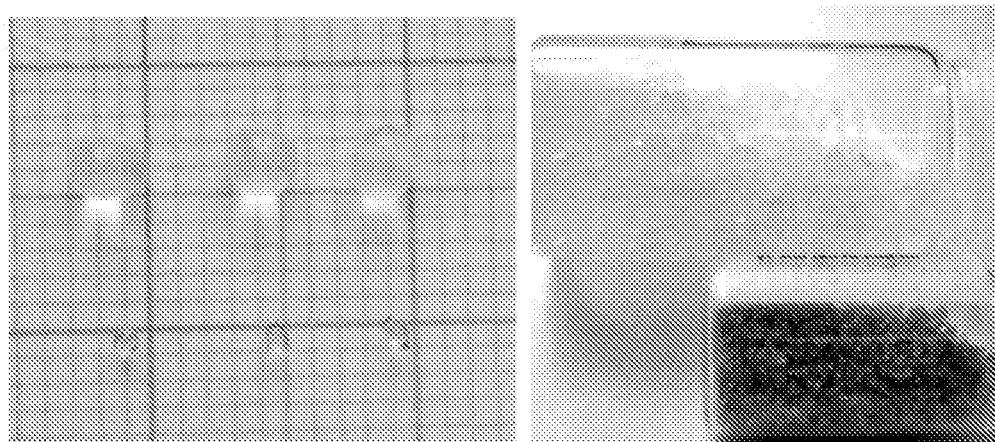


Figura 5

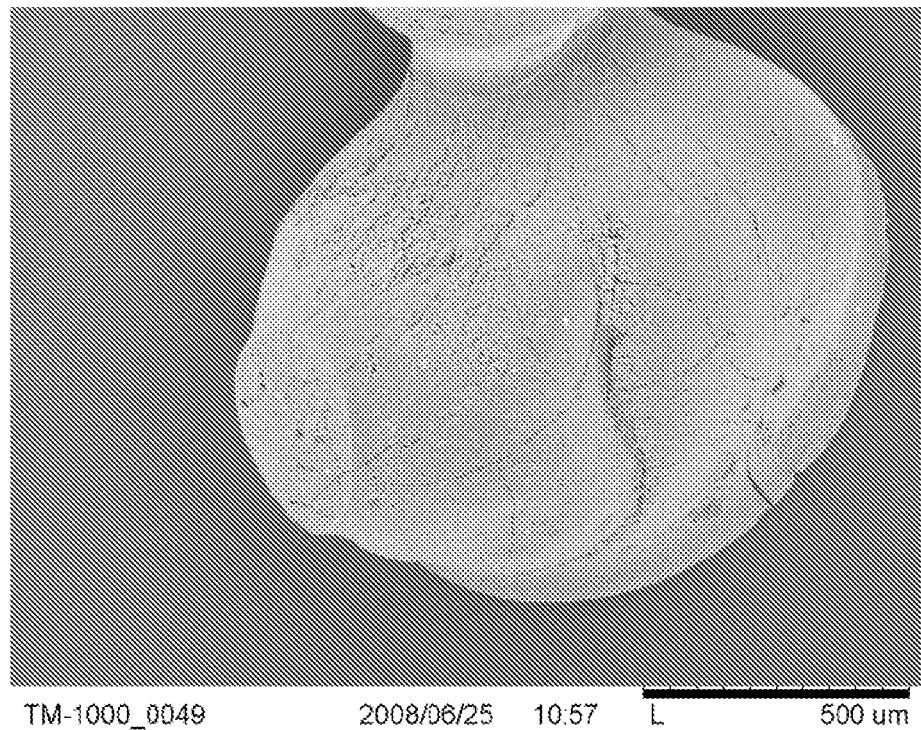


Figura 6. A

ES 2 348 990 B1

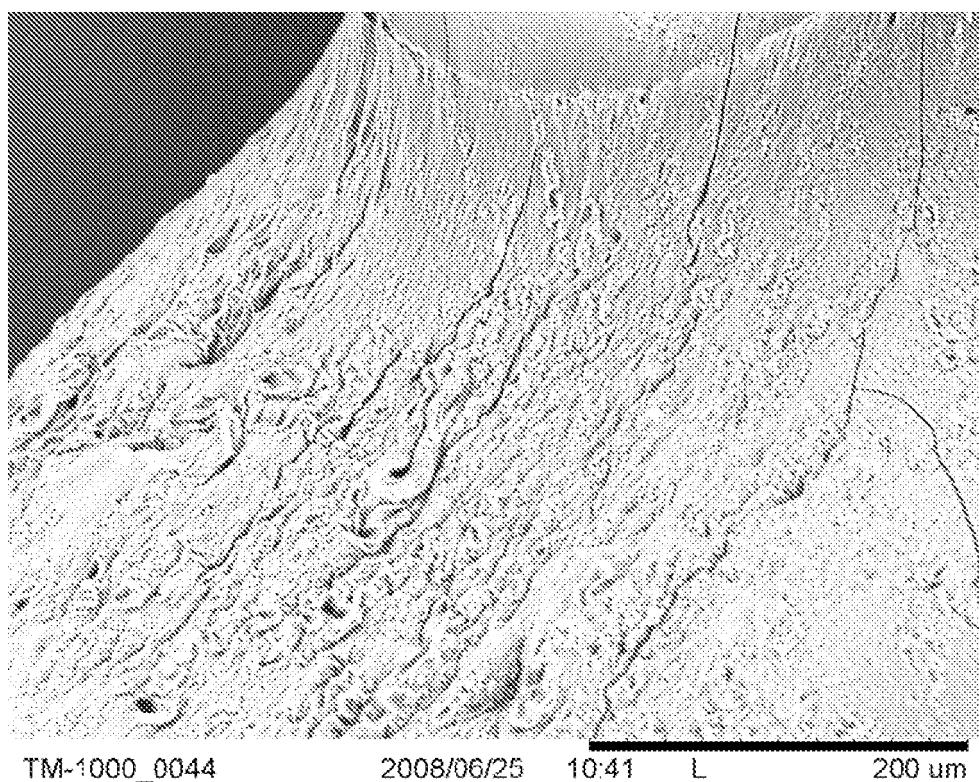


Figura 6. B

ES 2 348 990 B1

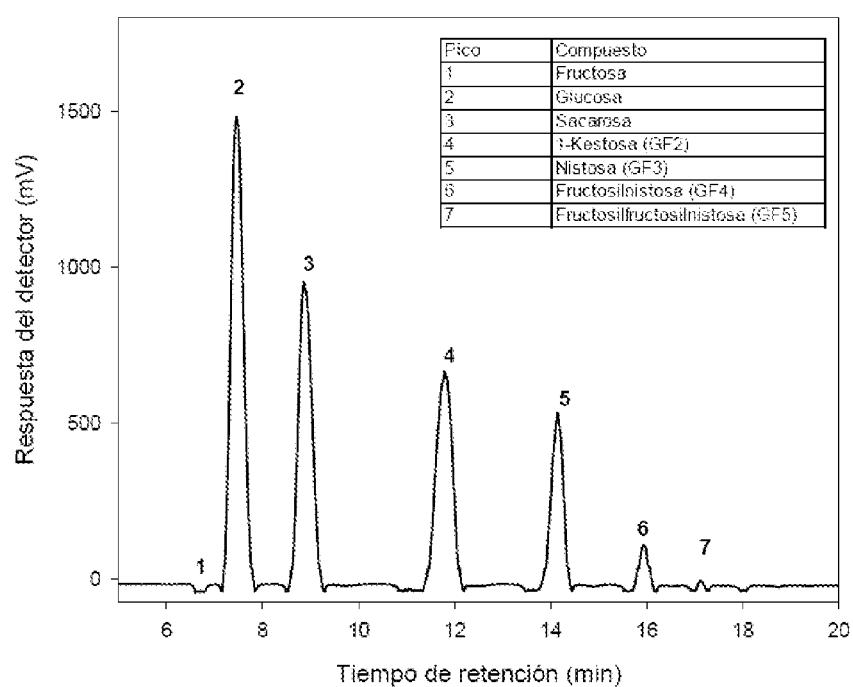


Figura 7

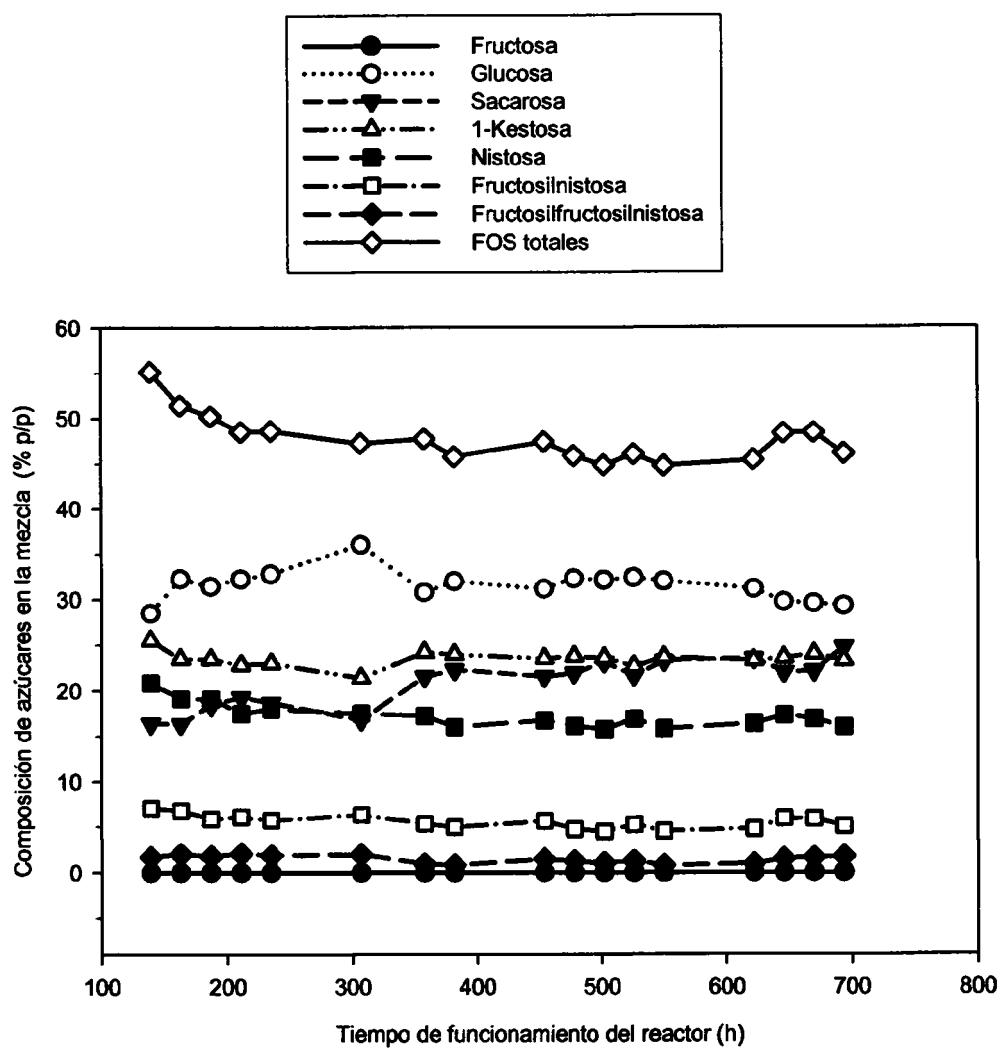


FIG. 8

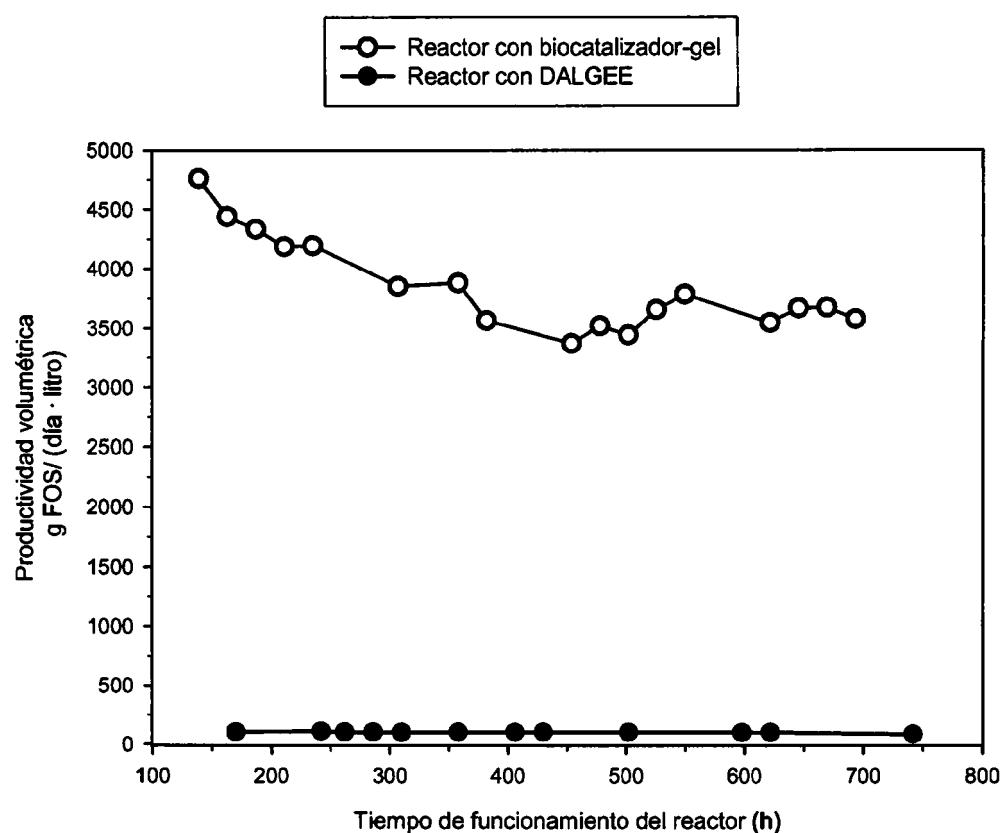


FIG. 9

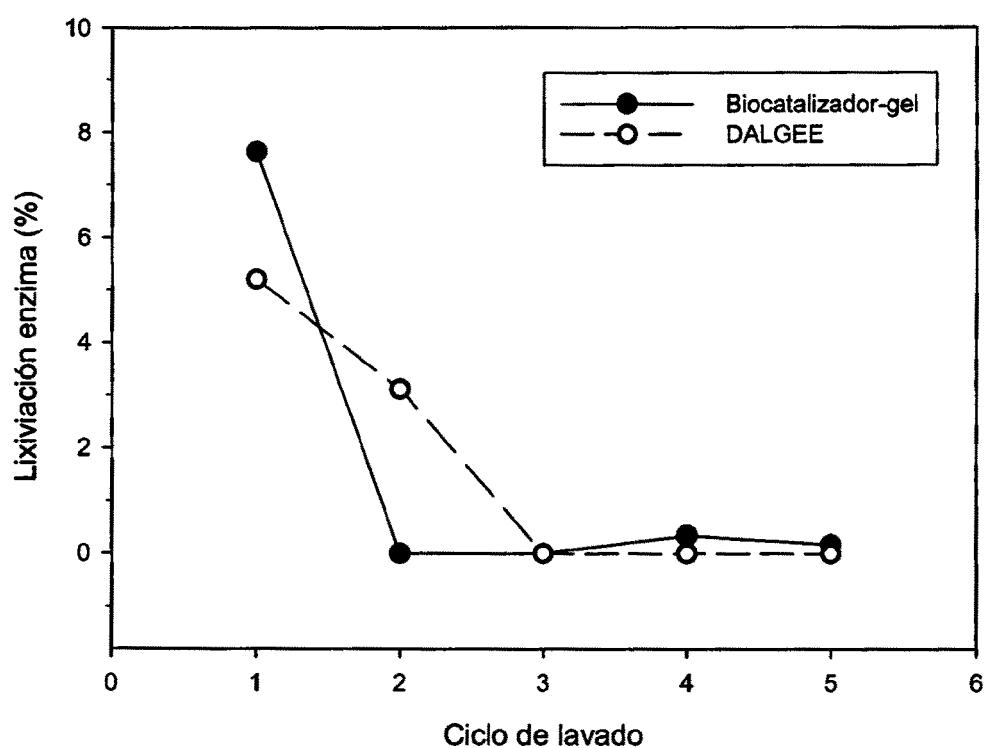
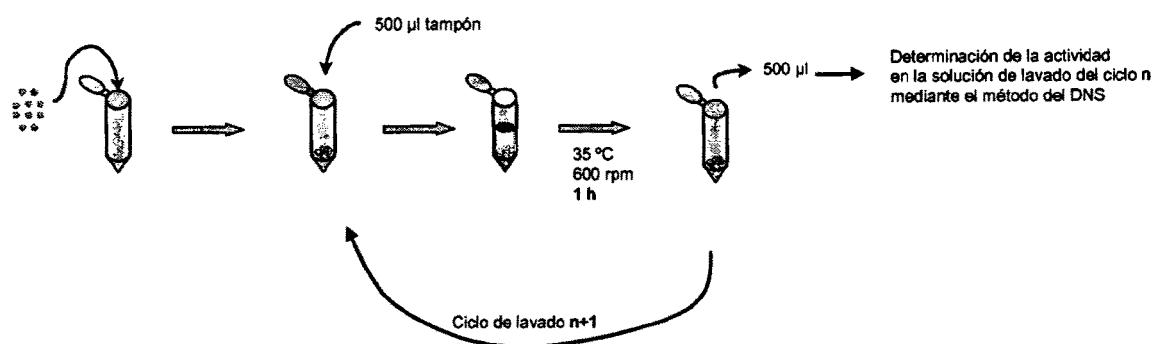


FIG. 10

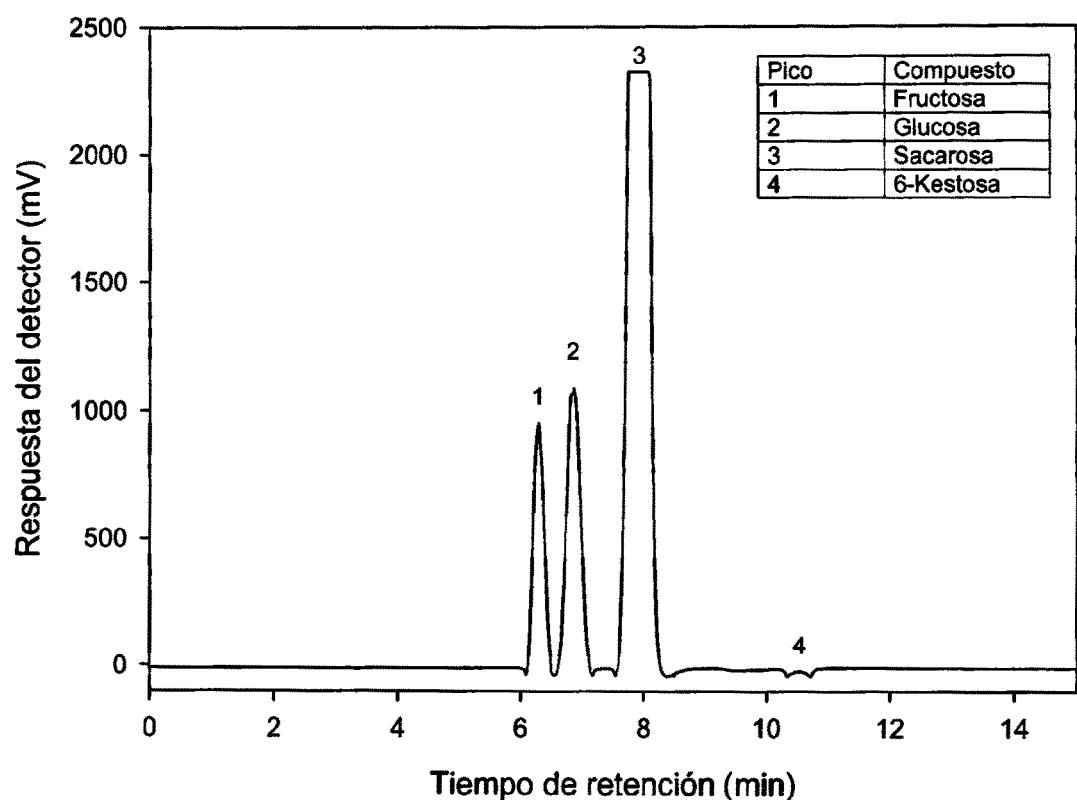


FIG. 11



②1 N.º solicitud: 200930001

②2 Fecha de presentación de la solicitud: 11.03.2009

③2 Fecha de prioridad: 00-00-0000

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	GHAZI, I. et al.: "Immobilisation of Fructosyltransferase from <i>Aspergillus aculeatus</i> on Epoxy-Activated Sepabeads EC for the Synthesis of Fructo-Oligosaccharides", Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic (2005), vol. 35 (1-3), pp.: 19-27, ISSN 1381-1177, todo el documento.	1-19
A	CRUZ, R. et al.: "Production of Fructooligosaccharides by the Mycelia of <i>Aspergillus japonicus</i> Immobilized in Calcium Alginate", Bioresource Technology (1998), vol. 65 (1-2), pp.: 139-143, ISSN 0960-8524, todo el documento.	1-19
A	US US5215905 A (KIM, M.H. et al.) 01.06.1993, todo el documento.	1-19
A	KR 900003710B B (MIWON CO) 30.05.1990, (resumen) BASE DE DATOS WPI [en línea], Thomson Corp., Philadelphia, USA, [recuperado el 06/05/2010]. Recuperado de WPI en EPOQUENET, (EPO), DW 199123, N° DE ACCESO 1991-169323.	1-19
A	ES 2255847 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 01.07.2006, todo el documento.	1-19
A	WO 2007/017537 A1 (UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID et al.) 15.02.2007, todo el documento.	1-19
A	WO 2007/074187 A1 (UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID et al.) 05.07.2007, todo el documento.	1-19

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: TODAS

Fecha de realización del informe 23.11.2010	Examinador A. Maqueda Herrero	Página 1/4
--	----------------------------------	---------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N11/10 (2006.01)

C12N9/10 (2006.01)

C12P19/18 (2006.01)

C12N9/24 (2006.01)

C12R1/66 (2006.01)

C12R1/645 (2006.01)

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

C12N, C12P, C12R

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, FSTA, CA

Fecha de Realización de la Opinión Escrita:

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-19 Reivindicaciones	SI NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-19 Reivindicaciones	SI 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 se publica.

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	GHAZI, I. et al.: "Immobilisation of Fructosyltransferase from <i>Aspergillus aculeatus</i> on Epoxy-Activated Sepabeads EC for the Synthesis of Fructo-Oligosaccharides", Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic (2005), vol. 35 (1-3), pp.: 19-27, ISSN 1381-1177, todo el documento.	
D02	CRUZ, R. et al.: "Production of Fructooligosaccharides by the Mycelia of <i>Aspergillus japonicus</i> Immobilized in Calcium Alginate", Bioresource Technology (1998), vol. 65 (1-2), pp.: 139-143, ISSN 0960-8524, todo el documento.	
D03	US US5215905 A (KIM, M.H. et al.) 01.06.1993, todo el documento.	
D04	KR 900003710B B (MIWON CO) 30.05.1990, (resumen) BASE DE DATOS WPI [en línea], Thomson Corp., Philadelphia, USA, [recuperado el 06/05/2010]. Recuperado de WPI en EPOQUENET, (EPO), DW 199123, Nº DE ACCESO 1991-169323	
D05	ES 2255847 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS) 01.07.2006, todo el documento.	
D06	WO 2007/017537 A1 (UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID et al.) 15.02.2007, todo el documento.	
D07	WO 2007/074187 A1 (UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID et al.) 05.07.2007, todo el documento.	

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 solicitud reivindica un biocatalizador inmovilizado así como un procedimiento para su obtención. En la realización de dicho procedimiento se inmoviliza una enzima fúngica mediante inclusión en un gel de alginato cálcico y posteriormente se seca. Una de las aplicaciones de estos biocatalizadores es la producción de fructooligosacáridos (FOS) -oligosacáridos prebióticos- (1-kestosa, nistosa, 1^F-fructosilnistosa y 1^F-fructosil-fructosilnistosa) que pueden ser utilizados como ingredientes funcionales en productos alimenticios.

Los biocatalizadores también pueden usarse para obtener jarabes de fructosa (edulcorantes) a partir de sacarosa.

Las actividades enzimáticas reivindicadas para la obtención del biocatalizador son la fructosil-transferasa (procedente de un hongo del género *Aspergillus*) y la beta-fructofuranosidasa (originaria de un hongo del género *Rhodotorula*).

D01 y D02 representan el estado de la técnica más cercano a la solicitud. D01 describe un procedimiento para inmovilizar una fructosil-transferasa procedente de *Aspergillus aculeatus* en una matriz polimérica basada en poli-metacrilato. Una vez conseguida la inmovilización de la enzima, ésta se utiliza para la obtención de FOS como kestosa, nistosa y 1^F-fructofuranosil-nistosa. Este procedimiento es muy similar al de la solicitud, sólo que la matriz utilizada para inmovilizar la enzima es diferente.

D02 describe un procedimiento para producir FOS. Para ello inmovilizan micelios completos de *Aspergillus japonicus* (con actividades fructosil-transferasa y fructofuranosidasa) en partículas de gel de alginato cálcico. En este caso, las esferas de alginato cálcico conteniendo el micelio con las actividades enzimáticas mencionadas no son sometidas a secado.

Tanto D01 como D02 plantean diferencias respecto a la solicitud en la forma de resolver el problema técnico planteado: sintetizar FOS utilizando actividades enzimáticas inmovilizadas. Así, como se ha dicho anteriormente, en D01 se utiliza enzimas aisladas inmovilizadas en un soporte polimérico sintético (poli-metacrilato). En D02, se inmovilizan, no las enzimas, sino micelios completos que contienen actividades enzimáticas idénticas a la de la solicitud. En este caso, no se realiza secado alguno del conjunto.

La solicitud, al contrario que en D01 y D02, utiliza una técnica en la que se utiliza como soporte para la inmovilización de las enzimas, alginato cálcico. Dado que el tamaño de poro del soporte plantearía problemas de lixiviación de las enzimas y, por tanto, disminuiría el rendimiento de la reacción en la que se obtienen los FOS, los solicitantes someten el conjunto a una etapa de secado. Con esta etapa adicional de secado se consiguen una mayor estabilidad y una mayor actividad volumétrica del biocatalizador.

D03-D07 tan sólo reflejan el estado de la técnica anterior.

Así pues, se considera que las reivindicaciones 1-19 de la solicitud cumplen los requisitos de novedad y actividad inventiva.