

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 498**

51 Int. Cl.:

C12P 19/14	(2006.01)
C07H 1/00	(2006.01)
C07H 3/06	(2006.01)
C12P 19/00	(2006.01)
C12P 19/04	(2006.01)
C12N 9/38	(2006.01)
C12N 11/08	(2006.01)
C13K 5/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.09.2014 PCT/NL2014/050604**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2015 WO15034356**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2014 E 14781316 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 3041945**

54 Título: **Producción de galacto-oligosacáridos**

30 Prioridad:

05.09.2013 EP 13183222

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.11.2017

73 Titular/es:

**FRIESLANDCAMPINA NEDERLAND B.V. (100.0%)
Stationsplein 4
3818 LE Amersfoort, NL**

72 Inventor/es:

**BENJAMINS, FRÉDÉRIC;
CAO, LINQIU y
BROEKHUIS, ANTONIUS AUGUSTINUS**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 641 498 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).

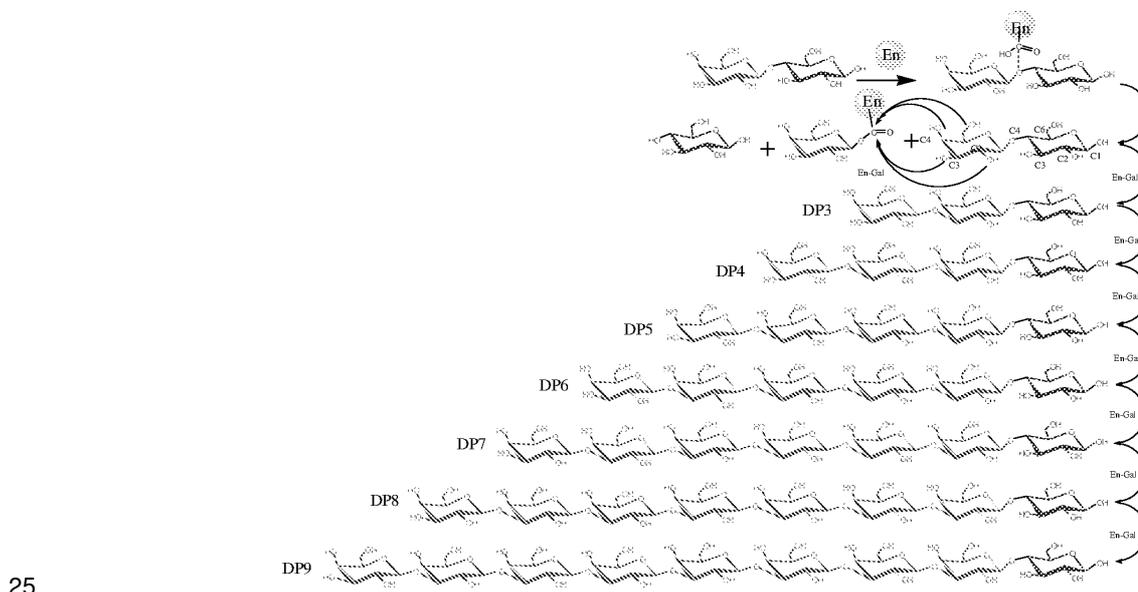
DESCRIPCIÓN

Producción de galacto-oligosacáridos

La invención se relaciona con métodos para la preparación de galacto-oligosacáridos (GOS). Los GOS, también conocidos como oligogalactosilactosa, oligogalactosa, oligolactosa o transgalactooligosacáridos (TOS), son un importante ingrediente alimenticio [1]. Debido a su naturaleza indigerible, los GOS pertenecen al grupo de prebióticos. Los prebióticos son definidos como ingredientes alimenticios no digeribles que afectan de manera benéfica al huésped, estimulando el crecimiento y/o actividad de bacterias benéficas en el colon. La habilidad de GOS, cuando son añadidos, para replicar el efecto bifidogénico de la leche humana, no sólo en recuento de bacterias, sino también respecto a la actividad metabólica de la microbiota del colon, ha aumentado de manera significativa el interés en su producción y aplicación en diferentes procesos alimenticios y farmacéuticos. Por ejemplo, los GOS ocurren en productos disponibles comercialmente, tales como alimentos para infantes y adultos, variando desde fórmulas infantiles hasta alimento para enfermos críticos.

Como su nombre lo sugiere, la síntesis de GOS involucra típicamente varios procesos de transferencia de galactosilo catalizados por β -galactosidasa (β -D-galactohidrolasa; EC 3.2.1.23), la cual usa lactosa como donante de galactosilo y lactosa o la especie intermedia de GOS como aceptador de galactosilo.

En el Esquema 1 se representa el mecanismo subyacente. Brevemente, la enzima y el donante de galactosilo (lactosa, β -D-Galp-(1,4)- β -D-Glcp) forman inicialmente un complejo transitorio de galactosil-enzima (En--Galp) y a continuación un verdadero complejo covalente galactosil-enzima (En-Galp), el cual libera una glucosa (molécula β -D-Glcp) del complejo. Entonces, otro aceptador de galactosilo (lactosa, β -D-Galp-(1,4)- β -D-Glcp u otra especie GOS) se une al complejo en el centro activo y ejecuta un ataque nucleofílico sobre este complejo galactosil-enzima (En-Galp) generalmente con su extremo no reductor (fragmento galactosilo de lactosa), dando como resultado así la formación de una especie DP3 GOS, la cual es expresada generalmente como productos β -D-Galp-(1 \rightarrow n)- β -D-Galp-(1,4)- β -D-Glcp, donde n representa la posición del enlace glicosídico, la cual puede ser 2,3,4, o 6, dependiendo de la fuente de la enzima y las condiciones aplicadas de reacción.



Esquema 1: representación esquemática del mecanismo de síntesis de GOS mediante elongación de lactosa catalizada por β galactosidasa por enlaces glicosídicos β 1-4

A medida que la reacción progresa (véase el esquema 1), más y más fragmentos de galactosilo son transferidos a las especies de GOS existentes, conduciendo a la formación de especies de GOS con diferente grado de polimerización (DP). Por ello, los GOS pueden ser expresados generalmente como (Gal) m -Glc (donde m varía usualmente entre 2-9, dependiendo de la fuente de la enzima y las condiciones aplicadas de reacción). Aparte de las especies con \geq DP3 de GOS, nuevas especies con DP2, tales como alolactosa, son consideradas usualmente como el producto primario de la acción de transgalactosilación de β -galactosidasa. Estas nuevas especies con DP2 formadas por la transgalactosilación de β -galactosidasa pueden tomar parte adicionalmente en la formación de especies GOS con mayor DP, complicando así el espectro de producto de GOS, como se discute posteriormente.

Aunque la enzima β -galactosidasa tiene numerosas aplicaciones en las industrias de alimentos y lácteas, la moderada estabilidad de la enzima es una de las limitaciones que impiden la implementación general de

biocatalizadores a una escala industrial. Los estudios para explorar su potencial completo como catalizador han dado como resultado diferentes estrategias adecuadas para la estabilización de la enzima. Por ejemplo, la enzima ha sido inmovilizada mediante diferentes métodos tales como absorción física, atrapamiento y método de enlace covalente sobre diferentes soportes. La inmovilización ha mostrado también tener un efecto ventajoso en la reducción de la inhibición de producción de β -galactosidasa. Aún más, la inmovilización de la enzima facilita la capacidad para usar de nuevo la enzima y la operación continua del proceso de síntesis de GOS.

Es bien sabido que la síntesis de GOS catalizada por β -galactosidasa es controlada cinéticamente [2]. Esto significa que la cantidad real de galacto-oligosacárido formada en un cierto momento depende mucho de las tasas relativas de las reacciones de síntesis deseadas versus las reacciones no deseadas de hidrólisis de lactosa y /o GOS. Esto, a su vez depende no sólo de la concentración de lactosa sino también de las especies de GOS que se forman, y además, de la interacción de la enzima con los productos resultantes de la síntesis y la hidrólisis.

Así, las diferentes especies de GOS pueden ser usadas no sólo como aceptadores para posteriores síntesis de GOS sino también como sustratos para la hidrólisis. La reacción de hidrólisis dominará generalmente en las últimas etapas de la reacción, cuando el pico de concentración de GOS ha pasado y la concentración de sustrato principal lactosa en la mezcla de reacción ha descendido a un valor bajo. Por otro lado, puede ocurrir también inhibición de la producción, cuando se acumulan más y más productos, dando como resultado la inhibición de síntesis de GOS o hidrólisis de GOS.

En la técnica se conocen diferentes factores para aumentar el rendimiento de síntesis de GOS a partir de lactosa usando β -galactosidasa. Véase Torres et al., para una revisión de la producción, las propiedades y las aplicaciones de GOS. Las condiciones de reacción para la transgalactosilación deberían ser elevada concentración de lactosa, elevada temperatura y baja actividad de agua en el medio de reacción. La temperatura, concentración del sustrato y origen de la enzima juegan un papel importante en la síntesis enzimática de oligosacáridos. Sin embargo, la influencia de la concentración inicial de lactosa puede ser mucho mayor. Respecto al uso de solución altamente concentrada de lactosa inicial, se ha mostrado que el máximo rendimiento de GOS está fuertemente influenciado por la concentración inicial de lactosa principalmente, hasta que el intervalo de concentración es 30% a 40% (p/v). En general, pueden producirse más y más grandes galactooligosacáridos (GOSs) con mayores concentraciones iniciales de lactosa. Dado que la solubilidad de la lactosa es relativamente baja a temperatura ambiente pero aumenta de manera manifiesta con el aumento de temperatura, en general se desean temperaturas elevadas.

Las temperaturas más altas pueden ser benéficas en mayores rendimientos de oligosacárido. El mayor rendimiento a temperaturas elevadas es una ventaja adicional, cuando se opera a elevadas concentraciones iniciales de lactosa y, en consecuencia, elevadas temperaturas. Por otro lado, los potenciales de beta-galactosidasa inmovilizada para la síntesis de GOS, por ejemplo reducción en la contribución de costo de la enzima mediante reciclaje eficiente, facilidad de manipulación y control de proceso, y habilitación de un proceso continuo, han sido ampliamente reconocidos. Sin embargo, aún no se ha reportado el uso industrial beta-galactosidasa inmovilizada, para la producción de GOS. En el ejemplo del estudio de Urretia et al., se mostró que la β -galactosidasa de *B. circulans* inmovilizada era reciclable, cuando se ejecutaba la reacción a 60°C en una solución de lactosa al 50% (p/p) usando una elevada dosificación de enzima (~18% de la lactosa (p/p)) bajo operación repetida en lote.

En consecuencia, en general se prefiere que la síntesis de GOS sea ejecutada usando enzima inmovilizada bajo condiciones con una elevada concentración inicial de lactosa, con objeto de lograr un elevado rendimiento de GOS y reducir la reacción lateral de hidrólisis [3,4,5].

Sin embargo, se ha hallado que los resultados obtenidos a partir de estudios de optimización ejecutados en un escenario de investigación, no siempre suministran un buen indicador para la síntesis de GOS a una escala industrial, por ejemplo en industrias de alimentos, en las que por razones económicas se usan típicamente concentraciones relativamente bajas de enzima (y/o un menor volumen de enzima inmovilizada) y largos (>20 horas) periodos de incubación, con objeto de lograr una elevada productividad y un elevado rendimiento espacio-tiempo. En particular, se observó que el uso de una solución altamente concentrada de lactosa (55% p/p) como lactosa alimentada para la síntesis de GOS a 60°C en una operación repetida en lote, dio como resultado una pérdida de aproximadamente 95% de la actividad LU inicial de la enzima inmovilizada, después del segundo ciclo de operación.

Por ello, se propone desarrollar condiciones mejoradas de reacción para la síntesis de GOS a una escala industrial, que permitan la reutilización repetida de enzima inmovilizada, mientras se retiene sustancialmente la actividad de la enzima y sin sacrificar un elevado rendimiento de GOS y una operación efectiva en costos.

Se halló de manera sorprendente que los objetivos anteriores podían ser alcanzados usando una pasta de lactosa cristalina, en lugar de una solución altamente concentrada de lactosa disuelta, como alimentación de lactosa. Más específicamente, 20% de la actividad inicial de LU de la enzima (medida como LU, como se define abajo) fue retenida después del tercer ciclo de reacción, cuando se incubó una pasta de lactosa de 55% p/p con enzima

5 inmovilizada a 58°C por 24 horas. El contenido final de GOS estuvo por encima de 60% (materia seca) durante los seis lotes iniciales. Sin querer estar atados a ninguna teoría, se especula que una solución convencional altamente concentrada de lactosa, preparada mediante disolución completa a elevada temperatura, debe ser considerada como una "solución "metastable"", que soportará recristalización a una menor temperatura de reacción durante prolongados periodos de incubación. Esto causa la formación de cristal de lactosa sobre la superficie y en los poros del vehículo de la enzima, conduciendo presumiblemente no sólo a una reducida accesibilidad sino también a la inactivación (desnaturalización) de la enzima inmovilizada. De modo sorprendente, esto puede evitarse usando una suspensión de lactosa "precrystalizada", en la que los cristales de lactosa funcionan como un conjunto sustrato y la lactosa disuelta puede acceder libremente a los poros de vehículo de enzima. Así, puede retardarse la desnaturalización de la enzima mediante el uso de lactosa "precrystalizada", sin necesidad de disolver completamente la lactosa mediante precalentamiento de la lactosa cristalizada a una temperatura más alta, dando como resultado así un proceso industrial sostenible.

15 De acuerdo con ello, la invención suministra un método para la preparación de galacto-oligosacáridos (GOS) a partir de lactosa, que comprende el contacto de una lactosa alimentada, con β -galactosidasa que esta inmovilizada, preferiblemente sobre un vehículo sólido, y permitiendo la síntesis de GOS, en la que dicha alimentación de lactosa es una pasta acuosa de lactosa cristalina.

20 Como se usa aquí, el término "pasta acuosa" se refiere a una mezcla (suspensión) en agua de cristales insolubles de lactosa, es decir una composición en la que no toda la lactosa está disuelta y en la que la concentración de lactosa soluble es igual a su solubilidad a una temperatura dada de reacción. Como se indicó anteriormente, la solubilidad de la lactosa es fuertemente dependiente de la temperatura. La figura 1 muestra la relación solubilidad-temperatura para lactosa en agua a pH neutro.

25 Típicamente, la pasta acuosa de lactosa para uso de la presente invención contiene 17%-75% (p/p) de lactosa. En la práctica, un elevado contenido de lactosa en la pasta puede dar como resultado un producto concentrado en el reactor, que requiere menos energía para concentrarse adicionalmente, para obtener el jarabe terminado de GOS de 75% (p/p). Por ello, tanto por razones económicas como por muy buen rendimiento de GOS, se prefiere que la pasta de lactosa contenga 50-70 % (p/p) de lactosa en total. Por ejemplo, la pasta acuosa de lactosa contiene por lo menos 53% (p/p), preferiblemente por lo menos 55% (p/p) de lactosa. Incrementando el contenido total de materia seca de la mezcla de reacción, sin sacrificar la estabilidad de la enzima, el método de la invención suministra una muy alta productividad y salida de GOS por volumen de reactor.

30 Se prepara fácilmente una pasta para uso en la presente invención, mediante adición de lactosa cristalina (monohidrato) a un líquido acuoso. La persona experta será capaz de calcular la concentración de lactosa necesaria para obtener una pasta a una temperatura dada, con base en la curva de solubilidad de lactosa. Por ejemplo, puede usarse la siguiente ecuación empírica para calcular la lactosa soluble a una temperatura (T) de reacción dada:

$$\text{Solubilidad de lactosa} = 0.003 * T^2 + 0.2713 * T + 9.778 .$$

35 De acuerdo con ello, se calculó que la solubilidad de lactosa a 58°C era 35.6% (p/p). Por ello, el porcentaje de cristales insolubles de lactosa será la concentración de lactosa menos la solubilidad de lactosa a 58°C. De esta forma, se calcula que el porcentaje de los cristales insolubles de lactosa presentes en el sistema de reacción es 19.4% (55% menos 35.6%) (p/p)

40 Típicamente, se añade una cantidad adecuada de lactosa directamente a una solución amortiguadora a temperatura ambiente, y se calienta hasta una temperatura deseada de reacción. También es posible añadir lactosa al agua, seguido por ajuste del pH de la pasta de lactosa hasta un intervalo de pH de trabajo de aproximadamente pH 3.5 - 7.5 que está dentro del intervalo de actividad de la enzima, por ejemplo mediante adición de soda cáustica (NaOH) o una solución amortiguadora.

45 La persona experta notará que el pH óptimo de beta-galactosidasa individual inmovilizada depende de su fuente y del tipo de métodos de inmovilización y que él puede descender durante la conversión enzimática. En consecuencia, el pH puede requerir ajuste durante la conversión enzimática, por ejemplo mediante adición gradual de una solución cáustica o vía un modo de pH estacionario.

50 Como se mencionó anteriormente, en contraste con los métodos convencionales que emplean soluciones altamente concentradas de lactosa, un método de la invención no requiere el calentamiento extensivo de lactosa para disolver completamente la lactosa. Esto no sólo reduce el consumo de energía y así los costos operacionales que están asociados con el paso de calentamiento, sino que también evita el indeseable cambio de color de la solución de lactosa hasta una apariencia más amarillenta.

Sin embargo, en la práctica podría desearse también disolver completamente la lactosa, con objeto de retirar los agregados insolubles de proteína o sales minerales insolubles, tales como fosfato de calcio o citrato de calcio que pueden estar presentes en los cristales de lactosa. Por ello, desde luego también es posible preparar una pasta de lactosa calentando una alimentación de lactosa a una temperatura (T^1) elevada para disolver la lactosa y retirar las partículas insolubles como se mencionó anteriormente y enfriar hasta la temperatura (T^2) deseada de reacción para dejar que la lactosa disuelta cristalice. Como se muestra aquí abajo, el calentamiento de una solución de lactosa completamente solubilizada de >58% (p/p) seguido por enfriamiento a una temperatura de aproximadamente 60°C dio como resultado una cristalización espontánea de lactosa.

La formación de buenos cristales y el crecimiento del cristal son críticos para la extracción y purificación de lactosa. La α -lactosa cristaliza desde soluciones sobresaturadas a temperatura por debajo de 93.5°C para producir una variedad de formas de cristal. Los cristales obtenidos recuerdan formas de prisma y de hacha india, y son duros y sólo ligeramente solubles. Por encima de 93.5°C, cristaliza β -lactosa, usualmente como un diamante de lados desiguales. Una molécula de agua está asociada con la forma cristalina α de lactosa y así es denominada como el monohidrato. Sin embargo, a temperaturas por encima de 120°C y bajo vacío, se pierde esta agua y se forma la α -lactosa anhidra altamente higroscópica. Cuando la lactosa se disuelve en agua ocurre la mutarrotación, es decir los anómeros α y β se convierten uno en otro para producir una solución de 62.7% de β -lactosa a 20°C. Como la α -lactosa es de lejos la especie menos soluble, la concentración de la solución da como resultado la precipitación de α -lactosa y tiene lugar mutarrotación adicional, para mantener la misma posición de equilibrio.

Un método de la invención comprende preferiblemente el uso de lactosa grado alimenticio o grado farmacéutico, o lactosa refinada que está entre la lactosa grado alimenticio y grado farmacéutico. La lactosa grado alimenticio es producida concentrando suero o permeado (un coproducto de la producción del concentrado de proteína de suero) hasta una solución sobresaturada y la lactosa cristaliza, luego retirando y secando los cristales de lactosa. Procesos especiales de cristalización, así como molienda y cernido fraccionado, producen tipos de lactosa que difieren en distribución de tamaño de partícula. Hoy, la industria ofrece varios grados tipos de lactosa que varía desde cristales superfinos hasta extra gruesos para todas las aplicaciones. El contenido de lactosa no es menor a 99%, con el contenido de cenizas sulfatadas no mayor a 0.3%, ambos sobre una base seca. El pH de una solución al 10% no es mayor a 4.5 o mayor a 7.5.

Para obtener un grado refinado o un grado farmacéutico de lactosa, es necesario el proceso de refinación. Este involucra la nueva disolución de los cristales de lactosa y el tratamiento de la solución con carbón activado virgen, el cual absorbe varios solutos incluyendo riboflavina y una variedad de proteínas. También se absorbe un grupo de polipéptidos conocidos como proteosa peptonas, que se derivan de la β -caseína. Estas peptonas son producidas por la acción de plasmina, una enzima proteasa que migra desde la corriente sanguínea hasta la leche en la ubre de la vaca. Puede absorberse proteína adicional sobre el carbón activado, mediante ajuste temporal del pH del licor. El carbón es retirado mediante floculación y filtración y luego descartado. Después de la cristalización, subsiguiente separación de los cristales mediante centrifugación y lavado con agua fría y secado, se obtiene una lactosa blanca grado farmacéutico de alta pureza. Los cristales son molidos o cernidos para dar productos con distribuciones específicas de tamaño de partícula.

Luego del contacto de la pasta de lactosa con una preparación que comprende beta-galactosidasa inmovilizada, la mezcla de reacción resultante es incubada bajo condiciones que favorecen la síntesis de GOS. La persona entrenada entenderá que la temperatura de reacción seleccionada debería favorecer tanto la síntesis de GOS como la estabilidad de la enzima. Por ello, la temperatura óptima es la temperatura a la cual la enzima inmovilizada puede ser reciclada de una manera económicamente óptima, por ejemplo, disponiendo la enzima inmovilizada cuando alcanza la semivida de la enzima inmovilizada en la beta-galactosidasa inmovilizada individual seleccionada. Típicamente, la síntesis de GOS es ejecutada a una temperatura de reacción que está entre aproximadamente 20 y aproximadamente 60°C. En una realización, la reacción es llevada a cabo a 40-60°C, preferiblemente 45-55°C, como a aproximadamente 50°C.

La mezcla de reacción es incubada hasta que se ha obtenido la cantidad deseada de GOS. Dependiendo de las condiciones de incubación y la cantidad de la enzima inmovilizada usada, en general se permite que la síntesis de GOS de acuerdo con la invención proceda de 0.5-100 horas. Sin embargo, generalmente la producción industrial de GOS requiere una integración racional con otras unidades de operación involucradas, tales como purificación, desmineralización, decoloración y similares. Así, por razones económicas y prácticas, la síntesis de GOS a una escala industrial es ejecutada preferiblemente durante un periodo de reacción de por lo menos 6 o 10 horas, preferiblemente 12-36 horas. Por ejemplo, debido al elevado rendimiento de GOS y aumento en la estabilidad de la enzima, un método de la invención es practicado de manera adecuada usando un tiempo de incubación de aproximadamente 18-24 horas. Esto permite la acomodación flexible en un día de trabajo del empleado, mientras al mismo tiempo obvia la necesidad por elevadas cantidades de enzima, porque una gran cantidad de enzima inmovilizada en el reactor reducirá la productividad y rendimiento espacio-tiempo.

Por ejemplo, la dosificación de la beta-galactosidasa inmovilizada puede ser usada en una cantidad de hasta 30 LU /gramo de lactosa inicial, preferiblemente hasta 25 LU/gramo, más preferiblemente en una cantidad de aproximadamente entre 10 y 20 LU/gramo. Como se usa aquí, una unidad de lactasa (LU) está definida como la

5 Cuando la lactosa es hidrolizada por lactasa, es convertida en glucosa y galactosa. La actividad de lactasa es determinada midiendo la cantidad de glucosa liberada.

Existen varias maneras para ejecutar la síntesis de GOS usando una reacción de "pasta" de lactosa, como se divulga en el presente documento. En una primera realización, la pasta es colocada en un reactor separado y los cristales insolubles de lactosa son retenidos mediante un microfiltro. Entonces, la lactosa soluble es bombeada a un

10 reactor de lecho empacado (PBR) donde está localizada la betagalactosidasa inmovilizada. La salida del PBR es devuelta al reactor. De este modo, después de cierto tiempo, la lactosa será disuelta completamente y podrán obtenerse elevadas concentraciones de GOS.

En una segunda realización, los cristales de lactosa son añadidos gradualmente a la solución de GOS. Se disuelve la lactosa y es bombeada al PBR y la lactosa disuelta será convertida en GOS.

15 En una tercera realización, no todos los cristales insolubles de lactosa son añadidos de una vez, tal que no se encuentra dificultad en la agitación de la mezcla de reacción. Por ejemplo, los cristales de lactosa son añadidos directamente a una mezcla de reacción existente, para reponer los cristales de lactosa presentes inicialmente, que se han disuelto y han sido convertidos completamente en GOS. Mediante la detección visual de desaparición/disolución de cristales de lactosa a medida que ocurre la reacción, pueden añadirse más cristales de

20 lactosa para continuar la reacción hasta que pueda obtenerse una solución alta en GOS, por ejemplo hasta 75%.

Como se entenderá, puede practicarse un método de la invención usando beta-galactosidasa de una amplia variedad de fuentes, tales como microorganismos, plantas y animales. Los microorganismos como bacterias, hongos y levaduras son considerados las fuentes preferidas de beta-galactosidasa para aplicaciones industriales. Véase la referencia Panesar 2010 para un resumen de las fuentes microbianas adecuadas. Preferiblemente, la

25 beta-galactosidasa es aislada de un microorganismo seleccionado de entre el grupo consistente en *A. oryzae*, *A. niger*, *B. circulans*, *S. singularis*, *T. aquaticus*, *K. lactis*, *K. marxianus* y *E. coli*. Algunas de las enzimas tienen elevada especificidad para sintetizar oligosacáridos de longitud de cadena y orientación del enlace específicas. Por ejemplo, la β -galactosidasa proveniente de *B. circulans* muestra elevada especificidad a los enlaces β -1,4 y a su vez rinde principalmente galactosil oligosacáridos (GOS) con enlace β -1,4 mediante transglicosilación, mientras la

30 β -galactosidasa proveniente de *Aspergillus oryzae* da principalmente GOS β -1,6. Se obtuvieron muy buenos resultados con beta-galactosidasa de *B. circulans*, que está disponible de Daiwa Kasei, Amano, Japón en la forma de la preparación comercial de enzima, Biolacta@N5.

Un método de la invención se caracteriza por la incorporación de una pasta de lactosa con la beta-galactosidasa inmovilizada. En la técnica se conocen diferentes formas de inmovilización de enzima. Ellas comprenden

35 típicamente un vehículo poroso sobre el cual se inmoviliza la beta-galactosidasa mediante enlace covalente, por absorción física (interacciones carga-carga o van der Waals), a través de encapsulación en gel o una combinación de ellas. La tabla 2 de referencia Panesar 2010 da un vistazo de las diferentes fuentes de beta-galactosidasa y métodos de inmovilización. Además pueden aplicarse [6,7] también las enzimas inmovilizadas libres de vehículo, tales como CLEC (cristales de enzima entrecruzada) o CLEAs (agregados de enzima entrecruzada).

40 La invención no está limitada a ningún tipo de inmovilización de enzima. Sin embargo, respecto a la facilidad de operación y ausencia de fuga de las moléculas de enzima hacia la mezcla de reacción, se prefieren vehículos que pueden promover el enlace covalente directo de la enzima.

Como se muestra aquí posteriormente, se obtuvieron buenos resultados con beta-galactosidasa inmovilizada mediante enlace covalente a un vehículo sólido. Preferiblemente, el vehículo sólido es un polímero acrílico activado,

45 preferiblemente una matriz de polimetacrilato funcionalizada. Por ejemplo, puede usarse una matriz de polimetacrilato funcionalizada con hexametilenamino (Sepabeads) o una resina macroporosa acrílica activada con epoxi, como Eupergit C 250L.

Una vez la reacción ha ocurrido hasta un nivel deseado, puede finalizarse la síntesis de GOS mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la beta-galactosidasa inmovilizada es separada físicamente del resto de la

50 mezcla de reacción, mediante filtración o por retención de las partículas de las enzimas inmovilizadas, mediante una criba instalada en el fondo del reactor.

Como se explica aquí posteriormente, un método de la invención es usado de manera ventajosa en un sistema de operación repetida en lote, que involucra varios lotes consecutivos ("ciclos") de síntesis de GOS. Además, un método de la invención permite reciclar la enzima inmovilizada, durante varios lotes puesto que se evitan los efectos

55 perjudiciales de cristalización de lactosa durante la reacción de síntesis de GOS, mediante el uso de una pasta de

lactosa como alimentación de lactosa. Esto hace posible la operación semicontinua y reutilización múltiple de la enzima.

De acuerdo con ello, en una realización un método comprende además, a continuación de un primer ciclo de síntesis de GOS, los pasos de: (a) lavado de la beta-galactosidasa inmovilizada, (b) almacenamiento opcional de la beta-galactosidasa inmovilizada lavada hasta un uso posterior; y (c) uno o más ciclos subsiguientes de síntesis de GOS mediante el contacto de la betagalactosidasa inmovilizada lavada del paso (a) con una pasta de lactosa, tal que se recicla la enzima.

Antes del lavado de la enzima, típicamente es separada físicamente de la mezcla de reacción que contiene GOS. Por ejemplo, si la enzima utilizada para la síntesis de GOS es usada en una bolsa similar a "bolsa de té", la bolsa de té puede ser simplemente retirada de la mezcla de reacción. De modo alternativo, puede retirarse el GOS del reactor, mientras la enzima inmovilizada permanece en el reactor durante el lavado.

Por ejemplo, se lava varias veces la enzima con agua desmineralizada y o con el mismo amortiguador usado en la reacción de síntesis de GOS. La enzima inmovilizada puede ser desinfectada por ejemplo para reducir el recuento microbiano, lavando con una solución de ácido acético de pH aproximado de 4.5. La enzima puede ser almacenada en un amortiguador a temperatura por debajo de 10°C, preferiblemente aproximadamente a 4°C. Los amortiguadores adecuados incluyen aquellos en el intervalo de pH 5.5-7.5. Por ejemplo, la enzima es almacenada en amortiguador K₂HPO₄ / KH₂PO₄ 0.1M, pH 6.0 - 7.0 a 4°C, antes de su nuevo uso. En una realización, un método de la invención comprende por lo menos 5, preferiblemente por lo menos 8, más preferiblemente por lo menos 10 ciclos de síntesis de GOS que emplean beta-galactosidasa inmovilizada reciclada.

En un aspecto adicional, la invención suministra una composición que comprende una pasta acuosa de lactosa cristalina y que comprende beta-galactosidasa que esta inmovilizada sobre un vehículo sólido. Anteriormente se divulgaron las concentraciones preferidas de lactosa, fuentes de enzima y concentraciones de enzima.

Leyenda de las figuras

Figura 1: curva de solubilidad de lactosa y temperatura.

Figura 2: comparación de retención de actividad de síntesis de GOS catalizada por beta-galactosidasa inmovilizada en EC-HA usando una pasta de lactosa (■) o una solución de lactosa (◆) como alimentación de lactosa.

Sección experimental

Los ejemplos aquí abajo ejemplifican los efectos ventajosos del uso de una pasta de lactosa, en lugar de una solución altamente concentrada de lactosa, en la fabricación de GOS usando beta-galactosidasa inmovilizada.

Ejemplo 1 (ejemplo comparativo): síntesis de GOS con β-galactosidasa de *Bacillus circulans* inmovilizada usando una solución de lactosa (55%)

Condiciones experimentales:

Se añadieron 35 gramos de lactosa a 25 gramos de amortiguador de K₂HPO₄ / KH₂PO₄ 0,1M, pH 6.3 y se disolvió completamente a 95°C, luego se enfrió a 58°C. Después de ello, se añadieron 2.7 gramos de enzima inmovilizada unida a un vehículo, sobre vehículo comercial (Sepabeads EC-HA) vía acoplamiento con glutaraldeído, con una actividad específica de 131.16 LU/gramo de enzima inmovilizada, para iniciar la reacción enzimática. La dosificación de enzima es 10.2 LU/gramo de lactosa.

Después de un tiempo de reacción de 24 horas, se filtró el GOS y se lavó la enzima inmovilizada, con agua desmineralizada y se almacenó en amortiguador K₂HPO₄ / KH₂PO₄ 0,1M, pH 6.0 - 7.0 a 4 °C, antes del nuevo uso.

Se analizaron los carbohidratos (galactosa, glucosa, lactosa y GOS) como se describió previamente por Coulier et al. (J. Agric. Food Chem. 2009, 57, 8488-8495) y Warmerdam et al. (Appl Biochem Biotechnol (2013) 170:340-358).

En la tabla 1 se resumen la actividad remanente de enzima y el rendimiento de GOS después del primer lote y segundo lote. De modo notable, la actividad remanente de la enzima inmovilizada fue sólo 5.4% de la actividad inicial LU, sugiriendo que la enzima inmovilizada se desnaturalizó rápidamente.

Tabla 1 Un resumen de la síntesis de GOS usando beta-galactosidasa inmovilizada en una solución de lactosa completamente solubilizada.

Enzima inmovilizada/número	Tiempo [h]	Composición de GOS y azúcar [% en base seca]	Retención de actividad después de
----------------------------	------------	--	-----------------------------------

ES 2 641 498 T3

de lote						cada lote [%]
		Galactosa	Glucosa	Lactosa	GOS	
						100
EC-HA – lote 1	24	2.86	23.71	16.02	57.41	26.1
EC-HA – lote 2	24	1.39	21.27	28.13	49.21	5.4

Ejemplo 2: síntesis de GOS con β -galactosidasa de *Bacillus circulans* inmovilizada en un sistema de reacción de pasta de lactosa (55% p/p) de la invención.

Condiciones experimentales:

- 5 Se añadieron 70 gramos de lactosa directamente a 51 gramos de amortiguador de K_2HPO_4 / KH_2PO_4 0,1M, pH 6. y a continuación se calentó la mezcla de reacción a la temperatura de reacción de 58°C (y se mantuvo por lo menos 1 hora) y se añadieron 12 gramos de enzima inmovilizada unida a un vehículo, sobre vehículo comercial (Sepabeads EC-HA) vía acoplamiento con glutaraldeído, con una actividad específica de 141.8 LU/gramo de enzima inmovilizada, para iniciar la reacción enzimática. La dosificación de enzima es 15.2 LU/gramo de lactosa.
- 10 Después de un tiempo de reacción de 24 horas, se filtró el GOS y se lavó la enzima inmovilizada, con agua desmineralizada y se almacenó en amortiguador K_2HPO_4 / KH_2PO_4 0,1M, pH 6.0 - 7.0 solución a 4 °C, antes del nuevo uso.

Tabla 2 Un resumen de la síntesis de GOS con β -galactosidasa inmovilizada de *Bacillus circulans* en pasta de lactosa (55 % p/p) en un modo consecutivo

Enzima inmovilizada/número de lote	Tiempo [h]	Composición de GOS y azúcar [% en base seca]				Retención de actividad LU después de lote [%]
		Galactosa	Glucosa	Lactosa	GOS	
						100
Lote 1	24	3.77	22.00	4.11	69.00	57.3
Lote 2	24	5.31	24.46	3.44	65.38	30.1
Lote 3	24	1.74	20.87	9.53	66.94	19.6
Lote 4	24	1.28	18.88	12.03	67.03	11.7
Lote 5	24	0.99	18.76	17.90	61.59	10.6
Lote 6	24	0.74	18.16	25.77	54.59	7.3
Lote 7	24	0.68	16.14	29.21	53.16	7.0
Lote 8	24	0.65	16.54	32.63	48.93	3.8

- 15 Ejemplo 3 (ejemplo comparativo): síntesis de GOS con β -galactosidasa libre, de *Bacillus circulans* usando un sistema de reacción de pasta lactosa (65%, p/p).

Condiciones experimentales:

- 20 Se añadieron 85 gramos de lactosa directamente a 65 gramos de amortiguador de K_2HPO_4 / KH_2PO_4 0,1M, pH 6. y a continuación se calentó la mezcla de reacción a la temperatura de reacción de 58°C (y se mantuvo por lo menos 1 hora) y se añadieron 85 mg de betagalactosidasa libre de Biolacta N5 (Amano) disueltos en 2 ml de agua desmineralizada, para iniciar la reacción. La dosificación de enzima fue 5 LU/gramo de lactosa.

Se incubó la mezcla de reacción en un baño de agua con agitador orbital. Después de reacción por 24 horas, el contenido de GOS en la mezcla final de reacción era sólo 40% y había aún bastante lactosa insoluble que quedaba en la mezcla de reacción. Esto sugiere que en un sistema de pasta con una concentración tan alta de lactosa, la enzima libre era menos activa que la enzima inmovilizada.

- 5 Ejemplo 4: Síntesis de GOS con β -galactosidasa inmovilizada, de *Bacillus circulans* (vehículo de epoxi Eupergit C 250 L) en sistema de reacción de pasta de lactosa (65%, p/p)

Se añadieron 8 gramos de β -galactosidasa inmovilizada, de Biolacta N5 sobre Eupergit C 250 L a 200 gramos de pasta de lactosa, con amortiguador de citrato de potasio 20 mM, pH7.0 y se incubó a 60°C. Se agitó la mezcla de reacción con un agitador magnético. La dosificación de enzima fue 7 LU/gramo de lactosa.

- 10 Después de 24 horas, se encontró que la mezcla de reacción era completamente clara y el contenido de GOS era 57%.

Este resultado sugiere que una combinación de elevada concentración en la pasta y enzima inmovilizada es ideal para la síntesis de GOS es un proceso industrial; (i) no es necesario disolver completamente la lactosa, y (ii) menor consumo de energía para la concentración del producto final, cuando la concentración del producto del reactor es también cercana a la concentración del producto final (jarabe de GOS, 75% (p/p)).

- 15

Referencias

1. Rivero-Urgell M y Santamaria-Orleans A (2001) Oligosaccharides: application in infant food. *Early Human Development* 65 Suppl. S43-S52
- 20 2. Torres D, Goncalves M, Teixeira J, Rodrigues L: Galacto-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Compr Rev Food Sci, Food Safety* 2010, 9:438-454.
3. Urrutiaa P, Mateob C, Guisan JMWilson, Illanes LA (2013) Immobilization of *Bacillus circulans* β -galactosidase and its application in the synthesis of galacto-oligosaccharides under repeated-batch operation. *Biochemical Engineering Journal* 77:41- 48
- 25 4. Panesar PS, Panesar R, Singh RS, Kennedy JF y Kumar H (2006) Microbial production, immobilization and applications of β -D-galactosidase. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology J Chem Technol Biotechnol* 81:530-543
5. Grosova Z., Rosenberg M., Rebro M. (2008) Perspectives and applications of immobilised β -galactosidase in food industry - a review. *Czech J. Food Sci.*, 26: 1-14.
- 30 6. Gaur R, Pant H, Jain R, Khare SK: Galacto-oligosaccharides synthesis by immobilized β -galactosidase. *Food Chem.* 2006, 97, 426-430.
7. Cao L: Immobilized Enzymes. en *Comprehensive Biotechnology* (segunda edición) 2011, 2:461-476.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de galacto-oligosacáridos (GOS) a partir de lactosa, que comprende (i) el contacto de una alimentación de lactosa con beta-galactosidasa (EC 3.2.1.23) inmovilizada y (ii) permitir la síntesis de GOS, en el que dicha alimentación de lactosa es una pasta acuosa de lactosa cristalina.
- 5 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la pasta acuosa de lactosa contiene 17%-75% (p/p), preferiblemente 50-70% (p/p) de lactosa, preferiblemente lactosa grado alimenticio o grado farmacéutico.
3. Método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la pasta acuosa de lactosa contiene por lo menos 53% (p/p), preferiblemente por lo menos 55% (p/p) de lactosa.
- 10 4. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el pH de la pasta de lactosa es pH 3.5 - 7.5.
5. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se prepara una pasta de lactosa mediante calentamiento de una alimentación de lactosa a una temperatura (T1) alta, para disolver la lactosa y enfriamiento hasta la temperatura (T2) deseada de reacción, para permitir que la lactosa disuelta cristalice.
- 15 6. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la síntesis de GOS es ejecutada a una temperatura de reacción de entre 40 y 60°C.
7. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la síntesis de GOS es ejecutada durante un período de reacción de por lo menos 6 horas, preferiblemente 12-36 horas.
- 20 8. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha beta-galactosidasa inmovilizada es usada en una cantidad de hasta 30 LU / gramos de lactosa inicial, preferiblemente hasta 25 LU/gramo, más preferiblemente en una cantidad de entre aproximadamente 10 y 20 LU/gramo.
9. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicha beta-galactosidasa es aislada de un microorganismo seleccionado de entre el grupo consistente en *A. oryzae*, *A. niger*, *B. circulans*, *S. singularis*, *T. aquaticus*, *K. lactis*, *K. marxianus* y *E. coli*.
- 25 10. Método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicha beta-galactosidasa es beta-galactosidasa de *B. circulans*.
11. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se inmoviliza beta-galactosidasa sobre un vehículo sólido, preferiblemente un vehículo poroso, mediante enlace covalente, mediante una interacción carga-carga o mediante encapsulación en gel.
- 30 12. Método de acuerdo con la reivindicación 11, en el que se inmoviliza la beta-galactosidasa sobre un vehículo de polímero acrílico activado, preferiblemente una matriz de polimetacrilato funcionalizado, más preferiblemente una matriz de polimetacrilato funcionalizado con hexametilamina o una resina macroporosa acrílica activada con epoxi.
13. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además, luego de un primer ciclo de síntesis de GOS, los pasos de:
35 (a) lavar con agua y/o amortiguador la beta-galactosidasa inmovilizada,
(b) opcionalmente almacenar la beta-galactosidasa inmovilizada lavada hasta uso posterior; y
(c) por lo menos uno o más ciclos subsiguientes de síntesis de GOS mediante el contacto de la betagalactosidasa lavada inmovilizada del paso (a) con una pasta de lactosa, tal que se recicla la enzima inmovilizada.
- 40 14. Método de acuerdo con la reivindicación 13, que involucra por lo menos 5, preferiblemente por lo menos 8, más preferiblemente por lo menos 10 ciclos de síntesis de GOS que emplean beta-galactosidasa inmovilizada reciclada.
15. Una composición que comprende una pasta acuosa de lactosa cristalina y beta-galactosidasa inmovilizada.

Figura 1

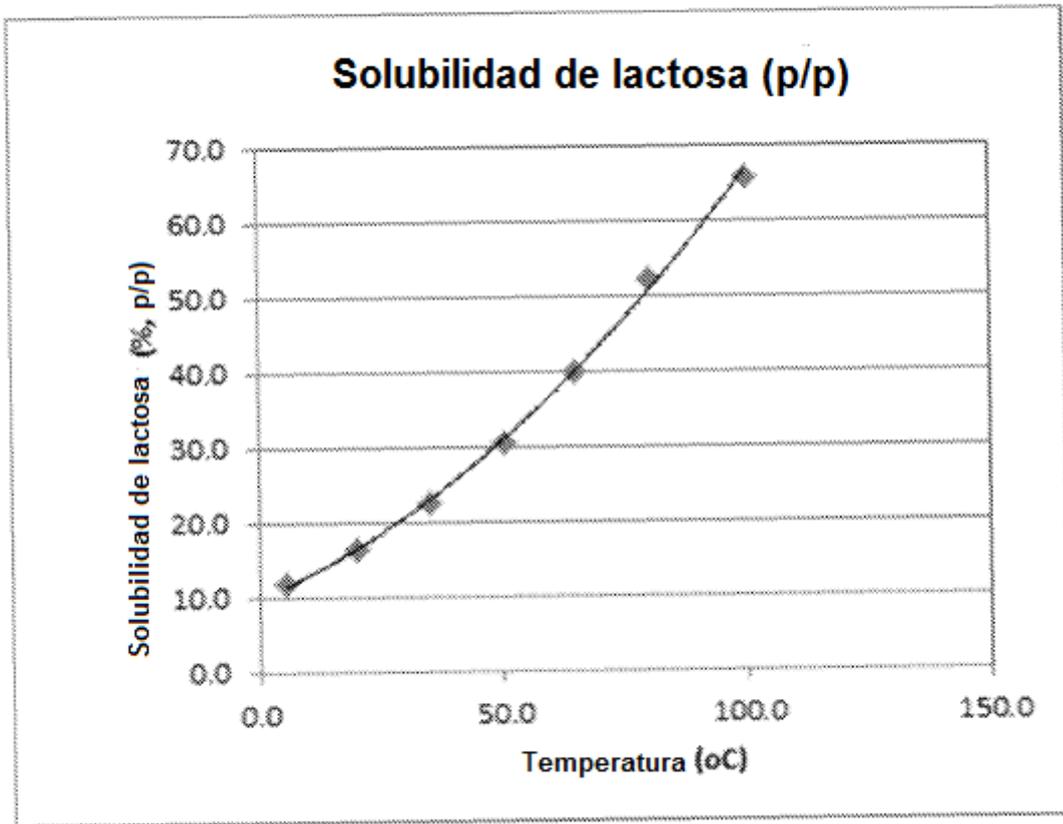


Figura 2

