(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 576 359**

(51) Int. Cl.:

C07H 17/04 (2006.01)
C12P 19/60 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2010 E 14159427 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.06.2016 EP 2743276**

(54) Título: **Composición particulada que contiene ácido 2-O-alfa-D-glucosil-L-ascórbico cristalino anhidro, proceso para producir la misma y usos de la misma**

(30) Prioridad:

03.09.2009 JP 2009204142
28.12.2009 JP 2009298857
21.05.2010 JP 2010117835
26.08.2010 JP 2010190139

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.07.2016

(73) Titular/es:

HAYASHIBARA CO., LTD. (100.0%)
675-1 Fujisaki, Naka-ku
Okayama-shi, Okayama 702-8006, JP

(72) Inventor/es:

SHIBUYA, TAKASHI;
IZAWA, SEISUKE;
NISHIMOTO, TOMOYUKI;
FUKUDA, SHIGEHARU y
MIYAKE, TOSHIO

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 576 359 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición particulada que contiene ácido 2-O-alfa-D-glucosil-L-ascórbico cristalino anhidro, proceso para producir la misma y usos de la misma

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición particulada que contiene ácido 2-O-alfa-D-glucosil-L-ascórbico cristalino anhidro y, más particularmente, a una composición particulada apenas solidificable que contiene ácido 2-O-alfa-D-glucosil-L-ascórbico cristalino anhidro.

Descripción de la técnica anterior

Debido a sus actividades fisiológicas ventajosas y a su acción antioxidante, el ácido L-ascórbico se ha utilizado para diversos fines, entre ellos para productos alimenticios y cosméticos. Sin embargo, el ácido L-ascórbico, es inestable debido a su reducibilidad directa y es susceptible de recibir la degradación oxidativa y de perder su actividad fisiológica como defecto crucial. Para superar el defecto, el presente solicitante, como uno de los cosolicitantes de la Literatura de Patente 1, divulgó ácido 2-O-α-D-glucosil-L-ascórbico que está compuesto por una molécula de D-glucosa unida al grupo hidroxilo en la posición C-2 del ácido L-ascórbico (en lo sucesivo en el presente documento, abreviado como "ácido 2-glucósido ascórbico ", en toda la memoria descriptiva). Como características sobresalientes, el ácido 2-glucósido ascórbico no exhibe reducibilidad directa, pero tiene una estabilidad satisfactoria, y ejerce las actividades fisiológicas inherentes al ácido L-ascórbico después de descomponerse en los cuerpos vivos en ácido L-ascórbico y D-glucosa vivir mediante una enzima *in vivo* que existe de forma inherente en los cuerpos vivos. De acuerdo con el procedimiento divulgado en la Literatura de Patente 1, el ácido 2-glucósido ascórbico se forma permitiendo que una enzima de transferencia de sacárido, tal como ciclomaltodextrina glucanotransferasa (abreviada como "CGTasa", en lo sucesivo) o α-glucosidasa actúe sobre una solución que contiene ácido L-ascórbico ácido y el compuesto sacárido α-glucosilo.

En la patente de Literatura 2, el presente solicitante tuvo éxito en la cristalización del ácido 2-glucósido ascórbico a partir de una solución saturada de ácido 2-glucósido ascórbico y divulgó ácido 2-glucósido ascórbico cristalino y una composición particulada que contiene el mismo. Hasta ahora se ha sabido que el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino existe meramente en una forma cristalina anhidra. En las literaturas no patentes 1 y 2 se presentaron datos sobre el análisis de la estructura de rayos X para ácido 2-glucósido ascórbico cristalino.

En las literaturas de patentes 3 y 4 del mismo solicitante que la presente invención se divulgó un proceso para la recogida de una fracción de contenido alto de ácido 2-glucósido ascórbico, que comprende someter una solución que contiene ácido 2-glucósido ascórbico formado mediante una reacción enzimática a cromatografía en columna usando una resina ácida de intercambio de cationes ácidos fuertes y la recolección de la fracción. En la literatura de patentes 5, el mismo solicitante divulgó un proceso para producir un producto de contenido alto de ácido 2-glucósido ascórbico, que comprende someter una solución que contiene ácido 2-glucósido ascórbico formado mediante una reacción enzimática a electrodiálisis usando una membrana de intercambio aniónico para eliminar las impurezas tales como ácido L-ascórbico y los sacáridos de la solución; y en la literatura de patentes 6, el mismo solicitante divulgó un proceso para producir un producto de contenido alto de ácido 2-glucósido ascórbico, que comprende someter una solución que contiene ácido 2-glucósido ascórbico a una resina de intercambio aniónico y desorber selectivamente los ingredientes adsorbidos en la resina para obtener una fracción rica en ácido 2-glucósido ascórbico.

En la literatura de patentes 7, el mismo solicitante que la presente invención divulgó un proceso para producir ácido 2-glucósido ascórbico, que comprende dejar que la enzima formadora de α-isomaltosil glucosacárido o la enzima formadora de α-isomaltosil glucosacárido en combinación con CGTasa actúe en una solución que contiene ácido L-ascórbico y compuesto de α-glucosil sacárido para formar ácido 2-glucósido ascórbico. Las literaturas de patentes 8 y 9 solicitadas por el mismo solicitante que la presente invención divulgan que la enzima formadora de α-isomaltosil glucosacárido y la enzima de transferencia de α-isomaltosilo catalizan la transferencia de sacárido al ácido L-ascórbico para formar ácido 2-glucósido ascórbico.

Haciendo referencia a los usos de ácido 2-glucósido ascórbico se han realizado muchas propuestas como se muestra en, por ejemplo, las literaturas de patentes 10-29. Dependiendo de sus características ventajosas, el ácido 2-glucósido ascórbico se ha usado convencionalmente como un material para productos alimenticios, cosméticos, productos de parafarmacia, o productos farmacéuticos; y se ha utilizado ampliamente en otros usos donde el ácido L-ascórbico no se podía utilizar debido a su inestabilidad, por no decir los usos convencionales de ácido L-ascórbico.

Como se ha descrito anteriormente, ahora se sabe que el ácido 2-glucósido ascórbico se produce mediante el uso de ácido L-ascórbico y sustancias amiláceas como materiales y diversas enzimas de transferencia de sacáridos. De acuerdo con los resultados ya obtenidos por el presente solicitante hasta ahora, el método para permitir que la

CGTasa, como enzima de transferencia de sacárido, actúe sobre una solución que contiene ácido L-ascórbico y sustancia amilácea es un método industrialmente ventajoso debido a su rendimiento de producción más alto de ácido 2-glucósido ascórbico. Basado en este descubrimiento, el presente solicitante ha estado produciendo composiciones particuladas que contienen ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro mediante el método de permitir que la CGTasa actúe en una solución que contiene ácido L-ascórbico y sustancia amilácea, y comercializando las composiciones particuladas como materiales para cosméticos/productos de parafarmacia y para productos alimenticios, que se comercializan, respectivamente, como "AA2G" y "ASCOFRESH", nombres de productos de tales composiciones particuladas y comercializados por Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japón y Hayashibara Shoji Inc., Okayama, Japón, respectivamente (estas composiciones particuladas convencionales que contienen ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro que se han comercializado como materiales para cosméticos/productos de parafarmacia y para productos alimenticios se abrevian de aquí en adelante a "polvos de calidad de producto de parafarmacia").

Aunque lo polvos de calidad producto de parafarmacia tienen, como norma de calidad, una pureza relativamente alta de hasta 98,0 % en peso o superior en términos de la pureza del ácido 2-glucósido ascórbico y retienen una capacidad de fluidez satisfactoria como polvo (a lo largo de la memoria, “composición(es) particulada(s)” incluyen “polvo(s)”, a menos que se especifique lo contrario) justo después de la producción, tienen el defecto de que pueden solidificarse debido a su carga muerta o absorbancia de humedad, cuando se dejan reposar a unas condiciones de temperatura y humedad relativamente altas durante un periodo de tiempo relativamente largo. Teniendo en cuenta dicho defecto, los polvos convencionales de calidad producto de parafarmacia se han comercializado envasados en bolsas de polietileno por alícuotas de 10 kg de los mismos y se han introducido, junto con los desecantes, en latas de acero con tapas. Incluso con la forma de esa forma del producto, los polvos de calidad producto de parafarmacia, no obstante, siguen el problema de que en ocasiones pueden solidificar y pierden su utilidad como polvos, cuando se almacenan durante un período relativamente largo de tiempo. La solidificación de las composiciones particuladas, que contienen ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro para su uso como un material para cosméticos, productos de parafarmacia, o productos alimenticios, por lo general puede causar problemas en las etapas de, por ejemplo, transporte, tamizado, o mezcla de materiales, cuando una planta de producción está diseñada bajo la premisa de que se utilizarán materiales con capacidad de fluidez satisfactoria.

Literatura de la técnica anterior

i) Literatura de patente

[Literatura de patente 1], patente japonesa Kokai n.º 139288/91
[Literatura de patente 2], patente japonesa Kokai n.º 135992/91
[Literatura de patente 3], patente japonesa Kokai n.º 183492/91
[Literatura de patente 4], patente japonesa Kokai n.º 117290/93
[Literatura de patente 5], patente japonesa Kokai n.º 208991/93
[Literatura de patente 6], patente japonesa Kokai n.º 2002-088095
[Literatura de patente 7], patente japonesa Kokai n.º 2004-065098
[Literatura de patente 8], publicación de patente internacional WO 02010361
[Literatura de patente 9], publicación de patente internacional WO 01090338
[Literatura de patente 10], publicación de patente internacional WO 05087182
[Literatura de patente 11], patente japonesa Kokai n.º 046112/92
[Literatura de patente 12], patente japonesa Kokai n.º 182412/92
[Literatura de patente 13], patente japonesa Kokai n.º 182413/92
[Literatura de patente 14], patente japonesa Kokai n.º 182419/92
[Literatura de patente 15], patente japonesa Kokai n.º 182415/92
[Literatura de patente 16], patente japonesa Kokai n.º 182414/92
[Literatura de patente 17], patente japonesa Kokai n.º 333260/96
[Literatura de patente 18], patente japonesa Kokai n.º 2005-239653
[Literatura de patente 19], publicación de patente internacional WO 06033412
[Literatura de patente 20], patente japonesa Kokai n.º 2002-326924
[Literatura de patente 21], patente japonesa Kokai n.º 2003-171290
[Literatura de patente 22], patente japonesa Kokai n.º 2004-217597
[Literatura de patente 23], publicación de patente internacional WO 05034938
[Literatura de patente 24], patente japonesa Kokai n.º 2006-225327
[Literatura de patente 25], publicación de patente internacional WO 06137129
[Literatura de patente 26], publicación de patente internacional WO 06022174
[Literatura de patente 27], patente japonesa Kokai n.º 2007-063177
[Literatura de patente 28], publicación de patente internacional WO 06132310
[Literatura de patente 29], publicación de patente internacional WO 07086327

ii) Literatura de no patentes

[Literatura de no patente 1] Carbohydrate Research, Takahiko MANDAI et al., Vol. 232, pp. 197-205, 1992

[Literatura de no patente 2] International Journal of Pharmaceutics, Yutaka INOUE et al., Vol. 331, pp. 38-45, 2007

Sumario de la invención

La presente invención, que se hizo para resolver el defecto anterior, tiene como objetivo proporcionar una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro que es más significativamente difícilmente solidificable que las composiciones particuladas convencionales que contienen ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro en un grado para su uso en productos de parafarmacia.

A fin de superar el objeto anterior, los presentes inventores continuaron estudiando sobre la solidificación de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro y encontraron que "ÁCIDO 2-GLUCÓSIDO ASCÓRBICO 999", un nombre del producto de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro para su uso como un reactivo estándar para el análisis, código N.º AG124, comercializado por Hayashibara Biochemical Laboratories Inc., Okayama, Japón (abreviado como "polvo de calidad de reactivo", de aquí en adelante), no solidifica incluso en las condiciones donde un polvo de calidad de producto de parafarmacia sí solidifica y retiene las propiedades de un polvo. Al igual que un polvo de calidad de producto de parafarmacia, el polvo de calidad de reactivo anterior es el producido mediante la purificación de una solución que contiene ácido 2-glucósido ascórbico obtenido a través de una etapa de permitir CGTasa para actuar en una solución que contiene ácido L-ascórbico y la sustancia amilácea, concentrándose la solución purificada y cristalizando el ácido 2-glucósido ascórbico para obtener ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro. El polvo de calidad de reactivo anterior, sin embargo, difiere del polvo de calidad de producto de parafarmacia en que, además de las etapas de producción habituales, se requiere una etapa de recristalización de disolver los cristales una vez obtenidos y luego cristalizar de nuevo el mismo, y una etapa de lavado de lavar repetidamente los cristales recristalizados con agua refinada, etc., para aumentar la pureza del ácido 2-glucósido ascórbico a un nivel de 99,9 % en peso o superior. Por lo tanto, incluso el polvo de calidad de producto de parafarmacia, posiblemente pueda prepararse en una composición particulada apenas solidificable que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro cuando la pureza se puede aumentar a 99,9 % en peso o superior.

Para aumentar la pureza del ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro a un nivel de pureza superior tan alta como al menos 99,9 % en peso, sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, se requerirán las etapas opcionales de una etapa de recristalización y una etapa de lavado con agua refinada o similares, además de las etapas de producción ordinales, lo que da como resultado un incremento desfavorable del tiempo y el trabajo requerido para su producción, causando la pérdida de ácido 2-glucósido ascórbico en las etapas de recristalización y lavado, la reducción del rendimiento de la producción, y aumentando el coste de producción por un amplio margen. Por lo tanto, no es una selección realista simplemente aumentar la pureza del ácido 2-glucósido ascórbico a un nivel de 99,9 % en peso o superior con el fin de obtener una composición particulada apenas solidificable que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro que el polvo de calidad de producto de parafarmacia.

Los presentes inventores continuaron estudiando sobre la solidificación de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro y e investigaron repetidamente de mediante la forma de ensayo y error, y descubrieron, en comparación con los polvos convencionales de calidad de producto de parafarmacia, una composición particulada significativamente apenas solidificable que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro que tiene un mayor grado de cristalinidad de 90 % o superior para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro o un menor nivel de sorción dinámica de vapor de la composición particulada de 0,01 % en peso o inferior, aunque la composición particulada tenga el mismo nivel de pureza del ácido 2-glucósido ascórbico que los de los polvos convencionales de calidad de producto de parafarmacia o tiene una pureza menor que las de un polvo de calidad de reactivo.

Los presentes inventores continuaron además estudiando sobre un proceso para producir una composición particulada, que contiene ácido ascórbico 2-glucósido cristalino anhidro con el grado de cristalinidad identificado anteriormente y que tiene el nivel de sorción dinámica de vapor identificado anteriormente, a escala industrial, y descubrieron que una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro preparado mediante las siguientes etapas pueden prepararse con relativa facilidad a partir de un polvo, que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro cristalizado a partir de la siguiente solución, en una composición particulada con un grado de cristalinidad del 90 % o superior para ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro y un nivel de sorción dinámica de vapor de la composición particulada de 0,01 % en peso o inferior: Permitiendo que la CGTasa y la glucoamilasa, en este orden, actúen sobre una solución que contiene ácido L-ascórbico y sustancia amilácea para formar ácido 2-glucósido ascórbico en un alto rendimiento de producción de 35 % en peso o superior, purificando la solución resultante para aumentar el contenido de ácido 2-glucósido ascórbico hasta más de 86 % en peso, sobre una base de sólidos secos (b.s.s).

En consecuencia, la presente invención proporciona una composición particulada que comprende ácido 2-O-α-D-glucosil-L-ascórbico cristalino y que comprende ácido 2-O-α-D-glucosil-L-ascórbico en una cantidad de más del 98,0 % en peso pero inferior al 99,9 % en peso, sobre una base de sólido seco; que tiene un grado de cristalinidad de 90 % o superior para ácido 2-O-α-D-glucosil-L-ascórbico anhidro, cuando se calcula sobre la base de un perfil de análisis de difracción de polvo de rayos X de dicha composición; que contiene partículas con un tamaño de partícula

de menos de 150 μm en una cantidad de 70 % en peso o superior con respecto a la totalidad de la composición particulada, y los que tienen un tamaño de partícula de al menos 53 μm pero inferior a 150 μm en una cantidad de 40 a 60 % en peso con respecto a la totalidad de la composición; que contiene ácido L-ascórbico y/o D-glucosa; y que tiene un poder reductor de toda la composición de menos de uno por ciento en peso.

El polvo es significativamente apenas solidificable en comparación con los polvos convencionales de calidad de producto de parafarmacia; es fácilmente manipulable como material para productos alimenticios, cosméticos, productos de parafarmacia y productos farmacéuticos; y tiene una importancia y valor excepcionales. Por lo tanto, lograron la presente invención.

La presente invención se define en las reivindicaciones. La materia objeto fuera del alcance de las reivindicaciones se proporciona solo para comparación.

Breve descripción de los dibujos adjuntos

La figura 1 es un ejemplo de patrón de difracción de rayos X en polvo con rayos X característicos para una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, que sustancialmente consiste en ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro.
La figura 2 es un ejemplo de patrón de difracción de rayos X en polvo con rayos X característicos para una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico, que sustancialmente consiste en ácido 2-glucósido ascórbico amorfo.
La figura 3 es un ejemplo de patrón de difracción de rayos X en polvo con una radiación sincotrónica para una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, que sustancialmente consiste en ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro.
La figura 4 es un ejemplo de patrón de difracción de rayos X en polvo con radiación sincotrónica para una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico, que sustancialmente consiste en ácido 2-glucósido ascórbico amorfo.
La figura 5 es un diagrama esquemático de estructura de orden superior de CGTasa derivada de un microorganismo del género *Geobacillus.*
La figura 6 es un diagrama esquemático de residuos catalíticos y regiones conservadas de CGTasa derivada de un microorganismo del género *Geobacillus.*
La figura 7 es una figura de la estructura y el sitio de reconocimiento para las enzimas de restricción de un ADN recombinante "pRSET-iBTC12" que contiene el gen de la CGTasa derivado de un microorganismo del género *Geobacillus,* utilizado en la presente invención.

Explicación de los símbolos

En las figuras 5 y 6, los símbolos "A" a "D" significan el dominio A de la CGTasa, el dominio B de la CGTasa, dominio C de la CGTasa, y el dominio D de la CGTasa, respectivamente.

En la figura. 5, "hélice" significa una estructura de α-hélice; "flecha en forma de placa", estructura de lámina *β*; y estructura de bucle "hebra fina".

En la figura 6, los símbolos [1] a [4] significa las regiones conservadas 1 a 4, habitualmente presentes en la familia de las α-amilasa, respectivamente; el símbolo "●", un residuo catalítico; "D225", el residuo de ácido aspártico 225[a] como uno de los residuos catalíticos de la CGTasa; "D253", residuo de ácido glutámico 253[a] como uno de los residuos catalíticos de la CGTasa; y "D324", residuo de ácido aspártico 324[a] como uno de los residuos catalíticos de la CGTasa.

En la figura. 7, el símbolo "pUC ori" significa el origen de replicación del plásmido pUC; "T7", el promotor de T7; "flecha blanca (Amp)", gen de la resistencia a la ampicilina; y "flecha negro", gen de la CGTasa.

Descripción detallada de la invención

La presente invención resuelve el objeto anterior proporcionando una composición particulada de acuerdo con la reivindicación 1. Se describe una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico en una cantidad de más de 98,0 % en peso pero inferior al 99,9 % en peso, b.s.s., y tiene un grado de cristalinidad de 90 % o superior para ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, cuando se calcula sobre la base de un perfil de análisis de difracción de rayos X en polvo de la composición particulada.

La composición particulada de acuerdo con la presente invención puede tener un nivel de sorción dinámica de vapor de la composición particulada de 0,01 % en peso o inferior, cuando se mantiene a 25 ºC con una humedad relativa de 35 % durante 12 horas después de la eliminación del agua en una corriente de gas nitrógeno.

De acuerdo con la presente invención, la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la presente invención contiene partículas con un tamaño de partícula de menos de 150 μm en

una cantidad de 70 % en peso o más con respecto a la composición particulada completa y los que tienen un tamaño de partícula de al menos 53 µm pero inferior a 150 µm en una cantidad de 40 a 60 % en peso de toda la composición particulada. La composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico anhidro cristalino de la presente invención contiene ácido L-ascórbico y/o D-glucosa y tiene un poder reductor de la composición particulada total de menos de uno por ciento en peso. En una realización preferida, la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la presente invención contiene ácido L-ascórbico en una cantidad de 0,1 % en peso o inferior, b.s.s.

La composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la presente invención como se ha mencionado anteriormente es, típicamente, una composición particulada producida a partir de una solución que contiene ácido 2-glucósido ascórbico obtenido a través de una etapa de permitir que la CGTasa actúe sobre una solución que contiene ácido L-ascórbico y sustancia amilácea.

También se describe un proceso para producir una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, caracterizado por que contiene las etapas de permitir que la CGTasa y la glucoamilasa, en este orden, actúen sobre una solución que contiene ácido L-ascórbico y sustancia amilácea para obtener una solución que contiene ácido 2-glucósido ascórbico en un rendimiento de producción de 35 % en peso o superior de ácido 2-glucósido ascórbico; purificar la solución resultante para aumentar el contenido de ácido 2-glucósido ascórbico a un nivel de más de 86 % en peso, b.s.s.; cristalizar ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro en la solución purificada; recoger el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro cristalizado; y envejecer y secar los cristales recogidos; y, opcionalmente, pulverizar los cristales resultantes.

Ejemplos de la CGTasa utilizados en el proceso de la presente divulgación incluyen cualquiera de las enzimas CGTasa naturales y los que se preparan mediante tecnología de ADN recombinante de forma independiente de su origen y fuentes, siempre que forman ácido 2-glucósido ascórbico en un rendimiento de producción de 35 % en peso o superior, cuando se permite que la CGTasa y la glucoamilasa, en este orden, actúen sobre una solución que contiene ácido L-ascórbico y sustancias amiláceas. Sin embargo, teniendo en cuenta el rendimiento de la producción de ácido 2-glucósido ascórbico, se prefieren las CGTasas últimas descritas derivadas de la cepa Tc-62 de *Geobacillus stearothermophilus* y la cepa TC-27 de *Geobacillus stearothermophilus*, y CGTasas mutantes obtenidas mediante mutación de la CGTasa derivada de la cepa Tc-91 de *Bacillus stearothermophilus* mediante tecnología de ADN recombinante. Entre ellas, la CGTasa de la cepa Tc-62 *Bacillus stearothermophilus* es la utilizada más preferentemente debido a su rendimiento de producción relativamente alto de ácido 2-glucósido ascórbico.

La glucoamilasa utilizada en la presente divulgación no debe restringirse específicamente y se puede usar cualquier enzima recombinante y de origen natural de forma independiente de su origen y fuentes, siempre que forman ácido 2-glucósido ascórbico en un rendimiento de producción de 35 % en peso o superior, cuando se permite que la CGTasa y la glucoamilasa, en este orden, actúen sobre una solución que contiene ácido L-ascórbico y sustancias amiláceas.

La variación en función del tipo de sustancia amilácea utilizada como material, cuando se permite que la CGTasa actúe sobre una solución que contiene ácido L-ascórbico y sustancia amilácea, el rendimiento de la producción de ácido 2-glucósido ascórbico se puede aumentar, permitiendo que actúe sobre la solución una enzima desramificante de almidón tal como isoamilasa y pululanasa, junto con CGTasa.

En una forma de realización preferida del proceso de acuerdo con la presente divulgación, la etapa para la purificación de la solución anterior que contiene ácido 2-glucósido ascórbico para aumentar el contenido de ácido 2-glucósido ascórbico a más de 86 % en peso, b.s.s., se efectúa permitiendo una solución de reacción enzimática después de la filtración y de desalación para el contacto con una resina de intercambio aniónico para adsorber acto seguido el ácido 2-glucósido ascórbico y el ácido L-ascórbico, eliminando sacáridos tales como D-glucosa con agua refinada, alimentando como eluyente una solución acuosa con una concentración de menos de 0,5 N de ácido clorhídrico o de sal(es) para eluir el ácido 2-glucósido ascórbico y el ácido L-ascórbico, concentrando el eluato resultante, alimentando el material eluido concentrado en la cromatografía en columna usando una resina de intercambio catiónico o una resina sintética porosa, y alimentando un eluyente para efectuar la elución. En particular, como la cromatografía en columna con resina de intercambio catiónico, se prefieren las de sistema de lecho móvil simulado usando una resina de intercambio catiónico de ácido fuerte como un material de empaquetado, ya que una fracción deseada con un contenido de ácido 2-glucósido ascórbico de más del 86 % en peso se obtiene preferentemente con el mismo con una eficiencia y rendimiento de la producción satisfactorios.

La presente invención resuelve el objeto anterior proporcionando un material pulverulento para productos alimenticios, cosméticos, productos de parafarmacia y productos farmacéuticos, que consiste en la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la presente invención.

Los ejemplos de los materiales para productos alimenticios ventajosamente utilizables en la presente invención incluyen agentes enriquecedores de vitamina-C, potenciadores de la producción de colágeno, agentes de blanqueado de la piel, agentes para mejorar el sabor, agentes de mejora de la calidad, agentes de prevención del dorado, acidulantes, cargas, agentes que afectan al cuerpo y antioxidantes. Los ejemplos de los materiales para

productos cosméticos ventajosamente utilizables en la presente invención incluyen agentes de blanqueado de la piel, agentes activadores celulares, potenciadores de la producción de colágeno, agentes enriquecedores de vitamina C, agentes mejoradores del gusto, agentes para mejorar el sabor, acidulantes, cargas, agentes que afectan al cuerpo, estabilizantes y antioxidantes. Los ejemplos de los materiales para productos de parafarmacia ventajosamente utilizables en la presente invención incluyen agentes de blanqueado de la piel, agentes activadores celulares, potenciadores de la producción de colágeno, agentes enriquecedores de vitamina C, agentes mejoradores del gusto, agentes para mejorar el sabor, acidulantes, cargas, agentes que afectan al cuerpo, estabilizantes y antioxidantes. Adicionalmente, los ejemplos de los materiales para productos de parafarmacia ventajosamente utilizables en la presente invención incluyen agentes de blanqueado de la piel, agentes activadores celulares, potenciadores de la producción de colágeno, agentes para preservar órganos, agentes inhibidores de trastorno radical, agentes enriquecedores de vitamina C, agentes de prevención del dorado, cargas, adyuvantes, estabilizantes y antioxidantes.

A continuación se encuentran explicaciones detalladas de la presente invención:

1. Definición de los términos

A lo largo de la memoria descriptiva, los términos que siguen significan lo siguiente:

<Grado de cristalinidad>

El término "un grado de cristalinidad para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro", como se hace referencia en la memoria descriptiva significa un valor definido por la siguiente fórmula [1].

Fórmula [1]:

$$\text{Grado de cristalinidad } (\%) = \frac{Hs - H_0}{H_{100} - H_0} \times 100$$

H_{100}: Un valor analítico para un grado de cristalinidad, determinado con base en el perfil de difracción de rayos X en polvo para una muestra estándar en polvo que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, donde la muestra estándar en polvo consiste sustancialmente en ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro.

H_0: Un valor analítico para un grado de cristalinidad, determinado con base en el perfil de difracción de rayos X en polvo para una muestra estándar en polvo que contiene ácido 2-glucósido ascórbico, donde la muestra estándar en polvo consiste sustancialmente en la forma amorfa de ácido 2-glucósido ascórbico.

Hs: Un valor analítico para un grado de cristalinidad, determinado con base en el perfil de difracción de rayos X en polvo para, como muestra de ensayo, un polvo que contiene ácido 2-glucósido ascórbico.

En la fórmula [1], los perfiles de difracción de rayos X en polvo para la base de la determinación de los valores analíticos H_{100}, H_0 y H_s se pueden determinar, por lo general, mediante un analizador de difracción de rayos X en polvo equipado con un sistema óptico reflectante o transmisivo. Los perfiles de difracción de rayos X en polvo contienen datos para ángulos de difracción y resistencias de difracción del ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro contenidos en un ensayo o muestra estándar. Los ejemplos de métodos para la determinación de los datos analíticos para los grados de cristalinidad de tales muestras incluyen el método Harmans, el método de Vonk, etc. Entre los cuales se prefiere el método de Harmans por su facilidad y precisión. Dado que estos métodos analíticos ahora se han proporcionado como software informáticos, idóneamente se puede usar cualquier analizador de difracción de rayos X en polvo equipado con un aparato de análisis instalado con cualquiera de los programas informáticos anteriores.

Como "una muestra estándar en polvo que contiene ácido 2-glucósido ascórbico anhidro cristalino, donde la muestra estándar en polvo consiste sustancialmente en ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro", para determinar el valor analítico H_{100}, debe usarse un ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro en forma de una composición particulada o monocristal, que tiene una pureza de 99,9 % en peso o superior (a lo largo de la memoria descriptiva, "% en peso" se abrevia como "%", a menos que se especifique lo contrario, pero el "%" fijado en el grado de cristalinidad no debe limitarse a ello), exhibe picos de difracción característicos inherentes al ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, y consiste sustancialmente en ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro. Ejemplos de los que están en forma de una composición particulada o de monocristal incluyen aquellos en forma de una composición particulada de cualquiera de los polvos de calidad de reactivo identificados anteriormente, las composiciones particuladas que contienen ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro obtenido por

recristalización del polvo de calidad reactiva, o ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro en forma de un monocristal. Como referencia, cuando se analizan con un software informático para el método Harmans, un perfil de difracción de rayos X en polvo de la muestra estándar en polvo identificada anteriormente de la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, que consiste sustancialmente en ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, da un valor analítico H_{100}, normalmente, varía de aproximadamente 70,2 % a aproximadamente 70,5 %.

Como "muestra estándar en polvo que contiene ácido 2-glucósido ascórbico, donde la muestra estándar en polvo consiste sustancialmente en la forma amorfa del ácido 2-glucósido ascórbico" para determinar el valor analítico H_0, se debe usar un ácido 2-glucósido ascórbico en forma de una composición particulada, que tiene una pureza de 99,1 % o superior, presenta un patrón de difracción de rayos X en polvo de solamente halo inherente a su forma amorfa, y no exhibe sustancialmente ningún pico de difracción de ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro. Los ejemplos de tal composición particulada incluyen aquellos donde que se obtienen mediante disolución de la muestra estándar en polvo identificada anteriormente para la determinación del valor analítico H_{100} en una cantidad apropiada de agua refinada, concentrando la solución, liofilizando el concentrado y secando el resultante *al vacío* para dar un contenido de humedad de 2,0 % o menos, cuando se determina con el método de Karl Fischer. Con estos tratamientos, se sabe por experiencia que se obtiene una composición particulada que consiste sustancialmente en una forma amorfa. Como referencia, cuando se analizan con un software informático para el método Harmans, un perfil de difracción de rayos X en polvo de la muestra estándar en polvo identificada anteriormente de la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, que consiste sustancialmente en la forma amorfa del ácido 2-glucósido ascórbico, da un valor analítico H_0, normalmente, varía de aproximadamente 7,3 % a aproximadamente 7,6 %.

Como muestra estándar para determinar el valor analítico H_0, no hace falta decir que se prefiere un ácido 2-glucósido ascórbico con una pureza superior, sin embargo, la pureza del ácido 2-glucósido ascórbico de una muestra estándar usada para la determinación del valor analítico H_0, preparada a partir de la muestra estándar usada para determinar el valor analítico H_{100} como se ha mencionado anteriormente, está limitada al 99,1 %, pese a que la pureza de la muestra estándar usada para determinar el valor analítico H_{100} es claramente tan alta como 99,9 % o superior, como se muestra en el experimento 1-1 descrito más adelante. Por lo tanto, la pureza de "una muestra estándar en polvo que contiene ácido 2-glucósido ascórbico, donde la muestra estándar en polvo consiste sustancialmente en la forma amorfa del ácido 2-glucósido ascórbico" está ajustada a 99,1 % o más como se ha mencionado anteriormente.

<Nivel de sorción dinámica de vapor>

El término "nivel de sorción dinámica de vapor", como se hace referencia en la memoria descriptiva significa un valor calculado mediante la siguiente fórmula [2] basada en dos valores de peso determinados en un analizador de sorción/desorción de humedad de una manera tal de eliminar el agua libre de una muestra permitiendo que repose a 25 ºC y una humedad relativa de 0 % en una corriente de gas nitrógeno durante 12 horas, y pesando la muestra resultante; y permitiendo que la muestra repose a 25 ºC y una humedad relativa del 35 % en una corriente de gas nitrógeno durante 12 horas, y pesando inmediatamente la muestra resultante de nuevo:

Fórmula [2]:

$$\text{Nivel de sorción dinámica de vapor (\%)} = \frac{W_{35\%} - W_{0\%}}{W_{0\%}} \times 100$$

$W_{0\,\%}$: Peso de una muestra de ensayo medido inmediatamente después de reposar a 25 ºC y a una humedad relativa de 0 % en corriente de gas nitrógeno durante 12 horas.

$W_{35\,\%}$: Peso de una muestra de ensayo, medido inmediatamente después de la muestra de ensayo, que se había medido para $W_{0\,\%}$, se dejó en reposo a 25 ºC y una humedad relativa del 35 % en una corriente de gas nitrógeno durante 12 horas.

<Poder reductor>

El término "poder reductor de toda la composición particulada", como se hace referencia en la memoria descriptiva significa un porcentaje (%) del contenido de sacárido reductor con respecto al contenido total de azúcar en una muestra de ensayo, calculado mediante la siguiente fórmula [3] basada en el contenido de azúcar reductor y el contenido total de azúcar en términos de D-glucosa, determinado en el método de Somogyi-Nelson y el método de antrona-ácido sulfúrico ampliamente utilizado en la técnica, donde se usa D-glucosa como sustancia estándar.

Fórmula [3]:

$$\text{Poder reductor (\%)} = \frac{\text{Contenido de azúcar reductor}}{\text{Contenido total de azúcar}} \times 100$$

<Distribución del tamaño de partícula>

En la memoria descriptiva, la distribución del tamaño de partícula de una composición particulada se determina como sigue: Tamices e metal con tamaños de abertura de 425, 300, 212, 150, 106, 75 y 53 µm, producidos por Kabushiki Gaisha Iida Seisaku-sho, que cumplen las normas industriales japonesas (JIS Z 8801-1), se pesan con precisión, se apilan en el orden identificado anteriormente y se montan en un agitador de tamización rotatorio "R-1", producido por Kabushiki Gaisha Tanaka Kagaku Kikai Seisaku-sho. Una cantidad prescrita de la muestra pesada se coloca en el tamiz superior (que tiene un tamaño de abertura de 425 µm) entre los tamices apilados, seguido de agitación de los tamices durante 15 minutos al tiempo que se mantienen las condiciones de apilación. Después, cada uno de los tamices apilados se pesó con precisión y el peso de la muestra recogida en cada uno de los tamices se determinó restando el peso de cada uno de los tamices antes de cargar la muestra del peso del tamiz correspondiente después de la agitación. La distribución del tamaño de partícula se expresa mediante el cálculo del porcentaje en peso (%) del peso de la composición particulada recogida en cada uno de los tamices con respecto al de la muestra cargada.

<Rendimiento de producción de ácido 2-glucósido ascórbico>

El término "rendimiento de la producción de ácido 2-glucósido ascórbico", como se hace referencia en la memoria descriptiva significa un contenido (%) de ácido 2-glucósido ascórbico, b.s.s., en una solución de reacción enzimática obtenida al permitir que una enzima tal como la CGTasa actúe en una solución que contiene ácido L-ascórbico y sustancia amilácea.

<Contenido ácido 2-glucósido ascórbico, b.s.s.>

El término contenido de ácido 2-glucósido ascórbico, b.s.s., significa un porcentaje (%) en peso de ácido 2-glucósido ascórbico con respecto al peso total de una muestra que contiene el mismo cuando se calcula excluyendo el agua. Por ejemplo, el significado del contenido de ácido 2-glucósido ascórbico, b.s.s. en una solución es un porcentaje (%) en peso de ácido 2-glucósido ascórbico con respecto al contenido de sólidos totales, excluyendo el agua contenida en la solución. Si bien el significado del contenido de ácido 2-glucósido ascórbico, b.s.s., en una composición particulada es un porcentaje (%) en peso del peso de ácido 2-glucósido ascórbico con respecto a peso total de la composición particulada, cuando se calcula con respecto al peso total de la composición particulada como excluyendo el agua contenida en la composición particulada.

<Actividad de CGTasa>

El término "actividad CGTasa", como se denomina en la presente memoria descriptiva se define como sigue: A cinco mililitros de una solución acuosa de sustrato que contiene 0,3 % (p/v) de un almidón soluble, tampón de acetato 20 mM (pH 5,5), y cloruro de calcio 1mM, se añade 0,2 ml de una solución de enzima diluida apropiadamente, y la solución resultante se mantiene a 40 ºC, y se toman muestras a 0 min y 10 min después de iniciar la reacción enzimática en cantidades respectivas de 0,5 ml, seguido de la adición de inmediato de 15 ml de solución 0,02 N de ácido sulfúrico a cada muestra para suspender la reacción enzimática. Cada una de las soluciones resultantes se mezcla con 0,2 ml de solución de yodo 0,2 N para desarrollar colores, y, después de 10 minutos, las soluciones coloreadas se miden, respectivamente, para determinar la absorbancia a una longitud de onda de 660 nm mediante un espectrofotómetro, seguido del cálculo de la actividad de CGTasa usando la siguiente fórmula [4] como una actividad para la hidrólisis del almidón. Una unidad de actividad de CGTasa se define como la cantidad de enzima que disminuye completamente el color de yodo de una solución que contiene 15 mg de almidón.

Fórmula [4]:

$$\text{Actividad (unidad/ml)} = \frac{Aa - Ab}{Aa} \times \frac{1}{0,2} \times \text{(tasa de dilución)}$$

Nota: “Aa" significa la absorbancia a una longitud de onda de 660 nm de una solución de reacción 0 minutos después de iniciar la reacción enzimática.

“Ab" significa la absorbancia a una longitud de onda de 660 nm de una solución de reacción 10 minutos después de iniciar la reacción enzimática.

<Actividad de la isoamilasa>

El término "actividad de isoamilasa", como se denomina en la presente memoria descriptiva se define como sigue:

A tres mililitros de una solución acuosa de sustrato que contiene 0,83 % (p/v) de almidón céreo soluble de Lintner y tampón de acetato 0,1 mM (pH 3,5), se añaden 0,5 ml de una solución enzimática diluida apropiadamente, y la solución resultante se mantiene a 40 ºC, y se toman muestras a 0,5 min y 30,5 min después de iniciar la reacción enzimática en cantidades respectivas de 0,5 ml, seguido de la adición de inmediato de 15 ml de solución 0,02 N de ácido sulfúrico a cada muestra para suspender la reacción enzimática. Cada una de las soluciones resultantes se mezcla con 0,5 ml de solución de yodo 0,01 N para desarrollar colores a 25 ºC durante 15 minutos, y, después, las soluciones coloreadas se miden, respectivamente, para determinar la absorbancia a una longitud de onda de 610 nm mediante un absorciómetro, seguido del cálculo de la actividad de amilasa usando la siguiente fórmula [5] como una actividad para la hidrólisis del almidón. Una unidad de actividad de la isoamilasa se define como una cantidad de enzima que aumenta la absorbancia por 0.004 a una longitud de onda de 610 nm en las condiciones de medición anteriores.

Fórmula [5]:

$$\text{Actividad (unidad/ml)} = \frac{Aa - Ab}{0{,}004} \times \text{(tasa de dilución)}$$

Nota: “Aa" significa la absorbancia de una solución de reacción a una longitud de onda de 610 nm.
“Ab" significa la absorbancia de una solución control a una longitud de onda de 610 nm.

2. Composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la presente invención

<Grado de cristalinidad y nivel de sorción dinámica de vapor>

Como se ha descrito anteriormente, la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la presente divulgación contiene más de 98,0 %, pero menos de 99. 9 %, b.s.s., de ácido 2-glucósido ascórbico; y tiene un grado de cristalinidad de 90 % o superior para ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, cuando se calcula sobre la base de un perfil de análisis de difracción de polvo de rayos X; o tiene un nivel de sorción de vapor dinámica del 0,01 % o inferior. Como se explica mediante los siguientes experimentos, la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la presente divulgación, que tiene el grado de cristalinidad o el nivel de sorción de vapor dinámica anterior, es significativamente apenas solidificable en comparación con polvos de calidad de producto de parafarmacia, a pesar de que tiene sustancialmente el mismo nivel de pureza del ácido 2-glucósido ascórbico que los polvos de calidad de producto parafarmacia o tiene una menor pureza de ácido 2-glucósido ascórbico que la de un polvo de calidad de reactivo.

Adicionalmente, como se muestra en los siguientes experimentos, entre las composiciones particuladas que contienen más de 98,0 % pero menos de 99,9 %, b.s.s. de ácido 2-glucósido ascórbico, los que tienen un grado de cristalinidad dentro del intervalo anterior tienen un nivel de sorción dinámica de vapor de 0,01 % o inferior, mientras que aquellos con un nivel de sorción dinámica de vapor dentro del intervalo anterior tienen un grado de cristalinidad de 90 % o superior para ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro. Por lo tanto, la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la presente divulgación puede definirse mediante el grado de cristalinidad para ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro o el nivel de sorción dinámica de vapor de la composición particulada y, si es necesario, puede estar definida por ambos.

El significado de la sorción dinámica de vapor es un fenómeno donde el nivel de vapor contenido en una muestra cambia a medida que la humedad alrededor de la muestra cambia a una temperatura constante. Aunque, a diferencia del grado de cristalinidad, el nivel de sorción dinámica de vapor como un índice representativo de la susceptibilidad de la sorción de vapor no es un índice que depende directamente de la estructura cristalina de un polvo como una muestra, se puede especular que el fenómeno de absorción de humedad se refiere a la solidificación de la composición particulada y puede cambiar de manera significativa, dependiendo de la composición de sacáridos, así como la pureza del ácido 2-glucósido ascórbico y el tamaño de partícula de la composición

particulada. Por lo tanto, se considera que el nivel de sorción dinámica de vapor sería un potente índice para la evaluación de la solidificación de la composición particulada por absorción de humedad.

Como se encuentra en los siguientes experimentos, una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro con un nivel de sorción dinámica de vapor de más de 0,05 % se solidifica con relativa facilidad en las condiciones experimentales ensayadas, mientras que aquellos con un nivel de sorción dinámica de vapor de 0,01 % o menor no solidifican sustancialmente en las mismas condiciones. El hecho indica que el nivel de sorción dinámica de vapor junto con el grado de cristalinidad son potentes índices en la realización de una composición particulada sustancialmente apenas solidificable que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro.

La muestra estándar usada para la determinación del valor analítico H_0 en la obtención del grado de cristalinidad, es decir, "una muestra estándar en polvo que contiene ácido 2-glucósido ascórbico que consiste sustancialmente en la forma amorfa del ácido 2-glucósido ascórbico" exhibió un nivel de sorción dinámica de vapor de 1,7 % como se muestra en el experimento 3 descrito más adelante; mientras que la muestra estándar utilizada para la determinación del valor analítico H_{100} en la obtención del grado de cristalinidad, es decir, "una muestra estándar en polvo que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, que consiste sustancialmente en la forma cristalina anhidra del ácido 2-glucósido ascórbico" exhibió un nivel de sorción dinámica de vapor más bajo que el límite de detección y no mostró sustancialmente ninguna sorción de vapor dinámica, como se muestra de manera similar en el Experimento 3.

<Distribución del tamaño de partícula>

La composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la presente invención contiene partículas con un tamaño de partícula de menos de 150 µm en una cantidad de 70 % en peso o más de la composición particulada completa y contiene los que tienen un tamaño de partícula de 53 µm o más pero inferior a 150 µm en una cantidad de 40 a 60 % de toda la composición particulada. Puesto que la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la presente invención puede, por ejemplo, controlarse fácilmente dentro de la distribución del tamaño de partícula identificada anteriormente requerida en materiales para productos alimenticios, tiene el mérito de que puede usarse como material para productos alimenticios, cosméticos, productos de parafarmacia, o productos farmacéuticos de manera similar a los convencionales sin alterar ninguna etapa de producción o regulaciones de materiales convencionales.

<Impurezas de la reacción y poder reductor>

La composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico anhidro cristalino de la presente invención contiene ácido L-ascórbico y/o D-glucosa y tiene un poder reductor de la composición particulada total de menos de uno por ciento. Como es bien conocido, el ácido L-ascórbico y la D-glucosa tienen reducibilidad directa e inducen coloración marrón cuando se calientan en coexistencia con un compuesto que tiene un grupo amino intramolecularmente, tales como aminoácidos y proteínas, y, por lo tanto, preferentemente, no deben estar presentes en una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro como producto. Sin embargo, por ejemplo, en la producción de una composición particulada, que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, obtenido a través de una etapa de permitir que una enzima, tal como la CGTasa, actúe sobre una solución que contiene ácido L-ascórbico y sustancia amilácea, las impurezas de reacción, tales como ácido L-ascórbico intacto y D-glucosa derivados de la sustancia amilácea material coexistirán inevitablemente en la composición particulada producida de este modo a cualquier tasa. Por ejemplo, en polvos convencionales de calidad de producto de parafarmacia, las cantidades de ácido L-ascórbico y D-glucosa contenidos en los mismos podrían alcanzar aproximadamente un uno por ciento, b.s.s., en total, y esto puede inducir una reacción de coloración marrón impredecible cuando se utilizan como materias primas para productos alimenticios, etc.

Por lo tanto, en la presente invención, al tiempo que permite la incorporación inevitable de ácido L-ascórbico y/o D-glucosa, el poder reductor de toda la composición particulada de la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro se controla a menos del uno por ciento. Como se muestra en los experimentos descritos más adelante, en la producción de la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la presente invención mediante el proceso de acuerdo con la presente divulgación, el poder reductor de toda la composición particulada se puede ajustar fácilmente a menos de uno por ciento. Siempre que el poder reductor de toda la composición particulada sea menos de uno por ciento, las composiciones en partículas que contienen ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, que aún contiene ácido L-ascórbico y/o D-glucosa, no inducen sustancialmente la coloración marrón, incluso cuando calientan en presencia de un compuesto con un grupo amino intramolecular, tales como aminoácidos y proteínas. En consecuencia, cualquier composición particulada que contienen ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, que contiene ácido L-ascórbico y/o D-glucosa y tiene un poder reductor de cada composición particulada total de menos de uno por ciento, tiene el mérito de que se puede incorporar en productos alimenticios, cosméticos, productos de parafarmacia y productos farmacéuticos en general sin miedo a causar coloración o un cambio de color. A este respecto, cuando el poder reductor de toda la

composición particulada es inferior al uno por ciento, el contenido total de ácido L-ascórbico y D-glucosa es de 0,2 % o menor, b.s.s., para la composición particulada.

En una realización más preferida, la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la presente invención tiene un contenido de ácido L-ascórbico de 0,1 % o inferior, b.s.s. Tal como se utiliza en los productos alimenticios o similares, como un antioxidante o secuestrante de oxígeno, el ácido L-ascórbico tiene una reactividad alta con el oxígeno. Debido a esto, se considera que el ácido L-ascórbico no solo induce coloración marrón cuando se calienta en presencia de compuestos que tienen grupos amino intramolecularmente, sino que también se refiere claramente a la coloración de composiciones particuladas *per se.* De hecho, como se muestra en el experimento descrito más adelante, de acuerdo con el hallazgo obtenido por los presentes inventores, los polvos de calidad de producto de parafarmacia que contienen aproximadamente 0,2 % de ácido L-ascórbico ocasionalmente inducen un fenómeno que se *en sí mismos* empiezan a mostrar una coloración de color marrón claro, cuando se almacena en la forma mencionada anteriormente durante un período relativamente largo de tiempo. Por el contrario, en el caso de que una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro tiene un contenido de ácido L-ascórbico de 0,1 % o inferior, que en sí mismo es libre de causar temor de que se produzca una coloración marrón claro, incluso cuando se almacenan en la misma forma de producto que los polvos de calidad de producto de parafarmacia. Para referencia, de acuerdo con el proceso de producción de la presente divulgación, el contenido de ácido L-ascórbico en la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la presente invención puede hacerse con relativa facilidad del 0,1 % o inferior sin aumentar el coste de producción a través de la etapa de purificación de, sucesivamente, realizar una cromatografía en columna usando una resina de intercambio aniónico para eliminar sacáridos tales como D-glucosa, etc., y luego cromatografía en columna usando una resina de intercambio catiónico o porosa, en particular, aplicando una cromatografía en columna de lecho móvil simultánea utilizando resina de intercambio catiónico como la cromatografía en columna usando resina de intercambio catiónico. 3. Proceso para producir la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro.

La composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la presente divulgación puede prepararse mediante cualquier proceso de producción y no debe limitarse a uno específico producido por un proceso de producción particular, siempre y cuando se trate de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, que contiene ácido 2-glucósido ascórbico en una cantidad de más del 98,0 % pero inferior al 99,9 %, b.s.s., y tiene o bien un grado de cristalinidad de 90 % o superior para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro o una nivel de sorción dinámica de vapor de 0,01 % o inferior.

No obstante, de acuerdo con el siguiente proceso de la presente divulgación, la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la presente invención se produce con relativa facilidad; el proceso contiene básicamente las etapas (1) a (5) siguientes:

(1) Permitir que la CGTasa y la glucoamilasa, en este orden, actúen sobre una solución que contiene ácido L-ascórbico y sustancia amilácea para obtener una solución que contiene ácido 2-glucósido ascórbico en un rendimiento de producción de 35 % o superior;
(2) Purificar la solución resultante que contiene ácido 2-glucósido ascórbico para aumentar el contenido de ácido 2-glucósido ascórbico a más de 86 %, b.s.s.;
(3) someter la solución purificada resultante con un contenido de ácido 2-glucósido ascórbico de más del 86 %, b.s.s., para cristalizar el ácido 2-glucósido ascórbico para formar ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro;
(4) recoger el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro formado; y
(5) envejecer, secar y, opcionalmente, pulverizar la ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro recogido.

Las etapas anteriores se explican a continuación, respectivamente:

<Etapa 1>

La etapa (1) es para la formación de ácido 2-glucósido ascórbico a partir de ácido L-ascórbico y la sustancia amilácea a través de una reacción enzimática. Los materiales y las enzimas utilizados y la reacción enzimática empleada se explican sucesivamente.

A. Materiales y enzimas utilizados

<Ácido L-ascórbico>

Los ejemplos del ácido L-ascórbico usado en la presente divulgación incluyen cualquiera de los que están en la forma de un hidroxi ácido o una sal metálica del mismo, tales como sales de metales alcalinos y sales de metales alcalinotérreos, e incluso se pueden usar mezclas de los mismos sin dificultad.

<Sustancia amilácea>

Los ejemplos de la sustancia amilácea utilizada en la presente divulgación incluyen almidón de patata, almidón de batata, almidón de tapioca, almidón de maíz, almidón de trigo, etc. Entre los cuales se prefierdonde no tienen sustancialmente ninguna estructura ramificada intramolecularmente pero tienen un grado de polimerización de glucosa uniforme; las ciclomaltodextrinas, cicloamilosas, amilosas sintetizadas, etc., son particularmente preferibles porque todas ellas tienen un grado de polimerización de glucosa de 6 a 100 y tienen una estructura de cadena lineal o una estructura cíclica de cadena lineal. Cuando se usan almidones licuados en general e hidrolizados parciales de almidón como la sustancia amilácea, se controlan preferentemente sus grados de polimerización de glucosa mediante hidrólisis de los sitios ramificados de tales almidones mediante el uso de CGTasa en combinación con, por ejemplo, una enzima o más enzimas desramificantes del almidón, tales como isoamilasa (EC 3.2.1.68) y pululanasa (EC 3.3.1.41). La isoamilasa es particularmente preferible como dicha enzima desramificante de almidón porque es fácilmente manipulable en función de su actividad enzimática, especificidad de sustrato, etc.

<CGTasa>

Los ejemplos de la CGTasa (EC 2.4.1.19) utilizados en la presente divulgación incluyen cualquiera de aquellas de origen natural o aquellas que se obtienen mediante tecnología recombinante sin restringir particularmente a sus orígenes y fuentes, siempre que formen ácido 2-glucósido ascórbico en un rendimiento de producción tan alto como de un 35 % en peso o más, cuando se permite que actúen, sucesivamente, junto con la glucoamilasa, en este orden, sobre una solución que contiene ácido L-ascórbico y sustancia amilácea. Los ejemplos de tales enzimas de origen natural incluyen CGTasas derivadas de la cepa TC-62 de *Bacillus stearothermophilus* y la cepa Tc-27 de *Bacillus stearothermophilus* son preferibles por su rendimiento relativamente alto de producción de ácido 2-glucósido ascórbico; entre los cuales, la primera CGTasa derivada de *la* cepa Tc-62 *Geobacillus stearothermophilus* es la más preferible en términos de rendimiento de la producción de ácido 2-glucósido ascórbico.

Los ejemplos de CGTasa obtenidos a través de tecnología de ADN recombinante incluyen, por ejemplo, la que tiene una secuencia de aminoácidos, donde el resto de lisina 228 en la secuencia de aminoácidos de CGTasa producida por *la cepa* Tc-91 de *Geobacillus stearothermophilus,* es decir, la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 ha sido sustituido con un resto de ácido glutámico. Para obtener dicha CGTasa mutante, como es bien conocido, un gen que codifica la secuencia de aminoácidos, donde el resto de lisina 228 en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 se ha sustituido con un resto de ácido glutámico, se introduce en un huésped apropiado tal como *E. coli, Bacillus subtilis,* etc., para transformar el huésped, seguido de la expresión del gen en el transformante.

Las cepas Tc-27, Tc-62 and Tc-91 de *Geobacillus stearothermophilus* identificadas anteriormente son los microorganismos divulgados en la patente japonesa Kokai n.º 63189/75 (publicación de patente japonesa n.º 27791/78) solicitados por el mismo solicitante que el de la presente invención y se han depositado en el National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology, Higashi 1-1-1, Chuo-6, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japón, con los números de registro FERM BP-11142, FERM BP-11143 y FERM P-2225 (conforme al procedimiento de transferencia al depósito internacional bajo el número de registro de FERM ABP-11273), cuando se confirmó el día 14 de julio de 2009. Los microorganismos que una vez se clasificaron en un grupo con el nombre de la especie *Bacillus stearothermophilus* se han transferido ahora todos ellos a un grupo con el nombre de los microorganismos de la especie *"Geobacillus stearothermophilus",* no obstante, el nombre de microorganismos del género *"Bacillus"* todavía se ha utilizado como aquel para llamar a los microorganismos de un género independiente. En estas circunstancias, para evitar confusiones, los microorganismos de las especies *"Bacillus stearothermophilus"* y *"Stearothermophilus Geobacillus"* se describen como aquellos de la especie *" Geobacillus stearothermophilus "* largo de la memoria descriptiva.

<Glucoamilasa>

Cualquier glucoamilasas (EC 3.2.1.3) se puede utilizar sin restricción específica independientemente de sus orígenes y fuentes e incluyen aquellos en forma de una enzima natural y los obtenidos mediante tecnología de ADN recombinante, siempre que la CGTasa y la glucoamilasa, cuando se deja que actúen, en este orden, sobre una solución que contiene ácido L-ascórbico y sustancia amilácea, formen ácido 2-glucósido ascórbico en un rendimiento de producción tan alto como 35 % o superior.

Dado que la glucoamilasa normalmente se añade a una solución de la reacción enzimática después de la solución se calienta para suspender la reacción de transferencia de sacáridos por la CGTasa, los que pueden ejercer una actividad enzimática deseada adecuada para el uso real a una temperatura relativamente alta, por ejemplo, de aproximadamente 40 a aproximadamente 60 ºC con el fin de ahorrar energía y tiempo necesarios para el enfriamiento de la reacción enzimática después de calentar. En uso, cuando la glucoamilasa contiene α-glucosidasa, el ácido 2-glucósido ascórbico resultante se hidrolizará de este modo y deseablemente se usa glucoamilasa sustancialmente libre de α-glucosidasa. Se puede usar cualquier glucoamilasa independientemente de su origen y fuente, siempre que cumpla los requisitos anteriores, por ejemplo, una preparación comercializada de glucoamilasa derivada de un microorganismo del género *Rhizopus,* un nombre de producto de "GLUCOZYME # 20000", una enzima comercializada por Nagase ChemteX, Corp., Osaka, Japón; y preferentemente se pueden usar otras derivadas de un microorganismo del género *Aspergillus*, un nombre de producto de "GLUCZYME AF6" comercializado por Amano Enzyme Inc., Aichi, Japón.

B. Reacción enzimática

A continuación se explica la reacción de transferencia de sacáridos a ácido L-ascórbico. Se deja que la CGTasa actúe sobre una solución, por lo general, una solución acuosa que contiene ácido L-ascórbico y sustancia amilácea. Cuando la CGTasa actúa sobre una solución acuosa de este tipo, uno o más restos de D-glucosa se transfieren al grupo hidroxilo en la posición C-2 del ácido L-ascórbico, dando lugar a la formación de ácido 2-glucósido ascórbico con un resto de D-glucosa unido al grupo hidroxilo en la posición C-2 anterior, y otros ácidos α-glicosil-L-ascórbicos tales como ácido 2-0-α-maltosil-L-ascórbico, ácido α 2-0-maltotriosil-L-ascórbico y ácido 2-0-α-maltotetraosil-L-ascórbico, que tienen al menos dos restos de D-glucosa unidos al grupo hidroxilo en la posición C-2 anterior.

Normalmente se deja que la CGTasa actúe sobre una solución acuosa, preparada previamente para disolver el ácido L-ascórbico y la sustancia amilácea para dar una concentración de sustrato de 1 a 40 %, en una cantidad de 1 a 500 unidades/g de sustancia amilácea, seguido de un enzimática de reacción a un pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 10 y una temperatura de 30 a 70 ºC durante al menos seis horas, preferentemente, de aproximadamente 12 a aproximadamente 96 horas. Dado que el ácido L-ascórbico es susceptible a la oxidación, la solución debería, preferentemente, mantenerse en condiciones anaerobias o reductoras durante la reacción enzimática, al tiempo que se protege de la luz y coexistiendo, opcionalmente, por ejemplo, un agente reductor tal como tiourea o sulfuro de hidrógeno.

La relación en peso, b.s.s., de la sustancia amilácea y el ácido L-ascórbico en la solución deben ser, preferentemente, de 8:2 a 3:7. Cuando la relación de la sustancia amilácea supera el intervalo anterior, la transferencia de sacárido a ácido L-ascórbico procede eficazmente; sin embargo, el rendimiento de la producción de ácido 2-glucósido ascórbico está restringido por la concentración inicial de ácido L-ascórbico, dando lugar a un nivel relativamente bajo. Mientras que, cuando la relación de ácido L-ascórbico supera el intervalo anterior, el ácido L-ascórbico intacto permanecerá en una cantidad considerable y esto no es preferible en una producción a escala industrial. De acuerdo con lo anterior, la relación identificada anteriormente se considera la mejor.

Además de la CGTasa, en el caso de la utilización de la isoamilasa como enzima desramificante del almidón, tales preferentemente se debe permitir que la isoamilasa actúe sobre la sustancia amilácea en coexistencia con la CGTasa, en una solución que contiene ácido L-ascórbico y sustancia amilácea, donde la cantidad de isoamilasa que se va a añadir es, generalmente, de 200 a 2.500 unidades/g de sustancia amilácea y la enzima se hace reaccionar enzimáticamente a una temperatura de 55 ºC o más baja, variando en función de la temperatura óptima y el pH de la isoamilasa utilizada. Cuando se usa la pululanasa como enzima desramificante de almidón, se pude usar de acuerdo con el caso de la isoamilasa.

Una vez completada una reacción enzimática con CGTasa sola o junto con una enzima desramificante de almidón como un todo, la solución de la reacción enzimática resultante se calienta instantáneamente para inactivar la CGTasa sola o en combinación con la enzima desramificante de almidón y suspender la reacción enzimática, seguido de permitir que la glucoamilasa actúe sobre la solución resultante. Mediante la acción de la glucoamilasa, una cadena de dos o más restos de D-glucosa unidos al grupo hidroxilo en la posición C-2 del ácido L-ascórbico se escinde para transformar el ácido α-glicosil-L-ascórbico, tal como ácido 2-0-α- maltosil-L-ascórbico, ácido α-2-0-maltotriosil-L-ascórbico y ácido 2-0-α-maltotetraosil-L-ascórbico en ácido 2-glucósido ascórbico en un mayor rendimiento de producción tan alto como de 35 % o superior, preferentemente, de 37 a 45 % de ácido 2-glucósido ascórbico.

En el caso de que el rendimiento de producción de ácido 2-glucósido ascórbico sea del 35 % o mayor, preferentemente de 37 a 45 %, facilita la obtención de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro que tiene un grado de cristalinidad de 90 % o más alto para ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro o un nivel de sorción dinámica de vapor de 0,01 % o menor de la composición particulada a través de las siguientes etapas (2) a (5). La razón por la cual el límite superior del rendimiento de la producción preferible se establece en 45 % es la siguiente: es sustancialmente difícil superar el límite superior en vista de nivel tecnológico de ingeniería enzimática de hoy, mientras que incluso si el rendimiento de la producción de ácido ascórbico 2- glucósido se incrementa a más del 45 %, el grado de cristalinidad para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro en la composición particulada resultante y el nivel de sorción de vapor dinámica de la misma no mejorarían tanto.

En el caso de que el rendimiento de producción de ácido 2-glucósido ascórbico sea menor del 35 %, es difícil obtener una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro que tiene un grado de cristalinidad de 90 % o más alto para ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro o un nivel de sorción dinámica de vapor de 0,01 % o menor de la composición particulada, incluso si se separa mediante las siguientes etapas (2) a (5). Aunque la razón es incierta, se puede especular que la dificultad anterior sería dependiente de una cantidad relativa de ácido 5-0-α –glucosil-L-ascórbico-ácido ascórbico y ácido-6-O-α-glucosil-L-ascórbico como subproductos productos que se forman inevitablemente cuando se permite que la CGTasa actúe sobre una solución que contiene ácido L-ascórbico y sustancia amilácea.

En general, el ácido 5-O-α-glucosil-L-ascórbico y el ácido 6-O-α-glucosil-L-ascórbico, donde el resto de D-glucosa se une al grupo hidroxilo en la posición C-5 o C-6 de ácido L-ascórbico, son reconocidos como sustancias inhibidoras de la cristalización que inhiben la cristalización de ácido 2-glucósido ascórbico y estos ácido 5-0-α-glucosil-L-ascórbico y ácido 6-O-α-glucosil-L-ascórbico se forman inevitablemente como subproductos, junto con el ácido 2-glucósido ascórbico y los ácidos α-glicosil-L-ascórbicos mencionados anteriormente. El contenido de los subproductos anteriores generalmente es tan bajo como de aproximadamente un uno por ciento, b.s.s., en total; sin embargo, la retirada de los mismos es generalmente difícil debido a que estos productos transferidos a sacáridos se eluyen en sustancialmente la misma posición que la del ácido 2-glucósido ascórbico en la etapa de purificación convencional con una columna. Sin embargo, cuando se forma ácido 2-glucósido ascórbico en un rendimiento de producción tan alto como de 35 % o más, preferentemente, de 37 a 45 %, permitiendo la que GTasa natural o recombinante mencionada anteriormente actúe sobre una solución que contiene ácido L-ascórbico y sustancia amilácea, el rendimiento de la producción de ácido 5-0-α-glucosil-L-ascórbico y ácido 6-0-α-glucosil-L-ascórbico no supera el 0,5 %, b.s.s., en total. Como resultado, se puede especular que la cristalización posterior de ácido 2-glucósido ascórbico en una composición particulada de ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro procederá más suavemente.

Además, también se puede especular que lo siguiente se refiere a la teoría anterior; cuando se usa CGTasa como enzima de transferencia de sacáridos, la manera de unión entre los restos de D-glucosa en ácido α-glicosil-L-ascórbico tal como α de ácido 2-O-α-maltosil-L-ascórbico, ácido 2-O-α-maltotriosil-L-ascórbico, etc., es el enlace α-1,4, incluso cuando dos o más restos de D-glucosa se transfieren al grupo hidroxilo en la posición C-2 del ácido L-ascórbico. Por lo tanto, la unión entre los restos de D-glucosa anteriores se escinde fácilmente mediante la acción posterior de la glucoamilasa para convertir el ácido glicosil-L-ascórbico en ácido 2-glucósido ascórbico; y, por ejemplo, no hay temor de que queden sustancias inhibidoras de la cristalización, tales como α-ácido-glicosil-L-ascórbico que tiene una estructura ramificada, tal como el enlace α-1,6, incluso después del tratamiento con glucoamilasa, como cuando se usa la enzima formadora de α isomaltosil glucosacárido.

<Etapa 2>

La etapa (2) es para purificar una solución que contiene ácido 2-glucósido ascórbico obtenido en la etapa (1) anterior para aumentar el contenido de ácido 2-glucósido ascórbico a más de 86 %, b.s.s.; la solución que contiene ácido 2-glucósido ascórbico obtenido en la etapa (1) se decolora y se filtra con un carbón activado, etc., seguido de desalación del filtrado resultante con una resina de intercambio catiónico y aplicando la solución desalada a cromatografía en columna para purificar la solución para dar un contenido de ácido 2-glucósido ascórbico de más del 86 %, preferentemente 88 % o superior, b.s.s. Como cromatografía en columna usada para la purificación, básicamente se puede usar cualquier cromatografía en columna, siempre que aumenten el contenido de ácido 2-glucósido ascórbico en una solución a más de 86 % b.s.s., no obstante, los ejemplos preferidos de estas son cromatografía en columna que utiliza una resina de intercambio catiónico o resina porosa, seguido de cromatografía en columna con una resina de intercambio aniónico para eliminar los sacáridos, tales como D-glucosa. Los ejemplos de las resinas de intercambio aniónico deseadas para retirar sacáridos tales como D-glucosa incluyen "AMBERLITE IRA411S" y "AMBERLITE IRA478RF" (ambas comercializadas por Rohm & Hass Company, Philadelphia, EE.UU.); y "DIAION WA30" (comercializada por Mitsubishi Chemical Corp., Tokio, Japón). Los ejemplos de las resinas de intercambio catiónico deseadas para separar el ácido 2-glucósido ascórbico del ácido L-ascórbico incluyen "DOWEX 50WX8" (comercializada por Dow Chemical Co., Midland, EE.UU.); "AMBERLITE CG120" (c comercializada por Rohm&Hass Company, Philadelphia, EE.UU.); "XT-1022E" (comercializada por Tokyo Organic Chemical Industries, Ltd., Tokio, Japón); y "DIAION SK104" y "DIAION UBK 550"(ambas comercializadas por Mitsubishi Chemical Corp., Tokio, Japón). Los ejemplos de las resinas porosas deseadas incluyen "TOYOPEARL HW-40" (comercializada por "Tosoh Corp., Tokyo, Japón); y "CELLFINE GH-25" (comercializada por Chico Corp., Tokio, Japón). En el caso de llevar a cabo la cromatografía en columna utilizando resinas de intercambio catiónico o resinas porosas, las condiciones preferibles son las siguientes: La concentración de sólidos de una solución de material que se alimenta en la columna es de aproximadamente 10 % a aproximadamente 50 %, el volumen de carga en una resina es de aproximadamente 1/1.000 a 1/20 veces de un volumen de resina húmeda, y agua purificada en una cantidad más o menos igual al volumen de la resina húmeda se alimentan a una velocidad lineal de 0,5 a 5 m/hora. Entre los cuales, en el caso de utilizar una cromatografía en columna de lecho móvil simulado como la cromatografía en columna usando una resina de intercambio catiónico, dicha cromatografía en columna es preferible, ya que aumenta la pureza del ácido 2-glucósido ascórbico en el producto purificado resultante y reduce concomitantes tales como ácido L-ascórbico y D-glucosa, en particular, se reduce el contenido de ácido L-ascórbico y forma una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro con un contenido de ácido L-ascórbico de 0,1 % o inferior, b.s.s. Para referencia, variando en función de una temperatura de operación/caudal de ajuste, las condiciones de elución preferibles para la cromatografía en columna de lecho móvil simulado, donde se utiliza una resina de intercambio catiónico se usa como material de empaquetamiento, son las siguientes: la concentración de una solución, que contiene ácido 2-glucósido ascórbico alimentado en la cromatografía en columna anterior, es del 60 % o menor, el volumen de carga de la solución que contiene ácido 2-glucósido ascórbico es 1/20 veces en volumen o menor del volumen de la resina húmeda, y el volumen de agua purificada utilizada como eluyente es de no más de 30 veces en volumen, por lo general, de 5 a 20 veces en volumen del volumen de carga anterior.

Cuando el contenido de ácido 2-glucósido ascórbico en la solución es del 86 % o menor, b.s.s., es difícil obtener una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro que tiene un grado de cristalinidad de 90 % o más alto para ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro o un nivel de sorción dinámica de vapor de 0,01 % o menor de la composición particulada, incluso cuando se trata con las etapas sucesivas (3) a (5). Se especula que la razón es que, cuando el contenido de ácido 2-glucósido ascórbico en la solución es 86 % o inferior, b.s.s., la pureza del ácido 2-glucósido ascórbico en la composición particulada resultante que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro obtenido a través de la las etapas posteriores es relativamente baja y esto dificulta la cristalización suave del mismo.

La solución purificada para dar un contenido de ácido 2-glucósido ascórbico de más de 86 %, preferentemente de 88 % o superior, b.s.s. se concentra para dar una concentración prescrita, por lo general, una concentración de aproximadamente 65 a aproximadamente 85 % de ácido 2-glucósido ascórbico, antes de la etapa de cristalización de ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro. El concentrado se controla normalmente para que tenga una temperatura de aproximadamente 30 a aproximadamente 45 ºC. El concentrado, que tiene la concentración y la temperatura, corresponde a la solución que contiene el ácido 2-glucósido ascórbico con un grado de saturación de 1,05 a 1,50.

<Etapa 3>

La etapa (3) es para la cristalización de ácido 2-glucósido ascórbico a partir de una solución que contiene más de 86 %, preferentemente 88 % o más, b.s.s., de ácido 2-glucósido ascórbico en ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro; la solución que contiene ácido 2-glucósido ascórbico, previamente purificado y concentrado para dar una pureza prescrita y la concentración, y controlado a una temperatura prescrita en la etapa (2), se transfiere a un cristalizador, se mezcla con 0,1 a 5 % de un cristal de siembra de ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, y se agita suavemente, seguido de enfriamiento gradual de la temperatura de la solución a 5-20 ºC durante 6 a 48 horas para cristalizar el ácido 2-glucósido ascórbico para formar ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro. Cuando ya está presente en el cristalizador, etc. un cristal de siembra de ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, no hay necesidad de añadir particularmente un cristal de siembra. En todos los casos, la cristalización de ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro a partir del concentrado anterior se efectúa preferentemente en presencia de dicho cristal de siembra. Si es necesario, la concentración de la solución purificada y la cristalización de del ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro en la solución se puede llevar a cabo de forma simultánea en una forma tal como un proceso de ebullición.

<Etapa 4>

La etapa (4) es para recoger el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro cristalizado; la masa cocida se recoge del cristalizador y, después, el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro se recoge por centrifugación.

<Etapa 5>

La etapa (5) es para el envejecimiento del ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro recogido y secado del producto seco resultante, y opcionalmente pulverizado; el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro recogido por centrifugación se lava con una pequeña cantidad de agua purificada, tal como agua desionizada y agua destilada, para lavar las impurezas adsorbidas en la superficie de los cristales. La cantidad de agua utilizada para el lavado no debe estar restringida específicamente, sin embargo, una cantidad excesiva de ella disuelve los cristales *per se,* así como las impurezas, lo que da lugar a una reducción del rendimiento de producción y a un incremento del coste de lavado. Por lo tanto, las superficies de los cristales se lavan normalmente, preferentemente, con agua en una cantidad de hasta 30 %, preferentemente, del 15 al 25 % del peso de los cristales. El lavado se lleva a cabo preferentemente con una fuerza centrífuga de una manera tal de colocar los cristales en una centrífuga de tipo cestillo. Los cristales recogidos de este modo y lavados se envejecen y se secan manteniéndolos en una atmósfera con una temperatura y humedad predeterminadas durante un período de tiempo prescrito para convertir los cristales resultantes en una composición particulada con un grado de cristalinidad de 90 % o superior para ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro o un nivel de sorción dinámica de vapor del 0,01 % o inferior.

Aunque la temperatura del producto de la composición particulada que contiene cristales en las etapas de envejecimiento y de secado, la humedad relativa de la atmósfera y el tiempo para el envejecimiento y el secado no se deben restringir específicamente siempre que se obtenga la composición particulada con el grado deseado de cristalinidad o el nivel de sorción dinámica de vapor deseados. Sin embargo, la temperatura del producto y la atmósfera deben respectivamente, preferentemente, mantenerse a una temperatura de 20 a 55 ºC y con una humedad relativa de 60 a 90 % en las etapas de envejecimiento y secado. El tiempo total para las etapas de envejecimiento y de secado es, preferentemente, de aproximadamente 5 a aproximadamente 24 horas. La composición particulada que contiene cristales, obtenida a través de las etapas de envejecimiento y de secado, se enfría de un modo no forzado a una temperatura ambiente en una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro con un grado de cristalinidad de 90 % o mayor para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro o un nivel de sorción dinámica de vapor del 0,01 % o inferior. La composición particulada cristalina obtenida de este modo se convierte en un producto final con o sin pulverización opcional.

Excepto para el rendimiento de la producción de ácido 2-glucósido ascórbico en la etapa (1) anterior y el contenido de ácido 2-glucósido ascórbico de cualquiera de las soluciones de las etapas anteriores (2) y (3), las etapas anteriores (1) a (5) son, básicamente, las mismas que las etapas de la producción de polvos de calidad de producto de parafarmacia y están libres de cualquier etapa para recristalización y para el lavado repetido de cristales, que son ambas indispensables en el proceso de producción de polvos de calidad de reactivo.

La composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro obtenido de este modo se convierte bastante rápido en una composición particulada sustancialmente no higroscópica con una capacidad de fluidez mejorada mediante enfriamiento no forzado después de las etapas de envejecimiento y secado, sin embargo, el grado de cristalinidad para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro no aumenta a 90 % o más y el nivel de sorción dinámica de vapor de la composición particulada no baja a 0,01 % o menor, cuando el tiempo de enfriamiento no forzado es demasiado corto. Cuando una composición particulada, preparada con un tiempo de enfriamiento no forzado corto, se convierte directamente en un producto final, solo se obtiene una composición particulada que, posiblemente, se solidifica en circunstancias normales de almacenamiento de manera similar a los polvos de calidad de producto de parafarmacia. Al estar influido por la temperatura y la humedad atmosféricas y también al variar en función de la escala y la estructura de los aparatos/instalaciones utilizados para el secado, el posible requisito de tiempo de enfriamiento no forzado más corto para la obtención de la composición particulada apenas solidificable de la presente invención se considera que es casi constante en condiciones constantes. Por lo tanto, cuando la relación entre (i) el requisito de tiempo de enfriamiento no forzado para ajustar el grado de cristalinidad al 90 % o superior para ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro y ajustar el nivel de sorción dinámica de vapor cuando tiene incluso un nivel de una composición particulada del mismo a 0,01 % o inferior, y (ii) la temperatura y la humedad atmosféricas, se examinan una vez con aparatos e instalaciones específicas para el uso real, no es necesario en cada caso para examinar el grado de cristalinidad y el nivel de sorción de vapor dinámica de una composición particulada en cada momento de la producción, pero la composición particulada de la presente invención se puede obtener mediante el uso del tiempo de enfriamiento no forzado anterior como índice.

Los presentes inventores encontraron además que, en lugar del enfriamiento no forzado de la composición particulada que contiene cristales después del envejecimiento y secado identificados anteriormente, por ejemplo, un enfriamiento forzado soplando un aire limpio con aproximadamente la temperatura ambiente a la composición particulada para bajar la temperatura a aproximadamente la temperatura ambiente se produce suavemente la cristalización de ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro en una composición particulada con un grado de cristalinidad de 90 % o superior para ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro y un nivel de sorción dinámica de vapor de 0,01 % o menor en un período de tiempo relativamente corto. El aire de soplado tiene preferentemente una temperatura que varía de aproximadamente 15 a aproximadamente 30 ºC, más preferentemente, de 18 a 28 ºC. Además, el tiempo de soplado es, por lo general, preferentemente, de aproximadamente 5 a aproximadamente 60 minutos, más preferentemente, de 10 a 30 minutos. Al variar en función de la temperatura del aire de soplado, el efecto del enfriamiento forzado no se observa tan claramente con un tiempo de soplado de menos de cinco minutos, mientras que no se espera un incremento mejorado del grado de cristalinidad, incluso con un tiempo de soplado de más de 60 minutos y, por lo tanto dicho tiempo de soplado no es preferible. En el caso del aire de soplado, el efecto de enfriamiento debe ejercerse, preferentemente, en la totalidad de la composición particulada que contiene cristales, tanto mediante agitación como vibración apropiadas de la composición particulada.

La composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro obtenido de este modo es de la presente divulgación, que contiene ácido 2-glucósido ascórbico en una cantidad de más del 98,0 % pero inferior al 99,9 %, b.s.s., y, o bien tiene un grado de cristalinidad de 90 % o superior para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, cuando se calcula sobre la base de un perfil de análisis de difracción de rayos X en polvo de la composición particulada, o tiene un nivel de sorción dinámica de vapor de 0,01 % o menor, cuando se mantiene a 25 ºC con una humedad relativa del 35 % durante 12 horas después de la retirada del agua libre de la composición particulada en una corriente de gas nitrógeno. Comparando con los polvos convencionales de calidad de producto farmacéutico, la composición particulada es una composición particulada significativamente apenas solidificable que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, incluso en las condiciones donde los polvos convencionales se solidificarán.

Entre paréntesis, la solidificación de los materiales tiene el inconveniente de afectar de forma variada a las plantas de producción. Por ejemplo, en el campo de una producción de alimentos donde se utilizan materiales pulverulentos, tales materiales con frecuencia se pulverizan finamente mediante trituradoras de rodillos, se transportan por aire a las líneas de producción mediante soplado de aire y se transportan mediante transportadores de bobina en zigzag. En tales ocasiones, si se solidificaran los materiales pulverulentos, se inducirían a los siguientes acontecimientos problemáticos: Los rodillos de las trituradoras de rodillos pueden quedar dañados o quemados, o se pueden bloquear los tamices y los tubos de transporte instalados en las líneas de producción. Además, los materiales pulverulentos solidificados tienen un alto riesgo de causar acontecimientos problemáticos operativos en su disolución y en su mezcla o amasado con otros materiales. Los problemas en las etapas de producción causados por la solidificación de tales polvos se describen con detalle en, por ejemplo, "Funryutai-Trouble-Shooting" (resolución de problemas de partículas pulverulentas), editado por Tsutomu Shibata, publicado por Kogyo Chosakai Publishing Co., Ltd., Tokyo, Japón, pp. 15-19, 2006.

Puesto que la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la presente invención es significativamente apenas solidificable en comparación con los polvos de calidad de producto de parafarmacia convencionales tiene la ventaja de que se puede incorporar en uno o más de otros materiales pulverulentos para productos alimenticios, cosméticos, productos de parafarmacia y productos farmacéuticos en el campo de la fabricación de productos alimenticios incluyendo bebidas, así como de cosméticos, productos de parafarmacia y productos farmacéuticos, que se producen en plantas de producción que están diseñadas para el uso de materiales con una capacidad de fluidez satisfactoria en las instalaciones.

Los ejemplos de los materiales pulverulentos identificados anteriormente para productos alimenticios incluyen harinas de cereales, almidones, azúcares en polvo, condimentos en polvo, especias en polvo, zumos en polvo, grasas y aceites en polvo, péptidos en polvo, yemas de huevo en polvo, leche en polvo, leche descremada en polvo, cafés en polvo, cacaos en polvo, *miso en polvo* y verduras en polvo. Los ejemplos de materiales pulverulentos para cosméticos incluyen polvos para la cara, talco, caolín, mica, sericita, almidones, bentonita, polvos de seda, polvo de celulosa, polvos de nylon, sales de baño, piezas de jabón, dióxido de titanio, dióxido de silicio (sílice), y óxido de cinc. Los ejemplos de materiales pulverulentos para productos de parafarmacia incluyen sales de aminoácidos, preparaciones vitamínicas, preparaciones de calcio, excipientes, materiales de carga, fungicidas, y preparaciones enzimáticas. Los ejemplos de materiales pulverulentos para productos farmacéuticos incluyen ingredientes eficaces en polvo; excipientes y cargas, tales como oligosacáridos, lactosa, almidones, dextrinas, azúcares blancos, celulosas cristalinas, ésteres de sacarosa y ésteres de ácidos grasos; y agentes de recubrimiento tales como goma laca. La composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico anhidro cristalino de la presente invención normalmente contiene ácido L-ascórbico y/o D-glucosa y tiene un poder reductor de la composición particulada total de menos de uno por ciento. En detalle, son composiciones particuladas satisfactorias en que, si bien por lo general contienen uno o ambos de ácido L-ascórbico y D-glucosa a un nivel detectable por métodos analíticos tales como cromatografía líquida de alto rendimiento, específicamente en una cantidad de 0,01 % o más alto, pero no superior a 0,2 %, b.s.s., tienen un poder reductor de toda la composición particulada que es menor del uno por ciento, y, por lo tanto, como se muestra en el experimento descrito más adelante, están sustancialmente libres de causar decoloración (coloración marrón) incluso cuando se calienta en presencia de uno o más compuestos con un grupo amino intramolecularmente, tales como aminoácidos y proteínas. Preferentemente, las composiciones particuladas que contienen ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro obtenidas de este modo contienen ácido L-ascórbico en una cantidad de 0,1 % o inferior. Cuando una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro tiene un contenido de ácido L-ascórbico tan bajo como de 0,1 % o inferior, no hay temor de que se produzca decoloración en la composición particulada *per se,* incluso cuando se almacena durante un período relativamente largo de tiempo en la misma forma de producto que los polvos de calidad de producto de parafarmacia convencionales.

Adicionalmente, las composiciones particuladas que contienen ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro obtenidas de este modo se pueden preparar solas en productos de composiciones particuladas que contienen ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, ya que normalmente contienen partículas con un tamaño de partícula de menos de 150 µm en una cantidad de 70 % o más de cada una de las composiciones particuladas enteras y aquellas que tienen un tamaño de partícula de al menos 53 µm pero inferior a 150 µm en una cantidad de 40 a 60 % para cada una de las composiciones particuladas enteras. En el caso en que contienen una cantidad relativamente grande de partículas pulverulentas con un tamaño de partícula más grande que el de las partículas identificadas anteriormente o que tiene una distribución de partículas que difieren de los niveles deseados, se pulverizan apropiadamente para reducir su tamaño de partícula o se clasifican por tamizado o similar para controlar su tamaño de partícula.

Los ejemplos siguientes explican concretamente la presente invención:

Experimento 1: Influencia del grado de cristalinidad sobre la solidificación de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro

Las composiciones particuladas que contienen ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro con diferentes grados de cristalinidad para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro en el intervalo de 0 a 100 % se prepararon y ensayaron para determinar la solidificación para examinar la relación entre el grado de cristalinidad y la capacidad de solidificación. Los detalles son los siguientes:

Experimento 1-1: Preparación de las muestras

<Muestra de ensayo n.º 1>

"ASCORBIC ACID 2-GLUCOSIDE 999" (n.º de código AG124, una pureza de 99,9 % o superior), una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, como una muestra estándar que consiste sustancialmente en ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, se utilizó como muestra de ensayo n.º 1.

<Muestra de ensayo n.º 2>

Una composición particulada, preparada mediante la disolución de la muestra de ensayo n.º 1 en una cantidad adecuada de agua purificada, liofilización de la solución resultante durante tres días y secado del producto resultante *al vacío* a una temperatura de 40 ºC o más baja durante la noche, se utilizó como otra muestra estándar que consiste sustancialmente en ácido 2-glucósido ascórbico amorfo y se denominó "muestra de ensayo n.º 2". La muestra de ensayo n.º 2 tenía un contenido de humedad de 2,0 % cuando se mide con el método de Karl Fischer.

<Muestras de ensayo n.º 3 y 4>

Como muestras de ensayo n.º 3 y 4 con un grado de cristalinidad para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino que está entre los de las muestras de ensayo n.º 1 y 2, las siguientes muestras se prepararon del siguiente modo: una composición particulada que consiste en ácido 2 glucósido ascórbico amorfo preparada de forma similar al método para la muestra de ensayo n.º 2 se extendió sobre una bandeja metálica y se cristalizó parcialmente manteniéndola en una cámara con una temperatura y humedad constantes controladas a una temperatura de 25 ºC y una humedad relativa de 90 % durante 24 o 72 horas para acelerar la cristalización. Sucesivamente, se sacó la bandeja metálica de la cámara, se secó *al vacío* a 38 ºC durante la noche para obtener dos tipos de composiciones particuladas, donde una con un tiempo de mantenimiento de 24 horas en la cámara de temperatura y humedad controladas se llamó "muestra de ensayo n.º 3", mientras que la otra con un tiempo de mantenimiento de 72 horas se llamó "muestra de ensayo nº. 4". Las muestras de ensayo n.º 3 y 4 se introdujeron, respectivamente, en un vial sellado con un tapón y conservado con un desecante en un desecador en una condición de sellado hasta justo antes de someterlas al ensayo de análisis.

Experimento 1-2: Purezas del ácido 2-glucósido ascórbico y grados de cristalinidad de las muestra de ensayo n.º 1 a 4

<Pureza del ácido 2-glucósido ascórbico>

Las purezas del ácido 2-glucósido ascórbico de las muestras de ensayo n.º 1 a 4 se determinaron del siguiente modo: usando agua purificada, cada una de las muestras de ensayo se realizó en una solución acuosa al 2 %, que después se filtró de membrana de 0,45 μm. El filtrado se sometió a cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) en las siguientes condiciones, seguido del cálculo de la pureza del ácido 2-glucósido ascórbico, b.s.s., de cada una de las muestras de ensayo basados en el área del pico de cada cromatograma del índice de refracción. Los resultados se indican en la tabla 1.

Condiciones analíticas

Sistema de HPLC: "LC-10AD", comercializado por Shimadzu Corp., Kyoto, Japón;
Desgasificador: "DGU-12AM", comercializado por Shimadzu Corp., Kyoto, Japón;
Columna: "WAKOPAK WAKOBEADS T-330", H^+-forma, comercializada por Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japón;
Volumen de inyección de la muestra: 10 μl;
Eluyente: 0,01 % (v/v) de solución acuosa de ácido nítrico;
Caudal: 0,5 ml/min;
Temperatura: 25 °C;
Detector del índice de refracción: "RID-10A", comercializado por Shimadzu Corp., Kyoto, Japón;
Aparato de procesamiento de datos: "CHROMATOPAK C-R7A", comercializado por Shimadzu Corp., Kyoto, Japón;

<Grado de cristalinidad>

Los grados de cristalinidad de las muestras de ensayo números 1 a 4 para anhidra del ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro se determinaron mediante: sometiendo cada muestra de ensayo al análisis utilizando "X 'Pert PRO MPD", un nombre del producto de un difractómetro de rayos X en polvo de luz reflejada disponible en el mercado comercializado por Spectris Co., Ltd., Tokio, Japón; irradiando un rayo de CuK α (corriente eléctrica de los rayos X: 40 mA, voltaje eléctrico: 45 kV, longitud de onda: 1,5405 Å), como rayos X característicos irradiados desde la diana d Cu, a la muestra para obtener un perfil de difracción de rayos X en polvo; y determinando el valor de análisis para el grado de cristalinidad de cada una de las muestras de ensayo n.º 1 a 4 mediante el método de Harmans usando un software informático del método de Harman instalado exclusivamente en el difractómetro. Antes del análisis anterior, el grado de partículas y el factor de flexión preestablecido en el software se ajustaron, respectivamente, a los niveles apropiados para la obtención de una línea de base juzgada como la más preferible, teniendo en cuenta los picos solapados mutuamente, la intensidad de la difracción y la intensidad de la dispersión en los respectivos patrones de difracción de rayos X en polvo. El método de Harmans se describe con detalle en P. H. Harmans y A. Weidinger, "Journal of Applied Physics, Vol. 19, pp. 491-506 (1948) y P. H. Harmans y A. Weidinger, "Journal of Polymer Science", Vol. 4, pp. 135-144 (1949).
El grado de cristalinidad de cada muestra de ensayo se calculó sustituyendo los datos siguientes en la fórmula 1 anterior: Hs como el valor del grado de cristalinidad de cada muestra de ensayo; H_{100}, el valor analítico del de la muestra de ensayo n.º 1; y H_0, el valor analítico del de la muestra de ensayo n.º 2. Cuando se analiza mediante el

método de Harmans, el valor analítico del grado de cristalinidad de la muestra de ensayo n.º 1 (valor analítico H_{100}) y el de la muestra de ensayo n.º 2 (el valor analítico H_0) fueron, respectivamente, 70,23 % y 7,57 %. Los resultados también se indican en la tabla 1. Los patrones de difracción de rayos X en polvo de las muestras de ensayo n.º 1 y 2, como muestras estándar, se muestran, respectivamente, en las figuras 1 y 2.

Como se muestra en la figura 2, los picos de difracción claros y agudos específicos del ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro se encontraron en el intervalo de los ángulos de difracción (2 θ) de 4 a 65° en el patrón de difracción de rayos X en polvo de la muestra de ensayo n.º 1, pero no se encontró ningún halo específico del ácido 2-glucósido ascórbico amorfo. Mientras tanto, como se muestra en la figura 2, al contrario que el patrón de difracción de rayos X en polvo de la figura 1, se encontró claramente un halo específico del ácido 2-glucósido ascórbico amorfo como una línea basal aglutinada en el patrón de difracción de rayos X en polvo de la muestra de ensayo n.º 2, pero no se encontró ningún pico de difracción específico del ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro.

Experimento 1-3: Análisis de difracción de rayos X en polvo de las muestras de ensayo n.º 1 y 2 usando una radiación sincotrónica

Este experimento se llevó a cabo para confirmar aún más que las muestras de ensayo n.º 1 y 2 eran muestras estándar adecuadas para la determinación de los valores analíticos H_{100} y H_0. Estas muestras se sometieron a una difractometría de rayos X en polvo con luz transmitida, que detecta una débil difracción y dispersión, utilizando una radiación sincotrónica (llamada "radiación", de aquí en adelante), como una fuente de radiación de rayos X. Las condiciones analíticas fueron las siguientes.

<Condiciones analíticas>

Difractómetro de rayos X en polvo: Modelo "PDS-16", un difractómetro de rayos X en polvo de alta velocidad (modo Debye Scherrer, longitud de la cámara: 497.2 mm) comercializado por Kohzu Precision Co., Ltd., Kanagawa, Japón;
Fuente de radiación de rayos X: "Beam line of Hyogo Prefecture (BL08B2)", radiación de defección de electroimán;
Longitud de onda: 0,7717Å (16,066 keV);
Resistencia: 10^9 fotones/s;
Ángulo de medición: de 2 a 40°;
Tiempo de exposición: 600 s;
Grabación de imágenes: "IMAGING PLATE BAS-2040", placa de obtención de imágenes comercializada por Fujifilm Corp., Tokyo, Japón; y
Analizador de imágenes: "BIO-IMAGE ANALYZER BAS-2500", comercializado por Fujifilm Corp., Tokyo, Japón.

La medición se llevó a cabo mediante el uso de la "línea de haz de la Hyogo Prefecture (BL08B2)" colocado en "Spring-8", una instalación de radiación sincotrónica, 1-1-1 Koto, Sayo-cho, Sayo, Hyogo, Japón.

Antes del análisis de difracción de rayos X en polvo, las muestras de ensayo n.º 1 y 2, respectivamente, se molieron en un mortero y se tamizaron con un tamiz de malla 53 μm. A continuación, cada una de las composiciones particuladas resultantes que se pasaron por el tamiz se inyectaron homogéneamente en "MARKTUBE No. 14", un nombre de producto de un capilar de vidrio para la difracción de rayos X en polvo (diámetro: 0,6 mm, vidrio de Lindeman), comercializado por Toho KK, Tokio, Japón, para dar una longitud de la muestra inyectada de aproximadamente 30 mm. Sucesivamente, el capilar se cortó en el extremo final de la muestra inyectada y el extremo abierto se selló con un adhesivo. A continuación, el capilar se fijó en un soporte para muestras con una arcilla y el soporte para muestras se fijó al difractómetro de rayos X en polvo para dar la dirección longitudinal del capilar perpendicularmente contra el eje óptico del difractómetro de rayos X en polvo.

Para eliminar el efecto adverso de la orientación del ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro en el perfil de difracción de rayos X en polvo, la medición de la difracción de rayos X en polvo se llevó a cabo permitiendo que el soporte de la muestra se correspondiera a una velocidad uniforme hacia la dirección longitudinal del capilar en una anchura de ± 1,5 mm y a un ciclo de tiempo de una vez/60 segundos, y permitiendo simultáneamente que el soporte de la muestra rotara a una velocidad uniforme alrededor del eje de rotación en la dirección longitudinal del capilar a una ciclo de tiempo de dos veces/segundo.

En los procesos de análisis de los perfiles de difracción de rayos X en polvo y la preparación de los patrones de difracción de rayos X en polvo de las muestras de ensayo n.º 1 y 2, se eliminaron las señales de fondo inherentes al difractómetro de rayos X en polvo de cada perfil de difracción de rayos X en polvo de acuerdo con la manera convencional para mejorar la precisión de la medición. Los patrones de difracción de rayos X en polvo resultantes de las muestras de ensayo n.º 1 y 2 se muestran en las figuras 3 y 4, respectivamente.

Como se muestra en la figura 3, los picos de difracción específicos del ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro aparecieron claramente y de forma pronunciada en el intervalo de los ángulos de difracción (2 theta) de 2 a 40 ° para el patrón de difracción de rayos X en polvo de la muestra de ensayo n.º 1, medido mediante el uso de radiación

sincotrónica. Dado que la longitud de onda de la radiación sincotrónica (0,7717 Å) era diferente de la de los rayos X característicos (1,5405 Å), cada pico de difracción en la figura 3 apareció en aproximadamente un medio del ángulo de difracción (2 θ) de cada uno de los picos correspondientes en la figura 1. Sin embargo, los patrones de difracción de rayos X en polvo en las figuras 1 y 3 coincidían extremadamente bien con los demás. Mientras tanto, la anchura del pico a la mitad de la altura de cada pico de difracción en la figura 3 era evidentemente más estrecha que la de la figura 1, y cada pico de difracción en la figura 3 mostró mayor resolución que la de la figura 1, aunque la resistencia del pico en la figura 3 fue casi 100 veces superior que la de la figura 1. El patrón de difracción de rayos X en polvo en la figura 3 mostró ausencia de halo específico del ácido 2-glucósido ascórbico amorfo, como se muestra en la siguiente figura 4. El resultado indica que el grado de cristalinidad de la muestra de ensayo n.º 1 para el ácido 2-glucósido ascórbico anhidro cristalino es extremadamente alto, y la muestra de ensayo n.º 1 consiste sustancialmente en ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro.

Como se muestra en la figura 4, el patrón de difracción de rayos X en polvo de la muestra de ensayo n.º 2 obtenido mediante el uso de radiación sincotrónica mostró un halo notable específico para el ácido 2-glucósido ascórbico amorfo como una línea de base aglutinada pero ningún pico de difracción específico del ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro. Este resultado indica que la muestra de ensayo n.º 2 consiste sustancialmente en ácido 2-glucósido ascórbico amorfo.

Los resultados anteriores, obtenidos mediante el uso de radiación sincotrónica como fuente de rayos X avalan que las muestra de ensayo n.º 1 y 2 son muestras estándar adecuadas para definir los valores analíticos H_{100} y H_0, respectivamente, para su uso en la fórmula 1.

Experimento 1-4

Ensayo de solidificación

El siguiente experimento fue investigar la propiedad de solidificación de las respectivas muestra de ensayo n.º 1 a 4: Un gramo de cada una de las muestra de ensayo n.º 1 a 4, preparadas en el Experimento 1-1, se colocó por separado en un "TUBO FALCON 2059. ", un nombre de producto de un tubo de polipropileno cilíndrico de 14 ml (1,7 cm de diámetro, 10 cm de altura) que tiene una forma inferior hemiesférica y una tapa, comercializado por Becton, Dickinson and Company, New Jersey, EE.UU.. Los tubos se fijaron a una gradilla para tubos verticalmente y se dejaron reposar durante 24 horas, después de colocar la gradilla para tubos en "IC-410", un nombre de producto de un incubador comercializado por Advantec Toyo Kaisha, Ltd.,, Tokio, Japón, controlada a 50 ºC. Después de la incubación, se sacaron los tubos de la incubadora, seguido de la retirada de cada tapa, sacando cada muestra de cada tubo para colocarla en una placa de plástico plana negra girando los tubos boca abajo lentamente, y observando macroscópicamente las condiciones de las muestras.

El grado de solidificación de cada muestra de ensayo se juzgó sobre la base de los siguientes criterios:

"Solidificada", (+): La muestra mantenía claramente la forma hemiesférica de la parte inferior del tubo, incluso en la placa;
“Ligeramente solidificada", (±): La muestra mostraba ligeramente la forma hemiesférica de la parte inferior del tubo;
"No solidificada", (-): La muestra estaba deformada y no mostraba la forma hemiesférica de la parte inferior del tubo. Los resultados se mostraron en la columna de "Capacidad de solidificación" de la Tabla 1.

Tabla 1

Muestras de ensayo n.º	1	2	3	4
Pureza del ácido 2-glucósido ascórbico (%)	99,9	99,1	99,1	99,1
Grado de cristalinidad (%)	100,0	0,0	88,3	93,1
Solidificación	-	+	+	-

Como se muestra en la Tabla 1, la muestra de ensayo n.º 1, como una muestra estándar para definir el valor analítico H_{100} (grado de cristalinidad: 100,0 %), se consideró "no solidificada" (-), porque colapsaba fácilmente y no mantenía la forma hemiesférica de la parte inferior del tubo, cuando se sacó del tubo y se colocó sobre una placa plana. Por el contrario, la muestra de ensayo n.º 2 como otra muestra estándar para definir el valor analítico H_0 (grado de cristalinidad: 0,0 %), se consideró "solidificada" (+), porque seguía manteniendo la forma hemiesférica de la parte inferior del tubo, cuando se sacó del tubo y se colocó sobre la placa. La forma hemisférica de la muestra de ensayo n.º 2 no se colapsó ni siquiera cuando se le dio una ligera vibración a la placa.

La muestra de ensayo n.º 3 con un grado de cristalinidad de 88,3 % mantuvo la forma hemiesférica de la parte inferior del tubo, incluso cuando se sacó del tubo y se colocó en la placa, y se consideró que claramente estaba "solidificada" (+), similar a la muestra de ensayo n.º 2. La muestra de ensayo n.º 4, con un grado de cristalinidad de 93,1 % colapsó igual que la muestra de ensayo n,. 1, sin embargo, perdió su forma y colapsó justo después de haberla sacado del tubo y colocado en la placa y se consideró "no solidificada" (-).

Como se ha descrito anteriormente, aunque las muestras de ensayo n.º 2 a 4 se prepararon a partir de la muestra de ensayo n.º 1 con un ácido 2-glucósido ascórbico de pureza 99,9 %, el análisis de HPLC mencionado anteriormente mostró que sus purezas del ácido 2-glucósido ascórbico no aumentaban a un nivel superior al 99,1 %. La razón de esto no está clara, pero se puede especular que una ligera cantidad de ácido 2-glucósido ascórbico podría perderse por degradación o similar durante la preparación.

A partir de los resultados Anteriores, en el caso de las composiciones particuladas que contienen 99,1 % o más, b.s.s, de ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, los que tienen un grado de cristalinidad para el ácido-2-glucósido ascórbico cristalino anhidro más alto tienden a tener una capacidad de solidificación menor; y los datos de que la muestra de ensayo n.º 3 con un grado de cristalinidad del 88,3 % se consideró "solidificada" (+) y la muestra de ensayo n.º 4 con un grado de cristalinidad de 93,1 % se consideró "no solidificada" (-) Indican que un umbral que cambia de la consideración de “solidificada" (+) a la de "no solidificada" (-) en el ensayo de solidificación anterior se encuentra entre un grado de cristalinidad de 88,3 % y de 93,1 %.

Experimento 2

Relación entre la solidificación y el grado de cristalinidad de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro

En este experimento, según los resultados del Experimento 1, se usaron siete tipos de composiciones particuladas que contienen ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, que tienen un grado de cristalinidad para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro en el intervalo de 0 a 100 % y una pureza del ácido 2-glucósido ascórbico en el Intervalo de 99,1 a 99,9 % y se analizó la capacidad de solidificación de un modo similar al experimento 1 para investigar la relación entre la solidificación y el grado de cristalinidad con mayor detalle.

Experimento 2-1

Preparación de la muestra de ensayo

Las composiciones particuladas de las muestras de ensayo n.º 5 a 9 de la Tabla 2 se prepararon pesando las muestras de ensayo n.º 1 y 2, que se habían preparado en el experimento 1-1, en cantidades adecuadas, respectivamente, y mezclándolas hasta homogeneidad. La tabla 2 muestra las purezas del ácido 2-glucósido ascórbico y los grados de cristalinidad para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de las muestras de ensayo n.º 5 a 9, determinados mediante el método divulgado en el experimento 1-2. Los resultados de las muestras de ensayo n.º 1 y 2 de la Tabla 2 se copiaron de la Tabla 1.

Experimento 2-2

Ensayo de solidificación

Las muestras de ensayo n.º 5 a 9 se sometieron al ensayo de solidificación en el Experimento 1-4. Los resultados se muestran en la columna de "Solidificación" de la Tabla 2. Los resultados de la solidificación de las muestras de ensayo n.º 1 y 2 de la Tabla 2 se copiaron de la Tabla 1.

Tabla 2

Muestras de ensayo n.º	1	2	5	6	7	8	9
Pureza del ácido 2-glucósido ascórbico (%)	99,9	99,1	99,8	99,7	99,6	99,5	99,4
Grado de cristalinidad (%)	100,0	0,0	99,8	92,6	91,5	89,2	29,9
Solidificación	-	+	-	-	-	±	+

Como se encuentra en los resultados de la tabla 2, la muestra de ensayo n.º 9 con un grado de cristalinidad de 29,9 % se consideró "solidificada" (+) y la muestra de ensayo n.º 8 con un grado de cristalinidad de 89,2 % se consideró "ligeramente solidificada”(±). Por el contrario, las muestras de ensayo n.º 7, 6 y 5 con los respectivos grados de cristalinidad de 91,5 %, 92,6 % y 99,8 % se consideraron "no solidificadas" (-), de forma similar a la muestra de ensayo n.º 1. Estos resultados indican que, entre las composiciones particuladas que contienen ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, que contiene ácido 2-glucósido ascórbico en una cantidad de 99,1 % o mayor pero menor que 99,9 %, b.s.s., las que tienen un grado de cristalinidad del 90 % o mayor para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro no solidifican en las condiciones de este experimento.

Experimento 3

Influencia del nivel de sorción dinámica de vapor sobre la solidificación de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro

Dado que se estima que la higroscopicidad de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro está implicada en la solidificación de la composición particulada, en este experimento, el

nivel de sorción dinámica de vapor, que se supone que es un índice útil para la estimación de la higroscopicidad, de las muestras de ensayo n.º 1 y 2 y las muestras de ensayo n.º 5 a 9 se midieron y el efecto del Nivel de sorción dinámica de vapor sobre la solidificación de las composiciones particuladas que contienen ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro se investigó mediante la verificación de los resultados del ensayo de solidificación obtenidos en el experimento 2-2.

Experimento 3-1

Medición del nivel de sorción dinámica de vapor

Aproximadamente, alícuotas de 50 mg de las muestras de ensayo n.º 1 y 2, preparadas en el experimento 1-1, y las muestras de ensayo n.º 5 a 9, preparadas en el experimento 2-1, se colocaron, respectivamente, en una cubeta para muestras de malla y se dejaron reposar en "IGA SORP", un aparato para sorción dinámica de vapor comercializado por Hiden Isocheme Corp., aunque las cubetas para muestras de malla se fijaron a soportes para muestras (hechos de acero inoxidable). Las muestras de ensayo se deshidrataron manteniéndolas a una temperatura de 25 º c y a una humedad relativa del 0 % durante 12 horas en corriente de gas nitrógeno a un caudal de 200 ml/min y se pesaron inmediatamente. Además, las muestras de ensayo se mantuvieron a una temperatura de 25º c y una humedad relativa del 35 % durante 12 horas en una corriente de gas nitrógeno y se pesaron de nuevo. El nivel de sorción dinámica de vapor (%) de cada muestra de ensayo se calculó sustituyendo en la fórmula 2 mencionada anteriormente el peso de cada muestra de ensayo cuya humedad se ha eliminado y el peso de la misma muestra justo después de su hidratación a una temperatura de 25 ºC y una humedad relativa del 35 % de durante 12 horas. Los datos de los niveles de sorción dinámica de vapor de las muestras de ensayo n.º 1 y 2, así como las muestras de ensayo n.º 5 a 9, obtenidas en este experimento, se muestran en la tabla 3. En paralelo, las purezas del ácido 2-glucósido ascórbico, obtenidas en el experimento 2-1, y los resultados de los ensayos en la solidificación del mismo, obtenidos en el experimento 2-2, se muestran en la tabla 3.

Tabla 3

Muestras de ensayo n.º	1	2	5	6	7	8	9
Pureza del ácido 2-glucósido ascórbico (%)	99,9	99,1	99,8	99,7	99,6	99,5	99,4
Nivel de sorción dinámica de vapor (%)	<0,01	1,70	<0,01	<0,01	0,01	0,05	0,13
Solidificación	-	+	-	-	-	±	+

Como se muestra en la Tabla 3, los niveles de sorción dinámica de vapor de las muestras de ensayo n.º 2 y 5 a 9 variaron desde menos de 0,01 % (correspondiente a "<0,01" en la Tabla 3 y esto se aplica en lo sucesivo), es decir, un valor menor que el límite de detección, a 1,70 %, y esto indica que incluso las composiciones particuladas que contienen ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, que contiene ácido 2-glucósido ascórbico en una cantidad de 99,1 % o más, pero menos de 99,9 %, b.s.s., pueden tener niveles de sorción dinámica de vapor significativamente diferentes. Cada muestra de ensayo n.º 1, 5 y 6 tenía un nivel de sorción dinámica de vapor más bajo que el límite de detección. Por el contrario, las muestras de ensayo n.º 2, 8 y 9 tenían un nivel de sorción dinámica de vapor de más de 0,05 %, en particular, la muestra de ensayo n.º 2 tenía un nivel de sorción dinámica de vapor de 1,70 %, un nivel de sorción dinámica de vapor 10 veces más alto que los de las muestras de ensayo n.º 8 y 9.

Según la comparación de los resultados anteriores y los resultados de la columna de "Solidificación" en la Tabla 3, existe una clara correlación entre la solidificación de las composiciones particuladas que contienen ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro y sus niveles de sorción dinámica de vapor;.muestras de ensayo n.º 1, 5, 6 y 7, que tiene un nivel de sorción dinámica de vapor menor que el límite de detección o tan bajo como del 0,01 %, se consideró "no solidificada" (-), mientras que las muestra de ensayo n.º 2, 8 y 9, que tiene un nivel de sorción dinámica de vapor que alcanza del 0,05 a 1,70 %, se consideraron "solidificadas" (+) o "ligeramente solidificas" (±). Los resultados de este experimento indican que, además del grado de cristalinidad, el nivel de sorción dinámica de vapor de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro debe ser un índice útil para la realización de una apenas solidificable. Los resultados anteriores también indican que una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro con un contenido de ácido 2-glucósido ascórbico de 99,1 % o mayor pero menor que 99,9 %, b.s.s., y con un nivel de sorción dinámica de vapor de 0,01 % o menor, no se solidifica en las condiciones de este experimento.

El hecho de que la muestra de ensayo n.º 2 mostraba un marcado nivel de sorción dinámica de vapor alto, tanto como de 1,70 % en este experimento sugiere que la sorción de vapor es inducida principalmente por el ácido 2-glucósido ascórbico amorfo. Por otro lado, el hecho de que la muestra de ensayo n.º 1 mostró un nivel de sorción dinámica de vapor menor que el límite de detección sugiere que la muestra no contiene sustancialmente ácido 2-glucósido ascórbico amorfo como la muestra de ensayo n.º 2. Estos resultados también coincidieron con los patrones de difracción de rayos X en polvo de las muestras de ensayo n.º 1 mostrados en las figuras 1 y 3, y avalan que la muestra de ensayo n.º 1 es una muestra estándar adecuada para definir el valor analítico H_{100} para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, como base para el cálculo del grado de cristalinidad para ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de acuerdo con la Fórmula 1.

Experimento 4

Influencia del enfriamiento forzado sobre el grado de cristalinidad, el nivel de sorción dinámica de vapor y la solidificación de la composición particulada

A partir de los resultados de los experimentos anteriores, se reveló que, en una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, tanto el grado de cristalinidad como el nivel de sorción dinámica de vapor de la composición particulada se relacionan estrechamente con la solidificación de los mismos. De acuerdo con lo anterior, en este experimento se examinaron los siguientes: la influencia del enfriamiento forzado de una composición particulada que contiene cristales después de las etapas de envejecimiento y secado en la producción de los mismos sobre el grado de cristalinidad, el nivel de sorción dinámica de vapor, y la solidificación de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro.

Experimento 4-1

Preparación de la muestra de ensayo

Las composiciones particuladas, preparadas de manera similar a la muestra de ensayo n.º 2 en el Experimento 1-1, se extendieron respectivamente sobre una bandeja metálica y se mantuvieron en una cámara con una temperatura y humedad constantes controladas a 25 ºC y una humedad relativa de 90 % durante 16 horas para acelerar la cristalización y para cristalizar parcialmente la composición particulada resultante. A continuación, se sacó la bandeja metálica de la cámara, se secó a 40 °C durante ocho horas, y sucesivamente, se enfrió de forma no forzada durante aproximadamente dos horas para obtener la muestra de ensayo n.º 10 o se enfrió de forma forzada después de secar y después soplar con aire a 20 ºC durante 15 o 40 minutos a la composición particulada en la bandeja para obtener las muestras de ensayo n.º 11 y 12, respectivamente. Las muestras de ensayo n.º 10 a 12 se encerraron respectivamente herméticamente en un vial con una tapa y se almacenaron en un desecador con un desecante hasta justo antes someterlas a los ensayos analíticos.

Experimento 4-2

Medición de la pureza del ácido 2-glucósido ascórbico

Las purezas del ácido 2-glucósido ascórbico de las muestras de ensayo n.º 10 a 12 se midieron mediante el método descrito en el Experimento 1-2 y los resultados se indican en la Tabla 4. La pureza del ácido 2-glucósido ascórbico de la muestra de ensayo n.º 1 se copió de la Tabla 1.

Experimento 4-3

Medición del grado de cristalinidad y el nivel de sorción dinámica de vapor

El grado de cristalinidad para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro y los niveles de sorción dinámica de vapor de las composiciones particuladas de las muestras de ensayo n.º 10 a 12 se midieron mediante los métodos descritos en los Experimentos 1 y 3, respectivamente.

Los resultados se indican en la Tabla 4. Los resultados de la muestra de ensayo n.º 1 en la tabla 4 se copiaron de las Tablas 1 y 3.

Experimento 4-4

Ensayo de solidificación

Las muestras de ensayo n.º 10 a 12 se sometieron al ensayo de solidificación en el Experimento 1-4. Los resultados se muestran en la columna de "Solidificación" de la Tabla 4, junto con el resultado de la muestra n.º 1 descrita en la tabla 1.

Tabla 4

Muestras de ensayo n.º	1	10	11	12
Pureza del ácido 2-glucósido ascórbico (%)	99,9	99,1	99,1	99,1
Condición de enfriamiento para el polvo cristalino	-	Enfriamiento no forzado	Soplado con aire a 20 ºC durante 15 min	Soplado con aire a 20 ºC durante 40 min
Grado de cristalinidad (%)	100,0	88,1	91,5	94,1
Nivel de sorción dinámica de vapor (%)	<0,01	0,06	<0,01	<0,01
Solidificación	-	+	-	-

Como es evidente a partir de la Tabla 4, la muestra de ensayo n.º 10, preparada mediante enfriamiento no forzado después de las etapas de envejecimiento y secado de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro obtenido por cristalización, tenía un grado de cristalinidad de 88,1 % para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro y un nivel de sorción dinámica de vapor de 0,06 %, y se consideró "solidificada" (+) mediante el ensayo de solidificación. Por el contrario, la muestra de ensayo n.º 11, preparada mediante enfriamiento forzado soplando aire a 20 ºC durante 15 minutos después del envejecimiento y secado de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, tenía un grado de cristalinidad 91,5 % para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro y un nivel de sorción de vapor dinámica menor que el límite de detección, y se consideró "no solidificada" (-) mediante el ensayo de solidificación. De un modo similar, la muestra de ensayo n.º 12, preparada mediante enfriamiento forzado soplando aire a 20 ºC durante 40 minutos después del envejecimiento y secado de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, tenía un grado de cristalinidad 94,1 % para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro y un nivel de sorción de vapor dinámica menor que el límite de detección, y se consideró "no solidificada" (-) mediante el ensayo de solidificación. Estos resultados indican que la cristalización de una composición particulada puede estimularse mediante enfriamiento forzado en lugar de enfriamiento no forzado realizado después de las etapas de envejecimiento y secado de una composición particulada, lo que significa que el enfriamiento forzado es más ventajoso que el enfriamiento no forzado en la preparación de una composición particulada con un mayor grado de cristalinidad del ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro y un nivel de sorción dinámica de vapor menor, es decir, una composición particulada apenas solidificable.

Experimento 5

Influencia de la pureza del ácido 2-glucósido ascórbico sobre la solidificación de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro

A partir de los experimentos anteriores, se reveló que, en una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro con una pureza de ácido 2-glucósido ascórbico tan alta como 99,1 % o más, tanto el grado de cristalinidad para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro y el nivel de sorción dinámica de vapor, respectivamente, se relacionan estrechamente con la solidificación de la composición particulada. En este experimento, la relación entre la solidificación de la composición particulada y la pureza del ácido L-ascórbico de la misma se investigó adicionalmente.

Experimento 5-1

Preparación de la muestra de ensayo

Las muestras de ensayo n.º 13 a 18, mostradas en la Tabla 5, que tienen diferentes purezas de ácido 2-glucósido ascórbico, se prepararon a partir de soluciones acuosas que contienen ácido L-ascórbico y dextrina, un tipo de sustancia amilácea, tal como se describe a continuación; y se sometieron al ensayo de solidificación de forma similar al Experimento 1-4.

Cuatro partes en peso de "PINEDEX #100", una dextrina comercializada por Matsutani Chemical Industries Co., Ltd., Hyogo, Japón, se disolvió en 15 partes en peso de agua por calentamiento. Después, tres partes en peso de ácido L-ascórbico se mezclaron con la solución. Sucesivamente, 100 unidades/g de dextrina de la CGTasa de la cepa Tc-62 de *Geobacillus stearothermophilus* y 250 unidades/g de dextrina de la isoamilasa, comercializada por Hayashibara Biochemical Laboratories Inc., Okayama, Japón, se mezclaron con la solución anterior y se sometieron a una reacción enzimática mientras se mantenía la solución resultante a un pH de 5,5 y una temperatura de 55 ºC durante 50 horas para formar ácido 2-glucósido ascórbico. Se puede especular que los ácidos α -glicosil-L-ascórbicos, tal como ácido 2-0-α –maltosil-L-ascórbico, ácido 2-O-α-maltotriosil-L-ascórbico, ácido 2-O-α-L-maltotetraosil-ascórbico, etc., deben formarse en la solución de reacción.

Después de la inactivación de las enzimas por calentamiento, la solución de reacción se ajustó a pH 4,5, se mezcló con 50 unidades/g de dextrina de "GLUCZYME AF6",un nombre de producto de una muestra de glucoamilasa comercializada por Amano Enzymes Inc., Aichi, Japón, y se sometió a una reacción enzimática durante 24 horas para hidrolizar los ácidos α-glicosil-L-ascórbicos anteriores en ácido 2-glucósido ascórbico e hidrolizar los oligosacáridos concomitantes restantes en D-glucosa. Después de la reacción, la solución de reacción contenía ácido 2-glucósido ascórbico en un rendimiento de producción de 39 %.

La solución de reacción se calentó para inactivar la glucoamilasa, se decoloró y se filtró con un carbón activado, se sometió a una columna de resina de intercambio catiónico (forma H+) para el desalado y después se sometió a una resina de intercambio aniónico (forma OH-) para absorber el ácido L-ascórbico y el ácido 2-glucósido ascórbico, seguido de lavado de la resina con agua para eliminar la D-glucosa y alimentar una solución de ácido clorhídrico 0,5 N para efectuar la elución. El eluato se concentró para dar un contenido de sólidos de aproximadamente 50 % y después se sometió a cromatografía en columna usando "DOWEX 50WX4" (forma Ca^{2+}-), un nombre del producto de una resina de intercambio catiónico de ácidos fuertes comercializada por Dow Chemical Company. El eluato concentrado para dar un contenido de sólidos de aproximadamente 50 % se cargó en la columna en un volumen de

aproximadamente 1/50 veces el volumen de la resina húmeda en la columna, y se alimentó con agua purificada en un volumen de 50 veces el volumen de carga del eluato a una velocidad lineal de 1 m/hora, seguido de fraccionamiento del eluato resultante por alícuotas de 0,05 volúmenes del volumen de la columna. Después, la composición de cada fracción se midió en HPLC descrita en el Experimento 1-1 y se recogieron seis fracciones con un contenido de ácido 2-glucósido ascórbico del 80 %, b.s.s. o mayor y se concentraron al vacío para dar una concentración de sólidos de aproximadamente el 76 %. El concentrado resultante se colocó en un cristalizador, se mezcló con la muestra de ensayo n.º 1, obtenida en el Experimento 1-1, como una semilla, en una cantidad de dos por ciento de los contenido de sólidos, b.s.s, seguido de enfriamiento de la temperatura de la solución de 40 ºC a 15 ºC durante dos días en condiciones de agitación suaves para cristalizar el ácido 2-glucósido ascórbico para formar ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro.

A continuación, de acuerdo con una manera convencional, las muestras de ensayo n.º 13 a 18, mostradas en la Tabla 5, se prepararon mediante la recolección de los cristales de la masa cocida mediante una centrífuga del tipo cestillo, el lavado de los cristales con una pequeña cantidad de agua destilada, el envejecimiento y secado de los cristales lavados, el soplado con aire a 25 ºC durante 30 minutos a los cristales envejecidos y secados para enfriar y pulverizar el resultante.

Tabla 5

Muestras de ensayo n.º	1	2	13	14	15	16	17	18	19
Pureza del ácido 2-glucósido ascórbico (%)	99,9	99,1	97,4	98,0	98,6	99,1	99,5	99,7	98,9
Grado de cristalinidad (%)	100,0	0,0	88,7	89,0	91,6	94,8	99,4	99,5	88,9
Nivel de sorción dinámica de vapor (%)	<0,01	1,70	0,07	0,04	0,01	<0,01	<0,01	<0,01	0,03
Solidificación	-	+	+	±	-	-	-	-	±
Estabilidad durante el almacenamiento	-		+	+	-	-	-	-	+

Las muestras de ensayo n.º 1 y 2 en la Tabla 5 fueron las mismas que las del Experimento 1-1, y las purezas del ácido 2-glucósido ascórbico, los grados de cristalinidad para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro y los niveles de sorción dinámica de vapor de las mismas se copiaron de los resultados experimentales anteriores. Además, "AA2G", un nombre de producto de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, comercializado por Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japón, que es un polvo convencional de calidad de producto de parafarmacia, se utilizó como muestra de ensayo n.º 19. De acuerdo con los métodos descritos en los experimentos anteriores, se midieron las purezas del ácido 2-glucósido ascórbico, los grados de cristalinidad para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro y los niveles de sorción dinámica de vapor de las muestras de ensayo n.º 13 a 19 y los resultados se indican en la tabla 5.

Experimento 5-2

Ensayo de solidificación

Las muestras de ensayo n.º 13 a 19, obtenidas en el Experimento 5-1, se analizaron para determinar la solidificación por un método similar al del Experimento 1-4. Los resultados se muestran en la Tabla 5. Los resultados de los ensayos de solidificación para las muestras de ensayo n.º 1 y 5 de la Tabla 2 se copiaron de la Tabla 1.

Experimento 5-3

Ensayo de estabilidad durante el almacenamiento

Para confirmar que el ensayo de solidificación llevado a cabo en el Experimento 1-4, etc., es un ensayo adecuado para la evaluación de la capacidad de solidificación de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro en condiciones prácticas de almacenamiento, la muestra de ensayo n.º 1 obtenida en el experimento 1-1-, las muestras de ensayo n.º 13 a 18 obtenidas en el Experimento 5-1, y la muestra de ensayo n.º 19 se sometieron a un ensayo de estabilidad durante el almacenamiento que está diseñado para tener en cuenta las condiciones, el ambiente y el período de tiempo de almacenamiento real de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro.

Alícuotas de diez kilogramos de cualquiera de las muestras de ensayo n.º 1 y 13 a 19 se colocaron respectivamente en una bolsa doble de polietileno (80 mm por 600 mm). A continuación, cada bolsa se colocó en una lata de acero de 18 litros de una manera tal que permite que la parte de abertura de la bolsa repose en posición vertical y su abertura, dejando reposar la lata de acero sin tapar y almacenar durante 45 días en las condiciones tales de la temperatura ambiente y libre de control de humedad. Después de 45 días de almacenamiento, cada bolsa de polietileno con cualquiera de las muestras de ensayo se sacó de la lata y las muestras de ensayo se sacaron de las bolsas y se colocaron en una placa plana de plástico negro para la observación macroscópica de sus capacidades de flujo libre y grados de solidificación.

Se juzgó la solidificación de las muestras de ensayo mediante los siguientes criterios: "Solidificada" (+); se detectan torta(s) en una muestra de ensayo y la capacidad de flujo libre de la muestra de ensayo ha disminuido en comparación con la que tenía al inicio del ensayo. "No solidificada" (-); no se detectan torta(s) en una muestra de ensayo y la capacidad de flujo libre de la muestra de ensayo no ha cambiado en comparación con la que tenía al inicio del ensayo. La forma de almacenamiento de cada muestra de ensayo en el ensayo de estabilidad durante el almacenamiento es la misma que la de los polvos de calidad de producto de parafarmacia cuando se distribuyen en el comercio y se almacenan, a excepción de no cerrar la bolsa con una goma, no poner desecante y no almacenar en una lata de acero con una tapa sobre la misma. Las tres diferencias anteriores se proporcionaron con el fin de crear los entornos para el ensayo de almacenamiento ligeramente más duros que las condiciones de distribución y de almacenamiento en la práctica comercial de las composiciones particuladas. Los resultados también se indican en la tabla 5.

Como se muestra en la Tabla 5, a excepción de la muestra de ensayo n.º 2 que consiste sustancialmente en ácido 2-glucósido ascórbico amorfo y la muestra de ensayo n.º 19, un polvo de calidad de producto de parafarmacia, el resto de las muestras de ensayo n.º 1 y 13 a 18 tienden a aumentar sus grados de cristalinidad para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro a medida que sus purezas de ácido 2-glucósido ascórbico aumentan. En el ensayo de solidificación, las muestras de ensayo n.º 13 y 14 con las respectivas purezas de ácido 2-glucósido ascórbico de 97,4 % y 98,0 % se consideraron “solidificadas” (+) o "ligeramente solidificadas" (±). Por el contrario, las muestras de ensayo n.º 15 a 18 con una pureza del ácido 2-glucósido ascórbico de 98,6 a 99,7 % se consideraron "no solidificadas" (-). Estos resultados indican que el valor umbral de la pureza del ácido 2-glucósido ascórbico que influye en la capacidad de solidificación se encuentra en aproximadamente el 98,0 % y esto concluye que debe ser necesario que la pureza del ácido 2-glucósido ascórbico sea superior al 98,0 % para la obtención de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro que se considera "no solidificada" (-) mediante el ensayo de solidificación.

No se observó ninguna solidificación en las muestra de ensayo n.º 15 a 18 de manera similar a la muestra de ensayo 1, aunque las purezas de ácido 2-glucósido ascórbico de las muestras de ensayo n.º 15 a 18 fueron del 98,6 % a 99,7 %, que eran casi los mismos niveles que los de la muestra de ensayo n.º 19, un polvo de calidad de producto de parafarmacia, con una pureza de 98,9 %, y significativamente menores que las de la muestra de ensayo n.º 1, un polvo de calidad de reactivo que consiste sustancialmente en ácido 2- glucósido ascórbico cristalino anhidro. Como referencia, los grados de cristalinidad para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de las muestras de ensayo n.º 15 a 18 fueron 91,6 % y 99,5 %, y la muestra de ensayo n.º 19, un polvo de calidad de producto de parafarmacia, tenía un 88,9 % tan bajo como de menos del 90 %. A partir de estos resultados, se puede concluir que el grado de cristalinidad para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro debería hacerse del 90 % o mayor para obtener una composición particulada deseada, que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, que es significativamente solidificable que la muestra de ensayo n.º 19, un polvo de calidad de producto de parafarmacia.

En las muestras de ensayo n.º 1 y 13 a 18, se halló una tendencia a que sus niveles de sorción dinámica de vapor disminuyen a medida que sus purezas de ácido 2-glucósido ascórbico aumentan. La muestra de ensayo n.º 13 con un nivel de sorción dinámica de vapor de 0,07 % se consideró "solidificada" (+), y las muestras 14 y 19 con los respectivos niveles de sorción dinámica de vapor de 0,04 % y 0,03 % se consideraron "ligeramente solidificadas" (±). Por el contrario, la muestra de ensayo n.º 15 con un nivel de sorción dinámica de vapor de 0,01 % y las muestras de ensayo n.º 16 a 18 con niveles de sorción dinámica de vapor menores que el límite de detección se consideraron "no solidificadas" (-). Estos resultados indican que el nivel de sorción dinámica de vapor de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro debe hacerse del 0,01 % o menor para obtener una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro que tiene un capacidad de solidificación significativamente más baja que la de la muestra de ensayo n.º 19, un polvo de calidad de producto de parafarmacia.

Como se muestra en la columna inferior de la Tabla 5, las muestras de ensayo n.º 13 y 14 con las respectivas purezas de ácido 2-glucósido ascórbico de 97,4 % y 98,0 % se consideraron "solidificadas" (+) en el ensayo de estabilidad durante el almacenamiento, donde se almacenaron durante 45 días en bolsas en cantidades respectivas de 10 kg/bolsa a lo largo de las líneas de su forma de productos comercializados actualmente. Por el contrario, las muestras de ensayo n.º 15 a 18 con una pureza del ácido 2-glucósido ascórbico de 98,6 % a 99,7 % se consideraron "no solidificadas" (-), de forma similar a los resultados en sus ensayos de solidificación. Estos hechos indican que el ensayo de solidificación, como se muestra en el Experimento 1-4, etc., es un ensayo adecuada para la evaluación de la solidificación de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro en circunstancias prácticas de almacenamiento.

Experimento 6

Relación entre el grado de cristalinidad y el tamaño del cristal de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro

En general, una partícula pulverulenta de un polvo que contiene cristales se considera que está construida por un solo cristal plural, es decir, construida por cristalitos. Se especula que cuanto más alto es el grado de cristalinidad de

un polvo, mayor será el tamaño (diámetro) de cada uno de los cristalitos. El tamaño de los cristalitos anteriores se dice que se calcula sobre la base de la "fórmula de Scherrer" mostrada en la siguiente fórmula [6] mediante el uso de una semianchura de un pico de difracción y un ángulo de difracción, que se calculan en base a los perfiles de difracción de rayos X en polvo. Un software de ordenador para calcular dicho tamaño de los cristalitos se instala en un analizador de difracción de rayos X en polvo general. La muestra de ensayo n.º 1, que consiste sustancialmente en ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, preparada en el Experimento 1; la muestra de ensayo n.º 15, una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro preparada en el Experimento 5 y que tiene una pureza de ácido 2-glucósido ascórbico y un grado de cristalinidad por su forma cristalina anhidra, que son relativamente similares a los de los polvos de calidad de producto de parafarmacia convencionales; y la muestra de ensayo n.º 19 utilizada en el Experimento 5, un polvo de calidad de producto de parafarmacia convencional, se seleccionaron y se calculó el tamaño de los cristalitos de una sola partícula pulverulento por el método siguiente:

Fórmula [6]

$$D = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta}$$

D: Tamaño del cristalito (A)
λ: Longitud de onda de rayos X (A)
β: Anchura de la línea de difracción (rad)
θ: Ángulo de difracción (°)
K: Constante (0,9 cuando se usa una semianchura (una anchura total a la mitad del máximo) para β)

<Método de cálculo de tamaño de los cristalitos del ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro>

Los perfiles de difracción de rayos X en polvo, que se habían usado para determinar los valores de análisis para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro en las respectivas muestras de ensayo n.º 1, 15 y 19 en el Experimento 1 o 5, se utilizaron como perfiles de difracción de rayos X en polvo para la base del cálculo del tamaño de los cristalitos. A partir de los patrones de difracción preparados mediante el análisis de los perfiles de difracción de rayos X en polvo, los picos de difracción con ángulos de difracción (2 θ) de aproximadamente 10,4°, 13,2°, 18,3°, 21,9° y 22,6° se seleccionaron como los picos de difracción que se utilizan para calcular el tamaño de los cristalitos de un ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro y son separables entre sí en una región en un ángulo relativamente más bajo que se reconoce que tienen una influencia menor sobre la anchura del pico de difracción surgido a partir de la tensión no uniforme de los cristalitos en una partícula pulverulenta. Usando "X' pert Highscore Plus", un software informático de procesamiento analítico instalado en un analizador de difracción de rayos X en polvo, los perfiles de difracción de los rayos X en polvo de las respectivas muestras de ensayo se procesaron para determinar las semianchuras y los ángulos de difracción (2 θ) de los cinco picos de difracción seleccionados, que después se calibraron según las mediciones obtenidas con, como patrón, silicio ("Si640C", una muestra estándar de difracción de rayos X, proporcionada por National Institute of Standards and Technology (NIST) en EE.UU. Con las semianchuras calibradas y los ángulos de difracción (2 θ), el tamaño de los cristalitos del ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro en cada muestra de ensayo se calculó mediante el programa de la fórmula "Scherrer" en el software informático. Los resultados están en la Tabla 6. El tamaño de los cristalitos de cada muestra de ensayo fue un promedio de los datos calculados a partir de los cinco picos de difracción seleccionados, respectivamente. La pureza del ácido 2-glucósido ascórbico y el grado de cristalinidad del cristal anhidro del mismo solamente se copian de los de la Tabla 5. Para referencia, dado que los patrones de difracción de rayos X en polvo de las muestras de ensayo n.º 15 y 19 se detectaron ambos en ángulos de difracción (2 θ) en el intervalo de 4° a 65° como picos de difracción claros y nítidos característicos del ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro y los patrones de difracción coincidían bien con el patrón de difracción de rayos X en polvo (Figura 1) de la muestra de ensayo n.º 1, se consideró razonable comparar las muestras de ensayo entre sí sobre la base de sus datos calculados para el tamaño de los cristalitos de ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro contenido en cada muestra de ensayo, basados en los patrones de difracción de rayos X en polvo de estas muestras de ensayo.

Tabla 6

Muestras de ensayo n.º	1	15	19
Pureza del ácido 2-glucósido ascórbico (%)	99,9	98,6	98,9
Grado de cristalinidad (%)	100	91,6	88,9
Tamaño del cristalito (Å)	1,170	1,440	1,380

Como se encuentra en la Tabla 6, el tamaño de los cristalitos de ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la muestra de ensayo n.º 1 con un grado de cristalización de 100 % para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino

anhidro se calculó en 1,770 Å. El tamaño de los cristalitos de ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la muestra de ensayo n.º 15 con un grado de cristalización de 91,6 % para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro se calculó en 1,440 Å. Además, el tamaño de los cristalitos de ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la muestra de ensayo n.º 19 con un grado de cristalización de 88,9 % para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro se calculó en 1,380 Å. Cuanto mayor sea el grado de cristalinidad de ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, mayor se hace el tamaño de los cristalitos y esto revela que, entre estos tres tipos de muestras de ensayo, existe una relación entre el grado de cristalinidad y el tamaño de los cristalitos.

Experimento 7

Relación entre el poder reductor y la coloración marrón de la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro

Las muestras de ensayo usadas en los experimentos anteriores eran todas composiciones particuladas que contienen ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro preparadas a partir de soluciones que contienen ácido 2-glucósido ascórbico obtenidas a través de una etapa que permite que la CGTasa actúe en soluciones que contienen ácido L-ascórbico y sustancia amilácea. Cuando se emplea tal proceso de producción, las composiciones particuladas resultantes contendrán ácido L-ascórbico y D-glucosa como concomitantes específicos para el proceso de producción, independientemente de la cantidad de tales concomitantes. Dado que tanto el ácido L-ascórbico como la D-glucosa tienen reducibilidad, las composiciones particuladas que contienen ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, que varían dependiendo de la cantidad de ácido L-ascórbico y D-glucosa, posiblemente pueden causar una coloración marrón desventajosa en los productos finales cuando se usan en productos que contienen compuestos con un grupo amino, tales como proteínas y aminoácidos. En particular, puesto que el ácido L-ascórbico tiene una reactividad relativamente alta con el oxígeno, se especula que el ácido L-ascórbico debe ser un causante de inducir no solo la coloración desfavorable en productos que lo contienen, sino también un causante de la coloración de los polvos de calidad de producto de parafarmacia convencionales por sí mismos, que se observaron convencionalmente en ocasiones cuando se almacenaron los polvos de calidad de producto de parafarmacia convencionales durante un período relativamente largo de tiempo.

En consecuencia, en este experimento, las muestras de ensayo n.º 1 y 15 a 19, que se habían usado en los experimentos anteriores, se examinaron para determinar la relación entre el contenido total de ácido L-ascórbico y D-glucosa, el contenido de ácido L-ascórbico, y el poder reductor de toda la composición particulada y la coloración mediante un ensayo acelerado de tratamiento térmico de acuerdo con los siguientes procedimientos:

Ciento cincuenta miligramos de cada una de las muestras de ensayo se pesaron y se colocaron en un tubo de ensayo de 10 ml con un tapón de rosca, y los tubos de ensayo en una condición cerrada con la tapa roscada se colocaron en " DRYING-OVEN SA310", un nombre de producto un horno comercializado por Masuda Corp., Osaka, Japón, y se calentaron a 80 ºC durante tres días. Posteriormente, después de retirar los tapones de rosca de los tubos de ensayo, se añadieron tres mililitros de agua desionizada a cada uno de los tubos para disolver las muestras. Las soluciones resultantes se midieron para determinar la absorbancia a 400 nm utilizando "UV-2400PC", un nombre de producto de un espectrofotómetro comercializado por Shimadzu Corp., Kyoto, Japón. El grado de coloración causado por calentamiento se juzgó sobre la base de los dos criterios siguientes: cuando una absorbancia a una longitud de onda de 400 nm es inferior a 0,50, se considera "no coloreada marrón sustancialmente no colorada marrón" (-); y la absorbancia a una longitud de onda de 400 nm de 0,50 o superior, "coloreada marrón" (+). Los resultados se indican en la tabla 7.

El contenido total de ácido L-ascórbico y D-glucosa en cada muestra de ensayo se determinó mediante HPLC descrita en el Experimento 1-1. El poder reductor de toda la composición particulada de cada muestra de ensayo se determinó midiendo la cantidad de azúcares reductores y azúcares totales mediante el método de Somogyi-Nelson y el método de antrona-ácido sulfúrico utilizados generalmente en la técnica, respectivamente, utilizando D-glucosa como sustancia patrón; y calcular el poder reductor mediante la sustitución de los datos en la fórmula 3 mencionada anteriormente. El contenido total de ácido L-ascórbico y D-glucosa, el contenido de ácido L-ascórbico, y el poder reductor de toda la composición particulada para cada muestra se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7

Muestras de ensayo n.º		1	15	16	17	18	19
Composición (%) b.s.s.	Ácido 2-glucósido ascórbico	99,9	98,6	99,1	99,5	99,7	98,9
	Contenido total de ácido L-ascórbico y D-glucosa (ácido L-ascórbico)	0,0 (0,0)	0,2 (0,1)	0,1 (<0,1)	0,1 (<0,1)	<0,1 (0,0)	0,3 (0.2)
	Otros	0,1	1,2	0,8	0,4	0,3	0,8
Poder reductor de la totalidad de la composición particulada (%)		0,05	0,98	0,86	0,20	0,12	1,12
Propiedad de coloración marrón		-	-	-	-	-	+

Como se muestra en la Tabla 7, en las composiciones particuladas que contienen ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, el contenido de ácido L-ascórbico y D-glucosa en la muestra de ensayo n.º 1, un polvo de calidad

de reactivo que consiste sustancialmente en ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro eran todos tan bajos como inferiores a sus límites de detección. Por el contrario, se detectaron ácido L-ascórbico y/o D-glucosa en cualquiera de las muestras de ensayo n.º 12 a 18 como las composiciones particuladas que contienen ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la presente invención y la muestra de ensayo n.º 19, un polvo de calidad de producto de parafarmacia convencional. En dichos polvos, como se desprende de las muestras de ensayo n.º 15 a 18, aquellas con un contenido total de ácido L-ascórbico y D-glucosa de no más de 0,2 %, b.s.s, se consideraron "no coloreadas marrón o sustancialmente no coloreadas marrón" (-);mientras que, como es evidente a partir de la muestra de ensayo n.º 19, que con un contenido total de ácido L-ascórbico y D-glucosa que alcanza el 0,3 %, b.s.s., se consideró "coloreada marrón" (+). Como para el ácido L-ascórbico que se considera más estrechamente relacionado con la coloración de los polvos, como se desprende de las muestras de ensayo n.º 15 a 18, cuando el contenido total de ácido L-ascórbico y D-glucosa es de 0,2 % o inferior, b.s.s, se consideraron "no coloreadas marrón o sustancialmente no coloreadas marrón"(-); mientras que, como es evidente a partir de la muestra de ensayo n.º 19, cuando un contenido total de ácido L-ascórbico y D-glucosa que alcanza el 0,3 %, b.s.s., se consideró "coloreada marrón" (+). Para referencia, como ya se ha mencionado, puesto que el ácido L-ascórbico tiene una reactividad relativamente alta con el oxígeno y se refiere a la coloración de composiciones particuladas que contienen ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, las que tienen un contenido de ácido L-ascórbico de no más de 0,1 %, b.s.s., están más allá de la aprehensión de causar coloración incluso cuando se almacenan durante un período relativamente largo de tiempo en la forma de producto de polvos de calidad de producto de farmacia convencionales.

Desde el punto de vista del poder reductor, como se desprende de las muestras de ensayo n.º 15 a 18, las que tienen un poder reductor de toda la composición particulada que es menor que uno por ciento se consideraron "no coloreadas marrón sustancialmente no coloreadas marrón" (-). Por el contrario, como se desprende de la muestra de ensayo n.º 19, las muestras de ensayo con un poder reductor de toda la composición particulada que es más de uno por ciento se consideraron "coloradas marrón" (+). Estos resultados coincidían mucho con los resultados anteriores obtenidos considerando con un índice del contenido total de ácido L-ascórbico y D-glucosa.

Los resultados anteriores indican que las composiciones particuladas que contienen ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro sin la desventaja de causar coloración se pueden obtener mediante el control de sus poderes reductores de sus composiciones particuladas enteras hasta un nivel de menos de uno por ciento a pesar de que contienen inevitablemente L-ascórbico ácido y/o D-glucosa a un nivel detectable debido a sus procesos de producción. Teniendo en cuenta los aspectos de la coloración de no solo los productos finales preparados con composiciones particuladas, sino también de las composiciones particuladas *per se*, los resultados anteriores muestran que el contenido de ácido L-ascórbico en las composiciones particuladas debería ser, preferentemente, 0,1 %, b.s.s. o inferior.

Los siguientes ejemplos explican la presente invención con más detalle, pero la presente invención no debe restringirse nunca de este modo.

Ejemplo 1

Preparación de solución CGTasa bruta

La cepa Tc-62 de *Geobacillus stearothermophilus* (FERM BP-11143, un número de depósito en el National Institute of Bioscience and Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology) se cultivó con "AGAR NUTRITIVO", un medio de cultivo inclinado, comercializado por Difco Laboratories, Inc., a 50 ºC durante dos días. Un bucle de las células cultivadas, recogidas del medio de cultivo inclinado, se inoculó en un medio líquido de siembra que contiene 2 % de almidón soluble, 0,5 % de cloruro de amonio, 0,05 % de hidrogenofosfato de potasio, 0,025 % de sulfato de magnesio, y 0,5 % de carbonato de calcio, se cultivaron a 50 ºC durante tres días con agitación. El cultivo de siembra resultante se inoculó en un medio de cultivo principal que tiene la misma composición que el medio de cultivo de siembra excepto que se reemplazó el almidón soluble por dextrina y se cultivó adicionalmente a 50 ºC durante tres días con agitación. Las células se retiraron del cultivo resultante mediante centrifugación y el sobrenadante resultante se concentró con una membrana UF para dar un volumen de aproximadamente 1/18 del mismo para obtener una solución CGTasa bruta.

Preparación de la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro

Cuatro partes en peso de almidón de patata licuado se disolvieron en 20 partes en peso de agua por calentamiento, y la solución se mezcló con tres partes en peso de ácido L-ascórbico y se ajustaron a pH 5,5 para su uso como una solución de sustrato. La solución de sustrato se mezcló con la solución de la enzima CGTasa bruta anterior en una cantidad de 100 unidades/g de sólidos del almidón de patata licuado e isoamilasa producida por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón, en una cantidad de 250 unidades/g de sólidos del almidón de patata licuado, y enzimáticamente se hizo reaccionar a 55 º C durante 40 horas para formar, junto con los ácidos 2-glucósido ascórbico, α-glicosil-L-ascórbico tales como ácido 2-O-α-maltosil-L-ascórbico, 2-O-α-maltotriosil-L-ascórbico, y ácido 2-O-α-maltotetraosil-L-ascórbico.

Después de la inactivación de las enzimas por calentamiento, la solución de reacción se ajustó a pH 4,5, se mezcló con 50 unidades/g de dextrina de "GLUCZYME AF6",un nombre de producto de una muestra de glucoamilasa comercializada por Amano Enzymes Inc., Aichi, Japón, y se sometió a una reacción enzimática durante 24 horas para hidrolizar los ácidos α-glicosil-L-ascórbicos anteriores en ácido 2-glucósido ascórbico e hidrolizar los oligosacáridos concomitantes restantes en D-glucosa. El rendimiento de la producción de ácido 2-glucósido ascórbico en la solución de reacción fue de aproximadamente 39 %. La solución de reacción contenía ácido 5-O-α-glucosil-L-ascórbico y ácido 6-O-α-glucosil-L-ascórbico en un contenido total de aproximadamente 0,1 %, b.s.s.

Después de la inactivación de la enzima por calentamiento, la solución se decoloró y se filtró con un carbón activado, y el filtrado se desaló con una resina de intercambio catiónico (forma H+). Entonces, se dejó que el ácido L- ascórbico y el ácido 2-glucósido ascórbico en la solución desalada se adsorbieran en una resina de intercambio aniónico (forma OH-), se lavaron con agua para retirar la D-glucosa y se eluyeron con solución de ácido clorhídrico 0,5 N. El eluato se concentró para dar una concentración de contenido de sólidos de aproximadamente 50 % y se sometió a una cromatografía en columna de lecho móvil simulado usando 10 columnas empaquetadas con "DIAION UBK550" (forma Na+), un nombre de producto de una resina de intercambio catiónico de ácidos fuertes comercializada por Mitsubishi Chemical Corp., Tokio, Japón. El eluato, que se había concentrado para dar una concentración de contenido de sólidos de aproximadamente 50 %, se alimentó a la columna en una cantidad de volumen de aproximadamente 1/40 veces el volumen de la resina húmeda, y se alimentó con un eluyente en una cantidad de aproximadamente 15 volúmenes del volumen alimentado para eluir el ácido 2-glucósido ascórbico, seguido de la recogida de una fracción rica en ácido 2-glucósido ascórbico pero pobre en ácido L-ascórbico. La fracción contenía 92,2 % de ácido 2-glucósido ascórbico, b.s.s.

Una vez concentrada la fracción a presión reducida en un concentrado de aproximadamente 72 %, que después se colocó en un cristalizador y se mezcló con " ÁCIDO 2-GLUCÓSIDO ASCÓRBICO 999" (n.º de código: AG124, una pureza de ácido 2-glucósido ascórbico de 99,9 % o superior), un nombre del producto de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, comercializado como un reactivo estándar analítico por Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japón, como una semilla, en una cantidad de dos por ciento de los contenidos sólidos. A continuación, la solución de la mezcla se ajustó a 40 ºC y se enfrió gradualmente a 15 ºC durante dos días en condiciones de agitación suaves para cristalizar el ácido 2-glucósido ascórbico para formar ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro.

Se recogieron los cristales mediante centrífuga de cestillo, se lavaron por pulverización de una pequeña cantidad de agua purificada fría, se envejecieron y se secaron a 38 °C durante tres horas, se enfriaron soplando aire a 25 C durante 45 minutos y se pulverizaron para obtener una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, que tenía una pureza de 99,5 % de ácido 2-glucósido ascórbico, un contenido total de 0,1 % de ácido L-ascórbico y D-glucosa, con un contenido de menos de 0,1 % de ácido L-ascórbico, un grado de cristalinidad de 97,0 % para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, y un poder reductor total de toda la composición particulada de 0,25 %. El nivel de sorción dinámica de vapor de la composición particular era menor que el límite de detección. Cuando se midió para determinar la distribución de partícula, la composición particulada contenía partículas con un tamaño de partícula inferior a 150 µm en una cantidad de 91,2 % y las que tienen un tamaño de partículas de 53 µm o más, pero menos de 150 µm en una cantidad de 50,2 %. Cuando se sometieron al mismo ensayo de solidificación y ensayo de coloración marrón como en los Experimentos 1-4 y 7, respectivamente, la composición particulada se consideró "no solidificada" (-) en el ensayo de solidificación y "no coloreada marrón o sustancialmente no coloreada marrón" (-) en el ensayo de coloración marrón.

La composición particulada es fácilmente manipulable ya que apenas se solidifica y tiene una capacidad de coloración menor en comparación con "AA2G", un nombre del producto para un polvo de calidad de producto de parafarmacia convencional comercializado por Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japón, comercializado convencionalmente como un ingrediente de blanqueado de la piel en una calidad para su uso en productos de parafarmacia, etc. Puesto que la composición particulada no se diferencia de los polvos de calidad de producto de parafarmacia convencionales en cuanto a que es una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, de manera similar a los polvos convencionales anteriores, se pueden usar solos o en combinación con otros ingredientes como un material pulverulento para productos alimenticios, cosméticos, productos de parafarmacia, productos farmacéuticos, etc. Puesto que tiene un contenido de ácido L-ascórbico de 0,1 % o inferior, no hay temor de causar coloración en la composición de partículas per se, incluso cuando la composición se almacena durante la desventaja de producir coloración en la composición particulada per se, incluso cuando la composición se almacena durante un período relativamente largo de tiempo en la misma forma de producto que los polvos de calidad de producto de parafarmacia convencionales.

Ejemplo 2

Preparación de solución CGTasa bruta

Se preparó una solución de CGTasa bruta de forma similar a la del Ejemplo 1 excepto que se usó la cepa Tc-27 de *Geobacillus stearothermophilus* (FERM BP-11142, número de depósito en el National Institute of Bioscience and

Human-Technology Agency of Industrial Science and Technology) en lugar de la cepa Tc-62 de *Geobacillus stearothermophilus.*

Preparación de la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro

Cinco partes en peso de almidón de maíz se añadieron a 15 partes en peso de agua y después se disolvieron en la misma mediante calentamiento después de la adición de una enzima de licuación comercializada. La solución resultante se mezcló con tres partes en peso de ácido L-ascórbico y se ajustó a pH 5,5 para dar una solución de sustrato. A la solución de sustrato se añadió la solución de CGTasa bruta anterior e isoamilasa producidas por Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japón, en cantidades respectivas de 100 unidades y 1.000 unidades/g de sólidos del almidón de maíz, seguido de una reacción enzimática a 55 ºC durante 50 horas para formar ácido 2-glucósido ascórbico y otros ácidos α-glicosil-L-ascórbicos.

Después de la inactivación de la enzima por calentamiento, la solución de reacción se ajustó a pH 4,5, se mezcló con "GLUCOZYME # 20000", un nombre del producto de una muestra de glucoamilasa con una actividad de 20.000 unidades/g, comercializada por Nagase ChemteX Corp., Osaka, Japón) en una cantidad de 50 unidades/g de sólido del almidón de maíz y se hizo reaccionar a 55 ºC durante 24 horas para degradar los ácidos α-glicosil-L-ascórbicos, tales como ácido 2-O-α-maltosil-L-ascórbico, ácido 2-O-α-maltotriosil-L-ascórbico, y 2-O-α-maltotetraosil-L-ascórbico en ácido 2-glucósido ascórbico; y para degradar los sacáridos concomitantes en D-glucosa. La solución de la reacción resultante contenía ácido 2-glucósido ascórbico en un rendimiento de producción de aproximadamente 37 %. Asimismo, la solución de reacción contenía ácido 5-O-α-glucosil-L-ascórbico y ácido 6-O-α-glucosil-L-ascórbico en una cantidad total de aproximadamente 0,2 %.

Después de la inactivación de la enzima por calentamiento, la solución de reacción se decoloró y se filtró con un carbón activado. El filtrado se desaló con una resina de intercambio catiónico (forma H+) y se alimentó a una resina de intercambio aniónico (forma OH-) para adsorber el ácido L-ascórbico y el ácido 2-glucósido ascórbico de inmediato, seguido de lavado de la resina de intercambio aniónico con agua para retirar la D-glucosa y alimentar con una solución de ácido clorhídrico de 0,5 N la resina para la elución. El eluato se alimentó a la cromatografía en columna usando "TOYOPEARL HW-40", un nombre del producto de una resina porosa de Tosoh Corp., Tokio, Japón, para recoger una fracción rica en ácido 2-glucósido ascórbico pero pobre en ácido L-ascórbico. La fracción recogida contenía 89,5 % b.s.s. de ácido 2-glucósido ascórbico.

La fracción se concentró a presión reducida en un concentrado de 76 %, que después se colocó en un cristalizador y se mezcló con la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro preparada en el Ejemplo 1, como una semilla, en una cantidad de dos por ciento de los contenidos sólidos. A continuación, la mezcla resultante se calentó 40 ºC y después se enfrió gradualmente a 15 ºC durante dos días con agitación suave para cristalizar el ácido 2-glucósido ascórbico para formar ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro.

Se recogieron los cristales mediante centrífuga de cestillo, se lavaron por pulverización de una pequeña cantidad de agua destilada, envejecieron y secaron el resultante 35°C durante ocho horas, se enfriaron soplando aire a 25 ºC durante 15 minutos en el producto resultante y pulverizaron el producto enfriado para obtener una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, que tenía una pureza de 99,2 % de ácido 2-glucósido ascórbico, un contenido total de menos de 0,1 % de ácido L-ascórbico y D-glucosa, un contenido de menos de 0,1 % de ácido L-ascórbico, un grado de cristalinidad de 94,4 % para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, y un poder reductor total de toda la composición particulada de 0,15 %. La composición particulada tenía un nivel de sorción dinámica de vapor menor que el límite de detección. La medición de la distribución de partícula de la composición particulada reveló que contenía partículas con un tamaño de partícula inferior a 150 µm en una cantidad de 83,2 % y las que tienen un tamaño de partículas de 53 µm o más, pero menos de 150 µm en una cantidad de 57,1 %. Cuando se sometieron al mismo ensayo de solidificación y ensayo de coloración marrón como en los Experimentos 1-4 y 7, respectivamente, la composición particulada se consideró "no solidificada" (-) en el ensayo de solidificación y "no coloreada marrón o sustancialmente no coloreada marrón" (-) en el ensayo de coloración marrón.

La composición particulada es fácilmente manipulable ya que apenas se solidifica y tiene una capacidad de coloración menor en comparación con "AA2G" convencional, un nombre de producto de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro comercializado por Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japón, en un grado para su uso en productos de parafarmacia como ingrediente para el blanqueado de la piel etc. Puesto que la composición particulada no difiere de los polvos de calidad de producto de parafarmacia convencionales en que es una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, se puede usar solo o en combinación con otros ingredientes como material para productos alimenticios, cosméticos, productos de parafarmacia, productos farmacéuticos etc., de un modo similar a los polvos convencionales anteriores. Dado que la composición particulada tiene un contenido de ácido L-ascórbico de 0,1 % o menor, no tiene la desventaja de causar la coloración en la composición particulada *per se*, incluso cuando la composición se almacena durante un período relativamente largo de tiempo en la misma forma de producto que los polvos de calidad de producto de parafarmacia convencionales.

Ejemplo 3

Preparación de CGTasa mutante

La CGTasa de la cepa Tc-91 de *Geobacillus stearothermophilus* (conocida como *Bacillus stearothermophilus* en la clasificación anterior), se clonó su gen y se determinó su secuencia de aminoácidos de CGTasa madura (SEQ ID NO: 1) basada en la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 2). Se sabe que la CGTasa madura tiene en su secuencia de aminoácidos cuatro regiones conservadas que habían sido reconocidas que existían habitualmente en las enzimas clasificadas en la familia de α-amilasa. La estructura estérica de la proteína de CGTasa ya se ha determinado mediante análisis cristalográfico de rayos X y reveló que tenía cuatro dominios, A, B, C y D como se muestra en la figura. 5 (véase ″ Kogyo-yo-Toshitsu-Koso-Handbook", pp. 56-63, Kodansha Scientific K.K. Ed., Tokio, Japón (1999)). Se identificaron tres grupos catalíticos de la CGTasa, es decir, el ácido aspártico en 225 (D225), el ácido glutámico en 253 (E253), y el ácido aspártico en 324 (D324) de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 (véase ″Kogyo-yo-Toushitsu-Koso-Handbook", pp. 56-63, Kodansha Scientific K.K. Ed., Tokio, Japón (1999)). La figura 6 es un diagrama esquemático de la estructura primaria de la CGTasa. Mediante la inducción de una mutación en el ADN del gen de la CGTasa mediante los siguientes procedimientos, se obtuvo un mutante de CGTasa, que tiene una mayor productividad de ácido 2-glucósido ascórbico que la CGTasa silvestre.

El gen de la CGTasa de *la cepa* de *Geobacillus stearothermophilus* (depositado bajo el número de registro FERM P-2225 y con el International Patent Organism Depositary in National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), mantenido por los presentes inventores, se mutó mediante la inducción o eliminación de sitios de escisión de enzimas de restricción sin alterar la secuencia de aminoácidos de la CGTasa y se recombinó con un vector plasmídico para convertir en un ADN recombinante que contiene el gen que codifica la CGTasa silvestre. La estructura del ADN recombinante, "pRSET-iBTC12", se mostró en la figura 7. Los fragmentos de genes (fragmentos N de I-EcoT22I), que contienen una región que codifica un sitio activo de la CGTasa silvestre en el ADN recombinante anterior, se obtuvieron mediante digestión del ADN recombinante, y la mutación aleatoria de los resultantes *in vitro* utilizando el kit "GeneMorph PCR Mutagenesis Kit " (un nombre del producto de un kit de mutación de PCR comercializado por Stratagene Company). Los fragmentos mutados se insertan en el ADN recombinante original para preparar mezclas de genes, que codifican variantes de CGTasa con varias sustituciones de aminoácidos. Los ADN recombinantes se obtuvieron por recombinación de los genes variantes con un vector de expresión plasmídico. Con los ADN recombinantes, las células coliformes se transformaron para obtener una biblioteca de genes de las variantes de CGTasa.

Más de 13.000 cepas de transformantes se aislaron de la biblioteca de genes y se cultivaron para obtener células, y de las que se prepararon soluciones de lisis como enzimas en bruto que contienen variantes de CGTasa. Se dejó que las enzimas en bruto actuaran en una solución acuosa que contiene ácido L-ascórbico e hidrolizados parciales de almidón para formar ácidos α-glicosil-L-ascórbicos, que después se trataron con glucoamilasa para formar ácido 2-glucósido ascórbico. Mediante la comparación de los rendimientos de producción de los ácidos α-glicosil-L-ascórbicos con los de los de la CGTasa silvestre, se cribaron los transformantes capaces de producir un mutante de CGTasa que tiene mayor productividad de ácido 2-glucósido ascórbico. En consecuencia, se obtuvo un transformante deseado que tiene un gen mutante de la CGTasa mutante deseada. La secuencia de nucleótidos del gen mutante de CGTasa del transformante se descodificó y se reveló que el resto de lisina en 228 en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 se sustituyó con un resto de ácido glutámico.

El transformante que contiene el gen o el ADN que codifica el mutante de CGTasa anterior se cultivó con T-medio que contiene 100 µl/ml de ampicilina de sodio (que contiene 12 g de Bacto-triptona, 24 g de extracto de Bacto-levadura, 5 ml de glicerol, fosfato monopotásico 17 mM y fosfato de dipotasio 72 mM de por l del medio) a 37 ºC durante 24 horas en condiciones aerobias. Las células recogidas del cultivo por centrifugación se rompieron mediante "ULTRA SONIC HOMOGENEIZADOR UH-600 (un disruptor de ultrasonidos producido por SMT Co., Ltd.) y el sobrenadante se trató mediante calentamiento a 60 ºC durante 30 minutos para inactivar o desnaturalizar las proteínas no resistentes al calor inherentes a las células huésped. El sobrenadante tratado con calor se centrifugó adicionalmente para preparar una muestra parcialmente purificada de la mutante de CGTasa.

Preparación de la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro

Cinco partes en peso de almidón de patata se mezclaron con 15 partes en peso de agua y después se disolvieron en la misma mediante calentamiento después de la adición de una enzima de licuación de almidón comercializada. La solución se mezcló con tres partes en peso de ácido L-ascórbico y se ajustó a pH 5,5 para dar una solución de sustrato. La solución de sustrato se mezcló con el mutante de CGTasa parcialmente purificado obtenido por el método anterior en una cantidad de 20 unidades/ g de almidón de patata y se hizo reaccionar a 65 ºC durante 72 horas para formar ácido 2-glucósido ascórbico y ácidos α-glicosil-L-ascórbicos. A continuación, la reacción se calentó para inactivar el mutante de CGTasa restante. A la solución se añadió "GLUCOZYME # 20000" (un nombre de producto de una glucoamilasa con una actividad de 20.000 unidades/g comercializada por Nagase ChemteX Corp., Osaka, Japón) en una cantidad de 100 unidades/g de almidón de patata, seguido de una reacción enzimática a pH 5,0 y 40 ºC durante aproximadamente 18 horas para degradar los ácidos α-glicosil-L-ascórbicos en ácido 2-glucósido ascórbico y degradar los sacáridos concomitantes en D-glucosa. La solución de reacción contenía ácido 2-

glucósido ascórbico en un rendimiento de producción de aproximadamente 40 % y contenía ácido 5-O-α-glucosil-L-ascórbico y ácido 6-O-α-glucosil-L-ascórbico en una cantidad total de aproximadamente 0,3 %.

Después de inactivar la glucoamilasa restante mediante calentamiento, la solución de reacción se decoloró y se filtró con un carbón activado, y el filtrado se concentró, y se alimentó a una resina de intercambio aniónico (forma OH^-) para adsorber el ácido L-ascórbico y el ácido 2-glucósido ascórbico de inmediato, seguido de lavado de la resina con agua para eliminar la D-glucosa y llevar a cabo la elución con solución de ácido clorhídrico 0,5 N. Del mismo modo que en el Ejemplo 1, el eluato resultante se alimentó a una cromatografía en columna de lecho móvil simulado usando una resina de intercambio catiónico de ácidos fuertes para recoger una fracción rica en ácido 2-glucósido ascórbico pero pobre en ácido L-ascórbico. La fracción recogida contenía 90,4 % b.s.s. de ácido 2-glucósido ascórbico.

Después de desalar con una resina de intercambio de cationes (forma H+), La fracción se concentró a presión reducida en un concentrado de 75 %, que después se colocó en un cristalizador y se mezcló con la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico preparada en el Ejemplo 1, como una semilla, en una cantidad de dos por ciento de los contenidos sólidos. A partir de entonces, el concentrado se ajustó a 45 ºC y se enfrió gradualmente a 10 ºC durante dos días en condiciones de agitación suave para cristalizar el ácido 2-glucósido ascórbico para formar ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro. Se recogieron los cristales, se lavaron por pulverización de una pequeña cantidad de agua desionizada fría, se envejecieron y se secaron a 38 ºC durante tres horas, se enfriaron de forma no forzada durante la noche, y se pulverizaron para obtener una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, que tenía una pureza de aproximadamente 98,8 %, contenía menos de 0,1 % de ácido L-ascórbico y D-glucosa en total, contenía menos de 0,1 % de ácido L-ascórbico, tenía un grado de cristalinidad de 93,5 % para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro y tenía un poder reductor total de toda la composición particulada de 0,31 %. El nivel de sorción dinámica de vapor de la composición particular era menor que el límite de detección. La medición de la distribución de partícula de la composición particulada reveló que contenía partículas con un tamaño de partícula inferior a 150 μm en una cantidad de 93,1 % y las que tienen un tamaño de partículas de 53 μm o más, pero menos de 150 μm en una cantidad de 48,2 %. Cuando se sometieron al mismo ensayo de solidificación y ensayo de coloración marrón como en los Experimentos 1-4 y 7, respectivamente, la composición particulada se consideró "no solidificada" (-) en el ensayo de solidificación y "no coloreada marrón o sustancialmente no coloreada marrón" (-) en el ensayo de coloración marrón.

La composición particulada es fácilmente manipulable ya que apenas se solidifica y se colorea menos en comparación con "AA2G" convencional, un nombre de producto de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro comercializado por Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japón, en un grado para su uso en productos de parafarmacia como ingrediente para el blanqueado de la piel etc. Puesto que la composición particulada no difiere de los polvos de calidad de producto de parafarmacia convencionales en que es una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, se puede usar solo o en combinación con otros ingredientes como material para productos alimenticios, cosméticos, productos de parafarmacia, productos farmacéuticos etc., de un modo similar a los polvos convencionales anteriores. Dado que la composición particulada tiene un contenido de ácido L-ascórbico de 0,1 % o menor, la composición particulada *per se* no tiene la desventaja de producir coloración, incluso cuando se almacena durante un período relativamente largo de tiempo en la misma forma de producto que los polvos de calidad de producto de parafarmacia convencionales. Dado que la composición particulada tiene un contenido de ácido L-ascórbico de 0,1 % o menor, no tiene la desventaja de causar la coloración en la composición particulada *per se*, incluso cuando la composición se almacena durante un período relativamente largo de tiempo en la misma forma de producto que los polvos de calidad de producto de parafarmacia convencionales.

Ejemplo 4

Preparación de la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro

Una reacción enzimática se llevó a cabo mediante el método de manera similar a la del Ejemplo 3 excepto porque se permite que 500 unidades/g de sólidos de almidón de isoamilasa (producido por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón) actúen sobre el almidón a 55 ºC junto con la CGTasa. Después del tratamiento con glucoamilasa, la solución de reacción contenía ácido 2-glucósido ascórbico en un rendimiento de producción de aproximadamente 45 %. La solución de reacción contenía ácido 5-O-α-glucosil-L-ascórbico y ácido 6-O-α-glucosil-L-ascórbico en una cantidad total de aproximadamente 0,2 %. La solución de reacción se purificó de manera similar a la del Ejemplo 3 para recoger una fracción con un contenido de ácido 2-glucósido ascórbico de 91,8 %, b.s.s.

Después de la cristalización realizada de forma similar a la del ejemplo 3, los cristales resultantes se recogieron, se lavaron por pulverización de una pequeña cantidad de agua desionizada fría, se envejecieron y se secaron a 38 ºC durante tres horas, se enfriaron de forma no forzada durante la noche, y se pulverizaron para obtener una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, que tenía una pureza de aproximadamente 99,2 %, contenía menos de 0,1 % de ácido L-ascórbico y D-glucosa en total, contenía menos de 0,1 % de ácido L-ascórbico, tenía un grado de cristalinidad de 95,6 % para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino

anhidro y tenía un poder reductor total de toda la composición particulada de 0,25 %. El nivel de sorción dinámica de vapor de la composición particular era menor que el límite de detección. La medición de la distribución de partícula de la composición particulada reveló que contenía partículas con un tamaño de partícula inferior a 150 µm en una cantidad de 92,7 % y las que tienen un tamaño de partículas de 53 µm o más, pero menos de 150 µm en una cantidad de 44,2 %. Cuando se sometieron al mismo ensayo de solidificación y ensayo de coloración marrón como en los Experimentos 1-4 y 7, respectivamente, la composición particulada se consideró "no solidificada" (-) en el ensayo de solidificación y "no coloreada marrón o sustancialmente no coloreada marrón" (-) en el ensayo de coloración marrón.

La composición particulada es fácilmente manipulable ya que apenas se solidifica y se colorea menos en comparación con "AA2G" convencional, un nombre de producto de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro comercializado por Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japón, en un grado para su uso en productos de parafarmacia como ingrediente para el blanqueado de la piel etc. Puesto que la composición particulada no difiere de los polvos de calidad de producto de parafarmacia convencionales en que es una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, se puede usar solo o en combinación con otros ingredientes como material para productos alimenticios, cosméticos, productos de parafarmacia, productos farmacéuticos etc., de un modo similar a los polvos convencionales anteriores. Dado que la composición particulada tiene un contenido de ácido L-ascórbico de 0,1 % o menor, no tiene la desventaja de causar la coloración en la composición particulada *per se*, incluso cuando la composición se almacena durante un período relativamente largo de tiempo en la misma forma de producto que los polvos de calidad de producto de parafarmacia convencionales.

Ejemplo 5

Preparación de la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro

Cinco partes en peso de almidón de patata se añadieron a 15 partes en peso de agua y después se disolvieron en la misma mediante calentamiento después de la adición de una enzima de licuación de almidón comercializada. La solución se mezcló con tres partes en peso de ácido L-ascórbico y se ajustó a pH 5,5 para dar una solución de sustrato. La solución de sustrato se mezcló con CGTasa (producida por Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japón, derivada de la cepa Tc-91 de *Geobacillus stearothermophilus* (depositado bajo el número de registro FERM P-2225 y en transferencia al depósito internacional con el número de registro de FERM ABP-11273 en el International Patent Organism Depositary in National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) e isoamilasa (producido por Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japón) en cantidades respectivas de 100 unidades y 1.000 unidades por gramo del almidón de patata y se hizo reaccionar a 55 ºC durante 50 horas para formar ácido 2-glucósido ascórbico y otros ácidos α-glicosil-L-ascórbico. Después de la inactivación de las enzimas por calentamiento, la solución de reacción se ajustó a pH 4,5, se mezcló con "GLUCOZYME #20000", un nombre de producto de una glucoamilasa con una actividad de 20.000 unidades/g comercializada por Nagase ChemteX Corp., Osaka, Japón, mediante 50 unidades por gramo del almidón de patata, se hizo reaccionar a 55 ºC durante 24 horas para degradar los ácidos α-glicosil-L-ascórbicos anteriores en ácido 2-glucósido ascórbico y degradar los sacáridos concomitantes restantes en D-glucosa. El rendimiento de la producción de ácido 2-glucósido ascórbico fue de aproximadamente 38 %, b.s.s. La solución de la reacción contenía ácido 5-O-α-glucosil-L-ascórbico y ácido 6-O-α-glucosil-L-ascórbico en una cantidad total de aproximadamente 0,4 %, b.s.s.

Después de la inactivación de la enzima por calentamiento, la solución de reacción se decoloró y se filtró con un carbón activado. El filtrado se desaló con una resina de intercambio catiónico (forma H+) y se sometió a una resina de intercambio aniónico (forma OH-) para adsorber el ácido L-ascórbico y el ácido 2-glucósido ascórbico de inmediato, seguido de lavado de la resina con agua para retirar la D-glucosa y eluir los ingredientes adsorbidos con ácido clorhídrico 0,5 N. El eluyente se alimentó a la cromatografía en columna usando "TOYOPEARL HW-40", un nombre del producto de una resina porosa de Tosoh Corp., Tokio, Japón, para recoger una fracción rica en ácido 2-glucósido ascórbico pero pobre en ácido L-ascórbico. La fracción recogida contenía ácido 2-glucósido ascórbico en una cantidad de 87,6 %, b.s.s.

Después de concentrar la fracción a una presión reducida para dar una concentración de aproximadamente 76 %, el concentrado se colocó en un cristalizador, se mezcló con la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro preparado en el Ejemplo 1, como una semilla, en una cantidad de dos por ciento de contenido de sólidos, se ajustó a 40 ºC, se enfrió gradualmente a 15 ºC durante dos días en condiciones de agitación suave para cristalizar el ácido 2-glucósido ascórbico para formar ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro. Los cristales se recogieron con una centrífuga del tipo cestillo, se lavaron por pulverización de una pequeña cantidad de agua destilada, se envejecieron y se secaron a 35 ºC durante ocho horas, se enfriaron soplando aire a 20 ºC durante 10 minutos, y se pulverizaron para obtener una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro. La composición particulada tenía una pureza de 98,5 % para el ácido 2-glucósido ascórbico, contenía menos de 0,1 % de ácido L-ascórbico y D-glucosa en total, contenía menos de 0,1 % de ácido L-ascórbico, tenía un grado de cristalinidad de 94,8 % para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro y tenía un poder reductor total de toda la composición particulada de 0,15 %. El nivel de sorción dinámica de vapor de la composición particular era menor que el límite de detección. La medición de la distribución de partícula de la

composición particulada reveló que contenía partículas con un tamaño de partícula inferior a 150 μm en una cantidad de 83,0 % y las que tienen un tamaño de partículas de 53 μm o más, pero menos de 150 μm en una cantidad de 57,7 %. Cuando se sometieron al mismo ensayo de solidificación y ensayo de coloración marrón como en los Experimentos 1-4 y 7, respectivamente, la composición particulada se consideró "no solidificada" (-) en el ensayo de solidificación y "no coloreada marrón o sustancialmente no coloreada marrón" (-) en el ensayo de coloración marrón.

La composición particulada es fácilmente manipulable ya que apenas se solidifica y se colorea menos en comparación con "AA2G" convencional, un nombre de producto de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro comercializado por Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japón, en un grado para su uso en productos de parafarmacia como ingrediente para el blanqueado de la piel etc. Puesto que la composición particulada no difiere de los polvos de calidad de producto de parafarmacia convencionales en que es una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, se puede usar solo o en combinación con otros ingredientes como material para productos alimenticios, cosméticos, productos de parafarmacia, productos farmacéuticos etc., de un modo similar a los polvos convencionales anteriores. Dado que la composición particulada tiene un contenido de ácido L-ascórbico de 0,1 % o menor, no tiene la desventaja de causar la coloración en la composición particulada *per se*, incluso cuando la composición se almacena durante un período relativamente largo de tiempo en la misma forma de producto que los polvos de calidad de producto de parafarmacia convencionales.

Ejemplo comparativo 1

Preparación de la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro

A excepción de no usar la isoamilasa, una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro se preparó mediante el mismo método que en el Ejemplo 5 usando CGTasa de la cepa Tc-91 de *Geobacillus stearothermophilus* (depositado bajo el número de registro FERM P-2225 y conforme al procedimiento de transferencia al depósito internacional con el número de acceso de ABP-11273 en el International Patent Organism Depositary in National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) producido por Hayashibara Biochemical Laboratories, Inc., Okayama, Japón. El rendimiento de la producción de ácido 2-glucósido ascórbico después del tratamiento con glucoamilasa fue de aproximadamente 28 %. La solución de reacción contenía ácido 5-O-α-glucosil-L-ascórbico y ácido 6-O-α-glucosil-L-ascórbico en una cantidad total de aproximadamente 1,0 %, b.s.s. Del mismo modo que en el Ejemplo 5, la solución de reacción se decoloró, se desaló y se purificó para recoger una fracción rica en ácido 2-glucósido ascórbico. La fracción recogida contenía ácido 2-glucósido ascórbico en una cantidad de 87,7 %, b.s.s.

Del mismo modo que en el Ejemplo 5, la fracción rica en ácido 2-glucósido ascórbico se concentró para cristalizar el ácido 2-glucósido ascórbico y se recogieron los cristales resultantes, se envejecieron, se secaron y se enfriaron para obtener una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro, que tenía una pureza de 98,5 % para el ácido 2-glucósido ascórbico, contenía 0,4 % de ácido L-ascórbico y D-glucosa en total, contenía 0,2 % de ácido L-ascórbico, tenía un grado de cristalinidad de 89,1 % para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro y tenía un poder reductor total de toda la composición particulada de 1,17 %. El nivel de sorción dinámica de vapor de la composición particulada fue de 0,04 %. La medición de la distribución de partícula de la composición particulada reveló que contenía partículas con un tamaño de partícula inferior a 150 μm en una cantidad de 78,1 % y las que tienen un tamaño de partículas de 53 μm o más, pero menos de 150 μm en una cantidad de 50,2 %.

Cuando se sometieron al mismo ensayo de solidificación y ensayo de coloración marrón como en los Experimentos 1-4 y 7, respectivamente, la composición particulada se consideró “solidificada" (+) en el ensayo de solidificación y "coloreada marrón" (+) en el ensayo de coloración marrón. Puesto que la composición particulada tiene un grado de cristalinidad de menos de 90 % para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro y un nivel de sorción dinámica de vapor de 0,04 % superior a 0,01 %, que puede causar solidificación durante su distribución y período de tiempo de almacenamiento y esto causaría inevitablemente problemas graves cuando se usa como un material para productos alimenticios, cosméticos, productos de parafarmacia, productos farmacéuticos, etc. Puesto que la composición particulada contiene ácido L-ascórbico tan alto como 0,2 %, en sí misma está libre de la desventaja de producir cloración durante la distribución comercial y período de tiempo de almacenamiento.

Puesto que la composición particulada tiene un contenido de ácido L-ascórbico de tan alto como de 0,2 %, existe la desventaja de causar coloración en la composición particulada *per se* durante el período de distribución comercial y de almacenamiento.

<Ensayo de estabilidad durante el almacenamiento>

Las composiciones particuladas que contienen ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro obtenidas en los Ejemplos 1 a 5 y el Ejemplo Comparativo 1, se analizaron determinar sus estabilidades de almacenamiento

mediante el mismo método que en el Experimento 5-3. Los resultados de este experimento y los de las pruebas de solidificación confirmados en los Ejemplos y el Ejemplo Comparativo se muestran en la Tabla 8 en paralelo.

Tabla 8

Muestras de ensayo n.º	Estabilidad durante el almacenamiento	Solidificación
Ejemplo 1	-	-
Ejemplo 2	-	-
Ejemplo 3	-	-
Ejemplo 4	-	-
Ejemplo 5	-	-
Ejemplo comparativo 1	+	+

Como se muestra en la Tabla 8, en la prueba de estabilidad de almacenamiento, donde cada muestra de ensayo se almacenó en condiciones de envasado en una bolsa de 10 kg durante 45 días de acuerdo con una forma de producto comercializado en realidad, cualquiera de las composiciones particuladas que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de los Ejemplos 1-5 se consideró "no solidificada" (-), pero la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro del Ejemplo comparativo 1 se consideró "solidificada" (+). Estos resultados coincidieron bien con los del ensayo de solidificación.

Como se ha descrito anteriormente, las composiciones particuladas que contienen ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la presente invención, como se muestra en los Experimentos 1 a 7 y los Ejemplos 1 a 5, tienen un grado de cristalinidad de 90 % o superior para el ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro o tienen un nivel de sorción dinámica de vapor de 0,01 % o inferior, y, por lo tanto, son composiciones particuladas tan manejables como para considerarlas "no solidificadas" (-) en el ensayo de solidificación, a pesar de que, aunque contienen ácido L-ascórbico y/o D-glucosa como impurezas características de sus procesos de producción en un nivel detectable mediante cromatografía líquida convencional, las purezas de ácido 2-glucósido ascórbico en las composiciones particuladas son de más de 98,0 % pero inferiores al 99,9 %, en concreto, 98,5 % o más (véase el Ejemplo 5), pero 99,8 % o inferior (véase el Experimento 2), que es el nivel menor que 99,9 % de ácido 2-glucósido ascórbico en el polvo de calidad de reactivo y las hace distinguibles las composiciones en partículas de la presente invención a partir del polvo de calidad de reactivo en términos de la pureza del ácido 2-glucósido ascórbico.

Ejemplo 6

Preparación en polvo de vitamina C (ejemplo de aplicación como material alimenticio)

Veinte partes en peso de una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro obtenido por cualquiera de los métodos en los Ejemplos 1 a 5 para su uso como un material pulverulento para los productos alimenticios, se mezclaron con 70 partes en peso de sacarosa, 10 partes en peso de dextrina, y una cantidad adecuada de un sabor, seguido de la mezcla la mezcla resultante mediante un mezclador en una preparación en polvo de vitamina C. El producto se puede preparar mezclando fácilmente hasta la homogeneidad una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro con otro polvo mediante el uso de un mezclador sin causar ningún acontecimiento problemático durante su etapa de preparación. El producto se puede mezclar fácilmente con otros materiales para productos alimenticios y es un preparado en polvo de vitamina C sustancialmente libre de causar coloración o solidificación incluso cuando se almacenan durante un período de tiempo relativamente largo. Dado que el producto y las composiciones que contienen el mismo tienen las funciones fisiológicas de la vitamina C, se pueden tomar por vía oral para mantener la salud o el blanqueamiento de la piel o las mucosas.

Ejemplo 7

Polvo para blanqueamiento de la piel (ejemplo de aplicación como material cosmético)

Formulación

(Ingredientes)	(%)
α,α-Trehalosa	59.5
Polietilenglicol 6000	20
Sílice	5
Composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro obtenida mediante cualquiera de los métodos de los Ejemplos 1 a 5	15
Sabor	Cantidad adecuada
Color	Cantidad adecuada
Antiséptico	Cantidad adecuada
Rellenar el volumen hasta 100 %	

<Método de preparación>

La α,α-trehalosa, polietilenglicol 6000, sílice, sabor, color, y antiséptico anteriores se colocaron y se mezclaron hasta la homogeneidad con un mezclador en una mezcla en polvo. A la mezcla se añadió la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro obtenido en cualquiera de los métodos en los Ejemplos 1 a 5, seguido de agitación y mezcla de la mezcla hasta la homogeneidad para obtener un polvo de blanqueamiento de la piel. El producto facilita mezclar una composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro con otros ingredientes en una mezcla homogénea mediante el uso de un mezclador, sin causar ningún acontecimiento problemático durante su etapa de preparación. Dado que el producto se puede mezclar fácilmente con otros materiales para productos cosméticos y es un polvo para blanqueamiento de la piel sustancialmente libre de causar coloración o solidificación incluso cuando se almacenan durante un período de tiempo relativamente largo. El producto y las composiciones que contienen la misma pueden usarse como un agente dermatológico externo para blanquear la piel.

Como se ha descrito anteriormente, dado que la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la presente invención es significativamente, apenas solidificable en comparación con los polvos convencionalmente comercializados de calidad de producto de parafarmacia como materiales para cosméticos, productos de parafarmacia, y productos alimenticios, la composición particulada tiene el mérito de que es fácilmente manipulable y sustancialmente libre de perder su capacidad de flujo libre satisfactoria como una composición particulada durante su almacenamiento, conservación o transporte. A pesar del hecho de que la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la presente invención es significativamente apenas solidificable en comparación con los polvos de calidad de producto de parafarmacia convencionales, no es necesario aumentar su pureza de ácido 2-glucósido ascórbico al nivel de los polvos de calidad de reactivo y, por lo tanto, no hay necesidad de etapas adicionales en el proceso de producción, tales como la recristalización y/o repetición de lavado de cristales. Debido a esto, la composición particulada de la presente invención tiene la ventaja de que el rendimiento de producción no disminuye por un amplio margen y puede producirse a un coste menor.

Según el procedimiento de la presente divulgación, la composición particulada de la presente invención se puede producir a partir de ácido L-ascórbico y la sustancia amilácea como materiales por el proceso de producción que no difiere del proceso de producción para la producción de polvos de producto de parafarmacia convencionales en las etapas comprendidas en la misma. Por lo tanto, el proceso de producción de la presente divulgación tiene el mérito ventajoso de que produce una composición particulada significativamente apenas solidificable, que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro en comparación con los polvos convencionales de calidad para producto de parafarmacia, con sustancialmente el mismo período de tiempo, trabajo, instalaciones de producción y el coste que los requeridos para la producción de tales polvos convencionales.

De acuerdo con los materiales pulverulentos para productos alimenticios, cosméticos, de parafarmacia y productos farmacéuticos de la presente invención, dado que consisten en la composición particulada que tiene la propiedad significativamente apenas solidificable, se puede obtener el siguiente mérito ventajoso. No existe miedo de que produzca alteraciones durante el transporte de materia, el tamizado y la mezcla, incluso cuando se usa en plantas de producción que están diseñadas para, según las condiciones, utilizar materiales que tienen una capacidad de fluidez satisfactoria.

Además, puesto que la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la presente invención se puede preparar fácilmente en una que tiene dos partículas con un tamaño de partícula de menos de 150 μm en una cantidad de 70 % en peso o más a toda la composición particulada y los que tienen un tamaño de partícula de al menos 53 μm pero inferior a 150 μm s en una cantidad de 40 a 60 % en peso, que puede usarse convencionalmente sin alterar las etapas de producción convencionales y normas de materiales, incluso cuando se utilizan como materiales para productos alimenticios, cosméticos, productos de parafarmacia y productos farmacéuticos.. Cuando la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la presente invención es la que contiene ácido L-ascórbico y/o D-glucosa y tiene un poder reductor de toda la composición particulada que es menos del uno por ciento, se alcanza el mérito de que, a pesar de que es una composición particulada producida a partir de ácido L-ascórbico y la sustancia amilácea como materiales, que está libre de temor de causar deterioro de la calidad tales como coloración marrón, incluso cuando se mezcla con otros ingredientes que tienen un grupo amino intramolecularmente, tales como aminoácidos y proteínas. En particular, cuando el contenido de ácido L-ascórbico en la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la presente invención es 0,1 % en peso de inferior, b.s.s., la composición particulada per se está libre del temor de coloración con color marrón claro, incluso cuando se almacena solo durante un periodo de tiempo relativamente largo y se puede usar como sustancialmente no coloreado, mientras que el material pulverulento para alimentos, cosméticos, productos de parafarmacia y farmacéuticos.

Además, puesto que la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la presente invención es significativamente apenas solidificable en comparación con los polvos convencionales de calidad para producto de parafarmacia, puede ser más fácilmente manipulable que los convencionales y se utiliza como un material para productos alimenticios, cosméticos, productos de parafarmacia, o productos farmacéuticos en

los campos de los productos alimenticios, cosméticos, productos de parafarmacia, productos farmacéuticos, piensos, cebos, productos químicos y productos industriales. El método de producción de la composición particulada que contiene ácido 2-glucósido ascórbico cristalino anhidro de la presente descripción se puede utilizar como un método de producción de la misma a partir de materias amiláceas y ácido L-ascórbico, como materiales naturales, en una cantidad deseada y en una menor costará en los campos de la producción de productos de almidón-sacarificado o derivados de la vitamina

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Kabushiki Kaisha Hayashibara Seibutsu Kagaku Kenkyujo

<120> Composición particulada que contiene ácido 2-O-alfa-D-glucosil-L-ascórbico cristalino anhidro, proceso para producir la misma y usos de la misma

<130> 10121604

<160> 2

<210> 1
<211> 680
<212> PRT
<213> *Geobacillus stearothermophilus*

<400> 1

```
Ala Gly Asn Leu Asn Lys Val Asn Phe Thr Ser Asp Val Val Tyr Gln
                5                   10                  15
Ile Val Val Asp Arg Phe Val Asp Gly Asn Thr Ser Asn Asn Pro Ser
            20                  25                  30
Gly Ala Leu Phe Ser Ser Gly Cys Thr Asn Leu Arg Lys Tyr Cys Gly
        35                  40                  45
Gly Asp Trp Gln Gly Ile Ile Asn Lys Ile Asn Asp Gly Tyr Leu Thr
    50                  55                  60
Asp Met Gly Val Thr Ala Ile Trp Ile Ser Gln Pro Val Glu Asn Val
65                  70                  75                  80
Phe Ser Val Met Asn Asp Ala Ser Gly Ser Ala Ser Tyr His Gly Tyr
                85                  90                  95
Trp Ala Arg Asp Phe Lys Lys Pro Asn Pro Phe Phe Gly Thr Leu Ser
            100                 105                 110
Asp Phe Gln Arg Leu Val Asp Ala Ala His Ala Lys Gly Ile Lys Val
        115                 120                 125
Ile Ile Asp Phe Ala Pro Asn His Thr Ser Pro Ala Ser Glu Thr Asn
    130                 135                 140
Pro Ser Tyr Met Glu Asn Gly Arg Leu Tyr Asp Asn Gly Thr Leu Leu
145                 150                 155                 160
Gly Gly Tyr Thr Asn Asp Ala Asn Met Tyr Phe His His Asn Gly Gly
                165                 170                 175
Thr Thr Phe Ser Ser Leu Glu Asp Gly Ile Tyr Arg Asn Leu Phe Asp
            180                 185                 190
Leu Ala Asp Leu Asn His Gln Asn Pro Val Ile Asp Arg Tyr Leu Lys
        195                 200                 205
Asp Ala Val Lys Met Trp Ile Asp Met Gly Ile Asp Gly Ile Arg Met
    210                 215                 220
Asp Ala Val Lys His Met Pro Phe Gly Trp Gln Lys Ser Leu Met Asp
225                 230                 235                 240
Glu Ile Asp Asn Tyr Arg Pro Val Phe Thr Phe Gly Glu Trp Phe Leu
                245                 250                 255
Ser Glu Asn Glu Val Asp Ala Asn Asn His Tyr Phe Ala Asn Glu Ser
            260                 265                 270
Gly Met Ser Leu Leu Asp Phe Arg Phe Gly Gln Lys Leu Arg Gln Val
        275                 280                 285
Leu Arg Asn Asn Ser Asp Asn Trp Tyr Gly Phe Asn Gln Met Ile Gln
    290                 295                 300
Asp Thr Ala Ser Ala Tyr Asp Glu Val Leu Asp Gln Val Thr Phe Ile
305                 310                 315                 320
Asp Asn His Asp Met Asp Arg Phe Met Ile Asp Gly Gly Asp Pro Arg
                325                 330                 335
```

```
Lys Val Asp Met Ala Leu Ala Val Leu Leu Thr Ser Arg Gly Val Pro
            340                 345                 350
Asn Ile Tyr Tyr Gly Thr Glu Gln Tyr Met Thr Gly Asn Gly Asp Pro
        355                 360                 365
Asn Asn Arg Lys Met Met Ser Ser Phe Asn Lys Asn Thr Arg Ala Tyr
    370                 375                 380
Gln Val Ile Gln Lys Leu Ser Ser Leu Arg Arg Asn Asn Pro Ala Leu
385                 390                 395                 400
Ala Tyr Gly Asp Thr Glu Gln Arg Trp Ile Asn Gly Asp Val Tyr Val
                405                 410                 415
Tyr Glu Arg Gln Phe Gly Lys Asp Val Val Leu Val Ala Val Asn Arg
            420                 425                 430
Ser Ser Ser Ser Asn Tyr Ser Ile Thr Gly Leu Phe Thr Ala Leu Pro
        435                 440                 445
Ala Gly Thr Tyr Thr Asp Gln Leu Gly Gly Leu Leu Asp Gly Asn Thr
    450                 455                 460
Ile Gln Val Gly Ser Asn Gly Ser Val Asn Ala Phe Asp Leu Gly Pro
465                 470                 475                 480
Gly Glu Val Gly Val Trp Ala Tyr Ser Ala Thr Glu Ser Thr Pro Ile
                485                 490                 495
Ile Gly His Val Gly Pro Met Met Gly Gln Val Gly His Gln Val Thr
            500                 505                 510
Ile Asp Gly Glu Gly Phe Gly Thr Asn Thr Gly Thr Val Lys Phe Gly
        515                 520                 525
Thr Thr Ala Ala Asn Val Val Ser Trp Ser Asn Asn Gln Ile Val Val
    530                 535                 540
Ala Val Pro Asn Val Ser Pro Gly Lys Tyr Asn Ile Thr Val Gln Ser
545                 550                 555                 560
Ser Ser Gly Gln Thr Ser Ala Ala Tyr Asp Asn Phe Glu Val Leu Thr
                565                 570                 575
Asn Asp Gln Val Ser Val Arg Phe Val Val Asn Asn Ala Thr Thr Asn
            580                 585                 590
Leu Gly Gln Asn Ile Tyr Ile Val Gly Asn Val Tyr Glu Leu Gly Asn
        595                 600                 605
Trp Asp Thr Ser Lys Ala Ile Gly Pro Met Phe Asn Gln Val Val Tyr
    610                 615                 620
Ser Tyr Pro Thr Trp Tyr Ile Asp Val Ser Val Pro Glu Gly Lys Thr
625                 630                 635                 640
Ile Glu Phe Lys Phe Ile Lys Lys Asp Ser Gln Gly Asn Val Thr Trp
                645                 650                 655
Glu Ser Gly Ser Asn His Val Tyr Thr Thr Pro Thr Asn Thr Thr Gly
            660                 665                 670
Lys Ile Ile Val Asp Trp Gln Asn
        675                 680
```

<210> 2
<211> 2133
<212> ADN
<213> *Geobacillus stearothermophilus*

<400> 2

```
atg aga aga tgg ctt tcg cta gtc ttg agc atg tca ttt gta ttt agt          48
Met Arg Arg Trp Leu Ser Leu Val Leu Ser Met Ser Phe Val Phe Ser
  1               5                  10                  15

gca att ttt ata gta tct gat acg cag aaa gtc acc gtt gaa gca gct          96
Ala Ile Phe Ile Val Ser Asp Thr Gln Lys Val Thr Val Glu Ala Ala
             20                  25                  30

gga aat ctt aat aag gta aac ttt aca tca gat gtt gtc tat caa att         144
Gly Asn Leu Asn Lys Val Asn Phe Thr Ser Asp Val Val Tyr Gln Ile
         35                  40                  45
```

```
gta gtg gat cga ttt gtg gat gga aat aca tcc aat aat ccg agt gga      192
Val Val Asp Arg Phe Val Asp Gly Asn Thr Ser Asn Asn Pro Ser Gly
     50                  55                  60

gca tta ttt agc tca gga tgt acg aat tta cgc aag tat tgc ggt gga      240
Ala Leu Phe Ser Ser Gly Cys Thr Asn Leu Arg Lys Tyr Cys Gly Gly
 65                  70                  75                  80

gat tgg caa ggc atc atc aat aaa att aac gat ggg tat tta aca gat      288
Asp Trp Gln Gly Ile Ile Asn Lys Ile Asn Asp Gly Tyr Leu Thr Asp
                 85                  90                  95

atg ggt gtg aca gcg ata tgg att tct cag cct gta gaa aat gta ttt      336
Met Gly Val Thr Ala Ile Trp Ile Ser Gln Pro Val Glu Asn Val Phe
            100                 105                 110

tct gtg atg aat gat gca agc ggt tca gcc tcc tat cat ggt tat tgg      384
Ser Val Met Asn Asp Ala Ser Gly Ser Ala Ser Tyr His Gly Tyr Trp
        115                 120                 125

gcg cgc gat ttc aaa aag cca aac ccg ttt ttt ggt acc ctc agt gat      432
Ala Arg Asp Phe Lys Lys Pro Asn Pro Phe Phe Gly Thr Leu Ser Asp
    130                 135                 140

ttc caa cgt tta gtt gat gcc gca cat gca aaa gga ata aag gta att      480
Phe Gln Arg Leu Val Asp Ala Ala His Ala Lys Gly Ile Lys Val Ile
145                 150                 155                 160

att gac ttt gcc ccc aac cat act tct cct gct tca gaa acg aat cct      528
Ile Asp Phe Ala Pro Asn His Thr Ser Pro Ala Ser Glu Thr Asn Pro
                165                 170                 175

tct tat atg gaa aac gga cga ctg tac gat aat ggg aca ttg ctt ggc      576
Ser Tyr Met Glu Asn Gly Arg Leu Tyr Asp Asn Gly Thr Leu Leu Gly
            180                 185                 190

ggt tac aca aat gat gcc aac atg tat ttt cac cat aac ggt gga aca      624
Gly Tyr Thr Asn Asp Ala Asn Met Tyr Phe His His Asn Gly Gly Thr
        195                 200                 205

acg ttt tcc agc tta gag gat ggg att tat cga aat ctg ttt gac ttg      672
Thr Phe Ser Ser Leu Glu Asp Gly Ile Tyr Arg Asn Leu Phe Asp Leu
    210                 215                 220

gcg gac ctt aac cat cag aac cct gtt att gat agg tat tta aaa gat      720
Ala Asp Leu Asn His Gln Asn Pro Val Ile Asp Arg Tyr Leu Lys Asp
225                 230                 235                 240

gca gta aaa atg tgg ata gat atg ggg att gat ggt atc cgt atg gat      768
Ala Val Lys Met Trp Ile Asp Met Gly Ile Asp Gly Ile Arg Met Asp
                245                 250                 255

gcg gtg aag cac atg ccg ttt gga tgg caa aaa tct ctg atg gat gag      816
Ala Val Lys His Met Pro Phe Gly Trp Gln Lys Ser Leu Met Asp Glu
            260                 265                 270

att gat aac tat cgt cct gtc ttt acg ttt ggg gag tgg ttt ttg tca      864
Ile Asp Asn Tyr Arg Pro Val Phe Thr Phe Gly Glu Trp Phe Leu Ser
        275                 280                 285

gaa aat gaa gtg gac gcg aac aat cat tac ttt gcc aat gaa agt gga      912
Glu Asn Glu Val Asp Ala Asn Asn His Tyr Phe Ala Asn Glu Ser Gly
    290                 295                 300
```

```
atg agt ttg ctc gat ttt cgt ttc gga caa aag ctt cgt caa gta ttg        960
Met Ser Leu Leu Asp Phe Arg Phe Gly Gln Lys Leu Arg Gln Val Leu
305                 310                 315                 320

cgc aat aac agc gat aat tgg tat ggc ttt aat caa atg att caa gat       1008
Arg Asn Asn Ser Asp Asn Trp Tyr Gly Phe Asn Gln Met Ile Gln Asp
                325                 330                 335

acg gca tca gca tat gac gag gtt ctc gat caa gta aca ttc ata gac       1056
Thr Ala Ser Ala Tyr Asp Glu Val Leu Asp Gln Val Thr Phe Ile Asp
            340                 345                 350

aac cat gat atg gat cgg ttt atg att gac gga gga gat ccg cgc aag       1104
Asn His Asp Met Asp Arg Phe Met Ile Asp Gly Gly Asp Pro Arg Lys
        355                 360                 365

gtg gat atg gca ctt gct gta tta ttg aca tcc cgt ggc gta ccg aat       1152
Val Asp Met Ala Leu Ala Val Leu Leu Thr Ser Arg Gly Val Pro Asn
    370                 375                 380

att tac tat ggt aca gag caa tac atg acc ggt aac ggc gat cca aac       1200
Ile Tyr Tyr Gly Thr Glu Gln Tyr Met Thr Gly Asn Gly Asp Pro Asn
385                 390                 395                 400

aat cgt aag atg atg agt tca ttc aat aaa aat act cgc gcg tat caa       1248
Asn Arg Lys Met Met Ser Ser Phe Asn Lys Asn Thr Arg Ala Tyr Gln
                405                 410                 415

gtg att caa aaa cta tct tct ctc cga cga aac aat ccg gcg tta gct       1296
Val Ile Gln Lys Leu Ser Ser Leu Arg Arg Asn Asn Pro Ala Leu Ala
            420                 425                 430

tat ggt gat acc gaa cag cgt tgg atc aat ggc gat gtg tat gtg tat       1344
Tyr Gly Asp Thr Glu Gln Arg Trp Ile Asn Gly Asp Val Tyr Val Tyr
        435                 440                 445

gag cga cag ttt ggc aaa gat gtt gtg tta gtt gcc gtt aat cgt agt       1392
Glu Arg Gln Phe Gly Lys Asp Val Val Leu Val Ala Val Asn Arg Ser
    450                 455                 460

tca agc agt aat tac tcg att act ggc tta ttt aca gct tta cca gca       1440
Ser Ser Ser Asn Tyr Ser Ile Thr Gly Leu Phe Thr Ala Leu Pro Ala
465                 470                 475                 480

gga aca tat acg gat cag ctt ggc ggt ctt tta gac gga aat aca att       1488
Gly Thr Tyr Thr Asp Gln Leu Gly Gly Leu Leu Asp Gly Asn Thr Ile
                485                 490                 495

caa gtc ggt tca aat gga tca gtt aat gca ttt gac tta gga ccg ggg       1536
Gln Val Gly Ser Asn Gly Ser Val Asn Ala Phe Asp Leu Gly Pro Gly
            500                 505                 510

gaa gtc ggt gta tgg gca tac agt gca aca gaa agc acg cca att att       1584
Glu Val Gly Val Trp Ala Tyr Ser Ala Thr Glu Ser Thr Pro Ile Ile
        515                 520                 525

ggt cat gtt gga ccg atg atg ggg caa gtc ggt cat caa gta acc att       1632
Gly His Val Gly Pro Met Met Gly Gln Val Gly His Gln Val Thr Ile
    530                 535                 540

gat ggc gaa gga ttc gga aca aat acg ggc act gtg aag ttc gga acg       1680
Asp Gly Glu Gly Phe Gly Thr Asn Thr Gly Thr Val Lys Phe Gly Thr
```

```
545                 550                 555                 560

aca gct gcc aat gtt gtg tct tgg tct aac aat caa atc gtt gtg gct        1728
Thr Ala Ala Asn Val Val Ser Trp Ser Asn Asn Gln Ile Val Val Ala
                565                 570                 575

gta cca aat gtg tca cca gga aaa tat aat att acc gtc caa tca tca        1776
Val Pro Asn Val Ser Pro Gly Lys Tyr Asn Ile Thr Val Gln Ser Ser
            580                 585                 590

agc ggt caa acg agt gcg gct tat gat aac ttt gaa gta cta aca aat        1824
Ser Gly Gln Thr Ser Ala Ala Tyr Asp Asn Phe Glu Val Leu Thr Asn
        595                 600                 605

gat caa gtg tca gtg cgg ttt gtt gtt aat aac gcg act acc aat cta        1872
Asp Gln Val Ser Val Arg Phe Val Val Asn Asn Ala Thr Thr Asn Leu
    610                 615                 620

ggg caa aat ata tac att gtt ggc aac gta tat gag ctc ggc aac tgg        1920
Gly Gln Asn Ile Tyr Ile Val Gly Asn Val Tyr Glu Leu Gly Asn Trp
625                 630                 635                 640

gac act agt aag gca atc ggt cca atg ttc aat caa gtg gtt tac tcc        1968
Asp Thr Ser Lys Ala Ile Gly Pro Met Phe Asn Gln Val Val Tyr Ser
                645                 650                 655

tat cct aca tgg tat ata gat gtc agt gtc cca gaa gga aag aca att        2016
Tyr Pro Thr Trp Tyr Ile Asp Val Ser Val Pro Glu Gly Lys Thr Ile
            660                 665                 670

gag ttt aag ttt att aaa aaa gac agc caa ggt aat gtc act tgg gaa        2064
Glu Phe Lys Phe Ile Lys Lys Asp Ser Gln Gly Asn Val Thr Trp Glu
        675                 680                 685

agt ggt tca aat cat gtt tat acg aca cca acg aat aca acc gga aaa        2112
Ser Gly Ser Asn His Val Tyr Thr Thr Pro Thr Asn Thr Thr Gly Lys
    690                 695                 700

att ata gtg gat tgg cag aac                                            2133
Ile Ile Val Asp Trp Gln Asn
705                 710
```

REIVINDICACIONES

1. Una composición particulada que comprende ácido 2-O-α-D-glucosil-L-ascórbico cristalino anhidro,

que comprende ácido 2-O-α-D-glucosil-L-ascórbico en una cantidad de más de 98,0 % en peso pero inferior al 99,9 % en peso, sobre una base sólida seca;
que tiene un grado de cristalinidad de 90 % o superior para el ácido 2-O-α-D-glucosil-L-ascórbico cristalino anhidro, cuando se calcula sobre la base de un perfil de análisis de difracción de rayos X en polvo de dicha composición;
que contiene partículas con un tamaño de partícula de menos de 150 μm en una cantidad de 70 % en peso o superior a toda la composición particulada, y las que tienen un tamaño de partícula de al menos 53 μm pero inferior a 150 μm en una cantidad de 40 a 60 % en peso de la composición entera;
que contiene ácido L-ascórbico y/o D-glucosa; y
que tiene un poder reductor de toda la composición que es menor que uno por ciento en peso.

2. La composición de la reivindicación 1, donde la composición tiene un nivel de sorción dinámica de vapor de 0,01 % o menor, cuando se mantiene a 25 ºC bajo una humedad relativa de 35 % en peso durante 12 horas después de la retirada del agua en dicha composición bajo una corriente de gas nitrógeno.

3. La composición de la reivindicación 1 o 2, donde el contenido de ácido L-ascórbico es 0,1 % en peso o inferior, en una base sólida seca.

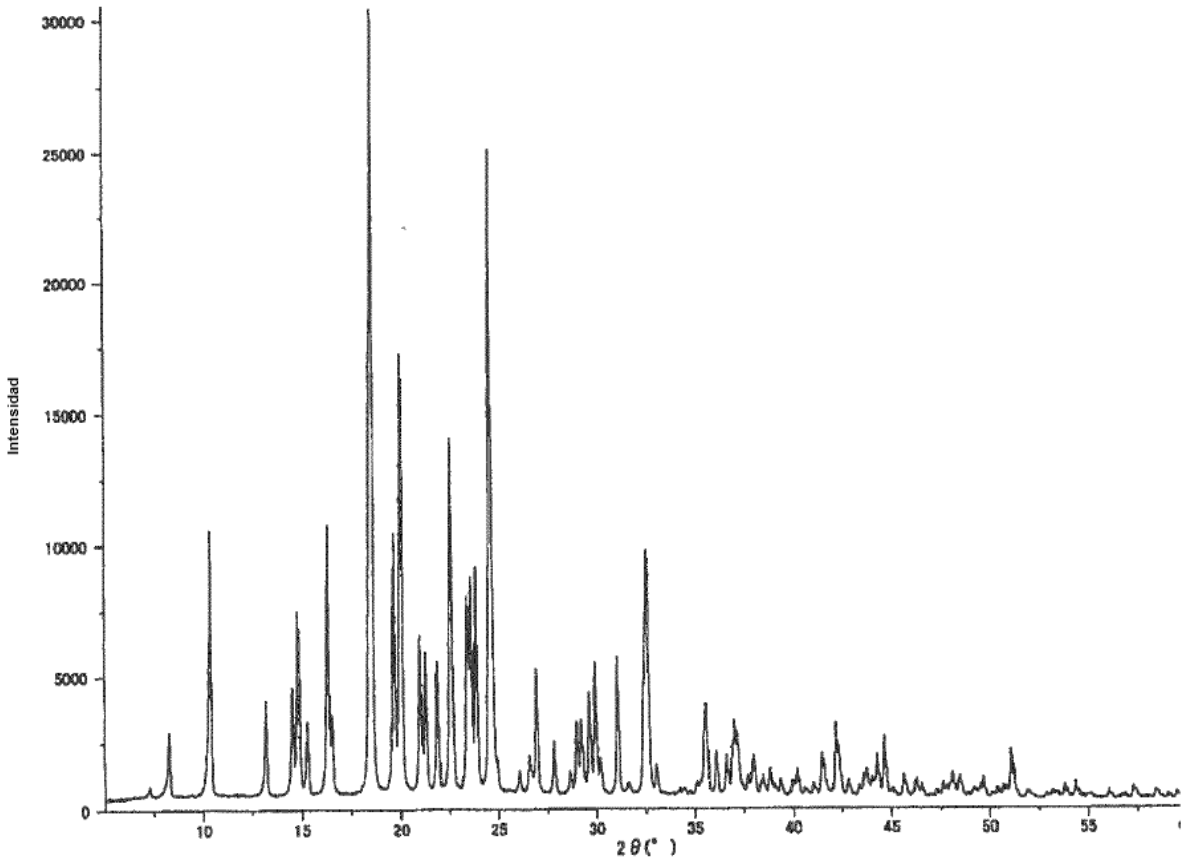
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0
Intensidad
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
2θ(°)

FIG. 1

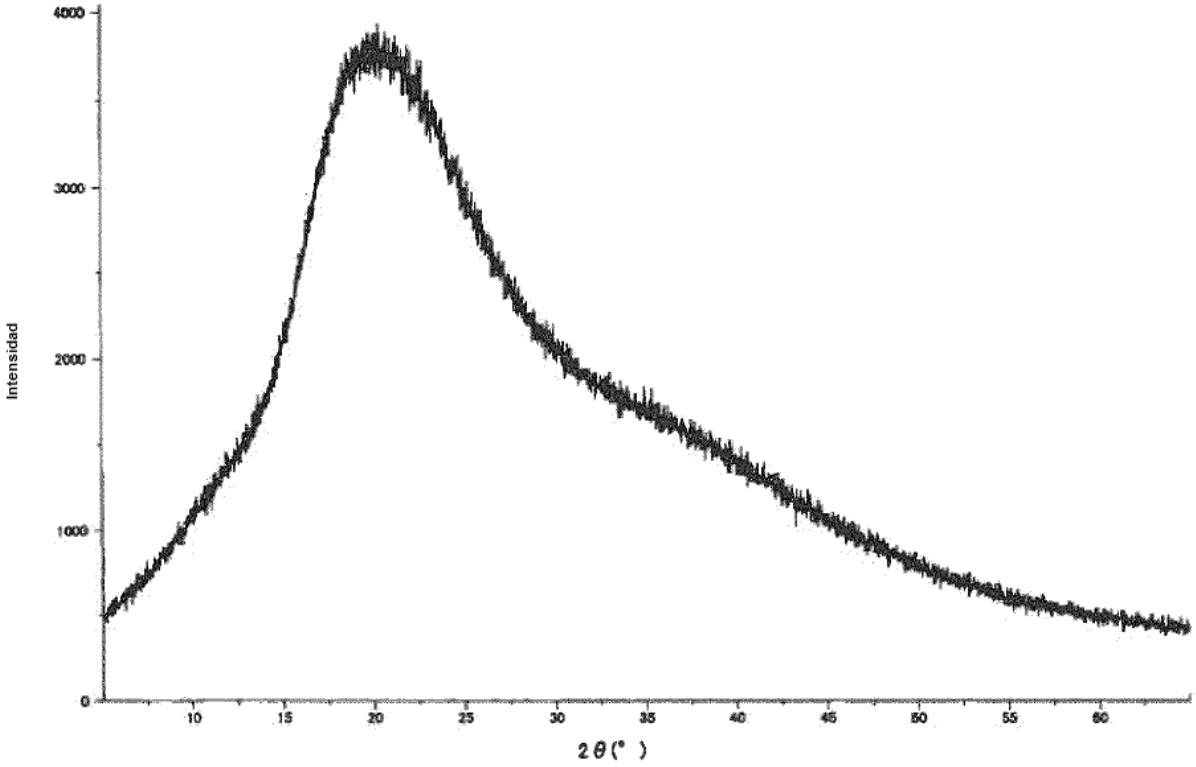
4000
3000
2000
1000
0
Intensidad
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
2θ(°)

FIG.2

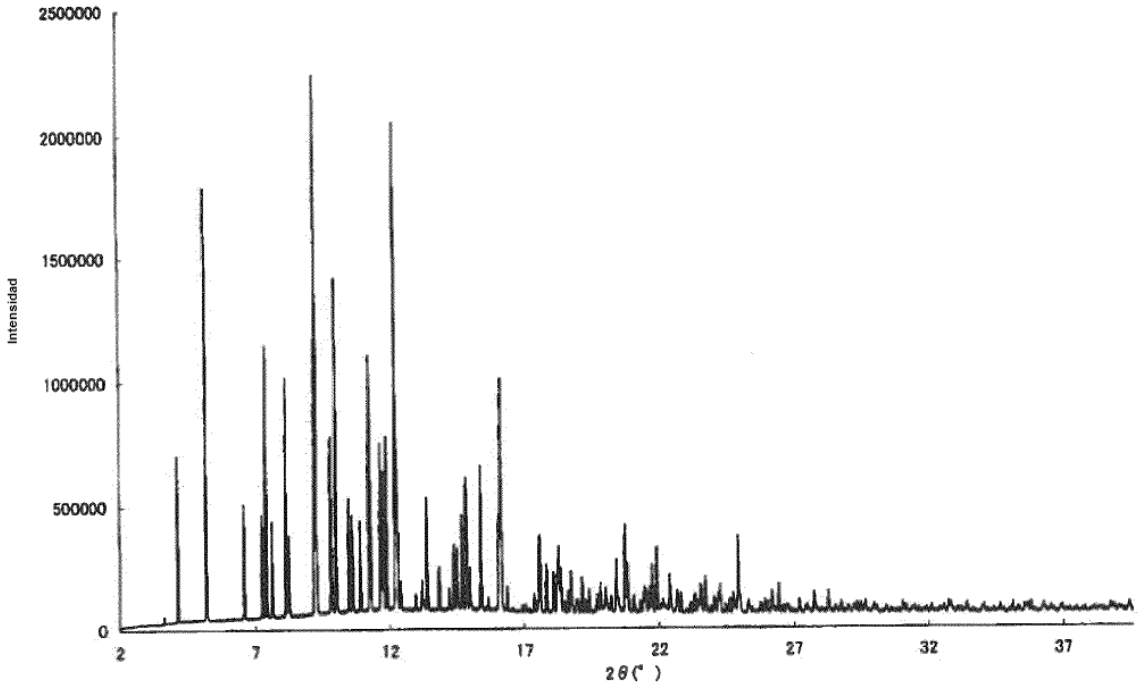
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
Intensidad
2
7
12
17
22
27
32
37
2θ(°)

FIG. 3

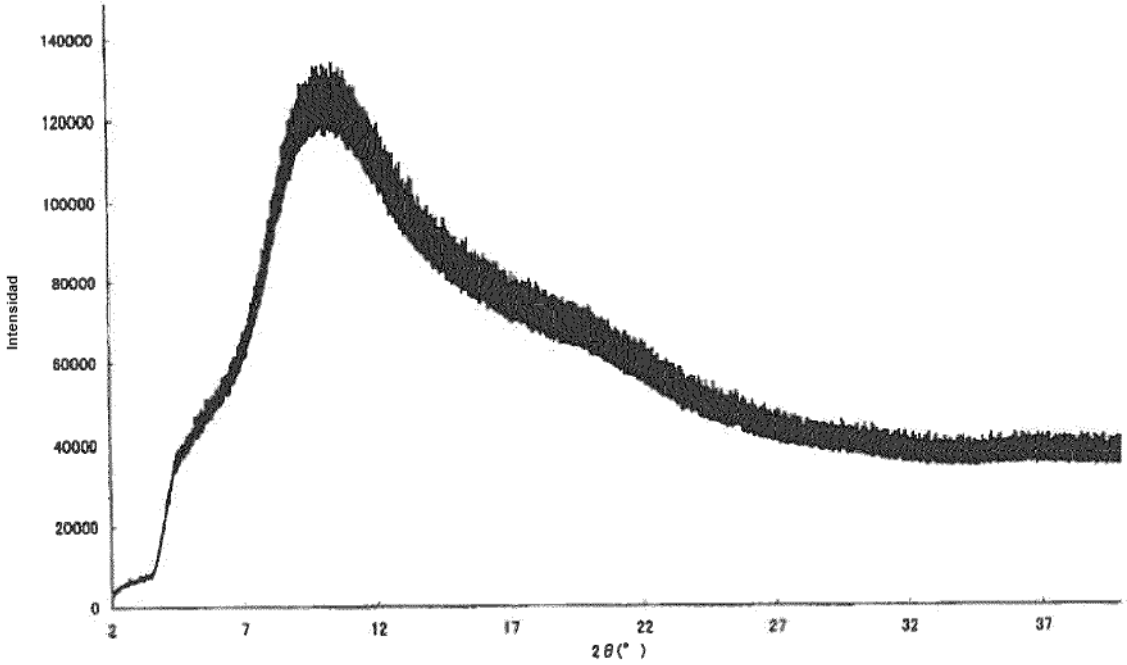
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
Intensidad
2
7
12
17
22
27
32
37
2θ(°)

FIG. 4

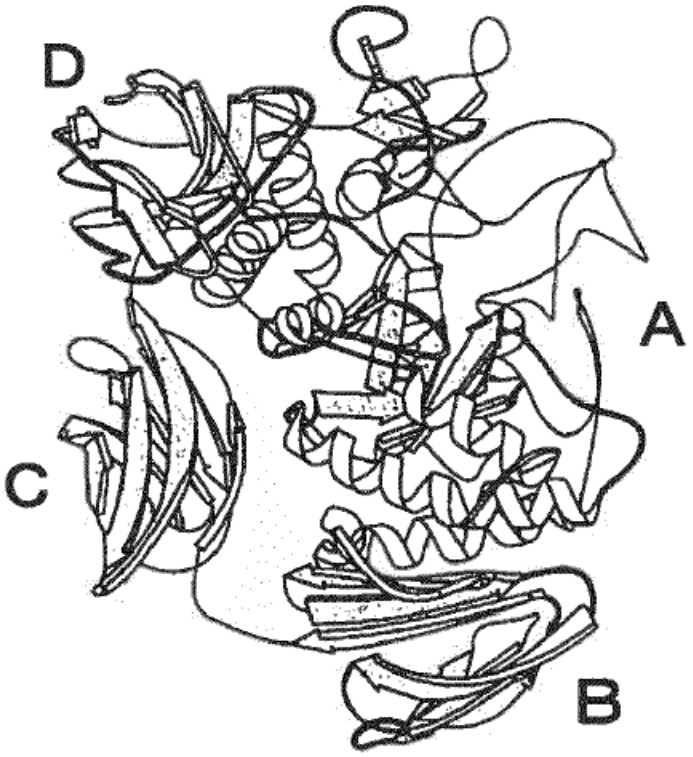

FIG. 5

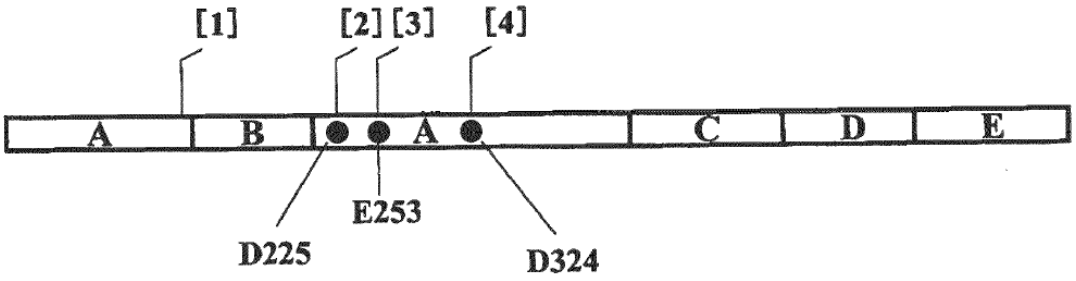

FIG. 6

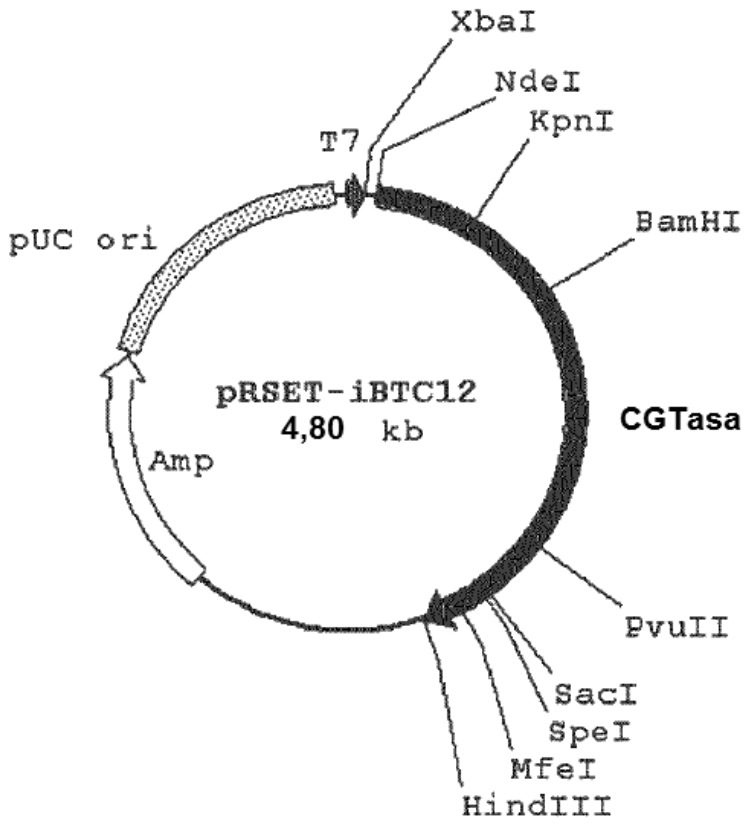
XbaI
NdeI
KpnI
T7
BamHI
pUC ori
pRSET-iBTC12
4,80 kb
CGTasa
Amp
PvuII
SacI
SpeI
MfeI
HindIII

FIG. 7