

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 614 286**

51 Int. Cl.:

**C08B 37/00** (2006.01)

**C12P 19/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.12.2008 PCT/CN2008/073895**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.11.2009 WO09132501**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.12.2008 E 08874088 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.11.2016 EP 2272876**

54 Título: **Glucano y manano, su método de preparación y uso**

30 Prioridad:

**29.04.2008 CN 200810105516**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**30.05.2017**

73 Titular/es:

**ANGEL YEAST CO., LTD. (100.0%)  
No. 168, Chengdong Avenue Yichang  
Hubei 443003, CN**

72 Inventor/es:

**YU, XUEFENG;  
LI, ZHIHONG;  
YU, MINGHUA;  
YAO, JUAN y  
ZHANG, YAN**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 614 286 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Glucano y manano, su método de preparación y uso

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a la preparación de glucano y manano. En particular, la presente invención se refiere a un método para preparar glucano y manano a partir de microorganismos, en especial de las levaduras. La presente invención se refiere además a la preparación de glucano y manano producidos de este modo, y al uso de los mismos.

**Antecedentes de la invención**

10 En la actualidad, con la creciente incidencia del cáncer y el incremento de la preocupación relacionada con los restos de antibióticos en los piensos para animales, los investigadores de todo el mundo desean vivamente encontrar un agente funcional seguro y eficaz que mejore la inmunidad de los pacientes, así como para diagnosticar o tratar enfermedades.

15 Los polisacáridos de la pared celular de los microorganismos (en especial de las levaduras) se consideran una muy buena elección. Después de llegar al intestino, el glucano y el manano de las levaduras los podría absorber el organismo humano a través del epitelio del intestino por medio de la endocitosis, y desempeñan una función eficaz en el refuerzo de la inmunidad del organismo animal y humano, en la mejora de la función intestinal y en la resistencia a la radiación. Su mecanismo de acción incluye la estimulación y la activación de los macrófagos, de los linfocitos citolíticos naturales y de otras células inmunitarias, el fomento de la liberación de citocinas, y la muerte de células tumorales, antígenos y otras partículas perjudiciales, de forma directa o indirecta. Además, pueden absorber  
20 diferentes toxinas en el intestino debido a su excelente capacidad para la absorción, pueden mejorar el peristaltismo intestinal y pueden mejorar el funcionamiento del intestino.

25 El glucano y el manano son los principales componentes de la pared celular microbiana (en particular de la levadura). El glucano, como polímero de glucosa, es un polisacárido insoluble en álcali cuyo esqueleto está formado por  $\beta$ -1,3-glucano con ramificaciones laterales ocasionales de  $\beta$ -1,6-dextrano. Por otra parte, el manano es un polisacárido hidrosoluble cuyo esqueleto está formado por unidades de D-manosa unidas por enlaces  $\alpha$ -1,6, en donde la mayoría de las moléculas de manosa, o incluso todas ellas, tienen cadenas laterales compuestas de restos de manosa unidos por enlaces de 2-5  $\alpha$ -1,2 o  $\alpha$ -1,3.

30 Se han llevado a cabo numerosas investigaciones sobre la extracción y utilización del glucano de la pared celular. Sin embargo, estas investigaciones presentan varias desventajas: (1) el método de extracción se refiere principalmente a tratamientos simples con ácido o álcali, y el contenido de glucano de las preparaciones es de menos del 60%; (2) la mayor parte de las investigaciones se centran en la extracción del glucano, en lugar de la extracción simultánea de glucano y manano (la mayor parte del cual se desecha); (3) algunos de los procesos no son idóneos para aplicarlos a gran escala en la industria por su poca estabilidad y rendimiento.

35 En vista de las distintas aplicaciones de las células de levadura en la industria fermentativa y la diversa utilización de los  $\beta$ -glucanos, en la técnica se necesitan nuevos métodos para preparar el glucano a partir de las células de levadura. Estos nuevos métodos deberían superar las desventajas de la poca estabilidad y/o de poco rendimiento en la técnica anterior.

40 La solicitud de patente internacional WO 00/08201 A1 se refiere a un método para obtener un polisacárido inmunomodulador biológicamente activo de masa molecular elevada desde la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. «Zymolyase®-20T Datasheet», URL: <http://www.amsbio.com/datasheets/120491-1.pdf>, se refiere a la Zymolyase®-20T producida por un cultivo sumergido de *Arthrobacter luteus*, que es una nueva preparación enzimática que hidroliza con eficacia la pared celular de las células de levadura viables.

**Breve descripción de la invención**

45 En un aspecto, la presente invención se refiere a un método para preparar glucano a partir de microorganismos, que comprende las etapas de:

- a) tratar las células del microorganismo con una proteasa y una mananasa;
- b) separar la mezcla obtenida en la etapa a) en una fase densa y una fase ligera; y
- c) secar la fase densa obtenida en la etapa b), gracias a lo cual se obtiene una preparación de glucano,

en donde la etapa c) comprende las etapas de:

50 c') tratar la fase densa obtenida en la etapa b) con un álcali y un ácido, de forma secuencial, y separarla en una fase densa y una fase ligera; y

c'') secar la fase densa obtenida en c'), con lo que se obtiene la preparación del glucano.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un método para preparar glucano y manano a partir de microorganismos, que comprende las etapas de:

a) tratar las células del microorganismo con una proteasa y una mananasa;

5 b) separar la mezcla obtenida en la etapa a) en una fase densa y una fase ligera;

c) secar la fase densa obtenida en la etapa b), gracias a lo cual se obtiene una preparación de glucano; y

d) secar la fase ligera obtenida en la etapa b), gracias a lo cual se obtiene una preparación de manano,

en donde la etapa c) comprende las etapas de:

10 c') tratar la fase densa obtenida en la etapa b) con un álcali y un ácido, de forma secuencial, y separarla en una fase densa y una fase ligera; y

c'') secar la fase densa obtenida en c'), gracias a lo cual se obtiene la preparación de glucano.

15 Preferiblemente, en los métodos anteriores, la fase densa obtenida en la etapa b) se podría tratar de forma secuencial con un álcali y un ácido después de la etapa b) y separarse de nuevo en una fase densa y una fase ligera. A continuación, la fase densa obtenida se somete al secado de la etapa c), gracias a lo cual se obtiene la preparación de glucano.

Se presenta un método para preparar manano a partir de microorganismos, que comprende las etapas de:

a) tratar las células del microorganismo con una proteasa y una mananasa;

b) separar la mezcla obtenida en la etapa a) en una fase densa y una fase ligera; y

d) secar la fase ligera obtenida en la etapa b).

20 En algunas realizaciones, las células del microorganismo se seleccionan del grupo que consiste en células de bacterias, de hongos y de plantas, por ejemplo, células de levadura, tales como células de *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Schizosaccharomyces* o *Hansenula*, lo más preferiblemente las células de *Saccharomyces*, tales como *Saccharomyces cerevisiae* o levadura de panadería.

25 En otras realizaciones, las células se someten a una etapa de tratamiento previo en el que las células se lisan o autolisan antes de la etapa a).

En otras realizaciones la proteasa utilizada para el tratamiento con proteasa es una proteasa alcalina, preferiblemente proteasas de *Bacillus subtilis*.

30 En otras realizaciones, la mananasa utilizada para el tratamiento con mananasa se selecciona del grupo que consiste en Gamanase™ (Novozymes), PURABRITE™ (Genencor International Inc.) o la mananasa de Pangbo Biological Engineering Co., Ltd., Nanning, China, o cualquier combinación de las mismas.

La presente invención se refiere además a la preparación de glucano y a la preparación de manano producidas de acuerdo con los métodos de más arriba.

La presente invención se refiere además al uso de la preparación de glucano y de la preparación de manano para la fabricación de alimentos, nutrientes, pienso o cosméticos.

### 35 Descripción detallada de la invención

40 El manano es el polímero comprendido por unidades de manosa. En la levadura, el manano se fija tanto a las proteínas de la superficie externa de la pared celular de la levadura como a la membrana celular interna. Por lo general, el manano es responsable del 20 al 50% de la pared celular (peso seco). Los oligosacáridos comprendidos principalmente por manano son capaces de interrumpir la colonización de los patógenos intestinales para mejorar el ambiente intestinal. Pueden actuar como un antígeno para iniciar directamente la respuesta de anticuerpos y actuar como un factor inmunoestimulante para reforzar la inmunidad humoral y celular de los animales.

45 Al tratar la pared celular de los microorganismos con una proteasa y una mananasa, el método de la presente invención podría extraer glucano y manano simultáneamente de la pared celular microbiana. Así pues, la preparación de glucano y la preparación de manano producidas de este modo podrían tener diferentes aplicaciones, por ejemplo, utilizarse en la alimentación humana, en el pienso animal, en los cosméticos, en los medicamentos y en los nutrientes como un aditivo, o utilizarse junto con vehículos aceptables para la agricultura en composiciones protectoras de plantas, en combinación con nutrientes, herbicidas o plaguicidas agrícolas.

En la presente invención, cualquier microorganismo idóneo se puede utilizar como fuente de glucano o manano, entre ellos, pero sin limitarse a ellos, bacterias, hongos y plantas, tales como las algas unicelulares. Por ejemplo, el microorganismo puede ser una bacteria, tal como *Alkaligenes*, *Agrobacterium*, *Cellulomonas* y *Pestalotia*; o un hongo, tal como *Aureobasidium*, *Agaricus*, *Lentinus*, *Pleurotus ostreatus*, *Macrospora*, *Ganoderma*, *Schizophylla*, *Fachyma hoelen*, *Pestalotia* y *Corioulus*. Los materiales no microbianos (tales como plantas) también se pueden utilizar como la fuente de glucano o manano.

En algunas realizaciones, se utilizan las levaduras como la fuente de glucano o manano. La levadura puede ser, por ejemplo, *Saccharomyces*, tal como *Saccharomyces cerevisiae* (que incluye la levadura de panadería y la levadura de cerveza), *Saccharomyces delbrueckii*, *Saccharomyces rosei*, *Saccharomyces microellipsodes*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Kluyveromyces*, tales como *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces polysporus*; *Candida*, tales como *Candida utilis*, *Candida albicans*, *Candida cloacae*, *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Schizosaccharomyces*, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; y *Hansenula*, tales como *Hansenula wingei*, *Hansenula arni*, *Hansenula henricii*, *Hansenula americana*.

Preferiblemente, en el método de la presente invención se utiliza como la fuente de glucano o manano una cepa de *Saccharomyces*, en especial de *Saccharomyces cerevisiae*, que pueden ser las células de levadura, los derivados de levadura tales como levadura seca, leche de levadura, pared celular de levadura, etc., o cualquier combinación de las mismas.

En el método de preparación de la presente invención, las células microbianas se tratan primero con una proteasa y una mananasa, y a continuación se separan en función de la densidad. La fracción con mayor densidad (en adelante denominada la «fase densa», tal como el precipitado) contiene el glucano, mientras que la fracción con la densidad más baja (en adelante denominada la «fase ligera») contiene el manano. Los métodos idóneos para la separación los conoce bien el experto en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la centrifugación, en el que la velocidad de centrifugación puede variar dentro de un amplio margen y se puede determinar mediante las técnicas convencionales.

Después de la centrifugación, la fase densa y la fase ligera se recogen y secan por separado, gracias a lo cual se obtiene la preparación de glucano y de manano. Opcionalmente, la fase densa y la fase ligera se pueden concentrar y a continuación secarse por separado.

Sin desear comprometerse con ninguna teoría, el tratamiento con proteasa y el tratamiento con mananasa de la presente invención se considera que hidrolizan una gran cantidad de las proteínas y de los polisacáridos de la pared celular microbiana, y que destruyen la estructura de la pared celular, con lo que el glucano queda expuesto y se facilita la extracción del glucano y del manano.

Las proteasas idóneas para el método de la presente invención las conocen bien los expertos en la técnica. Se pueden adquirir en el mercado a determinados fabricantes o las pueden preparar los expertos en la técnica de acuerdo con los métodos convencionales, entre ellos, por ejemplo, la extracción, la ingeniería genética, etc. En algunas realizaciones, la proteasa es una proteasa alcalina. Por ejemplo, la proteasa presenta una actividad considerable a un pH que oscila entre pH 7 y 10, pH 7,5 y 9,5, o pH 7,8 y 9,5. Los ejemplos de las proteasas idóneas incluyen, pero sin limitarse a ellas, subtilisina 147, subtilisina 309, subtilisina BPN<sup>TM</sup>, subtilisina Novo<sup>TM</sup>, Alcalase<sup>TM</sup>, Savinase<sup>TM</sup>, Durazym<sup>TM</sup> (se pueden obtener de Novozymes); Maxatase<sup>TM</sup>, Maxacal<sup>TM</sup>, Purafect<sup>TM</sup>, FN2<sup>TM</sup>, FN3<sup>TM</sup> (se pueden obtener de Genencor International Inc.), Validase AFP<sup>TM</sup>, Validase<sup>TM</sup> FP500, Validase<sup>TM</sup> FP II, Bromelain<sup>TM</sup> (se pueden obtener de Valley Research, South Bend, IN) o la proteasa alcalina de Pangbo Biological Engineering Co., Ltd., Nanning, China, o cualquier combinación de las mismas. En el método de la presente invención, la cantidad de proteasa la puede determinar convencionalmente un experto en la técnica, por ejemplo, 0,0001-10%, 0,001-5%, 0,01-1% o 0,05-0,5% (en peso seco del material de levadura a tratar).

Las mananasas adecuadas para el método de la presente invención las conocen bien los expertos en la técnica. Se pueden adquirir en el mercado a determinados fabricantes o las pueden preparar los expertos en la técnica de acuerdo con los métodos convencionales, entre ellos, por ejemplo, la extracción, la ingeniería genética, etc. Las mananasas idóneas incluyen, pero sin limitarse a ellas, Gamanase<sup>TM</sup> (se puede obtener de Novozymes), PURABRITE<sup>TM</sup> (se puede obtener de Genencor International Inc.) o la mananasa de Pangbo Biological Engineering Co., Ltd., Nanning, China, o cualquier combinación de las mismas. En el método de la presente invención, la cantidad de mananasa también la puede determinar convencionalmente el experto en la técnica, por ejemplo, 0,0001-10%, 0,001-8%, 0,01-6%, 0,05-5% o 0,1-3% (en peso seco del material de levadura a tratar).

En algunas realizaciones, el protocolo para tratar las células microbianas con una proteasa y una mananasa incluye el tratamiento de las células con la proteasa en las condiciones idóneas y a continuación el tratamiento de las células con la mananasa en las condiciones idóneas.

Las condiciones específicas para el tratamiento enzimático dependerán en parte de las enzimas específicas que se utilicen. Los expertos en la técnica pueden determinar el pH, temperatura y duración idóneos, y la cantidad idónea de enzimas de acuerdo con las enzimas específicas que se apliquen.

En algunas realizaciones, el tratamiento con la proteasa se puede realizar a pH de 7 a 10, preferiblemente pH 7,0-

9,5, tal como pH 7,5-9,0, pH 7,5-9,5, pH 7,0-9,0, pH 7,0-8,8. La temperatura para el tratamiento con la proteasa puede ser, por ejemplo, de 10 a 70°C, tal como 20-65°C, 25-65°C, 30-60°C o 35-60°C, 65°C o 55°C. La duración puede ser de 1 a 20 h, tales como 2-15 h, 3-12 h, 5-12 h, etc.

5 En otras realizaciones, el tratamiento con mananasa se puede realizar a pH de 4,0 a 7,2, tal como pH 4,0-7,0, pH 4,5-7,0, pH 4,8-7,0, pH 5,0-7,0 o pH 4,0-6,0, pH 4,0-6,5, pH 4,5-6,0, pH 4,5-6,5, etc. La temperatura para el tratamiento con la proteasa puede ser de 10 a 70°C, tal como 20-65°C, 25-60°C, 30-55°C o 35-50°C. La duración puede ser de 4 a 20 h, tal como 6-15 h, 8-12 h, etc.

10 Opcionalmente, un tratamiento previo, tal como el tratamiento térmico, lisis o autólisis, se puede realizar antes de tratar las células microbianas o los materiales de fracciones de las mismas con la proteasa o mananasa de acuerdo con la presente invención. La autólisis es un proceso en el que las macromoléculas se lisan mediante las enzimas endógenas microbianas. Los métodos para la autólisis de los microorganismos se conocen bien en la técnica. Durante la lisis o la autólisis se pueden añadir otras enzimas exógenas más (p. ej., proteasa) para facilitar la lisis. En una realización, las células microbianas (p. ej., células de levadura) o sus fracciones que contienen la pared celular se formulan en una solución acuosa al 1-20% y a continuación se hacen reaccionar durante 0,5-3 h a 50-100°C. En otra realización, las células microbianas o sus fracciones que contienen la pared celular se formulan en una solución acuosa al 1-20%, a continuación, se les añade una proteasa al 0,05%-10% (en peso de la enzima/la materia seca de levadura) y se incuban durante 5-30 h a 35-50°C para el tratamiento previo. Las proteasas idóneas las conoce el experto en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la papaína. Tales proteasas están disponibles en el mercado, tal como la de Pangbo Biological Engineering Co., Ltd., Nanning, China, o se pueden preparar mediante métodos de extracción o de ingeniería genética.

20 Así pues, en una realización concreta, el tratamiento con proteasa y el tratamiento con mananasa se pueden realizar tal y como sigue. Los materiales microbianos (tales como la pared celular de la levadura) se formulan primero en una suspensión al 1-20% (en peso) con agua y se hacen reaccionar durante 0,5-3 h a 50-100°C. A continuación, se ajusta la temperatura a 10-70°C y se ajusta el pH a 7,0-9,0, y se le añade la proteasa alcalina a una concentración final del 0,5-4‰ (el peso de las enzimas/la materia seca de levadura) y se incuba durante 6-10 h. A continuación, se ajusta el pH a 4,0-7,0 y se le añade la mananasa a la concentración final del 0,5-4‰ (el peso de las enzimas/el peso de la materia seca de levadura) y se incuba durante 8-12 h.

25 En la presente invención, se pueden añadir las sustancias ácidas o alcalinas idóneas para ajustar los valores de pH necesarios para el sistema de enzimólisis, entre ellos, por ejemplo, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, carbonato de sodio, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido cítrico, etc., que están dentro de la capacidad del experto en la técnica.

30 En los métodos de la presente invención, las etapas de separación se pueden realizar con los métodos de separación convencionales basados en la densidad, tales como la centrifugación. En una realización preferida, la separación se realiza mediante el uso de un separador de tipo disco.

35 La etapa de secado del método de la presente invención se puede realizar mediante el uso de cualquier método bien conocido por los expertos en la técnica, entre ellos, pero sin limitarse a ellos, la liofilización, secado con rodillos, secado por pulverización y secado pelicular. Opcionalmente, la etapa de secado se puede realizar después de una etapa de molienda. En una realización preferida, el secado es un secado por pulverización, por ejemplo, a 100-180°C. Opcionalmente, toda concentración se realiza antes de cualquier etapa de secado mediante las técnicas convencionales que se conocen en la técnica.

40 Preferiblemente, el método de la presente invención se puede combinar con los métodos convencionales para la extracción de glucano. Por ejemplo, después de que los microorganismos se traten con la proteasa y la mananasa, y de que se hayan separado, la fase densa obtenida se trata a continuación con álcalis y ácidos. Ya que se han retirado la mayor parte de los contaminantes mediante el tratamiento enzimático, el rendimiento del método de la presente invención es más elevado que el de los métodos convencionales que utilizan ácido y álcali. Además, ya que la cantidad de materiales a tratar disminuye después de retirar los contaminantes, disminuye la cantidad del álcali y ácido utilizado, lo que conduce a una menor contaminación medioambiental y a una menor corrosión de los dispositivos.

45 Tal y como saben bien los expertos en la técnica, los álcalis idóneos para tal tratamiento alcalino posterior incluyen, pero sin limitarse a ellos, hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, o la combinación de los mismos, cuya concentración final en el sistema de tratamiento con álcali podría ser del, por ejemplo, 0,5-10%, preferiblemente del 1-8%, más preferiblemente del 2-6% (p/v). El tratamiento con álcali se realiza por lo general en las condiciones de calentamiento, por ejemplo, a la temperatura de 50-120°C, tal como 50-120°C, 60-110°C, 65-100°C, 70-95°C, durante un periodo de tiempo adecuado, tal como 1-20 h, 2-15 h, 2-10 h o 2-8 h. Preferiblemente, la fase densa tratada con álcali se separa, por ejemplo, mediante centrifugación. En una realización, el tratamiento con álcali se realiza tal y como sigue. La fase densa obtenida mediante el tratamiento con álcali y la separación se concentran y/o secan opcionalmente, a continuación, se formulan con agua hasta que la concentración es del 0,2-20%, tal como del 0,5-15% o del 1-10%. El álcali se le añade hasta que la concentración final es del 0,5-10%, preferiblemente del 1-8%, lo más preferiblemente del 2-6% (p/v), y preferiblemente se calienta hasta 70-100°C y se incuba durante 1-4 h.

Opcionalmente, el sistema tratado por el álcali se separa, por ejemplo, por centrifugación.

5 La fase densa obtenida mediante el tratamiento con álcali se puede además tratar con ácidos. Los ácidos idóneos los conoce bien el experto en la técnica, e incluyen, pero sin limitarse a ellos, ácido sulfúrico, ácido acético, ácido clorhídrico o ácido fosfórico, o cualquier combinación de los mismos. En una realización, la fase densa que se obtiene mediante el tratamiento con álcali y que opcionalmente se concentra y/o seca se formula con agua a la concentración del 1-10%, se ajusta a pH 3-5 con un ácido, se calienta a 60-100°C y se incuba durante 0,5-5 h, tal como 1-4 h. Puede estar en agitación durante el proceso de incubación.

10 Después de que el sistema tratado con un álcali y un ácido se separe, por ejemplo, por centrifugación, la fase densa obtenida se concentra y/o se seca, gracias a lo cual se obtiene una preparación de glucano de levadura. Si es necesario, la fase densa obtenida del sistema tratado con un álcali y con un ácido se podría separar varias veces por centrifugación, por ejemplo, se le añade agua y se separa de nuevo por centrifugación. A continuación, la fase densa final se concentra y/o se seca tal y como se describe más arriba con respecto al producto tratado con las enzimas y separado.

15 Una preparación de glucano con un contenido de más del 70% y una preparación de manano con un contenido de más del 40% se puede preparar a partir de las células de levadura, de acuerdo con el método de la presente invención. La tasa de extracción del presente método es del 60-95%. El método de la presente invención se puede llevar a cabo en condiciones suaves con una estabilidad excelente y es idóneo para la producción industrial.

20 El contenido de glucano y de manano en la preparación final se puede determinar mediante diferentes métodos bien conocidos por los expertos en la técnica, tales como el método con fenol y ácido sulfúrico, DNS, titulación de Fehling, cromatografía, etc.

25 La presente invención se refiere además a la preparación de manano y a la preparación de glucano preparadas de acuerdo con el método de la presente invención, que se pueden administrar solos o en combinación con vehículos o excipientes comestibles, farmacéuticamente aceptables o cosméticamente aceptables. Por lo tanto, se pueden formular en forma de solución, partículas, comprimidos, píldoras y emulsiones, etc. Su cantidad eficaz y método de preparación los pueden determinar los expertos en la técnica a través de los métodos convencionales.

La preparación de manano y la preparación de glucano preparadas de acuerdo con el método de la presente invención se pueden aplicar en diferentes aplicaciones. Por ejemplo, el manano de levadura, que es un polisacárido hidrosoluble y se puede añadir a diferentes alimentos, nutrientes, pienso y cosméticos, desempeña una función importante a la hora de mejorar la inmunidad y absorber toxinas, etc.

30 Las peculiaridades y los diversos aspectos de la presente invención se ejemplifican mediante los ejemplos específicos que vienen a continuación. A menos que se indique específicamente, los protocolos y reactantes utilizados en la presente invención son métodos y reactivos bien conocidos. Se debe observar que estos ejemplos son ilustrativos y no limitan el alcance de la presente invención.

### Ejemplos

35 En los ejemplos que vienen a continuación, el porcentaje de las enzimas añadidas se basa en la razón de las enzimas por el peso seco del material original (p. ej., el porcentaje de la enzima por el peso seco de las células de levadura). La proteasa alcalina y la mananasa utilizadas en los siguientes ejemplos se obtienen de Pangbo Biological Engineering Co., Ltd., Nanning, China.

Ejemplo 1: Preparación de manano

40 a) 500 kg de levadura de panadería (levadura seca muy activa, Angel Yeast Co. Ltd., China) se formuló con agua en una suspensión al 10% (p/p), se incubó durante 1 h a 90°C, se ajustó a 60°C y se le ajustó el pH a 7,0 con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. Se le añadió la proteasa alcalina al 3‰ y se incubó durante 8 h. A continuación, se le ajustó el pH a 5,0 con ácido clorhídrico, se le añadió la mananasa al 3‰ y se incubó durante 10 h.

45 b) Separación a 6.000g con el separador de tipo disco (Jiangsu Juneng Machinery Co., Ltd, China). La fase densa y la fase ligera se recogieron por separado.

c) La fase ligera obtenida en b) se concentró por concentración al vacío y se secó por pulverización a 180°C, con lo que se obtuvo la preparación de manano como un polvo amarillo pálido. El contenido de manano fue del 40%, tal y como se determinó mediante el método con fenol y ácido sulfúrico.

Ejemplo 2: Preparación de manano

50 a) 500 kg de pared celular de levadura preparada a partir de levadura de panadería por autólisis se formuló con agua en una suspensión al 3% (p/p), se incubó durante 3 h a 100°C, se enfrió a 50°C y se le ajustó el pH a 9,0 con hidróxido de sodio. Se le añadió la proteasa alcalina al 1‰ y se incubó durante 10 h. A continuación, se le ajustó el pH a 4,0 con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, se le añadió la mananasa a la concentración final del 4‰ y se incubó durante 12 h a 50°C.

b) Separación a 3.000g con el separador de tipo disco. La fase densa y la fase ligera se recogieron por separado.

5 c) La fase ligera obtenida en b) se concentró por concentración al vacío y se secó por pulverización a 160°C, con lo que se obtuvo una preparación de manano como un polvo amarillo pálido. El contenido de manano fue del 42%, tal y como se determinó mediante el método con fenol y ácido sulfúrico.

Ejemplo 3: Preparación de manano

10 a) 500 kg de pared celular de levadura preparada de la levadura de panadería por autólisis se formuló con agua en una suspensión al 20% (p/p), se incubó durante 2 h a 50°C, se enfrió a 10°C y se le ajustó el pH a 8,0 con hidróxido de sodio. Se le añadió la proteasa alcalina al 4‰ y se incubó durante 10 h a 50°C. A continuación, se le ajustó el pH a 6,0 con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, se le añadió la mananasa al 2‰ y se incubó durante 10 h a 50°C.

b) Separación a 10.000g con el separador de tipo disco. La fase densa y la fase ligera se recogieron por separado.

15 c) La fase ligera obtenida en b) se concentró por concentración al vacío y se secó por pulverización a 180°C, con lo que se obtuvo una preparación de manano como un polvo amarillo pálido. El contenido de manano fue del 44%, tal y como se determinó mediante el método con fenol y ácido sulfúrico.

Ejemplo 4: Preparación de manano

20 a) 500 kg de pared celular de levadura preparada a partir de levadura de panadería por autólisis se formuló con agua en una suspensión al 1% (p/p), se incubó durante 0,5 h a 80°C, se enfrió a 70°C y se le ajustó el pH a 8,0 con hidróxido de sodio. Se le añadió la proteasa alcalina al 0,5‰ y se incubó durante 6 h a 70°C. A continuación, se le ajustó el pH a 7,0 con ácido clorhídrico, se le añadió la mananasa al 0,5‰ y se incubó durante 8 h a 70°C.

Las etapas b) y c) se realizaron como en el ejemplo 4, con lo que se obtuvo el contenido de manano del 42%.

Ejemplo 5: Preparación de glucano

Las etapas a) y b) se realizaron como en el ejemplo 1;

25 c) La fase densa obtenida en b) se concentró por concentración al vacío y se secó por pulverización, con lo que se obtuvo la preparación de glucano como un polvo. El contenido de glucano fue del 45%, tal y como se determinó mediante el método con fenol y ácido sulfúrico.

Ejemplo 6: Preparación de glucano

Las etapas a) y b) se realizaron como en el ejemplo 1;

30 c) La fase densa obtenida en b) se formuló con agua para una suspensión al 5%. Se le añadió el NaOH a la concentración final del 5%, se incubó durante 3 h a 90°C con agitación continua y se enfrió a 60°C;

d) Separación a 8.000g con el separador de tipo disco. La fase densa y la fase ligera se recogieron por separado;

35 e) La fase densa obtenida en d) se formuló con agua hasta dar una suspensión al 5%, se le ajustó el pH a 4,5 con ácido sulfúrico concentrado, se incubó durante 1 h a 90°C con agitación continua y se enfrió a 50°C;

f) Separación a 8.000g con el separador de tipo disco. Se descartó la fase ligera. A la fase densa se le añadió agua hasta alcanzar el volumen anterior a la separación, y se separó de nuevo. La separación se repitió cuatro veces;

40 g) La fase densa obtenida en f) se secó por pulverización a 160°C, con lo que se obtuvo la preparación de glucano como un polvo. El contenido de glucano fue del 85%, tal y como se determinó mediante el método con fenol y ácido sulfúrico.

Ejemplo 7: Preparación de glucano

Las etapas a) y b) se realizaron como en el ejemplo 1;

45 c) La fase densa obtenida en b) se formuló con agua para dar una suspensión al 8%. Se le añade el KOH a la concentración final del 2%, se incubó durante 3 h a 70°C con agitación continua, y se enfría hasta los 50°C;

d) Separación a 8.000g con el separador de tipo disco. Se descartó la fase ligera. A la fase densa se le añadió agua hasta alcanzar el volumen anterior a la separación y se separó de nuevo con el separador de tipo disco. La separación se repitió 4 veces;

e) La fase densa obtenida en d) se formuló con agua para dar una suspensión al 5%, se le ajustó el pH a 3,5 con ácido acético, se incubó durante 1,5 h a 100°C con agitación continua y se enfrió a 60°C;

5 f) Separación a 6.000g con el separador de tipo disco. Se descartó la fase ligera. A la fase densa se le añadió agua hasta alcanzar el volumen anterior a la separación, y se separó de nuevo con el separador de tipo disco. La separación se repitió cinco veces;

g) La fase densa final obtenida en f) se secó por pulverización a 100°C, con lo que se obtuvo la preparación de glucano como un polvo. El contenido de glucano fue del 70%, según se determinó por el método con fenol y ácido sulfúrico.

#### Ejemplo 8: Preparación de manano y glucano

10 a) La levadura de panadería (levadura muy activa, Angel Yeast Co., Ltd, China) se formuló en una suspensión al 15%;

b) A la suspensión se le añadió papaína al 0,5% (Pangbo Biological Engineering Co., Ltd, Nanning, China), y se incubó durante 20 h a 45°C con agitación continua;

15 c) La suspensión se calentó a 90°C durante 1 h, se centrifugó a 6.000g en una centrífuga y se recogió la fase densa;

d) La fase densa de c) se formuló con agua para obtener una suspensión al 8%;

e) La suspensión en d) se calentó a 100°C durante 1 h, se enfrió a 60°C y se le ajustó el pH a 9,5 con hidróxido de sodio. Se le añadió la proteasa alcalina al 4‰ y se incubó durante 8 h. A continuación, se le ajustó el pH a 7,0, se le añadió la mananasa a la concentración final del 0,4‰ y se incubó durante 8 h a 50°C;

20 f) Separación a 10.000g con un separador de tipo disco, y la fase densa y la fase ligera se recogieron por separado;

g) La fase ligera en f) se secó por pulverización, con lo que se obtuvo la preparación de manano como un polvo. El contenido de manano fue del 45%, según se determinó por el método con fenol y ácido sulfúrico;

25 h) La fase densa en f) se formuló con agua para dar una suspensión al 5%. Se le añadió el KOH a la concentración final del 3%, se incubó durante 3 h a 95°C, se enfrió a 60°C y se centrifugó a 6.000g con un separador de tipo disco. Se recogió la fase densa;

i) La fase densa en h) se formuló con agua para dar una suspensión al 5%, se le ajustó el pH a 4,0 con ácido clorhídrico, se incubó durante 1 h a 85°C, y se centrifugó a 6.000g con un separador de tipo disco. Se recogió la fase densa;

30 j) La fase densa en i) se secó por pulverización, con lo que se obtuvo la preparación de glucano como un polvo. El contenido de glucano fue del 75%.

#### Ejemplo 9: Preparación de manano y glucano

a) La levadura de panadería se formuló en una suspensión al 12%;

35 b) A la suspensión se le añadió papaína (Pangbo Biological Engineering Co., Ltd., Nanning, China) a la concentración final del 1%, y se incubó durante 18 h a 50°C con agitación continua;

c) La suspensión se calentó a 85°C durante 1 h y se centrifugó a 10.000g con una centrífuga. Se recogió la fase densa;

d) La fase densa en c) se formuló con agua para dar una suspensión al 10%;

40 e) La suspensión en d) se calentó a 100°C durante 2 h, se enfrió a 60°C y se le ajustó el pH a 7,5 con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. Se le añadió la proteasa alcalina al 2‰ y se incubó durante 10 h;

f) Separación por centrifugación a 6.000g. La fase densa y la fase ligera se recogieron por separado;

g) La fase ligera en f) se secó por pulverización y se obtuvo la preparación de manano como un polvo. El contenido de manano fue del 35%;

45 h) La fase densa en f) se formuló con agua para dar una suspensión al 5%. Se le añadió el KOH a la concentración final del 3%, se incubó durante 3 h a 95°C, se enfrió a 60°C y se centrifugó a 6.000g. Se recogió la fase densa;

i) La fase densa en h) se formuló con agua para dar una suspensión al 5%, se le ajustó el pH a 4,0 con ácido



clorhídrico, se incubó durante 1 h a 85°C y se centrifugó a 6.000g. Se recogió la fase densa;

j) La fase densa en i) se secó por pulverización, con lo que se obtuvo la preparación de glucano como un polvo. El contenido de glucano es del 60%.

- 5 El método de la presente invención presenta una o varias de las ventajas que siguen: condiciones de reacción más suaves, protocolos más simples, estabilidad excelente, mayor rendimiento, menos contaminación, idóneo para la producción industrial a gran escala, y se obtiene el manano al mismo tiempo.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para preparar una preparación de glucano, que comprende las etapas de:
- a) tratar las células de un microorganismo con una proteasa y una mananasa;
  - b) separar la mezcla obtenida en la etapa a) en una fase densa y una fase ligera; y
- 5 c) secar la fase densa obtenida en la etapa b), con lo que se obtiene la preparación de glucano, en donde la etapa c) comprende las etapas de:
- c') tratar la fase densa obtenida en la etapa b) con un álcali y un ácido, secuencialmente, y separarla en una fase densa y una fase ligera; y
  - c'') secar la fase densa obtenida en c'), con lo que se obtiene la preparación de glucano.
- 10 2. Un método para preparar una preparación de glucano y manano, que comprende las etapas de:
- a) tratar las células de un microorganismo con una proteasa y una mananasa;
  - b) separar la mezcla obtenida en la etapa a) en una fase densa y una fase ligera;
  - c) secar la fase densa obtenida en la etapa b), con lo que se obtiene la preparación de glucano; y
  - d) secar la fase ligera obtenida en la etapa b), con lo que se obtiene la preparación de manano,
- 15 en donde la etapa c) comprende las etapas de:
- c') tratar la fase densa obtenida en la etapa b) con un álcali y con un ácido, secuencialmente, y separarla en una fase densa y una fase ligera; y
  - c'') secar la fase densa obtenida en c'), con lo que se obtiene la preparación de glucano.
- 20 3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además incluye un tratamiento previo que lisa o autolisa las células del microorganismo antes de la etapa a), en donde el tratamiento previo comprende formular las células del microorganismo con agua en una solución del 1 al 20% e incubar durante 0,5 a 3 h de 50 a 100°C, o como alternativa, formular las células del microorganismo con agua en una solución del 1 al 20%, añadir proteasa del 0,05% al 10%, e incubar durante 5 a 30 h de 35 a 50°C.
- 25 4. El método acuerdo con de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la proteasa es una proteasa alcalina.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el tratamiento con la proteasa se realiza a pH de 7 a 10, y a una temperatura de 10 a 70°C.
- 30 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la mananasa se selecciona del grupo que consiste en Gamanase™ de Novozymes, PURABRITE™ de Genencor International Inc., o la mananasa de Pangbo Biological Engineering Co., Ltd. Nanning, China, o cualquier combinación de las mismas.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el tratamiento con la mananasa se realiza a pH de 4,0 a 7,2 y a una temperatura de 10 a 70°C.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la separación se realiza con un separador de tipo disco.
- 35 9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde las células del microorganismo se seleccionan del grupo que consiste en células de bacterias, hongos y plantas.
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la célula microbiana es la pared celular de la levadura.
- 40 11. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el tratamiento alcalino se realiza con un álcali a la concentración final del 0,5 al 10% (p/v) a la temperatura de 50 a 120°C.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el tratamiento ácido se realiza con un ácido para ajustar el sistema de reacción a pH de 3 a 5, a la temperatura de 60 a 100°C.
- 45 13. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el sistema de reacción se separa por centrifugación después del tratamiento con álcali y antes del tratamiento con ácido, y la fase densa obtenida se concentra y/o seca opcionalmente antes del tratamiento con ácido.