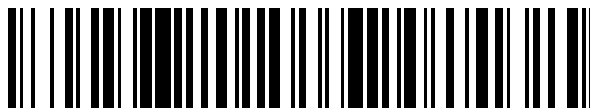


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 403**

21 Número de solicitud: 201430784

51 Int. Cl.:

C12P 19/04 (2006.01)

C07H 3/06 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

27.05.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

27.11.2015

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (100.0%)**

**C/ Serrano 117
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**MORENO ANDÚJAR, Francisco Javier;
DÍEZ MUNICIO, Marina;
HERRERO CALLEJA, Miguel;
CORZO SÁNCHEZ, Nieves;
MUÑOZ MORENO, María Del Rosario;
DE LAS RIVAS GONZÁLEZ DEL REY, Blanca y
JIMENO HERRANZ, María Luisa**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

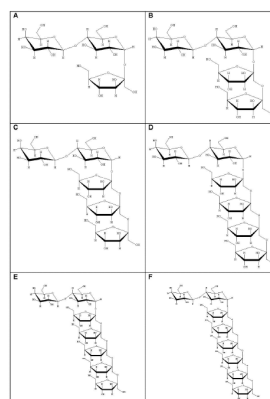
54 Título: **Procedimiento bi-enzimático de síntesis eficiente de oligosacáridos fructosilados derivados de lactosacarosa, productos obtenidos y su uso en la mejora de la salud gastrointestinal**

57 Resumen:

Procedimiento bi-enzimático de síntesis eficiente de oligosacáridos fructosilados derivados de lactosacarosa, productos obtenidos y su uso en la mejora de la salud gastrointestinal.

La presente invención se refiere a un procedimiento de síntesis bi-enzimática eficaz que permite la obtención de oligosacáridos fructosilados derivados de lactosacarosa con grado de polimerización entre 4 y 10, utilizando como sustrato de partida una combinación de disacáridos y que se caracteriza por su bajo coste, sencillez, alto rendimiento y por ser medioambientalmente limpio. La invención también se refiere a los oligosacáridos con grado de polimerización 6, 7 y 8 obtenidos por primera vez mediante el procedimiento de la invención y al uso de los mismos en la elaboración de composiciones prebióticas alimentarias seguras, que también se protegen, y que son de utilidad para prevenir patologías relacionadas con el sistema gastrointestinal.

FIG.1



PROCEDIMIENTO BI-ENZIMÁTICO DE SÍNTESIS EFICIENTE DE OLIGOSACÁRIDOS FRUCTOSILADOS DERIVADOS DE LACTOSACAROSA, PRODUCTOS OBTENIDOS Y SU USO EN LA MEJORA DE LA SALUD GASTROINTESTINAL

DESCRIPCIÓN

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se relaciona con el campo de la industria agro-alimentaria y de la salud, ya que específicamente se refiere a un procedimiento secuencial de síntesis que utiliza dos enzimas y una combinación de disacáridos como material de partida para la obtención de oligosacáridos fructosilados derivados de lactosacarosa. Los oligosacáridos obtenidos según el procedimiento, y singularmente aquellos con grado de polimerización 6 a 8 que se describen por primera vez en este documento, resultan de aplicación para la mejora de la salud del sistema gastrointestinal a través de la estimulación selectiva de bacterias beneficiosas. La invención también se relaciona con el uso de dichos oligosacáridos en la elaboración de composiciones alimentarias prebióticas que son útiles, por ejemplo, para prevenir y atenuar problemáticas asociadas a la enfermedad inflamatoria intestinal o para la reducción de la hiperlipidemia.

ESTADO DE LA TÉCNICA

El trisacárido lactosacarosa ($O\text{-}\beta\text{-D-galactopiranosil-(1}\rightarrow\text{4)-}O\text{-}\alpha\text{-D-glucopiranosil-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-fructofuranosido}$), también conocido como lactosilfructósido, es un ingrediente alimentario funcional con importantes aplicaciones industriales que ha sido objeto de especial interés en Japón, donde más de 30 productos alimenticios que contienen este ingrediente prebiótico han sido certificados como FOSHU (siglas de “*food for specified health use*”). Además de propiciar la estimulación selectiva de las bacterias beneficiosas presentes en el intestino grueso en seres humanos y animales (Ohkusa T, et al. *Digestion*, 1995, 56, 415-420; Playne y Crittenden, 2009. Lactose, Water, Salts and Minor Constituents. Eds. P.L.H. McSweeney and P.F. Fox), también presenta un gran potencial como edulcorante bajo en calorías y constituye una alternativa en el tratamiento de problemáticas asociadas a la enfermedad inflamatoria intestinal, en la prevención del estreñimiento o en la reducción de la hiperlipidemia (Kitahata y Fujita, 1993. Oligosaccharides: Production, Properties and Applications. Ed. T. Nakakuki; Côté, 2007. Novel enzyme technology for food applications. Ed. R.A. Rastall).

Por su parte, los oligosacáridos fructosilados derivados de lactosacarosa (OFDLs) o

lactosilfructósidos con grado de polimerización (GP) superior a 3, al tener lactosacarosa como estructura base, deberían poseer, al menos, las propiedades beneficiosas atribuidas a este trisacárido, pero dado su mayor peso molecular podrían presentar la capacidad de ser fermentados en las zonas más distales del colon, que es la región del intestino grueso que presenta una mayor incidencia de patologías digestivas y oncológicas. Asimismo, al compartir características estructurales con los fructo-oligosacáridos (FOS), que son polímeros con una molécula de sacarosa y varias unidades de fructosa unidas por enlace $\beta(2\rightarrow1)$, es de esperar que tengan propiedades similares a los mismos. Por todo ello, se abre un abanico de posibilidades para el empleo de estos OFDLs como ingredientes alimentarios naturales reconocidos como prebióticos y seguros, con consideración de GRAS (*"generally recognized as safe"*) en USA y FOSHU en Japón.

Es conocido que la reacción de síntesis de la lactosacarosa puede ocurrir mediante transfructosilación de la lactosa (aceptor) con sacarosa (donador) o transgalactosilación de la sacarosa (aceptor) con lactosa (donador). Entre las enzimas que tienen la capacidad de transferir la unidad de fructosa de la sacarosa a la lactosa, se encuentran las levansacarasas (EC 2.4.1.10) procedentes de *Bacillus natto* (Takahama A, et al. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, 1991, 38, 789-796), *Bacillus subtilis* (Park N-H, et al. *Biotechnol. Lett.*, 2005, 27, 495-497), *Paenibacillus polymyxa* (Choi H-J, et al. *Biotechnol. Progr.*, 2004, 20, 1876-1879) o *Zymomonas mobilis* (Han W-C, et al. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 19, 1153-1160) y la invertasa (EC 3.2.1.26) de *Arthrobacter* sp. K-1 (US 5089401; Mikuni K, et al. *J. Appl. Glycosci.*, 2000, 47, 281-285; Pilgrim A, et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2001, 65, 758-765).

Por otra parte, la síntesis de lactosacarosa mediante la transferencia de la unidad de galactosa de la lactosa a la sacarosa puede llevarse a cabo a partir de una enzima con actividad β -galactosidasa (EC 3.2.1.23) como la procedente de *Bacillus circulans* (Li W, et al. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 3927-3933).

Sin embargo, en el conocimiento de los inventores, el único método descrito hasta el momento para la obtención de OFDLs basa su síntesis a partir de los trisacáridos kestosa y lactosacarosa mediante una enzima purificada obtenida de la raíz del espárrago (*Asparagus officinalis* L.) consiguiendo aumentar el grado de polimerización de la lactosacarosa (sustrato aceptor) únicamente a 4 ó 5, por unión de una o dos unidades de fructosa de la kestosa (sustrato donador) (Yamamori A, et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2002, 66, 1419-1422). Este procedimiento de síntesis emplea sustratos muy costosos y poco accesibles, presenta una muy reducida eficiencia de producción que se sitúa en el 11% de rendimiento en peso con respecto a la kestosa inicial de

partida tras un proceso de 48 horas de duración, y obtiene los oligosacáridos con un bajo porcentaje de pureza debido tanto a la gran cantidad de sustrato que queda sin hidrolizar (kestosa y lactosacarosa) como a la formación de otros productos derivados de los mismos (sacarosa y nistosa). Adicionalmente, lleva implícito el empleo de una pequeña cantidad de tolueno, reactivo
5 altamente tóxico e incompatible con el consumo humano.

Por todo lo anterior, se considera necesario desarrollar un nuevo método de síntesis de estos OFDLs con GP de entre 4 y 10 que utilizando disacáridos como material de partida incrementa el rendimiento y reduce el coste, posibilitando su obtención industrial de forma viable y segura para
10 el consumo humano, lo que permitirá su posterior utilización a través de alimentos funcionales o nutracéuticos diseñados para la mejora de la salud del sistema gastrointestinal.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

15 Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere en primer lugar a un procedimiento de síntesis de oligosacáridos fructosilados derivados de lactosacarosa (OFDLs) con grado de polimerización de entre 4 y 10, que utiliza una reacción de transfructosilación bi-enzimática y que comprende las siguientes
20 etapas:

- a) incubar una combinación de los disacáridos sacarosa y lactosa junto con la enzima recombinante levansacarasa (EC 2.4.1.10) de *Bacillus subtilis* (CECT 39) para obtener una mezcla de azúcares que comprende lactosacarosa como componente mayoritario, e
25 b) incubar la mezcla de azúcares de la etapa anterior junto con una enzima inulinasa (EC 2.4.1.9).

El procedimiento de síntesis de OFDLs tras la etapa (a) es capaz de conseguir una mezcla de azúcares que comprende un rendimiento en peso de lactosacarosa superior al 80% con respecto
30 a la lactosa inicial y de realizarse en un tiempo no superior a 90 minutos, empleando una temperatura no superior a 37°C.

Preferentemente los disacáridos sacarosa y lactosa se utilizan con un ratio equimolar.

35 El procedimiento de síntesis de OFDLs presenta una etapa (b) que se lleva a cabo durante un período de tiempo no superior a 18 horas.

En una realización particular, en la etapa (b) se utiliza una enzima recombinante inulinasa (EC 2.4.1.9) a una temperatura de 55°C, que preferentemente es una enzima obtenida de la cepa *Lactobacillus gasseri* (DSM 20604).

- 5 El procedimiento de síntesis de OFDLs al que se refiere esta invención es capaz de alcanzar un rendimiento en peso con respecto a la cantidad de lactosa inicial superior al 20%.

En segundo lugar, la invención se refiere a los nuevos OFDLs con grado de polimerización 6, 7 y 8.

- 10 En tercer lugar, la invención se refiere al uso de los OFDLs con grado de polimerización 6, 7 y 8 en la elaboración de una composición alimentaria prebiótica útil para prevenir y atenuar patologías del sistema gastrointestinal.

- En cuarto lugar, la invención se refiere a una composición alimentaria prebiótica que comprende
15 los OFDLs con grado de polimerización 6, 7 y 8.

Descripción detallada de la invención

- El problema técnico que resuelve la presente invención es la búsqueda de un procedimiento de síntesis de oligosacáridos fructosilados derivados de lactosacarosa (OFDLs) o lactosilfructósidos
20 con distinto grado de polimerización (GP), preferentemente de entre 4 y 10, y que partiendo de disacáridos como material de partida, constituya una mejora con respecto a los procedimientos de síntesis que se conocen en el estado de la técnica, aportando ventajas técnicas relacionadas con el aumento del rendimiento y la pureza, la reducción del coste, la variedad de OFDLs obtenidos, la reducción de los subproductos de reacción y la eliminación de la toxicidad de los productos
25 obtenidos.

- Los inventores de esta solicitud de patente han descubierto que una alternativa para la obtención de OFDLs con grado de polimerización de entre 4 y 10, pasa por el uso combinado y secuencial de una enzima recombinante levansacarasa (EC 2.4.1.10) procedente de *Bacillus subtilis* (CECT
30 39) y una enzima recombinante inulinasa (EC 2.4.1.9), que preferentemente es una enzima obtenida de la cepa *Lactobacillus gasseri* (DSM 20604), mediante reacción de transfructosilación, utilizando como materia prima los disacáridos sacarosa y lactosa (ver ejemplos 1 y 2) o bien subproductos de la industria alimentaria ricos en alguno de estos disacáridos como el permeado de suero de quesería (ver ejemplo 3).

35

Las principales ventajas técnicas de la presente invención, se indican a continuación:

a) con respecto al procedimiento:

- es sencillo y económico; tiene lugar a temperatura moderada; el equipamiento requerido es sencillo; tanto las enzimas, como los productos de partida utilizados presentan un coste reducido. A modo de referencia, el trabajo que se considera más cercano a esta invención (Yamamori A, et al. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2002, 66, 1419-1422) emplea como sustratos los trisacáridos kestosa, con un precio estimado de 88 € por cada 100 mg, y lactosacarosa, con un precio estimado de 87 € por cada 1 g, mientras que la sacarosa y la lactosa presentan un precio estimado de 37 € por cada 1 kg,
- presenta una menor duración del proceso, así mientras que el proceso descrito por Yamamori et al. (*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2002, 66, 1419-1422) necesita de 48 horas, el procedimiento aquí propuesto emplea menos de 20 horas,
- presenta un rendimiento de producción elevado que duplica al de Yamamori et al. (*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2002, 66, 1419-1422); no genera subproductos de reacción; y ofrece una mayor variedad de derivados fructosilados de interés, incluyendo algunos no descritos hasta el momento;
- es fácilmente escalable,
- es inocuo y medioambientalmente limpio, debido a que todos los sustratos, reactivos y enzimas empleados son de grado alimentario y durante la producción no se originan residuos tóxicos o difíciles de eliminar, como lo que sucede en el trabajo de Yamamori et al. (*Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2002, 66, 1419-1422) que requiere el uso de tolueno, reactivo altamente tóxico e incompatible con el consumo humano,
- permite la revalorización de subproductos de la industria agro-alimentaria de bajo coste y de fácil obtención, como por ejemplo, el permeado de suero de quesería, rico en lactosa, o subproductos de la industria azucarera que se utilizan como materia prima del procedimiento de síntesis, lo que redundará en una mejora medioambiental y de reducción de costes por tratamiento de residuos de las empresas generadoras.

b) con respecto a los OFDLs de grado de polimerización 6, 7 y 8, obtenidos:

- son compuestos que deben presentar buena actividad prebiótica induciendo efectos fisiológicos beneficiosos para la salud del tracto gastrointestinal, por presentar la capacidad de ser fermentados en las zonas más distales del colon,
- podrían presentar un bajo coste de producción, y
- se trata de productos de buena calidad microbiológica y que no presentan toxicidad ya que todos los sustratos, reactivos y enzimas empleados en el proceso de síntesis son reconocidos como seguros, de grado alimentario y en ninguna etapa de la producción se originan residuos tóxicos o difíciles de eliminar, por lo que podrían ser utilizados directamente como ingredientes funcionales seguros.

Constituye un primer objeto de la invención un procedimiento de síntesis eficiente de OFDLs con grado de polimerización de entre 4 y 10, que utiliza una reacción de transfructosilación bi-enzimática, en adelante procedimiento de síntesis de la invención, y que comprende las siguientes etapas:

5

a) incubar una combinación de los disacáridos sacarosa y lactosa junto con la enzima recombinante levansacarasa (EC 2.4.1.10) de *Bacillus subtilis* (CECT 39) para obtener una mezcla de azúcares que comprende lactosacarosa como componente mayoritario, e

10 b) incubar la mezcla de azúcares de la etapa anterior junto con una enzima inulinasa (EC 2.4.1.9) de grado alimentario.

c)

En la presente invención por “reacción de transfructosilación bi-enzimática” se entiende la reacción enzimática de transferencia de un residuo de fructosa a otro carbohidrato que actúa como aceptor, que requiere el uso combinado y secuencial de dos enzimas, una levansacarasa 15 (EC 2.4.1.10) y una inulinasa (EC 2.4.1.9).

Por “oligosacáridos fructosilados derivados de lactosacarosa o lactosil-fructósidos o OFDLs” se entiende un conjunto de oligosacáridos con grado de polimerización de entre 4 y 10, definidos por la fórmula $\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-D-Glc-}[(1\rightarrow\text{2})\text{-}\beta\text{-D-Fru}]_n$, con propiedades bioactivas y/o funcionales 20 debido a sus características estructurales. Ejemplos de OFDLs que se incluyen en el ámbito de la presente invención son, aunque sin limitarse, el tetrasacárido $\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-D-Glc-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-Fru-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-Fru}$ y el pentasacárido $\beta\text{-D-Gal-(1}\rightarrow\text{4)-}\alpha\text{-D-Glc-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-Fru-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-Fru-(1}\rightarrow\text{2)-}\beta\text{-D-Fru}$.

25 La combinación de disacáridos que se utiliza en el procedimiento de síntesis de la invención, es preferentemente una combinación de los disacáridos sacarosa (o azúcar común de caña o remolacha) y lactosa (o azúcar de la leche). En el ámbito de la invención también se incluye el uso de subproductos importantes de la industria agro-alimentaria que sean ricos en los disacáridos anteriormente indicados, como por ejemplo y sin limitarse, el permeado de suero de quesería o 30 subproductos derivados de la industria azucarera.

En un aspecto, en la etapa (a) del procedimiento de síntesis de la invención la mezcla de azúcares comprende lactosacarosa con un rendimiento en peso superior al 80% con respecto a la lactosa inicial.

35

En otro aspecto, la etapa (a) del procedimiento de síntesis de la invención se lleva a cabo durante

un tiempo no superior a 90 minutos.

Los disacáridos que se utilizan en el ámbito de la invención se utilizan en forma de disolución, con una concentración de sacarosa comprendida entre 100 y 800 g/L, y una concentración de lactosa de entre 100 y 300 g/L. Preferentemente las soluciones de sacarosa y lactosa se utilizan en un ratio equimolar, y más preferentemente a una concentración de 250 g/L.

Las etapas (a) y (b) del procedimiento de síntesis de la invención se llevan a cabo a una temperatura de entre 20 y 60 °C y a un pH de entre 3,5 y 7,0.

La función de la enzima recombinante con actividad levansacarasa (EC 2.4.1.10) que se utiliza en la etapa (a) del procedimiento de síntesis de la invención es realizar la conversión de sacarosa y lactosa en lactosacarosa que se utilizará como carbohidrato aceptor en la reacción con la enzima con actividad inulinasa (EC 2.4.1.9).

Los resultados obtenidos son específicos de cada enzima y de las condiciones particulares de síntesis. El estado de la técnica más cercano refiere el uso de distintas enzimas o células con actividad levansacarasa, partiendo de sacarosa y lactosa, para producir lactosacarosa utilizando distintas condiciones de síntesis. Sin embargo, la enzima recombinante levansacarasa (EC 2.4.1.10) de *Bacillus subtilis* depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con número de acceso CECT 39, que se utiliza en el procedimiento de síntesis de la invención, es responsable de obtener uno de los mayores rendimientos en la producción de lactosacarosa (81%) con un tiempo de reacción y una temperatura ostensiblemente inferiores al resto (90 minutos y 37 °C) y con una reducida cantidad de sustratos de partida (ver tabla 1).

Tabla 1. Producción biotecnológica de lactosacarosa mediante enzimas o células con actividad levansacarasa

Cepa	Biocatalizador	Concentración de sustratos	Producción de Lactosacarosa	Rendimiento (en peso, respecto a la cantidad inicial de lactosa)	Condiciones de síntesis: tiempo (h); temperatura (°C)
1) <i>Bacillus natto</i>	Enzima purificada	85.5 g l ⁻¹ sacarosa y 85.5 g l ⁻¹ lactosa	53 g l ⁻¹	61.9 %	NF
2) <i>Paenibacillus polymyxa</i> IFO 3020	Células	225 g l ⁻¹ sacarosa y 225 g l ⁻¹ lactosa	170 g l ⁻¹	75.5 %	6 h; 55 °C
3) <i>Bacillus subtilis</i> KCCM 32835	Células	225 g l ⁻¹ sacarosa y 225 g l ⁻¹ lactosa	183 g l ⁻¹	81.3 %	10 h; 55 °C
4) <i>Bacillus subtilis</i> NCIMB 11871	Enzima recombinante	205 g l ⁻¹ sacarosa y 410 g l ⁻¹ lactosa	68 g l ⁻¹	16.6 %	4h; NF
5) <i>Pseudomonas aurantiaca</i>	NF	510 g l ⁻¹ sacarosa y 360 g l ⁻¹ lactosa	285 g l ⁻¹	79.2 %	2 h; 45 °C
6) <i>Zymomonas mobilis</i>	Enzima recombinante	180 g l ⁻¹ sacarosa y 180 g l ⁻¹ lactosa	103 g l ⁻¹	57.2 %	2 h; 23 °C
7) <i>Sterigmatomyces elviae</i> mutant	Células	250 g l ⁻¹ sacarosa y 250 g l ⁻¹	140 g l ⁻¹	56.0 %	NF

		lactosa			
8) <i>Sterigmatomyces elviae</i> mutant	Células inmovilizadas	250 g l ⁻¹ sacarosa y 250 g l ⁻¹ lactosa	192 g l ⁻¹	76.8 %	NF; 50 °C
9) <i>Bacillus subtilis</i> CECT 39	Enzima recombinante	250 g l ⁻¹ sacarosa y 250 g l ⁻¹ lactosa	203 g l ⁻¹	81.2 %	90 min; 37°C

* NF: No facilitado; Referencias: 1) Takahama et al. (1991); 2) Choi et al. (2004); 3) Park et al. (2005); 4) Seibel et al. (2006); 5) Han et al. (2007); 6) Han et al. (2009); 7) Lee et al. (2007b); 8) Lee et al. (2007a); 9) presente invención.

5

Preferentemente, se utiliza una concentración de entre 0,1 y 5 U/mL de la enzima recombinante levansacarasa (EC 2.4.1.10) de *Bacillus subtilis* (CECT 39).

10

En una realización preferida, en la etapa (a) del procedimiento de síntesis de la invención se parte de un ratio equimolar de 250 g/L de soluciones de sacarosa y lactosa y de la enzima levansacarasa (EC 2.4.1.10) de *Bacillus subtilis* (CECT 39) con una concentración de 0,5 U/mL, y se utiliza una temperatura de 37 °C y un pH de 6 durante un período de tiempo no superior a 90 minutos.

15

La función de la enzima con actividad inulinasa (EC 2.4.1.9) de grado alimentario de la etapa (b) del procedimiento de síntesis de la invención, es añadir residuos de fructosa de la sacarosa inicial a la lactosacarosa liberada por la enzima levansacarasa.

20

En otro aspecto, la etapa (b) del procedimiento de síntesis de la invención se lleva a cabo durante un tiempo no superior a 18 horas.

25

En otro aspecto, el procedimiento de síntesis de la invención consigue producir OFDLs con un grado de polimerización de entre 4 y 10, con un rendimiento en peso con respecto a la cantidad de lactosa inicial superior al 20%.

El procedimiento de síntesis de la invención no es una mera sucesión de dos reacciones independientes, puesto que la segunda parte del proceso no se puede llevar a cabo de forma

eficaz si previamente no ha tenido lugar una síntesis de lactosacarosa con un alto rendimiento. Más concretamente, la síntesis de lactosacarosa (galactosa-glucosa-fructosa) a partir de la adición de la unidad de fructosa de la sacarosa a la lactosa (galactosa-glucosa) mediante la enzima levansacarasa (EC 2.4.1.10) de *Bacillus subtilis* (CECT 39) es un paso intermedio que posibilita a la enzima inulinasa (EC 2.4.1.9) añadir posteriormente más unidades de fructosa al residuo fructosilado de la lactosacarosa, dando lugar a la producción eficaz de OFDLs con grado de polimerización de entre 4 y 10.

El procedimiento de síntesis de la invención para obtener los OFDLs no sería posible con el empleo de una sola enzima o con el uso de ambas en el orden inverso (ver ejemplos 4 – 6).

En otra realización preferida, la enzima con actividad inulinasa (EC 2.4.1.9) de grado alimentario de la etapa (b) del procedimiento de síntesis de la invención, es una enzima recombinante que se obtiene de una cepa de *Lactobacillus gasseri* depositada en el *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* con número de acceso DSM 20604, y se utiliza con una concentración de entre 0,5 y 5 U/mL.

En otra realización preferida, en la etapa (b) del procedimiento de síntesis de la invención se utiliza una concentración de 1,6 U/mL de la enzima inulinasa (EC 2.4.1.9) de *Lactobacillus gasseri* (DSM 20604) a una temperatura de 55°C, durante un período de tiempo no superior a 18 horas.

El procedimiento de síntesis de la invención comprende una etapa de purificación para obtener OFDLs con un grado de polimerización de entre 4 y 10 de un alto grado de pureza. Preferentemente, la etapa de purificación se realiza utilizando técnicas cromatográficas, aunque el experto en la técnica conocerá que es posible realizar esta purificación a través de, por ejemplo, un tratamiento con carbón activo y posterior desorción con soluciones etanólicas de baja concentración, un tratamiento biológico con levaduras deficientes en actividad invertasa o mediante el empleo de técnicas de filtración por membrana.

En otro aspecto, el procedimiento de síntesis de la invención consigue un porcentaje de OFDLs con un grado de polimerización de entre 4 y 10 purificados superior al 90% del total de carbohidratos.

Adicionalmente, el procedimiento de síntesis de la invención comprende una etapa posterior de liofilización o atomizado de los OFDLs con un grado de polimerización de entre 4 y 10 con un alto grado de pureza.

Constituyen un segundo objeto de la invención, los oligosacáridos fructosilados derivados de lactosacarosa con grado de polimerización 6, 7 y 8 en adelante OFDLs de la invención.

Los OFDLs de la invención son el hexasacárido β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru, el heptasacárido β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru y el octasacárido β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru.

Como demuestra el estado de la técnica, hasta el momento no se habían identificado OFDLs con este grado de polimerización.

La alta resistencia de las uniones β (2 $\rightarrow$ 1) de los OFDLs de la invención a los enzimas digestivos de humanos y animales, y su potencial estimulación selectiva de bacterias beneficiosas intestinales, ampliamente especificados en el apartado del estado de la técnica, le confieren un gran potencial como prebiótico mediante la modulación de las funciones fisiológicas, metabólicas e inmunológicas del hospedador.

Por otra parte, los OFDLs de la invención, al tener lactosacarosa como estructura base, poseen, al menos, las propiedades beneficiosas atribuidas a este trisacárido, pero dado su mayor peso molecular presentan la capacidad de ser fermentados en las zonas más distales del colon, que es la región del intestino grueso que presenta una mayor incidencia de patologías digestivas y oncológicas. Asimismo, al compartir características estructurales con los fructo-oligosacáridos (FOS), que son polímeros con una molécula de sacarosa y varias unidades de fructosa unidas por enlace β (2 $\rightarrow$ 1), presentan propiedades similares a los mismos, los cuales son, igualmente, ingredientes alimentarios naturales reconocidos como prebióticos y seguros con la consideración de GRAS en USA y FOSHU en Japón.

Por ese motivo, constituye un tercer objeto de la invención el uso de los OFDLs de la invención en la elaboración de una composición prebiótica útil para prevenir y atenuar patologías del sistema gastrointestinal.

En el ámbito de la presente invención, por “composición prebiótica” se entiende una combinación de ingredientes constitutiva de un producto alimentario sólido o líquido y que adicionalmente a sus características nutricionales u organolépticas, comprenden funciones específicas de resistencia a la digestión gastrointestinal y de estimulación selectiva del crecimiento y actividad de una o varias

cepas de bacterias en el sistema digestivo, que ayudan a mejorar la salud y a prevenir y atenuar distintas patologías.

Ejemplos de patologías que se incluyen en el ámbito de la presente invención son aunque sin limitarse, la enfermedad inflamatoria intestinal, el estreñimiento o la reducción de la hiperlipidemia.

En otro aspecto, los OFDLs de la invención se utilizan como edulcorante bajo en calorías.

Constituye un cuarto objeto de la invención una composición alimentaria prebiótica que comprende los OFDLs de la invención.

A lo largo de la descripción y de las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas. Para el experto en la materia, otros aspectos, 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.

Breve explicación de las figuras

FIG. 1. Estructura de la lactosacarosa y de los principales oligosacáridos fructosilados derivados (OFDLs) con grado de polimerización de entre 4 y 8 elucidadas mediante resonancia magnética nuclear (RMN) obtenidos según el procedimiento de la invención según el ejemplo 1: A) Lactosacarosa: β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru; B) OFDL GP4: β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru; C) OFDL GP5: β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru; D) OFDL GP6: β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru; E) OFDL GP7: β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru; F) OFDL GP8: β -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-Glc-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-Fru.

FIG. 2. Esquema del proceso bi-enzimático llevado a cabo para la síntesis eficiente de oligosacáridos fructosilados derivados de lactosacarosa (OFDLs) basado en el uso combinado y secuencial de dos enzimas recombinantes, en primer lugar, una levansacarasa (EC 2.4.1.10) procedente de *Bacillus subtilis* (CECT 39) y, a continuación, una inulinasa (EC 2.4.1.9) de *Lactobacillus gasseri* (DSM 20604) y utilizando como sustratos los disacáridos sacarosa y lactosa. Abreviaturas: Enzimas: LEV, levansacarasa (EC 2.4.1.10) de *Bacillus subtilis* (CECT 39); INU, inulinasa (EC 2.4.1.9) de *Lactobacillus gasseri* (DSM 20604). Monosacáridos: Glc, glucosa; Fru,

fructosa; Gal, galactosa.

FIG. 3. Perfil obtenido por cromatografía de líquidos con detector de índice de refracción (LC-RID) donde se observa la síntesis de oligosacáridos fructosilados derivados de lactosacarosa, OFDLs (GP 4 - 8) con alto rendimiento y porcentaje de pureza. Identificación de los picos cromatográficos: 1, fructosa; 2, glucosa; 3, sacarosa; 4, inulobiosa; 5, lactosa; 6, kestosa; 7, lactosacarosa; 8, nistosa; 9, 11, 13, 15, 17, OFDLs (GP 4 - 8, respectivamente); 10, 12, 14, 16, fructo-oligosacáridos (GP 5 - 8, respectivamente).

EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

1.- Procedimiento de síntesis de OFDLs con un grado de polimerización de entre 4 y 8 que utiliza como sustratos de partida sacarosa y lactosa en un ratio equimolar

Los oligosacáridos fructosilados derivados de lactosacarosa, OFDLs se obtuvieron a partir de una solución de 250 g/L de sacarosa y 250 g/L de lactosa en tampón fosfato potásico 50 mM con pH 6, a la que se añadieron 0,5 U/mL de enzima recombinante levansacarasa (EC 2.4.1.10) de *Bacillus subtilis* (CECT 39). Tras incubar dicha mezcla de reacción inicial a 37 °C de temperatura y agitación de 700 r.p.m durante 90 min, se obtuvo una mezcla de azúcares que presentó como compuesto principal la lactosacarosa con rendimiento superior al 80% (en peso con respecto a la lactosa inicial de partida), siendo el único producto aceptor sintetizado. Posteriormente, se añadieron 1,6 U/mL de enzima recombinante inulinasa (EC 2.4.1.9) de *Lactobacillus gasseri* (DSM 20604) para continuar con la incubación durante 18 h más en las que la temperatura se aumentó a 55°C. La mezcla de azúcares resultante, contuvo los oligosacáridos fructosilados derivados de lactosacarosa con grado de polimerización 4-8, obtenidos a partir de la adición de 1 a 5 unidades de fructosa al residuo fructosilado de la lactosacarosa formada como consecuencia de la transferencia de la unidad de fructosa de la sacarosa a la lactosa.

El trisacárido lactosacarosa que se obtuvo inicialmente con un 80% de rendimiento (en peso con respecto a la lactosa inicial de partida), disminuyó posteriormente a favor de la formación de sus derivados fructosilados con grado de polimerización 4-8, obtenidos con un 22% de rendimiento (en peso con respecto a la cantidad de lactosa inicial).

Una vez terminado el proceso de síntesis, tuvo lugar un proceso de purificación en columna durante 60 min mediante cromatografía de líquidos preparativa con detector de índice de refracción (LC-RID) empleando una columna amino ligada y utilizando como fase móvil

acetonitrilo:agua (65:35, v:v), en modo isocrático. A nivel preparativo se puede trabajar con una columna con dimensiones de 250 mm de longitud y 21,2 mm de diámetro interno, a un flujo de trabajo de 21,0 mL/min y un volumen de inyección de 2-3 mL, lo que permite obtener una gran cantidad del producto de interés.

5

El producto final obtenido presentó un alto porcentaje de OFDLs, siendo éste de en torno al 90% del total de carbohidratos presentes en la muestra atendiendo a la cuantificación realizada. El resto de producto estuvo constituido por un 10% de fructo-oligosacáridos (FOS).

10 Finalmente, se llevó a cabo una etapa de liofilización o atomizado, con la que se consigue obtener el producto en polvo.

2.- Procedimiento de síntesis de OFDLs con un grado de polimerización de entre 4 y 8 que utiliza como sustratos de partida sacarosa y lactosa con ratio equimolar y añadiendo una carga adicional de sacarosa

15

Se siguieron exactamente los mismos pasos que los indicados en el ejemplo 1, con la salvedad de que en este caso, antes de la incubación con la enzima recombinante inulinasa (EC 2.4.1.9) de *Lactobacillus gasseri* (DSM 20604), se añadió sacarosa (70 g/L). Con este procedimiento se consiguió un discreto aumento del rendimiento de los oligosacáridos fructosilados derivados de lactosacarosa promovido por una mayor concentración inicial de sustrato donador, alcanzando el 25% de rendimiento.

20

Sin embargo, también se produjo un aumento de producción de fructo-oligosacáridos (FOS), dando lugar a una disminución de la pureza de los oligosacáridos fructosilados derivados de lactosacarosa.

25

El mismo procedimiento se puede realizar a partir de la adición de 120 g/L de sacarosa, observándose de forma más acusada la producción de FOS, frente al aumento de los oligosacáridos fructosilados derivados de lactosacarosa (27% de rendimiento), traduciéndose en una disminución de la pureza de la mezcla.

30

3.- Procedimiento de síntesis de OFDLs con un grado de polimerización de entre 4 y 8 que utiliza como sustratos de partida sacarosa y permeado de suero de quesería en un ratio sacarosa:lactosa equimolar

35

Se siguieron exactamente los mismos pasos que los indicados en el ejemplo 1, con la salvedad de que en este caso se partió de una solución de 250 g/L de sacarosa y 320 g/L de permeado de suero de quesería de origen bovino (cantidad equivalente a 250 g/L de lactosa).

- 5 Utilizando el permeado de suero de quesería, subproducto de la industria láctea, se consiguió sintetizar oligosacáridos fructosilados derivados de lactosacarosa con un rendimiento similar a cuando se utiliza lactosa como sustrato (ver ejemplo 1): en torno al 20-25% (en peso con respecto a la cantidad inicial de lactosa) en función del suero de quesería empleado.

10 **4.- Reacción de transfructosilación con enzima levansacarasa utilizando como sustratos de partida sacarosa y lactosa en un ratio equimolar**

Para llevar a cabo la reacción de transfructosilación, se preparó una solución de 250 g/L de sacarosa y 250 g/L de lactosa en tampón fosfato potásico 50 mM con pH 6, a la que se añadió 0,5 U/mL de enzima recombinante levansacarasa (EC 2.4.1.10) de *Bacillus subtilis* (CECT 39). Dicha mezcla de reacción se incubó a 37 °C de temperatura y agitación de 700 r.p.m durante 90 min. La mezcla de azúcares obtenida presentó como compuesto principal el trisacárido lactosacarosa obtenido con rendimiento superior al 80% (en peso con respecto a la lactosa inicial de partida), siendo el único producto aceptor sintetizado. Los oligosacáridos fructosilados derivados de lactosacarosa no se obtuvieron mediante este procedimiento de síntesis. Posteriormente, se llevó a cabo un proceso de purificación en columna durante 15 min mediante cromatografía de líquidos preparativa con detector de índice de refracción (LC-RID) empleando una columna amino ligada y utilizando como fase móvil acetonitrilo:agua (65:35, v:v), en modo isocrático y se obtuvo lactosacarosa con un porcentaje de pureza próximo al 100%.

25 Finalmente, se lleva a cabo una etapa de liofilización o atomizado, con la que se consigue obtener el producto en polvo.

30 **5.- Reacción de transfructosilación con enzima inulinasa utilizando como sustratos de partida sacarosa y lactosa en un ratio equimolar**

En esta caso para llevar a cabo la reacción de transfructosilación se preparó una solución de 250 g/L de sacarosa y 250 g/L de lactosa en tampón acetato sódico 25 mM con pH 5,2, suplementado con cloruro de calcio 1 mM a la que se añadió 1,6 U/mL de enzima recombinante inulinasa (EC 35 2.4.1.9) de *Lactobacillus gasseri* (DSM 20604). Dicha mezcla de reacción se incubó a 55 °C de temperatura y agitación de 700 r.p.m durante 24 h. La mezcla de azúcares resultante estuvo

compuesta por fructo-oligosacáridos (FOS) como principales productos aceptores obtenidos con un 31% de rendimiento (en peso con respecto a la sacarosa inicial de partida) junto con el trisacárido lactosacarosa obtenido con un 6,5% de rendimiento (en peso con respecto a la lactosa inicial de partida). Los oligosacáridos fructosilados derivados de lactosacarosa (grado de polimerización 4 y 5) se obtuvieron con un 2% de rendimiento (en peso con respecto a la lactosa inicial de partida). Los oligosacáridos fructosilados derivados de lactosacarosa con grado de polimerización 6, 7 y 8 no se pudieron sintetizar.

6.- Reacción de transfructosilación bi-enzimática (inulinasa-levansacarasa) utilizando como sustratos de partida sacarosa y lactosa en un ratio equimolar

A una solución de 250 g/L de sacarosa y 250 g/L de lactosa en tampón acetato sódico 25 mM con pH 5,2, suplementado con cloruro de calcio 1 mM, se añadió 1,6 U/mL de enzima inulinasa (EC 2.4.1.9) de *Lactobacillus gasseri* (DSM 20604). Tras incubar dicha mezcla de reacción inicial a 55 °C de temperatura y agitación de 700 r.p.m durante 18 h, se añadió 0,5 U/mL de enzima levansacarasa (EC 2.4.1.10) de *Bacillus subtilis* (CECT 39) para continuar con la incubación durante 90 min más en los que la temperatura se baja a 37°C. La mezcla de azúcares resultante contuvo como principales productos aceptores fructo-oligosacáridos (FOS) (≈20%, en peso con respecto a la sacarosa inicial de partida) y lactosacarosa (≈40%, en peso con respecto a la lactosa inicial de partida). Sin embargo, los oligosacáridos fructosilados derivados de lactosacarosa (grado de polimerización 4 y 5) se obtuvieron con un rendimiento extremadamente bajo (≈2%, en peso con respecto a la lactosa inicial de partida) y los oligosacáridos fructosilados derivados de lactosacarosa con grado de polimerización 6, 7 y 8 no se sintetizaron.

REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento de síntesis de oligosacáridos fructosilados derivados de lactosacarosa (OFDLs) con grado de polimerización de entre 4 y 10, que utiliza una reacción de transfructosilación bi-enzimática, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:
- 5
- a) incubar una combinación de los disacáridos sacarosa y lactosa junto con la enzima recombinante levansacarasa (EC 2.4.1.10) de *Bacillus subtilis* (CECT 39) para obtener una mezcla de azúcares que comprende lactosacarosa como componente mayoritario, e
- 10
- b) incubar la mezcla de azúcares de la etapa anterior junto con una enzima inulinasa (EC 2.4.1.9) de grado alimentario.
- 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que en la etapa (a) la lactosacarosa de la mezcla de azúcares comprende un rendimiento en peso superior al 80% con respecto a la lactosa inicial.
- 15
- 3.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado por que la etapa (a) se lleva a cabo durante un período de tiempo no superior a 90 minutos.
- 20
- 4.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que en la etapa (a) la sacarosa y la lactosa se utilizan en disolución con una concentración de entre 100 y 800 g/L y de entre 100 y 300 g/L respectivamente.
- 25
- 5.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4, caracterizado por que la sacarosa y la lactosa se utilizan con un ratio equimolar.
- 6.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que en la etapa (a) la sacarosa y la lactosa se utilizan en disolución con una concentración de 250 g/L y de 250 g/L respectivamente.
- 30
- 7.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 6, caracterizado por que se lleva a cabo a una temperatura de entre 20 y 60°C y a un pH de entre 3,5 y 7,0.
- 35
- 8.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado por que en la etapa (a) la enzima recombinante levansacarasa (EC 2.4.1.10) de *Bacillus subtilis* (CECT 39) se

utiliza en una concentración de entre 0,1 y 5 U/mL.

9.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado por que en la etapa (a) se utiliza la enzima de *Bacillus subtilis* (CECT 39) con una concentración de 0,5 U/mL, a una temperatura de 37 °C y un pH de 6.

10.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 9, caracterizado por que la etapa (b) se lleva a cabo durante un período de tiempo no superior a 18 horas.

11.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, caracterizado por una producción de OFDLs con un grado de polimerización de entre 4 y 10 con un rendimiento en peso con respecto a la cantidad de lactosa inicial superior al 20%.

12.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 11, caracterizado por que en la etapa (b) la enzima con actividad inulinasa (EC 2.4.1.9) se utiliza con una concentración de entre 0,5 y 5 U/mL.

13.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, caracterizado por que en la etapa (b) la enzima recombinante inulinasa (EC 2.4.1.9) procede de *Lactobacillus gasseri* (DSM 20604).

14.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 13, caracterizado por que en la etapa (b) se utiliza una concentración de la enzima de *Lactobacillus gasseri* (DSM 20604) de 1,6 U/mL y se utiliza una temperatura de 55°C.

15.- Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, caracterizado por que comprende una etapa de purificación de los OFDLs obtenidos en la etapa (b).

16.- OFDLs con grado de polimerización 6, 7 y 8 obtenidos por el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

17.- Uso de los OFDLs según la reivindicación 16, en la elaboración de una composición prebiótica útil para prevenir y atenuar patologías del sistema gastrointestinal.

18.- Uso según la reivindicación 17, caracterizado por que las patologías del sistema gastrointestinal se seleccionan de entre, enfermedad inflamatoria intestinal, estreñimiento y

reducción de la hiperlipidemia.

19.- Composición alimentaria prebiótica que comprende los OFDLs según la reivindicación 16.

FIG.1

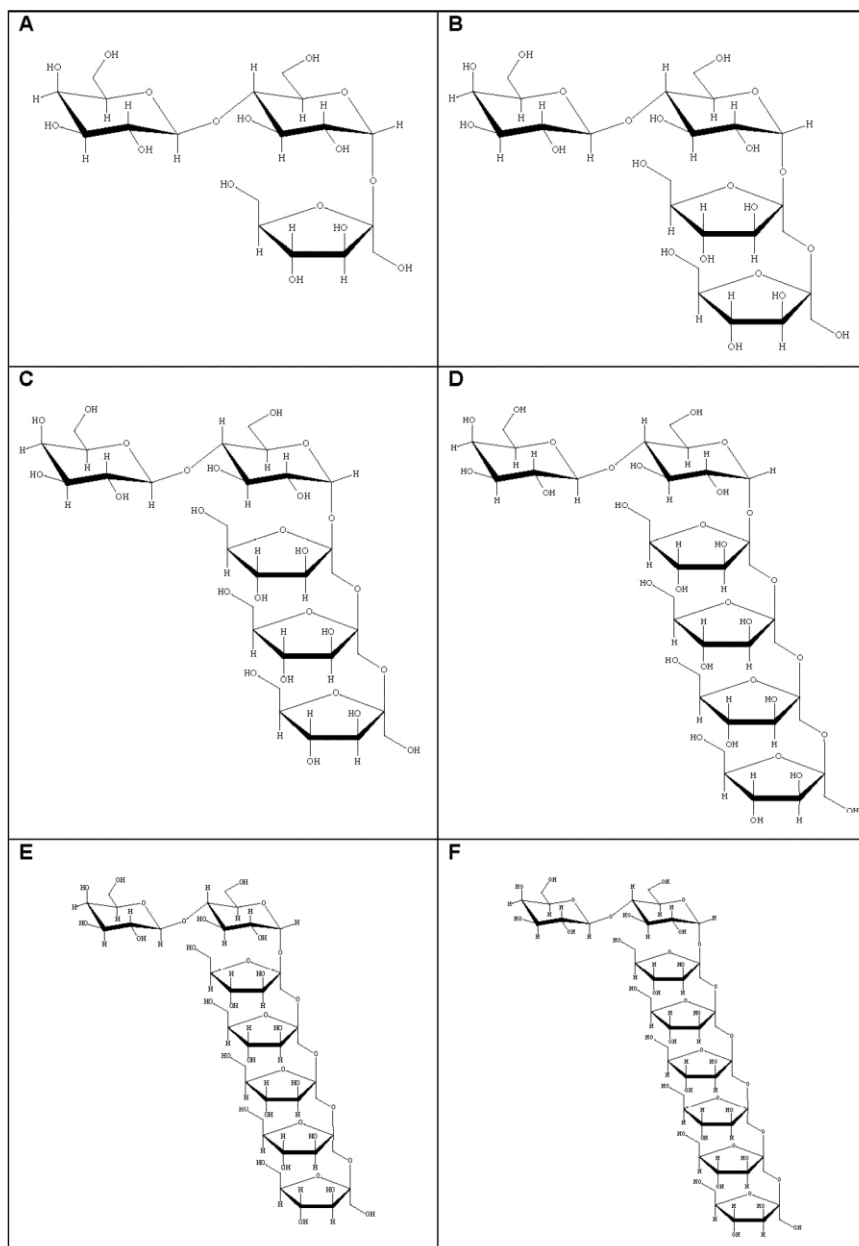


FIG. 2

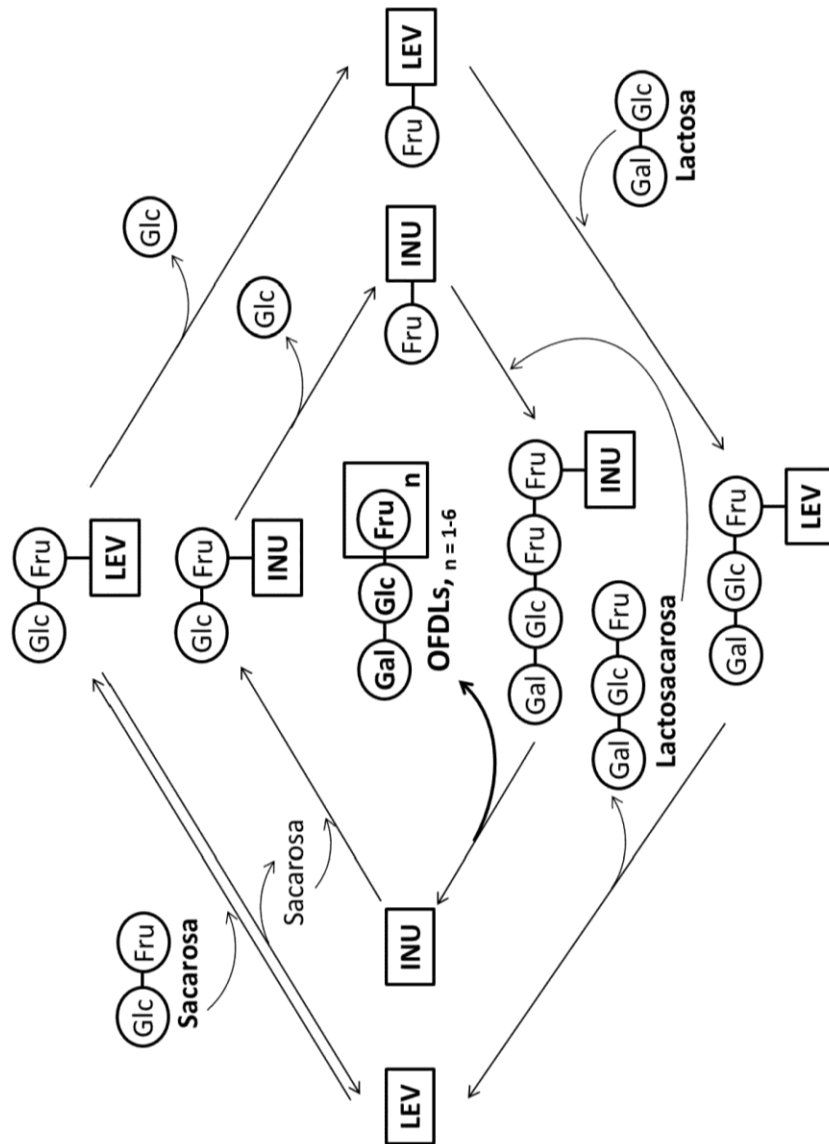
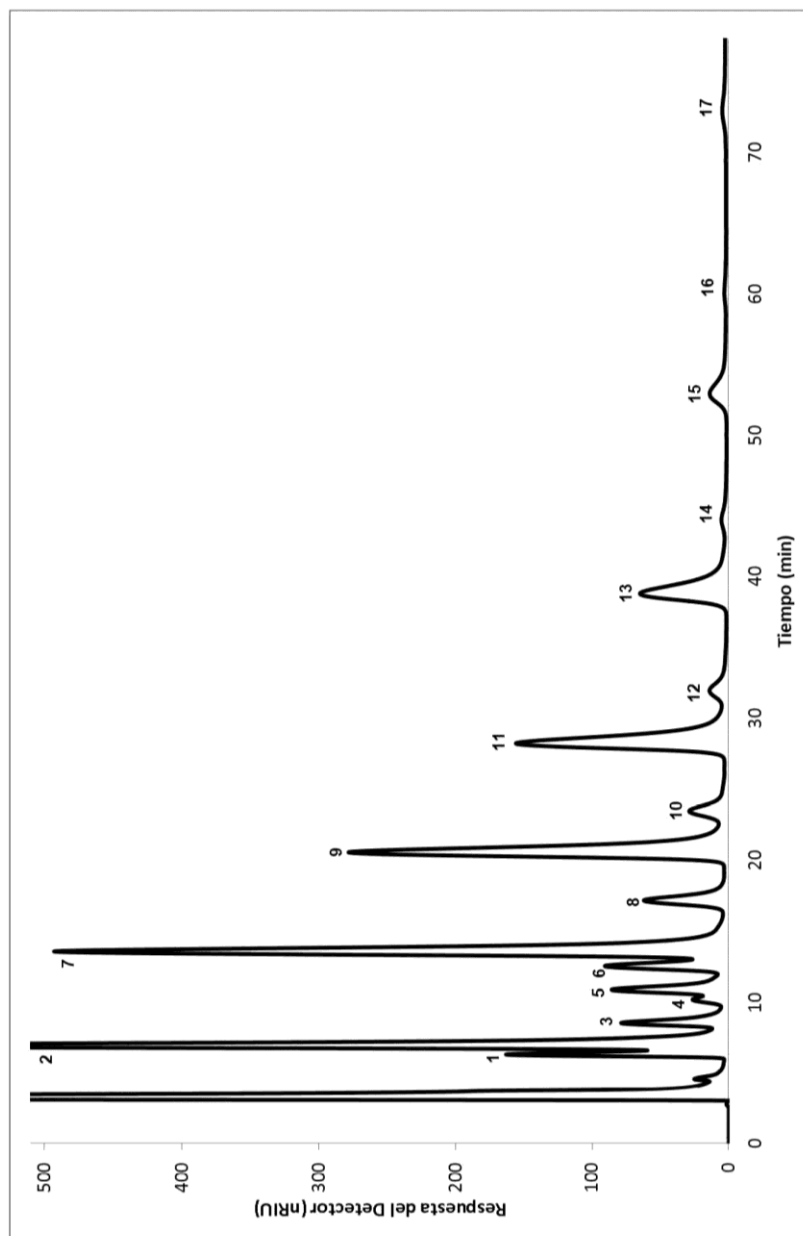


FIG. 3





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201430784

②② Fecha de presentación de la solicitud: 27.05.2014

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12P19/04** (2006.01)
C07H3/06 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	YAMAMORI A et al., Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2002, vol. 66, pags 1419-1422 "Two novel Oligosaccharides formed by 1f-fructosyltransferase purified from roots of aparagus (<i>Asparagus oficinales L.</i>)". Todo el documento	1-19
A	DIEZ-MUNICIO M et al. Applied and Environmental Microbiology, 2013, vol 79, no. 13, págs 4129-4140 "Enzymatic synthesis and characterization of fructooligosaccharides and novel maltosylfructosides by inulosucrase from <i>Lactobacillus gasser</i> DSM 20604". Todo el documento.	1-19
A	PARK N et al., Biotechnology Letters 2005, vol 27, págs 495-497 "Lactosucrose production by various microorganisms harboring levansucrase activity". Todo el documento.	1-19
A	WANMENG M et al., Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, vol. 97, págs. 7073-7080. "Current studies on physiological functions and biological production of lactosucrose". Todo el documento.	1-19
A	ANWAR M et al., Microbiology 2010, vol 156, págs. 1264-1274. "Inulin and levan synthesis by probiotic <i>Lactobacillus gasser</i> strains: characterization of three novel fructansucrase enzymes and their fructan products". Páginas 1270,1273.	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:

Fecha de realización del informe
09.10.2015

Examinador
A. I. Santos Díaz

Página
1/4

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

C12P, C07H

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 24.09.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-19	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-19	SI
	Reivindicaciones	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	YAMAMORI A et al., Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2002, vol. 66, págs 1419-1422 "Two novel Oligosaccharides formed by 1f-fructosyltransferase purified from roots of asparagus (<i>Asparagus officinales L.</i>)". Todo el documento.	
D02	DIEZ-MUNICIO M et al. Applied and Environmental Microbiology, 2013, vol 79, no. 13, págs 4129-4140 "Enzymatic synthesis and characterization of fructooligosaccharides and novel maltosylfructosides by inulosucrase from <i>Lactobacillus gasseri</i> DSM 20604". Todo el documento.	
D03	PARK N et al., Biotechnology Letters 2005, vol 27, págs 495-497 "Lactosucrose production by various microorganisms harboring levansucrase activity". 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 se refiere (reivindicaciones 1-19) a un procedimiento para la síntesis de oligosacáridos fructosilados(lactofructosidos) con grado de polimerización entre 4 y 10 derivados de lactosacarosa, producto obtenido por dicho procedimiento, uso y composición alimentaria que comprende el producto. El procedimiento consta de dos etapas

- Incubar lactosa y sacarosa con levansacarasa recombinante (EC 2.4.1.10) de *Bacillus subtilis* (CECT 39) para obtener una mezcla de azúcares que comprende lactosacarosa como componente mayoritario
- Incubar la mezcla de azúcares de la etapa anterior junto con una enzima inulasa (EC2.4.1.9.) de grado alimentario

El documento D01 describe un método de obtención de lactofructosidos a partir de kestosa y lactosacarosa con una enzima purificada obtenida de *Asparagus officinales L.* obteniendo grados de polimerización máximos de 4 o 5. Este método de obtención de lactofructosidos es diferente del utilizado en el procedimiento de la invención y los productos obtenidos tienen un grado de polimerización inferior.

El documento D02 describe la obtención de fructooligosacaridos (FOS) utilizando una inulasa (EC 2.4.1.9) de *Lactobacillus gasseri* a partir de sacarosa. El resultado de esta reacción son FOS puesto que el producto de partida es sacarosa y no lactosacarosa.

El documento D03 describe la producción de lactosacarosa por varios microorganismos con actividad levansacarasa entre los que se encuentra *Bacillus subtilis*.

Ninguno de estos documentos describe el procedimiento de síntesis de lactofructosidos con grado de polimerización entre 4 y 10 de la solicitud y reflejan solo el estado de la técnica en consecuencia la invención es nueva y se considera que implica actividad inventiva.

Las reivindicaciones 2-19 son dependientes de la reivindicación 1 y por lo tanto cumplen también los requisitos de novedad y actividad inventiva.