



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 213 784**

51 Int. Cl.:

C07H 3/06 (2006.01)

C12P 19/18 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

C12R 1/80 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **96941837 .5**

96 Fecha de presentación : **11.12.1996**

97 Número de publicación de la solicitud: **0873995**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **28.10.1998**

54 Título: **1-cestona cristalina y procedimiento para su preparación.**

30 Prioridad: **11.12.1995 JP 7-321951**
21.03.1996 JP 8-64682
29.03.1996 JP 8-77534
29.03.1996 JP 8-77539

45 Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **01.09.2004**

45 Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **21.03.2011**

45 Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **21.03.2011**

73 Titular/es: **MEIJI SEIKA KABUSHIKI KAISHA**
4-16 Kyobashi 2-chome
Chuo-ku, Tokyo 104, JP

72 Inventor/es: **Nishizawa, Koji;**
Matsumoto, Hitoshi;
Nakamura, Hirofumi;
Kawakami, Takashi;
Nakada, Yuko;
Hirayama, Masao y
Adachi, Takashi

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 213 784 T5

DESCRIPCIÓN

1-cestosa cristalina y procedimiento para su preparaciónANTECEDENTES Y TRASFONDO DE LA INVENCIÓNSector de la invención

5 La presente invención, se refiere a procedimientos para la producción de 1-cestosa, especialmente, a un procedimiento para la producción de grandes cristales de 1-cestosa, mediante cristalización al vacío, o cristalización en frío, a un alto grado de rendimiento productivo.

Antecedentes del arte de esta técnica especializada

10 La estructura molecular de la 1-cestosa, un tipo de trisacárido, es el mismo que para la sucrosa, excepto en cuanto a lo referente al hecho de que, la porción mitad de fructuosa, se encuentra acoplada con otra fructuosa, en la posición 1, vía un enlace β -2,1. Los fructo-oligosacáridos, se caracterizan por una reducida cariosidad, indigestibilidad a las enzimas y la facilitación específica del crecimiento de *Bifidobacterium* en los intestinos, tal y como viene demostrado por algunos de los presentes inventores de la presente invención (Publicación de Patente Japonesa nº 53834 / 1984). Se cree que, la 1-cestosa, la cual es un componente de los fructosacáridos, tiene también las mismas características.

15 Los oligosacáridos cristalinos comercialmente obtenibles en el mercado, se han venido limitando a la rafinosa, la cual tiene reducidos tamaños de las partículas o granos de cristal, de una longitud comprendida dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,3 mm. El azúcar cristalino más corrientemente bien conocido, a saber, la sucrosa, se produce mayormente como un azúcar granulado, el cual se compone primariamente de grandes cristales, de un tamaño comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 0,25 mm hasta aproximadamente 1 mm, y azúcar blando, el cual es una mezcla de cristales de gran tamaño y de cristales de tamaño medio, de unas medidas que se encuentran comprendidas dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 0,5 mm. En los oligosacáridos, los cristales grandes, vienen también favorecidos por su alta utilidad.

20 Si bien ambas, la 1-cestosa y la sucrosa, tienen cristales de columna, los cristales de la 1-cestosa, son más rectangulares que los cristales casi cúbicos de la sucrosa. Así, por lo tanto, la 1-cestosa, debe tener mayores cristales que la sucrosa, con objeto de mostrar propiedades físicas similares a las del azúcar granulado.

25 En un procedimiento previamente discutido para la producción de 1-cestosa en forma de cristales, se procede a calentar una solución de 1-cestosa de un grado, en la escala de Brix, de 85 ó mayor, y de una alta pureza del 70% ó mayor, a una temperatura de 80°C o mayor; se procede a añadir una suspensión de microcristales a la solución; la temperatura, se reduce a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van de 65 a 75°C, para depositar cristales; y, mientras la temperatura se mantiene a un valor comprendido dentro de unos márgenes de 60 a 80°C, se recupera la 1-cestosa cristalina depositada (Publicación de patente japonesa nº 70075 /1994).

30 Este procedimiento, tiene la desventaja de que, el rendimiento productivo de los cristales, es reducido, a un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van desde aproximadamente un 30% hasta aproximadamente un 40%, debido al hecho de que, la concentración y la pureza de la solución cristalizante, cae a medida que los cristales se depositan. Adicionalmente, este procedimiento, involucra, de una forma inevitable, la deposición de microcristales con un incremento de la viscosidad en la solución. Así, de esta forma, la solución, debería calentarse, durante la recuperación de los cristales. Adicionalmente a ello, los tamaños de las partículas o granos, de los cristales obtenidos, no son uniformes y son generalmente pequeños.

35 Por otro lado, la 1-cestosa, puede producirse a partir de la sucrosa, haciendo uso de la actividad transferasa de la fructuosa. En uno de dichos conocidos procedimientos, la solución de sucrosa, ajustada a una concentración de un porcentaje del 50% o mayor, se deja que reaccione, a un valor pH de 4,0 a 7,0, en presencia de una enzima, que tiene una actividad de transferasa de fructuosa, la cual se deriva de microorganismos *Aspergillus* o *Fusarium* (Publicación de Patente Japonesa Nº 62184 / 1988). En otro conocido procedimiento, se deja reaccionar una enzima que tiene actividad de transferasa de fructuosa, derivada de un microorganismo *Aspergillus*, a un valor pH de 4,0 a 7,0, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes que van de 25 a 65°C, y a una concentración de sucrosa de un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van de un 20 a un 70% (Publicación de Documento Abierto de Patente Japonesa nº 268190 / 1986).

40 No obstante, estos procedimientos, están encaminados primariamente a la obtención de una mezcla de un trisacárido (1-cestosa), un tetrasacárido (nistosa), y un pentasacárido (fructosil nistosa), es decir, fructooligosacáridos, procedentes de la sucrosa. Las tasas de conversión de la sucrosa a 1-cestosa, en este procedimiento, son únicamente de un 36 a un 41%, como máximo (con referencia a la tabla 3, en la Publicación de Patente Japonesa nº 62184/1988, y

a los ejemplos de la Publicación de Documento Abierto de Patente Japonesa nº 28190 / 1986). También, en estos procedimientos, se produce un porcentaje de un 11 a un 23% de nistosa, conjuntamente con 1-cestosa, dejando un porcentaje de un 11 a un 23% de sucrosa no reaccionada, mientras que se produce un porcentaje de un 13 a un 32% de monosacáridos, tales como fructuosa o glucosa, como bioproductos (ibidem).

5 Debe prestarse debida nota en cuanto al hecho de que, la presencia de monosacáridos, sucrosa y nistosa es desventajosa para la siguiente razón: En la separación de dos componentes por cromatografía de lecho en movimiento simulado, la cual se utiliza generalmente para producir azúcar isomerizado, etc. se procede a dividir una solución que contiene dos o más azúcares de diferentes pesos moleculares, en dos fracciones, en concordancia con la diferencia en sus pesos moleculares. Si este procedimiento se utiliza para obtener 1-cestosa de alta pureza, a partir de una solución
10 que contiene 1-cestosa, la solución, debe, (1) o bien dividirse en dos fracciones, es decir, una fracción que contiene azúcares con pesos moleculares más bajos que la 1-cestosa, y una que contenga aquéllas con pesos moleculares iguales o mayores que los de la 1-cestosa, incluyendo 1-cestosa; o bien (2) dividirse en dos fracciones, es decir, una fracción que contenga azúcares con pesos moleculares mayores que los de la 1-cestosa, y una que contenga aquéllas con pesos moleculares iguales o menores que los de la 1-cestosa, incluyendo la 1-cestosa. En el primer caso, puesto
15 que la fracción contiene azúcares de mayor peso molecular que el de la 1-cestosa, la pureza de la 1-cestosa, en la fracción, es inevitablemente baja, dependiendo del contenido de tales tipos de azúcares. Cuando la solución contiene altos contenidos de azúcares, cuyos pesos moleculares son mayores que los de la 1-cestosa, por ejemplo, nistosa, con la separación de dos componentes por cromatografía de lecho móvil simulado, se requieren una o más etapas de separación, tales como una segunda separación cromatográfica de la fracción resultante, con objeto de obtener una
20 solución de 1-cestosa de alta pureza (por ejemplo, de una pureza del 80% ó mayor), que es necesaria para cristalización. En el último caso, el procedimiento, tiene la misma desventaja, cuando los contenidos de monosacáridos y de sucrosa son altos. Así, por lo tanto, existe una necesidad de un procedimiento que utilice reacciones enzimáticas, en el cual, la producción de monosacáridos, sucrosa, nistosa, etc., sea reducido, es decir, un procedimiento en el cual pueda producirse 1-cestosa de una forma selectiva, y las condiciones, y una nueva enzima para este procedimiento.

25 De entre los microorganismos de Penicillium, se ha sugerido que, el Penicillium frequentans, tiene una enzima que tiene actividad transferasa de fructuosa (Publicación de Documento Abierto de Patente Japonesa nº 293494 / 1992). No obstante, éste reporte únicamente establece el hecho de que, el microorganismo, produce transferasa de fructuosa, pero no menciona la tasa de conversión a 1-cestosa.

30 Un procedimiento para producir selectivamente 1-cestosa, utilizando un microorganismo de Scopulariopsis que produce 1-cestosa en presencia de sucrosa, al mismo tiempo que consume glucosa, ha sido ya reportado (Publicación de Documento Abierto de Patente Japonesa nº 41600 / 1992). Después de que el microorganismo se ha incubado en un medio que contiene sucrosa, para producir 1-cestosa, se recupera 1-cestosa del cultivo. En concordancia con la publicación, la tasa de conversión de sucrosa a 1-cestosa, es tan alta como la correspondiente a un porcentaje del 60%. No obstante, puesto que el procedimiento utiliza el cuerpo entero del hongo, la concentración total de azúcar en el
35 cultivo, es decir, la concentración de sucrosa al principio de la incubación, debe ser tan baja como la correspondiente a un porcentaje del 15%. Adicionalmente a ello, durante la purificación, deben retirarse los altos contenidos de proteínas y otras impurezas.

Así, de esta forma, se solicitan procedimientos para producir 1-cestosa, de una forma más selectiva, solicitándose, de una forma particular, nuevas condiciones para la reacción.

40 La patente europea EP 0 474 046, da a conocer un procedimiento para la preparación de 1-cestosa, a partir de microorganismos que pertenecen al género Scopulariopsis, y la subsiguiente purificación de la 1-cestosa, utilizando metanol.

45 Takeda, H. y colegas, en Journal of Fermentation and Bioengineering, volumen 77, nº 4, 386 - 389, 1994, dan a conocer un procedimiento para la preparación de 1-cestosa, mediante la redisolución de cristales crudos, seguido de recrystalización de cristales crudos, a partir de una solución acuosa.

La patente europea EP 0 301 626, dan a conocer un procedimiento par la preparación de 1-cestosa, utilizando Aspergillus phoenicis.

Resumen de la invención

50 Nosotros, los solicitantes, hemos encontrado, ahora, el hecho de que, la viscosidad de la fracción, puede hacerse lo suficientemente reducida como para permitir la separación de cristales, como sólidos, a partir de la solución, a la temperatura ambiente, sin calentar dicha solución, mediante un procedimiento de concentración controlada, y control de temperatura, basado en lo que se denomina cristalización por vacío, o cristalización en frío. Se ha encontrado también el hecho de que pueden obtenerse cristales grandes de 1-cestosa, a una alta tasa de rendimiento productivo.

La presente invención, está basada en estos descubrimientos.

Así, de esta forma, el objeto de la presente invención, es el de proporcionar un procedimiento para la producción de 1-cestosa en forma de cristales, en donde, la 1-cestosa cristalina, se obtiene a una alta tasa de rendimiento productivo, mediante la separación de sólido, del líquido, a temperatura ambiente.

5 Otro objeto de la presente invención, es el de proporcionar cristales grandes de 1-cestosa, en una forma granular.

En concordancia con el primer aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la producción de 1-cestosa en forma de cristales, que comprende las etapas de:

10 (a) concentrar una solución de 1-cestosa, de alta pureza, que tiene un porcentaje del 80%, o más, de pureza de 1-cestosa, a un grado, según la escala de Brix de un 75% o mayor, añadir cristales de siembra y, a continuación, calentar el concentrado resultante, a una temperatura de 60°C, o mayor, para permitir que crezcan los cristales,

(b) como una etapa de crecimiento de los cristales, concentrar el concentrado, bajo presión reducida, para permitir que crezcan los cristales, y

15 (c) como una etapa de disolución de microcristales, seguido de la etapa de crecimiento de los cristales, calentar el concentrado para redissolver los microcristales que se han generado en el concentrado, si las microcristales fallan en redisolverse completamente, añadiendo agua al concentrado, para disolver los microcristales,

seguido de la repetición de por lo menos una vez, de cada una de las etapas consistentes en la etapa (b) de crecimiento de cristales, y la etapa (c) de disolución de microcristales, y

recuperación de 1-cestosa en forma de cristales.

20 Adicionalmente a ello, se proporciona un procedimiento modificado del correspondiente al primer aspecto de la presente invención, que comprende las etapas de:

en lugar de las etapas (a) y (b), anteriormente descritas, arriba,

(a') la concentración de una solución de 1-cestosa, de alta pureza, que tenga una pureza de 1-cestosa 1 de un porcentaje de un 80%, o más, a un grado, en la escala de Brix, de 75, o mayor, y el calentamiento del concentrado resultante, a una temperatura de 60°C, o mayor, sin la adición de los cristales de siembra, y

25 (b') la concentración del concentrado, bajo una presión reducida, para reducir la temperatura del concentrado, y para iniciar la cristalización y permitir el que crezcan los cristales resultantes,

seguido por la etapa (c) de disolución de microcristales, tal y como se define anteriormente, arriba,

30 a continuación, mediante la repetición de por lo menos una vez, de cada una de las etapas correspondientes a la etapa (b) de crecimiento de cristales y la etapa (c) de disolución de los microcristales, tal y como se ha definido anteriormente, arriba, y

recuperación de 1-cestosa en forma de cristales.

En concordancia con el segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento para la producción de 1-cestosa en forma de cristales, que comprende las etapas de:

35 (α) concentrar una solución de 1-cestosa, de alta pureza, que tiene un porcentaje del 80%, o más, de pureza de 1-cestosa, a un Brix de un 80% o mayor, manteniendo la temperatura de un nivel comprendido dentro de unos márgenes que van de 50 a 60°C, para iniciar la cristalización, sin la adición de cristales de siembra y, a continuación, mantener los cristales resultantes a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes que van de 70 a 95°C, para que crezcan,

40 (β) como una etapa subsiguiente de enfriamiento, enfriar el concentrado en una temperatura de 5 a 20°C desde la temperatura en la etapa previa, y

(γ) como una etapa de crecimiento de los cristales, mantener el concentrado a la temperatura reducida de la etapa de enfriamiento arriba mencionada, para permitir el que los cristales crezcan,

45 seguido de la repetición de por lo menos una vez, de cada una de las etapas consistentes en la etapa (β) de enfriamiento, y la etapa (γ) de crecimiento de los cristales, reducir la temperatura a un nivel comprendido dentro de unos márgenes que van de 20 a 60°C, y la recuperación de 1-cestosa en forma de cristales.

Descripción detallada de la invenciónProcedimiento de los primeros y segundos aspectos de la presente invenciónEjemplo de cristalización

5 En ambos, el primer aspecto y el segundo aspecto de la presente invención, se utiliza, como material de partida, una muestra cristalina que contiene una 1-cestosa de alta pureza. En el procedimiento en concordancia con la presente invención, sería más ventajosa una 1-cestosa de alta pureza, preferiblemente, de un porcentaje de pureza del 80% o mayor y, de una forma más preferible, de un porcentaje de un 90% o mayor. La pureza de 1-cestosa, a la que aquí se hace referencia, se refiere al contenido de 1-cestosa expresado como el porcentaje, en peso, del contenido de azúcar en la muestra de cristalización.

10 Para preparar una muestra de cristalización de 1-cestosa, una fuente de azúcar que contiene 1-cestosa, se prepara o bien se obtiene, y se purifica, para incrementar su pureza de 1-cestosa. Un fuente de azúcar que contiene 1-cestosa, puede prepararse, por ejemplo, dejando que la transferasa de fructuosa derivada de una planta, un microorganismo, etc., reaccione en sucrosa u otro sustrato; incubando un microorganismo en un medio que contiene sucrosa u otro azúcar; o a partir de varias mezclas de fructooligosacáridos comercialmente obtenibles en el mercado, mediante técnicas standard, tales como la separación cromatográfica o separación por membrana, o procedimiento de Steffen, en el cual se utiliza cal para precipitar las impurezas.

15 En concordancia con la forma preferida de presentación de la presente invención, la proporción de nistosa en el contenido de azúcar, excepto 1-cestosa, en la muestra de cristalización de 1-cestosa, debe ser mínima. Nosotros, los solicitantes, hemos encontrado el hecho de que, el contenido de nistosa en la muestra de cristalización, debe ser más reducido, para obtener cristales mayores de 1-cestosa. De una forma más específica, se ha demostrado el hecho de que, la nistosa, si existe, inhibe la cristalización de 1-cestosa. El contenido preferible de nistosa, es de un 10%, en peso, o menor, de 1-cestosa.

20 Este descubrimiento, se aplica no únicamente a procedimientos en concordancia con la primera y segunda forma de la presente invención, sino que, también se aplica, a procedimientos previamente conocidos, para la producción de 1-cestosa.

Procedimiento para el primer aspecto de la presente invención

25 En el procedimiento en concordancia con el primer aspecto de la presente invención, la muestra de cristalización, se concentra, en primer lugar, a un grado, en la escala de Brix, de 75 ó, de una forma preferible, a un grado de 85. La concentración, puede realizarse procediendo a calentar o a descompresión. A continuación, se procede a añadir los cristales al concentrado. La cantidad preferible de cristales de siembra, es de un porcentaje del 1%, o inferior, con respecto al contenido de sólidos en el concentrado. Después de que se haya procedido a añadir los cristales de siembra, se deja que, el concentrado, continúe cristalizando, con los cristales de cristal como núcleos. Es preferible el que, la temperatura del concentrado, se mantenga a un nivel de 60°C ó superior, durante un transcurso de tiempo de aproximadamente 0,5 a 6 horas, de una más preferible, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes que van de 70 a 95°C, durante un transcurso de tiempo comprendido entre unos márgenes que van de 1 a 3 horas.

30 En otro aspecto preferido de la presente invención, los núcleos de cristal, pueden formarse sin proceder a la adición de cristales de siembra, de forma distinta al procedimiento anteriormente descrito, arriba. El concentrado, puede concentrarse bajo la acción de presión reducida, o una temperatura de 60°C ó superior, para depositar microcristales y, a continuación, dejando que éste continúe cristalizando, bajo las condiciones descritas anteriormente, arriba, con los microcristales como núcleo. Es preferible el hecho de que, los microcristales, se formen en una gama comprendida dentro de unos márgenes que van de 10 a 160 mmHg, de presión absoluta, y en una gama de temperatura comprendida dentro de unos márgenes que van de 30 a 70°C, de una forma preferible, en una gama de presión absoluta comprendida dentro de unos márgenes que van de 40 a 120 mmHg, y a una gama de temperatura que esté comprendida dentro de unos márgenes que van de 50 a 60°C.

35 Después de que se haya dejado que el concentrado continúe cristalizando, de la forma que se ha descrito anteriormente, arriba, éste se concentra bajo la acción de presión reducida, preferiblemente, a una presión absoluta comprendida dentro de unos márgenes que van de 40 a 200 mmHg, durante un transcurso de tiempo comprendido dentro de unos márgenes que van de 10 a 60 minutos, de una forma más preferible, a una presión absoluta de 60 a 120 mmHg, durante 30 a 60 minutos. Durante el procedimiento de concentración, la temperatura del concentrado, descendiendo en unos niveles comprendidos dentro de unos márgenes que van de 40 a 70°C, facilitándose con ello el crecimiento de los cristales (etapa de crecimiento de los cristales).

40 A continuación de la etapa de crecimiento de los cristales, el concentrado, se somete a la etapa de disolución de los cristales, descrita anteriormente, arriba. Mientras se observa el crecimiento de los cristales de 1-cestosa, como

5 resultado de la concentración al vacío, el procedimiento de concentración, produce también, generalmente, microcristales de 1-cestosa. Los microcristales, se vuelven a disolver, procediendo a calentar el concentrado, de una forma preferible, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes que van de 70 a 95°C, de una forma más preferible, de 75 a 85°C, y manteniendo la temperatura durante un transcurso de tiempo comprendido dentro de unos márgenes que van de 0,5 a 6 horas, de una forma preferible, de 1 a 2 horas. Si el calentamiento fallara en la redisolución de los microcristales de una forma completa, se procede a añadir para redisolver preferiblemente los microcristales en su totalidad.

10 En el procedimiento en concordancia con el primer aspecto de la presente invención, la etapa de disolución de los microcristales, se sigue mediante la repetición, de por lo menos una vez, de cada una de las etapas de crecimiento, consistentes en la etapa de crecimiento de los cristales, y en la etapa de crecimiento de los microcristales, tal y como se ha descrito anteriormente, arriba. De una forma particular, después de que el concentrado se mantenga de una forma preferible a una presión absoluta comprendida dentro de unos márgenes que van de 40 a 200 mmHg, durante un transcurso de tiempo comprendido dentro de unos márgenes que van de 10 a 60 minutos, para permitir el que crezcan los cristales, los monocristales resultantes, se vuelven a disolver, procediendo a calentar el concentrado, de una forma preferible, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes que van de 70 a 95°C, y manteniendo la temperatura durante un transcurso de tiempo comprendido dentro de unos márgenes que van de 0,5 a 6 horas. Si el calentamiento fallara en la redisolución de los microcristales de una forma completa, se procede a añadir agua, para redisolver preferiblemente los microcristales en su totalidad.

20 Los cristales de 1-cestosa, se dejan crecer los suficientemente, hasta el tamaño de grano deseado, en estas etapas. Los cristales, obtenidos, pueden aislarse y recubrirse, mediante la aplicación de técnicas standard (por ejemplo, mediante centrifugación). La forma de presentación preferida de la presente invención, tiene la significativa ventaja consistente en el hecho de que, después de que se haya terminado la cristalización, el concentrado en el cual se ha permitido que los cristales de 1-cestosa se ha dejado el que crezca lo suficiente, hasta alcanzar un forma granular, éste adquiere una viscosidad los suficientemente baja, como para permitir la recuperación de los cristales, sin tener que calentar la solución. Después de la recuperación, los cristales, pueden secarse, tanto como sea necesario, para formar, finalmente, los cristales de 1-cestosa.

25 En concordancia con el primer aspecto de la presente invención, se obtiene 1-cestosa, con un rendimiento productivo tan alto como el correspondiente a un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van del 50 al 60%.

30 En concordancia con la forma de presentación preferida de la presente invención, puede obtenerse la 1-cestosa cristalina, en forma de cristales de columna que tienen longitudes de más de 1,0 mm, y una pureza correspondiente a un porcentaje de 95% o superior. De una forma específica, controlando el grado, dentro de la escala de Brix, a unos valores comprendidos dentro de unos márgenes que van de 75 a 85, de una forma preferible, de 79 a 83, en la etapa de crecimiento de los cristales anteriormente descrita, arriba, se inhibe la generación de microcristales, en el concentrado, facilitando con ello el crecimiento de cristales, para producir de un modo eficiente, la 1-cestosa, en forma de cristales de gran tamaño, tal y como se describe anteriormente, arriba.

40 Adicionalmente a lo anteriormente expuesto, en el procedimiento correspondiente al primer aspecto de la presente invención, la muestra de cristalización, puede reponerse, con objeto de compensar la pérdida de volumen provocada en la etapa de crecimiento de cristales anteriormente descrita, arriba, después de la etapa de crecimiento de cristal, antes de la etapa de disolución de microcristales, o después de la etapa de disolución de microcristales, antes de la segunda etapa de crecimiento de los cristales. Esta reposición, ayudaría en el incremento del volumen procesado por operación y, al mismo tiempo, mantiene la alta pureza de la 1-cestosa en la solución, la cual, de otro modo, descendería a medida de que procediera la cristalización, permitiendo el que tenga lugar la cristalización, a un grado de pureza de la 1-cestosa, consistentemente alto.

45 Se preferirá el que, la 1-cestosa, se prepare según procedimientos correspondientes a procesos continuos, procediendo a repetir el mismo procedimiento que el que se ha descrito anteriormente, arriba, o llevando a cabo el procedimiento en concordancia con el segundo aspecto de la presente invención, tal y como se describe posteriormente, abajo, en solución de azúcar que contiene 1-cestosa, a partir de la cual se ha recuperado la 1-cestosa en forma de cristales.

50 De una forma alternativa, el mismo procedimiento descrito anteriormente, arriba, o el procedimiento en concordancia con el segundo aspecto de la presente invención, tal y como se describe posteriormente, abajo, a continuación, puede repetirse, en la solución de azúcar que contiene 1-cestosa, a partir de la cual, se ha recuperado, después, la 1-cestosa en forma de cristales, en la cantidad que sea necesaria, reponiendo la solución, con muestra fresca de cristalización. Estos procedimientos correspondientes a procesos continuos de cristalización, ayudarían en incrementar adicionalmente el rendimiento productivo del cristal de 1-cestosa, en algunos casos, a un rendimiento productivo total, tan alto como un porcentaje del 80% ó mayor.

Procedimiento del segundo aspecto de la presente invención

En el procedimiento en concordancia con el segundo aspecto de la presente invención, la muestra de cristalización, se concentra, en primer lugar, a un grado, según la escala de Brix, de un valor de 80, ó mayor, de una forma preferible, a un valor comprendido dentro de unos márgenes que van de 83 a 88. La concentración, puede realizarse procediendo a calentar o mediante descompresión. A continuación, mientras el concentrado se controla, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes que van de 70 a 95°C, se añaden cristales de siembra al concentrado. La cantidad preferible de los cristales de siembra, es la correspondiente a un porcentaje de un 1%, o inferior, con relación al contenido de sólidos en el concentrado.

En otra forma de presentación preferida de la presente invención, pueden formarse núcleos de cristales, sin añadir núcleos de cristales de siembra, de forma distinta al procedimiento descrito anteriormente, arriba. De una forma interesante, nosotros, los solicitantes, hemos encontrado el hecho de que, los microcristales, los cuales funcionan como núcleos de los cristales, pueden formarse, de una forma eficiente, procediendo a calentar el concentrado, el cual se ha concentrado a un grado, según la escala de Brix, correspondiente a un valor de 80 ó mayor, desde aproximadamente la temperatura ambiente (de alrededor de 25°C), hasta una temperatura comprendida dentro de unos márgenes que van de 50 a 60°C, y que, el número y el tamaño de los microcristales, puede controlarse mediante la regulación de la tasa de calentamiento. Una tasa mayor de calentamiento, desde la temperatura ambiente al nivel de temperatura correspondiente a una gama situada dentro de los márgenes anteriormente mencionados, arriba, daría como resultado un reducido número de microcristales como núcleos de cristales, dando de este modo como resultado, el que se formen cristales de gran tamaño. Además de ello, una tasa menor de calentamiento, daría como resultado un mayor número de microcristales, como núcleos de cristales, dando ello como resultado cristales más pequeños.

Después de que se hayan añadido los cristales, o que se hayan formado los microcristales, los cuales funcionan como núcleos de cristales, tal y como se describe anteriormente, arriba, el concentrado se mantiene caliente, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes que van de 70 a 95°C, de una forma preferible, de 75 a 85°C y, durante un transcurso de tiempo comprendido entre 30 minutos y 6 horas, para permitir el que crezcan los cristales.

En la siguiente etapa de enfriamiento de este procedimiento, el concentrado, se enfría para disminuir su temperatura, en un nivel comprendido dentro de unos márgenes que van de 5 a 20°C, de una forma preferible, en aproximadamente 10°C. A continuación, el concentrado, se mantiene caliente, a dicha temperatura, durante un transcurso de tiempo comprendido dentro de unos márgenes que van de 30 minutos a 6 horas, para permitir el que los cristales crezcan, en la etapa subsiguiente de crecimiento de los cristales.

En este procedimiento, la etapa de enfriamiento y la etapa de crecimiento de los cristales, se siguen de la repetición de por lo menos una vez, cada una de las mismas etapas consistentes en la etapa de enfriamiento y la etapa de crecimiento de los cristales. En otras palabras, la temperatura del concentrado, se baja, desde el valor correspondiente a la etapa previa, en un valor correspondiente a unos márgenes que van de 5 a 20°C, de una forma preferible, en un valor de aproximadamente 10°C, manteniéndolo posteriormente alto, a la misma temperatura, durante un transcurso de tiempo comprendido dentro de unos márgenes que van de 30 minutos a 6 horas, para permitir el que crezcan los cristales.

Si durante el proceso de cristalización se ha formado una gran cantidad de microcristales, se recomienda el que, la temperatura de la solución, se incremente, de una forma preferible, en un nivel comprendido dentro de unos márgenes que desde aproximadamente 10 a 20°C, con respecto al nivel de temperatura existente cuando se formaron los microcristales, con objeto de proceder a la redisolución de los microcristales. A continuación, la etapa de enfriamiento y la etapa de crecimiento de los cristales, se llevan a cabo otra vez.

La etapa de calentamiento, y la etapa de crecimiento de los cristales, se repiten, hasta que la temperatura de la solución de cristalización, es de un nivel comprendido dentro de unos márgenes que van de 20 a 60°C, de una forma preferible, de 40 a 50°C.

Los cristales de 1-cestosa, se dejan crecer lo suficiente, en estas etapas, hasta que alcancen el tamaño de partícula o grano deseado. Los cristales obtenidos, pueden aislarse y recuperarse mediante técnicas estandarizadas (por ejemplo, mediante centrifugación). La forma de presentación preferida de la presente invención, tiene una significativa ventaja, tal como lo tiene el proceso correspondiente al procedimiento del primer aspecto de la presente invención, después de que haya terminado la cristalización, en donde, el concentrado que contiene, en los cuales los cristales de 1-cestosa, se han dejado crecer lo suficiente, a una forma granular, tiene una viscosidad lo suficientemente baja, como para permitir la recuperación de cristales, sin calentar la solución. Después de la recuperación, los cristales, pueden secarse tanto como sea necesario, para realizar, finalmente, la 1-cestosa cristalina.

En concordancia con un segundo aspecto de la presente invención, se obtiene 1-cestosa, a un rendimiento productivo correspondiente a un porcentaje del 40%, ó mayor, pudiendo ser tan alto como el correspondiente a unos porcentajes comprendidos dentro de unos márgenes que van de un 43 a un 45%, en una forma preferida.

Adicionalmente, como en el procedimiento en concordancia con el primer aspecto de la presente invención, la 1-cestosa cristalina, puede prepararse mediante procesos continuos, repitiendo el mismo procedimiento que el que se ha descrito anteriormente, arriba, o llevando a cabo el procedimiento del primer aspecto de la presente invención en la solución de azúcar que contiene 1-cestosa, a partir del cual se ha recuperado la 1-cestosa cristalina. De una forma alternativa, el mismo procedimiento que el que se ha descrito anteriormente, arriba, o el procedimiento del primer aspecto de la presente invención, puede repetirse, en la solución de azúcar que contiene 1-cestosa, a partir de la cual se ha recuperado la 1-cestosa cristalina, después reponer la solución con muestra de cristalización fresca. Estos procedimientos continuos de cristalización, ayudarían en incrementar adicionalmente el rendimiento productivo de los cristales de 1-cestosa.

La 1-cestosa, puede producirse a partir de sucrosa, utilizando una enzima derivada de ciertos microorganismos.

Aquí, en este documento, 1 unidad de enzima que tiene actividad de transferasa de fructuosa, se refiere a los siguientes significados:

En el caso de una enzima derivada de un microorganismo de Aspergillus, la cantidad de la enzima que puede producir 1 μ mol de 1-cestosa, en un transcurso de tiempo de 1 minuto, a una temperatura de 40°C, a un pH de 5,0, y a una concentración de sustrato (sucrosa) de un 10%, en peso; y

En el caso de una enzima derivada de un microorganismo de Penicillium, la cantidad de enzima que puede producir 1 μ mol de 1-cestosa, en un transcurso de tiempo de 1 minuto, a una temperatura de 40°C, a un pH de 5,0, y a una concentración de sustrato (sucrosa) de un 10%, en peso;

Etapas (i)

Síntesis de 1-cestosa a partir de sucrosa

En primer lugar, se procede a convertir la sucrosa a 1-cestosa, en una cualquiera de las siguientes etapas:

(1) (1) permitiendo el que una enzima que tenga actividad transferasa de fructuosa, derivada de un microorganismo Aspergillus, reaccione en una solución de sucrosa, correspondiendo a un porcentaje del 43%, en peso, o más, de los azúcares resultantes;

(2) permitiendo el que una enzima que tenga actividad transferasa de fructuosa, derivada de un microorganismo Penicillium, reaccione en una solución de sucrosa, correspondiendo a un porcentaje del 46%, en peso, o más, de los azúcares resultantes; o,

(3) permitiendo el que una enzima que tenga actividad transferasa de fructuosa, derivada de un microorganismo Scopulariopsis, reaccione en una solución de sucrosa, correspondiendo a un porcentaje del 53%, en peso, o más, de los azúcares resultantes;

Etapas (i) (1)

En la etapa (i) (1), se utiliza una enzima que tiene actividad de transferasa de fructuosa, la cual puede prepararse a partir de un microorganismo Aspergillus. La enzima, puede prepararse, de una forma preferente, a partir de Aspergillus niger, específicamente, a partir de Aspergillus niger ATCC20611.

La enzima, puede recuperarse a partir de un cultivo, procediendo a incubar el microorganismo en un medio apropiado (por ejemplo, un medio que contenga de un 3,0 a un 10,0% de sucrosa, de un 3,0 a un 10,0% de extracto de levadura, y de un 0,3 a un 1,0% de CMC), a un pH inicial de un valor de 6,0 a 7,0 a una temperatura comprendida dentro de una márgenes que van de 25 a 30°C, durante un transcurso de tiempo de 48 a 96 horas.

La enzima, actúa sobre la solución de sucrosa, con una concentración de un 50%, en peso, o mayor, de una forma preferible, a una tasa de 0,5 a 100 unidades, por 1 g de sucrosa, a un pH de 5,0 a 10,0, y a una temperatura de 50 a 65°C, y produce 1-cestosa que corresponde a un porcentaje del 43%, ó más, de los azúcares resultantes. Además de ello, ésta actúa, sobre una solución de sucrosa, bajo las mismas condiciones, y produce nistosa, correspondiente a un porcentaje del 13%, ó menos, de los azúcares resultantes. En los procedimientos descritos en la Publicación de Patente Japonesa nº 62184 / 1988, y la Publicación del Documento Abierto de Patente nº 268190 / 1986, las tasas de conversión de sucrosa a 1-cestosa, son de únicamente un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van de un 36 a un 41%, como máximo. En estos procedimientos, conjuntamente con la 1-cestosa, se produce un porcentaje de nistosa del 11 a 23%. Este procedimiento, tiene una remarcable desventaja con respecto al arte anterior de esta técnica especializada, descrito en las publicaciones, en cuanto a lo referente a producir 1-cestosa de una forma selectiva.

La enzima, se deja reaccionar sobre sucrosa, para producir 1-cestosa. En una forma preferible de presentación, se hace reaccionar una solución de sucrosa, con una concentración de un porcentaje correspondiente a un 50%, en peso, o mayor, de una forma preferible, con una concentración comprendida dentro de unos márgenes que van de un 50%, en peso, a un 60%, en peso, a un valor pH de 5,0 a 10,0, de una forma preferible, a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes que van de 50 a 65°C, de una forma preferible, de 50 a 60°C. Adicionalmente, en una forma preferida de presentación, la enzima que tiene una actividad de transferasa de sucrosa, se hace reaccionar con una solución de sucrosa, a una tasa de 0,5 a 100 unidades, de una forma preferible, a una tasa de 3 a 100 unidades, por 1 g de sucrosa, y a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes que van de 50 a 65°C, de una forma preferible, de 50 a 60°C, durante un transcurso de tiempo de 2 a 100 horas, de una forma preferible, de 2 a 40 horas.

Es preferible el que, la enzima, se desactive, después de que la reacción de transferencia se haya terminado, de una forma preferible, mediante la adición de carbono activado (por ejemplo, carbono activado S-W50, procedente de Taiko) a una tasa comprendida dentro de unos porcentajes que van de un 0,1 a un 1,0%, en peso, del contenido en sólidos, y calentando la solución reactiva, a una temperatura situada dentro de unos márgenes que van de 90 a 95°C, durante un transcurso de tiempo comprendido entre 20 y 60 minutos, al mismo tiempo que la decoloración de la solución reactiva.

En una forma preferida de presentación, los azúcares resultantes, contiene un porcentaje del 43%, en peso, o más, de 1-cestosa, y un 13%, en peso, ó menos, de nistosa. La composición, puede mejorarse bajo la acción de condiciones más preferibles, a un porcentaje del 44%, en peso, ó más, de 1-cestosa, y un 7%, en peso, o menos, de nistosa.

Etapas (i) (2)

La enzima para su uso en la etapa (i) (2), es una enzima derivada de las especies Penicillium, la cual puede actuar sobre sucrosa, para producir 1-cestosa, correspondiente a un porcentaje del 46%, en peso, o más, de los azúcares resultantes. Las enzimas que tienen actividad transferasa de fructuosa que se utilizan de una forma preferible en la presente invención, incluyen la nueva enzima descrita posteriormente, a continuación:

La enzima, se prepara a partir de un microorganismo Penicillium, de una forma preferible, a partir de Penicillium roqueforti, especialmente, a partir de la cepa Penicillium roqueforti IAM7254.

La enzima, puede recuperarse a partir de un cultivo, procediendo a incubar el microorganismo en un medio apropiado (por ejemplo, un medio que contenga de un 5, a un 30% de sucrosa, de un 1 a un 10% de licor saturado de trigo, de un 0,05 a un 0,3% de urea, de un 0,2 a un 3,0 de dihidrogenofosfato de potasio, y de un 0,01 a un 0,1% de sulfato de magnesio heptahidratado), a un valor pH inicial de 6,5 a 7,5 y a una temperatura de 25 a 30°C, durante un transcurso de tiempo de 2 a 5 días.

Es preferible el que, la enzima, se purifique mediante un procedimiento conocido de purificación. Los procedimientos preferibles de purificación, incluyen la salación, utilizando una sal tal como el sulfato amónico; la precipitación, utilizando un disolvente orgánico, tal como el metanol; etanol o acetona, la adsorción, utilizando almidón; la ultrafiltración; cromatografía de filtración en gel; la cromatografía de intercambio de iones; y varios otros procedimientos cromatográficos.

La enzima, mostraba las siguientes propiedades:

- Actividad

La enzima, corta el enlace β-D-fructofuranósido de un azúcar que tiene un enlace β-D-fructofuranósido, tal como la sucrosa, la 1-cestosa o la rafinosa, y transfiere el grupo fructosil resultante, de una forma específica, a la posición C-1 (grupo hidroxilo) del grupo fructosil terminal de azúcares.

La enzima, actúa también sobre la solución de sucrosa, con una concentración de un porcentaje de un 50%, ó mayor, a un valor pH de 6,0 a 9,0, y una temperatura 35 a 55°C, durante un transcurso de tiempo de 2 a 100 horas, para producir 1-cestosa, correspondiente a un 46%, en peso, ó más, de los azúcares resultantes.

La enzima, puede también reaccionar, con una solución de sucrosa, con una concentración de un porcentaje de un 50%, ó mayor, a una tasa de 0,5 a 100 unidades por 1 g de sucrosa, a un valor pH de 6,0 a 9,0, y una temperatura 35 a 55°C, durante un transcurso de tiempo de 2 a 100 horas, para producir 1-cestosa, correspondiente a un 46%, en peso, ó más, de los azúcares resultantes. La enzima, actúa también, sobre la solución de sucrosa, bajo las mismas condiciones, para producir nistosa, correspondiente a un 7%, en peso, o menos, de los azúcares resultantes

– Especificidad del sustrato

La enzima, actúa efectivamente sobre la sucrosa, la 1-cestosa, la rafinosa, pero no sobre la turnabas, la maltosa.

– Temperatura óptima

5 La temperatura óptima de la enzima, es la de 40°C a 50°C.

– Estabilidad a la temperatura

La enzima, retiene por lo menos un porcentaje del 60%, de actividad relativa, a un valor pH de 7,0 y a una temperatura de 55°C, o menos, después de un transcurso de tiempo de 30 minutos.

– Valor pH óptimo

10 El valor pH óptimo de la enzima, es de 6,0 a 7,0.

– Valor pH estable

La enzima, es remarcable estable, a un pH comprendido dentro de unos valores que van de 4,0 a 8,9, reteniendo por lo menos un porcentaje de un 90% de actividad relativa, a una temperatura de 40°C, después de un transcurso de tiempo de 30 minutos.

15 – Peso molecular

El peso molecular de la enzima, según se mide mediante cromatografía de filtración en gel, es de 315.000.

– Inhibición de actividad

La enzima, se inhibe mediante glucosa, la cual es un subproducto de la reacción de transferencia de la fructuosa.

20 – Cinética de la enzima

El valor km de la enzima, es de 1,1 M.

En la etapa (i) (2), de la presente invención, la enzima, se hace reaccionar con sucrosa, para producir 1-cestosa.

En concordancia con un procedimiento preferido,

25 una solución de sucrosa, con una concentración del 50%, en peso, o mayor, de una forma preferible, de un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van de un 55 a un 65%, en peso, se hace reaccionar, a un valor pH de 6,0 a 9,0, de una forma preferible, a un valor pH de 6,0 a 8,0, y a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes que van de 35 a 55°C, de una forma preferible, de 40 a 50°C. Adicionalmente, según un procedimiento preferido en concordancia con la presente invención, la enzima que tiene una actividad de transferasa de fructuosa, se
30 añade a la solución de sucrosa, a una tasa de 0,5 a 100 unidades, de una forma preferible, a una tasa de 2 a 50 unidades, por g de sucrosa, para que reaccione a una temperatura de 35 a 55°C, de una forma preferible, de 40 a 50°C, durante un transcurso de tiempo de 2 a 100 horas, de una forma preferible, de 4 a 100 horas.

35 Es preferible el que, la enzima, se desactive, después de que la reacción de transferencia se haya terminado, de una forma preferible, mediante la adición de carbono activado (por ejemplo, carbono activado S-W50, procedente de Taiko) a una tasa comprendida dentro de unos porcentajes que van de un 0,1 a un 1,0%, en peso, del contenido en sólidos, y calentando la solución reactiva, a una temperatura situada dentro de unos márgenes que van de 40 a 70°C, durante un transcurso de tiempo comprendido entre 20 y 60 minutos, al mismo tiempo que la decoloración de la solución reactiva.

40 En una forma preferida de presentación, los azúcares resultantes, contiene un porcentaje del 46%, en peso, o más, de 1-cestosa, y un 7%, en peso, o menos, de nistosa.

Etapas (i) (3)

La enzima para su uso en la etapa (i) (3), es una enzima derivada de las especies Scopulariopsis, la cual puede actuar sobre sucrosa, para producir 1-cestosa, correspondiente a un porcentaje del 53%, en peso, o más, de los

azúcares resultantes. Las enzimas que tienen actividad transferasa de fructuosa que se utilizan de una forma preferible en la presente invención, incluyen la enzima descrita posteriormente, a continuación:

La enzima, se prepara a partir de un microorganismo Scopulariopsis, de una forma preferible, a partir de Scopulariopsis brevicaulis, especialmente, a partir de la cepa Scopulariopsis brevicaulis IFO4843.

5 La enzima, puede recuperarse a partir de un cultivo, procediendo a incubar el microorganismo en un medio apropiado (por ejemplo, un medio que contenga de un 3,0 a un 10,0% de sucrosa, de un 5 a un 15% de licor saturado de trigo, de un 0,05 a un 0,3% de urea, de un 0,2 a un 3,0% de dihidrogenofosfato de potasio, y de un 0,01 a un 0,1% de sulfato de magnesio heptahidratado), a un valor pH inicial de 6,5 a 7,5 y a una temperatura de 20 a 30°C, durante un transcurso de tiempo de 3 a 8 días.

10 La enzima, se prepara, de una forma preferible, mediante la recuperación del cuerpo del hongo, a partir de un cultivo, utilizando una centrifugadora, tal como del tipo de cesta; suspendiendo el hongo recuperado en un tampón, a un valor pH de 7,0; obteniendo una suspensión de enzima cruda, mediante un tratamiento ultrasónico, y un tratamiento de membrana; a continuación, procediendo a tratar con intercambiador de iones, filtración en gel, focalización cromatográfica, u otro procedimiento, en la suspensión cruda de enzima cruda:

15 La enzima, mostraba las siguientes propiedades:

– Actividad

La enzima, corta el enlace β -D-fructofuranósido de un azúcar que tiene un enlace β -D-fructofuranósido, tal como la sucrosa, la 1-cestosa o la rafinosa, y transfiere el grupo fructosil resultante, de una forma específica, a la posición C-1 (grupo hidroxilo) del grupo fructosil terminal de azúcares.

20 La enzima, actúa también sobre la solución de sucrosa, con una concentración de un porcentaje de un 50%, ó mayor, a un valor pH de 6,0 a 10,0, y una temperatura 35 a 50°C, durante un transcurso de tiempo de 2 a 100 horas, para producir 1-cestosa, correspondiente a un 53%, en peso, ó más, de los azúcares resultantes.

25 La enzima, puede reaccionar con una solución de sucrosa, a una concentración del 50%, en peso, o mayor, de una forma preferible, a una concentración del 50% al 55%, en peso, a un valor pH de 6,0 a 10,0, de una forma preferible, a un pH de 7,0 a 9,8, y a una temperatura de 35 a 50°C, de una forma preferible, de 35 a 40°C, para producir 1-cetosa, correspondiente a un porcentaje del 53%, o más, de los azúcares resultantes. De una forma preferible, la enzima, se hace reaccionar a una tasa de 0,5 a 100 unidades y, de una forma más preferible, a una tasa de 2 a 20 unidades, por 1 g de sucrosa. La enzima, actúa también sobre la solución de sucrosa, bajo las mismas condiciones, para producir nistosa, correspondiente a un 5%, en peso, o menos, de los azúcares resultantes. En este sentido, la
30 enzima, es significativamente apropiada en producir 1-cestosa, de una forma selectiva.

– Especificidad del substrato

La enzima, actúa efectivamente sobre la sucrosa, la 1-cestosa, la rafinosa, pero no sobre la turanosa, la maltosa.

– Temperatura óptima

35 La temperatura óptima de la enzima, es de 40°C..

– Valor pH óptimo

El valor pH óptimo de la enzima, es de 6,0 a 7,0.

– Valor pH estable

40 La enzima, es remarcable estable, a un pH comprendido dentro de unos valores que van de 6,0 a 10,0, reteniendo por lo menos un porcentaje de un 80% de actividad relativa, a una temperatura de 40°C, después de un transcurso de tiempo de 30 minutos.

– Peso molecular

El peso molecular de la enzima, según se mide mediante cromatografía de filtración en gel, es de 360 a 380 kDa.

45 Un análisis por SDS-PAGE, reveló el hecho de que, la enzima, tenía un peso molecular

– Punto isoeléctrico

El punto isoeléctrico, tal y como se mide mediante dos electroforesis dimensionales y cromatografía hidrofóbica, es de aproximadamente 3,8 a 3,9.

– Inhibición de actividad

5 La enzima, se inhibe mediante glucosa, la cual es un subproducto de la reacción de transferencia de la fructuosa.

– Cinética de la enzima

El valor k_m de la enzima, es de 0,75 M. La enzima, se inhibe, de una forma incompatible, mediante la glucosa, con una constante de inhibición (k_i) de 0,125 M.

10 En la etapa (i) (3), de la presente invención, la enzima, se hace reaccionar con sucrosa, para producir 1-cestosa.

En concordancia con un procedimiento preferido,

15 una solución de sucrosa, con una concentración del 50%, en peso, o mayor, de una forma preferible, de un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van de un 50 a un 55%, en peso, se hace reaccionar, a un valor pH de 6,0 a 10,0, de una forma preferible, a un valor pH de 7,0 a 9,8, y a una temperatura comprendida dentro de unos márgenes que van de 35 a 50°C, de una forma preferible, de 35 a 40°C. Adicionalmente, según un procedimiento preferido en concordancia con la presente invención, la enzima que tiene una actividad de transferasa de fructuosa, se añade a la solución de sucrosa, a una tasa de 0,5 a 100 unidades, de una forma preferible, a una tasa de 2 a 20 unidades, por 1 g de sucrosa, para que reaccione a una temperatura de 35 a 50°C, de una forma preferible, de 35 a 20 40°C, durante un transcurso de tiempo de 2 a 100 horas, de una forma preferible, de 9 a 60 horas.

25 Es preferible el que, la enzima, se desactive, después de que la reacción de transferencia se haya terminado, de una forma preferible, mediante la adición de carbono activado (por ejemplo, carbono activado S-W50, procedente de Taiko) a una tasa comprendida dentro de unos porcentajes que van de un 0,1 a un 1,0%, en peso, del contenido en sólidos, y calentando la solución reactiva, a una temperatura situada dentro de unos márgenes que van de 90 a 95°C, durante un transcurso de tiempo comprendido entre 20 y 60 minutos, al mismo tiempo que la decoloración de la solución reactiva.

30 En una forma preferida de presentación, los azúcares resultantes, contienen un porcentaje del 5%, en peso, o más, de 1-cestosa, y un 5%, ó menos, de nistosa. La composición, puede mejorarse, bajo una condiciones más preferibles, a un porcentaje de un 55%, en peso, ó más, de 1-cestosa, y a un porcentaje de un 4%, en peso, o menos de nistosa.

En concordancia con una forma de presentación preferida de la presente invención,

35 se desea el que, la solución que contiene 1-cestosa, la cual se ha obtenido en una cualquiera de las etapas (i) (1) a (3), anteriormente descritas, arriba, se filtre, para retirar el cuerpo de los hongos, etc. y se decolore y desodore mediante la utilización de carbono activado, previamente a la ejecución de la etapa (ii). La decoloración y desodorización, pueden lograrse mediante la adición de carbono activado, correspondiente a un porcentaje comprendido dentro de unos márgenes que van de un 0,1 a un 1,0%, en peso, del contenido en sólidos, en la solución de 1-cestosa, y procediendo a agitar, a una temperatura comprendida dentro de unos niveles que van de 40 a 70°C, durante un 40 intercambio de tiempo de 20 a 60 minutos. Es preferible el que, la solución, se desale adicionalmente, con resina intercambiadora de cationes y aniones, para desalar y filtrar de nuevo, para proporcionar una solución transparente de 1-cestosa.

Etapas (ii)

Separación cromatográfica

45 La solución reactiva que contiene 1-cestosa, la cual se ha obtenido utilizando la enzima anteriormente citada, arriba, se separa cromatográficamente, para preparar 1-cestosa cristalina. Un procedimiento preferido de separación cromatográfica, es el de la separación cromatográfica en lecho móvil simulado, el cual se utiliza, de una forma general, para producir azúcares isomerizados.

La separación cromatográfica, proporciona una fracción que contiene 1-cestosa, a una pureza del 80%, ó mayor, de una forma preferible, 90% ó mayor.

En el procedimiento,

5 el contenido relativo de azúcares, de los cuales, los pesos moleculares son mayores que el de la 1-cestosa, tal como la nistosa, es reducido, tal y como se ha expuesto ya. Así, por lo tanto, la 1-cestosa, puede efectivamente purificarse, mediante un procedimiento individual, de separación cromatográfica de dos componentes, mediante lecho móvil simulado, utilizando la enzima y las condiciones de reacción tal y como se describen en la etapa (i), mientras que, en el arte correspondiente a la técnica anterior, se necesitan dos o más operaciones repetidas. Una forma preferida de la presente invención, posibilita el purificar la 1-cestosa a un porcentaje del 80 al 95%, mediante este procedimiento.

10 En esta etapa, se obtiene una fracción que contiene 1-cestosa, a una pureza del 80%, preferiblemente, a una pureza del 90%, ó mayor. Es preferible el que, la solución de 1-cestosa de alta pureza, se separe, con objeto de minimizar la proporción de nistosa, en el contenido de azúcar remanente, ya que, un menor contenido de nistosa, daría como resultado cristales de mayor tamaño, de 1-cestosa. Se desea el hecho de que, el contenido de nistosa, sea de un 10%, en peso, o menor, de 1-cestosa.

En concordancia con el una forma preferida de presentación,

15 es preferible el que, la fracción obtenida, se trate con carbono activado, y se desale, previamente a la etapa (iii) subsiguiente. El proceso de tratamiento con carbón activado, y el desalado, puede realizarse de la misma forma que en la etapa (i).

Etapas (iii)

Cristalización

20 En el tercer aspecto de la presente invención, la etapa (iii), es una etapa de cristalización. El procedimiento para la etapa (iii), puede ser, de una forma preferible, el mismo que el del primer aspecto y el segundo aspecto de la presente invención. De una forma similar, la forma de presentación preferida del primer y segundo aspectos de la presente invención, pueden también ser aplicables, como la forma preferida de presentación.

1-cestosa cristalina

25 En concordancia con las formas preferidas de presentación de la presente invención, puede obtenerse 1-cestosa cristalina, que tenga tamaños de grano o partícula de más de 1,0 mm. De forma distinta a los cristales en forma de polvo, los cristales grandes de 1-cestosa, no coagulan fácilmente durante el proceso de secado, haciendo posible el obtener un producto de un tamaño de grano o partícula uniforme. Adicionalmente, la 1-cestosa cristalina en concordancia con la presente invención, tiene una alta fluidez y, por lo tanto, es menos probable el que forme polvo o que se consolide. La ventajas esperadas de esta característica, incluyen la pequeña desviación, en reducidos paquetes, tales como para azúcar de mesa, y pequeña clasificación cuando se mezcla con azúcar granulado.

Ejemplos

La presente invención, se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos que se facilitan a continuación, los cuales no se intenta en absoluto que sean limitativos de la invención. Las cifras, en porcentaje, que se facilitan a continuación, se refieren a porcentaje en peso, a menos que se especifique de otra forma.

35 En los ejemplos que se facilitan a continuación, la muestra de cristalización, se preparó mediante procedimientos tales como el de la separación y purificación cromatográfica, a partir de una muestra comercialmente obtenible en el mercado de fructooligosacáridos, Meioligo G o Meioligo P (Meiji Seika), o separación y purificación cromatográfica a partir de una solución de sucrosa, la cual se había hecho reaccionar con transferasa de fructuosa, tal y como se describe en los ejemplos que se facilitan posteriormente, a continuación.

40 En los ejemplos que se facilitan a continuación, la composición de azúcar, en la muestra de cristalización, varía, reflejando la diferencia en las condiciones de separación.

Ejemplo A

Ejemplo A1

45 Para la realización de este ejemplo, se utilizó una muestra de cristalización, con una composición de azúcar correspondiente a unos porcentajes de un 92% de 1-cestosa, un 5% de sucrosa, y un 3% de nistosa, la cual se había preparado en concordancia con el Ejemplo C1, tal y como se describirá posteriormente, más abajo.

La muestra de cristalización, se concentró a un grado de 80, según la escala de Brix. A continuación, y después de calentar el concentrado a una temperatura de 75°C, se procedió a añadir cristales de siembra de 1-cestosa,

correspondientes a un 1% del contenido de sólidos en el concentrado. Se dejó que los cristales crecieran durante un transcurso de tiempo de 0,5 horas. La solución, se concentró, a continuación, bajo la acción de presión reducida, a un valor de presión absoluta de 80 mm de Hg, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos. A través del procedimiento de concentración, la temperatura de la solución, descendió a un nivel de 55°C y, el grado, según la escala de Brix, alcanzó un valor de 83. A medida que los microcristales de 1-cestosa se generaban, durante el procedimiento de concentración, el concentrado, se calentó a una temperatura de 75°C, y se mantuvo a dicha temperatura durante un transcurso de tiempo de 1 hora, para disolver los microcristales. Como resultado de ello, el grado, según la escala de Brix, de la porción del concentrado, excepto los cristales, asumió un valor de aproximadamente 80.

La etapa de crecimiento de los cristales y la etapa de disolución de los microcristales, se repitió durante cuatro veces, para permitir el que la 1-cestosa, cristalizara suficientemente. A continuación, los cristales, se recuperaron por centrifugación, a la temperatura ambiente, y se secaron, para formar, finalmente, los cristales de 1-cestosa.

La pureza de los cristales de 1-cestosa obtenidos, era de un porcentaje correspondiente a un 99% y, el rendimiento productivo de los cristales, era de un porcentaje de aproximadamente un 60%.

Una examen microscópico, reveló el hecho de que, la mayoría de los cristales, tenían una longitud comprendida dentro de unos márgenes que iban de 0,3 a 2 mm, y que no existía coagulación de los cristales.

La distribución del tamaño de grano o partícula de los cristales, se investigó mediante tamizado de los cristales, a través de tamices automáticos, de 20, 40 y 60 mesh, durante un transcurso de tiempo de 5 minutos. El resultado obtenido, se muestra en la tabla que se facilita abajo, a continuación. El tamaño de cristal predominante, en longitud, se encontró que era el correspondiente a una gama comprendida dentro de unos márgenes que van de 0,5 mm a 1,2 mm. Debería tomarse debida nota en cuanto al hecho de que, las longitudes reales de los cristales sobredimensionados, excedían en la longitud de la diagonal de la malla, considerando el hecho de que, los cristales de 1-cestosa, tienen formas rectangulares.

TABLA 1

Malla	Longitud del lado	Longitud de la diagonal	Sobredimensionado
20	0,84	1,19	0.5%
40	0,37	0,52	75.9%
60	0,25	0,35	18.1%
			5.5%

Ejemplo A2

Para la realización de este ejemplo, se utilizó una composición de azúcar correspondiente a unos porcentajes de un 95% de 1-cestosa, un 4% de sucrosa, y un 1% de nistosa, la cual se había preparado en concordancia con el Ejemplo D2, tal y como se describirá posteriormente, más abajo.

La muestra de cristalización, se concentró a un grado de 80, según la escala de Brix. A continuación, y después de calentar el concentrado a una temperatura de 80°C, se procedió a añadir cristales de siembra de 1-cestosa, correspondientes a un 0,5% del contenido de sólidos en el concentrado. Se dejó que los cristales crecieran durante un transcurso de tiempo de 0,5 horas. La solución, se concentró, a continuación, bajo la acción de presión reducida, a un valor de presión absoluta de 160 mm de Hg, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos. A través del procedimiento de concentración, la temperatura de la solución, descendió a un nivel de 70°C y, el grado, según la escala de Brix, alcanzó un valor de 83. A medida que los microcristales de 1-cestosa se generaban, durante el procedimiento de concentración, el concentrado, se calentó a una temperatura de 95°C, y se mantuvo a dicha temperatura durante un transcurso de tiempo de 1 hora, para disolver los microcristales.

La etapa de crecimiento de los cristales y la etapa de disolución de los microcristales, se repitió durante cuatro veces. Puesto que, los microcristales fallaron en cuanto a disolverse completamente, en la cuarta etapa de disolución de los cristales, se procedió a añadir agua, correspondiente a un porcentaje del 2% del contenido de sólidos, en el concentrado, para disolver los microcristales. A continuación, la etapa de crecimiento de los cristales y la etapa de

disolución de los microcristales, descritas anteriormente, arriba, se repitieron dos veces más. A continuación, los cristales, se recuperaron por centrifugación, a la temperatura ambiente, y se secaron, para formar, finalmente, los cristales de 1-cestosa.

La pureza de los cristales de 1-cestosa obtenidos, era de un porcentaje correspondiente a un 99% y, el rendimiento productivo de los cristales, era de un porcentaje de aproximadamente un 57%. Un examen microscópico, reveló el hecho de que, la mayoría de los cristales, tenían una longitud de aproximadamente 1 mm.

Ejemplo A3

Para la realización de este ejemplo, se utilizó una muestra de cristalización, con una composición de azúcar correspondiente a unos porcentajes de un 95% de 1-cestosa, un 4% de sucrosa, y un 1% de nistosa, la cual se había preparado en concordancia con el Ejemplo D2, tal y como se describirá posteriormente, más abajo.

La muestra de cristalización, se concentró a un grado de 75, según la escala de Brix. A continuación, y después de calentar el concentrado a una temperatura de 70°C, la solución, se concentró, bajo la acción de presión reducida, a un valor de presión absoluta de 80 mm de Hg, durante un transcurso de tiempo de 15 minutos, para producir microcristales. Con los microcristales como núcleo, se dejó que crecieran los cristales, a una temperatura de 70°C, durante un transcurso de tiempo de 6,0 horas. La solución, se concentró, a continuación, a una presión reducida de 80 mm de Hg, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos. A través del procedimiento de concentración, la temperatura de la solución, descendió a un nivel de 55°C. A medida que los microcristales de 1-cestosa se generaban, durante el procedimiento de concentración, el concentrado, se calentó a una temperatura de 75°C, y se mantuvo a dicha temperatura durante un transcurso de tiempo de 1 hora, para disolver los microcristales.

La etapa de crecimiento de los cristales y la etapa de disolución de los microcristales, se repitieron durante cuatro veces, para permitir el que la 1-cestosa, cristalizara suficientemente. A continuación, los cristales, se recuperaron por centrifugación, a la temperatura ambiente, y se secaron, para formar, finalmente, los cristales de 1-cestosa.

La pureza de los cristales de 1-cestosa obtenidos, era de un porcentaje correspondiente a un 99% y, el rendimiento productivo de los cristales, era de un porcentaje de aproximadamente un 59%. Un examen microscópico de los cristales, reveló que, la mayoría de los cristales, tenían una longitud de aproximadamente 1 mm.

La distribución del tamaño de grano o partícula de los cristales, se investigó mediante tamizado de los cristales, a través de tamices de 20, 24, 32 y 42 mesh.

El resultado obtenido, se muestra en la tabla que se facilita abajo, a continuación. El tamaño de cristal predominante, en longitud, se encontró que era el correspondiente a una gama comprendida dentro de unos márgenes que van de 0,7 mm a 1,2 mm. Debería tomarse debida nota en cuanto al hecho de que, las longitudes reales de los cristales sobredimensionados, excedían en la longitud de la diagonal de la malla, considerando el hecho de que, los cristales de 1-cestosa, tienen formas rectangulares.

TABLA 2

Malla	Longitud del lado	Longitud de la diagonal	Sobredimensionado
20	0,84	1,19	6.5%
24	0,37	0,100	35.8%
32	0,25	0,70	41.7%
42	0,35	0,49	13.8%
			2.2%

Ejemplo A4

Para la realización de este ejemplo, se utilizó una muestra de cristalización, con una composición de azúcar correspondiente a unos porcentajes de un 92% de 1-cestosa, un 2% de sucrosa, y un 6% de nistosa, a partir de Meoligo P, mediante separación cromatográfica, utilizando un separador cromatográfico de dos componentes, de lecho móvil simulado.

La muestra de cristalización, se concentró a un grado de 75, según la escala de Brix. A continuación, y después de calentar el concentrado a una temperatura de 70°C, la solución, se concentró, bajo la acción de presión reducida, a un valor de presión absoluta de 80 mm de Hg, durante un transcurso de tiempo de 10 minutos, para producir microcristales. Con los microcristales como núcleo, se dejó que crecieran los cristales, a una temperatura de 70°C, durante un transcurso de tiempo de 3 horas. La solución, se concentró, a continuación, a una presión reducida de 80 mm de Hg, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos. A través del procedimiento de concentración, la temperatura de la solución, descendió a un nivel de 55°C. A medida que los microcristales de 1-cestosa se generaban, durante el procedimiento de concentración, el concentrado, se calentó a una temperatura de 75°C, y se mantuvo a dicha temperatura durante un transcurso de tiempo de 1 hora, para disolver los microcristales.

La etapa de crecimiento de los cristales y la etapa de disolución de los microcristales, se repitieron durante tres veces. A continuación, se añadió la muestra de cristalización, para reponer la pérdida de volumen causada en el procedimiento de concentración. A continuación, se procedió a repetir dos veces más, la etapa de crecimiento de los cristales y la etapa de crecimiento de los microcristales, anteriormente citadas, arriba. A continuación, los cristales, se recuperaron por centrifugación, a la temperatura ambiente, y se secaron, para formar, finalmente, los cristales de 1-cestosa.

La pureza de los cristales de 1-cestosa obtenidos, era de un porcentaje correspondiente a un 93% y, el rendimiento productivo e los cristales, era de un porcentaje de aproximadamente un 60%. Un examen microscópico de los cristales, reveló que, la mayoría de los cristales, tenían una longitud comprendida dentro de unos márgenes que iban de aproximadamente 0,3 a 1 mm.

20 Ejemplo A6

Para la realización de este ejemplo, se utilizó una muestra de cristalización, con una composición de azúcar correspondiente a unos porcentajes de un 95% de 1-cestosa, un 4% de sucrosa, y un 1% de nistosa, la cual se había preparado en concordancia con el ejemplo D2, tal y como se describirá posteriormente.

La muestra de cristalización, se concentró a un grado de 85, según la escala de Brix. A continuación, el concentrado se calentó gradualmente desde una temperatura de 20°C, a una temperatura de 80°C, para producir microcristales, a una temperatura de aproximadamente 50 a 60°C. Con los microcristales como núcleo, los cristales, se dejaron crecer, a una temperatura de 80°C, durante un tiempo de 30 minutos. Después de que la solución se enfriara a una temperatura de 70°C, lo cual tardó 30 minutos, los cristales se dejaron crecer a 70°C, durante 30 minutos. Adicionalmente, después de que la solución se calentara a una temperatura de 60°C, lo cual tardó 40 minutos, se dejó que los cristales crecieran a una temperatura de 60°C, durante un transcurso de tiempo de 30 minutos. Todavía, de una forma adicional, después de que la solución se enfriara a una temperatura de 50°C, lo cual requirió 60 minutos de tiempo, los cristales se dejaron crecer a una temperatura de 50°C, durante 30 minutos.

A continuación, los cristales, se recuperaron por centrifugación, a la temperatura ambiente, y se secaron, para formar, finalmente, los cristales de 1-cestosa.

La pureza de los cristales de 1-cestosa obtenidos, era de un porcentaje correspondiente a un 99% y, el rendimiento productivo de los cristales, era de un porcentaje de aproximadamente un 43%. Un examen microscópico de los cristales, reveló que, la mayoría de los cristales, tenían una longitud comprendida dentro de unos márgenes que iban de aproximadamente 0,3 a 2 mm.

Ejemplo comparativo

Se procedió a mezclar la 1-cestosa preparada en el Ejemplo 1, descrito anteriormente, arriba, con sucrosa, y se examinó en cuanto a las propiedades de la mezcla.

El cristal de 1-cestosa preparado en el Ejemplo A2 y azúcar granulado HA (Azúcar de Nippon Beet), se tamizaron separadamente. Las porciones de sobredimensionado de 40 mesh, de cada uno de ellos, se mezclaron entre ellas, a una tasa de un 80% de sucrosa y de un 20% de 1-cestosa, y se usaron como muestra de mezcla bruta (sobredimensionada de 40 mesh), de sucrosa y 1-cestosa.

Adicionalmente a lo antes expuesto, la 1-cestosa cristalina preparada en el ejemplo A2, anteriormente facilitado, arriba, y azúcar granulado HA (Azúcar Nippon Beet), se trituraron por separado, en un molino de mesa, y se tamizaron. Las porciones sobredimensionadas de 100 mesh, de cada uno de ellos, se mezclaron conjuntamente, a una tasa de un 80% de sucrosa y un 20% de 1-cestosa, y se utilizaron como muestra de mezcla fina de sucrosa y 1-cestosa.

Estas muestras, se analizaron utilizando un dispositivo para ensayos (téster) para materias en polvo (Hosokawa Micron) para las partidas listadas en la tabla que se facilita posteriormente, abajo, en concordancia con procedimientos estandarizados. Los resultados, se muestran en la tabla que se facilita abajo:</

TABLA 4

Partida	Muestra fina	Muestra bruta
Fluidez		
Ángulo de respuesta	49	39
Ángulo de espátula	65	40
Compresibilidad	49	13
Dispersabilidad	27	11
Variación como empaquetada	Pobre	Buena

Estos resultados, muestran el hecho de que, la muestra bruta, tenía una fluidez superior y menos variación al empaquetarse. Se encontró que, la muestra fina, se consolidaba, cuando se comprimía.

Ejemplo B (No en concordancia con la invención)

Ejemplo B-1

(1) Se procedió emplazar 15 l de un medio que contenía un 5% de sucrosa, un 6,5% de extracto de levadura, y un 0,5% de CMC (carboximetilcelulosa) en un recipiente fermentador de 30 litros de capacidad, éste se ajustó a un valor pH de 6,5, y se esterilizó, a una temperatura de 120°C, durante 30 minutos. Se procedió a inocular *Aspergillus niger* ATCV20611, en un medio, emplazado en un matraz Erlenmeyer, y que contenía un 5% de sucrosa, un 2,0% de caldo en forma de polvo, un 0,5% de CMC, y se incubó a una temperatura de 28°C, durante un tiempo de 21 horas y, a continuación, se implantó en el medio anteriormente citado, arriba, y se incubó a una temperatura de 28°C, durante un transcurso de tiempo de 96 horas. Después de que hubiese terminado la incubación, se recuperó el cuerpo del hongo del cultivo, utilizando una centrifugadora del tipo de cesta, y se secó por congelación, para fabricar un cuerpo de hongo seco, para su utilización como enzima, en las siguientes reacciones.

La actividad transferasa de la fructuosa, del cuerpo de hongo secado, era de un valor de aproximadamente 14.000 unidades por 1 g de cuerpo de hongo seco.

(2) Se procedió a emplazar 20 litros de solución de sucrosa, a una concentración del 60%, a un pH de 10,0, y a una temperatura de 60°C, en una cámara de reacción. La enzima que se había preparado en (1), según se ha descrito anteriormente, arriba, se añadió a la cámara de reacción, a una tasa de 60 unidades por 1 g de sucrosa, y se dejó que reaccionara, a una temperatura de 60°C y a un pH de 10,0, durante 40 horas. A continuación, se añadió carbono activado (carbono activado S-W50, procedente de Taiko), a una tasa de un 1,0% del contenido de sólidos, para desactivar la enzima y descolorear la solución, a una temperatura de 95°C, durante 30 minutos.

La composición del azúcar, de la solución desactivada, era de un 44% de 1-cestosa, un 32% de sucrosa, un 17% de monoasacáridos, y un 7% de nistosa.

La solución desactivada, se filtró, con objeto de eliminar cualesquiera impurezas, tales como el cuerpo de hongo, y el carbono desactivado. A continuación, se procedió a añadir, al filtrado, carbono activado (carbono activado S-W50, procedente de la firma Taiko), a una tasa de un 0,5% del contenido de sólidos, y se agitó, a una temperatura de 60°C, durante un tiempo de 20 minutos, para descolorear de nuevo. Después de haberse filtrado, con objeto de eliminar el carbono activado, de la misma forma que la se ha descrito anteriormente, arriba, la solución, se desaló, mediante una resina intercambiadora de cationes y aniones y, a continuación, se filtró de nuevo, para fabricar una solución de 1-cestosa, incolora y transparente (muestra cromatográfica). En el procedimiento de decoloración y desalado, se observó fuertemente la descomposición de la 1-cestosa.

Con objeto de mejorar la pureza de la 1-cestosa, en la muestra cromatográfica obtenida anteriormente, arriba, la solución, se separó cromatográficamente, mediante un separador cromatográfico, de dos componentes, de lecho

móvil simulado. Se obtuvo una fracción cromatográfica, con una composición del azúcar, del 92% de 1-cestosa, un 3% de sucrosa, y un 5% de nistosa.

A continuación, se procedió a descolorear y desalar la fracción, para fabricar una fracción de 1-cestosa incolora y transparente (muestra de cristalización).

5 Ejemplo B2

Se procedió a añadir la enzima que se había preparado de la misma forma que en el ejemplo B1 (1), a 10 litros de solución de sucrosa, ajustándose a una concentración del 50%, a un pH de 9,0, y a una temperatura de 50°C, a una tasa de 100 unidades por 1 g de sucrosa, y se dejó que reaccionara, a una temperatura de 50°C y a un pH de 9,0, durante 2 horas. A continuación, se añadió carbono activado (carbono activado S-W50, procedente de Taiko), a una tasa de un 1,0% del contenido de sólidos, para desactivar la enzima y descolorear la solución, a una temperatura de 95°C, durante 30 minutos.

La composición del azúcar, de la solución desactivada, era de un 43% de 1-cestosa, un 30% de sucrosa, un 18% de monoasacáridos, y un 9% de nistosa.

La solución desactivada, se filtró, con objeto de eliminar cualesquiera impurezas, tales como el cuerpo de hongo, y el carbono desactivado. A continuación, se procedió a añadir, al filtrado, carbono activado (carbono activado S-W50, procedente de la firma Taiko), a una tasa de un 0,5% del contenido de sólidos, y se agitó, a una temperatura de 60°C, durante un tiempo de 20 minutos, para descolorear de nuevo. Después de haberse filtrado, con objeto de eliminar el carbono activado, de la misma forma que la se ha descrito anteriormente, arriba, la solución, se desaló, mediante una resina intercambiadora de cationes y aniones y, a continuación, se filtró de nuevo, para fabricar una solución de 1-cestosa, incolora y transparente (muestra cromatográfica). En el procedimiento de decoloración y desalado, se observó fuertemente la descomposición de la 1-cestosa.

Con objeto de mejorar la pureza de la 1-cestosa, en la muestra cromatográfica obtenida anteriormente, arriba, la solución, se separó cromatográficamente, mediante un separador cromatográfico, de dos componentes, de lecho móvil simulado. Se obtuvo una fracción cromatográfica, con una composición del azúcar, del 90% de 1-cestosa, un 3% de sucrosa, y un 7% de nistosa.

A continuación, se procedió a descolorear y desalar la fracción, para fabricar una fracción de 1-cestosa incolora y transparente (muestra de cristalización).

Ejemplo B3

Se procedió a añadir la enzima que se había preparado de la misma forma que en el ejemplo B1 (1), a 10 litros de solución de sucrosa, ajustándose a una concentración del 60%, a un pH de 5,50, y a una temperatura de 60°C, a una tasa de 3,0 unidades por 1 g de sucrosa, y se dejó que reaccionara, a una temperatura de 60°C y a un pH de 5,5, durante 4 horas. A continuación, se añadió carbono activado (carbono activado S-W50, procedente de Taiko), a una tasa de un 0,3% del contenido de sólidos, para desactivar la enzima y descolorear la solución, a una temperatura de 95°C, durante 30 minutos.

La composición del azúcar, de la solución desactivada, era de un 43% de 1-cestosa, un 22% de sucrosa, un 22% de monosacáridos, y un 13% de nistosa.

La solución desactivada, se filtró, con objeto de eliminar cualesquiera impurezas, tales como el cuerpo de hongo, y el carbono desactivado. A continuación, se procedió a añadir, al filtrado, carbono activado (carbono activado S-W50, procedente de la firma Taiko), a una tasa de un 0,2% del contenido de sólidos, y se agitó, a una temperatura de 60°C, durante un tiempo de 20 minutos, para descolorear de nuevo. Después de haberse filtrado, con objeto de eliminar el carbono activado, de la misma forma que la se ha descrito anteriormente, arriba, la solución, se desaló, mediante una resina intercambiadora de cationes y aniones y, a continuación, se filtró de nuevo, para fabricar una solución de 1-cestosa, incolora y transparente (muestra cromatográfica). En el procedimiento de decoloración y desalado, se observó fuertemente la descomposición de la 1-cestosa.

Con objeto de mejorar la pureza de la 1-cestosa, en la muestra cromatográfica obtenida anteriormente, arriba, la solución, se separó cromatográficamente, mediante un separador cromatográfico, de dos componentes, de lecho móvil simulado. Se obtuvo una fracción cromatográfica, con una composición del azúcar, del 80% de 1-cestosa, un 7% de sucrosa, y un 13% de nistosa.

A continuación, se procedió a descolorear y desalar la fracción, para fabricar una fracción de 1-cestosa incolora y transparente (muestra de cristalización).

Ejemplo B4

Para la realización de este ejemplo, se utilizó la muestra de cristalización, con una composición de azúcar correspondiente a unos porcentajes de un 90% de 1-cestosa, un 3% de sucrosa, y un 7% de nistosa, la cual se había preparado en concordancia con el ejemplo B2, descrito anteriormente, arriba, y se concentró a un grado de 80, según la escala de Brix. Después de calentar el concentrado, a una temperatura de 70°C, las solución se concentró, a una presión absoluta de 80 mmHg, durante un transcurso de tiempo de 10 minutos, para producir microcristales. Con los microcristales como núcleo, los cristales, se dejaron crecer, a una temperatura de 70°C, durante un tiempo de 3 horas. La solución, se concentró, bajo presión reducida, a una presión absoluta de 80 mmHg, durante un tiempo de 30 minutos. Mediante el procedimiento de concentración, la temperatura de la solución, descendió a un nivel de 55°C. Mientras que se generaban los microcristales de 1-cestosa, durante el procedimiento de concentración, el concentrado, se calentó a una temperatura de 75°C, y se mantuvo a la temperatura, durante un transcurso de tiempo de 1 hora, para disolver los microcristales.

La etapa de crecimiento de los cristales, y la etapa de disolución de los microcristales, se repitió tres veces. La muestra de cristalización, se añadió, para reponer la pérdida de volumen causada por el procedimiento de concentración. A continuación, la etapa de crecimiento de los cristales y la etapa de disolución de los microcristales, se volvió a repetir dos veces más. A continuación, los cristales, se recuperaron mediante centrifugación, a la temperatura ambiente, y se secaron, para formar, finalmente, cristales de 1-cestosa.

La pureza de los cristales de 1-cestosa obtenidos, era de un porcentaje correspondiente a un 99% y, el rendimiento productivo de los cristales, era de un porcentaje de aproximadamente un 60%.

Un examen microscópico de los cristales, reveló que, la mayoría de los cristales, tenían una longitud comprendida dentro de unos márgenes que iban de aproximadamente 0,3 a 1 mm.

Ejemplo C (No en concordancia con la presente invención)Ejemplo C1

(1) Se procedió emplazar 15 l de un medio que contenía un 22,5% de sucrosa, un 1,5% de extracto de levadura, y un 3% de licor saturado de trigo, en un recipiente fermentador de 30 litros de capacidad, éste se ajustó a un valor pH de 6,8, y se esterilizó, a una temperatura de 120°C, durante 30 minutos. Se procedió a inocular *Penillium roqueforti* (cepa IAM 7254), en un medio, emplazado en un matraz Erlenmeyer, de 1 litro de capacidad útil, y que contenía un 15,0% de sucrosa, un 1,0% de extracto de levadura, y un 2,0% de licor saturado de trigo, y se incubó a una temperatura de 28°C, durante un transcurso de tiempo de 3 días, a continuación se implantó en el medio anteriormente citado, arriba, y se incubó a una temperatura de 28°C, durante un transcurso de tiempo de 4 días. Después de que hubiese terminado la incubación, se recuperó el cuerpo del hongo del cultivo, utilizando una centrifugadora del tipo de cesta, y se secó por congelación, para fabricar un cuerpo de hongo seco, para su utilización como enzima, en las siguientes reacciones.

La actividad transferasa de la fructuosa, del cuerpo de hongo secado, era de un valor de aproximadamente 95 a 135 unidades por 1 g de cuerpo de hongo seco.

(2) La enzima que se había preparado según se ha descrito anteriormente, arriba, se añadió a una solución de 10 litros de sucrosa, ajustándose a una concentración del 55%, en peso, a un pH de 7,0, y a una temperatura de 50°C, a una tasa de 10 unidades por 1 g de sucrosa, y se dejó que reaccionara, a una temperatura de 50°C y a un pH de 7,0, durante 4 horas. A continuación, se añadió carbono activado (carbono activado S-W50, procedente de Taiko), a una tasa de un 0,3% del contenido de sólidos, para desactivar la enzima y descolorear la solución, a una temperatura de 95°C, durante 30 minutos. La composición del azúcar, de la solución, era de un 46% de 1-cestosa, un 18% de sucrosa, un 30% de monoasacáridos, y un 6% de nistosa. La solución desactivada, se filtró, con objeto de eliminar cualesquiera impurezas, tales como el cuerpo de hongo. A continuación, se procedió a descolorear y desalar el filtrado, mediante carbono activado y resina intercambiadora de iones, después se filtró de nuevo, para obtener una solución de 1-cestosa, incolora y transparente.

Con objeto de mejorar la pureza de la 1-cestosa, en la muestra cromatográfica obtenida anteriormente, arriba, la solución, se separó cromatográficamente, mediante un separador cromatográfico, de dos componentes, de lecho móvil

Ejemplo C2

Se procedió a añadir la enzima que se había preparado de la misma forma que en el ejemplo C1 (1), a 10 litros de solución de sucrosa, ajustándose a una concentración del 65%, a un pH de 8,0, y a una temperatura de 40°C, a una tasa de 50 unidades por 1 g de sucrosa, y se dejó que reaccionara, a una temperatura de 40°C y a un pH de 8,0, durante 5 horas. A continuación, se añadió carbono activado (carbono activado S-W50, procedente de Taiko), a una tasa de un 1,0% del contenido de sólidos, para desactivar la enzima y descolorear la solución, a una temperatura de 95°C, durante 30 minutos.

La composición del azúcar, de la solución desactivada, era de un 47% de 1-cestosa, un 18% de sucrosa, un 28% de monoasacáridos, y un 7% de nistosa.

La solución desactivada, se filtró, con objeto de eliminar cualesquiera impurezas, tales como el cuerpo de hongo, y el carbono desactivado. A continuación, el filtrado, se descoloreó y se desaló, mediante carbono activado y resina intercambiadora de iones, a continuación, se filtró de nuevo, para fabricar una solución de 1-cestosa, incolora y transparente (muestra cromatográfica).

Con objeto de mejorar la pureza de la 1-cestosa, en la muestra cromatográfica obtenida anteriormente, arriba, la solución, se separó cromatográficamente, mediante un separador cromatográfico, de dos componentes, de lecho móvil simulado. Se obtuvo una fracción cromatográfica, con una composición del azúcar, del 90% de 1-cestosa, un 3% de sucrosa, y un 7% de nistosa.

A continuación, se procedió a descolorear y desalar la fracción cromatográfica, para fabricar una fracción de 1-cestosa incolora y transparente (muestra de cristalización).

La muestra de cristalización de esta forma preparada, se trató en el mismo procedimiento que en el Ejemplo B4, descrito anteriormente, arriba, para fabricar, finalmente, la 1-cestosa similar.

Ejemplo C3

Se procedió a añadir la enzima que se había preparado de la misma forma que en el ejemplo C1 (1), a 10 litros de solución de sucrosa, se ajustó a una concentración del 65%, a un pH de 6,0, y a una temperatura de 40°C, a una tasa de 2 unidades por 1 g de sucrosa, y se dejó que reaccionara, a una temperatura de 40°C y a un pH de 6,0, durante 100 horas. A continuación, se añadió carbono activado (carbono activado S-W50, procedente de Taiko), a una tasa de un 1,0% del contenido de sólidos, para desactivar la enzima y descolorear la solución, a una temperatura de 95°C, durante 30 minutos.

La composición del azúcar de la solución, era de un 46% de 1-cestosa, un 19% de sucrosa, un 28% de monoasacáridos, y un 7% de nistosa.

La solución desactivada, se filtró, con objeto de eliminar cualesquiera impurezas, tales como el cuerpo de hongo. A continuación, el filtrado, se descoloreó y se desaló, mediante carbono activado y resina intercambiadora de iones, a continuación, se filtró de nuevo, para fabricar una solución de 1-cestosa, incolora y transparente (muestra cromatográfica).

Con objeto de mejorar la pureza de la 1-cestosa, en la muestra cromatográfica obtenida anteriormente, arriba, la solución, se separó cromatográficamente, mediante un separador cromatográfico, de dos componentes, de lecho móvil simulado. Se obtuvo una fracción cromatográfica, con una composición del azúcar, del 80% de 1-cestosa, un 7% de sucrosa, y un 3% de nistosa.

A continuación, se procedió a descolorear y desalar la fracción cromatográfica, para fabricar una fracción de 1-cestosa incolora y transparente (muestra de cristalización).

Ejemplo D (No en concordancia con la presente invención)Ejemplo D1

(1) Purificación de la enzima

Se procedió a emplazar 15 l de un medio que contenía un 5,0% de sucrosa, un 10,5% de licor saturado de trigo, y un 0,1% de urea, en un recipiente fermentador de 30 litros de capacidad, ajustado a un valor pH de 7,0, y se esterilizó, a una temperatura de 120°C, durante

durante un transcurso de tiempo de siete días. Después de que hubiese terminado la incubación, se recuperó el cuerpo del hongo del cultivo, utilizando una centrifugadora del tipo de cesta, y se secó por congelación, para fabricar un cuerpo de hongo seco.

5 La actividad transferasa de la fructuosa, del cuerpo de hongo secado, era de un valor de aproximadamente 5,2 a 8,3 unidades por 1 g de cuerpo de hongo seco.

10 La materia en forma de polvo de cuerpos de hongos secados por congelación, preparados anteriormente, arriba, se suspendieron en un tampón de McIlvaine (pH 7,0), y se trituraron mediante ultrasonidos. Las células trituradas, se ultrafiltraron mediante un filtro de membrana (peso molecular del corte: 100.000). El sobrenadante obtenido, como enzima cruda, se separó mediante columna de intercambio de iones (columna de Q-sefaroza 60/100, Pharmacia), la cual se había equilibrado con tampón Tris-HCl (pH 7,3), a un gradiente de NaCl de 0 a 1 M. Se procedió a purificar dos fracciones, las cuales exhibían actividad enzimática, a través de cromatografía de filtración en gel (Superdex 200 10/30), Pharmacia). Se procedió, a continuación, a purificar, otra vez, una fracción resultante, la cual mostraba una banda electroforéticamente individual (enzima semi-purificada), mediante focalización de columna cromatográfica (Columna mono P 5/20, Pharmacia), utilizando un tampón bis-tris-HCl 0,025 M, como tampón de partida, y poli-tampón 74-HCl (pH 3,8), diluido 10 veces, como eluido.

TABLA 5

	Solución (ml)	Actividad total de la enzima (unidad)	Rendimiento productivo (%)
20 Extensión secada por congelación	7700	219.000	100
Ultrafiltración	1200	228.600	104
Cromatografía de intercambio de iones	130	214.200	98
25 Cromatografía de filtración en gel	15	657	0,3
Focalización cromatográfica	8	325	0,15

(2) Peso molecular y punto isoelectrico

30 El peso molecular de la holoenzima, según se encontró mediante filtración en gel, era de aproximadamente 360 a 380 kDa.

El resultado de SDS PAGE, sugirió la existencia de una subunidad, con un peso molecular de aproximadamente 54 KDa.

35 La cadena de glicósido, se eliminó mediante un procedimiento adaptado de Muramatsu y colegas (Methods in Enzymology, 50, 555 (1987), de la siguiente forma: En primer lugar, se procedió a añadir 1,2 veces (peso / peso) de SDS por 1 µg de enzima, para desnaturalizar la enzima, en baño de agua caliente; A continuación, con 1 miliunidad de Endoglicosidasa-β-H por proteína desnaturalizada añadida, la proteína, se incubó en un tampón de fosfato 50 mM (pH 6,0), a una temperatura de 37°C, durante un transcurso de tiempo de por lo menos 12 horas; El resultado, probaba la existencia de una subunidad cuyo peso molecular era de aproximadamente 51 kDa, con la cadena de glicósido retirada.

40 Los resultados de electroforesis bi-dimensional y de cromatografía hidrofóbica, mostraron el hecho de que, el punto isoelectrico estimado de la enzima, era de un valor de 3,8 a 3,9.

Ejemplo D2

tasa de un 1,0% del contenido de sólidos, para desactivar la enzima y descolorear la solución, a una temperatura de 95°C, durante 30 minutos.

La composición del azúcar de la solución, era de un 55% de 1-cestosa, un 16% de sucrosa, un 25% de monoasacáridos, y un 4% de nistosa.

5 La solución desactivada, se filtró, con objeto de eliminar cualesquiera impurezas, tales como el carbono activado. A continuación, el filtrado, se descoloreó y se desaló, mediante carbono activado y resina intercambiadora de iones, a continuación, se filtró de nuevo, para fabricar una solución de 1-cestosa, incolora y transparente.

10 Con objeto de mejorar la pureza de la 1-cestosa, en la muestra cromatográfica obtenida anteriormente, arriba, la solución, se separó cromatográficamente, mediante un separador cromatográfico, de dos componentes, de lecho móvil simulado. Se obtuvo una fracción cromatográfica, con una composición del azúcar, de un 95% de 1-cestosa, un 4% de sucrosa, y un 1% de nistosa.

A continuación, se procedió a descolorear y desalar la fracción cromatográfica, para fabricar una fracción de 1-cestosa incolora y transparente (muestra de cristalización).

Ejemplo D3

15 Se procedió a añadir la enzima que se había preparado de la misma forma que en el ejemplo D1, a 10 litros de solución de sucrosa, ajustada una concentración del 50%, a un pH de 7,0, y a una temperatura de 35°C, a una tasa de 2 unidades por 1 g de sucrosa, y se dejó que reaccionara, a una temperatura de 35°C y a un pH de 7,0, durante un tiempo de 60 horas. A continuación, se añadió carbono activado (carbono activado S-W50, procedente de Taiko), a una tasa de un 0,3% del contenido de sólidos, para desactivar la enzima y descolorear la solución, a una temperatura de 95°C, durante 30 minutos.

La composición del azúcar de la solución, era de un 55% de 1-cestosa, un 17% de sucrosa, un 25% de monoasacáridos, y un 5% de nistosa.

25 La solución desactivada, se filtró, con objeto de eliminar cualesquiera impurezas, tales como el carbono activado. A continuación, el filtrado, se descoloreó y se desaló, mediante carbono activado y resina intercambiadora de iones, a continuación, se filtró de nuevo, para formar una solución de 1-cestosa, incolora y transparente.

Con objeto de mejorar la pureza de la 1-cestosa, en la muestra cromatográfica obtenida anteriormente, arriba, la solución, se separó cromatográficamente, mediante un separador cromatográfico, de dos componentes, de lecho móvil simulado. Se obtuvo una fracción cromatográfica, con una composición del azúcar, de un 90% de 1-cestosa, un 3% de sucrosa, y un 7% de nistosa.

30 A continuación, se procedió a descolorear y desalar la fracción cromatográfica, para fabricar una fracción de 1-cestosa incolora y transparente (muestra de cristalización). La muestra de cristalización de esta forma preparada, se trató en el mismo procedimiento que en el Ejemplo B4 descrito anteriormente, arriba, para formar, finalmente, 1-cestosa cristalina.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la producción de 1-cestosa en forma de cristales, que comprende las etapas de:

5 (a) concentrar una solución de 1-cestosa, de alta pureza, que tiene un porcentaje del 80%, o más, de pureza de 1-cestosa, a un grado, según la escala de Brix, de un 75% o mayor, añadir cristales de siembra y, a continuación, calentar el concentrado resultante, a una temperatura de 60°C, o mayor, para permitir que crezcan los cristales,

(b) como una etapa de crecimiento de los cristales, concentrar el concentrado, bajo presión reducida, para permitir que crezcan los cristales, y

10 (c) como una etapa de disolución de microcristales, seguido de la etapa de crecimiento de los cristales, calentar el concentrado para redissolver los microcristales que se han generado en el concentrado, si las microcristales fallan en redisolverse completamente, añadiendo agua al concentrado, para disolver los microcristales,

seguido de la repetición de por lo menos una vez, de cada una de las etapas consistentes en la etapa (b) de crecimiento de cristales, y la etapa (c) de disolución de microcristales, y recuperación de 1-cestosa en forma de cristales.

2. Un procedimiento para producir 1-cestosa cristalina, que comprende las etapas de:

15 (a') la concentración de una solución de 1-cestosa, de alta pureza, que tenga una pureza de 1-cestosa de un porcentaje de un 80%, o más, a un grado, en la escala de Brix, de 75, o mayor, y el calentamiento del concentrado resultante, a una temperatura de 60°C, o mayor, sin la adición de los cristales de siembra, y

(b') la concentración del concentrado, bajo una presión reducida, para reducir la temperatura del concentrado, y para iniciar la cristalización y permitir el que crezcan los cristales resultantes,

seguido por la etapa (c) de disolución de microcristales, según la reivindicación 1,

20 a continuación, mediante la repetición de por lo menos una vez, de cada una de las etapas (b) de crecimiento de cristales y la etapa (c) de disolución de los microcristales, según la reivindicación 1, y

recuperación de 1-cestosa en forma de cristales.

25 3. Un procedimiento para la producción de 1-cestosa cristalina, según la reivindicación 1 ó 2, en donde, el concentrado, que tiene un grado, según la escala de Brix, comprendido dentro de unos márgenes que van de 75 a 85, se concentra, bajo la acción de presión reducida, con el mantenimiento en la etapa (b) de crecimiento de los cristales.

4. Un procedimiento para la producción de 1-cestosa cristalina, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde, la etapa (b) de crecimiento de los cristales, se realiza a una presión absoluta de 40 a 200 mmHg, y a una temperatura del concentrado, comprendida dentro de unos márgenes que van de 40 a 70°C.

30 5. Un procedimiento para la producción de 1-cestosa cristalina, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde, el concentrado, se calienta a una temperatura que va de 70 a 95°, en la etapa (c) de disolución de los microcristales.

6. Un procedimiento para la producción de 1-

8. Un procedimiento para la producción de 1-cestosa cristalina, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde, en la etapa (a), la etapa (a') o en la etapa (α), se utiliza una solución de 1-cestosa de alta pureza, de la cual, el contenido de nistosa es del 10%, o menos, del contenido de 1-cestosa.

5 9. Un procedimiento para la producción de 1-cestosa cristalina, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde, la 1-cestosa cristalina, se recupera a la temperatura ambiente.

10 10. Un procedimiento continuo para la producción de 1-cestosa cristalina, en donde, el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, se realiza otra vez, para recuperar 1-cestosa cristalina, a partir de la solución de azúcar, que contiene 1-cestosa, a partir de la cual, se han recuperado cristales en el procedimiento en concordancia con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y, en caso necesario, el procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, se realiza otra vez, para recuperar 1-cestosa cristalina, a partir de la solución de azúcar que contiene 1-cestosa, a partir de la cual se han recuperado los cristales.