

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 599**

51 Int. Cl.:

**C12P 19/12** (2006.01)  
**C12P 19/14** (2006.01)  
**C12P 19/18** (2006.01)  
**C12P 19/20** (2006.01)  
**C12N 9/10** (2006.01)  
**C07H 3/04** (2006.01)  
**C13K 13/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.09.2012 PCT/JP2012/073266**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **28.03.2013 WO13042587**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2012 E 12834341 (5)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2759600**

54 Título: **Proceso para producir un polvo que contiene dihidrato de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa cristalino**

30 Prioridad:

**21.09.2011 JP 2011206482**  
**30.07.2012 JP 2012168474**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.07.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SHIBUYA TAKASHI y**  
**IZAWA SEISUKE**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 674 599 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

Proceso para producir un polvo que contiene dihidrato de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa cristalino.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un proceso para producir una composición en partículas que contiene dihidrato de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa cristalino, en particular, a un proceso para producir una composición en partículas de alta pureza que contiene dihidrato de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa cristalino, que produce una composición en partículas que contiene dihidrato de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa cristalino a partir de almidón a escala industrial y con un rendimiento satisfactorio a través de etapas consistentes y a una composición en partículas que contiene dihidrato de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa cristalino obtenido mediante el mismo.

15 **Técnica anterior**

De manera convencional, se conocen varios métodos como procesos para producir composiciones en partículas de dihidrato de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa cristalino (la " $\alpha,\alpha$ -trehalosa" se abrevia como "trehalosa" en lo sucesivo a lo largo de la memoria descriptiva). Por ejemplo, La bibliografía de patente 1 divulga un proceso para producir una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino permitiendo que una  $\beta$ -amilasa con o sin una enzima desramificadora del almidón actúe sobre almidón licuado, permitiendo que una enzima convertidora de maltosa/trehalosa actúe en la mezcla resultante para obtener una solución de sacárido que contiene trehalosa, purificando de manera adecuada la solución de sacárido y cristalizando la trehalosa; y la bibliografía de patente 2 divulga un proceso para producir una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino permitiendo que una enzima formadora de  $\alpha$ -glucosiltrehalosa (otro nombre, "una enzima formadora de sacárido no reductora") y una enzima liberadora de trehalosa, junto con una enzima desramificadora de almidón, actúen sobre almidón licuado, permitiendo que una glucoamilasa actúe en la mezcla resultante para obtener una solución de sacárido que contiene trehalosa, purificando de manera adecuada la solución de sacárido y cristalizando la trehalosa.

Las bibliografías de patente 3 y 4 divulgan procesos para producir composiciones en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, que aumenta el contenido de trehalosa en la solución de sacárido que contiene trehalosa anteriormente identificada modificando el proceso divulgado en la bibliografía de patente 2, en donde se dejan actuar una enzima desramificadora de almidón y una ciclodextrina glucanotransferasa (abreviada en lo sucesivo como "CGTasa") sobre sus sustratos, con un uso combinado de una enzima formadora de  $\alpha$ -glucosiltrehalosa y una enzima liberadora de trehalosa. Las bibliografías de patente 5 y 6 divulgan procesos para producir composiciones en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino permitiendo que una enzima formadora de  $\alpha$ -glucosiltrehalosa termoestable procedente de un microorganismo del género *Sulfolobus* o una enzima formadora de  $\alpha$ -glucosiltrehalosa termoestable y una enzima liberadora de trehalosa termoestable actúen sobre almidón licuado para obtener una solución de sacárido que contiene trehalosa, purificando de manera adecuada la solución y cristalizando la trehalosa.

Entre estos procesos de producción convencionales, en el caso de usar de manera combinada las enzimas divulgadas en las bibliografías de patente 3 y 4, puede obtenerse fácilmente una solución de sacárido que contiene trehalosa con un contenido de trehalosa de más del 80% en peso, basándose en sólido seco (d.s.b.) a partir de almidón licuado como material solo con reacciones enzimáticas sin pasar a través de una etapa de fraccionamiento mediante cromatografía en columna y tiene el mérito de que la solución de sacárido que contiene trehalosa preparada de este modo tiene una capacidad de cristalización satisfactoria de la trehalosa debido a que la composición de sacárido de la misma está compuesta prácticamente por glucosa, salvo para la trehalosa. Por lo tanto, de acuerdo con los procesos de producción anteriores divulgados en las bibliografías de patente 3 y 4, puede producirse una composición en partículas con una pureza relativamente elevada que contiene dihidrato de trehalosa cristalino precipitando el dihidrato de trehalosa cristalino de la solución de sacárido que contiene trehalosa anterior y sometiendo a la mezcla resultante a un método de separación de sólido-líquido mediante centrifugación para recoger los cristales.

De forma particular, en los procesos de producción anteriores divulgados en las bibliografías de patente 3 y 4, cuando se usan enzimas procedentes de microorganismos del género *Arthrobacter* como enzima formadora de  $\alpha$ -glucosiltrehalosa y enzima liberadora de trehalosa, dichas enzimas pueden usarse de manera distintivamente ventajosa para producir una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino a escala industrial, ya que los microorganismos anteriores pueden crecer relativamente rápido y también tienen una alta productividad de las enzimas anteriores. Por lo tanto, el solicitante de la presente invención ha estado produciendo "TREHA", un nombre de producto de una composición en partículas de alta pureza que contiene dihidrato de trehalosa cristalino con una pureza de al menos el 98,0% en peso como producto estándar, comercializado por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón (denominado en lo sucesivo "un polvo de grado alimentario que contiene dihidrato de trehalosa cristalino"), usando las enzimas procedentes de un microorganismo del género *Arthrobacter* como enzima formadora de  $\alpha$ -glucosiltrehalosa y enzima liberadora de trehalosa y mediante los procesos divulgados en las bibliografías de patente 3 y 4; y comercializando "TREHA" principalmente como material para productos

alimentarios, cosméticos, etc. En la actualidad, de acuerdo con el proceso de producción anterior, sin embargo, el contenido de trehalosa en la solución de sacárido que contiene trehalosa obtenida mediante las reacciones enzimáticas sigue siendo de aproximadamente un 85% en peso, d.s.b. y el rendimiento de trehalosa frente al almidón no alcanza el 40%, incluso cuando las condiciones de la reacción enzimática se optimizan de diversos modos.

Por su parte, las bibliografías no de patente 1 y 2 divulgan que se obtiene una solución de sacárido que contiene trehalosa con un contenido de trehalosa de aproximadamente el 87% en peso, d.s.b., dejando que enzimas recombinantes, que se han preparado dejando que se expresen los genes respectivos para una enzima formadora de  $\alpha$ -glucosiltrehalosa termoestable, una enzima liberadora de trehalosa termoestable y una isoamilasa termoestable procedentes de un microorganismo de la especie *Sulfolobus solfataricus* en *Escherichia coli* (*E. coli*), o permitiendo que enzimas mutantes, que se han construido introduciendo adicionalmente mutaciones de sitio específico en los genes anteriores, actúen sobre almidón soluble.

Sin embargo, debido a que el almidón soluble usado como material en las bibliografías no de patente 1 y 2, que se prepara tratando el almidón con un ácido para eliminar las partes amorfas en los gránulos de almidón, es un material bastante específico y caro, el uso de dicho almidón soluble como material para producción a escala industrial de una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino es costoso, probablemente inaceptable, incluso si se obtuviera una solución de reacción enzimática con un contenido de trehalosa aumentado. Cuando se deja que actúen las enzimas recombinantes o las enzimas mutantes divulgadas en las bibliografías no de patente 1 y 2 sobre almidón licuado en lugar de almidón soluble en una producción a escala industrial, el contenido de trehalosa en la solución de sacárido que contiene trehalosa obtenido mediante las reacciones enzimáticas es comprensiblemente inferior a aproximadamente el 87% en peso y permanece aún a un nivel de aproximadamente el 85% en peso y no puede esperarse que mejore en rendimiento de una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino frente al almidón más allá de los procesos de producción actuales.

De hecho, con tan solo aumentar hasta el 86,0% en peso o más el contenido de trehalosa en una solución de sacárido que contiene trehalosa, posiblemente podría aplicarse a la solución de sacárido que contiene trehalosa un fraccionamiento en columna usando cromatografía en columna para obtener una fracción rica en trehalosa. Cuando se emplea dicho fraccionamiento en columna, cuantas más etapas, mayor será el coste de producción y además, puede inducirse una pérdida inevitable de trehalosa contenida en fracciones distintas de las fracciones recogidas ricas en trehalosa y no puede evitarse la reducción del rendimiento de una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino frente al almidón en un amplio margen incluso si se obtuviese una solución de sacárido que contiene trehalosa con un contenido de trehalosa de más del 86,0% en peso, d.s.b., mediante el fraccionamiento en columna anterior en dicho modo para preparar una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, recogiendo dihidrato de trehalosa cristalino precipitado de dicha solución de sacárido.

Con tan solo aumentar el rendimiento de producción frente al almidón, puede emplearse el siguiente método denominado de azúcar total en lugar de emplear el método de separación de sólido-líquido para recoger cristales precipitados mediante centrifugación; se coloca en un recipiente una masa cocida de azúcar que contiene cristales precipitados y se deja cristalizar/solidificar el contenido total y se pulveriza lo resultante para obtener un polvo o la masa cocida de azúcar se seca por pulverización para obtener un polvo. Sin embargo, en el caso de dicho método de azúcar total, al pulverizarse incluso los concomitantes, que son característicos del método usado, tales como la glucosa contenida en la masa cocida de azúcar, junto con la trehalosa cristalizada, el contenido de trehalosa en la composición en partículas resultante que contiene dihidrato de trehalosa cristalino no aumenta a un nivel mayor que el contenido de trehalosa en la masa cocida de azúcar y como desventaja, no puede obtenerse una composición en partículas con alta pureza que contenga dihidrato de trehalosa cristalino.

El almidón es un material que en la actualidad es relativamente abundante y fácil de obtener a un bajo precio, sin embargo, no es una sustancia inagotable y su cantidad total está limitada a la cantidad producida anualmente por los seres humanos sobre la tierra. Por otro lado, el almidón se usa extensivamente y recientemente se ha usado como nuevo material combustible para bioetanol, etc., debido al reciente aumento de demanda de energía limpia además de los usos convencionales para industrias, productos alimentarios, piensos y materiales alimentarios. En estas circunstancias, la mejora del rendimiento de producción frente al almidón para un producto o una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino es bastante importante en términos de una utilización eficaz de recursos limitados.

#### **Bibliografía de la técnica anterior**

##### Bibliografía de patentes

[Bibliografía de patentes 1] Patente Japonesa Kokai n.º 170977/95

[Bibliografía de patentes 2] Patente Japonesa Kokai n.º 213283/95

[Bibliografía de patentes 3] Patente Japonesa Kokai n.º 73504/96

[Bibliografía de patentes 4] Patente Japonesa Kokai n.º 2000-228980

[Bibliografía de patentes 5] Patente Japonesa Kokai n.º 66188/96  
 [Bibliografía de patentes 6] Patente Japonesa Kokai n.º 66187/96

Bibliografía no de patentes

5 [Bibliografía no de patentes 1] Journal of Agricultural and Food Chemistry, Fang et al., Vol. 55, págs. 5588-5594, 2007  
 [Bibliografía no de patentes 2] Journal of Agricultural and Food Chemistry, Fang et al., Vol. 56, págs. 5628-5633, 2008

**Sumario**

Objeto

15 La presente invención, que se elaboró para resolver el inconveniente en los procesos convencionales identificados anteriormente para producir composiciones en partículas que contienen dihidrato de trehalosa cristalino y para aumentar el rendimiento de dichas composiciones en partículas frente al almidón mientras se mantiene la pureza de la trehalosa, tiene el objeto de proporcionar un proceso para producir una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino que permite la producción de una composición en partículas de alta pureza que  
 20 contiene dihidrato de trehalosa cristalino con un rendimiento satisfactorio mediante etapas consistentes usando almidón como material y proporcionar una nueva composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino producida mediante el proceso.

Medios para lograr el objeto

25 Para superar los problemas anteriores, los presentes inventores continuaron estudiando mediante consideraciones y ensayo y error repetido acerca de la combinación de enzimas usadas en los métodos de producción anteriores divulgados en las bibliografías de patente 3 y 4, revelando que, cuando se usan enzimas procedentes de microorganismos del género *Arthrobacter*, que son fáciles de cultivar y tienen una elevada producción de enzima,  
 30 como enzima formadora de  $\alpha$ -glucosiltrehalosa y enzima liberadora de trehalosa, el uso de una CGTasa natural o recombinante procedente de un microorganismo del género *Paenibacillus* o una enzima mutante del mismo, en lugar de la CGTasa procedente de *Geobacillus stearothermophilus*, cepa Tc-91 (FERM BP-11273) que se ha usado hasta la fecha, produce una reacción formadora de trehalosa de manera más eficiente y mejora el contenido de trehalosa en una solución de sacárido que contiene trehalosa después del tratamiento con glucoamilasa hasta un nivel,  
 35 basándose en el sólido seco, de más del 86,0% en peso, preferentemente, del 87,0% en peso o más sin pasar a través de una etapa de fraccionamiento mediante cromatografía en columna. La solución de sacárido que contiene trehalosa obtenida de este modo, de manera convencional, se decolora, desala y concentra antes de precipitar el dihidrato de trehalosa cristalino, seguido de la recolección de los cristales resultantes mediante una centrifugadora y madurante y secando los cristales hasta obtener una composición en partículas de alta pureza que contiene  
 40 dihidrato de trehalosa cristalino con un contenido de trehalosa del 98,0% en peso o más, d.s.b., con un mayor rendimiento de producción frente al almidón que hasta ahora. Por lo tanto, lograron la presente invención.

La presente invención resuelve los objetos anteriores proporcionando un proceso para producir una composición en partículas que comprende  $\alpha,\alpha$ -trehalosa cristalina con un contenido de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa del 98,0% en peso o más,  
 45 basándose en el sólido seco y un grado de cristalinidad para el dihidrato de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa cristalino del 90,0% o más, cuando se calcula basándose en su perfil de difracción de rayos X, comprendiendo dicho proceso las etapas de:

50 obtener una solución de sacárido con un contenido de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa de más del 86,0% en peso, basándose en el sólido seco, sin pasar a través de una etapa de fraccionamiento mediante cromatografía en columna,

dejar que actúe sobre el almidón licuado una enzima formadora de  $\alpha$ -glucosiltrehalosa procedente de un microorganismo del género *Arthrobacter* y una enzima liberadora de trehalosa procedente de un microorganismo del género *Arthrobacter* junto con una enzima desramificadora del almidón y una ciclomaltodextrina glucanotransferasa, seguido de

55 dejar que actúe una glucoamilasa sobre la mezcla resultante,

precipitar el dihidrato de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa cristalino de dicha solución de sacárido,

60 recoger el dihidrato de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa cristalino precipitado mediante centrifugación y

madurar y secar los cristales recogidos,

65 en donde dicha ciclomaltodextrina glucanotransferasa es una ciclomaltodextrina glucanotransferasa natral o recombinante procedente de un microorganismo de las especies *Paenibacillus illinoisensis*, *Paenibacillus pabuli*, o *Paenibacillus amylolyticus*, o una enzima que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o 13,

en donde dicha etapa de precipitación del dihidrato de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa cristalino se lleva a cabo mediante un método de enfriamiento controlado o un método de enfriamiento semicontrolado y

5 en donde dicho método de enfriamiento controlado es un método de enfriamiento en donde la temperatura del líquido "T" en el tiempo "t" se expresa mediante la siguiente fórmula  $T = T_0 - (T_0 - T_i) (t/\tau)^3$ , en donde "τ" es el tiempo de operación establecido para una etapa de cristalización, "T<sub>0</sub>" es la temperatura del líquido al inicio de la cristalización y "T<sub>i</sub>" es la temperatura objetivo del líquido al terminar la cristalización.

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición en partículas que comprende dihidrato de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa cristalino, que comprende  $\alpha,\alpha$ -trehalosa en una cantidad del 99,0% en peso o más pero de no más del 99,6% en peso, basándose en el sólido seco y  
 15 tiene un grado de cristalinidad para el dihidrato de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa cristalino del 90,0% o más pero no mayor del 96,0%, cuando se calcula basándose en su perfil de difracción de rayos X, en donde la composición contiene partículas que tienen un tamaño en el intervalo de 53 μm a 425 μm en una cantidad del 70% o más en peso de la composición y  
 en donde la composición contiene partículas que tienen un tamaño en el intervalo de 53 μm a 300 μm en una cantidad del 50% o más en peso de la composición.

20 La ciclomaltodextrina glucanotransferasa natral o recombinante procedente de un microorganismo de las especies *Paenibacillus illinoisensis*, *Paenibacillus pabuli*, o *Paenibacillus amylolyticus*, o la enzima que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o 13 se usa como la CGTasa anterior para aumentar el contenido de trehalosa en la solución de sacárido anterior hasta más de un 86,0% en peso, d.s.b., sin pasar a través de una etapa de fraccionamiento mediante cromatografía en columna.

25 De acuerdo con la confirmación de los presentes inventores, la composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino producida mediante el proceso anterior en modo alguno es inferior a un polvo de grado alimentario convencional que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, en vista de su satisfactoria pureza de la trehalosa y de su capacidad de flujo libre y puede usarse como material para productos alimentarios y cosméticos de manera similar a un polvo de grado alimentario que contiene dihidrato de trehalosa cristalino.

30 Los microorganismos anteriores del género *Paenibacillus* como fuente para la CGTasa incluyen aquellos de las especies *Paenibacillus illinoisensis*, *Paenibacillus pabuli*, y *Paenibacillus amylolyticus*, entre los cuales, se prefieren los de las especies *Paenibacillus illinoisensis* y *Paenibacillus pabuli* ya que producen CGTasas que tienen el efecto de mejorar en gran medida el contenido de trehalosa en una solución de reacción enzimática en la reacción de  
 35 formación de la trehalosa, en particular, se prefieren los de la especie *Paenibacillus illinoisensis*.

En cuanto a las CGTasas anteriores, se usan preferentemente aquellas que tengan las siguientes secuencias parciales de aminoácidos (a) a (d):

- 40 (a) Gly-Ser-X<sub>1</sub>-Ala-Ser-Asp;  
 (b) Lys-Thr-Ser-Ala-Val-Asn-Asn;  
 (c) Lys-Met-Pro-Ser-Phe-Ser-Lys; y  
 (d) Val-Asn-Ser-Asn-X<sub>2</sub>-Tyr.

45 (En donde X<sub>1</sub> significa Ala o Ser y X<sub>2</sub> significa Ala o Thr, respectivamente).

Los ejemplos de CGTasas más preferibles que pueden usarse en la presente invención son aquellas que tienen una cualquiera de las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 12 y 13.

50 Los presentes inventores emplearon repetidas veces ensayo y error y descubrieron que, cuando se precipita el dihidrato de trehalosa cristalino de la solución de sacárido que contiene trehalosa anterior con un contenido de trehalosa, basándose en el sólido seco, de más del 86,0% en peso, preferentemente, 87,0% en peso o más, el rendimiento de producción de la composición en partículas resultante que contiene dihidrato de trehalosa cristalino frente al almidón puede aumentarse más aplicando al mismo el método de enfriamiento controlado descrito  
 55 anteriormente o el método de enfriamiento semicontrolado, en comparación con el caso de precipitar el dihidrato de trehalosa cristalino mediante un método de enfriamiento no forzado para enfriar la temperatura de una solución de sacárido que contiene trehalosa de manera natural. De forma detallada, la presente divulgación también resuelve los objetos anteriores proporcionando un proceso para producir una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, en donde la etapa anterior para precipitar el dihidrato de trehalosa cristalino se efectúa mediante  
 60 un método de enfriamiento controlado o un método de enfriamiento semicontrolado.

El motivo por el cual se aumenta el rendimiento de producción frente al almidón mediante la aplicación de dicho método de enfriamiento controlado dicho método de enfriamiento semicontrolado es incierto, sin embargo, se puede especular con que cualquiera de estos métodos puede inhibir tanto un rápido incremento del grado de saturación y la  
 65 formación de núcleos de cristal secundarios mediante el enfriamiento para formar una pluralidad de diminutos núcleos de cristal de tamaño sustancialmente homogéneo en la fase temprana de la cristalización y se puede hacer

crecer una serie de núcleos de cristales de tamaño homogéneo a la vez enfriando rápidamente una pluralidad de núcleos de cristal de tamaño aproximadamente homogéneo en la fase tardía de la cristalización y por lo tanto, se obtiene una masa cocida de azúcar que contiene cristales con una menor cantidad de microcristales y un tamaño uniforme del gránulo para facilitar la recuperación de los cristales mediante centrifugación y los cristales recuperados pueden lavarse con una cantidad relativamente pequeña de agua para reducir la pérdida de trehalosa cuando se lava.

Además, los presentes inventores descubrieron que la composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino preparada aplicando un método de enfriamiento controlado o un método de enfriamiento semicontrolado a la precipitación de dihidrato de trehalosa cristalino de manera similar a lo anterior es sorprendentemente superior ya que apenas se aglomera en comparación con una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino y un polvo de grado alimentario convencional que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, que se preparan mediante un método de enfriamiento no forzado. Confirmaron que estas propiedades superiores se deben a las diferencias en la pureza de la trehalosa y al grado de cristalinidad para el dihidrato de trehalosa cristalino de una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino y por lo tanto, lograron la presente invención para una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino *per se* de acuerdo con la reivindicación 4.

La presente divulgación resuelve los objetos anteriores proporcionando una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, obtenida mediante el proceso de emplear un método de enfriamiento controlado o un método de enfriamiento semicontrolado en la precipitación de dihidrato de trehalosa cristalino, que contiene, basándose en el sólido seco, un 99,0% en peso o más pero no más de un 99,6% en peso de trehalosa y tiene un grado de cristalinidad para el dihidrato de trehalosa cristalino del 90,0% o mayor pero no mayor del 96,0% cuando se determina en su perfil de difracción de rayos X de polvo.

Por referencia, una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, que contiene, basándose en el sólido seco, un 99,0% en peso o más pero no más de un 99,6% en peso de trehalosa y tiene un grado de cristalinidad para el dihidrato de trehalosa cristalino del 90,0% o mayor pero no mayor del 96,0% cuando se determina en su perfil de difracción de rayos X de polvo, es una composición en partículas novedosa distinguible de un polvo de grado alimentario convencional que contiene dihidrato de trehalosa cristalino en que tiene un grado de cristalinidad significativamente mayor para el dihidrato de trehalosa cristalino que el de un polvo de grado alimentario convencional que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, incluso si el contenido de trehalosa es sustancialmente el mismo o tiene un nivel ligeramente mayor que el de un polvo de grado alimentario convencional que contiene dihidrato de trehalosa cristalino.

El motivo por el que se obtiene una composición en partículas difícilmente aglomerable que contiene dihidrato de trehalosa cristalino mediante la aplicación de un método de enfriamiento controlado o un método de enfriamiento semicontrolado es incierto, sin embargo, puede especularse con que el incremento tanto de la pureza de la trehalosa como del grado de cristalinidad para el dihidrato de trehalosa cristalino puede afectar a lo anterior ya que, como se describió anteriormente, se obtiene una masa cocida de azúcar que contiene cristales con una menor cantidad de microcristales y un tamaño de gránulo homogéneo mediante dicho método de enfriamiento controlado o dicho método de enfriamiento semicontrolado. Esta suposición también puede evidenciarse incluso por el hecho de que el grado de cristalinidad para el dihidrato de trehalosa cristalino de la composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino de la presente divulgación, obtenida aplicando un método de enfriamiento controlado o un método de enfriamiento semicontrolado, es significativamente mayor que la de una composición en partículas, obtenida mediante un método de enfriamiento no forzado y un polvo de grado alimentario convencional que contiene dihidrato de trehalosa cristalino.

### Efecto de la invención

De acuerdo con el proceso de la presente invención, puede obtenerse una composición en partículas de alta pureza que contiene dihidrato de trehalosa cristalino con un rendimiento de producción satisfactorio frente al almidón y a una escala industrial mediante etapas consistentes en usar almidón como material y una enzima formadora de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y una enzima liberadora de trehalosa procedente de un microorganismo del género *Arthrobacter* que se cultiva fácilmente y tiene una elevada producción de enzimas. Por consiguiente, el proceso confiere una contribución ventajosa al uso efectivo de recursos de almidón como material. En particular, cuando se aplica un método de enfriamiento controlado o un método de enfriamiento semicontrolado en la precipitación de dihidrato de trehalosa cristalino a partir de una solución de sacárido que contiene trehalosa, el rendimiento de producción de una composición en partículas producida, que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, frente al almidón es meritorio que se mejore. La composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino producido mediante el proceso de la presente invención, que aplica un método de enfriamiento controlado o un método de enfriamiento semicontrolado, es una composición en partículas superior en tanto que es difícilmente aglomerable y tiene tanto una elevada pureza de trehalosa como un alto grado de cristalinidad para el dihidrato de trehalosa cristalino, en comparación con un polvo de grado alimentario convencional que contiene dihidrato de trehalosa cristalino.

## Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un ejemplo de un patrón de difracción de rayos X de polvo con un patrón de rayos X característico para una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, que consiste sustancialmente

5 La FIG. 2 es un ejemplo de un patrón de difracción de rayos X de polvo con un patrón de rayos X característico para una composición en partículas que contiene trehalosa, que consiste sustancialmente en una forma amorfa de trehalosa.

10 La FIG. 3 es un ejemplo de un patrón de difracción de rayos X de polvo con un patrón de radiación de sincrotrón para una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, que consiste sustancialmente en dihidrato de trehalosa cristalino.

La FIG. 4 es un ejemplo de un patrón de difracción de rayos X de polvo con un patrón de radiación de sincrotrón para una composición en partículas que contiene trehalosa, que consiste sustancialmente en una forma amorfa de trehalosa.

15 La FIG. 5 es una figura de los patrones de enfriamiento.

La FIG. 6 es una figura de la estructura y los sitios de reconocimiento de enzimas de restricción de un ADN recombinante "pRSET-iPI", que contiene un gen de CGTasa procedente de *Paenibacillus illinoisensis*, cepa NBRC15379.

## 20 Descripción detallada

### 1. Definición de términos

A lo largo de la memoria descriptiva, los siguientes términos tienen los siguientes significados:

25 <Rendimiento de producción frente al almidón>

La expresión "rendimiento de producción frente al almidón", tal como se cita en la memoria descriptiva se expresa por un porcentaje (%) para la relación del peso, d.s.b., de una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino por unidad de masa, d.s.b., de un material de almidón. La memoria descriptiva asume que una

30 composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino se produce mediante etapas consistentes en permitir que las enzimas actúen sobre el almidón como material para formar trehalosa, cristalizar la trehalosa formada y después recoger, madurar y secar la trehalosa cristalizada; y el significado de "rendimiento de producción frente al almidón", tal como se cita en la memoria descriptiva, significa el rendimiento de producción de una

35 composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, que se produce a partir de los cristales precipitados en primer lugar, es decir, los cristales precipitados en la primera etapa a partir de una solución de sacárido que contiene trehalosa obtenida permitiendo que las enzimas actúen sobre el almidón, frente al almidón; y no incluye ninguna composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino producida mediante

40 recristalización a partir de una solución de sacárido conservada después de recoger los cristales precipitados o a partir de la obtenida con un jarabe preparado a partir de la masa cocida de azúcar, es decir, no incluye ninguna composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino preparado a partir de los cristales de la segunda etapa y las posteriores. Por comparación, cuando se cristalizaron añadiendo un cristal de siembra, se incluye la cantidad del cristal de siembra en la cantidad de la composición en partículas obtenida que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, cuando se calcula el rendimiento de producción frente al almidón, a lo largo de la

45 memoria descriptiva.

<Actividad CGTasa>

La expresión "actividad CGTasa", tal como se cita en la memoria descriptiva se define del siguiente modo: A cinco

50 mililitros de una solución de sustrato acuoso que contiene un 0,3% (p/v) de un almidón soluble, tampón acetato 20 mM (pH 5,5) y cloruro de calcio 1 mM se le añaden 0,2 ml de una solución de enzima diluida de manera adecuada y la solución de sustrato resultante se mantiene a 40°C y se muestrea a los 0 min y a los 10 min después de iniciar la reacción enzimática en cantidades respectivas de 0,5 ml, seguido de la adición inmediata de 15 ml de solución de ácido sulfúrico 0,02 N a cada muestra para detener la reacción enzimática. Cada una de las soluciones de ácido

55 sulfúrico resultantes se mezcla con 0,2 ml de solución de yodo 0,1 N para revelar el color y, después de 10 min, se miden respectivamente las soluciones coloreadas respecto de su absorbancia a una longitud de onda de 660 mediante un espectrofotómetro, seguido del cálculo de la actividad de descomposición del almidón con la fórmula [1] a continuación. Una unidad de actividad CGTasa se define como la cantidad de enzima que reduce completamente el color de yodo de una solución que contiene 15 mg de almidón.

60 Fórmula [1]:

**[Ecuación 1]**

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

Nota: "Aa" significa la absorbancia a una longitud de onda de 660 nm de una solución de reacción a los 0 min después de iniciarse la reacción enzimática.

"Ab" significa la absorbancia a una longitud de onda de 660 nm de una solución de reacción a los 10 min después de iniciarse la reacción enzimática.

## &lt;Método de enfriamiento controlado&gt;

La expresión "método de enfriamiento controlado", tal como se cita en la memoria descriptiva, significa un método para precipitar cristales mediante "enfriamiento" controlado y significa un método de enfriamiento donde la temperatura del líquido "T" en el tiempo "t" se expresa básicamente por la fórmula [7], en donde "τ" es el tiempo de operación establecido para una etapa de cristalización, "T<sub>0</sub>" es la temperatura del líquido al inicio de la cristalización y "T<sub>f</sub>" es la temperatura objetivo del líquido al terminar la cristalización.

Fórmula [2]:

**[Ecuación 2]**

$$T = T_0 - (T_0 - T_f) (t/\tau)^3$$

En la FIG. 5 se expresa con "a" un método de enfriamiento controlado, cuando se expresa con un gráfico que describe de manera concreta (esquemáticamente) el método de enfriamiento controlado, en donde el eje de abscisas corresponde al tiempo de operación ajustado para una etapa de cristalización y el eje longitudinal corresponde a la temperatura del líquido durante la cristalización. Tal como se muestra en el símbolo "a" en la FIG. 5, de acuerdo con un método de enfriamiento controlado, la temperatura del líquido se reduce gradualmente en la fase temprana de la cristalización a la cual la temperatura del líquido es relativamente alta pero la temperatura del líquido se reduce rápidamente en la fase tardía en la cual la temperatura del líquido se ha reducido hasta cierto punto. Por consiguiente, en el tiempo de  $t = \tau/2$ , es decir, la temperatura del líquido "T<sub>m</sub>" hacia la mitad de la etapa de cristalización se mantiene al menos hasta la conexión de  $T_m > [(T_0 - T_i) / 2 + T_f]$  (o el cambio de temperatura en el punto medio de la etapa de cristalización sea menor del 50% del cambio de temperatura total). En el patrón de cambio de la temperatura del líquido frente al tiempo, el método de enfriamiento controlado se distingue claramente tanto del método de enfriamiento lineal (el símbolo "b" en la FIG. 5), donde la temperatura del líquido se reduce linealmente con el tiempo "t" a partir de la temperatura del líquido T<sub>0</sub> hasta T<sub>f</sub>, y un método de enfriamiento no forzado (el símbolo "c" en la FIG. 5), donde la temperatura del líquido se reduce exponencial y rápidamente en la fase temprana de la cristalización pero se reduce gradualmente en la fase más tardía de la cristalización con una temperatura del líquido reducida. Para alterar la temperatura del líquido "T" en función del tiempo "t" representadas en la fórmula [2] anterior, por ejemplo, puede usarse un circulador constante programado de propósito general para el sistema de cristalización, etc.

Cuando se aplica dicho método de enfriamiento controlado en la etapa de cristalización, el enfriamiento de la temperatura del líquido se lleva a cabo gradualmente en la fase temprana de la cristalización después de la adición de cristales de siembra de trehalosa y esto inhibe tanto un aumento repentino del grado de saturación de la trehalosa como una nucleación secundaria de cristales mediante enfriamiento y da como resultado un crecimiento predominante de cristales a partir de los cristales de siembra añadidos como núcleos de cristales. Mientras tanto, en la fase tardía de la cristalización en la que los cristales de siembra de los cristales de siembra añadidos como núcleos de cristales se han generado de manera homogénea, los cristales formados de manera homogénea se dejan crecer todos juntos cuando la temperatura del líquido se enfría rápidamente y por lo tanto, es meritorio que un método de enfriamiento controlado proporcione una masa cocida de azúcar que contiene cristales con un tamaño de partículas homogéneo y una cantidad menor de microcristales. Por referencia, el "método de enfriamiento controlado" se describe en detalle en "Wakariyasui-Batch-Shoseki" (Cristalización por lotes accesible), editado por Noriaki KUBOTA, publicado por la Sociedad de Ingenieros de Procesos de Separación, Japón, publicado el 30 de abril de 2010, págs. 32-47.

## &lt;Método de enfriamiento semicontrolado&gt;

La expresión "método de enfriamiento semicontrolado", tal como se cita en la memoria descriptiva, significa literalmente un método de semi-enfriamiento del método de enfriamiento controlado anteriormente identificado, en donde la temperatura del líquido "T" no se altera estrictamente frente al tiempo "t" de acuerdo con la fórmula [2]

anterior y más específicamente, significa un método de enfriamiento, en donde se deja que la temperatura del líquido "T" se reduzca de manera lineal o por etapas frente al tiempo "t" para mantener la variación (T<sub>0</sub>-T<sub>m</sub>) de la temperatura del líquido "T" en el punto de "t=τ/2" para que sea de al menos el 5% pero de menos del 50% del cambio de temperatura total (T<sub>0</sub>-T<sub>f</sub>), preferentemente, al menos el 10% pero menos del 30%, debido a que, la variación dependiente de la pureza, concentración, grado de saturación y contenido de cristales de siembra de trehalosa en una solución que contiene trehalosa usados en la cristalización, es preferible que los núcleos de cristales se generen de manera al menos prácticamente completa en el tiempo de operación "t=τ/2" (en el punto intermedio en la etapa de cristalización). En caso de permitir que la temperatura del líquido "T" se reduzca de manera lineal o por etapas frente al tiempo "t" para ajustar la variación (T<sub>0</sub>-T<sub>m</sub>) de la temperatura del líquido "T" en el punto "t=τ/2" para que sea de al menos el 5% pero menor del 50% del cambio de temperatura total (T<sub>0</sub>-T<sub>f</sub>), la temperatura del líquido "T" se reduce gradualmente frente al tiempo "t" en la fase temprana de la cristalización, donde la temperatura del líquido es relativamente elevada, la temperatura del líquido "T" se reduce rápidamente frente al tiempo "t" en una fase tardía de la cristalización, donde la temperatura del líquido se ha reducido hasta cierto punto. Como resultado, puede ser hasta cierto punto inferior a un método de enfriamiento controlado, sin embargo, un método de enfriamiento semicontrolado proporciona sustancialmente los mismos beneficios que el método de enfriamiento controlado, en donde el método de enfriamiento semicontrolado permite proporcionar una masa cocida de azúcar que contiene cristales con una menor cantidad de microcristales y un tamaño de partícula homogéneo.

Expresándolo de manera concreta, por ejemplo, se deja que la temperatura del líquido "T" se reduzca de manera lineal o por etapas frente al tiempo "t" de tal forma que se divide el tiempo de operación "τ" en al menos dos, preferentemente, al menos tres zonas y entonces, en una zona de la fase temprana de la etapa de cristalización, se permite que el gradiente térmico de enfriamiento cambie gradualmente (para ralentizar la velocidad de enfriamiento); y a medida que cambia desde la fase temprana o desde la fase intermedia a la fase tardía, se permite que aumente el gradiente térmico (para acelerar la velocidad de enfriamiento) para hacer que la variación (T<sub>0</sub>-T<sub>m</sub>) de la temperatura del líquido "T" en el punto de "t=τ/2" sea de al menos el 5% pero menor del 50% del cambio de temperatura total (T<sub>0</sub>-T<sub>f</sub>), preferentemente, al menos el 10% pero menos del 30%. En caso de que la variación (T<sub>0</sub>-T<sub>m</sub>) de la temperatura del líquido "T" en el punto de "t=τ/2" sea de al menos el 50% del cambio de temperatura total (T<sub>0</sub>-T<sub>f</sub>), la velocidad de enfriamiento en la fase temprana de la etapa de cristalización es lo suficientemente rápida como para aumentar rápidamente el grado de saturación mediante enfriamiento para formar los núcleos de cristales secundarios, mientras que en caso de que sea menor del 5%, la velocidad de enfriamiento en la fase temprana de la etapa de cristalización es lo suficientemente lenta como para entrar en la fase tardía de la etapa de cristalización, donde se iniciará un rápido enfriamiento antes de completarse la formación de cristales a partir de núcleos de cristal que no se han formado lo suficiente a partir de los cristales de siembra añadidos. En cualquier caso, se hace posible obtener una masa cocida de azúcar que contiene cristales con una menor cantidad de microcristales y un tamaño de partícula homogéneo.

Para llevar a cabo el método de enfriamiento controlado tal como se ha descrito anteriormente, ha de cambiarse la temperatura del líquido "T" en función del tiempo "t" representado en la fórmula [2] y es esencial un aparato o un cristizador que pueda controlar la temperatura del líquido mediante un programa predeterminado; sin embargo, de acuerdo con el método de enfriamiento semicontrolado, la temperatura del líquido "T" puede reducirse de manera lineal o por etapas frente al tiempo "t" para ajustar la variación (T<sub>0</sub>-T<sub>m</sub>) de la temperatura del líquido "T" en el punto de "t=τ/2" hasta un nivel de al menos el 5% pero menor del 50% del cambio de temperatura total (T<sub>0</sub>-T<sub>f</sub>), preferentemente, al menos el 10% pero menos del 30%, de tal forma que dicho método de enfriamiento semicontrolado tiene el beneficio de que puede llevarse a cabo de manera relativamente fácil incluso en caso de que no haya una instalación que controle de manera precisa la temperatura del líquido.

<Grado de cristalinidad>

La expresión "un grado de cristalinidad para el dihidrato de trehalosa cristalino", tal como se cita en la memoria descriptiva, significa un valor definido por la fórmula [3] a continuación.  
Fórmula [3]:

**[Ecuación 3]**

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

H<sub>100</sub>: Un valor analítico para un grado de cristalinidad, determinado basándose en el perfil de difracción de rayos X de polvo para una muestra patrón en polvo que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, donde la muestra patrón en polvo consiste sustancialmente en dihidrato de trehalosa cristalino.

H<sub>0</sub>: Un valor analítico para un grado de cristalinidad, determinado basándose en el perfil de difracción de rayos X de polvo para una muestra patrón en polvo que contiene trehalosa, donde la muestra patrón en polvo consiste

sustancialmente en una forma amorfa de la trehalosa.

Hs: Un valor analítico para un grado de cristalinidad, determinado basándose en el perfil de difracción de rayos X de polvo para, como muestra patrón, un polvo que contiene trehalosa.

5 En la fórmula [3], los perfiles de difracción de rayos X de polvo para la base de la determinación de los valores analíticos  $H_{100}$ ,  $H_0$  y Hs pueden determinarse normalmente mediante un difractómetro de rayos X de polvo equipado con un sistema óptico reflexivo o transmisivo. Los perfiles de difracción de rayos X de polvo contienen datos de ángulos de difracción y fuerzas de difracción del dihidrato de trehalosa cristalino contenido en una muestra de prueba o patrón. Algunos ejemplos de métodos para determinar los datos analíticos para los grados de cristalinidad de dichas muestras incluyen el método de Herman, el método de Vonk, etc. Entre estos, se prefiere el método de Hermans debido a su facilidad y precisión. Ya que en la actualidad estos métodos analíticos se proporcionan en forma de programas informáticos, puede usarse de manera adecuada cualquier difractómetro de rayos X de polvo equipado con un aparato analítico en el que se haya instalado cualquiera de los programas informáticos anteriores.

15 Como "muestra patrón en polvo que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, donde la muestra patrón en polvo consiste sustancialmente en dihidrato de trehalosa cristalino", para determinar el valor analítico  $H_{100}$ , ha de usarse un dihidrato de trehalosa cristalino en forma de un polvo o de un solo cristal, que tiene una pureza de trehalosa del 99,9% en peso o mayor (a lo largo de la memoria descriptiva. "% en peso" se abrevia como "%", a menos que se especifique otra cosa, peor el "%" añadido al grado de cristalinidad no debe limitarse a esto), muestra picos de difracción característicos inherentes al dihidrato de trehalosa cristalino en su patrón de difracción de rayos X de polvo y consiste sustancialmente en dihidrato de trehalosa cristalino. Algunos ejemplos de estos en forma de una composición en partículas o de un solo cristal incluyen "TREHALOSE 999" (N.º de código: TH224, una pureza de trehalosa de al menos el 99,9%), un nombre de producto de una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, comercializado por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón o comercializado por el presente solicitante como reactivo analítico; y aquellos en forma de una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino o en forma de un solo cristal, obtenido recristalizando el producto anterior. Por referencia, cuando se analiza con un programa informático para el método de Hermans, el perfil de difracción de rayos X de polvo de una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, como la muestra patrón en polvo anteriormente identificada, que consiste sustancialmente en dihidrato de trehalosa cristalino, proporciona un valor analítico  $H_{100}$ , normalmente, en el intervalo de aproximadamente el 50,6% a aproximadamente el 50,9%.

30 Como "muestra patrón en polvo que contiene trehalosa, donde la muestra patrón en polvo consiste sustancialmente en una forma amorfa de la trehalosa" para determinar el valor analítico determinar el valor analítico  $H_0$ , se usa aquella que tiene una pureza de trehalosa del 99,9% o mayor y consiste sustancialmente en trehalosa amorfa. Algunos ejemplos de dicha muestra patrón en polvo, incluyen aquellos que se obtienen disolviendo la muestra patrón en polvo anteriormente identificada para determinar el valor analítico  $H_{100}$  anteriormente indicado en una cantidad adecuada de agua destilada, concentrando la solución, criodesecando el concentrado y secando el resultante al vacío para dar un contenido de humedad del 2,0% o menor, cuando se determina mediante el método de Karl Fischer. Con estos tratamientos, se sabe por experiencia que se obtiene una composición en partículas que consiste sustancialmente en una forma amorfa de la trehalosa. En general, incluso en una composición en partículas que consiste sustancialmente en una forma amorfa de la trehalosa, los valores analíticos no deben ser necesariamente del 0% ya que, cuando se somete la composición en partículas a un difractómetro de rayos X de polvo y se analiza el perfil de difracción de rayos X de polvo con el método de Hermans, el método de Vonk, etc., se calcula una parte de la luz dispersada procedente de la forma amorfa inherente al algoritmo de un programa informático para efectuar el método analítico. Por referencia, cuando se analiza con un programa informático para el método de Hermans, el perfil de difracción de rayos X de polvo de la composición en partículas que contiene trehalosa, como la muestra patrón en polvo anteriormente identificada, que consiste sustancialmente en una forma amorfa de trehalosa, proporciona un valor analítico  $H_0$ , normalmente, en el intervalo de aproximadamente el 8,5% a aproximadamente el 8,7%.

<Diámetro medio del grano>

55 En general, se reconoce que una partícula de polvo está constituida por una pluralidad de cristales individuales, es decir, granos. Se especula con que el tamaño del grano (diámetro del grano) en un polvo que contiene cristales está reflejado por esta propiedad. La expresión "un diámetro medio del grano para el dihidrato de trehalosa cristalino" (denominado sencillamente en lo sucesivo como "diámetro del grano") tal como se cita en la presente divulgación significa una media de los diámetros del grano calculada de tal forma que se somete a una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino al análisis de difracción de rayos X de polvo; se seleccionan cinco picos de difracción de entre los picos de difracción detectados en los patrones de difracción de rayos X de polvo obtenidos, es decir, picos de difracción (los símbolos "a" a "e" en la FIG. 1) con ángulos de difracción ( $2\theta$ ) de 13,7° (índice de Miller (hkl): 101), 17,5° (índice de Miller (hkl): 220), 21,1° (índice de Miller (hkl): 221), 23,9° (índice de Miller (hkl): 231), y 25,9° (índice de Miller (hkl): 150), que se ubican en una región de ángulo relativamente bajo que es al menos disruptiva para el ancho del pico de difracción debido al estiramiento heterogéneo del grano y que estaban bien separados de los otros picos de difracción; se calibran las semiamplitudes (amplitudes completas a la mitad de la máxima) y se determinan los ángulos de difracción basándose en los valores medidos cuando se usa

silicio ("Si640d", proporcionado por el NIST: National Institute of Standards and Technology, como muestra patrón para la difracción de rayos X) como muestra patrón; y se calculan las medias respectivas de los diámetros del grano con la ecuación de Scherrer mostrada en la fórmula [4] a continuación:  
Fórmula [4]:

5

[Ecuación 4]

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

D: Tamaño del grano (Å)

λ: Longitud de onda de los rayos X (Å)

10 β: Amplitud lineal de la difracción (rad)

θ: Ángulo de difracción (°)

K: Constante (0,9 cuando se usa una semiamplitud (una amplitud completa a la mitad de la máxima) para β)

15 Al instalarse un difractómetro de rayos X de polvo convencional con un programa informático para calcular dichos diámetros del grano, se determina de manera relativamente sencilla un diámetro medio del grano dihidrato de trehalosa cristalino en tanto que esté disponible una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino. Antes del análisis de difracción de rayos X de polvo, se muele cada muestra de ensayo en un mortero y se tamiza con un tamiz de 53 μm para obtener un polvo que pasa a través del tamiz para su uso.

20 <Potencia reductora>

La expresión "una potencia reductora de la composición en partículas completa", tal como se cita en la memoria descriptiva, puede obtenerse usando D-glucosa como sustancia patrón; determinando el contenido de azúcar reductor en el contenido total de azúcar, respectivamente, basándose en la conversión a D-glucosa, mediante el método de Somogyi-Nelson y el método de antrona-ácido sulfúrico, ampliamente usado en la técnica; y calculando el porcentaje (%) del contenido de sacárido reductor respecto del contenido de azúcar total en una composición en partículas usando la fórmula [5] a continuación.

25

Fórmula [5]:

[Ecuación 5]

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

30

<Distribución del tamaño de partícula>

35 La distribución del tamaño de partícula de una composición en partículas se determina del modo siguiente en la memoria descriptiva: Se pesan de manera precisa tamices de metal con tamaños de apertura de 425, 300, 212, 150, 106, 75 y 53 μm, producidos por Kabushiki Gaisha Iida Seisaku-sho, Tokio, Japón, que cumplen con los Estándares Industriales Japoneses (JIS Z 8801-1), se apilan en el orden anteriormente identificado y se montan sobre "R-1", nombre de producto de un tamiz agitador Ro-Tap, producido por Kabushiki Gaisha Tanaka Kagaku Kikai Seisaku-sho, Osaka, Japón. Se coloca una cantidad determinada de muestra pesada en el tamiz superior (que tiene un tamaño de apertura de 425 μm) de los tamices apilados, seguido de agitación de los tamices durante 15 minutos manteniéndolos apilados. Posteriormente, se pesó nuevamente de manera precisa cada uno de los tamices y se determinó el peso de la muestra recogida en cada uno de los tamices restando el peso de cada uno de los tamices antes de cargar sobre él la muestra del peso de cada uno de los tamices correspondientes después de la agitación. La distribución del tamaño de partícula se expresa calculando el porcentaje en peso (%) de cada uno de los pesos de las composiciones en partículas con los respectivos tamaños de partículas recogidos en cada uno de los tamices respecto del peso de la muestra cargada en el tamiz superior.

40

45

2. Proceso para producir dihidrato de trehalosa cristalino

50 El proceso de la presente divulgación incluye básicamente las siguientes etapas (1) a (6):

(1) una etapa de formar trehalosa dejando que actúen una enzima formadora de α-glucosiltrehalosa y una enzima liberadora de trehalosa, que proceden de un microorganismo del género *Arthrobacter*, junto con enzima desramificadora del almidón y una CGTasa natural o recombinante sobre una solución de almidón licuado para formar trehalosa;

55

(2) una etapa de tratar con glucoamilasa dejando que la glucoamilasa actúe sobre la solución de reacción

resultante que contiene trehalosa obtenida en la etapa de formar la trehalosa;

(3) una etapa de purificar y concentrar la solución de reacción que contiene trehalosa mediante filtrado, decolorado, desalado y concentrado de la solución de reacción;

5 (4) una etapa de precipitar el dihidrato de trehalosa cristalino incorporando cristales de siembra de dihidrato de trehalosa cristalino al concentrado que contiene trehalosa;

(5) una etapa de recoger un dihidrato de trehalosa cristalino a partir de la masa cocida de azúcar obtenida en la etapa de precipitación; y

(6) una etapa de madurar, secar y opcionalmente pulverizar el dihidrato de trehalosa cristalino recogido.

10 Las etapas (1) a (6) anteriores se explican en detalle a continuación:

<Etapa (1) (Etapa de formación de trehalosa)>

15 Esta etapa es en la que se permite que una enzima formadora de  $\alpha$ -glucosiltrehalosa y una enzima liberadora de trehalosa, procedentes ambas de un microorganismo del género *Arthrobacter*, junto con una enzima desramificadora del almidón y una CGTasa natural o recombinante o una mutante de la misma actúen sobre almidón licuado como material para formar trehalosa.

20 La enzima formadora de  $\alpha$ -glucosiltrehalosa es una enzima que forma  $\alpha$ -glucosiltrehalosa que tiene una estructura de trehalosa en el extremo molecular al actuar sobre almidón licuado, mientras que la enzima liberadora de trehalosa es una enzima que libera trehalosa actuando sobre  $\alpha$ -glucosiltrehalosa. Por consiguiente, puede producirse de manera eficaz trehalosa permitiendo que actúen la enzima formadora de  $\alpha$ -glucosiltrehalosa y la enzima liberadora de trehalosa junto con la enzima desramificadora del almidón sobre almidón licuado obtenido gelatinizando y licuando almidón.

25 Algunos ejemplos del material de almidón usado en la producción de trehalosa incluyen cualquiera de los almidones superficiales, tales como almidón de maíz, almidón de arroz y almidón de trigo; almidones subterráneos, tales como almidón de patata, almidón de ocarina y almidón de tapioca; e hidrolizados parciales de almidón obtenidos hidrolizando parcialmente estos almidones con ácidos o amilasas. El material de almidón se suspende normalmente en agua en una suspensión de almidón de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 50% y se gelatiniza/licúa calentándolo en presencia de una  $\alpha$ -amilasa termoestable. El grado de licuefacción del almidón licuado se controla normalmente hasta un equivalente de dextrosa (DE) de menos de 10, más particularmente, de menos de 5.

30 Algunos ejemplos de la enzima formadora de  $\alpha$ -glucosiltrehalosa y de la enzima liberadora de trehalosa, que proceden de microorganismos del género *Arthrobacter*, incluyen los divulgados en la Patente Japonesa Kokai n.º 143876/95, Bibliografía de patentes 2 a 4, etc. Pueden usarse enzimas formadoras de  $\alpha$ -glucosiltrehalosa y enzimas liberadoras de trehalosa recombinantes, que se divulgan en las Patentes Japonesas Kokai n.º 322880/95, 322883/95, 298887/95 y 298880/95 y en la bibliografía de patente 4, etc. y también pueden usarse enzimas mutantes modificadas positivamente preparadas mediante la introducción de mutaciones de sitio específico en estas enzimas. De forma particular, pueden usarse de manera adecuada una enzima formadora de  $\alpha$ -glucosiltrehalosa y una enzima liberadora de trehalosa, que proceden de *Arthrobacter* sp. cepa S34 (FERM BP-6450) divulgadas en la bibliografía de patente 4 o procedentes de mutantes de la misma con una alta producción de enzima.

45 En el proceso de la presente divulgación, pueden usarse isoamilasa y pululanasa, que se emplean ampliamente en la técnica, como enzimas desramificadoras del almidón. Puede usarse cualquier preparación de enzimas comercializada y aquellas aisladas de microorganismos. Algunos ejemplos de dicha isoamilasa incluyen aquellos que proceden de microorganismos de las especies *Pseudomonas amyloclavata* y *Myroides odoratus* que son bien conocidos, en particular, se prefiere un espécimen de isoamilasa procedente de un microorganismo de la especie *Pseudomonas amyloclavata*, producido por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón. Algunos ejemplos de preparaciones de pululanasa incluyen una pululanasa procedente de un microorganismo de la especie *Klebsiella pneumoniae* comercializado por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón; y "PROMOZYME", un nombre comercial de una pululanasa procedente de un microorganismo de la especie *Bacillus amylopullulyticus*, comercializado por Novozymes Japan Ltd., Tokio, Japón.

55 El papel de la CGTasa en las etapas anteriores de formar trehalosa es para avanzar más la reacción anterior de formar trehalosa para aumentar en mayor medida el contenido de trehalosa en la solución de reacción mediante la conversión principalmente de maltooligosacáridos, que tienen un grado de polimerización de glucosa de cuatro o menor, que se forman inevitablemente en el proceso de formación de trehalosa anterior por una enzima formadora de  $\alpha$ -glucosiltrehalosa y una enzima liberadora de trehalosa, en maltooligosacáridos, que tienen un grado de polimerización de glucosa de cinco o más, mediante una reacción de desproporcionamiento (una reacción de reordenamiento intermolecular de sacáridos lineales) catalizada por la CGTasa.

65 Se han aislado CGTasas de diferentes microorganismos y se han desvelado sus funciones y propiedades fisicoquímicas (véase, por ejemplo, "Kogyo-yo-Toshitsu-Handbook" (Manual de Enzimas Industriales para Sacáridos), editado por Kodansha Scientific Ltd., Tokio, Japón, publicado por Kodansha Ltd., Tokio, Japón, págs. 28-32, 1999, etc.). Se han clonado los genes de algunas de las CGTasas anteriormente identificadas y se han

determinado las secuencias de aminoácidos basándose en las secuencias de bases de los genes clonados. También se sabe que existen cuatro regiones conservadas que se reconoce que existen de manera común en el grupo de enzimas clasificadas en la familia de las  $\alpha$ -amilasas en las secuencias de aminoácidos de las CGTasas anteriores. Se ha revelado la estructura estereoquímica de la proteína CGTasa procedente de un microorganismo de la especie *Geobacillus stearothermophilus* mediante análisis estructural de cristal por rayos X y también se han revelado los tres restos catalíticos de la CGTasa, es decir, el 225<sup>o</sup> resto, de ácido aspártico (D225), el 253<sup>er</sup> resto, de ácido glutámico (E253) y el 324<sup>o</sup> resto, de ácido aspártico (D324) en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (véase, por ejemplo, "Kogyo-yo-Toshitsu-Koso-Handbook" (Manual de Enzimas Industriales para Sacáridos), editado por Kodansha Scientific Ltd., Tokio, Japón, publicado por Kodansha Ltd., Tokio, Japón, págs. 56-63, 1999).

Puede usarse una CGTasa natural o recombinante, procedente de un microorganismo del género *Paenibacillus* o enzimas mutantes de la misma como CGTasa en el proceso de la presente divulgación. Por ejemplo, pueden usarse CGTasas procedentes de cepas de microorganismos conocidos hasta la fecha de las especies *Paenibacillus illinoisensis*, *Paenibacillus pabuli*, y *Paenibacillus amylolyticus*, y aquellas procedentes de microorganismos del género *Paenibacillus*, aislados del medio natural, como "CGTasa natural procedente de un microorganismo del género *Paenibacillus*" tal como se cita en el presente documento. Más concretamente, se usan de manera más adecuada CGTasas procedentes de *Paenibacillus illinoisensis*, cepa NBRC15959, *Paenibacillus illinoisensis*, cepa NBRC15379, *Paenibacillus pabuli*, cepa NBRC13638 y *Paenibacillus amylolyticus*, cepa NBRC15957 y las procedentes de cepas mutantes de las mismas con alta producción de enzima, que se obtienen introduciendo mutaciones en los microorganismos anteriores del género *Paenibacillus*, por ejemplo, mediante tratamientos de mutación tales como irradiación ultravioleta y sustancias químicas, usados de manera convencional en la técnica. Además, "ALKALI CD AMYLASE", un nombre de producto de una CGTasa procedente de un microorganismo de la especie *Paenibacillus* sp., producida por Nagase ChemteX Corp., Osaka, Japón, también puede usarse como CGTasa procedente de un microorganismo del género *Paenibacillus*. De hecho, la CGTasa, que se ha usado convencionalmente para producir un polvo de grado alimentario que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, es la que procede de un microorganismo de la especie *Geobacillus stearothermophilus*.

En el proceso de la presente divulgación, las CGTasas, que tienen las siguientes secuencias parciales de aminoácidos (a) a (d), se usan de manera adecuada:

- (a) Gly-Ser-X<sub>1</sub>-Ala-Ser-Asp;
- (b) Lys-Thr-Ser-Ala-Val-Asn-Asn;
- (c) Lys-Met-Pro-Ser-Phe-Ser-Lys; y
- (d) Val-Asn-Ser-Asn-X<sub>2</sub>-Tyr

(En donde X<sub>1</sub> significa Ala o Ser y X<sub>2</sub> significa Ala o Thr, respectivamente).

Las secuencias de aminoácidos parciales anteriores son características de las CGTasas procedentes de microorganismos del género *Paenibacillus*.

Como ejemplos de "una CGTasa recombinante procedente de un microorganismo del género *Paenibacillus*" y tal como se cita en la presente divulgación, aquellas, que se obtienen clonando un gen de CGTasa procedente de los microorganismos anteriores del género *Paenibacillus* y que permiten la expresión del gen de CGTasa clonado en un microorganismo hospedador adecuado, tal como *E. coli* y *Bacillus subtilis*, pueden usarse de manera adecuada. Por comparación, las CGTasas procedentes de *Paenibacillus illinoisensis*, cepa NBRC15379, *Paenibacillus pabuli*, cepa NBRC13638 y *Paenibacillus amylolyticus*, cepa NBRC15957 son genes de CGTasa clonados respectivamente a partir de estos microorganismos por los presentes solicitantes de manera independiente y se determinaron las secuencias de bases de los genes clonados, revelando que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente. Las CGTasas recombinantes que tienen una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1 a 3 pueden usarse de manera similar a una CGTasa natural procedente de un microorganismo del género *Paenibacillus* en el proceso de la presente divulgación.

Como ejemplos de "una enzima mutante de una CGTasa procedente de un microorganismo del género *Paenibacillus*" (abreviada como "una CGTasa mutante", en lo sucesivo) tal como se cita en la presente divulgación, pueden usarse de manera adecuada CGTasas mutantes e las que se introduce una eliminación, reemplazo o adición de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del microorganismo anterior en un intervalo que no altere sustancialmente la especificidad de sustrato y la actividad enzimática de la CGTasa. El número de aminoácidos que puede eliminarse, reemplazarse o añadirse en la secuencia de aminoácidos de dicha CGTasa mutante no debe restringirse particularmente, en tanto que pueda conservarse la especificidad de sustrato y la actividad enzimática de la CGTasa, sin embargo, se prefiere que sea menos de un 5% de la secuencia de aminoácidos, que consta de 680 restos de aminoácidos, es decir, aproximadamente hasta 30 restos de aminoácidos, preferentemente, al menos uno pero menos de 20, más preferentemente, al menos uno pero menos de 10. Asimismo, en referencia al sitio de mutación introducido en la secuencia de aminoácido, no ha de restringirse específicamente en tanto que se conserven sustancialmente la especificidad de sustrato y la actividad enzimática de la CGTasa, sin embargo, se evitará deseablemente cualquier introducción de mutaciones en las cuatro regiones conservadas que son comunes en un grupo de enzimas clasificadas como la familia de alfa-amilasa y que están

presentes en la secuencia de aminoácidos de la CGTasa y en las secuencia de aminoácidos parciales anteriormente identificadas de (a) a (d) que son características de las CGTasas procedentes de microorganismos del género *Paenibacillus*.

- 5 Algunos ejemplos más concretos de una "CGTasa natural o recombinante procedente de un microorganismo del género *Paenibacillus* o una enzima mutante de la misma" incluyen las CGTasas anteriormente identificadas que tienen cualquiera de las secuencias de aminoácidos respectivas de las SEQ ID NO: 1 a 3 y CGTasas mutantes que tienen la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 o 13, preparadas introduciendo una mutación de sitio específico en el gen de CGTasa de *Paenibacillus illinoisensis*, cepa NBRC15379 divulgada en el ejemplo que se describe más adelante.

15 En el proceso de la presente divulgación, la enzima formadora de  $\alpha$ -glucosiltrehalosa anteriormente identificada procedente de un organismo del género *Arthrobacter*, la enzima liberadora de trehalosa anteriormente identificada procedente de un organismo del género *Arthrobacter*, una enzima desramificadora del almidón y una CGTasa procedente de un microorganismo del género *Paenibacillus* se añaden de manera adecuada a almidón licuado (pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 10) como sustrato en cantidades respectivas de 0,5 a 10 unidades, 2,5 a 25 unidades, 50 a 1.000 unidades y de 0,5 a 50 unidades por gramo de almidón a una temperatura en el intervalo de 30 a 60°C durante 10 a 100 horas. El contenido de trehalosa en la solución de reacción resultante en el momento de terminar la reacción enzimática es normalmente de aproximadamente el 86%, d.s.b.

20 <Etapa (2) (Etapa de tratamiento con glucoamilasa)>

25 Esta etapa es la que permite adicionalmente que un espécimen de glucoamilasa actúe sobre la solución de reacción, obtenida en la etapa (1) de formación de trehalosa, para aumentar el contenido de trehalosa, d.s.b. De hecho, la solución de reacción obtenida en la etapa de formar trehalosa contiene, junto con la trehalosa, sacáridos tales como D-glucosa, maltosa, maltooligosacáridos que tienen un grado de polimerización de glucosa de al menos tres,  $\alpha$ -glucosiltrehalosa y  $\alpha$ -maltosiltrehalosa y, cuando se deja que la glucoamilasa actúe sobre la solución, la maltosa y los maltooligosacáridos que tienen un grado de polimerización de glucosa de al menos tres pueden hidrolizarse en D-glucosa, mientras que la  $\alpha$ -glucosiltrehalosa, tal como  $\alpha$ -glucosiltrehalosa y  $\alpha$ -maltosiltrehalosa pueden hidrolizarse en D-glucosa y trehalosa para aumentar la pureza de la trehalosa, es decir, el contenido de trehalosa, d.s.b., en la solución de reacción.

35 Las glucoamilasas que pueden usarse en el proceso de la presente divulgación no deben restringirse específicamente dependiendo de sus fuentes y orígenes, en tanto que puedan hidrolizar la maltosa y los maltooligosacáridos que tienen un grado de polimerización de glucosa de al menos tres hasta D-glucosa y también hidrolizar la  $\alpha$ -glucosiltrehalosa, tal como  $\alpha$ -glucosiltrehalosa y  $\alpha$ -maltosiltrehalosa en D-glucosa y trehalosa. Los especímenes de glucoamilasa comerciales, por ejemplo, tales como "GLUCZYMEAF6", un nombre de producto comercializado por Amano Enzyme Inc., Aichi, Japón y "GLUCOZYME", un nombre de producto comercializado por Nagase ChemteX Corp., Osaka, Japón, pueden usarse de manera adecuada.

40 El contenido de trehalosa en la solución de reacción después del tratamiento con la glucoamilasa o en la solución de sacárido que contiene trehalosa es normalmente de más del 86,0%, d.s.b., preferentemente, del 87,0% o mayor. Por comparación, cuando se usa una CGTasa procedente de un microorganismo de la especie *Geobacillus stearothermophilus* en lugar de usar una CGTasa procedente de un microorganismo del género *Paenibacillus*, el contenido de trehalosa en la solución de sacárido que contiene trehalosa después del tratamiento con la glucoamilasa es menor del 86,0%, d.s.b. y nunca es del 86,0% o mayor.

<Etapa (3) (Etapa de purificación y concentración)>

50 Esta etapa es la de eliminar impurezas tratando una solución de sacárido que contiene trehalosa que tiene un contenido aumentado de trehalosa, d.s.b., después del tratamiento con la glucoamilasa, con filtración, centrifugación, etc., de una manera convencional; decolorar la solución de sacárido resultante con carbón activado; desalar la solución con una resina de intercambio catiónico (forma de  $H^+$ ) y una resina de intercambio aniónico (forma de  $OH^-$ ); y concentrar la solución resultante hasta dar una concentración adecuada para su cristalización. Debido a que el contenido de trehalosa, d.s.b., en la solución de reacción se ha aumentado hasta un nivel del 86,0% o mayor mediante la etapa (2) de tratamiento con glucoamilasa, en la etapa (3) de purificación y concentración, no hay necesidad de una etapa de aumento adicional del contenido de trehalosa, tal como una etapa de fraccionamiento mediante cromatografía en columna.

60 <Etapa (4) (Etapa de cristalización)>

65 Esta etapa es la de precipitar el dihidrato de trehalosa cristalino de la solución de sacárido que contiene trehalosa obtenido mediante las etapas (1) a (3) en presencia de un cristal de siembra de dihidrato de trehalosa cristalino. Después de que la solución de sacárido con un contenido de trehalosa, d.s.b., que se ha aumentado hasta un nivel predeterminado, se haya controlado normalmente hasta dar un grado de saturación de trehalosa en el intervalo de 1,05 a 1,50 o se haya controlado para dar una concentración de trehalosa de aproximadamente el 60 a

aproximadamente el 85% y para dar una temperatura del líquido de aproximadamente 40 a aproximadamente 80°C, la solución de sacárido resultante se transfiere a un cristizador, al que se incorpora un cristal de siembra de dihidrato de trehalosa cristalino en una cantidad normalmente igual del 0,1 al 5% (p/v) y en particular, del 0,5 al 2% (p/v) del volumen de la solución de sacárido concentrada en el cristizador y la solución de sacárido concentrada se enfría de manera no forzada hasta de 5 a 60°C durante 3 a 48 horas en condiciones de agitación suave para inducir la precipitación del dihidrato de trehalosa cristalino. Por comparación, cuando ya está presente un cristal de siembra de dihidrato de trehalosa cristalino en el cristizador, etc., no se necesitará específicamente cristal de siembra adicional de dihidrato de trehalosa cristalino. La precipitación del dihidrato de trehalosa cristalino de la solución concentrada, con el objetivo de trabajar de manera eficiente, se efectúa normalmente en presencia de un cristal de siembra.

Ventajosamente, puede usarse un método de enfriamiento controlado o un método de enfriamiento semicontrolado en la etapa de cristalización, en lugar del método de enfriamiento no forzado anterior. En caso de llevar a cabo la cristalización mediante dicho método de enfriamiento controlado o dicho método de enfriamiento semicontrolado, la solución de sacárido que contiene trehalosa, que se ha ajustado a una temperatura específica mediante la etapa (3) anterior se transfiere a un cristizador, se le incorpora un cristal de siembra de dihidrato de trehalosa cristalino en una cantidad igual del 0,1 al 5% (p/v), en particular, del 0,5 al 2% (p/v) del volumen de la solución de sacárido concentrada en el cristizador y se deja que se efectúe la cristalización dejando que la temperatura del líquido se reduzca gradualmente en la etapa temprana de la etapa de cristalización y se reduce rápidamente en la etapa tardía de la etapa de enfriamiento controlando el enfriamiento en condiciones de agitación suave. El tiempo necesario para la cristalización varía dependiendo de la cantidad de cristal de siembra de dihidrato de trehalosa cristalino que se vaya a añadir; por ejemplo, en caso de un método de enfriamiento semicontrolado, el tiempo de enfriamiento total se reparte entre al menos dos zonas, preferentemente, preferentemente al menos tres zonas y después, en cada zona se reduce la temperatura de manera prácticamente lineal frente al tiempo; se deja que la temperatura del líquido "T" se reduzca de manera lineal o por etapas frente al tiempo "t" de tal forma que se permite que la variación ( $T_0 - T_m$ ) de la temperatura del líquido "T" en el punto de " $t = t/2$ " sea de al menos el 5% pero de menos del 50% del cambio de temperatura total ( $T_0 - T_f$ ), preferentemente, al menos el 10% pero menos del 30%. Por ejemplo, cuando se precipitan cristales enfriando la solución de sacárido que contiene trehalosa de 60°C a 20°C a lo largo de 10 horas, el tiempo de enfriamiento se divide en dos zonas de 6 horas y 4 horas, donde la solución se enfría preferentemente de 60°C a 50°C a lo largo de 6 horas y después, se enfría la solución de 50°C a 20°C a lo largo de 4 horas o el tiempo de enfriamiento se divide en dos zonas de 7 horas y 3 horas, donde la solución también se enfría preferentemente de 60°C a 45°C a lo largo de 7 horas y después, se enfría la solución de 45°C a 20°C a lo largo de 3 horas. Más preferentemente, el tiempo de enfriamiento se divide en tres zonas de 4, 3 y 3 horas y la solución se enfría sucesivamente de 60°C a 55°C a lo largo de 4 horas en la primera zona, se enfría de 55°C a 50°C a lo largo de 3 horas en la zona siguiente y se enfría de 50°C a 20°C a lo largo de 3 horas en la última zona.

De este modo, de acuerdo con un método de enfriamiento controlado o un método de enfriamiento semicontrolado, puede obtenerse una masa cocida de azúcar que apenas genera microcristales de dihidrato de trehalosa cristalino y contiene cristales con un diámetro de partícula sustancialmente homogéneo, en comparación con un método de cristalización que enfría de manera no forzada la solución líquida sin controlar la temperatura. Como resultado, puede aumentarse el rendimiento de producción del dihidrato de trehalosa cristalino frente al almidón que respecto del obtenido mediante un método de enfriamiento no forzado. Tal como se describe más adelante, la composición en partículas obtenida que contiene dihidrato de trehalosa cristalino tiene rasgos característicos de tener tanto una alta pureza de trehalosa como un alto grado de cristalinidad para el dihidrato de trehalosa cristalino, lo que la convierte en un índice importante para la aglomeración, que los de un polvo obtenido mediante un método de enfriamiento no forzado. En el caso de un método de enfriamiento controlado o de un método de enfriamiento semicontrolado, se obtiene de manera notable una composición en partículas con una distribución del tamaño de partículas más homogénea, en comparación con un polvo obtenido mediante un método de cristalización de enfriamiento no forzado.

<Etapa (5) (Etapa de recogida)>

Esta etapa es la de recoger el dihidrato de trehalosa cristalino mediante centrifugación de acuerdo con un método de separación de sólido-líquido convencional a partir de la masa de azúcar cocida obtenida en la etapa de cristalización (4). El dihidrato de trehalosa cristalino recogido se lava rociándolo con una pequeña cantidad de agua purificada para eliminar un jarabe con sacáridos amorfos, adheridos a la superficie del dihidrato de trehalosa cristalino. La cantidad de agua purificada a usar para lavar los cristales es preferentemente de al menos el 3% pero de no más del 10% del peso de una masa cocida de azúcar antes de la centrifugación. Cuando la cantidad del agua purificada anterior es menor del 3%, no puede efectuarse un lavado suficiente, lo que da como resultado restos de jarabe con sacáridos amorfos y el peligro de no obtener una pureza de trehalosa deseada. Por el contrario, cuando la cantidad de agua purificada usada para el lavado es mayor del 10%, aumenta la cantidad de dihidrato de trehalosa cristalino que se disuelve y elimina mediante el lavado y da como resultado el peligro de reducir el rendimiento de producción frente al almidón.

<Etapa (6) (Etapa de maduración y secado)>

Esta etapa es la de obtener una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino dejando reposar el dihidrato de trehalosa cristalino recogido en una atmósfera con una temperatura y humedad específicas durante un periodo de tiempo específico para madurar los cristales mientras se secan con aire caliente. La temperatura del producto de los cristales, la humedad relativa de la atmósfera y el tiempo de retención en la etapa de maduración y secado no están restringidos específicamente, en tanto que se obtenga una composición en partículas deseada, sin embargo, los cristales han de mantenerse preferentemente a una temperatura de 20 a 55°C como temperatura del producto y una humedad ambiente relativa del 60 al 90% y el tiempo de maduración y secado debe ser preferentemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 24 horas. La composición en partículas obtenida mediante la etapa de maduración y secado se enfría posteriormente de manera no forzada hasta temperatura ambiente. La composición en partículas, ventajosamente, puede enfriarse de manera forzada para hacer que la temperatura del producto sea aproximadamente la temperatura ambiente soplando sobre los productos aire limpio aproximadamente a temperatura ambiente. La composición en partículas obtenida de este modo puede usarse intacta u opcionalmente, pulverizarse hasta obtener un producto final.

De acuerdo con el proceso de producción de la composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino de la presente divulgación, se obtiene una solución de sacárido que contiene trehalosa con un contenido de trehalosa tan alto como de más del 86,0%, d.s.b. y que no requiere de una etapa de fraccionamiento mediante cromatografía en columna y no hay pérdidas por el fraccionamiento. Por lo tanto, puede obtenerse una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino con un alto rendimiento de producción frente al almidón. Debido a que el proceso emplea un método de separación por centrifugación de los cristales precipitados para eliminar un jarabe que contiene impurezas sin emplear un método de azúcar total para cristalizar toda la masa cocida de azúcar que contiene cristales precipitados y solidificación o secado por pulverización del resultante, el contenido de trehalosa en la composición en partículas resultante que contiene dihidrato de trehalosa cristalino puede aumentarse fácilmente hasta un nivel del 98,0% o más, para producir una composición en partículas de alta pureza que contiene dihidrato de trehalosa cristalino.

Cuando la cristalización se efectúa mediante un método de enfriamiento no forzado, la composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino producida de este modo es sustancialmente el mismo polvo que un polvo de grado alimentario convencional que contiene dihidrato de trehalosa cristalino en cuanto a sus propiedades de aglomeración, etc., cuando se almacena y normalmente contiene partículas con un tamaño de partícula de 53 µm o mayor pero menor de 425 µm en una cantidad del 70% o más de la composición en partículas completa y partículas con un tamaño de partícula de 53 µm o mayor pero menor de 300 µm en una cantidad del 50% o más de la composición en partículas completa. Cuando la cristalización se efectúa mediante un método de enfriamiento controlado o un método de enfriamiento semicontrolado, la composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino producido mediante el proceso de la presente divulgación es un polvo difícilmente aglomerable en comparación con el polvo de grado alimentario convencional que contiene trehalosa y normalmente contiene partículas con un tamaño de partícula de 53 µm o mayor pero menor de 425 µm en una cantidad del 80% o más de la composición en partículas completa y partículas con un tamaño de partícula de 53 µm o mayor pero menor de 300 µm en una cantidad del 60% o más de la composición en partículas completa. La composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino producida mediante el proceso de la presente divulgación tiene normalmente un poder reductor del 0,5% o menor cuando se calcula mediante la fórmula [5] anteriormente mencionada y es una composición en partículas superior que no provoca cambio de color producido por oscurecimiento incluso cuando se incorpora en productos alimentarios, productos farmacéuticos, etc.

Por consiguiente, la composición en partículas producida mediante el proceso de la presente divulgación puede usarse intacta o usarse después de controlar de manera adecuada el tamaño de partícula como material en polvo para productos alimentarios, cosméticos, fármacos, productos farmacéuticos, etc. En particular, como se describió anteriormente, la composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino producida mediante el proceso de la presente divulgación que emplea un método de enfriamiento controlado durante la cristalización: es significativamente una composición en partículas difícilmente aglomerable en comparación con un polvo de grado alimentario que contiene trehalosa y puede decirse que es una composición en partículas convencionalmente desconocida completamente nueva que contiene dihidrato de trehalosa cristalino. La composición en partículas tiene la ventaja adicional de que puede incorporarse en uno solo o en una pluralidad de materiales en polvo diferentes para productos alimentarios, cosméticos, fármacos, productos farmacéuticos, etc., en los campos de producción de productos alimentarios, cosméticos, fármacos y productos farmacéuticos, que se producen usando plantas de producción que están diseñadas para usar en sus instalaciones materiales en polvo.

Los siguientes experimentos explican de manera concreta el proceso para producir la composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino de la presente divulgación:

<Experimento 1: Efecto del origen de la CGTasa en el contenido de trehalosa en la solución de reacción enzimática>

Se llevaron a cabo los siguientes experimentos para examinar cómo afecta el origen de la CGTasa usada al contenido de trehalosa en una solución de sacárido, formada mediante una reacción enzimática, en un sistema de reacción enzimático, donde se dejan actuar una enzima formadora de α-glucosiltrehalosa procedente de un microorganismo del género *Arthrobacter* y un enzima liberadora de trehalosa también procedente de un

microorganismo del género *Arthrobacter* sobre almidón licuado, junto con una enzima desramificadora del almidón y una CGTasa y después se deja actuar la glucoamilasa sobre la mezcla resultante para formar trehalosa.

<Experimento 1-1: Preparación de la solución enzimática que contiene enzima formadora de  $\alpha$ -glucosiltrehalosa y enzima liberadora de trehalosa procedentes de un microorganismo del género *Arthrobacter*>

Mediante el método divulgado en el ejemplo 2-1 de la bibliografía de patente 4 (Patente Japonesa Kokai. N.º 2000-228980), se cultivó *Arthrobacter* sp., cepa S34 (FERM BP-6450) para obtener aproximadamente 20 l de cultivo. Al cultivo de 20 l se le añadieron dos gramos de "EGG WHITE LYSOZYME", un nombre de producto de un espécimen de lisozima producido por Nagase ChemteX Corp., Osaka, Japón, para efectuar la lisis celular en el cultivo mediante agitación a 260 rpm a 37°C durante 24 horas. La solución de células lisadas resultante se centrifugó para recoger un sobrenadante para obtener un extracto celular, que después se extrajo por precipitación salina convencional con sulfato de amonio. El precipitado formado se dializó frente a tampón de fosfato de sodio 10 mM (pH 7,0) y el dializado se sometió a una cromatografía de intercambio aniónico usando "SEPABEADS FP DA13", un gel producido por Mitsubishi Chemical Industries, Co., Tokio, Japón, para recoger una fracción enzimática. La fracción recogida era una preparación de enzima parcialmente purificada que contenía aproximadamente 15.600 unidades de una enzima liberadora de trehalosa y aproximadamente 3.100 de una enzima formadora de  $\alpha$ -glucosiltrehalosa. Se determinó la actividad de la enzima formadora de  $\alpha$ -glucosiltrehalosa y la enzima liberadora de trehalosa de acuerdo con los métodos divulgados anteriormente en la bibliografía de patente 4 (Patente Japonesa Kokai N.º 2000-228980).

<Experimento 1-2: CGTasas procedentes de diversos microorganismos>

Se usaron las siguientes CGTasas como derivadas de diversos microorganismos. Una CGTasa procedente de *Geobacillus stearothermophilus*, cepa Tc-91 (FERM BP-11273), producida por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón, se usó como CGTasa procedente de un microorganismo de la especie *Geobacillus stearothermophilus*; "CONTIZYME", un nombre comercial de una CGTasa comercializada vendida por Amano Enzyme Inc., Aichi, Japón, se usó como CGTasa procedente de un microorganismo de la especie *Bacillus macerans*; y "TORUZYME", un nombre comercial de una CGTasa comercializada vendida por Novozymes Japan Ltd., Tokio, Japón, se usó como CGTasa procedente de un microorganismo de la especie *Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes*.

Se prepararon las siguientes CGTasas como CGTasas procedentes de microorganismos del género *Paenibacillus*: *Paenibacillus illinoisensis*, cepa NBRC15959, *Paenibacillus illinoisensis*, cepa NBRC15379, *Paenibacillus pabuli*, cepa NBRC13638 y *Paenibacillus amylolyticus*, cepa NBRC15957 se cultivaron respectivamente en un medio de cultivo líquido que contenía dextrina al 2%, cloruro de amonio al 0,5%, hidrogenofosfato de potasio al 0,05%, sulfato de magnesio al 0,025% y carbonato de calcio al 0,5% a 27°C durante tres días. Se centrifugaron los cultivos resultantes y los sobrenadantes respectivos se extrajeron por precipitación salina convencional con sulfato de amonio y se dializaron para obtener soluciones enzimáticas en bruto de CGTasas procedentes de diferentes microorganismos. Las soluciones enzimáticas en bruto de CGTasas obtenidas de este modo se sometieron respectivamente a una cromatografía en columna de intercambio aniónico usando DEAE-TOYOPEARL 650S GEL comercializado por Tosoh Corp., Tokio, Japón y una cromatografía en columna hidrófoba usando BUTYL-TOYOPEARL 650M GEL comercializado por Tosoh Corp., Tokio, Japón, para obtener CGTasas parcialmente purificadas. Se determinó la actividad de cada una de las CGTasas procedentes de diferentes microorganismos de acuerdo con el método anteriormente identificado y se calcularon con la fórmula [1].

<Experimento 1-3: Reacción de formación de trehalosa>

Se suspendió almidón de maíz en agua para dar una concentración del 30% y se mezcló con carbonato de calcio al 0,1%. La suspensión resultante se ajustó a pH 6,0 y se mezcló con "TERMAMEAL 60L", un nombre de producto de un espécimen de  $\alpha$ -amilasa termoestable comercializado por Novozymes Japan Ltd., Tokio, Japón, en una cantidad igual al 0,2% del almidón, d.s.b., para gelatinizar y licuar el almidón haciendo reaccionar enzimáticamente a 95°C durante 15 min. La solución de almidón licuado resultante se autoclavó a 120°C durante 30 min, se enfrió a 51°C, se ajustó a pH 5,7, se mezcló con dos unidades/g de almidón, d.s.b., de una enzima formadora de  $\alpha$ -glucosiltrehalosa, 10 unidades/g de almidón, d.s.b., de una enzima liberadora de trehalosa, 300 unidades/g de almidón, d.s.b., de un espécimen de isoamilasa comercializado por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón, y 2 unidades/g de almidón, d.s.b. de cualquiera de las CGTasas divulgadas en el experimento 1-2 o preparadas en el experimento 1-2 y se hizo reaccionar enzimáticamente durante 64 horas. La solución de reacción resultante se calentó a 97°C durante 30 min para inactivar las enzimas respectivas restantes, se ajustó a pH 4,5, se mezcló con 10 unidades/g de almidón, d.s.b. de "GLUCOZYME #20000", un nombre de producto de un espécimen de glucoamilasa comercializado por Nagase ChemteX Corp., Osaka, Japón y se hizo reaccionar enzimáticamente durante 24 horas. La solución de reacción obtenida de este modo se calentó a 95°C durante 10 min para inactivar las enzimas restantes y se sometió al ensayo para determinar el contenido de trehalosa en la solución de reacción divulgado a continuación. Además, como control se preparó una solución de reacción, obtenida llevando a cabo una reacción enzimática en las mismas condiciones de antes salvo por no añadir CGTasa.

<Experimento 1-4: Ensayo para determinar el contenido de trehalosa en la solución de reacción>

Las soluciones de reacción obtenidas en el experimento 1-3 se elaboraron, respectivamente, en las soluciones de reacción 1 a 8 mostradas en la tabla 1 y se determinó del siguiente modo el contenido de trehalosa en cada reacción: Las soluciones 1 a 8 se prepararon, respectivamente, en soluciones al 1% con agua purificada, se filtraron con un filtro de membrana de 0,45 µm y se sometieron a análisis HPLC en las siguientes condiciones, seguido del cálculo del contenido de trehalosa en cada solución de reacción basándose en las áreas de pico aparecidas en los cromatogramas mediante un refractómetro diferencial y convirtiendo los valores basándose en el sólido seco. Los resultados se encuentran en la tabla 1. Los contenidos de trehalosa en las soluciones de reacción mostrados en la tabla 1 son los valores que pueden obtenerse con una reproducibilidad relativamente elevada dentro de una variabilidad considerable, incluso cuando las CGTasas respectivas se someten repetidas veces a la reacción de formación de trehalosa y al tratamiento con glucoamilasa cinco veces en las mismas condiciones.

Condiciones analíticas:

Sistema HPLC: "LC-10AD", comercializado por Shimadzu Corp., Kyoto, Japón;  
 Desgasificador: "DGU-12AM", comercializado por Shimadzu Corp., Kyoto, Japón;  
 Columna: "MCL GEL CK04SS", comercializado por Mitsubishi Chemical Corp., Tokio, Japón  
 Volumen de inyección de muestra: 20 µl;  
 Eluente: Agua purificada;  
 Caudal: 0,4 ml/min;  
 Temperatura: 85°C;  
 Refractómetro diferencial: "RID-10A", comercializado por Shimadzu Corp., Kyoto, Japón;  
 Aparato de procesamiento de datos: "CHROMATOPAC C-R7A", comercializado por Shimadzu Corp., Kyoto, Japón;

Tabla 1

Solución de reacción	Origen de la CGTasa	Contenido de trehalosa en la solución de reacción después del tratamiento con la glucoamilasa (% en peso d.s.b.)
1	Control (sin adición de CGTasa)	82,8
2	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> Tc-91	84,7
3	<i>Bacillus macerans</i>	85,1
4	<i>Thermoanaerobacterium thermosulfurigenes</i>	83,4
5	<i>Paenibacillus illinoisensis</i> NBRC15959	87,6
6	<i>Paenibacillus illinoisensis</i> NBRC15379	87,4
7	<i>Paenibacillus pabuli</i> NBRC13638	87,1
8	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> NBRC15957	86,5

Tal como resulta evidente a partir de la tabla 1, cuando se usó de manera convencional la CGTasa procedente de *Geobacillus stearothermophilus*, cepa Tc-91 para producir trehalosa (solución de reacción 2), el contenido de trehalosa después del tratamiento con la glucoamilasa fue de hasta el 84,7%, mientras que el contenido de trehalosa se aumentó hasta el 85,1%, cuando se usó la CGTasa procedente de un microorganismo de la especie *Bacillus macerans* (solución de reacción 3), a pesar de que la cantidad aumentada era despreciable. Cuando se usó CGTasa procedente de un microorganismo de la especie *Thermoanaerobacter thermosulfurigenes* (solución de reacción 4), el contenido de trehalosa fue del 83,4% que era menor que en caso de usar una CGTasa usada convencionalmente, procedente de *Geobacillus stearothermophilus*, cepa Tc-91 (solución de reacción 2), al formar la trehalosa.

Por el contrario, cuando se usaron las CGTasas procedentes de microorganismos del género *Paenibacillus* (soluciones de reacción 5 a 8), el contenido de trehalosa de cualquiera de las soluciones después del tratamiento con la glucoamilasa fue de más del 86,0%, d.s.b., que aumentó significativamente en comparación con el uso de la CGTasa procedente de *Geobacillus stearothermophilus*, cepa Tc-91 que se había usado de manera convencional para formar la trehalosa (solución de reacción 2). De forma particular, cuando se usaron CGTasas procedentes de *Paenibacillus illinoisensis*, cepa NBRC15959 (solución de reacción 5), *Paenibacillus illinoisensis*, cepa NBRC15379 (solución de reacción 6) y *Paenibacillus pabuli*, cepa NBRC13638 (solución de reacción 7) como CGTasas, el contenido de trehalosa era mayor del 87,0%, lo que revela que se obtienen soluciones de sacárido que contienen trehalosa con un alto contenido de trehalosa mediante dichas reacciones enzimáticas. Entre los resultados de este experimento, cuando se usó una CGTasa procedente de un microorganismo de la especie *Paenibacillus illinoisensis*, se obtuvo el máximo contenido de trehalosa, revelando que las CGTasas procedentes de microorganismos de la



sobre la placa plana; "Ligeramente aglomerada", (±): La muestra de ensayo mostró de manera ligera aunque reconocible la forma hemisférica de la parte inferior del tubo; y "No aglomerada", (-): La muestra de ensayo se deformó y no conservó la forma hemisférica de la parte inferior del tubo. Los resultados se muestran en la columna de "Aglomeración" en la tabla 2.

5

Tabla 2

Muestra de ensayo	Pureza de la trehalosa (% en peso)	Rendimiento de producción frente al almidón (% en peso)	Aglomeración
1	98,4	31	+
2	98,8	38	±
3	99,2	39	±
4	98,7	37	+
5	99,3	42	±
6	99,2	42	±
7	99,2	42	±
8	99,1	41	+
9	99,0	-	±

Como se muestra en la tabla 2, el contenido de trehalosa, d.s.b., de las composiciones en partículas que contenían dihidrato de trehalosa cristalino de las muestras de ensayo 1 a 8, es decir, las purezas de trehalosa fueron todas mayores del 98,0% y fueron composiciones en partículas de alta pureza que contienen dihidrato de trehalosa cristalino, de manera similar a la muestra de ensayo 9 como polvo de grado alimentario convencional que contiene dihidrato de trehalosa cristalino. No obstante, en cuanto al rendimiento de producción frente al almidón, aquellas en las muestras de ensayo 2 a 4, donde se usaron CGTasas distintas de las procedentes de microorganismos del género *Paenibacillus*, conservaron un rendimiento de producción frente al almidón tan alto como del 39%, mientras que las muestras de ensayo 5 a 8, preparadas con CGTasas procedentes de microorganismos del género *Paenibacillus*, mostraron un rendimiento de producción frente al almidón del 41 al 42%, mayor del 40%, lo que revela que se halló una diferencia entre los orígenes de las CGTasas usadas. Comparando los resultados en la tabla 1 con los de la tabla 2, las composiciones en partículas que contenían dihidrato de trehalosa cristalino preparadas a partir de soluciones de reacción enzimática con mayores contenidos de trehalosa después del tratamiento con glucoamilasa tendían a tener un mayor rendimiento de producción frente al almidón y se halló una relación entre el contenido de trehalosa en las soluciones de reacción enzimática y los rendimientos de producción frente al almidón.

Basándose en estos resultados, cuando se usan CGTasas procedentes de microorganismos del género *Paenibacillus* (muestras de ensayo 5 a 8) como CGTasas, el contenido de trehalosa en las soluciones de reacción enzimática después del tratamiento con la glucoamilasa es mayor del 86,0% y como consecuencia, se reveló que el rendimiento de producción frente al almidón para las composiciones en partículas que contienen dihidrato de trehalosa cristalino también aumenta hasta el 41% o más. En particular, cuando se usan CGTasas procedentes de microorganismos de la especie *Paenibacillus illinoisensis* o *Paenibacillus pabuli* (muestras de ensayo 5 a 7), el contenido de trehalosa en las soluciones de reacción enzimáticas después del tratamiento con la glucoamilasa es mayor del 87,0% y el rendimiento de producción frente al almidón aumenta adicionalmente hasta el 42%. Cuando se usan CGTasas procedentes de microorganismos del género *Paenibacillus*, los niveles de mejora en el rendimiento de producción frente al almidón (el rendimiento de producción frente al almidón para las muestra de ensayo 5 a 8) son del 3 al 4%, en comparación con una CGTasa de uso convencional procedente de *Geobacillus stearothermophilus*, cepa Tc-91 (muestra de ensayo 2), sin embargo, resulta extraordinario el hecho de que el rendimiento de producción frente al almidón se mejoren incluso de un 3 a un 4% en una producción a escala industrial de composiciones en partículas que contienen dihidrato de trehalosa cristalino.

En cuanto a la capacidad de aglomeración, como propiedad importante para su manipulación en estado de polvo, la muestra de ensayo 1 preparada a partir de solución de sacárido que contiene trehalosa sin usar ninguna CGTasa y la muestra de ensayo 4 preparada con CGTasa procedente de un microorganismo de la especie *Thermoanaerobacter thermosulfurigenes* se juzgaron como "Aglomeradas" (+) en la prueba de aglomeración anterior, mientras que las muestras de ensayo 2, 3 y 5 a 8 preparadas con otras CGTasas se juzgaron únicamente como "Ligeramente aglomeradas" (±) en la prueba de aglomeración anterior, de manera similar al polvo de grado alimentario que contiene dihidrato de trehalosa cristalino (muestra de ensayo 9). Los resultados indican que las composiciones en partículas que contenían dihidrato de trehalosa cristalino preparadas mediante el uso de CGTasas procedentes de microorganismos del género *Paenibacillus* (muestras de ensayo 5 a 8) no son en modo alguno inferiores a un polvo de grado alimentario convencional comercializado que contiene dihidrato de trehalosa cristalino (muestra de ensayo 9) y son composiciones en partículas que pueden usarse como materiales en polvo para productos alimentarios, cosméticos, fármacos o agentes farmacéuticos, de manera similar a un polvo de grado alimentario comercializado de manera convencional que contiene dihidrato de trehalosa cristalino.

<Experimento 3: Efecto del enfriamiento semicontrolado en la cristalización sobre la pureza de la trehalosa, el rendimiento de producción frente al almidón y la capacidad de aglomeración>

En este experimento, se examinó el efecto de la aplicación de un método de enfriamiento semicontrolado a la preparación de una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino sobre la pureza de la trehalosa, el rendimiento de producción frente al almidón y la capacidad de aglomeración de la composición en partículas, cuando se precipita dihidrato de trehalosa cristalino a partir de las soluciones de sacárido que contiene trehalosa 1 a 8 preparadas en el experimento 2-1.

<Experimento 3-1: Preparación de las muestras de ensayo>

Las soluciones de sacárido que contienen trehalosa 1 a 8, con diferentes contenidos de trehalosa, d.s.b, preparadas en el experimento 2-1, se concentraron respectivamente al vacío hasta dar una concentración de sólidos del 85%, d.s.b., se colocaron en un cristizador, se mezclaron con aproximadamente un uno por ciento de dihidrato de trehalosa cristalino como cristal de siembra respecto del volumen de cada solución de sacárido, seguido de la preparación de masas de azúcar cocidas que tenían dihidrato de trehalosa cristalino de manera similar al experimento 2, salvo por la cristalización mediante un método de enfriamiento semicontrolado de las soluciones de 60°C a 20°C a lo largo de aproximadamente 10 horas. El método de enfriamiento semicontrolado se llevó a cabo de tal modo que se dividieron las 10 horas de enfriamiento en total en tres zonas con cuatro, tres y tres horas, de enfriamiento prácticamente lineal de la temperatura del líquido frente al tiempo de tal forma que se redujo de 60°C a 55°C durante cuatro horas en la primera zona, de 55°C a 50°C a lo largo de tres horas en la zona siguiente y de 50°C a 20°C a lo largo de tres horas en la última zona. Se recogió dihidrato de trehalosa cristalino de cada una de las masas cocidas de azúcar de una manera convencional mediante una centrifugadora de tipo cesta, se lavaron con un ocho por ciento de agua desionizada respecto del peso de cada masa cocida de azúcar, se maduró y se enfrió a 40°C durante ocho horas, se enfrió de manera forzada soplando con aire limpio a 25°C durante 30 min y se pulverizó hasta obtener composiciones en partículas que contienen dihidrato de trehalosa cristalino. Las composiciones en partículas que contenían dihidrato de trehalosa cristalino, obtenidas a partir de las soluciones de sacárido que contiene trehalosa 1 a 8 respectivas mediante el método de enfriamiento semicontrolado, se prepararon en las muestras de ensayo 1c a 8c.

<Experimento 3-2: Pureza de la trehalosa, rendimiento de producción frente al almidón y capacidad de aglomeración de las muestras de ensayo 1c a 8c>

<Pureza de la trehalosa>

Se determinó la pureza de la trehalosa de las muestras de ensayo 1c a 8c mediante el mismo método de HPLC que en el experimento 1-3. Los resultados se encuentran en la tabla 3.

<Rendimiento de producción frente al almidón>

Se calculó el rendimiento de producción frente al almidón de las muestras de ensayo 1c a 8c mediante el mismo método que en el experimento 2-2. Los resultados se muestran en paralelo en la tabla 3.

<Prueba de aglomeración>

Se evaluó la capacidad de aglomeración de las muestras de ensayo 1c a 8c mediante la misma prueba de aglomeración que en el ejemplo 2-2. Los resultados se muestran en paralelo en la tabla 3.

Tabla 3

Muestra de ensayo	Pureza de la trehalosa (% en peso)	Rendimiento de producción frente al almidón (% en peso)	Aglomeración
1c	99,0	35	±
2c	99,2	40	±
3c	99,4	41	±
4c	99,1	39	±
5c	99,6	45	-
6c	99,6	45	-
7c	99,5	44	-
8c	99,4	43	-

Tal como resulta evidente a partir de la tabla 3, la pureza de la trehalosa de las muestras de ensayo 1c a 8c, preparadas aplicando un método de enfriamiento semicontrolado en sus etapas de cristalización, se encontraron en el intervalo del 99,0 al 99,6%. Comparando el resultado con la pureza de la trehalosa de las muestras de ensayo 1 a 8 obtenidas mediante cristalización mediante un método de enfriamiento no forzado en el experimento 2 (la columna de "pureza de la trehalosa" en la tabla 2), se aumentó la pureza de la trehalosa de cualquiera de las muestras de ensayo 1c a 8c de un 0,2 a un 0,6%. El resultado indica que la pureza de la trehalosa de una composición en partículas puede aumentarse aplicando un método de enfriamiento semicontrolado en su etapa de cristalización.

El rendimiento de producción frente al almidón de las muestras de ensayo 1c a 8c fue del 35 al 45%. Comparando el resultado con el rendimiento de producción frente al almidón de las muestras de ensayo 1 a 8 obtenidas mediante precipitación por un método de enfriamiento no forzado en el experimento 2, el rendimiento de producción frente al almidón de las muestras de ensayo 1c a 8c aumentó en aproximadamente un 2 a un 4%. El resultado significa que la aplicación de un método de enfriamiento semicontrolado a la cristalización aumentará el rendimiento de producción frente al almidón, en comparación con el caso de la cristalización mediante un método de enfriamiento no forzado. El motivo por el cual aumenta el rendimiento de producción frente al almidón de una composición en partículas resultante que contiene dihidrato de trehalosa cristalino al aplicar un método de enfriamiento semicontrolado, aunque no se encuentre un cambio en el contenido de trehalosa de la solución de sacárido que contiene trehalosa usada en la cristalización, no es seguro; sin embargo, puede especularse con que se reduce la pérdida de trehalosa cuando se recogen cristales a partir de una masa cocida de azúcar por centrifugación y lavado de los cristales recogidos con agua debido a que los cristales tienen una cantidad menor de microcristales y se obtiene un tamaño de partícula uniforme mediante el método de enfriamiento semicontrolado como se ha mencionado anteriormente.

Cuando se sometió a aglomeración a las muestras de ensayo 1c a 8c de un modo similar al experimento 2-2 para examinar su capacidad de aglomeración, las muestras de ensayo 1c a 4c, mostradas en la tabla 3, se juzgaron como "Ligeramente aglomeradas" ( $\pm$ ), mientras que cualquiera de las muestras de ensayo 5c a 8c se deformó cuando se extrajeron sobre una placa plana y no mantuvieron la forma del fondo del tubo y por lo tanto, se juzgaron como "No aglomeradas" (-). Estos resultados indican que, cuando se aplica un método de enfriamiento semicontrolado en la cristalización, tiene a mejorar sorprendentemente la capacidad de aglomeración de una composición en partículas resultantes, en comparación con el caso de la cristalización mediante un método de enfriamiento no forzado: Entre estas, el polvo de grado alimentario convencional que contenía dihidrato de trehalosa cristalino (muestra de ensayo 9) se juzgó como "Ligeramente aglomerado" ( $\pm$ ) (véase, por ejemplo, la tabla 2) en la prueba de aglomeración, mientras que las composiciones en partículas que contenían dihidrato de trehalosa cristalino obtenidas a partir de soluciones de sacárido que contiene trehalosa 5 a 8 con un contenido de trehalosa relativamente elevado de más del 86% (muestras de ensayo 5c a 8c) aplicando un método de enfriamiento semicontrolado se juzgaron como "No aglomeradas" (-). Este hecho indica que una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, que es difícilmente aglomerable en comparación con un polvo de grado alimentario convencional que contiene dihidrato de trehalosa cristalino y que es superior en cuanto a esta propiedad como composición en partículas, puede producirse precipitándose a partir de una solución de sacárido que contiene trehalosa con un contenido de trehalosa relativamente elevado de hasta más del 86% aplicando un método de enfriamiento semicontrolado.

Basándose en los resultados anteriores, se reveló que una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino con una mayor pureza de la trehalosa puede obtenerse con un mayor rendimiento de producción frente al almidón aplicando un método de enfriamiento semicontrolado en la etapa de cristalización, en comparación con el caso de precipitarse mediante un método de enfriamiento no forzado. Se reveló que una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, producida a partir de una solución de sacárido con un contenido de trehalosa relativamente elevado de más del 86% mediante cristalización usando un método de enfriamiento semicontrolado, es una composición en partículas ventajosa en tanto que no se aglomera incluso en condiciones donde se juzga un polvo convencional de grado alimentario que contiene dihidrato de trehalosa cristalino producido mediante un método de enfriamiento no forzado como "Ligeramente aglomerado" ( $\pm$ ) y conserva una capacidad de flujo libre como composición en partículas.

<Experimento 4: Efecto del grado de cristalinidad en el diámetro de grano medio sobre la diferencia de capacidad de aglomeración de la composición en partículas>

Las muestras de ensayo 5c a 8c, como composiciones en partículas que contienen dihidrato de trehalosa cristalino, que se habían preparado a partir de una solución de sacárido con un contenido de trehalosa relativamente elevado de más del 86% aplicando un método de enfriamiento semicontrolado en el experimento 3, tuvieron la propiedad de polvo superior de aglomerarse difícilmente incluso cuando no tenían propiedades muy diferentes a otras muestras de ensayo en cuanto a su pureza de la trehalosa. Con el fin de hallar el motivo, en este experimento se midieron los grados de cristalinidad y los diámetros medios del grano de las composiciones en partículas que contenían dihidrato de trehalosa cristalino de las muestras de ensayo 1 a 8 obtenidas en el experimento 2 y las muestras de ensayo 1c a 8c obtenidas en el experimento 3. Como control, se examinó de manera similar la muestra de ensayo 9.

<Experimento 4-1: Preparación de muestras patrón usadas para medir el grado de cristalinidad>

<Muestra patrón A>

Como muestra patrón A, se preparó un espécimen patrón que consistía sustancialmente en dihidrato de trehalosa cristalino recristalizando "TREHALOSE 999" (N.º de código: TH224, pureza del 99,9% o mayor), un nombre de producto de un polvo de grado de reactivo que contiene dihidrato de trehalosa cristalino: Mediante calentamiento, se disolvieron en 1.000 g de agua purificada 1.840 g del polvo de grado de reactivo anterior que contiene dihidrato de trehalosa cristalino y se colocó la solución en una cámara de temperatura constante controlada a 20°C y se dejó reposar durante una noche para efectuar la recristalización. El dihidrato de trehalosa cristalino precipitado mediante

la recristalización se recogió de una manera convencional usando una centrifugadora de tipo cesta, se secó a 40°C durante ocho horas para obtener aproximadamente 950 g de dihidrato de trehalosa cristalino para su uso como muestra patrón A. La pureza de la trehalosa de la muestra de ensayo A se reveló como del 100% cuando se determinó en el método HPLC divulgado en el experimento 1.

5

<Muestra patrón B>

Se preparó un espécimen patrón que consistía sustancialmente en trehalosa amorfa como muestra de ensayo B mediante el siguiente procedimiento: Se disolvió la muestra de ensayo A en una cantidad adecuada de agua purificada, se criodesecó durante tres días y se secó al vacío a 40°C o menos durante una noche para obtener un polvo que consistía sustancialmente en trehalosa amorfa para su uso como muestra de ensayo B. La pureza de la trehalosa de la muestra de ensayo B se reveló como del 100% cuando se determinó en el método HPLC divulgado en el experimento 1. El contenido de humedad de la muestra de ensayo B fue del 2,0% cuando se determinó con el método de Karl Fischer.

10

15

<Experimento 4-2: Grado de cristalinidad de las muestras de ensayo A y B, las muestras de ensayo 1 a 9 y las muestras de ensayo 1c a 8c>

<Grado de cristalinidad>

20

Los grados de cristalinidad para el dihidrato de trehalosa cristalino de las muestras de ensayo A y B, las muestras de ensayo 1 a 9 y las muestras de ensayo 1c a 8c se determinaron del modo siguiente: Los valores analíticos para los grados de cristalinidad de las muestras de ensayo A y B, las muestras de ensayo 1 a 9 y las muestras de ensayo 1c a 8c se determinaron respectivamente mediante el método de Hermans basándose en los perfiles de difracción de rayos X de polvo obtenidos usando "X' Pert PRO MPD", un nombre de producto de un difractómetro de rayos X de polvo de luz reflejada disponible comercialmente, comercializado por Spectris Co., Ltd., Tokio, Japón, que irradia un rayo de CuK $\alpha$  (corriente eléctrica del rayo X: 40 mA, tensión del tubo de rayos X: 45 kV, longitud de onda: 1,5405 Å), como rayo X característico irradiado a partir de una fuente de Cu; y usando un programa de análisis informático instalado de manera exclusiva en el difractómetro. Antes del análisis del grado de cristalinidad mediante el método de Hermans, se ajustaron los valores predeterminados de grado de partícula y de factor de desdoblamiento a los niveles adecuados para obtener un valor inicial juzgado como muy preferible, a la vez que se toman en consideración los picos mutuamente solapantes, la intensidad de la difracción y la intensidad de la dispersión en los respectivos patrones de difracción de rayos X de polvo. El método de Hermans se describe en detalle en P. H. Hermans y A. Weidinger, "Journal of Applied Physics", Vol. 19, págs. 491-506 (1948) y P. H. Hermans u A. Weidinger, "Journal of Polymer Science", Vol. 4, págs. 135-144 (1949).

25

30

35

Los grados de cristalinidad se determinaron sustituyendo en la fórmula [3] anteriormente mencionada los valores analíticos para los grados de cristalinidad de la muestra de ensayo A, la muestra de ensayo B y cada una de las muestras de ensayo, como los valores analíticos respectivos  $H_{100}$ ,  $H_0$  y  $H_s$ . De hecho, cuando se analizaron mediante el método de Hermans, el valor analítico del grado de cristalinidad para la muestra de ensayo A ( $H_{100}$ ) y el de la muestra de ensayo B ( $H_0$ ) fueron, respectivamente, del 50,69% y el 8,59%. Los resultados se encuentran en la tabla 4. Para las muestras de ensayo A y B, sus patrones de difracción de rayos X de polvo se muestran, respectivamente, en las FIG. 1 y 2.

40

45

Tal como se observa en la FIG. 1, se observaron picos de difracción claros y enfocados específicos para el dihidrato de trehalosa cristalino en el intervalo de ángulos de difracción ( $2\theta$ ) de 5 a 50° en el patrón de difracción de rayos X de polvo de la muestra de ensayo A, pero no se halló ningún halo específico para una forma amorfa de la trehalosa. Sin embargo, tal como se observa en la FIG. 2, a diferencia del patrón de difracción de rayos X de polvo de la FIG. 1, se halló claramente un halo específico para una forma amorfa de la trehalosa como un cúmulo basal en el patrón de difracción de rayos X de polvo de la muestra de ensayo B, pero no se observó ningún pico de difracción específico para el dihidrato de trehalosa cristalino o para la trehalosa cristalina anhidra.

50

<Experimento 4-3: Difracciones de rayos X de polvo de las muestras de ensayo A y B usando radiación de sincrotrón>

55

Este experimento se llevó a cabo para confirmar adicionalmente que las muestras de ensayo A y B eran muestras adecuadas para determinar los valores analíticos  $H_{100}$  y  $H_0$ , respectivamente: Estas muestras se sometieron a difracción de rayos X de polvo de luz transmitida, que detecta una señal de difracción y dispersión débil, usando radiación de sincrotrón (en lo sucesivo denominada "radiación"), como fuente de rayos X. Las condiciones analíticas fueron las siguientes.

60

<Condiciones analíticas>

Difractómetro de rayos X de polvo	: Modelo "PDS-16", un difractómetro de cuando se precipitan cristales enfriando la solución de sacárido que contiene trehalosa de alta velocidad (modo Debye Scherrer, longitud de la cámara: 497,2 mm) comercializado por Kohzu Precision Co., Ltd., Kanagawa, Japón;
Fuente de rayos X	: "Beam line of Hyogo Prefecture (BL08B2)", una fuente de radiación de un electroimán de doblado;
Longitud de onda	: 1,2394Å (10,00 keV);
Fuerza	: 10 <sup>9</sup> fotones/s;
Ángulo de medida	: 3 a 38°;
Tiempo de exposición	: 600 s;
Registro de imágenes	: "IMAGING PLATE BAS-2040", una placa para obtención de imágenes comercializada por Fujifilm Corp., Tokio, Japón; y
Sistema de lectura de imágenes obtenidas	"BIO-IMAGE ANALYZER BAS-2500", un analizador de imágenes comercializado por Fujifilm Corp., Tokio, Japón.

La medición se llevó a cabo usando "Beam line of Hyogo Prefecture (BL08B2)" colocado en "SPring-8", una instalación de radiación de sincrotrón, 1-1-1, Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo, Japón.

- 5 Antes de la medición de la difracción de rayos X de polvo, se molieron las muestras de ensayo A y B, respectivamente, en un mortero y se tamizaron con un tamiz de malla de 53 µm. A continuación, se hizo pasar cada una de las composiciones en partículas resultantes a través del tamiz y se inyectaron de manera homogénea en un "MARKTUBE N.º 14", un nombre de producto de un capilar para difracción de rayos X de polvo (diámetro: 0,6 mm, vidrio Lindeman), comercializado por Toho KK, Tokio, Japón, para dar una longitud de la muestra inyectada de
- 10 aproximadamente 30 mm. De manera sucesiva, se cortó el capilar en el extremo terminal de la muestra inyectada y se selló el extremo abierto con un adhesivo. A continuación, se fijó el capilar sobre un portamuestras con arcilla y el portamuestras se introdujo en el difractómetro de rayos X de polvo para proporcionar la dirección longitudinal del capilar de manera perpendicular frente al eje del difractómetro de rayos X de polvo. Para eliminar el efecto adverso de la orientación del dihidrato de trehalosa cristalino de su perfil de difracción de rayos X de polvo, la medición de la
- 15 difracción de rayos X de polvo se llevó a cabo dejando que el portamuestras rotase a una velocidad uniforme y con un ciclo de dos veces/segundo.

En el proceso de analizar los perfiles de difracción de rayos X de polvo y de preparar los patrones de difracción de rayos X de polvo de las muestras de ensayo A y B, se eliminaron las señales de fondo inherentes al difractómetro de rayos X de polvo de cada perfil de difracción de rayos X de polvo de acuerdo con un modo convencional para mejorar la precisión de la medida. Los patrones de difracción de rayos X de polvo resultantes de las muestras de ensayo A y B se muestran, respectivamente, en las FIG. 3 y 4.

25 Tal como se observa en la FIG. 3, los picos de difracción específicos para el dihidrato de trehalosa cristalino aparecieron de manera clara y enfocada en el intervalo de los ángulos de difracción (2θ) de 3 a 38° para el patrón de difracción de rayos X de polvo de la muestra de ensayo A, medidos en la difracción de rayos X de polvo usando la radiación de sincrotrón. Ya que la longitud de onda de la radiación del sincrotrón (1,2394 Å) era diferente a la del rayo X característico (1,5405 Å) en comparación con las FIG. 3 y 1, cada pico de difracción en la FIG. 3 aparecía como aproximadamente cuatro quintos del ángulo de difracción (2θ) de cada uno de los picos correspondientes en la

30 FIG. 1. Sin embargo, los patrones de difracción de rayos X de polvo en las FIG. 1 y 3 coincidían extremadamente bien entre sí. A semiamplitud de cada pico de difracción en la FIG. 3 fue evidentemente más estrecha que en la FIG. 1 y cada pico de difracción en la FIG. 3 mostró una mayor resolución que en la FIG. 1, aunque la fuerza de cada pico de difracción en la FIG. 3 fue mayor que en la FIG. 1, en aproximadamente 50 veces. El patrón de difracción de rayos X de polvo en la FIG. 3 no mostró ningún halo específico para una forma amorfa de la trehalosa, tal como se

35 muestra en la FIG. 4 descrita posteriormente. Los resultados indican que la muestra de ensayo A tiene una cristalinidad distintivamente elevada para dihidrato de trehalosa cristalino y consiste sustancialmente en dihidrato de trehalosa cristalino.

40 Tal como se muestra en la FIG. 4, el patrón de difracción de rayos X de polvo de la muestra de ensayo B, obtenida mediante difracción de rayos X de polvo usando la radiación de sincrotrón, mostró un halo reseñable específico para una forma amorfa de la trehalosa como un cúmulo basal, pero no se observó ningún pico de difracción específico para el dihidrato de trehalosa cristalino. Este hecho indica que la muestra de ensayo B consiste sustancialmente en una forma amorfa de la trehalosa.

45 Los resultados anteriores, obtenidos usando la radiación de sincrotrón como fuente de rayos X, respalda que las muestras de ensayo A y B sean muestras adecuadas para definir los valores analíticos H<sub>100</sub> y H<sub>0</sub>, respectivamente, para su uso en la fórmula [3].

50 <Experimento 4-4: Diámetros de grano medios de la muestra de ensayo A, las muestras de ensayo 1 a 9 y las muestras de ensayo 1c a 8c>

Basándose en las semiamplitudes y los ángulos de difracción (2θ) de cada pico de difracción en un patrón de

difracción de rayos X de polvo, pueden calcularse los diámetros del grano. Los presentes inventores consideraron que el valor medio de los diámetros del grano (diámetro medio del grano) calculado a partir de picos de difracción podría ser un parámetro que define las propiedades físicas de una composición en partículas que contiene cristales y determinaron el diámetro medio del grano para las muestras de ensayo en forma de composiciones en partículas que contienen dihidrato de trehalosa cristalino.

La muestra de ensayo A, las muestras de ensayo 1 a 9 y las muestras de ensayo 1c a 8c, excluyendo la muestra de ensayo B, que es un polvo amorfo y que no muestra ningún pico de difracción en su patrón de difracción de rayos X de polvo, se usaron para determinar sus diámetros medios de grano respectivos usando cada uno de sus patrones de difracción de rayos X de polvo que se habían usado para determinar sus grados de cristalinidad. Se determinó cada diámetro medio de grano seleccionando cinco picos de difracción en los patrones de difracción de rayos X de polvo para cada composición en partículas que contenía dihidrato de trehalosa cristalino, es decir, los picos de difracción (los símbolos "a" a "e" en la FIG. 1) en los ángulos de difracción ( $2\theta$ ) de 13,7° (índice de Miller (hkl): 101), 17,5° (índice de Miller (hkl):220), 21,1° (índice de Miller (hkl):221), 23,9° (índice de Miller (hkl):231) y 25,9° (índice de Miller (hkl): 150), que se ubican en una región de ángulo relativamente bajo que se consideró menos disruptiva para el ancho del pico de difracción debido al estiramiento heterogéneo del grano y que estaban bien separados de los otros picos de difracción; calibrando las semiamplitudes y los ángulos de difracción ( $2\theta$ ) de los picos de difracción basándose en un valor medido determinado usando "X' pert Highscore Plus" como programa informático analítico instalado de manera exclusiva en el difractor de rayos X de polvo y silicio ("Si640d", proporcionado por NIST: National Institute of Standards and Technology, como muestra patrón para la difracción de rayos X) como muestra patrón; calculando los diámetros del grano basándose en la fórmula [4] anterior; y calculando la media de los cinco datos anteriores. Los resultados se muestran en paralelo en la tabla 4.

Los resultados de la pureza de la trehalosa y la prueba de aglomeración en las composiciones en partículas para las muestras de ensayo 1 a 9 y las muestras de ensayo 1c a 8c se transcriben, respectivamente, de las tablas 2 y 3 y se muestran en paralelo en la tabla 4. Las muestras de ensayo A y B, usadas como especímenes patrón para determinar el grado de cristalinidad, se sometieron, respectivamente, a la misma prueba de aglomeración que en los experimentos 2-2 y 3-2 y se evaluó su capacidad de aglomeración. Los resultados se muestran en paralelo en la tabla 4.

Tabla 4

Muestra de ensayo	Pureza de la trehalosa (% en peso)	Grado de cristalinidad (%)	Diámetro medio del grano (Å)	Aglomeración
A	100	100	3.910	-
B	100	0	-	+
1	98,4	78,7	2.150	+
2	98,8	85,1	2.540	+
3	99,2	85,3	2.660	±
4	98,7	80,8	2.200	+
5	99,3	88,1	2.830	±
6	99,2	87,7	2.750	±
7	99,2	87,4	2.670	±
8	99,1	86,6	2.610	±
9	99,0	85,4	2.590	±
1c	99,0	85,7	2.540	±
2c	99,2	87,3	2.780	±
3c	99,4	88,6	2.850	±
4c	99,1	88,3	2.630	±
5c	99,6	96,0	3.580	-
6c	99,6	94,2	3.490	-
7c	99,5	93,3	3.300	-
8c	99,4	91,0	3.210	-

El diámetro medio del grano de la muestra de ensayo A (pureza de la trehalosa: 100,0%, grado de cristalinidad: 100,0%), usada como patrón para determinar el valor analítico  $H_{100}$  al medir el grado de cristalinidad, fue de 3.910 Å. Como se muestra en la tabla 4, la muestra de ensayo A se juzgó como "No aglomerada" (-) en la prueba de aglomeración. Por el contrario, la muestra de ensayo B usada como muestra patrón para determinar el valor analítico  $H_0$  (pureza de la trehalosa: 100,0%, grado de cristalinidad: 0,0%) se juzgó como "Aglomerada" (+) ya que mantiene su forma hemisférica del fondo del tubo incluso cuando se extrae del tubo y se coloca sobre una placa plana. La forma hemisférica de la muestra de ensayo B no se deshizo cuando se aplicó una ligera vibración sobre la placa. Sin embargo, la pureza de la trehalosa y el grado de cristalinidad de la muestra de ensayo 9 como dihidrato de trehalosa cristalino de grado alimentario comercializado de manera convencional fueron, respectivamente, del 99,0% y el 85,4%.

Tal como se muestra en la columna de "Grado de cristalinidad" en la tabla 4, los grados de cristalinidad de las

muestra de ensayo 1 a 8, que se habían obtenido por precipitación mediante un método de enfriamiento no forzado en la etapa de cristalización, se encontraron en el intervalo del 78,7 al 88,1%, mientras que los de las muestras de ensayo 1c a 8c, que se habían obtenido aplicando un método de enfriamiento semicontrolado en la etapa de cristalización, se encontraron en el intervalo del 85,7 al 96,0%. Al comparar los grados de cristalinidad de las

Los resultados en la tabla 4 indican que el grado de cristalinidad de una composición en partículas se correlaciona con su capacidad de aglomeración. Más específicamente, como se muestra en la tabla 4, cada una de la muestra de ensayo A y las muestras de ensayo 5c a 8c, con un grado de cristalinidad del 90% o mayor, se juzgaron como "No aglomeradas" (-), mientras que cada una de las muestras de ensayo 2, 3 y 5 a 9 y las muestras de ensayo 1c a 4c, con un grado de cristalinidad del 85% o mayor pero menor del 90% se juzgaron como "Ligeramente aglomeradas" ( $\pm$ ) y cada una de la muestra de ensayo B y las muestras de ensayo 1 y 4, con un grado de cristalinidad menor del 85% se juzgaron como "Aglomeradas" (+). Este hecho indica que el grado de cristalinidad puede ser un potente índice para definir una composición en partículas difícilmente aglomerable que contiene dihidrato de trehalosa cristalino.

Además, el resultado anterior indica que, en el proceso para producir una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, el grado de cristalinidad para el dihidrato de trehalosa cristalino se vuelve del 90% o mayor aumentando el contenido de trehalosa en la solución de reacción hasta más del 86,0% y después aplicando un método de enfriamiento semicontrolado en la etapa de cristalización siguiente, obteniendo como resultado una composición en partículas significativamente difícilmente aglomerable que contiene dihidrato de trehalosa cristalino en comparación con un polvo de grado alimentario convencional que contiene dihidrato de trehalosa cristalino.

Tal como se muestra en la columna de "Diámetro medio del grano" en la tabla 4, los diámetros medios del grano de las muestras de ensayo 1 a 8 obtenidas mediante cristalización mediante un método de enfriamiento no forzado en la etapa de cristalización se encontraron en el intervalo de 2.150 a 2.830 Å, mientras que los de las muestras de ensayo 1c a 8c, preparadas mediante un método de enfriamiento semicontrolado en la etapa de cristalización se encontraron en el intervalo de 2.540 a 3.580 Å. Comparando las muestras de ensayo 1c a 8c con las muestras de ensayo 1 a 8 en cuanto a sus diámetros medios del grano, se reveló que los diámetros medios del grano de las muestras 1c a 8c obtenidas mediante un método de enfriamiento semicontrolado aumentaron de 190 a 750 Å en comparación con los de las muestras de ensayo 1 a 8 obtenidas mediante un método de enfriamiento no forzado, aunque los diámetros medios del grano de las muestras de ensayo 1c a 8c variaron entre sí. El resultado muestra que la aplicación de un método de enfriamiento semicontrolado en la etapa de cristalización para el dihidrato de trehalosa cristalino es un método superior para obtener una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino con un diámetro medio del grano relativamente elevado.

En las muestras de ensayo 1 a 8 y las muestras de ensayo 1c a 8c, se observó una tendencia a que cuanto mayor fuese la pureza de la trehalosa y el grado de cristalinidad para el dihidrato de trehalosa cristalino en las composiciones en partículas, mayor sería el diámetro medio del grano. Esta tendencia indica que el diámetro medio del grano de una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino tiene una cierta correlación tanto con la pureza de la trehalosa como con el grado de cristalinidad de una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, tomando en consideración tanto el hecho de que el diámetro medio del grano de la muestra de ensayo 1, que tenía una pureza de la trehalosa del 100,0% y un grado de cristalinidad del 100,0%, fue de 3.910 Å y que el de la muestra de ensayo 9 como polvo de grado alimentario que contiene dihidrato de trehalosa cristalino fue de 2.590 Å.

Además, los resultados en la tabla 4 indican que el diámetro medio del grano también se correlaciona con la capacidad de aglomeración de una composición en partículas. De forma detallada, como se muestra en la tabla 4, la muestra de ensayo A y las muestras de ensayo 5c a 8c, que tenían un diámetro medio del grano de 3.210 Å o mayor, se juzgaron todas como "No aglomeradas" (-); las muestras de ensayo 2, 3 y 5 a 9 y las muestras de ensayo 1c a 4c, que tenían un diámetro medio del grano en el intervalo de 2.500 Å o mayor, pero menor de 3.200 Å, se juzgaron todas como "Ligeramente aglomeradas" ( $\pm$ ); y la muestra de ensayo B y las muestras de ensayo 1 a 4, que tenían un diámetro medio del grano de menos de 2.500 Å, se juzgaron todas como "Aglomeradas" (+). Este hecho indica que, además del grado de cristalinidad, el diámetro medio del grano también puede ser un índice potente para definir un dihidrato de trehalosa cristalino difícilmente aglomerable.

<Experimento 5: Características de polvo de las muestras de ensayo (estabilidad de almacenamiento, solubilidad en agua)>

Se llevaron a cabo pruebas de estabilidad de almacenamiento y de solubilidad en agua con el fin de revelar adicionalmente las propiedades de las muestras de ensayo 1 a 9 y las muestras de ensayo 1c a 8c.

<Experimento 5-1: Prueba de estabilidad de almacenamiento>

Para confirmar si la prueba de aglomeración llevada a cabo en los experimentos 2-2, 3-2, etc., es aceptable como prueba para evaluar la capacidad de aglomeración de una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino cuando se almacena realmente, las muestras de ensayo A y B obtenidas mediante el método en el experimento 4-1, las muestras de ensayo 1 a 9 obtenidas en el experimento 2 y las muestra de ensayo 1c a 8c obtenidas en el experimento 3 se sometieron a una prueba de estabilidad de almacenamiento diseñada tomando en consideración las condiciones, las circunstancias y el periodo de almacenamiento real de composiciones en partículas que contienen dihidrato de trehalosa cristalino como productos distribuidos comercialmente.

Se pesaron ciento cincuenta gramos de una cualquiera de las muestras de ensayo A y B, las muestras de ensayo 1 a 9 y las muestras de ensayo 1c a 8c, se colocaron en "UNI-PACK F-4", un nombre de producto de una bolsa de polietileno, 17 cm x 12 cm, comercializado por Seisannipponsha Ltd., Tokio, Japón y se sellaron en su interior en condiciones sin aire para obtener tres bolsas de polietileno para cada muestra de ensayo. Se colocó un peso de 13,2 kg sobre cada bolsa de polietileno para colocar de manera homogénea una carga sobre la superficie superior de cada bolsa que proporcionase una carga de 648 kg/m<sup>2</sup> para una superficie de cada bolsa y se almacenó en estas condiciones durante 60 días en condiciones libres de una temperatura y humedad relativamente elevadas. Por comparación, un producto de un polvo de grado alimentario que contiene dihidrato de trehalosa cristalino viene en paquetes de 20 kg y normalmente se apilan aproximadamente 10 bolsas de estos cuando se guardan en un almacén, etc. La carga de 648 kg/m<sup>2</sup> para una superficie de una bolsa de polietileno corresponde a la carga recibida por la bolsa inferior de entre las 10 bolsas apiladas. Después de 60 días de almacenamiento, se sacó cada muestra de ensayo de cada bolsa de polietileno, se tamizó con un tamiz que tiene un tamaño de poro de 425 µm y se pesaron, respectivamente, los pesos del polvo que pasó o que no pasó a través del tamiz, seguido de la determinación del porcentaje en peso (%) de las partículas con un tamaño de partícula de 425 µm o mayor respecto del polvo total y promediando los datos de las tres bolsas para cada una de las muestras de ensayo ensayadas para evaluar la aglomeración de cada composición en partículas después de 60 días de almacenamiento. La aglomeración de las composiciones en partículas se evaluó del siguiente modo: "No aglomerada" (-), donde las partículas con un tamaño de partícula de 425 µm o mayor son menos del 30% de la composición en partículas total; y "Aglomerada" (+), donde las partículas con un tamaño de partícula de 425 µm o mayor son el 30% o más de la composición en partículas total. El criterio de valoración se estableció en el 30% debido a que la disolución de una composición en partículas y el mezclado o amasado de la misma con otras composiciones en partículas se verá generalmente afectado cuando la relación de partículas con un tamaño de partícula de 425 µm o mayor en la composición de partículas supere el 30%. Los resultados se encuentran en la tabla 5.

<Experimento 5-2: Prueba de solubilidad en agua>

Se pesaron 0,25 g de cada muestra de ensayo se colocaron en un "FALCON TUBE 2059", un nombre de producto de un tubo cilíndrico de polipropileno de 14 ml que tiene un fondo de forma hemisférica y una tapa, comercializado por Becton, Dickinson and Company, Nueva Jersey, EE. UU. A cada tubo con cada muestra de ensayo se le añadieron cinco mililitros de agua desionizada y se incubaron los tubos durante 30 min en un baño de agua a una temperatura constante de 50°C, se voltearon dos veces y después se mantuvieron a 50°C durante 15 min para examinar la solubilidad en estas condiciones. Se juzgó como "Pasable" cuando se juzga macroscópicamente que una composición en partículas está completamente disuelta, mientras que se juzgó como "No pasable" cuando se observó macroscópicamente un resto insoluble. Los resultados se muestran en paralelo en la tabla 5.

Tabla 5

Muestra de ensayo	Estabilidad de almacenamiento	Solubilidad en agua
A	-	No pasable
B	+	Pasable
1	+	Pasable
2	+	Pasable
3	+	Pasable
4	+	Pasable
5	+	Pasable
6	+	Pasable
7	+	Pasable
8	+	Pasable
9	+	Pasable
1c	+	Pasable
2c	+	Pasable
3c	+	Pasable
4c	+	Pasable
5c	-	Pasable
6c	-	Pasable

Muestra de ensayo	Estabilidad de almacenamiento	Solubilidad en agua
7c	-	Pasable
8c	-	Pasable

5 Tal como se muestra en la columna de "Estabilidad de almacenamiento", en la prueba de estabilidad de almacenamiento, cada muestras de ensayo de almacenó durante 60 días en condiciones libres de temperatura y humedad relativamente elevadas, las muestras de ensayo 1 a 9 y las muestras de ensayo 1c a 4c, que tenían un grado de cristalinidad para la trehalosa de menos del 90,0% y un diámetro medio del grano de 2.850 Å o menor, se juzgaron como "Aglomeradas" (+), mientras que la muestra de ensayo A y las muestras de ensayo 5c a 9c, que tenían un grado de cristalinidad para del 91,0% o más pero no mayor del 96,0% y un diámetro medio del grano de 3.210 Å o mayor, se juzgaron como "No aglomeradas" (-). Los resultados indican que las muestras de ensayo que se juzgaron como "Aglomeradas" (+) o "Ligeramente aglomeradas" (±) en las pruebas de aglomeración llevadas a cabo en los experimentos 2-2 y 3-2, etc., se juzgan como "Aglomeradas" (+) en esta prueba de almacenamiento, mientras que las muestras que se juzgaron como "No aglomeradas" (-) en las pruebas de aglomeración llevadas a cabo en los experimentos 2-2 y 3-2, etc., se juzgan como "No aglomeradas" (-) en esta prueba de almacenamiento. Este hecho indica que la prueba de aglomeración llevada a cabo en los experimentos 2-2 y 3-2, etc., es adecuada como prueba para evaluar la capacidad de aglomeración de composiciones en partículas que contienen dihidrato de trehalosa cristalino en sus condiciones de almacenamiento reales.

20 Tal como se muestra en la columna de "Solubilidad en agua" en la tabla 5, la solubilidad en agua de la muestra de ensayo A, que tenía un grado de cristalinidad del 100% y un diámetro medio del grano de 3.910 Å, se juzgó como "No pasable", mientras que la de las muestras de ensayo 1 a 9 y las muestras de ensayo 1c a 8c, que tenía un grado de cristalinidad del 96,0% o menor y un diámetro medio del grano de 3.580 Å o menor, se juzgaron todas como "Pasables". Este resultado indica que, cuando se aumentan el grado de cristalinidad y el diámetro medio del grano de una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino hasta los niveles de la muestra de ensayo A y dicho de otro modo, cuando se aumentan hasta niveles de un polvo de grado de reactivo que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, empeora la solubilidad en agua, como un problema diferente a la capacidad de aglomeración.

<Experimento 6: Secuencias de aminoácidos parciales comunes en CGTasas más adecuadas para producir trehalosa>

30 Para caracterizar una CGTasa más adecuada para producir trehalosa, las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 1 a 3) de las CGTasas anteriormente indicadas, procedentes de microorganismos del género *Paenibacillus* que tienen un efecto mejorado de aumentar el contenido de trehalosa en las soluciones de reacción enzimáticas, es decir, que proceden, respectivamente, de *Paenibacillus illinoisensis*, cepa NBRC15379, *Paenibacillus pabuli*, cepa NBRC13638, y *Paenibacillus amylolyticus*, cepa NBRC15957, se compararon con las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 4 a 6) de las CGTasas, que proceden, respectivamente, de la cepa Tc-91 anteriormente mencionada de *Geobacillus stearothermophilus* y de microorganismos de las especies *Bacillus macerans* y *Thermoanaerobacter thermosulfurigenes*, que tienen un menor efecto de aumento del contenido de trehalosa en una solución de reacción enzimática que las de los microorganismos del género *Paenibacillus*. Todas las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 1 a 3, que se usaron en la comparación de secuencia de aminoácidos anterior, son aquellas que están codificadas por las secuencias de bases determinadas mediante la clonación independiente por los presentes solicitantes para los genes de CGTasa respectivos procedentes de *Paenibacillus illinoisensis*, cepa NBRC15379, *Paenibacillus pabuli*, cepa NBRC13638 y *Paenibacillus amylolyticus*, cepa NBRC15957. Las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4 y 5 son de las CGTasas procedentes de *Geobacillus stearothermophilus* (*Bacillus stearothermophilus* según la antigua clasificación), cepa Tc-91, divulgada en la Patente Japonesa Kokai n.º 135581/86 y determinada de manera independiente por el mismo solicitante de la presente invención y a partir de un microorganismo de la especie *Bacillus macerans*. Por comparación, aunque la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 no es "CONTIZYME", un nombre de producto de una CGTasa procedente de un microorganismo de la especie *Bacillus macerans*, comercializado por Amano Enzyme Inc., Aichi, Japón, usada en el experimento 1, se usó como sustituto debido a que es una secuencia de aminoácidos de una CGTasa procedente de un microorganismo que pertenece a la misma especie, *Bacillus macerans*. Como secuencia de aminoácidos de una CGTasa procedente de un microorganismo de la especie *Thermoanaerobacter thermosulfurigenes*, se usó la registrada en "GenBank", una base de datos de genes, con el número de referencia 35484.

55 En la comparación de secuencias de aminoácidos anteriormente mencionada, se observaron las siguientes secuencias de aminoácidos parciales de (a) a (d) en CGTasas que tienen un efecto superior de aumentar el contenido de trehalosa en una solución de reacción enzimática, es decir, dichas secuencias de aminoácidos parciales existen comúnmente en las CGTasas procedentes de los microorganismos anteriores del género *Paenibacillus* pero no existen en CGTasas, cuyos efectos aumentadores del contenido de trehalosa en las soluciones de reacción enzimática no son tan elevados, a saber, CGTasas procedentes, respectivamente, de *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus macerans*, y *Thermoanaerobacter thermosulfurigenes*:

(a) Gly-Ser-Xi-Ala-Ser-Asp;

- (b) Lys-Thr-Ser-Ala-Val-Asn-Asn;
- (c) Lys-Met-Pro-Ser-Phe-Ser-Lys; y
- (d) Val-Asn-Ser-Asn-X<sub>2</sub>-Tyr.

5 (En donde X<sub>1</sub> significa Ala o Ser y X<sub>2</sub> significa Ala o Thr, respectivamente).

Basándose en los resultados anteriores, las CGTasas que son más adecuadas para el proceso de producir trehalosa de la presente divulgación, a saber, CGTasas, que pueden aumentar el contenido de trehalosa hasta más del 86,0% en una solución de reacción enzimática, pueden caracterizarse por tener las secuencia de aminoácidos parciales  
10 anteriormente identificadas de (a) a (d).

La presente invención se explicará con más detalle basándose en los siguientes ejemplos.

### 15 Ejemplo de referencia 1

<Producción de composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino>

Se suspendió almidón de maíz en agua para dar una suspensión al 30%, mezclada con carbonato de calcio para dar una concentración final del 0,1% y se ajustó a pH 6,0. A la solución resultante se le añadió "TERMAMEAL 60L", un nombre de producto de un espécimen de  $\alpha$ -amilasa termoestable comercializado por Novozymes Japan Ltd., Tokio, Japón, en una cantidad equivalente al 0,2% del peso, d.s.b., del almidón y se sometió a una reacción enzimática de 20 98 a 100°C durante 15 min para gelatinizar y licuar el almidón. La solución de almidón licuada resultante, se autoclavó a 125°C durante 15 min, se enfrió a 51°C, se mezcló con una solución enzimática parcialmente purificada que contenía una enzima formadora de  $\alpha$ -glucosiltransferasa y una enzima liberadora de trehalosa, preparada  
25 mediante el método en el experimento 1-1, en cantidades respectivas de 2 y 10 unidades/g de almidón, mezclada adicionalmente un con una isoamilasa producida por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón, en una cantidad de 300 unidades/g de almidón y una CGTasa procedente de *Paenibacillus illinoisensis*, cepa NBRC15959, preparada mediante el método en el experimento 1-2, en una cantidad de dos unidades/g de almidón y se hizo reaccionar enzimáticamente de manera adicional durante aproximadamente 70 horas. Posteriormente, la solución de reacción  
30 enzimática se calentó a 97°C durante 30 min para inactivar las enzimas restantes, se ajustó a pH 4,5, se mezcló con "GLUCOZYME #20000", un nombre de producto de un espécimen de glucoamilasa comercializado por Nagase ChemteX Corp., Osaka, Japón, en una cantidad de 10 unidades/g de almidón y se hizo reaccionar enzimáticamente durante 24 horas para obtener una solución de reacción enzimática con una pureza de la trehalosa o un contenido de trehalosa del 87,4%, d.s.b. La solución de reacción enzimática obtenida de este modo se calentó para inactivar la  
35 enzima restante y, de manera convencional, se decoloró y filtró con carbón activado. El filtrado se desaló con una resina de intercambio catiónico (forma H<sup>+</sup>) y una resina de intercambio aniónico (forma OH<sup>-</sup>), se concentró al vacío, dando un concentrado con un contenido de sólidos de aproximadamente el 85%. El concentrado se colocó en un cristallizador, se mezcló con "TREHALOSE 999" (N.º de código: TH224, pureza de la trehalosa: 99,9% o mayor), un nombre de producto de un polvo de grado de reactivo que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, comercializado por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón, como cristal de siembra, en una cantidad igual al dos por ciento de  
40 contenidos sólidos, se ajustó a 55°C y se enfrió de manera no forzada a 15°C durante 24 horas en condiciones de agitación suave para precipitar el dihidrato de trehalosa cristalino. Los cristales se recogieron mediante una centrifugadora de tipo cesta, se rociaron con agua purificada en una cantidad igual a aproximadamente el cinco por ciento del peso de la masa cocida de azúcar, se maduraron y se secaron a 50°C durante dos horas, se enfriaron soplando aire a 20°C durante 10 min y se pulverizaron para obtener una composición en partículas que contiene  
45 dihidrato de trehalosa cristalino, que contenía, basándose en el sólido seco, un 99,4% de trehalosa, un 0,3% de D-glucosa, un 0,06% de 4-O- $\alpha$ -glucosiltrehalosa y un 0,09% de 6-O- $\alpha$ -glucosiltrehalosa, con un rendimiento de producción frente al almidón de aproximadamente el 42%.

50 De acuerdo con el proceso de producción de este ejemplo de referencia, puede producirse una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino con un elevado rendimiento de producción frente al almidón de aproximadamente el 42%. El grado de cristalinidad para el dihidrato de trehalosa cristalino, el diámetro medio del grano y la potencia reductora de la composición en partículas completa de la composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino producida mediante el proceso de este ejemplo fueron, respectivamente, del 88,4%,  
55 2.850 Å y un 0,4%. Por comparación, la medición para el grado de cristalinidad anterior se determinó mediante el método de Hermans usando los valores analíticos H<sub>100</sub> y H<sub>0</sub> obtenidos en el experimento 4-2. La medición de la distribución del tamaño de partícula del producto reveló que contenía partículas con un tamaño de partícula de 53  $\mu$ m o mayor, pero menor de 425  $\mu$ m en una cantidad del 73,1%, aquellas con un tamaño de partícula de 53  $\mu$ m o mayor pero menor de 300  $\mu$ m en una cantidad del 68,6% y aquellas con un tamaño de partícula de 425  $\mu$ m o mayor en una cantidad del 8,2%. El producto puede usarse como material para productos alimentarios, cosméticos,  
60 fármacos y agentes farmacéuticos de manera similar a un polvo de grado alimentario convencional que contiene dihidrato de trehalosa cristalino.

### 65 Ejemplo 2

<Producción de composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino>

Una solución de reacción enzimática con una pureza de la trehalosa o un contenido de trehalosa del 87,6%, d.s.b., se obtuvo llevando a cabo una reacción de formación de trehalosa y un tratamiento con glucoamilasa mediante un método similar al ejemplo 1, salvo por que se establece una reacción enzimática de 40 horas usando una enzima formadora de  $\alpha$ -glucosiltrehalosa y una enzima liberadora de trehalosa en cantidades respectivas de 3 unidades y 15 unidades por g de almidón y usando una CGTasa procedente de *Paenibacillus illinoisensis*, cepa NBRC15379 obtenida mediante el método en el experimento 1-2. La solución de reacción enzimática obtenida de este modo se calentó para inactivar las enzimas restantes y, de manera convencional, se decoloró y filtró con carbón activado. El filtrado se desaló con una resina de intercambio catiónico (forma H<sup>+</sup>) y una resina de intercambio aniónico (forma OH<sup>-</sup>), se concentró al vacío, dando un concentrado con un contenido de sólidos de aproximadamente el 85%. El concentrado se colocó en un cristizador, se mezcló con "TREHALOSE 999" (N.º de código: TH224, pureza de la trehalosa: 99,9% o mayor), un nombre de producto de un polvo de grado de reactivo que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, comercializado por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón, como cristal de siembra, en una cantidad igual al uno por ciento del contenido de sólidos y se ajustó a 60°C. Posteriormente, la solución que contiene trehalosa resultante se enfrió hasta 15°C durante un tiempo total de 24 horas mediante un método de enfriamiento semicontrolado de enfriamiento sucesivo de 60°C a 50°C a lo largo de 12 horas, de 50°C a 40°C a lo largo de seis horas y después, de 40°C a 15°C a lo largo de seis horas en condiciones de agitación suave para precipitar el dihidrato de trehalosa cristalino. Los cristales se recogieron mediante una centrifugadora de tipo cesta, se roció con agua purificada en una cantidad igual a aproximadamente el 5% del peso de la masa cocida de azúcar, se maduraron y se secaron a 50°C durante dos horas, se enfriaron soplando aire a 20°C durante 20 min y se pulverizaron para obtener una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, que contenía, basándose en el sólido seco, un 99,6% de trehalosa, un 0,07% de D-glucosa, un 0,04% de 4-O- $\alpha$ -glucosiltrehalosa y un 0,06% de 6-O- $\alpha$ -glucosiltrehalosa, con un rendimiento de producción frente al almidón de aproximadamente el 45%.

El grado de cristalinidad para el dihidrato de trehalosa cristalino, el diámetro medio del grano y la potencia reductora de la composición en partículas completa de la composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino producida fueron, respectivamente, del 95,6%, 3.520 Å y un 0,15%. Por comparación, la medición para el grado de cristalinidad anterior se determinó mediante el método de Hermans usando los valores analíticos H<sub>100</sub> y H<sub>0</sub> obtenidos en el experimento 4-2. La medición de la distribución del tamaño de partícula del producto reveló que contenía partículas con un tamaño de partícula de 53  $\mu$ m o mayor, pero menor de 425  $\mu$ m en una cantidad del 83,3%, aquellas con un tamaño de partícula de 53  $\mu$ m o mayor pero menor de 300  $\mu$ m en una cantidad del 72,5% y aquellas con un tamaño de partícula de 425  $\mu$ m o mayor en una cantidad del 6,9%. Cuando se sometió a una prueba de aglomeración mediante el mismo método que en los experimentos 2-2, 3-2, etc., el producto se juzgó como "No aglomerado" (-). Asimismo, el producto se juzgó como "Pasable" cuando se ensayó su solubilidad en agua mediante el mismo método que en el experimento 5.

De acuerdo con el proceso de producción de este ejemplo, puede producirse una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino con un rendimiento de producción frente al almidón tan alto como de aproximadamente el 45%. Sin embargo, en términos de pureza de la trehalosa, la composición en partículas que contenía dihidrato de trehalosa cristalino producida mediante el proceso de este ejemplo no es tan diferente de "TREHA", un nombre de producto de un polvo de grado alimentario convencional que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, comercializado por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón, como material alimentario o similar, es una composición en partículas significativamente difícil de aglomerar en comparación con el polvo de grado alimentario, así como de fácil almacenamiento y manipulación. El producto es similar al polvo de grado alimentario convencional en que es una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino; que cuanto más fácilmente se almacene y manipule, se usará más preferentemente como material para productos alimentarios, cosméticos, fármacos, productos farmacéuticos, etc.

### Ejemplo 3

<Producción de composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino>

Cuando se llevó a cabo una reacción de formación de trehalosa de una manera similar al ejemplo 1 salvo por que se usa, como CGTasa, la procedente de *Paenibacillus pabuli*, cepa NBRC13638 preparada en el método del experimento 1-2, el contenido de trehalosa en la solución de reacción enzimática después del tratamiento con la glucoamilasa fue del 87,2%, d.s.b. La solución de reacción enzimática obtenida de este modo se calentó para inactivar la enzima restante y, de manera convencional, se decoloró y filtró con carbón activado. El filtrado se desaló con una resina de intercambio catiónico (forma H<sup>+</sup>) y una resina de intercambio aniónico (forma OH<sup>-</sup>), se concentró al vacío, dando un concentrado con un contenido de sólidos de aproximadamente el 85%. El concentrado se colocó en un cristizador, se mezcló con "TREHALOSE 999" (N.º de código: TH224, pureza de la trehalosa: 99,9% o mayor), un nombre de producto de un polvo de grado de reactivo que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, comercializado por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón, como cristal de siembra, en una cantidad igual al uno por ciento de contenidos sólidos, se ajustó a 60°C y se enfrió a lo largo de 24 horas de tal forma que se enfrió de 60°C a 45°C durante 15 horas y de 45°C a 20°C a lo largo de 9 horas en condiciones de agitación suave mediante un método de enfriamiento semicontrolado en dos etapas para precipitar el dihidrato de trehalosa cristalino. Los cristales se recogieron mediante una centrifugadora de tipo cesta, se roció con agua purificada en una cantidad igual

a aproximadamente el 5% del peso de la masa cocida de azúcar, se maduraron y se secaron a 50°C durante dos horas, se enfriaron soplando aire a 20°C durante 10 min y se pulverizaron para obtener una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, que contenía, basándose en el sólido seco, un 99,2% de trehalosa, un 0,4% de D-glucosa, un 0,06% de 4-O- $\alpha$ -glucosiltrehalosa y un 0,10% de 6-O- $\alpha$ -glucosiltrehalosa, con un rendimiento de producción frente al almidón de aproximadamente el 44%.

El grado de cristalinidad para el dihidrato de trehalosa cristalino, el diámetro medio del grano y la potencia reductora de la composición en partículas completa de la composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino fueron, respectivamente, del 92,6%, 3.130 Å y un 0,5%. Por comparación, la medición para el grado de cristalinidad anterior se determinó mediante el método de Hermans usando los valores analíticos  $H_{100}$  y  $H_0$  obtenidos en el experimento 4-2. La medición de la distribución del tamaño de partícula del producto reveló que contenía partículas con un tamaño de partícula de 53  $\mu\text{m}$  o mayor, pero menor de 425  $\mu\text{m}$  en una cantidad del 75,2%, aquellas con un tamaño de partícula de 53  $\mu\text{m}$  o mayor pero menor de 300  $\mu\text{m}$  en una cantidad del 69,3% y aquellas con un tamaño de partícula de 425  $\mu\text{m}$  o mayor en una cantidad del 7,8%. Cuando se sometió a una prueba de aglomeración mediante el mismo método que en los experimentos 2-2, 3-2, etc., el producto se juzgó como "No aglomerado" (-). Asimismo, el producto se juzgó como "Pasable" cuando se ensayó su solubilidad en agua mediante el mismo método que en el experimento 5.

De acuerdo con el proceso de producción de este ejemplo, puede producirse una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino con un elevado rendimiento de producción frente al almidón de aproximadamente el 44%. Sin embargo, en términos de pureza de la trehalosa, la composición en partículas que contenía dihidrato de trehalosa cristalino producida mediante el proceso de este ejemplo no es tan diferente de "TREHA", un nombre de producto de un polvo de grado alimentario convencional que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, comercializado por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón, como material alimentario o similar, es una composición en partículas significativamente difícil de aglomerar en comparación con el polvo de grado alimentario, así como de fácil almacenamiento y manipulación. El producto es similar al polvo de grado alimentario convencional en que es una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino; que cuanto más fácilmente se almacene y manipule, se usará más preferentemente como material para productos alimentarios, cosméticos, fármacos, productos farmacéuticos, etc.

#### Ejemplo 4

<Producción de composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino>

Una solución de reacción enzimática con una pureza de la trehalosa o un contenido de trehalosa del 86,6%, d.s.b., se obtuvo llevando a cabo una reacción de formación de trehalosa y un tratamiento con glucoamilasa de manera similar al método en el ejemplo 1, salvo por que se usó almidón de tapioca como material de almidón y una CGTasa procedente de *Paenibacillus amylolyticus*, cepa NBRC15957, como CGTasa, obtenida mediante el método en el experimento 1-2. La solución de reacción enzimática obtenida de este modo se calentó para inactivar la enzima restante y, de manera convencional, se decoloró y filtró con carbón activado. El filtrado se desaló con una resina de intercambio catiónico (forma  $\text{H}^+$ ) y una resina de intercambio aniónico (forma  $\text{OH}^-$ ), se concentró al vacío, dando un concentrado con un contenido de sólidos de aproximadamente el 86%. El concentrado se colocó en un cristizador, se mezcló con "TREHALOSE 999" (N.º de código: TH224, pureza de la trehalosa: 99,9% o mayor), un nombre de producto de un polvo de grado de reactivo que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, comercializado por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón, como cristal de siembra, en una cantidad igual al uno por ciento de contenidos sólidos, se ajustó a 60°C y se enfrió a 15°C a lo largo de 24 horas en total de tal forma que se enfrió de 60°C a 50°C a lo largo de ocho horas, de 50°C a 35°C a lo largo de ocho horas y de 35°C a 15°C a lo largo de ocho horas en condiciones de agitación suave mediante un método de enfriamiento semicontrolado en tres etapas para precipitar el dihidrato de trehalosa cristalino. Los cristales se recogieron mediante una centrifugadora de tipo cesta, se roció con agua purificada en una cantidad igual a aproximadamente el 5% del peso de la masa cocida de azúcar, se maduraron y se secaron a 50°C durante dos horas, se enfriaron soplando aire a 20°C durante 20 min y se pulverizaron para obtener una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, que contenía, basándose en el sólido seco, un 99,4% de trehalosa, un 0,06% de D-glucosa, un 0,04% de 4-O- $\alpha$ -glucosiltrehalosa y un 0,06% de 6-O- $\alpha$ -glucosiltrehalosa, con un rendimiento de producción frente al almidón de aproximadamente el 43%.

El grado de cristalinidad para el dihidrato de trehalosa cristalino, el diámetro medio del grano y la potencia reductora de la composición en partículas completa de la composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino fueron, respectivamente, del 93,3%, 3.280 Å y un 0,13%. Por comparación, la medición para el grado de cristalinidad anterior se determinó mediante el método de Hermans usando los valores analíticos  $H_{100}$  y  $H_0$  obtenidos en el experimento 4-2. La medición de la distribución del tamaño de partícula del producto reveló que contenía partículas con un tamaño de partícula de 53  $\mu\text{m}$  o mayor, pero menor de 425  $\mu\text{m}$  en una cantidad del 80,7%, aquellas con un tamaño de partícula de 53  $\mu\text{m}$  o mayor pero menor de 300  $\mu\text{m}$  en una cantidad del 74,4% y aquellas con un tamaño de partícula de 425  $\mu\text{m}$  o mayor en una cantidad del 7,1%. Cuando se sometió a una prueba de aglomeración mediante el mismo método que en los experimentos 2-2, 3-2, etc., el producto se juzgó como "No aglomerado" (-). Asimismo, el producto se juzgó como "Pasable" cuando se ensayó su solubilidad en agua mediante

el mismo método que en el experimento 5.

De acuerdo con el proceso de producción de este ejemplo, puede producirse una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino con un rendimiento de producción frente al almidón tan alto como de aproximadamente el 43%. Sin embargo, en términos de pureza de la trehalosa, la composición en partículas que contenía dihidrato de trehalosa cristalino producida mediante el proceso de este ejemplo no es tan diferente de "TREHA", un nombre de producto de un polvo de grado alimentario convencional que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, comercializado por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón, como material alimentario o similar, es una composición en partículas significativamente difícil de aglomerar en comparación con el polvo de grado alimentario, así como de fácil almacenamiento y manipulación. El producto es similar al polvo de grado alimentario convencional en que es una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino; que cuanto más fácilmente se almacene y manipule, se usará más preferentemente como material para productos alimentarios, cosméticos, fármacos, productos farmacéuticos, etc.

## 15 Ejemplo 5

<Preparación de CGTasa recombinante y CGTasa mutante y producción de composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino mediante el uso de la misma>

20 Se llevó a cabo una producción de una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino usando, en lugar de la CGTasa procedente de *Paenibacillus illinoisensis*, cepa NBRC15379 usada en el ejemplo 2, dos tipos de enzimas de una CGTasa recombinante (de tipo silvestre) obtenida expresando un gen de CGTasa procedente del microorganismo anterior en *E. coli* como hospedador y una CGTasa mutante, que tiene un reemplazo de un resto de aminoácido en la secuencia de aminoácido por otro resto de aminoácido, preparada introduciendo una mutagénesis de sitio específico en la CGTasa anterior de tipo silvestre.

<Preparación de CGTasa recombinante>

30 Usando un gen de CGTasa que tiene la secuencia de bases de la SEQ ID NO: 7, procedente de *Paenibacillus illinoisensis*, cepa NBRC15379, que se había clonado a partir del microorganismo y estaba en posesión de los presentes inventores, se construyó un ADN recombinante para expresión, que contiene un gen que codifica una CGTasa natural (de tipo silvestre) mutando el gen de CGTasa anterior sin alterar la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de CGTasa para introducir o eliminar sitios de restricción de enzimas, etc. y recombinando el resultado en un vector de plásmido de expresión "pRSET-A", producido por Invitrogen Corporation, CA, EE. UU. La estructura del ADN recombinante obtenido, "pRSET-iPI" se muestra en la FIG. 6. *E. coli* BL21 (DE3), producida por Stratagene, CA, EE. UU., se transformó de un modo habitual con el ADN recombinante "pRSET-iPI" para obtener un transformante "BL21-RSET-iPI" que tiene el ADN recombinante. Posteriormente, el transformante se cultivó en condiciones aeróbicas a 37°C durante 24 horas en medio T (que contenía 12 g de bacto-triptona, 24 g de extracto bacto-levadura, 5 ml de glicerol, fosfato potásico 17 mM y fosfato dipotásico 72 mM por litro de medio) que contenía 100 µl/ml de ampicilina (sal de Na). El cultivo resultante se centrifugó y las células obtenidas se sometieron a un tratamiento de ruptura con un "ULTRA SONIC HOMOGENIZER UH-600", un nombre de producto de un disruptor de ultrasonidos, comercializado por MST Co., Ltd., Tokio, Japón y se centrifugaron, seguido de ensayar el sobrenadante respecto de su actividad CGTasa (actividad descomponedora del almidón) para que tuviese una actividad enzimática de aproximadamente 12,8 unidades/ml cuando se convirtió en la actividad por un mililitro del líquido de cultivo. El sobrenadante de la solución disruptada se extrajo por precipitación salina de manera habitual con sulfato de amonio y se dializó para obtener una solución enzimática en bruto de una CGTasa recombinante, seguido de la purificación de la solución enzimática en bruto sometiéndola a una cromatografía en columna de intercambio aniónico usando DEAE-TOYOPEARL 650S GEL, producido por Tosoh Corp., Tokio, Japón y una cromatografía en columna hidrófoba usando BUTYL-TOYOPEARL 650M GEL comercializado por Tosoh Corp., Tokio, Japón, dando un espécimen parcialmente purificado de una CGTasa recombinante.

<Preparación de CGTasa mutante>

55 Se prepararon dos tipos de CGTasas mutantes con una sustitución de aminoácidos introduciendo una mutación de sitio específico en un gen de CGTasa natural (de tipo silvestre) procedente de la cepa NBRC15379 de *Paenibacillus illinoisensis* identificada anteriormente de una manera convencional y expresando el gen de CGTasa mutante obtenido en *E. coli*. Cuando se introduce la sustitución de aminoácidos en la CGTasa, se evita cualquier mutación de sustitución de aminoácidos de los sitios siguientes y se selecciona un sitio de mutación de entre aquellos distintos a los sitios siguientes: Los restos de aminoácido del 133<sup>er</sup> resto de ácido aspártico al 138<sup>o</sup> resto de histidina (Asp 133 a His 138), del 223<sup>er</sup> resto de glicina al 231<sup>er</sup> resto de histidina (Gly 223 a His 231), del 255<sup>o</sup> resto de ácido glutámico al 258<sup>o</sup> resto de leucina (Glu 255 a Leu 258) y del 321<sup>er</sup> resto de fenilalanina al 326<sup>o</sup> resto de ácido aspártico (Phe 321 a Asp 326) en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 correspondiente a la secuencia de aminoácidos de una CGTasa procedente de *Paenibacillus illinoisensis*, cepa NBRC15379, es decir, las secuencias de aminoácidos correspondientes a cuatro regiones comúnmente conservadas en el grupo de enzimas clasificado como la familia de α-amilasa; y los restos de aminoácidos desde el 259<sup>o</sup> resto de glicina al 264<sup>o</sup> resto de ácido aspártico (Gly 269 a Asp 264), del 331<sup>er</sup> resto de lisina al 337<sup>o</sup> resto de asparagina (Lys 331 a Asp 337), del 375<sup>o</sup> resto de lisina al 381<sup>o</sup> resto

de lisina (Lys 375 a Lys 381) y del 567° de valina al 572° resto de tirosina (Val 567 a Tyr 572) en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, es decir, las secuencias de aminoácidos parciales anteriormente identificadas de (a) a (d) que son características de CGTasas procedentes de microorganismos del género *Paenibacillus*.

5 Basándose en la guía anterior, se decidió preparar los dos tipos siguientes de CGTasas mutantes; una CGTasa mutante (G178R) con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, en donde se reemplazó el 178° resto de glicina por un resto de arginina y una CGTasa mutante (Y454H) con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, en donde se reemplazó el 454° resto de tirosina por un resto de histidina. Se obtuvo un ADN recombinante, "pRSET-iPI (G178R) " que codifica una CGTasa mutante (G178R) usando como molde genético un ADN  
10 recombinante "pRSET-iPI" que tiene un gen de CGTasa (de tipo silvestre) procedente de *Paenibacillus illinoisensis*, cepa NBRC15379 y usando oligonucleótidos sintéticos que tienen la secuencia de bases de las SEQ ID NO: 8 y 9 como cebadores con sentido y antisentido, respectivamente; e introduciendo una mutación de sitio específico en el gen de CGTasa mediante PCR convencional y métodos de DpnI usando un kit comercial de mutagénesis de sitio dirigido "QuickChange", producido por Stratagene, CA, EE. UU. Se obtuvo un ADN, "pRSET-iPI (Y454H)" que codifica la CGTasa mutante (Y454H) de manera similar a la anterior, salvo por que se usaron oligonucleótidos  
15 sintéticos que tenían las secuencias de bases de las SEQ ID NO: 10 y 11 como cebadores con sentido y antisentido, respectivamente.

20 *E. coli* BL21 (DE3), producida por Stratagene, CA, EE. UU., se transformó de manera convencional usando el ADN recombinante "pRSET-iPI (G178R)" o "pRSET-iPI (Y454H)", que tenía un gen de CGTasa mutante, para obtener transformantes de "BL21-RSET-iPI (G178R)" y "BL21-RSET-iPI (Y454H)", que tenían los ADN recombinantes respectivos anteriores. De manera similar al "BL21-RSET-iPI" anterior, estos transformantes se cultivaron respectivamente, seguido de la rotura de las células y de la purificación parcial de los resultantes para obtener  
25 especímenes parcialmente purificados de las CGTasas mutantes, respectivamente. De hecho, se ensayaron los sobrenadantes de cada una de las soluciones de rotura de células respecto de su actividad CGTasa (actividad de hidrolización del almidón) y se convirtieron en actividades enzimáticas por mililitro de las soluciones de cultivo, revelando que tenían aproximadamente 10,3 unidades/ml para "BL21-RSET-iPI (G178R)" y aproximadamente 13,7 unidades/ml para "BL21-RSET-iPI (Y454H)".

30 <Producción de composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino>

Se produjo una composición en partículas que contenía dihidrato de trehalosa cristalino mediante un método similar al del ejemplo 2, salvo por que se usó la CGTasa recombinante (de tipo silvestre) y, como CGTasa mutante, G178R, una CGTasa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12; o Y454H, una CGTasa que tiene la  
35 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, habiéndose obtenido ambas en la etapa anterior. Se determinó el contenido de trehalosa en las soluciones de reacción enzimática obtenidas usando las CGTasas respectivas, las composiciones de sacárido de las composiciones en partículas obtenidas que contienen dihidrato de trehalosa cristalino, los rendimientos de producción frente al almidón, los grados de cristalinidad para el dihidrato de trehalosa cristalino, los diámetros cristalinos medios, las potencias reductoras de los polvos completos y las distribuciones de  
40 tamaño de partícula; y las composiciones en partículas se sometieron tanto a una prueba de aglomeración mediante el mismo método que en los experimentos 2-2, 3-2, y una prueba de solubilidad en gua mediante el mismo método que en el experimento 5. Los resultados se muestran como tabla en la tabla 6.

Tabla 6

Artículo	CGTasa		
	Enzima recombinante (tipo silvestre)	Enzima mutante G178R	Enzima mutante Y454H
Contenido de trehalosa en la solución de reacción enzimática* (% en peso)	87,2	87,0	87,6
Composición de sacárido (% en peso**)	Trehalosa	99,4	99,3
	D-Glucosa	0,08	0,07
	4-O- $\alpha$ -glucosiltrehalosa	0,04	0,05
	6-O- $\alpha$ -glucosiltrehalosa	0,07	0,06
Rendimiento de producción frente al almidón (% en peso)	45	44	45
Grado de cristalinidad (%)	94,4	94,9	95,1
Diámetro medio del grano (Å)	3380	3430	3550
Potencia reductora del polvo entero (%)	0,16	0,15	0,16
Distribución del tamaño de partícula (% en peso)	53 $\mu$ m o mayor, pero menor de 425 $\mu$ m	82,1	82,6
	53 $\mu$ m o mayor, pero menor de 300 $\mu$ m	73,4	74,7
	425 $\mu$ m o mayor	6,7	6,2
Prueba de aglomeración	-	-	-

Artículo	CGTasa		
	Enzima recombinante (tipo silvestre)	Enzima mutante G178R	Enzima mutante Y454H
Solubilidad en agua	Pasable	Pasable	Pasable
*: Después del tratamiento con la glucoamilasa			
**: Basándose en el peso seco			

Como se muestra en la tabla 6, incluso en caso de usar la CGTasa recombinante y las CGTasas mutantes con una sustitución de aminoácidos, el contenido de trehalosa en las soluciones de reacción enzimática se encuentran sustancialmente al mismo nivel del 87,0% o más, como en el caso de la CGTasa natural; y las composiciones en partículas, que contienen dihidrato de trehalosa cristalino que tienen sustancialmente la misma pureza de trehalosa, grado de cristalinidad, distribución del tamaño de partícula, etc., pueden producirse con un rendimiento de producción frente al almidón tan alto como de aproximadamente el 44% a aproximadamente el 45% de acuerdo con el mismo proceso de producción. De manera similar a las composiciones en partículas que contienen dihidrato de trehalosa cristalino producidas con las CGTasas naturales en los ejemplos 1 a 4, aunque las composiciones en partículas que contienen dihidrato de trehalosa cristalino producidas en el proceso de producción de este ejemplo no son tan diferentes respecto de "TREHA", un polvo de grado alimentario convencional que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, comercializado por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón, que se ha comercializado como material alimentario, etc., en términos de pureza de la trehalosa, son composiciones en partículas significativamente difíciles de aglomerar en comparación con el polvo de grado alimentario convencional, así como de fácil almacenamiento y manipulación.

#### Ejemplo 6

Una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, que contiene, basándose en el sólido seco, un 99,7% de trehalosa, un 0,05% de D-glucosa, un 0,03% de 4-O- $\alpha$ -glucosiltrehalosa y un 0,05% de 6-O- $\alpha$ -glucosiltrehalosa, se obtuvo con un rendimiento de producción frente al almidón de aproximadamente el 46% mediante un método similar al ejemplo 2, salvo por que se precipitó el dihidrato de trehalosa cristalino aplicando un método de enfriamiento controlado del contenido a lo largo de 24 horas mediante un perfil de enfriamiento de 20 etapas aproximado a la ecuación [2] anteriormente mencionada, de tal forma que se enfría el contenido de 60°C a 20°C usando, en la etapa de cristalización para el dihidrato de trehalosa cristalino, un circulador convencional de temperatura constante programado para el sistema de cristalización y haciendo fluir un medio de calentamiento de temperatura controlada a una camisa de un cristalizador.

La composición en partículas que contiene el dihidrato de trehalosa cristalino tenía un grado de cristalinidad para el dihidrato de trehalosa cristalino del 96,8%, un diámetro medio del grano de 3.680 Å y una potencia reductora del polvo completo del 0,13%. Por comparación, se llevó a cabo la determinación del grado de cristalinidad anterior mediante el método de Hermans usando los valores analíticos  $H_{100}$  y  $H_0$  determinados en el Experimento 4-2. La medición de la distribución del tamaño de partícula de la composición en partículas reveló que contenía partículas con un tamaño de partícula de 53  $\mu\text{m}$  o mayor, pero menor de 425  $\mu\text{m}$  en una cantidad del 84,5%, aquellas con un tamaño de partícula de 53  $\mu\text{m}$  o mayor pero menor de 300  $\mu\text{m}$  en una cantidad del 76,2% y aquellas con un tamaño de partícula de 425  $\mu\text{m}$  o mayor en una cantidad del 6,4%. Cuando se sometió a una prueba de aglomeración mediante el mismo método que en los experimentos 2-2, 3-2, etc., la composición en partículas se juzgó como "No aglomerada" (-). Asimismo, la composición en partículas se juzgó como "Pasable" cuando se ensayó su solubilidad en agua mediante el mismo método que en el experimento 5.

De acuerdo con el proceso de producción de este ejemplo, se produce una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino con un rendimiento de producción frente al almidón tan alto como de aproximadamente el 46%. Aunque la composición en partículas que contenía dihidrato de trehalosa cristalino producida mediante el proceso de este ejemplo no es tan diferente de "TREHA", un nombre de producto de un polvo de grado alimentario convencional que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, comercializado por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón, que se ha comercializado como material alimentario, etc., en términos de pureza de la trehalosa, es una composición en partículas significativamente difícil de aglomerar en comparación con el polvo de grado alimentario, así como de fácil almacenamiento y manipulación. El producto es similar al polvo de grado alimentario convencional en que es una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino; que cuanto más fácilmente se almacene y manipule, se usará más preferentemente como material para productos alimentarios, cosméticos, fármacos, productos farmacéuticos, etc.

#### Ejemplo de referencia

<Producción de composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino>

Cuando se llevó a cabo una reacción de formación de trehalosa y un tratamiento con glucoamilasa de manera similar al ejemplo 1, salvo por que se usa, como CGTasa, un espécimen de enzima CGTasa procedente de *Geobacillus stearothermophilus*, cepa Tc-91, producido por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón, una solución de reacción

enzimática después del tratamiento con glucoamilasa tenía un contenido de trehalosa del 85,2%, d.s.b. La solución de reacción enzimática se decoloró y filtró de manera convencional con carbón activado, y el filtrado se desaló con una resina de intercambio catiónico (forma  $H^+$ ) y una resina de intercambio aniónico (forma  $OH^-$ ), se concentró al vacío, dando un concentrado con un contenido de sólidos de aproximadamente el 84%. El concentrado se colocó en un cristizador, se mezcló con "TREHALOSE 999" (N.º de código: TH224, pureza de la trehalosa: 99,9% o mayor), un nombre de producto de un polvo de grado de reactivo que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, comercializado por Hayashibara Co., Ltd., Okayama, Japón, como cristal de siembra, en una cantidad igual al uno por ciento de contenidos sólidos, se ajustó a 55°C y se enfrió de manera no forzada de 55°C a 15°C durante 20 horas en condiciones de agitación suave para precipitar el dihidrato de trehalosa cristalino. Los cristales se recogieron mediante una centrifugadora de tipo cesta, se roció con agua purificada en una cantidad igual a aproximadamente el 5% del peso de la masa cocida de azúcar, se maduraron y se secaron a 50°C durante dos horas, se enfriaron soplando aire a 20°C durante 20 min y se pulverizaron para obtener una composición en partículas que contiene dihidrato de trehalosa cristalino, que contenía, basándose en el sólido seco, un 98,5% de trehalosa, un 0,8% de D-glucosa, un 0,07% de 4-O- $\alpha$ -glucosiltrehalosa y un 0,1% de 6-O- $\alpha$ -glucosiltrehalosa, con un rendimiento de producción frente al almidón de aproximadamente el 38%.

El grado de cristalinidad para el dihidrato de trehalosa cristalino, el diámetro medio del grano y la potencia reductora de la composición en partículas completa del polvo completo que contiene dihidrato de trehalosa cristalino fueron, respectivamente, del 88,3%, 2.580 Å y un 1,0%. Por comparación, se determinó la medición para el grado de cristalinidad anterior usando el método de Hermans usando los valores analíticos  $H_{100}$  y  $H_0$  obtenidos en el experimento 4-2. La medición de la distribución del tamaño de partícula del producto reveló que contenía partículas con un tamaño de partícula de 53  $\mu m$  o mayor, pero menor de 425  $\mu m$  en una cantidad del 74,4%, aquellas con un tamaño de partícula de 53  $\mu m$  o mayor pero menor de 300  $\mu m$  en una cantidad del 69,4% y aquellas con un tamaño de partícula de 425  $\mu m$  o mayor en una cantidad del 12,6%. Cuando se sometió a una prueba de aglomeración mediante el mismo método que en los experimentos 2-2, 3-2, etc., el producto se juzgó como "Ligeramente aglomerado" ( $\pm$ ): Asimismo, el producto se juzgó como "Pasable" cuando se ensayó su solubilidad en agua mediante el mismo método que en el experimento 5.

#### Aplicabilidad industrial

Tal como se ha descrito anteriormente, de acuerdo con el proceso de producción para producir composiciones en partículas que contienen dihidrato de trehalosa cristalino, aquellas que tienen una pureza relativamente elevada similar a un polvo de grado alimentario convencional que contiene dihidrato de trehalosa cristalino y que son difícilmente aglomerables, pueden producirse con un alto rendimiento de producción frente al almidón. En particular, cuando se aplica un método de enfriamiento controlado o un método de enfriamiento semicontrolado en la etapa de cristalización para el dihidrato de trehalosa cristalino, se producen composiciones en partículas que contienen una mayor pureza del dihidrato de trehalosa cristalino con un mayor rendimiento de producción frente al almidón. Tal como se ha descrito anteriormente, el proceso de producción de acuerdo con la presente divulgación permite producir de manera más eficiente composiciones en partículas que contienen dihidrato de trehalosa cristalino a escala industrial usando almidón, como material, que está presente de manera abundante pero en una fuente reducida y por lo tanto, tiene una utilidad industrial particular. Las composiciones en partículas que contienen dihidrato de trehalosa cristalino producidas mediante el proceso de producción de la presente divulgación, que emplea un método de enfriamiento controlado o un método de enfriamiento semicontrolado, son composiciones en partículas significativamente difíciles de aglomerar en comparación con los polvos de grado alimentario que contienen dihidrato de trehalosa cristalino y tienen una disponibilidad industrial superior en tanto que pueden usarse en diversos usos como materiales en polvo más fácilmente manipulables para productos alimentarios, cosméticos, fármacos o productos farmacéuticos. Por lo tanto, la presente invención, que tiene funciones y efectos sorprendentes, tiene distintas utilidades industriales.

#### Explicación de los símbolos

En la FIG. 1, los símbolos "a" a "e" tienen los siguientes significados:

- a: un pico de difracción con un ángulo ( $2\theta$ ) de 13,7° (índice de Miller (hkl): 101) para calcular el diámetro del grano;
- b: un pico de difracción con un ángulo ( $2\theta$ ) de 17,5° (índice de Miller (hkl):220) para calcular el diámetro del grano;
- c: un pico de difracción con un ángulo ( $2\theta$ ) de 21,1° (índice de Miller (hkl):221) para calcular el diámetro del grano;
- d: un pico de difracción con un ángulo ( $2\theta$ ) de 23,9° (índice de Miller (hkl):231) para calcular el diámetro del grano; y
- e: un pico de difracción con un ángulo ( $2\theta$ ) de 25,9° (índice de Miller (hkl): 150) para calcular el diámetro del grano.

En la FIG. 5, los símbolos "a" a "c" tienen los siguientes significados:

- a: Curva de enfriamiento controlado;
- b: Enfriamiento lineal; y
- c: Curva de enfriamiento no forzado.

5 En la FIG. 6, los siguientes símbolos tienen los siguientes significados:

- pUC ori: Origen de replicación procedente del plásmido pUC;
- T7: Promotor de T7;
- Flecha blanca (Amp): Gen de resistencia a la ampicilina; y
- 10 Flecha negra: Gen de CGTasa.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> Hayashibara Co., Ltd.

<120> Proceso para producir una composición en partículas que comprende dihidrato de alfa,alfa-trehalosa cristalino

20 <130> WO1243

<160> 13

<210> 1

<211> 682

25 <212> PRT

<213> *Paenibacillus illinoisensis*

<400> 1

ES 2 674 599 T3

Asp	Thr	Ala	Val	Thr	Asn	Lys	Gln	Asn	Phe	Ser	Thr	Asp	Val	Ile	Tyr
1				5					10					15	
Gln	Val	Phe	Thr	Asp	Arg	Phe	Leu	Asp	Gly	Asn	Pro	Ser	Asn	Asn	Pro
			20					25					30		
Thr	Gly	Ala	Ala	Phe	Asp	Gly	Thr	Cys	Ser	Asn	Leu	Lys	Leu	Tyr	Cys
		35					40					45			
Gly	Gly	Asp	Trp	Gln	Gly	Leu	Ile	Asn	Lys	Ile	Asn	Asp	Asn	Tyr	Phe
	50					55					60				
Ser	Asp	Leu	Gly	Val	Thr	Ala	Leu	Trp	Ile	Ser	Gln	Pro	Val	Glu	Asn
65					70					75					80
Ile	Phe	Ala	Thr	Ile	Asn	Tyr	Ser	Gly	Val	Thr	Asn	Thr	Ala	Tyr	His
				85					90					95	
Gly	Tyr	Trp	Ala	Arg	Asp	Phe	Lys	Lys	Thr	Asn	Pro	Tyr	Phe	Gly	Thr
			100					105					110		
Met	Thr	Asp	Phe	Gln	Asn	Leu	Val	Thr	Ser	Ala	His	Ala	Lys	Gly	Ile
		115					120					125			
Lys	Ile	Ile	Ile	Asp	Phe	Ala	Pro	Asn	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Met	Glu
	130					135					140				
Thr	Asp	Thr	Ser	Phe	Ala	Glu	Asn	Gly	Lys	Leu	Tyr	Asp	Asn	Gly	Ser
145					150					155					160
Leu	Val	Gly	Gly	Tyr	Thr	Asn	Asp	Thr	Asn	Gly	Tyr	Phe	His	His	Asn
				165					170					175	
Gly	Gly	Ser	Asp	Phe	Ser	Thr	Leu	Glu	Asn	Gly	Ile	Tyr	Lys	Asn	Leu
			180					185					190		
Tyr	Asp	Leu	Ala	Asp	Leu	Asn	His	Asn	Asn	Ser	Thr	Ile	Asp	Thr	Tyr
	195						200					205			
Phe	Lys	Asp	Ala	Ile	Lys	Leu	Trp	Leu	Asp	Met	Gly	Val	Asp	Gly	Ile
	210					215					220				
Arg	Val	Asp	Ala	Val	Lys	His	Met	Pro	Gln	Gly	Trp	Gln	Lys	Asn	Trp
225					230					235					240
Met	Ser	Ser	Ile	Tyr	Ala	His	Lys	Pro	Val	Phe	Thr	Phe	Gly	Glu	Trp
				245					250					255	
Phe	Leu	Gly	Ser	Ala	Ala	Ser	Asp	Ala	Asp	Asn	Thr	Asp	Phe	Ala	Asn
			260					265					270		
Glu	Ser	Gly	Met	Ser	Leu	Leu	Asp	Phe	Arg	Phe	Asn	Ser	Ala	Val	Arg
		275					280					285			
Asn	Val	Phe	Arg	Asp	Asn	Thr	Ser	Asn	Met	Tyr	Ala	Leu	Asp	Ser	Met
	290					295					300				
Leu	Thr	Ala	Thr	Ala	Ala	Asp	Tyr	Asn	Gln	Val	Asn	Asp	Gln	Val	Thr
305					310					315					320
Phe	Ile	Asp	Asn	His	Asp	Met	Asp	Arg	Phe	Lys	Thr	Ser	Ala	Val	Asn
				325					330					335	
Asn	Arg	Arg	Leu	Glu	Gln	Ala	Leu	Ala	Phe	Thr	Leu	Thr	Ser	Arg	Gly
			340					345					350		
Val	Pro	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Glu	Gln	Tyr	Leu	Thr	Gly	Asn	Gly





Gln Val Ile Tyr Ser Tyr Pro Thr Trp Tyr Tyr Asp Val Ser Val Pro  
 625 630 635 640  
 Ala Gly Thr Asn Leu Glu Phe Lys Phe Phe Lys Lys Asn Gly Ser Thr  
 645 650 655  
 Ile Thr Trp Glu Asn Gly Asn Asn His Thr Phe Thr Thr Pro Thr Ser  
 660 665 670  
 Gly Thr Ala Thr Val Thr Val Asp Trp Gln Pro  
 675 680

<210> 3  
 <211> 682  
 <212> PRT  
 <213> Paenibacillus amylolyticus

5

<400> 3

Asp Thr Ala Val Thr Asn Lys Gln Asn Phe Ser Thr Asp Val Ile Tyr  
 1 5 10 15  
 Gln Ile Phe Thr Asp Arg Phe Leu Asp Gly Asn Pro Ser Asn Asn Pro  
 20 25 30  
 Thr Gly Ala Ala Tyr Asp Ala Thr Cys Ser Asn Leu Lys Leu Tyr Cys  
 35 40 45  
 Gly Gly Asp Trp Gln Gly Leu Ile Asn Lys Ile Asn Asp Asn Tyr Phe  
 50 55 60  
 Ser Asp Leu Gly Val Thr Ala Leu Trp Ile Ser Gln Pro Val Glu Asn  
 65 70 75 80  
 Ile Phe Ala Thr Ile Asn Tyr Gly Gly Val Ile Asn Thr Ala Tyr His  
 85 90 95  
 Gly Tyr Trp Ala Arg Asp Phe Lys Lys Thr Asn Pro Tyr Phe Gly Thr  
 100 105 110  
 Met Ala Asp Phe Gln Asn Leu Ile Thr Thr Ala His Ala Lys Gly Ile  
 115 120 125  
 Lys Ile Val Ile Asp Phe Ala Pro Asn His Thr Ser Pro Ala Met Glu  
 130 135 140  
 Thr Asp Thr Ser Phe Ala Glu Asn Gly Lys Leu Tyr Asp Asn Gly Asn  
 145 150 155 160  
 Leu Val Gly Gly Tyr Thr Asn Asp Thr Asn Gly Tyr Phe His His Asn  
 165 170 175  
 Gly Gly Ser Asp Phe Ser Ser Leu Glu Asn Gly Ile Tyr Lys Asn Leu  
 180 185 190  
 Tyr Asp Leu Ala Asp Leu Asn His Asn Asn Ser Thr Ile Asp Gln Tyr  
 195 200 205  
 Phe Lys Asp Ala Ile Lys Leu Trp Leu Asp Met Gly Val Asp Gly Ile  
 210 215 220  
 Arg Val Asp Ala Val Lys His Met Pro Leu Gly Trp Gln Lys Ser Trp  
 225 230 235 240  
 Met Ser Ser Ile Tyr Ala His Lys Pro Val Phe Thr Phe Gly Glu Trp  
 245 250 255  
 Phe Leu Gly Ser Ala Ala Ser Asp Ala Asp Asn Thr Glu Phe Ala Asn  
 260 265 270  
 Glu Ser Gly Met Ser Leu Leu Asp Phe Arg Phe Asn Ser Ala Val Arg  
 275 280 285  
 Asp Val Phe Arg Asp Asn Thr Ser Asn Met Tyr Ala Leu Asp Ser Met  
 290 295 300  
 Ile Thr Gly Thr Ala Ala Asp Tyr Asn Gln Val Asn Asp Gln Val Thr  
 305 310 315 320  
 Phe Ile Asp Asn His Asp Met Asp Arg Phe Lys Thr Ser Ala Val Asn  
 325 330 335  
 Asn Arg Arg Leu Glu Gln Ala Leu Ala Phe Thr Leu Thr Ser Arg Gly  
 340 345 350  
 Val Pro Ala Ile Tyr Tyr Gly Thr Glu Gln Tyr Leu Thr Gly Asn Gly  
 355 360 365  
 Asp Pro Asp Asn Arg Ala Lys Met Pro Ser Phe Ser Lys Thr Thr Thr  
 370 375 380

10

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

<210> 4  
 <211> 680  
 5 <212> PRT  
 <213> Geobacillus stearothermophilus

<400> 4

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

10

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> 5  
 <211> 686  
 5 <212> PRT  
 <213> Bacillus macerans

<400> 5

Ser	Pro	Asp	Thr	Ser	Val	Asn	Asn	Lys	Leu	Asn	Phe	Ser	Thr	Asp	Thr
1				5					10					15	
Val	Tyr	Gln	Ile	Val	Thr	Asp	Arg	Phe	Val	Asp	Gly	Asn	Ser	Ala	Asn
			20					25						30	
His	Pro	Thr	Gly	Ala	Ala	Phe	Ser	Ser	Asp	His	Ser	Asn	Leu	Lys	Leu
		35					40					45			
Tyr	Phe	Gly	Gly	Asp	Trp	Gln	Gly	Ile	Thr	Asn	Lys	Ile	Asn	Asp	Gly
	50					55					60				
Tyr	Leu	Thr	Gly	Met	Gly	Ile	Thr	Ala	Leu	Trp	Ile	Ser	Gln	Pro	Val
	65				70					75					80
Glu	Asn	Ile	Thr	Ala	Val	Ile	Lys	Tyr	Ser	Gly	Val	Asn	Asn	Thr	Ala
				85					90					95	
Tyr	His	Gly	Tyr	Trp	Pro	Arg	Asp	Phe	Lys	Lys	Thr	Asn	Ala	Ala	Phe
			100					105					110		
Gly	Ser	Phe	Thr	Asp	Phe	Ser	Asn	Leu	Ile	Ala	Ala	Ala	His	Ser	His
		115					120						125		
Asn	Ile	Lys	Val	Val	Met	Asp	Phe	Ala	Pro	Asn	His	Thr	Asn	Pro	Ala
	130					135					140				
Ser	Ser	Thr	Asp	Pro	Ser	Phe	Ala	Glu	Asn	Gly	Ala	Leu	Tyr	Asn	Asn
	145			150						155					160
Gly	Thr	Leu	Leu	Gly	Lys	Tyr	Ser	Asn	Asp	Thr	Ala	Gly	Leu	Phe	His
				165					170					175	
His	Asn	Gly	Gly	Thr	Asp	Phe	Ser	Thr	Thr	Glu	Ser	Gly	Ile	Tyr	Lys
		180						185					190		
Asn	Leu	Tyr	Asp	Leu	Ala	Asp	Ile	Asn	Gln	Asn	Asn	Asn	Thr	Ile	Asp
	195						200					205			
Ser	Tyr	Leu	Lys	Glu	Ser	Ile	Gln	Leu	Trp	Leu	Asn	Leu	Gly	Val	Asp
	210					215					220				
Gly	Ile	Arg	Phe	Asp	Ala	Val	Lys	His	Met	Pro	Gln	Gly	Trp	Gln	Lys
	225				230					235					240
Ser	Tyr	Val	Ser	Ser	Ile	Tyr	Ser	Ser	Ala	Asn	Pro	Val	Phe	Thr	Phe
					245				250						255
Gly	Glu	Trp	Phe	Leu	Gly	Pro	Asp	Glu	Met	Thr	Gln	Asp	Asn	Ile	Asn
			260					265					270		
Phe	Ala	Asn	Gln	Ser	Gly	Met	His	Leu	Leu	Asp	Phe	Ala	Phe	Ala	Gln
		275					280					285			
Glu	Ile	Arg	Glu	Val	Phe	Arg	Asp	Lys	Ser	Glu	Thr	Met	Thr	Asp	Leu
	290					295					300				
Asn	Ser	Val	Ile	Ser	Ser	Thr	Gly	Ser	Ser	Tyr	Asn	Tyr	Ile	Asn	Asn
	305					310				315					320
Met	Val	Thr	Phe	Ile	Asp	Asn	His	Asp	Met	Asp	Arg	Phe	Gln	Gln	Ala
				325					330					335	
Gly	Ala	Ser	Thr	Arg	Pro	Thr	Glu	Gln	Ala	Leu	Ala	Val	Thr	Leu	Thr
			340					345						350	
Ser	Arg	Gly	Val	Pro	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Glu	Gln	Tyr	Met	Thr
		355					360						365		
Gly	Asn	Gly	Asp	Pro	Asn	Asn	Arg	Gly	Met	Met	Thr	Gly	Phe	Asp	Thr
	370					375					380				
Asn	Lys	Thr	Ala	Tyr	Lys	Val	Ile	Lys	Ala	Leu	Ala	Pro	Leu	Arg	Lys
	385				390					395					400
Ser	Asn	Pro	Ala	Leu	Ala	Tyr	Gly	Ser	Thr	Thr	Gln	Arg	Trp	Val	Asn

				405					410					415		
Ser	Asp	Val	Tyr	Val	Tyr	Glu	Arg	Lys	Phe	Gly	Ser	Asn	Val	Ala	Leu	
			420					425					430			
Val	Ala	Val	Asn	Arg	Ser	Ser	Thr	Thr	Ala	Tyr	Pro	Ile	Ser	Gly	Ala	
		435					440					445				
Leu	Thr	Ala	Leu	Pro	Asn	Gly	Thr	Tyr	Thr	Asp	Val	Leu	Gly	Gly	Leu	
		450				455					460					
Leu	Asn	Gly	Asn	Ser	Ile	Thr	Val	Asn	Gly	Gly	Thr	Val	Ser	Asn	Phe	
465					470					475					480	
Thr	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Thr	Ala	Val	Trp	Gln	Tyr	Thr	Thr	Thr	Glu	
				485					490						495	
Ser	Ser	Pro	Ile	Ile	Gly	Asn	Val	Gly	Pro	Thr	Met	Gly	Lys	Pro	Gly	
			500					505					510			
Asn	Thr	Ile	Thr	Ile	Asp	Gly	Arg	Gly	Phe	Gly	Thr	Thr	Lys	Asn	Lys	
			515				520						525			
Val	Thr	Phe	Gly	Thr	Thr	Ala	Val	Thr	Gly	Ala	Asn	Ile	Val	Ser	Trp	
						535					540					
Glu	Asp	Thr	Glu	Ile	Lys	Val	Lys	Val	Pro	Asn	Val	Ala	Ala	Gly	Asn	
545					550					555					560	
Thr	Ala	Val	Thr	Val	Thr	Asn	Ala	Ala	Gly	Thr	Thr	Ser	Ala	Ala	Phe	
					565				570						575	
Asn	Asn	Phe	Asn	Val	Leu	Thr	Ala	Asp	Gln	Val	Thr	Val	Arg	Phe	Lys	
			580					585					590			
Val	Asn	Asn	Ala	Thr	Thr	Ala	Leu	Gly	Gln	Asn	Val	Tyr	Leu	Thr	Gly	
			595				600					605				
Asn	Val	Ala	Glu	Leu	Gly	Asn	Trp	Thr	Ala	Ala	Asn	Ala	Ile	Gly	Pro	
						615						620				
Met	Tyr	Asn	Gln	Val	Glu	Ala	Ser	Tyr	Pro	Thr	Trp	Tyr	Phe	Asp	Val	
625					630					635					640	
Ser	Val	Pro	Ala	Asn	Thr	Ala	Leu	Gln	Phe	Lys	Phe	Ile	Lys	Val	Asn	
					645				650						655	
Gly	Ser	Thr	Val	Thr	Trp	Glu	Gly	Gly	Asn	Asn	His	Thr	Phe	Thr	Ser	
			660					665					670			
Pro	Ser	Ser	Gly	Val	Ala	Thr	Val	Thr	Val	Asp	Trp	Gln	Asn			
			675				680						685			

<210> 6  
 <211> 681  
 <212> PRT  
 <213> Thermoanaerobacter thermosulfurigenes

5

<400> 6

Ala	Pro	Asp	Thr	Ser	Val	Ser	Asn	Val	Val	Asn	Tyr	Ser	Thr	Asp	Val	
1				5					10					15		
Ile	Tyr	Gln	Ile	Val	Thr	Asp	Arg	Phe	Leu	Asp	Gly	Asn	Pro	Ser	Asn	
			20					25					30			
Asn	Pro	Thr	Gly	Asp	Leu	Tyr	Asp	Pro	Thr	His	Thr	Ser	Leu	Lys	Lys	
			35				40						45			
Tyr	Phe	Gly	Gly	Asp	Trp	Gln	Gly	Ile	Ile	Asn	Lys	Ile	Asn	Asp	Gly	
			50				55					60				
Tyr	Leu	Thr	Gly	Met	Gly	Ile	Thr	Ala	Ile	Trp	Ile	Ser	Gln	Pro	Val	
65					70					75					80	
Glu	Asn	Ile	Tyr	Ala	Val	Leu	Pro	Asp	Ser	Thr	Phe	Gly	Gly	Ser	Thr	
				85					90					95		
Ser	Tyr	His	Gly	Tyr	Trp	Ala	Arg	Asp	Phe	Lys	Lys	Pro	Asn	Pro	Phe	
			100					105					110			
Phe	Gly	Ser	Phe	Thr	Asp	Phe	Gln	Asn	Leu	Ile	Ala	Thr	Ala	His	Ala	
			115				120					125				
His	Asn	Ile	Lys	Val	Ile	Ile	Asp	Phe	Ala	Pro	Asn	His	Thr	Ser	Pro	
			130				135					140				
Ala	Ser	Glu	Thr	Asp	Pro	Thr	Tyr	Gly	Glu	Asn	Gly	Arg	Leu	Tyr	Asp	
145					150					155					160	
Asn	Gly	Val	Leu	Leu	Gly	Gly	Tyr	Thr	Asn	Asp	Thr	Asn	Gly	Tyr	Phe	

10

				165					170					175		
His	His	Tyr	Gly	Gly	Thr	Asn	Phe	Ser	Ser	Tyr	Glu	Asp	Gly	Ile	Tyr	
			180					185					190			
Arg	Asn	Leu	Phe	Asp	Leu	Ala	Asp	Leu	Asp	Gln	Gln	Asn	Ser	Thr	Ile	
		195					200					205				
Asp	Ser	Tyr	Leu	Lys	Ala	Ala	Ile	Lys	Leu	Trp	Leu	Asp	Met	Gly	Ile	
		210					215				220					
Asp	Gly	Ile	Arg	Met	Asp	Ala	Val	Lys	His	Met	Ala	Phe	Gly	Trp	Gln	
		225			230					235					240	
Lys	Asn	Phe	Met	Asp	Ser	Ile	Leu	Ser	Tyr	Arg	Pro	Val	Phe	Thr	Phe	
				245					250					255		
Gly	Glu	Trp	Tyr	Leu	Gly	Thr	Asn	Glu	Val	Asp	Pro	Asn	Asn	Thr	Tyr	
			260					265					270			
Phe	Ala	Asn	Glu	Ser	Gly	Met	Ser	Leu	Leu	Asp	Phe	Arg	Phe	Ala	Gln	
		275						280				285				
Lys	Val	Arg	Gln	Val	Phe	Arg	Asp	Asn	Thr	Asp	Thr	Met	Tyr	Gly	Leu	
		290				295					300					
Asp	Ser	Met	Ile	Gln	Ser	Thr	Ala	Ala	Asp	Tyr	Asn	Phe	Ile	Asn	Asp	
		305			310					315					320	
Met	Val	Thr	Phe	Ile	Asp	Asn	His	Asp	Met	Asp	Arg	Phe	Tyr	Thr	Gly	
				325					330					335		
Gly	Ser	Thr	Arg	Pro	Val	Glu	Gln	Ala	Leu	Ala	Phe	Thr	Leu	Thr	Ser	
			340					345					350			
Arg	Gly	Val	Pro	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Glu	Gln	Tyr	Met	Thr	Gly	
		355					360					365				
Asn	Gly	Asp	Pro	Tyr	Asn	Arg	Ala	Met	Met	Thr	Ser	Phe	Asp	Thr	Thr	
		370				375					380					
Thr	Thr	Ala	Tyr	Asn	Val	Ile	Lys	Lys	Leu	Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Ser	
				390						395					400	
Asn	Pro	Ala	Ile	Ala	Tyr	Gly	Thr	Gln	Lys	Gln	Arg	Trp	Ile	Asn	Asn	
				405					410					415		
Asp	Val	Tyr	Ile	Tyr	Glu	Arg	Gln	Phe	Gly	Asn	Asn	Val	Ala	Leu	Val	
			420					425					430			
Ala	Ile	Asn	Arg	Asn	Leu	Ser	Thr	Ser	Tyr	Tyr	Ile	Thr	Gly	Leu	Tyr	
			435				440					445				
Thr	Ala	Leu	Pro	Ala	Gly	Thr	Tyr	Ser	Asp	Met	Leu	Gly	Gly	Leu	Leu	
					455					460						
Asn	Gly	Ser	Ser	Ile	Thr	Val	Ser	Ser	Asn	Gly	Ser	Val	Thr	Pro	Phe	
				470						475					480	
Thr	Leu	Ala	Pro	Gly	Glu	Val	Ala	Val	Trp	Gln	Tyr	Val	Ser	Thr	Thr	
				485					490					495		
Asn	Pro	Pro	Leu	Ile	Gly	His	Val	Gly	Pro	Thr	Met	Thr	Lys	Ala	Gly	
			500					505					510			
Gln	Thr	Ile	Thr	Ile	Asp	Gly	Arg	Gly	Phe	Gly	Thr	Thr	Ala	Gly	Gln	
		515					520					525				
Val	Leu	Phe	Gly	Thr	Thr	Pro	Ala	Thr	Ile	Val	Ser	Trp	Glu	Asp	Thr	
						535					540					
Glu	Val	Lys	Val	Lys	Val	Pro	Ala	Leu	Thr	Pro	Gly	Lys	Tyr	Asn	Ile	
					550					555					560	
Thr	Leu	Lys	Thr	Ala	Ser	Gly	Val	Thr	Ser	Asn	Ser	Tyr	Asn	Asn	Ile	
				565						570				575		
Asn	Val	Leu	Thr	Gly	Asn	Gln	Val	Cys	Val	Arg	Phe	Val	Val	Asn	Asn	
			580					585					590			
Ala	Thr	Thr	Val	Trp	Gly	Glu	Asn	Val	Tyr	Leu	Thr	Gly	Asn	Val	Ala	
			595				600					605				
Glu	Leu	Gly	Asn	Trp	Asp	Thr	Ser	Lys	Ala	Ile	Gly	Pro	Met	Phe	Asn	
					615						620					
Gln	Val	Val	Tyr	Gln	Tyr	Pro	Thr	Trp	Tyr	Tyr	Asp	Val	Ser	Val	Pro	
					630					635					640	
Ala	Gly	Thr	Thr	Ile	Glu	Phe	Ile	Lys	Lys	Asn	Gly	Ser	Thr	Val	Thr	
				645						650				655		
Trp	Glu	Gly	Gly	Tyr	Asn	His	Val	Tyr	Thr	Thr	Pro	Thr	Ser	Gly	Thr	
				660				665						670		

ES 2 674 599 T3

Ala Thr Val Ile Val Asp Trp Gln Pro  
675 680

<210> 7  
<211> 2154  
<212> ADN  
<213> Paenibacillus illinoisensis

<400> 7

atg ttt caa atg gcc aaa cgc gtt ctc ctc agt acc acg cta acg ttc	48
Met Phe Gln Met Ala Lys Arg Val Leu Leu Ser Thr Thr Leu Thr Phe	
1 5 10 15	
agc ctg ctt gcc ggc agt gca ttg cct ttc ctg cct gcc tcc gcg att	96
Ser Leu Leu Ala Gly Ser Ala Leu Pro Phe Leu Pro Ala Ser Ala Ile	
20 25 30	
tat gcc gat gcg gat acg gct gtc acc aac aag caa aat ttc agt acc	144
Tyr Ala Asp Ala Asp Thr Ala Val Thr Asn Lys Gln Asn Phe Ser Thr	
35 40 45	
gat gtc atc tat caa gtt ttt acg gac cgg ttt ctg gac ggt aac cca	192
Asp Val Ile Tyr Gln Val Phe Thr Asp Arg Phe Leu Asp Gly Asn Pro	
50 55 60	
tcc aac aac ccc act gga gct gct ttt gat ggc aca tgc agc aac ctg	240
Ser Asn Asn Pro Thr Gly Ala Ala Phe Asp Gly Thr Cys Ser Asn Leu	
65 70 75 80	
aaa ctg tac tgc ggc ggc gac tgg cag ggg ctg att aac aaa atc aat	288
Lys Leu Tyr Cys Gly Gly Asp Trp Gln Gly Leu Ile Asn Lys Ile Asn	
85 90 95	
gac aac tat ttc agt gac ctg ggt gtc aca gcc ctc tgg atc tcc cag	336
Asp Asn Tyr Phe Ser Asp Leu Gly Val Thr Ala Leu Trp Ile Ser Gln	
100 105 110	
cct gtc gaa aat att ttc gct acc atc aac tac agc ggt gta acc aac	384
Pro Val Glu Asn Ile Phe Ala Thr Ile Asn Tyr Ser Gly Val Thr Asn	
115 120 125	
act gct tat cac ggc tat tgg gca cgg gat ttc aag aag acc aat cca	432
Thr Ala Tyr His Gly Tyr Trp Ala Arg Asp Phe Lys Lys Thr Asn Pro	
130 135 140	
tat ttc gga acc atg acc gat ttt cag aat ctg gtg acc tcc gcc cat	480
Tyr Phe Gly Thr Met Thr Asp Phe Gln Asn Leu Val Thr Ser Ala His	
145 150 155 160	
gct aaa ggc atc aaa atc att att gat ttc gcg cca aac cat acg ttc	528
Ala Lys Gly Ile Lys Ile Ile Ile Asp Phe Ala Pro Asn His Thr Phe	
165 170 175	
cct gcc atg gaa acc gat acc tcc ttc gct gaa aac ggc aaa ctg tac	576
Pro Ala Met Glu Thr Asp Thr Ser Phe Ala Glu Asn Gly Lys Leu Tyr	
180 185 190	
gat aac ggc agc ctg gtg ggc ggg tac acc aat gat acg aac gga tat	624
Asp Asn Gly Ser Leu Val Gly Gly Tyr Thr Asn Asp Thr Asn Gly Tyr	
195 200 205	
ttt cac cac aat ggc ggc tcc gat ttc tcc act ctt gag aat ggc att	672
Phe His His Asn Gly Gly Ser Asp Phe Ser Thr Leu Glu Asn Gly Ile	

5

10

ES 2 674 599 T3

210	215	220	
tac aaa aac ctc tac gat ctg gcc gat ctg aat cac aat aac agc acg			720
Tyr Lys Asn Leu Tyr Asp Leu Ala Asp Leu Asn His Asn Asn Ser Thr			
225	230	235	240
atc gat aca tat ttc aaa gac gcc atc aag ctg tgg ctg gat atg ggc			768
Ile Asp Thr Tyr Phe Lys Asp Ala Ile Lys Leu Trp Leu Asp Met Gly			
	245	250	255
gtg gac ggc atc cgt gtc gat gcg gtc aag cac atg cca cag gga tgg			816
Val Asp Gly Ile Arg Val Asp Ala Val Lys His Met Pro Gln Gly Trp			
	260	265	270
cag aag aac tgg atg tca tcc atc tat gca cac aag ccg gta ttt acc			864
Gln Lys Asn Trp Met Ser Ser Ile Tyr Ala His Lys Pro Val Phe Thr			
	275	280	285
ttc ggc gaa tgg ttc ctg gga tct gct gca tcc gat gcg gat aac aca			912
Phe Gly Glu Trp Phe Leu Gly Ser Ala Ala Ser Asp Ala Asp Asn Thr			
	290	295	300
gat ttt gcc aat gaa tcc ggt atg agt ttg ctt gat ttt cgt ttc aat			960
Asp Phe Ala Asn Glu Ser Gly Met Ser Leu Leu Asp Phe Arg Phe Asn			
	310	315	320
tcg gct gtc cgc aac gtg ttc cgg gat aac aca tcc aac atg tac gcg			1008
Ser Ala Val Arg Asn Val Phe Arg Asp Asn Thr Ser Asn Met Tyr Ala			
	325	330	335
ctg gat tcc atg ctt acg gct acg gca gca gat tac aat caa gtg aat			1056
Leu Asp Ser Met Leu Thr Ala Thr Ala Ala Asp Tyr Asn Gln Val Asn			
	340	345	350
gac caa gtc act ttc att gac aac cat gat atg gac cgt ttc aaa aca			1104
Asp Gln Val Thr Phe Ile Asp Asn His Asp Met Asp Arg Phe Lys Thr			
	355	360	365
agt gcg gtg aac aac cgc cgt ctg gaa cag gct ctg gcc ttc acg ctg			1152
Ser Ala Val Asn Asn Arg Arg Leu Glu Gln Ala Leu Ala Phe Thr Leu			
	370	375	380
acc tca cgc ggc gta cct gcc atc tat tat ggt acc gag cag tat ctg			1200
Thr Ser Arg Gly Val Pro Ala Ile Tyr Tyr Gly Thr Glu Gln Tyr Leu			
	385	390	400
acc ggg aat ggt gac ccg gat aac cgg gcc aaa atg cct tcc ttc tcc			1248
Thr Gly Asn Gly Asp Pro Asp Asn Arg Gly Lys Met Pro Ser Phe Ser			
	405	410	415
aaa tcg acc aca gcg ttc agc gtg atc agc aag ctg gct cct ctg cgc			1296
Lys Ser Thr Thr Ala Phe Ser Val Ile Ser Lys Leu Ala Pro Leu Arg			
	420	425	430
aaa tcc aac ccg gcg att gcc tac ggt tcc aca cag cag cgc tgg atc			1344
Lys Ser Asn Pro Ala Ile Ala Tyr Gly Ser Thr Gln Gln Arg Trp Ile			
	435	440	445
aac aat gat gta tat atc tat gag cgc aag ttt ggc aaa agc gtt gcc			1392
Asn Asn Asp Val Tyr Ile Tyr Glu Arg Lys Phe Gly Lys Ser Val Ala			
	450	455	460
gtt gtt gcc gtt aac cgc aat ctc acg acg cca acc agt atc acg aac			1440

ES 2 674 599 T3

Val	Val	Ala	Val	Asn	Arg	Asn	Leu	Thr	Thr	Pro	Thr	Ser	Ile	Thr	Asn		
465					470					475					480		
ctg	aat	acg	tcc	ctt	cca	tca	gga	aca	tac	acc	gat	gtg	ctg	ggc	ggc		1488
Leu	Asn	Thr	Ser	Leu	Pro	Ser	Gly	Thr	Tyr	Thr	Asp	Val	Leu	Gly	Gly		
				485					490					495			
gtg	ctg	aac	gga	aac	aac	att	act	tca	agt	gga	ggc	aac	att	tct	tcc		1536
Val	Leu	Asn	Gly	Asn	Asn	Ile	Thr	Ser	Ser	Gly	Gly	Asn	Ile	Ser	Ser		
			500					505					510				
ttc	acg	ctc	gca	gca	gga	gct	acc	gct	gtg	tgg	cag	tat	acg	gca	agt		1584
Phe	Thr	Leu	Ala	Ala	Gly	Ala	Thr	Ala	Val	Trp	Gln	Tyr	Thr	Ala	Ser		
		515					520					525					
gaa	acg	acg	cca	acc	atc	ggt	cac	gtt	ggc	cct	gta	atg	ggt	aaa	cct		1632
Glu	Thr	Thr	Pro	Thr	Ile	Gly	His	Val	Gly	Pro	Val	Met	Gly	Lys	Pro		
	530					535					540						
ggt	aac	gtc	gtt	acc	atc	gac	gga	cgg	ggg	ttc	ggc	tcc	acc	aaa	ggt		1680
Gly	Asn	Val	Val	Thr	Ile	Asp	Gly	Arg	Gly	Phe	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly		
545					550					555					560		
acc	gtc	tac	ttc	ggt	aca	aca	gcc	gtt	acg	ggc	tct	gcc	atc	act	tca		1728
Thr	Val	Tyr	Phe	Gly	Thr	Thr	Ala	Val	Thr	Gly	Ser	Ala	Ile	Thr	Ser		
					565					570					575		
tgg	gaa	gac	act	cag	atc	aaa	gtc	acc	att	cca	cca	gta	gca	ggc	ggt		1776
Trp	Glu	Asp	Thr	Gln	Ile	Lys	Val	Thr	Ile	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Gly		
			580					585					590				
gac	tat	gca	gtg	aaa	gtc	gct	gcc	aat	ggt	gtg	aac	agc	aat	gcc	tat		1824
Asp	Tyr	Ala	Val	Lys	Val	Ala	Ala	Asn	Gly	Val	Asn	Ser	Asn	Ala	Tyr		
		595					600					605					
aac	gat	ttc	acg	atc	cta	agc	ggc	gat	cag	gtc	tcg	gtt	cgg	ttc	gtc		1872
Asn	Asp	Phe	Thr	Ile	Leu	Ser	Gly	Asp	Gln	Val	Ser	Val	Arg	Phe	Val		
	610					615					620						
atc	aat	aat	gcc	aca	act	gca	ctg	ggt	gaa	aac	atc	tac	ctg	acg	ggc		1920
Ile	Asn	Asn	Ala	Thr	Thr	Ala	Leu	Gly	Glu	Asn	Ile	Tyr	Leu	Thr	Gly		
625					630					635					640		
aac	gtg	tcc	gaa	ctg	ggg	aac	tgg	acc	aca	ggt	gcg	gct	tcc	att	gga		1968
Asn	Val	Ser	Glu	Leu	Gly	Asn	Trp	Thr	Thr	Gly	Ala	Ala	Ser	Ile	Gly		
			645					650						655			
ccg	gct	ttc	aat	cag	gtc	atc	cac	gcc	tac	ccg	act	tgg	tat	tat	gac		2016
Pro	Ala	Phe	Asn	Gln	Val	Ile	His	Ala	Tyr	Pro	Thr	Trp	Tyr	Tyr	Asp		
			660					665					670				
gta	agt	gtt	cca	gcc	ggg	aaa	cag	ctg	gaa	ttc	aag	ttc	ttc	aag	aaa		2064
Val	Ser	Val	Pro	Ala	Gly	Lys	Gln	Leu	Glu	Phe	Lys	Phe	Phe	Lys	Lys		
		675					680					685					
aac	ggg	gct	acc	att	acg	tgg	gag	ggt	gga	tcc	aat	cac	acc	ttt	aca		2112
Asn	Gly	Ala	Thr	Ile	Thr	Trp	Glu	Gly	Gly	Ser	Asn	His	Thr	Phe	Thr		
	690					695					700						
aca	ccg	acc	agc	ggt	act	gcc	act	gta	aca	gta	aac	tgg	caa				2154
Thr	Pro	Thr	Ser	Gly	Thr	Ala	Thr	Val	Thr	Val	Asn	Trp	Gln				
705					710					715							

<210> 8

<211> 30

ES 2 674 599 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> cebador con sentido para la PCR  
  
 <400> 8  
 ttcaccacaa tggccgctcc gatttctcca 30  
  
 10 <210> 9  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 15 <220>  
 <223> cebador antisentido para la PCR  
  
 <400> 9  
 20 tggagaaatc ggagcggcca ttgtggtgaa 30  
  
 <210> 10  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 25 <220>  
 <223> cebador con sentido para la PCR  
  
 <400> 10  
 30 ctccatcag gaacacacac cgatgtgctg 30  
  
 <210> 11  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> cebador antisentido para la PCR  
  
 <400> 11  
 40 cagcacatcg gtgtgtgttc ctgatggaag 30  
  
 <210> 12  
 <211> 682  
 45 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> CGTasa(G178R) mutada  
 50 <400> 12

Asp	Thr	Ala	Val	Thr	Asn	Lys	Gln	Asn	Phe	Ser	Thr	Asp	Val	Ile	Tyr
1				5					10					15	
Gln	Val	Phe	Thr	Asp	Arg	Phe	Leu	Asp	Gly	Asn	Pro	Ser	Asn	Asn	Pro
			20					25					30		
Thr	Gly	Ala	Ala	Phe	Asp	Gly	Thr	Cys	Ser	Asn	Leu	Lys	Leu	Tyr	Cys
		35				40						45			
Gly	Gly	Asp	Trp	Gln	Gly	Leu	Ile	Asn	Lys	Ile	Asn	Asp	Asn	Tyr	Phe
	50					55					60				
Ser	Asp	Leu	Gly	Val	Thr	Ala	Leu	Trp	Ile	Ser	Gln	Pro	Val	Glu	Asn

65					70					75					80
Ile	Phe	Ala	Thr	Ile	Asn	Tyr	Ser	Gly	Val	Thr	Asn	Thr	Ala	Tyr	His
				85					90					95	
Gly	Tyr	Trp	Ala	Arg	Asp	Phe	Lys	Lys	Thr	Asn	Pro	Tyr	Phe	Gly	Thr
			100					105					110		
Met	Thr	Asp	Phe	Gln	Asn	Leu	Val	Thr	Ser	Ala	His	Ala	Lys	Gly	Ile
		115					120					125			
Lys	Ile	Ile	Ile	Asp	Phe	Ala	Pro	Asn	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Met	Glu
	130					135					140				
Thr	Asp	Thr	Ser	Phe	Ala	Glu	Asn	Gly	Lys	Leu	Tyr	Asp	Asn	Gly	Ser
145					150						155				160
Leu	Val	Gly	Gly	Tyr	Thr	Asn	Asp	Thr	Asn	Gly	Tyr	Phe	His	His	Asn
				165					170					175	
Gly	Arg	Ser	Asp	Phe	Ser	Thr	Leu	Glu	Asn	Gly	Ile	Tyr	Lys	Asn	Leu
			180					185					190		
Tyr	Asp	Leu	Ala	Asp	Leu	Asn	His	Asn	Asn	Ser	Thr	Ile	Asp	Thr	Tyr
		195				200						205			
Phe	Lys	Asp	Ala	Ile	Lys	Leu	Trp	Leu	Asp	Met	Gly	Val	Asp	Gly	Ile
	210					215					220				
Arg	Val	Asp	Ala	Val	Lys	His	Met	Pro	Gln	Gly	Trp	Gln	Lys	Asn	Trp
225					230					235					240
Met	Ser	Ser	Ile	Tyr	Ala	His	Lys	Pro	Val	Phe	Thr	Phe	Gly	Glu	Trp
			245						250					255	
Phe	Leu	Gly	Ser	Ala	Ala	Ser	Asp	Ala	Asp	Asn	Thr	Asp	Phe	Ala	Asn
			260					265					270		
Glu	Ser	Gly	Met	Ser	Leu	Leu	Asp	Phe	Arg	Phe	Asn	Ser	Ala	Val	Arg
		275					280					285			
Asn	Val	Phe	Arg	Asp	Asn	Thr	Ser	Asn	Met	Tyr	Ala	Leu	Asp	Ser	Met
	290					295					300				
Leu	Thr	Ala	Thr	Ala	Ala	Asp	Tyr	Asn	Gln	Val	Asn	Asp	Gln	Val	Thr
305					310					315					320
Phe	Ile	Asp	Asn	His	Asp	Met	Asp	Arg	Phe	Lys	Thr	Ser	Ala	Val	Asn
				325					330					335	
Asn	Arg	Arg	Leu	Glu	Gln	Ala	Leu	Ala	Phe	Thr	Leu	Thr	Ser	Arg	Gly
			340					345					350		
Val	Pro	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Glu	Gln	Tyr	Leu	Thr	Gly	Asn	Gly
		355				360						365			
Asp	Pro	Asp	Asn	Arg	Gly	Lys	Met	Pro	Ser	Phe	Ser	Lys	Ser	Thr	Thr
	370					375					380				
Ala	Phe	Ser	Val	Ile	Ser	Lys	Leu	Ala	Pro	Leu	Arg	Lys	Ser	Asn	Pro
385					390					395					400
Ala	Ile	Ala	Tyr	Gly	Ser	Thr	Gln	Gln	Arg	Trp	Ile	Asn	Asn	Asp	Val
			405						410					415	
Tyr	Ile	Tyr	Glu	Arg	Lys	Phe	Gly	Lys	Ser	Val	Ala	Val	Val	Ala	Val
			420					425					430		
Asn	Arg	Asn	Leu	Thr	Thr	Pro	Thr	Ser	Ile	Thr	Asn	Leu	Asn	Thr	Ser
		435					440					445			
Leu	Pro	Ser	Gly	Thr	Tyr	Thr	Asp	Val	Leu	Gly	Gly	Val	Leu	Asn	Gly
	450					455					460				
Asn	Asn	Ile	Thr	Ser	Ser	Gly	Gly	Asn	Ile	Ser	Ser	Phe	Thr	Leu	Ala
465					470					475					480
Ala	Gly	Ala	Thr	Ala	Val	Trp	Gln	Tyr	Thr	Ala	Ser	Glu	Thr	Thr	Pro
			485						490					495	
Thr	Ile	Gly	His	Val	Gly	Pro	Val	Met	Gly	Lys	Pro	Gly	Asn	Val	Val
			500					505					510		
Thr	Ile	Asp	Gly	Arg	Gly	Phe	Gly	Ser	Thr	Lys	Gly	Thr	Val	Tyr	Phe
		515					520					525			
Gly	Thr	Thr	Ala	Val	Thr	Gly	Ser	Ala	Ile	Thr	Ser	Trp	Glu	Asp	Thr
	530					535					540				
Gln	Ile	Lys	Val	Thr	Ile	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Gly	Asp	Tyr	Ala	Val
545					550					555					560
Lys	Val	Ala	Ala	Asn	Gly	Val	Asn	Ser	Asn	Ala	Tyr	Asn	Asp	Phe	Thr
				565					570					575	

ES 2 674 599 T3

Ile Leu Ser Gly Asp Gln Val Ser Val Arg Phe Val Ile Asn Asn Ala  
 580 585 590  
 Thr Thr Ala Leu Gly Glu Asn Ile Tyr Leu Thr Gly Asn Val Ser Glu  
 595 600 605  
 Leu Gly Asn Trp Thr Thr Gly Ala Ala Ser Ile Gly Pro Ala Phe Asn  
 610 615 620  
 Gln Val Ile His Ala Tyr Pro Thr Trp Tyr Tyr Asp Val Ser Val Pro  
 625 630 635 640  
 Ala Gly Lys Gln Leu Glu Phe Lys Phe Phe Lys Lys Asn Gly Ala Thr  
 645 650 655  
 Ile Thr Trp Glu Gly Gly Ser Asn His Thr Phe Thr Thr Pro Thr Ser  
 660 665 670  
 Gly Thr Ala Thr Val Thr Val Asn Trp Gln  
 675 680

<210> 13  
 <211> 682  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> CGTasa(Y454H) mutada

10 <400> 13

Asp Thr Ala Val Thr Asn Lys Gln Asn Phe Ser Thr Asp Val Ile Tyr  
 1 5 10 15  
 Gln Val Phe Thr Asp Arg Phe Leu Asp Gly Asn Pro Ser Asn Asn Pro  
 20 25 30  
 Thr Gly Ala Ala Phe Asp Gly Thr Cys Ser Asn Leu Lys Leu Tyr Cys  
 35 40 45  
 Gly Gly Asp Trp Gln Gly Leu Ile Asn Lys Ile Asn Asp Asn Tyr Phe  
 50 55 60  
 Ser Asp Leu Gly Val Thr Ala Leu Trp Ile Ser Gln Pro Val Glu Asn  
 65 70 75 80  
 Ile Phe Ala Thr Ile Asn Tyr Ser Gly Val Thr Asn Thr Ala Tyr His  
 85 90 95  
 Gly Tyr Trp Ala Arg Asp Phe Lys Lys Thr Asn Pro Tyr Phe Gly Thr  
 100 105 110  
 Met Thr Asp Phe Gln Asn Leu Val Thr Ser Ala His Ala Lys Gly Ile  
 115 120 125  
 Lys Ile Ile Ile Asp Phe Ala Pro Asn His Thr Phe Pro Ala Met Glu  
 130 135 140  
 Thr Asp Thr Ser Phe Ala Glu Asn Gly Lys Leu Tyr Asp Asn Gly Ser  
 145 150 155 160  
 Leu Val Gly Gly Tyr Thr Asn Asp Thr Asn Gly Tyr Phe His His Asn  
 165 170 175  
 Gly Gly Ser Asp Phe Ser Thr Leu Glu Asn Gly Ile Tyr Lys Asn Leu  
 180 185 190  
 Tyr Asp Leu Ala Asp Leu Asn His Asn Asn Ser Thr Ile Asp Thr Tyr  
 195 200 205  
 Phe Lys Asp Ala Ile Lys Leu Trp Leu Asp Met Gly Val Asp Gly Ile  
 210 215 220  
 Arg Val Asp Ala Val Lys His Met Pro Gln Gly Trp Gln Lys Asn Trp  
 225 230 235 240  
 Met Ser Ser Ile Tyr Ala His Lys Pro Val Phe Thr Phe Gly Glu Trp  
 245 250 255  
 Phe Leu Gly Ser Ala Ala Ser Asp Ala Asp Asn Thr Asp Phe Ala Asn  
 260 265 270  
 Glu Ser Gly Met Ser Leu Leu Asp Phe Arg Phe Asn Ser Ala Val Arg  
 275 280 285  
 Asn Val Phe Arg Asp Asn Thr Ser Asn Met Tyr Ala Leu Asp Ser Met  
 290 295 300

Leu Thr Ala Thr Ala Ala Asp Tyr Asn Gln Val Asn Asp Gln Val Thr  
 305 310 315 320  
 Phe Ile Asp Asn His Asp Met Asp Arg Phe Lys Thr Ser Ala Val Asn  
 325 330 335  
 Asn Arg Arg Leu Glu Gln Ala Leu Ala Phe Thr Leu Thr Ser Arg Gly  
 340 345 350  
 Val Pro Ala Ile Tyr Tyr Gly Thr Glu Gln Tyr Leu Thr Gly Asn Gly  
 355 360 365  
 Asp Pro Asp Asn Arg Gly Lys Met Pro Ser Phe Ser Lys Ser Thr Thr  
 370 375 380  
 Ala Phe Ser Val Ile Ser Lys Leu Ala Pro Leu Arg Lys Ser Asn Pro  
 385 390 395 400  
 Ala Ile Ala Tyr Gly Ser Thr Gln Gln Arg Trp Ile Asn Asn Asp Val  
 405 410 415  
 Tyr Ile Tyr Glu Arg Lys Phe Gly Lys Ser Val Ala Val Val Ala Val  
 420 425 430  
 Asn Arg Asn Leu Thr Thr Pro Thr Ser Ile Thr Asn Leu Asn Thr Ser  
 435 440 445  
 Leu Pro Ser Gly Thr His Thr Asp Val Leu Gly Gly Val Leu Asn Gly  
 450 455 460  
 Asn Asn Ile Thr Ser Ser Gly Gly Asn Ile Ser Ser Phe Thr Leu Ala  
 465 470 475 480  
 Ala Gly Ala Thr Ala Val Trp Gln Tyr Thr Ala Ser Glu Thr Thr Pro  
 485 490 495  
 Thr Ile Gly His Val Gly Pro Val Met Gly Lys Pro Gly Asn Val Val  
 500 505 510  
 Thr Ile Asp Gly Arg Gly Phe Gly Ser Thr Lys Gly Thr Val Tyr Phe  
 515 520 525  
 Gly Thr Thr Ala Val Thr Gly Ser Ala Ile Thr Ser Trp Glu Asp Thr  
 530 535 540  
 Gln Ile Lys Val Thr Ile Pro Pro Val Ala Gly Gly Asp Tyr Ala Val  
 545 550 555 560  
 Lys Val Ala Ala Asn Gly Val Asn Ser Asn Ala Tyr Asn Asp Phe Thr  
 565 570 575  
 Ile Leu Ser Gly Asp Gln Val Ser Val Arg Phe Val Ile Asn Asn Ala  
 580 585 590  
 Thr Thr Ala Leu Gly Glu Asn Ile Tyr Leu Thr Gly Asn Val Ser Glu  
 595 600 605  
 Leu Gly Asn Trp Thr Thr Gly Ala Ala Ser Ile Gly Pro Ala Phe Asn  
 610 615 620  
 Gln Val Ile His Ala Tyr Pro Thr Trp Tyr Tyr Asp Val Ser Val Pro  
 625 630 635 640  
 Ala Gly Lys Gln Leu Glu Phe Lys Phe Phe Lys Lys Asn Gly Ala Thr  
 645 650 655  
 Ile Thr Trp Glu Gly Gly Ser Asn His Thr Phe Thr Thr Pro Thr Ser  
 660 665 670  
 Gly Thr Ala Thr Val Thr Val Asn Trp Gln  
 675 680

## REIVINDICACIONES

1. Un proceso para producir una composición en partículas que comprende  $\alpha,\alpha$ -trehalosa cristalina con un contenido de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa del 98,0% en peso o más, basándose en el sólido seco y un grado de cristalinidad para el dihidrato de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa cristalino del 90,0% o más, cuando se calcula basándose en su perfil de difracción de rayos X, comprendiendo dicho proceso las etapas de:

5  
10  
15  
20  
25  
obtener una solución de sacárido con un contenido de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa de más del 86,0% en peso, basándose en el sólido seco, sin pasar a través de una etapa de fraccionamiento mediante cromatografía en columna, dejar que actúe sobre el almidón licuado una enzima formadora de  $\alpha$ -glucosiltrehalosa procedente de un microorganismo del género *Arthrobacter* y una enzima liberadora de trehalosa procedente de un microorganismo del género *Arthrobacter* junto con una enzima desramificadora del almidón y una ciclomaltodextrina glucanotransferasa, seguido de  
dejar que actúe una glucoamilasa sobre la mezcla resultante;  
precipitar el dihidrato de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa cristalino de dicha solución de sacárido;  
recoger el dihidrato de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa cristalino precipitado mediante centrifugación; y  
madurar y secar los cristales recogidos;  
en donde dicha ciclomaltodextrina glucanotransferasa es una ciclomaltodextrina glucanotransferasa natral o recombinante procedente de un microorganismo de las especies *Paenibacillus illinoisensis*, *Paenibacillus pabuli*, o *Paenibacillus amylolyticus*, o una enzima que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o 13;  
en donde dicha etapa de precipitación del dihidrato de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa cristalino se lleva a cabo mediante un método de enfriamiento controlado o un método de enfriamiento semicontrolado; y  
en donde dicho método de enfriamiento controlado es un método de enfriamiento en donde la temperatura del líquido "T" en el tiempo "t" se expresa mediante la siguiente fórmula " $T=T_0 - (T_0 - T_f) (t/\tau)^3$ ", en donde "r" es el tiempo de operación establecido para una etapa de cristalización, "T<sub>0</sub>" es la temperatura del líquido al inicio de la cristalización y "T<sub>f</sub>" es la temperatura objetivo del líquido al terminar la cristalización.

2. El proceso de la reivindicación 1, en donde dicha ciclomaltodextrina glucanotransferasa es una enzima que tiene las siguientes secuencias de aminoácidos parciales de (a) a (d):

- 30  
35  
(a) Gly-Ser-X<sub>1</sub>-Ala-Ser-Asp;  
(b) Lys-Thr-Ser-Ala-Val-Asn-Asn;  
(c) Lys-Met-Pro-Ser-Phe-Ser-Lys; y  
(d) Val-Asn-Ser-Asn--X<sub>2</sub>-Tyr;

en donde X<sub>1</sub> significa Ala o Ser y X<sub>2</sub> significa Ala o Thr, respectivamente.

3. El proceso de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde dicha ciclomaltodextrina glucanotransferasa es la que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 o 3.

4. Una composición en partículas que comprende dihidrato de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa cristalino, que comprende  $\alpha,\alpha$ -trehalosa en una cantidad del 99,0% en peso o más pero de no más del 99,6% en peso, basándose en el sólido seco y tiene un grado de cristalinidad para el dihidrato de  $\alpha,\alpha$ -trehalosa cristalino del 90,0% o más pero no mayor del 96,0%, cuando se calcula basándose en su perfil de difracción de rayos X, en donde la composición contiene partículas que tienen un tamaño en el intervalo de 53  $\mu$ m a 425  $\mu$ m en una cantidad del 70% o más en peso de la composición; y en donde la composición contiene partículas que tienen un tamaño en el intervalo de 53  $\mu$ m a 300  $\mu$ m en una cantidad del 50% o más en peso de la composición.

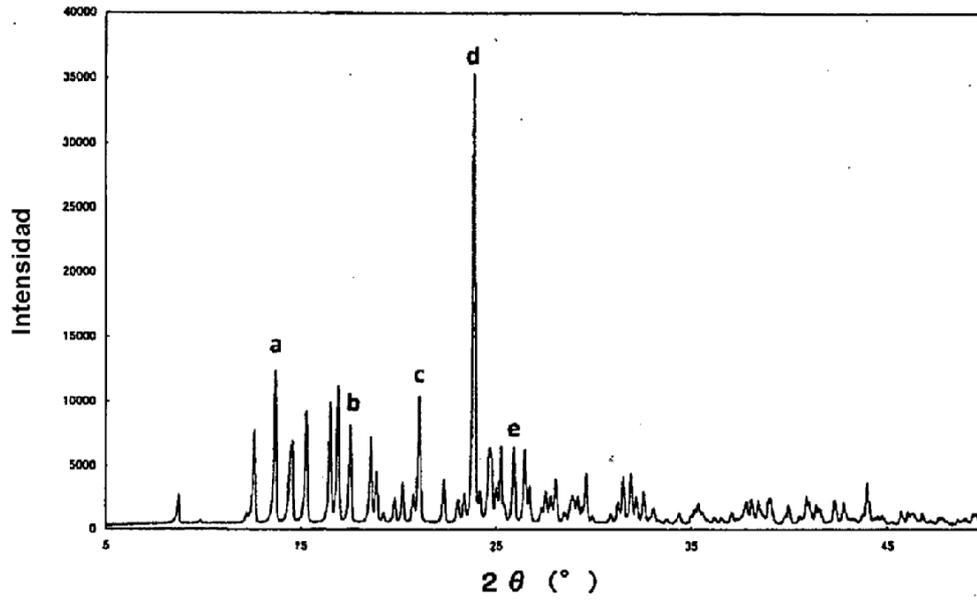


FIG. 1

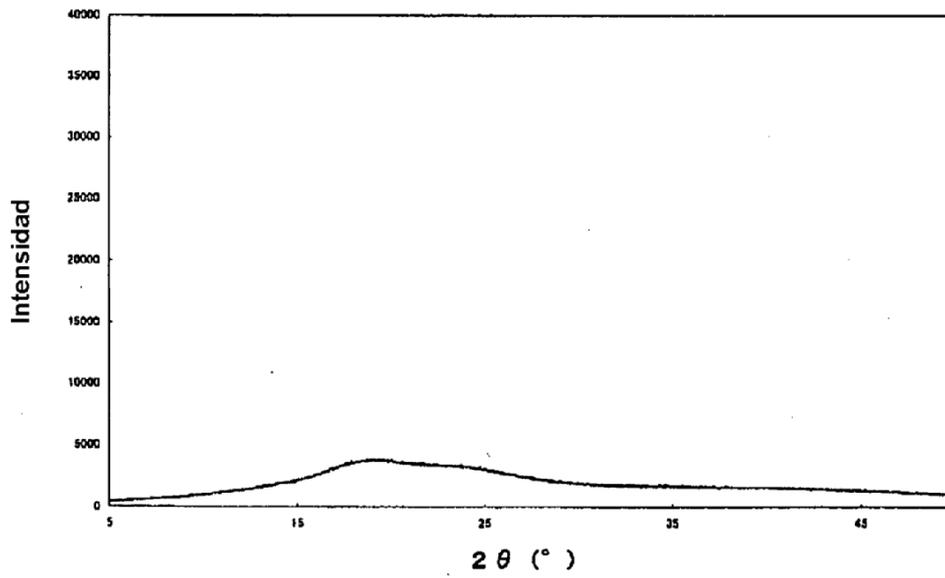


FIG. 2

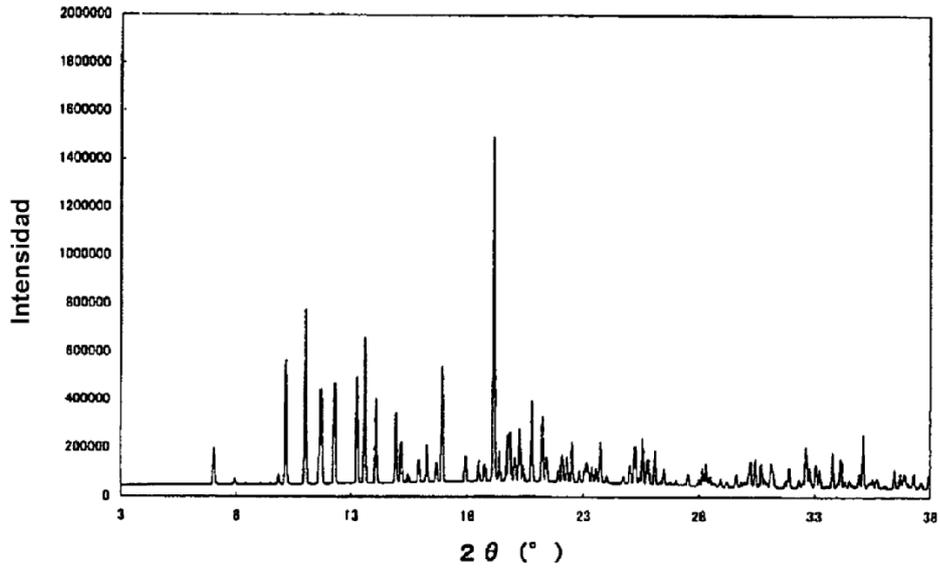


FIG. 3

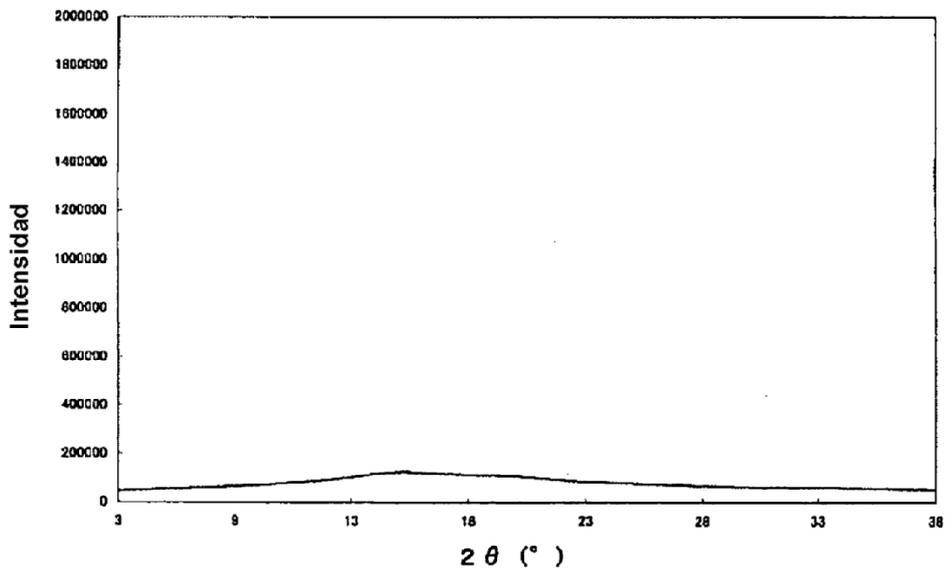


FIG. 4

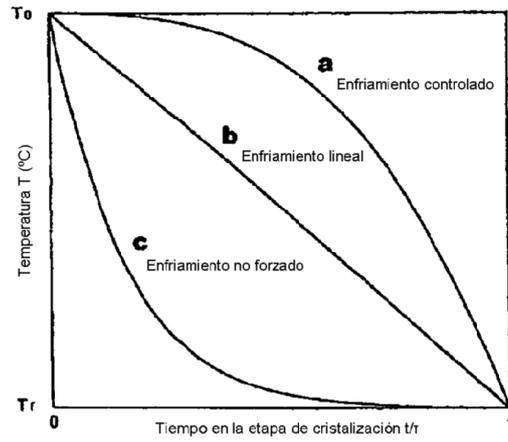


FIG. 5

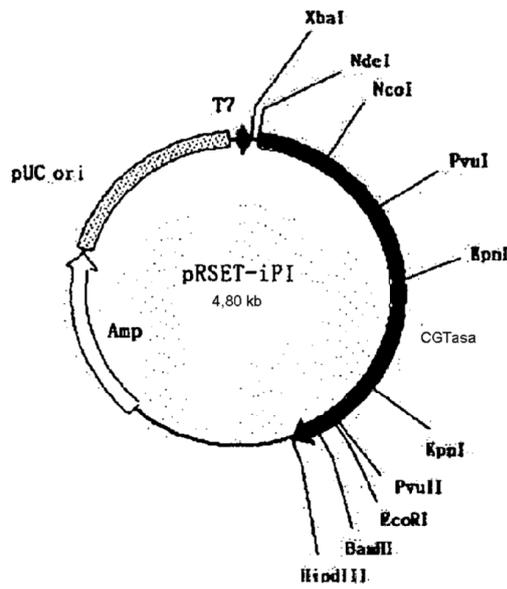


FIG. 6