

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 355 788**

21 Número de solicitud: 200930375

51 Int. Cl.:  
**C12P 19/00** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **29.06.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **31.03.2011**

Fecha de la concesión: **25.01.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **06.02.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**06.02.2012**

73 Titular/es:  
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (Titular al 52%)  
SERRANO, 117  
28006 MADRID, ES y  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
(Titular al 48%)**

72 Inventor/es:  
**RUPÉREZ ANTÓN, MARÍA PILAR;  
PÉREZ COZAR, MARÍA LUISA;  
REDONDO CUENCA, ARACELI y  
VILLANUEVA SUÁREZ, MARÍA JOSÉ**

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **MÉTODO PARA LA OBTENCIÓN DE OLIGOSACÁRIDOS VEGETALES.**

57 Resumen:

Método para la obtención de oligosacáridos vegetales.

La presente invención se refiere a un método para la obtención de oligosacáridos a partir de cualquier parte de un vegetal, preferiblemente del okara, subproducto que queda tras la elaboración de la leche de soja o de la elaboración del tofu, que comprende las etapas de obtener la fibra soluble y/o insoluble de un vegetal, hidrolizar la fibra del apartado (a) mediante la adición de una mezcla enzimática que comprende al menos una glicosidasa, incubar la mezcla obtenida en el apartado (b) a una temperatura de entre 20 y 50°C, y aislar los oligosacáridos del producto obtenido en el apartado (c).

ES 2 355 788 B1

## DESCRIPCIÓN

Método para la obtención de oligosacáridos vegetales.

5 La presente invención se refiere a un método de obtención de oligosacáridos a partir de cualquier parte de un vegetal. Preferiblemente los oligosacáridos se obtienen del okara, subproducto que queda tras la elaboración de la leche de soja o de la elaboración del tofu. Dicho método comprende la hidrólisis de la fibra soluble y/o insoluble, o de la fibra insoluble dispersada en un medio líquido, mediante la adición de una mezcla enzimática que comprende al menos una glicosidasa. Dicha glicosidasa puede ser al menos una beta-glucanasa, al menos una xilanasa, al menos una celulasa, al menos una pentosanasa, al menos una arabinasa, o cualquiera de sus combinaciones. El método de la presente invención se ha optimizado para obtener mayores rendimientos y por ello además puede comprender una etapa de tratamiento en autoclave previa a la hidrólisis enzimática. Con la optimización de las condiciones del método de la presente invención se consigue reducir el tiempo de incubación para llevar a cabo la hidrólisis, obteniendo además mayores rendimientos. Los oligosacáridos obtenidos se pueden utilizar para la elaboración de un alimento funcional.

### 15 Estado de la técnica anterior

Algunos de los polisacáridos que constituyen la fibra alimentaria, así como los oligosacáridos, se consideran ingredientes prebióticos, ya que son capaces de estimular el crecimiento selectivo de bacterias del colon beneficiosas para la salud (Gibson y Roberfroid, 1995, *J. Nutr.*, 125: 1401-1412).

Actualmente los oligosacáridos funcionales se consideran ingredientes importantes de los alimentos para mantener y mejorar el estado de salud. Muchos consumidores basan su alimentación en productos procesados, el aumento del contenido en oligosacáridos funcionales en alimentos de gran consumo pueden contribuir a alcanzar los niveles recomendados de carbohidratos no disponibles (Qiang *et al*, 2009. *Carbohydr Pol*, 77: 435-441).

Un alimento puede considerarse funcional si se demuestra que ejerce un efecto beneficioso sobre una o más funciones selectivas del organismo, independientemente de sus propiedades nutritivas, de modo tal que resulte apropiado para mejorar el estado de salud y bienestar, reducir el riesgo de enfermedad, o ambas cosas.

30 Numerosos estudios experimentales y epidemiológicos atribuyen a la fibra un papel preventivo de diversas enfermedades especialmente frecuentes en países desarrollados, debido a la gran variedad de efectos fisiológicos beneficiosos que presenta en el organismo humano (Cummings *et al*, 1997. *Eur J Clin Nutr*, 51: 417-423; Chandalia *et al*, 2000. *The New England J Med*, 342: 1392-1398; Jenkins *et al*, 2003. *Am J Clin Nutr*, 76: 266-273). Los oligosacáridos presentan unos efectos cercanos a los de la fibra soluble, ya que debido a su estructura química no pueden ser hidrolizados por los enzimas digestivos humanos y muestran algunos de los efectos propios de la fibra soluble.

35 Son conocidos procedimientos de obtención de oligosacáridos prebióticos mediante un proceso enzimático a partir de maltosa catalizada por la  $\alpha$ -glucosidasa de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (nº de publicación ES 2255847 A1) y la formación de fructooligosacáridos a 45°C a partir de sacarosa catalizada por la fructofuranosidasa de *Xanthophyllomyces dendrorhous* (Nº de publicación ES 2265297 A1).

Debido a la gran importancia industrial de los oligosacáridos y su función prebiótica, es deseable proporcionar nuevos métodos para su obtención a partir de nuevas materias primas, especialmente si éstas son subproductos que se producen en grandes cantidades. Asimismo, es igualmente deseable optimizar los métodos de obtención de oligosacáridos con el objeto de aumentar el rendimiento obtenido, pudiendo de esta manera rentabilizar de forma clara dicho proceso.

### 50 Explicación de la invención

La presente invención se refiere a un método de obtención de oligosacáridos a partir de cualquier parte de un vegetal. Preferiblemente los oligosacáridos se obtienen del okara, subproducto que queda tras la elaboración de la leche de soja o de la elaboración del tofu. Dicho método comprende la hidrólisis de la fibra soluble y/o insoluble, o de la fibra insoluble dispersada en un medio líquido mediante la adición de una mezcla enzimática que comprende al menos una glicosidasa. Dicha glicosidasa puede ser al menos una beta-glucanasa, al menos una xilanasa, al menos una celulasa, al menos una pentosanasa o al menos una arabinasa, o cualquiera de sus combinaciones. El método de la presente invención se ha optimizado para obtener mayores rendimientos y por ello además puede comprender una etapa de tratamiento en autoclave previa a la hidrólisis enzimática. Con la optimización de las condiciones del método se consigue reducir el tiempo de incubación para llevar a cabo la hidrólisis y obtener mayores rendimientos a esos tiempos más bajos.

65 En el caso de que se utilice una parte del vegetal que contenga más de un 5% de su peso seco de grasa, se desengrasará dicha muestra para evitar interferencias en las etapas posteriores de obtención de la fibra soluble y/o insoluble.

El okara de soja es muy rico en fibra alimentaria, especialmente en polisacáridos insolubles en agua, tanto celulosa como hemicelulosas, particularmente del tipo xilano y xiloglucano. La hidrólisis de estos polisacáridos del okara con el objetivo de obtener oligosacáridos se puede llevar a cabo por métodos enzimáticos o por métodos químicos.

El tratamiento enzimático empleado en la presente invención presenta ventajas frente al método químico, como por ejemplo:

- 5 - permite una hidrólisis específica y controlada, evitando así la generación de compuestos indeseables.
- las condiciones en las que se desarrolla la reacción enzimática son menos agresivas que las utilizadas en el tratamiento químico (ataque por ácidos).
- 10 - la hidrólisis enzimática de los polisacáridos del okara con glicosidasas produce oligosacáridos potencialmente prebióticos que pueden formar parte de un alimento como ingredientes funcionales.

La obtención de polisacáridos del okara de soja revaloriza dicho subproducto y ayuda a eliminar un problema ambiental ya que este subproducto es altamente susceptible a la putrefacción.

15 Tal como se ha comentado en un párrafo anterior, en la presente invención se optimiza el método de obtención de oligosacáridos por medio de la adición de etapas como por ejemplo el tratamiento en autoclave de la fibra soluble y/o insoluble o de la fibra insoluble dispersada o de cualquiera de los tipos anteriores de fibra, desengrasada, o por medio del empleo de diferentes medios líquidos de dispersión de fibra insoluble. El resultado de dicha optimización es la reducción del tiempo empleado en la incubación necesaria para la hidrólisis enzimática de dicha fibra y además, 20 la obtención de mayores rendimientos a dichos tiempos. Tal como puede observarse en la tabla 1 de los ejemplos de la presente invención, cuando se emplea agua destilada en lugar de tampón acetato pH 6 como medio líquido para la dispersión de 60 mg de fibra insoluble desengrasada por mL de medio líquido, se obtienen 11,51 g de oligosacáridos por 100 g de fibra insoluble desengrasada frente a los 8,2 g de oligosacáridos por 100 g de fibra insoluble desengrasada cuando se emplea tampón acetato pH 6, a pesar de mantener una incubación de 180 minutos frente a los 90 minutos 25 cuando se emplea agua destilada. El rendimiento obtenido cuando se introduce una etapa de tratamiento en autoclave de la fibra insoluble desengrasada dispersada en agua destilada, con 10 minutos de incubación para llevar a cabo la hidrólisis, es de 25,3 g de oligosacáridos por 100 g de fibra insoluble desengrasada.

Así pues, un aspecto de la presente invención se refiere a un método para la obtención de oligosacáridos que comprende:

- a. Obtener la fibra soluble y/o insoluble de un vegetal,
- 35 b. hidrolizar la fibra del apartado (a) mediante la adición de una mezcla enzimática que comprende al menos una glicosidasa,
- c. incubar la mezcla obtenida en el apartado (b) a una temperatura de entre 20 y 50°C, y
- 40 d. aislar los oligosacáridos del producto obtenido en el apartado (c)

En el apartado (a) del método se puede obtener la fibra soluble, la fibra insoluble o, la fibra soluble e insoluble (conjunta) de un vegetal. La obtención de la fibra soluble y/o insoluble de un vegetal se lleva a cabo por medio de cualquier técnica conocida en el estado de la técnica (ver el apartado de ejemplos para la obtención de la fibra insoluble). La fibra soluble y/o insoluble se obtiene de cualquier parte de un vegetal como por ejemplo, pero sin limitarse, de la parte aérea, de la parte radicular, de las semillas, o de cualquier subproducto de las mismas. 45

La fibra soluble y/o insoluble obtenida del vegetal puede someterse a un proceso de concentración mediante cualquier técnica conocida en el estado de la técnica como por ejemplo, pero sin limitarse, la liofilización. El producto de dicha concentración puede disolverse en el caso de la fibra soluble o dispersarse en el caso de la fibra insoluble, en un medio líquido 50

Una realización preferida de la presente invención se refiere al método para la obtención de oligosacáridos que además comprende obtener la fibra insoluble del vegetal según el apartado (a) y dispersar dicha fibra en un medio líquido, y en el apartado (b) hidrolizar el producto de la dispersión obtenido. Posteriormente, se prosigue con el resto de apartados (c) y (d) del método para obtener dichos oligosacáridos. 55

El término “dispersar” tal como se entiende en la presente invención, se refiere a la acción de mezclar la fibra insoluble de dicho vegetal con un medio líquido para que se distribuya de forma sustancialmente homogénea en el mismo. Al contrario que en una disolución, en la dispersión, las partículas que forman parte de la fibra insoluble, no se disuelven en el medio líquido sino que permanecen incorporadas a dicho líquido en el mismo estado original. La dispersión de la fibra insoluble en el medio líquido permite la actividad de la mezcla enzimática del paso posterior. 60

Los oligosacáridos son constituyentes de los polisacáridos. Los polisacáridos están formados por monosacáridos unidos entre sí por medio de enlaces glicosídicos. En la presente invención, se obtienen carbohidratos más pequeños debido a la hidrólisis de los enlaces glicosídicos entre residuos, es decir oligosacáridos. Los oligosacáridos son polímeros también formados por monosacáridos unidos por enlaces glicosídicos, con un número de unidades monoméricas, por ejemplo, pero sin limitarse de entre 2 y 10 residuos de azúcar. La hidrólisis de los polisacáridos produce su digestión. En la digestión o ruptura por hidrólisis del enlace glicosídico se consume una molécula de agua. Así pues, a modo 65

de ejemplo, la molécula de agua reacciona con un polisacárido AB, en el que A y B representan fragmentos del mismo. En la reacción, la molécula de agua se descompone en los fragmentos H<sup>+</sup> y OH<sup>-</sup>, y el polisacárido AB se descompone en los oligosacáridos A<sup>+</sup> y B<sup>-</sup>. A continuación, estos fragmentos se unen proporcionando los productos finales AOH y BH. La reacción es catalizada por al menos una enzima, produciendo la ruptura de dichos enlaces. Dicha digestión o hidrólisis está catalizada por enzimas hidrolasas, preferiblemente glicosilasas y más preferiblemente glicosidasas, que pueden ser específicas para determinados polisacáridos y, sobre todo, para determinados tipos de enlace glicosídico.

Las enzimas que catalizan la hidrólisis de los polisacáridos se adicionan a la fibra dispersada del apartado (paso) (a) en forma de una mezcla enzimática que comprende al menos una glicosidasa.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere a un método, donde la glicosidasa es al menos una beta-glucanasa y/o al menos una xilanasa. Según una realización más preferida, la glicosidasa es, además de una beta-glucanasa y/o una xilanasa, al menos una celulasa, al menos una pentosanasa, al menos una arabinasa o cualquiera de las combinaciones de la/s celulasa/s, la/s pentosanasa/s y la/s arabinasa/s con la/s beta-glucanasa/s y/o la/s xilanasa/s.

Según el comité de nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (NC-IUBMB), las enzimas usadas en el método de la presente invención son clasificadas con la siguiente nomenclatura:

EC 3 Hidrosilasas; EC 3.2 Glicosilasas; EC 3.2.1 Glicosidasas; EC 3.2.1.4 celulasa; EC 3.2.1.6  $\beta$ -1,3-1,4-glucanasa; EC 3.2.1.8  $\beta$ -1,4-xilanasa; EC 3.2.1.72 pentosanasa; EC 3.2.1.99 arabinanasa.

La enzima celulasa (EC 3.2.1.4) también es conocida con la denominación 4-(1,3;1,4)- $\beta$ -D-glucan 4-glucanohidrolasa. Esta enzima cataliza la hidrólisis de la celulosa.

La enzima beta-glucanasa (EC 3.2.1.6) cuya denominación aceptada por la NC-IUBMB es endo-1,3(4)- $\beta$ -glucanasa, es también conocida por otras denominaciones como por ejemplo endo-1,3- $\beta$ -D-glucanasa; laminaranasa;  $\beta$ -1,3-glucanasa;  $\beta$ -1,3-1,4-glucanasa; endo-1,3- $\beta$ -glucanasa; endo- $\beta$ -1,3(4)-glucanasa; endo- $\beta$ -1,3-1,4-glucanasa; endo- $\beta$ -(1,3)-D-glucanasa; endo-1,3-1,4- $\beta$ -D-glucanasa; endo- $\beta$ -(1-3)-D-glucanasa; endo- $\beta$ -1,3-glucanasa IV; endo-1,3- $\beta$ -D-glucanasa; 1,3-(1,3;1,4)- $\beta$ -D-glucan 3(4)-glucanohidrolasa.

La beta-glucanasa cataliza la reacción de hidrólisis de enlaces (1,3) ó (1-4) en  $\beta$ -D-glucanos.

La enzima xilanasa (EC 3.2.1.8) cuya denominación aceptada por la NC-IUBMB es endo-1,4- $\beta$ -xilanasa, es también conocida por otras denominaciones como por ejemplo endo-(1,4)- $\beta$ -xilan 4-xilanohidrolasa; endo-1,4-xilanasa; xilanasa;  $\beta$ -1,4-xilanasa; endo-1,4-xilanasa; endo- $\beta$ -1,4-xilanasa; endo-1,4- $\beta$ -D-xilanasa; 1,4- $\beta$ -xilan xilanohidrolasa;  $\beta$ -xilanasa;  $\beta$ -1,4-xilan xilanohidrolasa; endo-1,4- $\beta$ -xilanasa;  $\beta$ -D-xilanasa. La enzima xilanasa cataliza la reacción de hidrólisis de enlaces (1,4)- $\beta$ -D-xilosídico en xilanos. El xilano es un polisacárido constituido por una cadena lineal de residuos de xilosa y diversas ramificaciones y sustituciones. El xilano es el componente mayoritario de la hemicelulosa. Esta enzima es una hemicelulasa. Las hemicelulosas comprenden polímeros de pentosas, xilosas, arabinosas, hexosas, glucosas, mañosas, galactosas o ácidos urónico, glucurónico o galacturónico.

La enzima arabinasa (EC 3.2.1.99) cuya denominación aceptada por la NC-IUBMB es arabinan endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinosidasa, es también conocida por otras denominaciones como por ejemplo endo-1,5- $\alpha$ -L-arabinanasa; endo- $\alpha$ -1,5-arabanasa; endo-arabanasa; 1,5- $\alpha$ -L-arabinan 1,5- $\alpha$ -L-arabinanohidrolasa. La enzima arabinasa cataliza la reacción de hidrólisis de enlaces (1,5)- $\alpha$ -arabinofuranosídicos.

La enzima pentosanasa (EC 3.2.1.72) cuya denominación aceptada por la NC-IUBMB es xilan 1,3- $\beta$ -xilosidasa, es también conocida por otras denominaciones como por ejemplo 1,3- $\beta$ -D-xilosidasa, exo-1,3- $\beta$ -xilosidasa;  $\beta$ -1,3'-xilanasa; exo- $\beta$ -1,3'-xilanasa; 1,3- $\beta$ -D-xilan xilohidrolasa. La pentosanasa de la presente invención es una hemicelulasa, que cataliza la hidrólisis del pentosano. El pentosano es un polímero de pentosas (azúcares con 5 átomos de carbono, como por ejemplo, pero sin limitarse xilosa o arabinosa). El pentosano es una hemicelulosa.

Así pues, la adición de una mezcla enzimática que comprende al menos una beta-glucanasa y al menos una xilanasa, a la fibra soluble y/o insoluble o a la fibra insoluble dispersada, supone la hidrólisis de celulosa y hemicelulosa.

Además, la adición de al menos una pentosanasa y/o al menos una arabinasa supone la hidrólisis de oligosacáridos más específicos de hemicelulosa hidrolizados por las xilanasas.

La hidrólisis del método de la presente invención se puede llevar a cabo por medio de mezclas enzimáticas comerciales procedentes de bacterias, hongos o de cualquier otra procedencia. La mezcla enzimática comercial puede ser, pero sin limitarse, Ultraflo L de *Novozymes*, una mezcla de  $\beta$ -glucanasas, xilanasas, celulasas, pentosanasa y arabinasa. El Ultraflo L es una preparación enzimática multiactiva producida por el hongo no patógeno y no tóxico *Humicola insolens*.

En el apartado (c) del método, se incuba la mezcla obtenida en el apartado (b) a una temperatura de entre 20 y 50°C. Dicha temperatura comprende las temperaturas óptimas de las enzimas glicosidasas. Una realización preferida de la presente invención se refiere a un método donde la incubación del apartado (c) se lleva a cabo a una temperatura de entre 35 y 45°C. No obstante, en cualquiera de los métodos de la presente invención puede emplearse al menos una

enzima glicosidasa termófila cuya temperatura óptima para catalizar la hidrólisis de los enlaces glicosídicos supera los 60°C.

Según el apartado (d) del método, se aíslan los oligosacáridos del producto obtenido en el apartado (c) mediante cualquier técnica conocida en el estado de la técnica. Los oligosacáridos de la presente invención son prebióticos. Así pues, los oligosacáridos obtenidos con el método de la presente invención se pueden usar para la elaboración de un alimento prebiótico. Los alimentos prebióticos son alimentos funcionales que afectan beneficiosamente al organismo mediante la estimulación del crecimiento y/o actividad de una o varias cepas de bacterias en el colon, mejorando la salud del individuo que los ingiere.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al método, donde la fibra soluble y/o insoluble o a la fibra insoluble dispersada, procede de un vegetal de la familia *Fabaceae*. Según una realización más preferida el vegetal de la familia *Fabaceae* es *Glycine max* L (soja). Según otra realización aún más preferida, los oligosacáridos se obtienen del okara de *Glycine max* L.

Otra realización preferida se refiere al método donde la fibra soluble y/o insoluble o a la fibra insoluble dispersada, está desengrasada. En los casos en los que el porcentaje de grasa del vegetal supera el 5% de su peso seco, se hace necesario desengrasar previamente la muestra para obtener su fibra soluble y/o insoluble, permitiendo así una hidrólisis eficaz mediante la mezcla de enzimas utilizadas.

Según otra realización preferida, el medio líquido en el que se dispersa la fibra insoluble es tampón acetato a un pH de entre 3,5 y 6,5. En una realización más preferida, el tampón acetato tiene un pH de entre 5,5 y 6,5. El tampón acetato también puede tener un pH de entre 4,5 y 6,5.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al método donde el medio líquido en el que se dispersa la fibra insoluble es agua destilada.

Según otra realización preferida de la presente invención, el método además comprende el tratamiento en autoclave de la fibra soluble y/o insoluble o, de la fibra insoluble dispersada en el medio líquido y, en el apartado (b), hidrolizar el producto obtenido de dicho tratamiento en autoclave y seguir con los apartados (c) y (d) del método.

El término “tratamiento en autoclave” tal como se entiende en la presente invención se refiere a someter a la fibra dispersada en el medio líquido a vapor de agua a una temperatura y presión altas para de esta forma facilitar la hidrólisis que será llevada a cabo por medio de la adición de la mezcla enzimática. La presión alta evita que el agua llegue a ebullición. El tratamiento se lleva a cabo en un autoclave, en una olla a presión o en cualquier recipiente capaz de soportar las presiones y temperaturas alcanzadas. En el proceso citado se permite la entrada o generación de vapor de agua pero se limita su salida, hasta obtener una presión interna, por ejemplo, pero sin limitarse, de 90 a 200 kPa, lo cual provoca que el vapor alcance una temperatura aproximada de 120 a 135°C. En condiciones de alta presión hidrostática se pueden alcanzar hasta 900 MPa.

Según una realización más preferida del método, el tratamiento en autoclave se lleva a cabo a una temperatura de entre 115 y 125°C, una presión de entre 90 y 110 Kpa, y un tiempo de entre 5 y 30 minutos.

Otra realización preferida de la presente invención se refiere al método, donde además comprende la inactivación de las enzimas de la mezcla incubada según el apartado (c) y, en el apartado (d), aislar los oligosacáridos del producto obtenido de dicha inactivación. Es decir, en esta realización preferida se incluye un apartado adicional entre los apartados (c) y (d) del método que comprende dicha inactivación enzimática. La inactivación enzimática se puede llevar a cabo por medio de cualquiera de las técnicas conocidas en el estado de la técnica como por ejemplo, pero sin limitarse, sumergiendo un recipiente que contenga el producto obtenido en el apartado (c) en agua a una temperatura mayor de 95°C o exponiéndolo a vapor de agua, durante un tiempo en el que se asegure dicha inactivación como por ejemplo, pero sin limitarse, durante un tiempo mínimo de 5 minutos, durante un tiempo mínimo de 10 minutos ó durante un tiempo mínimo de 15 minutos.

Según otra realización preferida de la presente invención, la fibra insoluble o la fibra insoluble desengrasada se dispersa hasta 100 mg de dicha fibra por cada mL de medio líquido. Preferiblemente la fibra insoluble o la fibra insoluble desengrasada se dispersa hasta 90, 70 ó 60 mg de dicha fibra por cada mL de medio líquido. Una realización más preferida se refiere al método, donde se dispersa hasta 50 mg de fibra insoluble por cada mL de medio líquido.

Preferiblemente se dispersa hasta 40, 30, 20 ó 10 mg de fibra insoluble por cada mL de medio líquido.

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 el experto 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. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que describen la obtención de oligosacáridos procedentes del okara de soja. Los ejemplos tienen carácter ilustrativo y no limitativo de un método de obtención de oligosacáridos de origen vegetal.

### Ejemplo 1

10 *Obtención de la fibra insoluble del okara de soja (Glycine max L.) e hidrólisis enzimática*

#### 1.1 *Obtención de la fibra insoluble*

15 Se seleccionaron muestras de okara, subproducto industrial de la soja (*Glycine max* L). El okara en fresco se sometió a liofilización, es decir, se eliminó el agua mediante desecación al vacío y a muy bajas temperaturas. De esta manera el agua se extrae por sublimación.

20 La muestra liofilizada supone un método de conservación, pero además facilita el manejo a la hora de realizar los distintos análisis. Posteriormente, se pulverizó la muestra para obtener un polvo fino y homogéneo (tamaño de partícula < 1 mm), que se guardó en frascos de vidrio debidamente etiquetados y cerrados herméticamente. Estos frascos se almacenaron a temperatura ambiente y en ausencia de luz.

25 Posteriormente la muestra de okara liofilizada se sometió a un proceso de desengrasado con éter etílico en un extractor Soxhlet.

30 Una vez desengrasada la muestra, se procedió a obtener la fibra insoluble del okara de soja. Se llevó a cabo según el método de Prosky (Prosky *et al.* 1988. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71: 1017-1023): Se trata de un método enzimático-gravimétrico para la determinación de fibra alimentaria que se basa principalmente en la digestión de la muestra con  $\alpha$ -amilasa termoestable, proteasa y amiloglucosidasa para eliminar la proteína y el almidón de la muestra. Este método ha sido adoptado oficialmente por la AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*) (AOAC, 1995a; AOAC, 1995b).

Una vez fue obtenida la fibra insoluble, se pulverizó y se homogenizó (tamaño de partícula < 1 mm).

#### 35 1.2. *Hidrólisis enzimática de la fibra insoluble desengrasada*

La fibra insoluble de la muestra de okara desengrasada se expuso a la acción de las enzimas hidrolíticas.

40 Se añadió un volumen determinado de un medio líquido a una cantidad determinada de fibra insoluble desengrasada (ver más adelante), para conseguir dispersar dicha fibra insoluble. Los medios líquidos utilizados para la dispersión fueron tampón acetato a pH 6 ó agua destilada. Para favorecer el ataque enzimático se trató la muestra térmicamente en autoclave a 121°C y 1 atmósfera (100 Kpa) de presión. Posteriormente se añadió un volumen determinado de Ultraflo L y se mantuvo en agitación constante a 40°C. Transcurrida la hidrólisis enzimática, las enzimas se inactivaron llevando la muestra a ebullición durante 10 minutos.

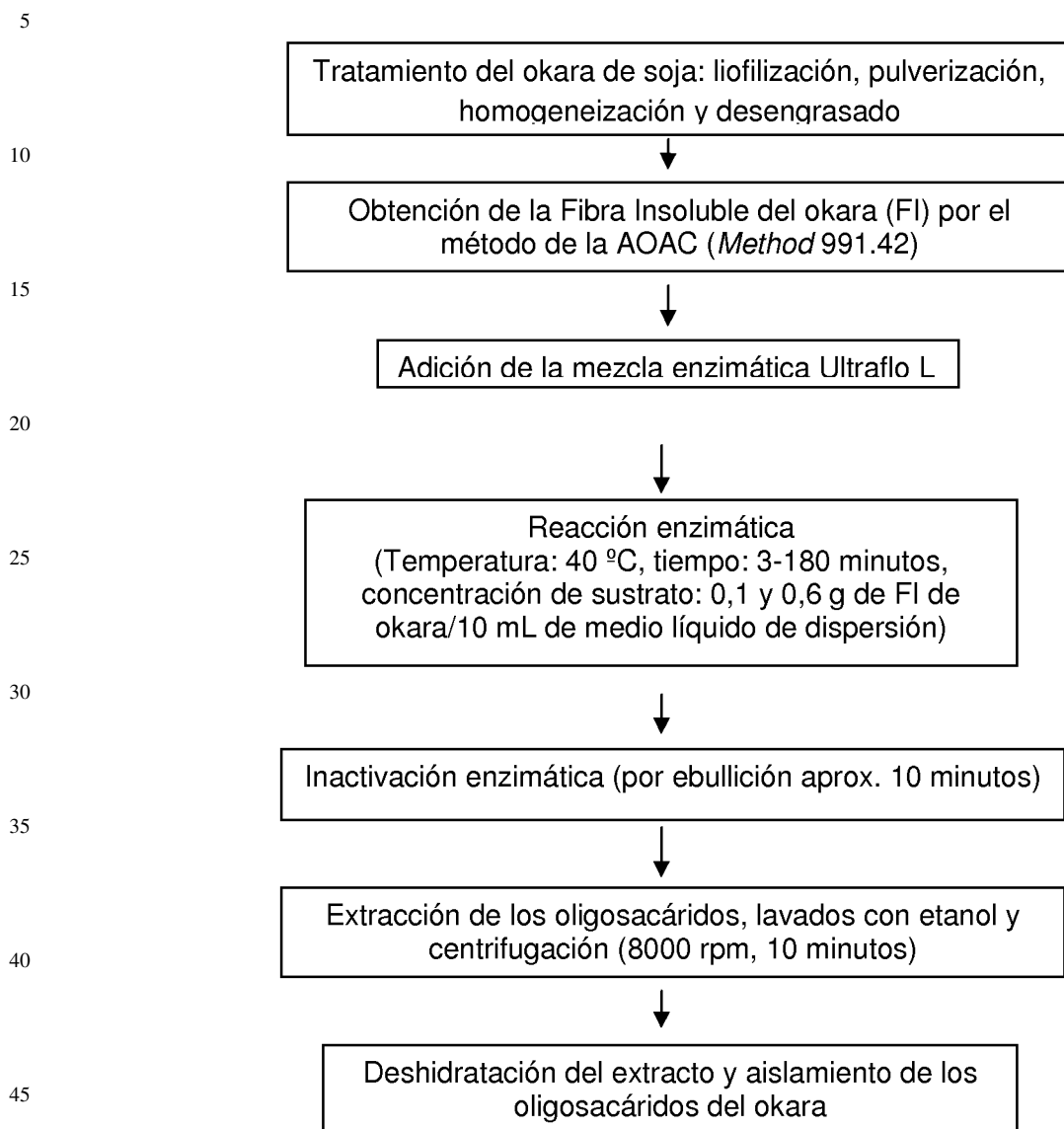
50 A continuación, el extracto soluble se separó del residuo insoluble por centrifugación (8000 rpm durante 10 minutos). El residuo fue sometido a varios lavados con etanol del 85% (v/v) y el líquido resultante de estos lavados se unió al extracto soluble y se evaporó a sequedad en rotavapor a 50°C.

55 Para que la muestra pudiera ser analizada por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), el extracto obtenido se redisolvió en agua destilada y se pasó por un filtro de 0.45  $\mu$ m para soluciones acuosas. El volumen utilizado en la redisolución con agua destilada depende de la cantidad de muestra de partida y de la concentración en oligosacáridos que se obtenga.

Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las siguientes:

- Fase móvil: agua milliQ
- 60 - Flujo: 0,5 mL/min
- Temperatura de la columna: 85°C
- Columna: HPX87P BioRad
- 65 - Detector: Índice de Refracción.

A continuación se muestra un esquema que resume el método mediante el cual se obtienen los oligosacáridos de la fibra insoluble del okara de soja.



## Ejemplo 2

*Rendimiento en la obtención de oligosacáridos usando tampón acetato pH 6 como medio líquido de dispersión*

### 2.1 Experimento 1

Se partió de 0,6 g de fibra insoluble (FI) de okara desengrasado y se añadieron 10 mL de tampón acetato a pH 6. La reacción enzimática se llevó a cabo con 1 mL de Ultraflo L durante 180 minutos a una temperatura de 40°C y en agitación constante. Transcurrido este tiempo, se inactivó el enzima llevando la muestra a ebullición durante 10 minutos. Tras la extracción de los oligosacáridos, se analizó el sobrenadante por HPLC. En estas condiciones, por cada 100 g de FI de okara desengrasado se obtienen 8,2 g de oligosacáridos.

### 2.2. Experimento 2

Se realizó un experimento enzimático para estudiar la concentración de oligosacáridos liberados en las mismas condiciones que en el experimento 1, pero durante un menor tiempo de actuación del enzima.

Para ello, se utilizaron 0,6 g de FI de okara desengrasado, 1 mL de Ultraflo L/10 mL de tampón acetato pH6. La temperatura incubación fue de 40°C y el tiempo de hidrólisis enzimática 60 minutos. El sobrenadante se analizó por HPLC y se observó una liberación de oligosacáridos de 4,46 g/100 g de FI de okara desengrasado. Por tanto, se produjo una liberación del 54,4% en un tiempo tres veces inferior de hidrólisis enzimática.

5

## Ejemplo 3

*Rendimiento en la obtención de oligosacáridos usando agua destilada como medio líquido de dispersión*

10

## 3.1. Experimento 1

Se añadieron 10 mL de agua destilada, en lugar del tampón acetato, a 0,6 g de FI de okara desengrasado. Posteriormente se adicionó 1 mL de Ultraflo L y se llevó a cabo la reacción durante 90 minutos a una temperatura de 40°C y en agitación constante. Tras la inactivación del enzima, se analizó el sobrenadante por HPLC y se observó una liberación de oligosacáridos de 11,51 g/100 g de FI de okara desengrasado.

15

## 3.2. Experimento 2

20

Se adicionaron 10 mL de agua destilada a 0,1 g de FI de okara desengrasado. A continuación, la dispersión de FI en agua destilada se trató en el autoclave a 121°C durante un tiempo de 10 minutos. Después del enfriamiento del sustrato, se añadió 1 mL de Ultraflo L y se llevó a un baño de 40°C en agitación continua. Transcurridos 10 minutos, se inactivó el enzima (10 minutos en ebullición). Tras la extracción, se procedió a la cuantificación de los oligosacáridos por HPLC, obteniendo 25,3 g/100 g FI de okara desengrasado.

25

En la siguiente tabla se presentan los resultados obtenidos en cada uno de los experimentos descritos en párrafos anteriores.

30

TABLA 1

*Resumen de los resultados obtenidos en cada uno de los experimentos*

35

Medio líquido de dispersión	Concentración de fibra insoluble (FI) en el medio líquido, (mg/mL)	Autoclave	Tiempo de incubación con la mezcla enzimática (min.)	Rendimiento (g de oligosacáridos/100 g de FI)
Tampón acetato pH 6	60	No	180	8,2
Tampón acetato pH 6	60	No	60	4,46
Agua destilada	60	No	90	11,51
Agua destilada	10	SI	10	25,3

60

Nota: En todos los casos, se usa 1 mL de la mezcla enzimática Ultraflo L, se lleva a cabo la incubación a 40°C y se inactivan las enzimas añadidas llevando dicha mezcla de reacción a ebullición durante 10 minutos.

65



Como puede observarse, la utilización de agua destilada como medio líquido de dispersión en el cual se va a llevar a cabo la hidrólisis tras la adición de la mezcla enzimática, mejora los rendimientos en la obtención de oligosacáridos respecto del medio líquido tampón acetato.

5 En vista de estos resultados, los inventores llevaron a cabo un experimento con agua como medio líquido de dispersión y trataron en autoclave el producto de dicha dispersión, obteniendo de esta manera el mejor rendimiento en la obtención de oligosacáridos de okara de soja. El tratamiento en autoclave permite mejorar el rendimiento de forma sorprendente ya que hay que tener en cuenta que se parte de una dispersión con una concentración de fibra de 10 mg/mL frente a los 60 mg/mL en el resto de experimentos y, además, la hidrólisis se lleva a cabo durante un periodo de 10 minutos frente a tiempos de entre 6 y 18 veces superiores en el resto de experimentos. En definitiva, se obtiene mayor cantidad de oligosacáridos y se reduce el tiempo empleado. Este hecho puede constituir una ventaja importante en lo que se refiere a la producción industrial de oligosacáridos de muestras vegetales.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

## REIVINDICACIONES

1. Método para la obtención de oligosacáridos que comprende:

- 5 a. obtener la fibra soluble y/o insoluble de un vegetal,  
b. hidrolizar la fibra del apartado (a) mediante la adición de una mezcla enzimática que comprende al menos una glicosidasa,  
10 c. incubar la mezcla obtenida en el apartado (b) a una temperatura de entre 20 y 50°C, y  
d. aislar los oligosacáridos del producto obtenido en el apartado (c).

15 2. Método para la obtención de oligosacáridos según la reivindicación 1, que además comprende obtener la fibra insoluble del vegetal según el apartado (a) y dispersar dicha fibra en un medio líquido, y en el apartado (b) hidrolizar el producto de la dispersión obtenido.

20 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde la mezcla enzimática comprende al menos una glicosidasa que se selecciona entre al menos una beta-glucanasa o al menos una xilanasas o cualquier combinación de las mismas.

25 4. Método según la reivindicación 3, donde la mezcla enzimática además comprende al menos una glicosidasa seleccionada entre al menos una celulasa o al menos una pentosanasa o al menos una arabinasa o cualquier combinación de las mismas.

5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la fibra procede de un vegetal de la familia *Fabaceae*.

30 6. Método según la reivindicación 5, donde el vegetal de la familia *Fabaceae* es *Glycine max* L.

7. Método según la reivindicación 6, donde los oligosacáridos se obtienen del okara de *Glycine max* L.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la fibra está desengrasada.

35 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, donde el medio líquido en el que se dispersa la fibra insoluble es tampón acetato a un pH de entre 3,5 y 6,5.

10. Método según la reivindicación 9, donde el tampón acetato tiene un pH de entre 5,5 y 6,5.

40 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, donde el medio líquido en el que se dispersa la fibra insoluble es agua destilada.

45 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde la incubación del apartado (c) se lleva a cabo a una temperatura de entre 35 y 45°C.

13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde además comprende el tratamiento en autoclave de la fibra soluble y/o insoluble o, de la fibra insoluble dispersada en el medio líquido y, en el apartado (b), hidrolizar el producto obtenido de dicho tratamiento en autoclave.

50 14. Método según la reivindicación 13, donde el tratamiento en autoclave se lleva a cabo a una temperatura de entre 115 y 125°C, una presión de entre 90 y 110 Kpa, y un tiempo de entre 5 y 30 minutos.

55 15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde además comprende la inactivación de las enzimas de la mezcla incubada según el apartado (c) y, en el apartado (d), aislar los oligosacáridos del producto obtenido de dicha inactivación.

16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 15, donde se dispersa hasta 100 mg de fibra insoluble por cada mL de medio de reacción.

60 17. Método para la obtención de oligosacáridos según la reivindicación 16, donde se dispersa hasta 50 mg de fibra insoluble por cada mL de medio de reacción.



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

21 N.º solicitud: 200930375

22 Fecha de presentación de la solicitud: 29.06.2009

32 Fecha de prioridad: 00-00-0000  
00-00-0000  
00-00-0000

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

51 Int. Cl.: C12P 19/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 2006114095 A1 (NOVOZYMES A/S) 02.11.2006, páginas 1,13,20,21.	1-4,11,12,15-17
A	PÉREZ-CONESA, D. et al. Principales prebióticos y sus efectos en la alimentación humana. 2004. Anales de Veterinaria. Vol. 20, páginas 5-20.	1-17
A	MATEOS-APARICIO, I. Aprovechamiento de subproductos de leguminosas para la obtención de productos funcionales. Comparación de metodologías para la caracterización de la fibra alimentaria. 2008. Tesis doctoral (en línea recuperado el 03.09.2010). Recuperado de internet: <a href="http://eprints.ucm.es/8175/">http://eprints.ucm.es/8175/</a>	1-17

**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  
03.09.2010

Examinador  
I.Rueda Molins

Página  
1/4

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

C12P

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, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 03.09.2010

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-17	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones _____	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 5-10, 13,14	<b>SÍ</b>
	Reivindicaciones 1-4, 11, 12, 15-17	<b>NO</b>

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	WO2006114095 A1 (NOVOZYMES A/S) . Páginas 1, 13, 20 y 21.	02.11.2006
D02	PÉREZ-CONESA, D. ET AL. Principales prebióticos y sus efectos en la alimentación humana. Anales de Veterinaria. Vol.20, páginas 5 - 20.	2004
D03	MATEOS-APARICIO, I. Aprovechamiento de subproductos de leguminosas para la obtención de productos funcionales. Comparación de metodologías para la caracterización de la fibra alimentaria. Tesis doctoral (en línea recuperado el 03.09.10). Recuperado de internet: <a href="http://eprints.ucm.es/8175/">http://eprints.ucm.es/8175/</a>	2008

**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 de patente divulga un método para la obtención de oligosacáridos partiendo de la fibra soluble y/o insoluble de un vegetal.

El documento D01 es el que refleja el estado de la técnica más cercano. Dicho documento muestra un proceso enzimático que hidroliza arabinosilanos.

El documento D02 refleja los principales prebióticos y sus efectos en la alimentación humana.

El documento D03 estudia el aprovechamiento de subproductos de leguminosas para la obtención de productos funcionales.

**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Artículos 6 y 8 LP11/1986)**

En las reivindicaciones 1-4, 11, 12, 15-17, se reivindica un método para la obtención de oligosacáridos que comprende las siguientes etapas: a) Obtener la fibra de un vegetal y dispersarla en agua destilada (se dispersarán hasta 50 mg de fibra insoluble por cada ml de medio de reacción). b) Hidrolizar el producto de la dispersión obtenido mediante la adición de una mezcla enzimática que comprende al menos dos glicosidasas (una de ellas seleccionada entre al menos una beta-glucanasa o una xilanasas y la otra seleccionada entre al menos una celulasa, una pentosanasa o una arabinasa). c) Incubar la mezcla obtenida en la etapa anterior a una temperatura de entre 20 y 50 °C e inactivar las enzimas de la mezcla. d) Aislar los oligosacáridos obtenidos.

El documento D01 muestra (en las reivindicaciones 22, 27 y 32) una composición para hidrolizar arabinosilano que puede comprender los enzimas beta-glucanasa y celulasa, para la producción de xilooligosacáridos. El documento indica (en el ejemplo de la página 13) como se podría realizar dicha hidrólisis enzimática. Para ello, se disuelven 0.05g de arabinosilano en 50 ml de agua, posteriormente se realiza una incubación a una temperatura de 50 °C y finalmente una inactivación de los enzimas de la mezcla.

Las diferencias entre el objeto reivindicado en la solicitud de patente y el documento D01 residen en el sustrato que va a ser hidrolizado por los enzimas. Dicho sustrato es fibra en el método reivindicado en la solicitud de patente y arabinosilano en el método divulgado en el documento D01. Puesto que el arabinosilano forma parte de la fibra presente en los cereales (tal y como se indica en la página 1 del documento D01), el objeto de invención de la solicitud de patente resultaría evidente para un experto en la materia, teniendo en cuenta la información divulgada en dicho documento. Por tanto, las reivindicaciones 1-4, 11, 12, 15-17 presentan novedad pero no actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 LP11/1986.