



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 364 307**

② Número de solicitud: 201000200

⑤ Int. Cl.:  
**C12P 19/00** (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **19.02.2010**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **31.08.2011**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**31.08.2011**

⑦ Solicitante/s: **Universidade de Vigo  
Campus Universitario de Vigo, s/n  
36310 Vigo, Pontevedra, ES**

⑦ Inventor/es: **Parajó Liñares, Juan Carlos**

⑦ Agente: **No consta**

⑤ Título: **Procedimiento para la obtención de xilooligosacáridos sustituidos procedentes del salvado de trigo.**

⑤ Resumen:

Procedimiento para la obtención de xilooligosacáridos sustituidos procedentes del salvado de trigo.

Se reivindica un procedimiento para la obtención de xilooligosacáridos sustituidos procedentes del salvado de trigo, consistente en el tratamiento de esta materia prima con agua a temperatura suficientemente alta para permitir la solubilización de al menos parte de las hemicelulosas. Previamente a la etapa de reacción puede realizarse una etapa opcional impregnación acuosa en presencia de ultrasonidos. La etapa de solubilización de hemicelulosas puede ir precedida de otra etapa de tratamiento acuoso, que permita la solubilización de parte del almidón contenido en la materia prima. El procedimiento permite obtener licores conteniendo, entre otros compuestos, xilooligosacáridos sustituidos (para los que se reivindican propiedades prebióticas), oligosacáridos derivados del almidón y fenoles solubles (con capacidad antioxidante). Los sólidos tratados según el procedimiento (para los que se reivindican aplicaciones en la alimentación animal o humana) contienen, entre otros componentes, celulosa y proteínas.

ES 2 364 307 A1

**DESCRIPCIÓN**

Procedimiento para la obtención de xilooligosacáridos sustituidos procedentes del salvado de trigo.

**5 Sector de la técnica**

La invención plantea la aplicación de técnicas básicas de la Química y de la Ingeniería Química (reacción química, operaciones de concentración y separación) al desarrollo de un proceso para la obtención de productos con valor comercial a partir de salvado de trigo. Por las aplicaciones de los productos finales y por tratarse del desarrollo de un proceso químico, el objeto de esta patente también está relacionado con áreas de la técnica como la Tecnología de los Alimentos, Ingeniería de los Alimentos e Ingeniería de Procesos.

**Estado de la técnica**

Las industrias que producen harina de trigo obtienen como subproducto el salvado de trigo, que está formado por las cinco capas externas del grano: las tres capas que forman el pericarpio (cutícula, epicarpio y endocarpio), la testa y la aleurona. El salvado de trigo supone una fracción significativa del peso del grano (pudiendo exceder del 14% en términos de peso seco, según algunos datos bibliográficos), lo que supone que se comercializa en grandes cantidades. Una parte del salvado se emplea en la industria panificadora o se vende directamente como complemento alimentario, mientras que la mayor parte se destina a la alimentación animal (formando parte, por ejemplo, de piensos para cerdos, aves, ganado bovino, conejos y equinos).

Las industrias del sector están interesadas en dotar de valor añadido al salvado de trigo, lo que podría lograrse a través de procesos de fraccionamiento que conduzcan a productos de elevado valor de mercado.

Ese tipo de aplicación requiere el conocimiento previo de la composición del salvado de trigo. Existe información científica, técnica y comercial de acceso público sobre la composición del salvado, que confirma la presencia en el mismo de distintas fracciones de importancia e interés, entre las que se incluyen polisacáridos, lignina, proteína, lípidos, vitaminas y minerales. Entre ellas, los polisacáridos (y particularmente, las hemicelulosas) son de especial interés para los fines de esta invención.

De acuerdo con la bibliografía, los polisacáridos presentes en el salvado de trigo incluyen:

- a) Almidón, formado por unidades de  $\alpha$ -glucosa, que es susceptible a reacciones de hidrólisis por vía química (empleando ácidos como catalizadores) o enzimática, y que puede solubilizarse mediante fraccionamiento en medio acuoso (también conocido como tratamiento hidrotérmico o autohidrólisis).
- b) Hemicelulosas, formadas fundamentalmente por arabinoxilano (que integra unidades estructurales de xilosa y arabinosa) sustituido con grupos acetilo, con ácidos uránicos y con grupos fenólicos (resultantes de la esterificación con ácidos fenólicos, particularmente ácido ferúlico).
- c) Celulosa, formada por unidades de  $\beta$ -glucosa, cuya estructura le proporciona una mayor resistencia a la degradación hidrolítica que la que presentan los otros polisacáridos citados con anterioridad.

El almidón puede separarse fácilmente de las hemicelulosas y de la celulosa, aprovechando su alta susceptibilidad a reacciones de hidrólisis (catalizadas, por ejemplo, con ácidos o enzimas; o alternativamente, causada por tratamientos acuosos sin adición externa de reactivos diferentes del propio salvado y del agua, según la tecnología conocida como autohidrólisis o procesamiento hidrotérmico). Una hidrólisis selectiva del almidón presente en el salvado de trigo permite obtener un sólido tratado en el que permanecen los polisacáridos más resistentes a la reacción (hemicelulosas y celulosa).

A su vez, las hemicelulosas presentes en el salvado de trigo sin tratar o en el sólido obtenido al eliminar selectivamente el almidón presente en el salvado de trigo, pueden solubilizarse por medio de tratamientos químicos o enzimáticos. Desde el punto de vista de la composición, las hemicelulosas corresponden a polisacáridos sustituidos, entre los que el más importante es el xilano, constituido por unidades estructurales de xilosa unidas por enlaces  $\beta$  (1-4). En el caso del salvado de trigo, las unidades de xilosa que forman la cadena principal del xilano pueden estar sustituidas (por ejemplo, con arabinosa, compuestos fenólicos, ácidos uránicos, y grupos acetilo). Información genérica sobre la composición de las hemicelulosas aparece publicada en los siguientes trabajos: Ebringerová, A.; Heinze, T., Xylan and xylan derivatives - biopolymers with valuable properties. 1. Naturally occurring xylans: structures, isolation procedures and properties, *Macromol. Rapid Commun.* 2000, 21, 542-556; y Ebringerová, A.; Hromádková, Z.; Heinze, T., Hemicellulose, *Adv. Polym. Sci.* 2005, 186, 1-67. Los grupos sustituyentes de naturaleza fenólica presentes en el salvado de trigo se han estudiado, entre otros, en los siguientes trabajos: Zhou, K.; Parry, J. W.; Yu, L., Phenolic acid composition of wheat bran, *ACS Symposium Series* 2005, 909 (Phenolic Compounds in Foods and Natural Health Products), 10-18; Kim, K. H.; Tsao, R.; Yang, R.; Cui, S. W., Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions, *Food Chem.* 2006, 95(3), 466-473; Verma, B.; Hucl, P.; Chibbar, R. N., Phenolic acid composition and antioxidant capacity of acid and alkali hydrolysed wheat bran fractions, *Food Chem.* 2009, 116(4), 947-954.

Debido a la presencia de sustituyentes fenólicos presentes en las hemicelulosas del salvado de trigo, se ha propuesto a éste como materia prima para la producción de ácido ferúlico (el más abundante de los ácidos fenólicos que contiene), por ejemplo en el trabajo siguiente: Barberousse, H.; Kamoun, A.; Chaabouni, M.; Giet, J. M.; Roiseux, O.; Paquot, M.; Deroanne, C.; Blecker, C., Optimization of enzymatic extraction of ferulic acid from wheat bran, using response surface methodology, and characterization of the resulting fractions. J. Sci. Food Agric. 2009, 89(10), 1634-1641.

Al igual que sucede con otras materias primas de origen vegetal, en las que el xilano aparece como constituyente de las hemicelulosas, puede llevarse a cabo la hidrólisis parcial de éstas (por medio de tratamientos químicos o en medios catalizados con enzimas) para producir oligosacáridos. En el caso del salvado de trigo, los oligosacáridos mayoritarios derivados de las hemicelulosas presentan una cadena principal de xilosa (xilooligosacáridos) y pueden presentar sustituyentes, por ejemplo otros azúcares (particularmente, arabinosa), ácidos urónicos, grupos acetilo y ácidos fenólicos. Estos oligosacáridos se denominan “xilooligosacáridos sustituidos” (XOS) en adelante.

La bibliografía ha descrito la producción por vía enzimática de XOS con sustituyentes fenólicos, que les dotan de actividad antioxidante. Algunos ejemplos representativos son los trabajos siguientes: Wang, J.; Yuan, X.; Sun, B.; Tian, Y.; Cao, Y., Scavenging activity of enzymatic hydrolysates from wheat bran, Food Technol. Biotechnol. 2009, 47(1), 39-46; Manisseri, C.; Gudipati, M., Bioactive xylo-oligosaccharides from wheat bran soluble polysaccharides. LWT-Food Sci. Technol. 2010, 43(3), 421-430; Broekaert, W.; Courtin, C.; Delcour, J., (Arabino)xylan oligosaccharide prebiotic preparation, 2009, Patente Internacional WO 2009117790; Madhukumar, M. S.; Muralikrishna, G., Structural characterisation and determination of prebiotic activity of purified xylo-oligosaccharides obtained from Bengal gram husk (*Cicer arietinum* L.) and wheat bran (*Triticum aestivum*), Food Chem. 2010, 118(2), 215-223; Maalej-Achouri, I.; Guerfali, M.; Gargouri, A.; Belghith, H., Production of xylo-oligosaccharides from agro-industrial residues using immobilized *Talaromyces thermophilus* xylanase, J. Mol. Catal. B: Enzym. 2009, 59(1-3), 145-152. Además de capacidad antioxidante, se ha destacado la aplicación de los XOS producidos a partir de salvado de trigo por vía enzimática como agentes prebióticos, basados en su comportamiento como oligosacáridos no digeribles. Información complementaria sobre las propiedades prebióticas de los xilooligosacáridos como prebióticos puede encontrarse en los siguientes artículos: Vázquez, M. J.; Alonso, J. L.; Domínguez, H.; Parajó, J. C., Xylooligosaccharides. Manufacture and applications, Trends Food Sci. Technol. 2000, 11, 387-393; y Moure, A.; Gullón, P.; Domínguez, H.; Parajó, J. C., Advances in the manufacture, purification and applications of xylooligosaccharides as food additives and nutraceuticals, Proc. Biochem. 2006, 41, 1913-1923. Información específica sobre las propiedades prebióticas de XOS derivados de salvado de trigo por vía enzimática puede encontrarse en las siguientes fuentes: Manisseri, C.; Gudipati, M., Bioactive xylo-oligosaccharides from wheat bran soluble polysaccharides, LWT-Food Sci. Technol., 2010, 43(3), 421-430; Broekaert, W.; Courtin, C.; Delcour, J., (Arabino)xylan oligosaccharide prebiotic preparation, 2009, Patente Internacional WO 2009117790. La modulación de la microbiota intestinal por XOS derivados de salvado de trigo por vía enzimática ha servido de base a una patente en la que estos compuestos se aplican como agentes activos para la prevención y tratamiento de infecciones gastrointestinales, como por ejemplo se reivindica en la siguiente patente: Broekaert, W.; Delcour, J., (Arabino)xylan oligosaccharides useful against gastrointestinal infections, 2009, Patente Internacional WO 2009040445. En la información bibliográfica disponible no se recoge evidencia experimental de la posible actividad antioxidante ni prebiótica de los productos obtenidos por procesamiento hidrotérmico del salvado de trigo. Debido a su naturaleza no selectiva, el procesamiento hidrotérmico no conduce sólo a XOS, sino también a distintos productos adicionales (por ejemplo, monosacáridos, extractos, ácido acético, productos de reacción de la fracción proteica o derivados de la lignina), que puede ser necesario refinar (aplicando operaciones de separación convencionales) para aumentar la pureza de los XOS hasta el grado necesario para permitir aplicaciones de tipo alimentario.

#### Descripción detallada de la invención

El proceso considerado consiste en someter al salvado de trigo a una secuencia de etapas de procesamiento, según el Proceso 1 o el Proceso 2 que se describen a continuación.

El Proceso 1, destinado a la obtención de XOS en medios conteniendo cantidades significativas de oligosacáridos derivados del almidón, consta de: a) una etapa (opcional) de impregnación acuosa, en la que se pone en contacto salvado de trigo y agua, que puede llevarse a cabo en presencia de ultrasonidos, para obtener una suspensión apropiada para su posterior procesamiento; y b) una etapa de procesamiento hidrotérmico, en la que la suspensión anterior, o bien una mezcla de salvado de trigo y agua se someten a procesamiento hidrotérmico (calentamiento en un sistema presurizado) hasta solubilizar al menos parte del almidón y de las hemicelulosas, en condiciones adecuadas para que se generen a partir de éstas XOS con propiedades prebióticas y antioxidantes. El medio de reacción contiene también otros productos en disolución de carácter fenólico, procedentes de la hidrólisis de las hemicelulosas y/o de la lignina, con capacidad antioxidante. Los XOS y los compuestos con carácter antioxidante pueden concentrarse y/o separarse del medio aplicando Operaciones Básicas convencionales de la Ingeniería Química (tales como evaporación, atomización, liofilización, procesamiento con membranas, extracción, precipitación, adsorción, cambio iónico o cromatografía), y puede incluir una etapa de tratamiento con xilanasas (que actúen sobre los licores tal como se obtienen, o sobre productos resultantes del procesamiento fisicoquímico de los licores). El procesamiento hidrotérmico también da lugar a un sólido (la fracción no solubilizada del salvado de trigo), que contiene proteína y celulosa, que puede destinarse a aplicaciones en la alimentación animal o humana como suplemento proteico rico en fibra no digerible.

El Proceso 2, destinado a la obtención de XOS con bajo contenido en oligosacáridos derivados del almidón, consta de: a) una etapa (opcional) de impregnación acuosa, en la que se pone en contacto salvado de trigo y agua, que puede llevarse a cabo en presencia de ultrasonidos, para obtener una suspensión apropiada para su posterior procesamiento;

b) una etapa de procesamiento hidrotérmico en la que la suspensión anterior, o bien una mezcla de salvado de trigo y agua, se somete a calentamiento hasta solubilizar al menos parte del almidón presente en la materia prima, de modo que se evita la solubilización de cantidades importantes de hemicelulosas, y c) una segunda etapa de procesamiento hidrotérmico, en la que la fracción sólida resultante de la primera etapa de procesamiento hidrotérmico se trata en medio acuoso en un sistema presurizado para causar la disolución de al menos parte de las hemicelulosas, en condiciones adecuadas para que se generen XOS con propiedades prebióticas y antioxidantes a partir de éstas. Con este modo de proceder se limita la concentración de glucooligosacáridos derivados del almidón que acompañan a los XOS. Además, el medio de reacción procedente de la segunda etapa de tratamiento hidrotérmico contiene otros productos en disolución de carácter fenólico, resultantes de la hidrólisis de las hemicelulosas y de la lignina, con capacidad antioxidante. Como se comentó con anterioridad para el Proceso 1, los XOS y los compuestos con carácter antioxidante pueden concentrarse y/o separarse del medio por Operaciones Básicas convencionales de la Ingeniería Química (tales como evaporación, atomización, liofilización, procesamiento con membranas, precipitación, extracción, adsorción, cambio iónico y cromatografía), y puede incluir una etapa de tratamiento con xilanasas (que actúen sobre los licores tal como se obtienen, o sobre productos resultantes del procesamiento fisicoquímico de los licores). En la segunda etapa de procesamiento hidrotérmico se obtiene una fase sólida que contiene proteína y celulosa, que puede emplearse en la alimentación animal o humana como suplemento proteico rico en fibra no digestible.

Un posible modo de realización del Proceso 1 se describe a continuación en el Ejemplo 1.

#### 20 Ejemplo 1

Se adquirió un salvado de trigo comercial (distribuido por la empresa Santiveri), que se analizó por los procedimientos descritos en las referencias que se citan a continuación: para el análisis de sustituyentes fenólicos y cuantificación de fenoles libres se siguió el trabajo de Yuan, X.; Wang, J.; Yao, H., Production of feruloyl oligosaccharides from wheat bran insoluble dietary fibre by xylanases from *Bacillus subtilis*, Food Chem. 2006, 95(3), 484-492; para el análisis de fibras se siguió el procedimiento descrito en el artículo de Van Soest, P. J., Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. II. A rapid method for the determination of fiber and lignin, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1963, 46, 829-835; y para la caracterización de otros productos presentes en el medio de reacción se utilizaron los procedimientos descritos en el artículo de Vegas, R.; Alonso, J. L.; Domínguez, H.; Parajó, J. C., Processing of rice husk autohydrolysis liquors for obtaining food ingredients, J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 7311-7317. Los análisis arrojaron los resultados siguientes (expresados como porcentaje en peso de salvado de trigo seco al horno): glucano (incluyendo almidón y celulosa, medidos conjuntamente en función de la glucosa generada por hidrólisis ácida cuantitativa), 31.5%; xilano (medido en función de la xilosa generada por hidrólisis ácida cuantitativa), 15.3%; sustituyentes arabinosilo de hemicelulosas (medidos en función de la arabinosa generada por hidrólisis ácida cuantitativa), 8.5%; grupos acetilo unidos a hemicelulosas (medidos en función del ácido acético generado por hidrólisis ácida cuantitativa), 0.46%; sustituyentes uránicos en hemicelulosas (medidos espectrofotométricamente como ácido galacturónico), 2.2%; sustituyentes fenólicos presentes en hemicelulosas (medidos como ácido ferúlico, 0.5%); proteína (medida en función del contenido en nitrógeno), 19%; lignina ácido-detergente, 6.8%; cenizas, 6.4%. Además, el análisis de fibras (ácido-detergente y neutra-detergente) y de lignina ácido-detergente, permitió establecer que la celulosa suponía el 7% en peso del salvado, correspondiendo el resto del glucano a almidón. Otros componentes de la materia prima (como lípidos o extractos) no se determinaron, por no considerarse representativos para los fines de esta invención. Una muestra de salvado de trigo se mezcló con agua hasta alcanzar una relación líquido-sólido de 10 kg agua/kg salvado seco al horno. A la hora de calcular la cantidad de agua necesaria, se tuvo en cuenta como tal el contenido en humedad del salvado (medida por secado al horno a 105°C). La suspensión se calentó en un reactor presurizado Parr con control de agitación y temperatura, utilizando una manta calefactora externa, hasta alcanzar una temperatura de 185°C. Tras alcanzar esta temperatura, el reactor se enfrió hasta una temperatura cercana a la ambiente, y se separó el sólido del líquido. El peso de sólido seco al horno resultante del tratamiento hidrotérmico, medido tras lavar exhaustivamente, correspondió al 52% del peso seco al horno del salvado alimentado al reactor. Se analizó el sólido por los mismos métodos aplicados al salvado de trigo, confirmándose que la celulosa era el principal polisacárido presente. El análisis elemental del sólido confirmó la presencia de nitrógeno en el mismo, evidenciando con ello su contenido en proteína. La digestibilidad enzimática de la celulosa por celulasas se midió empleando el método descrito en el siguiente artículo: Vázquez, D.; Lage, M. A.; Parajó, J. C.; Alonso, J. L., Empirical assessment on the cellulase digestibility of processed *Eucalyptus* wood, Appl. Biochem. Biotechnol. 1992, 37, 123-129. Los ensayos experimentales se realizaron en las condiciones de severidad intermedias descritas en esta referencia. El análisis CLAR del medio de reacción tras 24 y 48 horas de hidrólisis (empleando el mismo procedimiento aplicado para la determinación de la composición del sólido tras hidrólisis ácida cuantitativa) demostró la presencia de glucosa, confirmando la susceptibilidad del sólido a la hidrólisis enzimática. Se analizaron los licores, por los procedimientos descritos en los artículos de Yuan y col. (2006), Van Soest (1963) y Vegas y col. (2004) citados con anterioridad. Los licores contenían agua, otros componentes volátiles (por ejemplo, ácido acético procedente de las hemicelulosas y aldehídos procedentes de deshidratación de azúcares) y componentes no volátiles. Desde el punto de vista de esta invención, el interés se centra en los componentes no volátiles (definidos como la fracción resultante del secado a estufa a 105°C hasta peso constante de muestras de licores). Se confirmó la presencia de los siguientes componentes no volátiles: monosacáridos (xilosa, en cantidad correspondiente a 1.0 g/100 g salvado seco al horno, y arabinosa en cantidad correspondiente a 2.4 g/100 g salvado seco al horno); fenoles en disolución (procedentes de las hemicelulosas y de la lignina, medidos como equivalente en ácido ferúlico), en concentración de 0.6 g/100 g salvado seco al horno); glucooligosacáridos (procedentes del almidón y/o de la celulosa, en cantidad de 25.0 g/100 g salvado seco al horno); XOS compuestos por unidades de xilosa (15.0 g/100 g salvado seco al horno), sustituyentes arabinosilo (en cantidad de 4.6 g/100 g salvado seco al horno), grupos acetilo (en cantidad de 0.15 g/100 g de salvado seco al horno), ácidos uránicos (en

cantidad de 0.85 kg/100 kg de salvado seco al horno), ácidos fenólicos esterificados (en cantidad equivalente a 0.5 g de ácido ferúlico/100 g salvado seco al horno) y otros componentes no volátiles de menor interés para los fines de este estudio. Para confirmar la actividad antioxidante de productos fenólicos no asociados a XOS presentes en la disolución, se realizó una extracción del medio de reacción con acetato de etilo y se procedió a determinar la actividad antioxidante siguiendo los procedimientos basados en la captación del radical  $\alpha$ - $\alpha$ -difeníl- $\beta$ -picrilhidracilo (DPPH) y capacidad equivalente medida en Trolox. Estos procedimientos se desarrollaron según se describe en el siguiente artículo: Moure, A.; Domínguez, H.; Parajó, J. C., Antioxidant activity of liquors from aqueous treatments of *Pinus radiata* wood, *Wood Sci. Technol.* 2005, 39, 129-139. La fracción soluble en acetato de etilo se aisló evaporando el disolvente, y se determinó su actividad antioxidante. Los resultados demostraron que las capacidades antioxidantes DPPH y Trolox de los productos aislados eran al menos un 20% superiores a las determinadas para cantidades equivalentes de ácido ferúlico patrón, confirmando la actividad antioxidante de los productos obtenidos. Para determinar las propiedades de los XOS, los licores de reacción se sometieron al proceso de purificación descrito en la referencia siguiente: Vegas, R.; Luque, S.; Alvarez, J. R.; Alonso, J. L.; Domínguez, H.; Parajó, J. C., Membrane-assisted processing of xylooligosaccharide-containing liquors, *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 5430-5436. La disolución resultante se liofilizó, para obtener un producto sólido refinado. Dicho producto refinado se sometió a la determinación de actividad antioxidante por los métodos DPPH y Trolox citados con anterioridad, encontrándose que la capacidad antioxidante ejercida por los XOS era siempre superior a las determinadas para cantidades de ácido ferúlico iguales a las esterificadas en los XOS, confirmando la actividad antioxidante de éstos. Este resultado confirma la capacidad antioxidante de los XOS obtenidos según el método que se reivindica en la presente invención. A fin de confirmar el carácter prebiótico de los XOS, el producto refinado descrito anteriormente se empleó como fuente de carbono para el cultivo de cepas de bacterias probióticas (*Bifidobacterium adolescentis* CECT 5781, equivalente a ATCC 15703; *Bifidobacterium longum* CECT 4503, equivalente a ATCC 15707; *Bifidobacterium infantis* CECT 4551, equivalente a ATCC 15697; y *Bifidobacterium breve* CECT 4839, correspondiente a ATCC 15700). Todas las cepas se obtuvieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT, Valencia, España). En condiciones de anaerobiosis, se elaboraron medios de cultivo conteniendo 5 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de peptona y 10 g/L del sólido liofilizado obtenido en el proceso. Se tomaron alícuotas de este medio, que se depositaron en tubos de cultivo herméticos antes de su esterilización en autoclave. Posteriormente, se inocularon con las bacterias anteriormente citadas y se incubaron a 37°C sin agitación. Al cabo de 12 y 24 horas se realizaron recuentos de células al microscopio, que confirmaron la susceptibilidad de las fuentes de carbono empleadas para el crecimiento celular. En una nueva serie de experimentos, se llevaron a cabo fermentaciones utilizando las mismas condiciones de cultivo que las descritas anteriormente, pero empleando como inóculo heces fecales humanas. Al cabo de 48 y 72 horas de incubación se procedió al análisis de las muestras por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia, siguiendo los procedimientos descritos en el siguiente artículo: Gullón, P.; Moura, P.; Esteves, M. P.; Girio, F.; Domínguez, H.; Parajó, J. C., Assessment on the fermentability of xylooligosaccharides from rice husks by probiotic bacteria, *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, 7482-7487. Los datos revelaron el consumo completo de oligosacáridos en 72 horas, y la generación de ácidos grasos de cadena corta. Estos resultados confirman el poder prebiótico de los XOS obtenidos según el proceso propuesto.

Un posible modo de realización del Proceso 2 se describe a continuación en el Ejemplo 2.

#### Ejemplo 2

Se partió del mismo salvado de trigo comercial descrito en el Ejemplo 1. Una muestra de salvado de trigo se mezcló con agua hasta alcanzar una relación líquido-sólido de 10 kg agua/kg salvado seco al horno. A la hora de calcular la cantidad de agua necesaria, se contabilizó como agua el contenido en humedad del salvado (medida por secado al horno a 105°C). La suspensión se calentó en un reactor presurizado Parr con control de agitación y temperatura, utilizando una manta calefactora externa, hasta alcanzar una temperatura de 100°C, que se mantuvo durante 1 h. Tras este período, el reactor se enfrió hasta una temperatura cercana a la ambiente, y se separó el sólido del líquido. El peso de sólido seco al horno resultante de esta primera etapa de tratamiento hidrotérmico, medido tras lavar exhaustivamente, correspondió al 62% del peso seco al horno del salvado alimentado al reactor. Se analizaron los licores, por los procedimientos descritos en el Ejemplo 1. Los licores contenían agua, otros componentes volátiles de menor importancia para los fines de este estudio y componentes no volátiles. Éstos incluían monosacáridos (glucosa, en cantidad correspondiente a 0.42 g/100 g salvado seco al horno, y xilosa en cantidad correspondiente a 0.42 g/100 g salvado seco al horno); fenoles en disolución (medidos como equivalentes en ácido ferúlico), en concentración de 0.2 g/100 g salvado seco al horno); glucooligosacáridos (procedentes del almidón y/o de la celulosa, en cantidad de 22.0 g/100 g salvado seco al horno); XOS compuestos por unidades de xilosa (2.7 g/100 g salvado seco al horno) y sustituyentes arabinosilo (en cantidad de 0.53 g/100 g salvado seco al horno). No se detectaron cantidades significativas de grupos acetilo o de ácidos urónicos unidos a los XOS. La alta concentración de glucooligosacáridos (derivados del almidón) y las bajas concentraciones de monosacáridos (particularmente, de xilosa) confirman la capacidad de este primer tratamiento hidrotérmico para lograr una solubilización selectiva del almidón (a través de su conversión en glucooligosacáridos solubles). Los sólidos resultantes de la primera etapa hidrotérmica se lavaron con agua, se mezclaron con agua (en la misma proporción que en la primera etapa) y se calentaron en el mismo sistema de reacción empleado con anterioridad hasta alcanzar una temperatura máxima de 155°C, que se mantuvo durante 1 h. La fase sólida resultante de la segunda etapa de procesamiento hidrotérmico se lavó con agua y se analizó por los mismos métodos aplicados al salvado de trigo, confirmando que la celulosa era el principal polisacárido presente. El análisis elemental del sólido confirmó la presencia de nitrógeno en el mismo, evidenciando con ello su contenido en proteína. La digestibilidad enzimática de la celulosa por celulasas se confirmó por el mismo método descrito en el Ejemplo 1. La presencia de glucosa en los medios de hidrólisis confirmó la susceptibilidad del sólido a la hidrólisis enzimática. Los licores obtenidos en la

## ES 2 364 307 A1

segunda etapa de procesamiento hidrotérmico se analizaron empleando los métodos citados en el Ejemplo 1. Para mayor simplicidad y para facilitar la comparación de los datos con los correspondientes al Ejemplo 1, los resultados del Ejemplo 2 se expresan también empleando como base de cálculo el salvado sin tratar. El estudio de composición de los licores arrojó los siguientes componentes y contenidos: monosacáridos (xilosa, en cantidad correspondiente a 0.3 g/100 g salvado seco al horno, y arabinosa en cantidad correspondiente a 2.7 g/100 g salvado seco al horno); fenoles en disolución (medidos como equivalentes en ácido ferúlico), en concentración de 0.5 g/100 g salvado seco al horno); glucooligosacáridos (procedentes del almidón y/o de la celulosa, en cantidad de 8 g/100 g salvado seco al horno); XOS compuestos por unidades de xilosa (15.4 g/100 g salvado seco al horno), sustituyentes arabinosilo (en cantidad de 5.2 g/100 g salvado seco al horno), grupos acetilo (en cantidad de 0.28 g/100 g de salvado seco al horno), ácidos uránicos (en cantidad de 1 g/100 g de salvado seco al horno), ácidos fenólicos esterificados (en cantidad de 0.3 g/100 g salvado seco al horno) y otros componentes no volátiles de menor interés para los fines de este estudio. La actividad antioxidante de productos fenólicos no asociados a XOS se confirmó por los mismos métodos empleados en el Ejemplo 1, alcanzándose resultados estrechamente relacionados con los recogidos en el mismo. Para determinar las propiedades de los XOS, los licores de reacción procedentes de la segunda etapa de tratamiento hidrotérmico se sometieron al mismo proceso de purificación descrito en el Ejemplo 1, y la disolución resultante se liofilizó, para obtener un producto sólido refinado. Dicho producto refinado se sometió a determinación de actividad antioxidante por los mismos procedimientos señalados en el Ejemplo 1, alcanzándose resultados estrechamente relacionados con los encontrados en éste. Este resultado confirma las propiedades antioxidantes de la fracción aislada. A fin de confirmar el carácter prebiótico de los XOS obtenidos en las condiciones expuestas en este ejemplo, el producto refinado obtenido se empleó como fuente de carbono para el cultivo de las mismas cepas de bacterias probióticas señaladas en el Ejemplo 1, que se cultivaron en condiciones de anaerobiosis en la mismas condiciones descritas en el Ejemplo 1. Al cabo de 12 y 24 horas se realizaron recuentos de células al microscopio, que confirmaron la susceptibilidad del producto refinado obtenido en las condiciones de este Ejemplo como fuente de carbono para el crecimiento celular. En una nueva serie de experimentos, se llevaron a cabo fermentaciones utilizando las mismas condiciones de cultivo que las descritas anteriormente, pero empleando como inóculo heces fecales humanas. El análisis por el método CLAR descrito en la referencia Gullón y col. (2008) de muestras cultivadas durante 48 y 72 horas revelaron el consumo completo de oligosacáridos en 72 horas, y la generación de ácidos grasos de cadena corta. Estos resultados confirman el poder prebiótico de los XOS obtenidos en las condiciones del Ejemplo 2.

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Un procedimiento para la obtención de xilooligosacáridos sustituidos procedentes del salvado de trigo que consiste en:

- 10 a) Mezclar el salvado de trigo y el agua.
- b) Realización opcional de una impregnación acuosa en presencia de ultrasonidos del producto obtenido en la etapa anterior.
- 15 c) Procesamiento hidrotérmico del producto obtenido en la etapa anterior hasta su solubilización parcial para la generación de xilooligosacáridos sustituidos.

20 2. Procedimiento según la reivindicación 1 donde en la etapa c) se realiza una solubilización de al menos parte del almidón y de las hemicelulosas para obtener xilooligosacáridos sustituidos y oligosacáridos derivados del almidón.

25 3. Procedimiento según la reivindicación 1 donde en la etapa c) se realiza una solubilización parcial de al menos parte del almidón evitando la solubilización de cantidades importantes de hemicelulosas, y posteriormente se realiza una etapa d) consistente en el procesamiento hidrotérmico de la fracción sólida resultante de la etapa anterior hasta la solubilización de al menos parte de las hemicelulosas para la generación de xilooligosacáridos sustituidos.

30 4. Uso de los xilooligosacáridos sustituidos obtenidos según el procedimiento de la reivindicación 2 como ingredientes prebióticos para la alimentación animal o humana.

35 5. Uso de los xilooligosacáridos sustituidos obtenidos según el procedimiento de la reivindicación 3 para alimentación animal o humana.

40 6. Uso de los compuestos libres de carácter fenólico presentes en los licores de procesamiento hidrotérmico obtenidos según el procedimiento de la reivindicación 2 como antioxidantes en alimentación o cosméticos.

45 7. Uso de los compuestos libres de carácter fenólico presentes en los licores de procesamiento hidrotérmico obtenidos en la etapa d) según el procedimiento de la reivindicación 3 como antioxidantes en alimentación o cosméticos.

50 8. Uso de los xilooligosacáridos sustituidos obtenidos según el procedimiento de la reivindicación 2 como antioxidantes para alimentación animal o humana.

55 9. Uso de los xilooligosacáridos sustituidos obtenidos según el procedimiento de la reivindicación 3 como antioxidantes para alimentación animal o humana.

60 10. Uso de los sólidos resultantes del procesamiento hidrotérmico según el procedimiento de la reivindicación 2 para alimentación animal o humana.

65 11. Uso de los sólidos resultantes del procesamiento hidrotérmico obtenidos en la etapa d) según el procedimiento de la reivindicación 3 para alimentación animal o humana.



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201000200

②② Fecha de presentación de la solicitud: 19.02.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12P19/00** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	KABEL M.A., et al. Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylo-oligosaccharides. 2002. <i>Carbohydrate Polymers</i> . Vol. 50, páginas 47-56, página 48.	1,2
A	MADHUKUMAR M.S., et al. Structural characterization and determination of prebiotic activity of purified xylo-oligosaccharides obtained from Bengal gram husk ( <i>Cicer arietinum</i> L.) and wheat bran ( <i>Triticum aestivum</i> ). 15.01.2010. <i>Food Chemistry</i> . Vol. 118, páginas 215-223.	1-11
A	CARVALHEIRO F., et al. Wheat straw autohydrolysis: Process optimization and products characterization. 2009. <i>Appl. Biochem. Biotechnol.</i> Vol. 153, páginas 84-93.	1-11
A	PARAJÓ J.C., et al. Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials. 2004. <i>Trends in Food Science &amp; Technology</i> . Vol. 15, páginas 115-120.	1-11
A	MOURE A., et al. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. 2006. <i>Process Biochemistry</i> . Vol. 41, páginas 1913-1923.	1-11

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  
29.07.2011

Examinador  
I. Rueda Molins

Página  
1/4



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

C12P

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXT

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 29.07.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 3-11	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1,2	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 3-11	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1,2	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como 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	KABEL M.A., et al. Hydrothermally treated xylan rich by-products yield different classes of xylo-oligosaccharides. <i>Carbohydrate Polymers</i> . Vol. 50, páginas 47-56, página 48.	2002
D02	MADHUKUMAR M.S., et al. Structural characterization and determination of prebiotic activity of purified xylo-oligosaccharides obtained from Bengal gram husk ( <i>Cicer arietinum</i> L.) and wheat bran ( <i>Triticum aestivum</i> ). <i>Food Chemistry</i> . Vol. 118, páginas 215-223.	15.01.2010
D03	CARVALHEIRO F., et al. Wheat straw autohydrolysis: Process optimization and products characterization. <i>Appl. Biochem. Biotechnol.</i> Vol. 153, páginas 84-93.	2009
D04	PARAJÓ J.C., et al. Production of xylooligosaccharides by autohydrolysis of lignocellulosic materials. <i>Trends in Food Science &amp; Technology</i> . Vol. 15, páginas 115-120.	2004
D05	MOURE A., et al. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals.. <i>Process Biochemistry</i> . Vol. 41, páginas 1913-1923.	2006

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

La solicitud de patente divulga un procedimiento para la obtención de xilooligosacáridos sustituidos procedentes del salvado de trigo.

El documento D01, que es el que refleja el estado de la técnica más cercano, divulga la obtención de diferentes clases de xilooligosacáridos a partir de materias primas de diferente naturaleza, entre las que se encuentra el salvado de trigo, mediante procesamiento hidrotérmico.

**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Artículos 6 y 8 LP 11/1986)**

En las reivindicaciones 1 y 2, de la solicitud de patente, se reivindica un procedimiento para la obtención de xilooligosacáridos sustituidos procedentes del salvado de trigo que consiste en mezclar el salvado de trigo con el agua y la realización posterior de un procesamiento hidrotérmico.

El documento D01 muestra (en el apartado 2.4 de la página 48) el procesamiento hidrotérmico del salvado de trigo para la obtención de xilooligosacáridos. Por lo que, teniendo en cuenta la información divulgada en el citado documento D01, las reivindicaciones 1 y 2 carecen de novedad y de actividad inventiva según lo establecido en los Artículos 6 y 8 de LP 11/1986.