

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 745 449**

51 Int. Cl.:

C12P 19/18 (2006.01)
C13K 1/02 (2006.01)
C12P 19/02 (2006.01)
C07H 3/04 (2006.01)
C12P 19/12 (2006.01)
C13K 11/00 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.09.2015** **PCT/EP2015/070724**
87 Fecha y número de publicación internacional: **17.03.2016** **WO16038142**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.09.2015** **E 15760467 (9)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019** **EP 3191598**

54 Título: **Procedimiento para la preparación enzimática de un producto y de un coproducto glucósido a partir de un educto glucósido**

30 Prioridad:

10.09.2014 EP 14184302
10.09.2014 EP 14184301
29.10.2014 EP 14190891

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.03.2020

73 Titular/es:

PFEIFER & LANGEN GMBH & CO. KG (100.0%)
Aachener Straße 1042 A
50858 Köln, DE

72 Inventor/es:

KOCH, TIMO JOHANNES;
HÄSSLER, THOMAS y
KIPPING, FLORIAN

74 Agente/Representante:

BUENO FERRÁN , Ana María

ES 2 745 449 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

Procedimiento para la preparación enzimática de un producto y de un coproducto glucósido a partir de un educto glucósido

- 5 La invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un producto glucósido, esto es un oligosacárido, a saber celobiosa, y de un coproducto, esto es un monosacárido, a saber fructosa, a partir de un educto glucósido, es decir a partir de un oligosacárido, en particular a partir de sacarosa, con catálisis enzimática. El educto glucósido es así primeramente escindido enzimáticamente en glucosa-1-fosfato y el coproducto, haciéndose reaccionar la glucosa-1-fosfato posteriormente para dar el producto glucósido. Se
10 añade un reactivo a la glucosa-1-fosfato, esto es un sacárido adicional, en particular glucosa. El coproducto formado en la escisión del educto glucósido y el producto glucósido formado en la reacción de la glucosa-1-fosfato preferiblemente son ambos aislados o, alternativamente, el coproducto es además convertido en un coproducto-transformado, el cual es entonces es aislado.

- 15 Los carbohidratos pueden presentar diversas propiedades ventajosas, entre otras en el campo de la nutrición humana y animal. En particular, el disacárido celobiosa también se distingue por una potencial actividad y combinación prebiótica, algo raro en los disacáridos, de baja solubilidad, dulzura e higroscopicidad. Esto le abre diversas aplicaciones posibles como ingrediente funcional en productos alimenticios y alimentos. Otros glucósidos, tales como, por ejemplo, el glicosil glicerol, son adecuados para su uso en cosmética. Partiendo de disacáridos que se producen de manera ubicua en la naturaleza, como sacarosa, lactosa, manosa y maltosa,
20 se pueden preparar enzimáticamente otros disacáridos. En este caso, un intermedio importante es la glucosa-1-fosfato, que se obtiene a partir de disacáridos que contienen glucosa mediante una fosforilasa adecuada con la adición de una fuente de fosfato. La glucosa-1-fosfato puede reaccionar selectivamente con un reactivo adecuado, con catálisis mediante una fosforilasa adicional, para dar otros productos.

- 25 La celulosa como material de partida para la preparación química de celobiosa es conocida en la técnica anterior (A.N. Pereira et al., Preparation of celloextrins, en: Methods Enzymol., (1988), 160; US 2009/0281305). La celobiosa se puede obtener enzimáticamente por la hidrólisis de celulosa con celulasas, formándose glucosa por actividades secundarias y no siendo el grado de degradación completo (US 4.908.311, WO 2012/001102). Una desventaja de estos procesos es el grado incompleto de degradación de la celulosa, de modo que el producto contiene proporciones de oligómeros o residuos de celulosa de cadena más larga.
30 En el proceso enzimático, en particular, es una desventaja que la mayoría de las celulasas utilizadas tengan actividad de beta-glucosidasa y, por ello, escindan una parte del producto a glucosa. De esta manera no se pueden conseguir conversiones completas.

- 35 La US 4.908.311 describe el desarrollo de una composición producto que comprende celobiosa, obtenida a partir de celulosa por degradación, y glucosa. El proceso se lleva a cabo por medio de una levadura inmovilizada, gracias a la cual la glucosa es completamente metabolizada por la levadura. Sin embargo, el uso de levaduras y la metabolización de un monosacárido para la elaboración de un producto introduce impurezas indefinidas en el producto debido a la levadura. Además, se pierde un valioso carbohidrato durante la metabolización de la glucosa, disminuyendo el rendimiento considerablemente.

- 40 De la técnica anterior también es conocido el almidón como material de partida para la preparación de celobiosa (M. Suzuki et al., Synthesis of cellobiose from starch by the successive actions of two phosphorylases, en: New Biotechnology, (2009), 26, 3/4). En un proceso en dos etapas, después de la degradación del almidón, se separa el fosfato de una mezcla de producto intermedio que comprende glucosa-1-fosfato mediante electrodiálisis. Durante la segunda etapa de reacción, el fosfato se separa por precipitación en forma de $Mg(NH_4)PO_4$. Sin embargo, el uso de almidón como material de partida resulta en productos secundarios en
45 forma de residuos de almidón no degradados. Las glucano-fosforilasas utilizadas son capaces de degradar las cadenas de almidón tan sólo a una cadena residual de cierta longitud incluso después de la desramificación, razón por la cual este tipo de productos secundarios es intrínseco. Debido a la baja solubilidad de los almidones en agua, en general sólo es posible trabajar con concentraciones de sustrato del 1%, lo que conduce a procesos de producción con un escaso rendimiento espacio-tiempo y a la necesidad de eliminar grandes cantidades de agua después de la síntesis de la glucosa-1-fosfato (producto intermedio).
50

- La JP-A 2009/060922 describe la síntesis de glucosa-1-fosfato a partir de sacarosa con una sacarosa-fosforilasa de *Leuconostoc mesenteroides*. La síntesis se lleva a cabo en una fermentación de célula completa con la adición de sacarosa y ácido fosfórico, o sales fosfato. La concentración de los sustratos es de 0,6 a 1,2 M. En una fermentación de células enteras, además del producto real, también se forman numerosos productos secundarios, lo que aumenta significativamente el gasto en términos de aislamiento. Además, el proceso es
55 complejo de llevar a cabo, debido a que primero debe estimularse el crecimiento de los microorganismos hasta

alcanzar una concentración de biomasa específica antes de que se puedan establecer las condiciones para la óptima obtención del producto. Debido a los procesos que consumen glucosa-1-fosfato en las células, los rendimientos de las transformaciones de células completas son más bajos que aquellos de los procesos enzimáticos puros.

- 5 La EP-A 423 768 describe un procedimiento para la preparación de celobiosa a partir de sacarosa usando las tres enzimas sacarosa-fosforilasa, glucosa-isomerasa y celobiosa-fosforilasa. Además de resultar en glucosa-1-fosfato, el tratamiento de sacarosa con sacarosa-fosforilasa en presencia de fosfato también produce fructosa, que se isomeriza a glucosa mediante la glucosa-isomerasa. Finalmente, la reacción de la glucosa-1-fosfato con la glucosa obtenida por isomerización, con catálisis con la celobiosa-fosforilasa, conduce a celobiosa. El medio se tampona con imidazol. El material de partida (sacarosa) se emplea sólo a bajas concentraciones, de 100 mM y 200 mM, y el producto (celobiosa) se obtiene a bajas concentraciones, de solamente 147 mM. Después de la reacción, la celobiosa-fosforilasa se inactiva térmicamente o las enzimas se separan una de otra por inmovilización en columnas separadas que están conectadas en serie. El uso de tres enzimas es comparativamente complejo y da lugar a pérdidas de conversión. Además, la isomerización de la fructosa a glucosa es antieconómica. Cuando se utilizan tres enzimas simultáneamente en un sistema, no es posible tener en cuenta individualmente las condiciones óptimas de reacción para cada etapa de reacción. En particular, en la segunda etapa de reacción, la concentración de fosfato creciente interfiere con la reacción. Por tanto, también en la tercera etapa de reacción, la separación de la síntesis de celobiosa y la eliminación de fosfato también es desventajosa en términos del equilibrio de la reacción y de su velocidad. El proceso global es muy lento y, por tanto, requiere muchas horas para obtener rendimientos satisfactorios.

- 10 La WO 2014/060452 se refiere a la identificación, la expresión recombinante y la caracterización de una sacarosa-6'-fosfato-fosforilasa de la bacteria termófila *Thermoanaerobacterium termo-saccharolyticum*. De esta enzima se dice que es útil para la producción industrial de D-fructosa, D-fructosa-6-fosfato, alfa-D-glucosa-1-fosfato o alfa-D-glucósidos. La reacción se lleva a cabo en un sistema de dos fases empleando agua como primera fase y acetato de etilo como segunda fase.

- 15 En la preparación de celobiosa en presencia de tres enzimas, se ha descrito extraer por cristalización la celobiosa con el fin de aumentar el rendimiento. Esto puede realizarse bien después de la reacción, en cuyo caso el foco está en el reciclado de las enzimas (H. Taniguchi et al., *Enzymatic Synthesis of Cellobiose of Low Cost Carbohydrates; Biocatalysis and Biotechnology for functional foods and industrial products*, 2007, AOCS Press, London), bien al mismo tiempo que la reacción, con lo cual resulta que la posición de equilibrio de la reacción se desplaza especialmente a un mayor rendimiento del producto (M. Kitaoka et al., *Carbohydrate-Processing Phosphorolytic Enzymes*, en: *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, (2002), 14, 75). Sin embargo, debido a que la celobiosa es un disacárido que cristaliza particularmente mal, la cristalización sólo se puede conseguirse con parámetros de reacción desventajosos para la reacción real. Por ejemplo, también se requiere una alta sobresaturación, además de bajas temperaturas. Por ello, los rendimientos espacio-tiempo son muy bajos.

- 20 S. Suzuki et al., *New Biotecnología*, Elsevier BV, NL, Vol. 26, Nº 3-4, páginas 137-142, se refiere a la síntesis de celobiosa a partir de almidón mediante la acción sucesiva de dos fosforilasas. El medio se tampona con ácido 4-morfolinpropanosulfónico (MOPS) y contiene acetato de magnesio. Un alto rendimiento de celobiosa requiere largos tiempos de reacción de 70 horas o más. La celobiosa obtenida contiene cantidades sustanciales de fosfato.

- 25 Los procedimientos conocidos de la técnica anterior para la preparación de glucósidos a partir de otros glucósidos no son satisfactorios en todos los aspectos y existe la necesidad de procedimientos mejorados. Los procedimientos mejorados deben distinguirse por un alto rendimiento espacio-tiempo, el uso eficiente de materia prima, el uso eficiente de enzimas, el mínimo consumo de materias primas y sustancias auxiliares y un producto de alta pureza. Los sub-productos, por ejemplo cadenas de polímero no degradadas del material de partida (celulosa, almidón, etc.) deben suprimirse o incluso evitarse por completo.

En consecuencia, un objeto de la invención es proporcionar un procedimiento para la preparación de glucósidos a partir de otros glucósidos que tenga ventajas en relación a los procesos de la técnica anterior.

- 30 El procedimiento según la invención es el de hacer un uso óptimo, cuando sea posible, de los eductos empleados con respecto a su valor intrínseco y lograr un alto rendimiento espacio-tiempo. Así, se puede conseguir una alta estabilidad a largo plazo de las enzimas. Cuando se utilizan oligosacáridos que comprenden unidades sacárido estructurales de diferentes valores intrínsecos como eductos, cuando sea posible solamente las unidades sacárido estructurales de menor valor intrínseco se van a utilizar para la síntesis adicional y se van a hacer reaccionar adicionalmente para dar productos de mayor valor intrínseco en el procedimiento según la invención; por otra parte, las unidades sacárido estructurales de mayor valor intrínseco se utilizan por separado como coproductos.

Además, el proceso según la invención proporciona productos de forma tal que pueden emplearse como tales en la industria de los productos alimenticios, es decir, en particular sin más etapas de desarrollo. Las impurezas, por ejemplo debidas a productos secundarios o eductos no reaccionados oligoméricos se deben evitar en lo posible.

- 5 El objetivo se consigue mediante la materia objeto de las reivindicaciones de la patente.

Un primer aspecto de la invención se refiere a un procedimiento enzimático para la preparación de un producto y de un coproducto glucósido a partir de un educto glucósido, donde el proceso comprende las siguientes etapas:

- 10 a) proporcionar una primera composición de educto que comprende una fosforilasa del educto glucósido, el educto glucósido y fosfato;
- b) hacer reaccionar al menos una parte del educto glucósido contenido en la primera composición de educto con al menos una parte del fosfato contenido en la primera composición de educto, con catálisis mediante la fosforilasa del glucósido educto, obteniéndose aquí una primera composición de producto que comprende coproducto y glucosa-1-fosfato;
- 15 c) proporcionar una segunda composición de educto que comprende una fosforilasa del producto glucósido y al menos una parte de la glucosa-1-fosfato obtenida en la etapa (b), donde también se añade un reactivo para la glucosa-1-fosfato, esto es glucosa; y
- d) hacer reaccionar al menos una parte de la glucosa-1-fosfato contenida en la segunda composición de educto con el reactivo añadido para la glucosa-1-fosfato, esto es glucosa, con catálisis mediante la fosforilasa del producto glucósido, obteniéndose una segunda composición de producto que comprende el producto glucósido y fosfato;
- 20 e) (e') opcionalmente, aislar al menos una parte del coproducto; y/o
(e'') opcionalmente, proporcionar una tercera composición de educto que comprende al menos una parte del coproducto obtenido en la etapa (b) (o todavía contenida en la segunda composición de producto obtenida en la etapa (d)) y otra enzima capaz de catalizar la conversión del coproducto a un producto co-convertido;
- 25 hacer reaccionar al menos una parte del coproducto contenido en la tercera composición de educto con catálisis mediante la enzima adicional, obteniéndose una tercera composición de producto que comprende el coproducto convertido; y aislar al menos una parte del coproducto convertido; y
- 30 f) opcionalmente, aislar al menos una parte de producto glucósido; y
- g) opcionalmente, separar el fosfato obtenido en la etapa (d) y opcionalmente devolverlo a la etapa (a).

- Sorprendentemente, se ha encontrado que el procedimiento según la invención tiene una serie de ventajas en comparación con los procesos convencionales. Por ejemplo, con el procedimiento según la invención, el producto glucósido, esto es celobiosa, se puede obtener en forma de un sólido con propiedades definidas
- 35 (cristalinidad, color, pureza, contenido en agua, etc.), donde las partículas sólidas individuales tener un tamaño de grano relativamente grande, ya son incoloras incluso sin un paso de decoloración y se distinguen por una pureza particularmente alta. Además, el proceso según la invención proporciona un rendimiento mejorado en relación al educto glucósido utilizado, para el glucósido producto y para el coproducto y, así, evita la formación de productos secundarios no deseados, por ejemplo oligómeros, que se forman en los procesos
- 40 convencionales cuando se obtiene celobiosa a partir de celulosa o almidón. El contenido de glucosa-1-fosfato (educto) no reaccionado y opcionalmente el contenido del reactivo para la glucosa-1-fosfato no reaccionado también es bajo en el procedimiento según la invención.

- Además, se ha encontrado sorprendentemente que la velocidad de reacción del procedimiento enzimático según la invención es mucho mayor que la de los procesos de acuerdo con la técnica anterior, en particular
- 45 que la del proceso según la EP-A 423 768. El proceso de acuerdo con la invención permite una conversión de hasta el 70% del educto glucósido, esto es sacarosa, en 24 h, mientras que según la EP-A 423 768 se necesitan unas 100 h y en 24 h sólo puede conseguirse aproximadamente un 50% de conversión.

- Además, sorprendentemente se ha encontrado que las reacciones (b) y (d) pueden llevarse a cabo en una única fase acuosa esencialmente libre de disolventes orgánicos y esencialmente consistente en los eductos,
- 50 los productos y agua. El fosfato actúa como tampón y no es necesario un tampón adicional.

- Aún más, sorprendentemente se ha encontrado que el educto glucósido puede proporcionarse en una alta concentración, de al menos 200 mM, preferiblemente de aproximadamente 750 mM, y que el producto glucósido se puede obtener a una alta concentración de al menos 150 mM, preferentemente de aproximadamente 250 mM. En lo que se refiere al producto glucósido celobiosa, se ha encontrado
- 55 sorprendentemente que, a pesar de su límite de solubilidad de 111 g/l, a 15°C no precipita a partir de la segunda composición producto.

Además, se ha encontrado sorprendentemente que la fosforilasa del educto glucósido, la fosforilasa del glucósido producto, y, las enzimas adicionales, si las hay, se pueden emplear varias veces (esto es reciclase), por ejemplo llevando a cabo las etapas (b) y (d) en uno o más reactores de membrana, y que dichas enzimas no necesitan estar inmovilizadas en soportes dispuestos en recipientes de reacción separados (reactores).

5 Además, no hay ningún requisito para la inactivación de dichas enzimas después de la reacción.

Por otra parte, se ha encontrado sorprendentemente que las etapas (b) y (d), y opcionalmente las conversiones enzimáticas adicionales, si las hay, pueden llevarse a cabo en un único reactor (reactor común), de forma que el fosfato liberado en la etapa (d) se consume simultáneamente en la etapa (b), manteniéndose así la concentración total de fosfato baja en dicho único reactor.

10 La síntesis del producto glucósido a partir del educto glucósido tiene lugar vía el producto intermedio glucosa-1-fosfato. La glucosa-1-fosfato y el coproducto se forman primero a partir del educto glucósido y a partir del fosfato mediante una fosforilasa del educto glucósido. empleando una sacarosa-fosforilasa y sacarosa como glucósido educto es posible obtener, por ejemplo, el monosacárido fructosa como coproducto. Se ha encontrado que, sorprendentemente, el procedimiento según la invención permite obtener el coproducto

15 fructosa de forma eficiente. La fructosa es un monosacárido que se utiliza en la producción de refrescos y confitería y que se distingue por un bajo índice glucémico a pesar de su alto contenido energético y su buena solubilidad en agua.

Por medio de una segunda fosforilasa, la glucosa 1-fosfato es entonces transferida a un reactivo para la glucosa-1-fosfato como cosustrato. El cosustrato puede ser, por ejemplo, un monosacárido, un disacárido u otro oligosacárido. empleando una celobiosa-fosforilasa y glucosa como cosustrato, se puede obtener el

20 disacárido celobiosa, por ejemplo el producto glucósido.

En el procedimiento según la invención, primero se consume fosfato y luego se libera de nuevo. El procedimiento según la invención permite y preferiblemente comprende la recuperación del fosfato, lo que constituye una ventaja adicional y particular del procedimiento.

25 El procedimiento según la invención puede llevarse a cabo en una sola etapa, como un proceso en un solo recipiente, y/o en dos etapas, como un proceso de uno o más recipientes. En este contexto, en una etapa significa que las etapas (b) y (d) del procedimiento según la invención se llevan a cabo simultáneamente. Correspondientemente, en dos etapas significa que las etapas (b) y (d) del procedimiento según la invención se llevan a cabo de forma sucesiva en el tiempo. El experto en la técnica apreciará que también son posibles

30 formas mixtas con concurrencia parcial.

En una realización preferente, el educto glucósido se dosifica durante el proceso como un lote de alimentación. Esto es particularmente preferente cuando la fosforilasa del educto glucósido y/o la fosforilasa del producto glucósido es inhibida por la presencia de una concentración del educto glucósido demasiado alta. Dosificando el educto glucósido como un lote de alimentación puede mantenerse baja la concentración del educto glucósido

35 y así puede suprimirse la inhibición, a la vez que se proporciona suficiente educto glucósido para la síntesis.

Las figuras 1 y 2 muestran esquemáticamente una realización particularmente preferida del procedimiento según la invención. Aquí, la sacarosa se hace reaccionar como educto glucósido en presencia de fosfato, con catálisis mediante la sacarosa-fosforilasa, para formar glucosa-1-fosfato y fructosa como coproducto. La

40 fosfato-1-glucosa se hace reaccionar entonces en presencia de glucosa como reactivo para la glucosa-1-fosfato, con catálisis por la celobiosa-fosforilasa, para formar celobiosa, con liberación del fosfato. De esta manera, a partir de sacarosa y glucosa como materiales de partida se obtiene celobiosa y fructosa como productos.

La figura 3 muestra una variante de la forma de realización mostrada en la figura 2 donde el reactivo para la glucosa-1-fosfato no es glucosa sino celobiosa y donde la fosforilasa del producto glucósido es celotriosa-fosforilasa para formar celotriosa. Así, a partir de sacarosa y celobiosa como materiales de partida se obtiene

45 celotriosa y fructosa como productos.

La figura 4 muestra una variante de la realización mostrada en las figuras 2 y 3, donde la celobiosa que se obtiene como producto glucósido de acuerdo con la forma de realización de la figura 2 se hace reaccionar además con glucosa-1-fosfato. De esta manera a partir de sacarosa y glucosa como materiales de partida se

50 obtiene celotriosa y fructosa como productos.

Las figuras 5 y 6 muestran esquemáticamente formas de realización del procedimiento en forma de diagramas de flujo. La figura 5 muestra el procedimiento según la invención como un proceso en un solo recipiente, donde los pasos (b) y (d) se llevan a cabo en el mismo reactor. La figura 6 muestra un proceso de referencia como un

proceso de dos recipientes donde los pasos (b) y (d) se llevan a cabo separados espacialmente uno de otro en diferentes reactores.

Las etapas (a) y (b) del procedimiento según la invención, por un lado, y las etapas (c) y (d) del procedimiento de acuerdo con la invención se llevan a cabo típicamente de forma sucesiva en el tiempo. En una realización preferente del procedimiento según la invención, las etapas (c) y (d) se llevan a cabo en el tiempo después de las etapas (a) y (b), de manera que las etapas (a) a (d) se desarrollan en orden alfabético. Sin embargo, también es posible según la invención que una o más de las etapas de reacción se inicie antes de que la etapa de reacción previa comenzada haya finalizado por completo. El experto en la técnica apreciará que, en particular en caso de un procedimiento continuo preferiblemente, las etapas pueden llevarse a cabo simultáneamente.

10 Preferiblemente, el procedimiento según la invención se lleva a cabo como un proceso en continuo. Preferiblemente, las etapas (b) y (d) se llevan a cabo en una única fase acuosa que esencialmente no contiene disolventes orgánicos.

La etapa (e) y la etapa opcional (f) del procedimiento según la invención pueden llevarse a cabo en cualquier orden deseado o también simultáneamente. La etapa (e) del procedimiento según la invención se lleva a cabo preferiblemente después de la etapa opcional (b) o después de la etapa (d), llevándose a cabo la etapa opcional (f) del procedimiento según la invención preferiblemente después de la etapa (d).

Las etapas (a) a (e) y la etapa opcional (f) no tienen que seguirse una a la otra directamente. En consecuencia, según la invención es posible, e incluso puede ser preferible, que las otras etapas adicionales se lleven a cabo entre las etapas individuales, difiriendo las etapas adicionales en términos de medida de las medidas de acuerdo con las etapas (a) a (e) y la etapa opcional (f).

El procedimiento de acuerdo con la invención es un proceso enzimático, esto es tiene lugar con catálisis enzimática. Las enzimas utilizadas son una fosforilasa del educto glucósido en la etapa (b) y una fosforilasa del producto glucósido en la etapa (d). Preferiblemente se trata de dos enzimas diferentes.

La fosforilasa del educto glucósido es una sacarosa-fosforilasa. Preferiblemente, la sacarosa-fosforilasa es la sacarosa-fosforilasa de tipo salvaje de una bacteria que pertenece al filo *Actinobacteria*, o una sacarosa-fosforilasa que difiere de dicho tipo salvaje pero que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de homología (identidad) con la sacarosa-fosforilasa de tipo salvaje de una bacteria que pertenece al filo *Actinobacteria*. Preferiblemente, la bacteria pertenece a la clase *Actinobacteria*, más preferiblemente a la subclase *Actinobacteridae*, aún más preferiblemente al orden de las *Bifidobacteriales*, aún más preferiblemente a la familia de las *Bifidobacteriaceae*, incluso más preferiblemente al género *Bifidobacterium* y con total preferencia es *Bifidobacterium adolescentis*.

Para los fines de la especificación, la homología preferentemente se calcula como la identidad utilizando BLASTP (Stephen F. Altschul, Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller y David J. Lipman (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res 25: 3389-3402; Stephen F. Altschul, John C. Wootton, Michael E. Gertz, Richa Agarwala, Aleksandr Morgulis. , Alejandro A. Schaffer y Yi-Kuo Yu ""Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices." (2005) FEBS J. 272: 5101 a 5.109), preferiblemente utilizando la versión BLASTP 2.2.29+ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), preferentemente empleando los siguientes ajustes:

- 40 – campo "Enter Query Sequence": Query subrange: ninguno;
- campo "Choose Search Set": Database: secuencias de proteínas no redundantes (nr); parámetros opcionales: ninguno;
- campo "Program Selection": Algoritmo: blastp (BLAST proteína-proteína);
- 45 – parámetros de algoritmo: campo "General parameters": secuencias diana max: 100; entradas cortas: ajusta automáticamente los parámetros de entrada de las secuencias cortas; umbral esperado: 10; tamaño de palabra: 3; coincidencia max en un rango de consulta: 0;
- parámetros de algoritmo: campo "Scoring parameters": Matriz: BLOSUM62; Costes gap: Existencia: 11 Extensión: 1; ajustes en la composición: ajuste de la matriz de composición puntuación condicional; y l
- 50 – parámetros de algoritmo: campo "Filters and Masking": Filtro: ninguno; Máscara: ninguno.

La SEQ ID NO: 1 de la lista de secuencias es la secuencia de aminoácidos de la sacarosa-fosforilasa de tipo salvaje de *Bifidobacterium adolescentis*. La SEQ ID NO: 2 del listado de secuencias es la secuencia de aminoácidos de la celobiosa-fosforilasa de tipo salvaje de *Cellulomonas uda*. La SEQ ID NO: 3 del listado de secuencias es la secuencia de aminoácidos de una enzima de ingeniería derivada y difiere así de la celobiosa-fosforilasa de tipo salvaje de *Cellulomonas uda*.

- En realizaciones preferentes, cuando la sacarosa-fosforilasa difiere de la de tipo salvaje pero tiene al menos un 80% de homología (identidad) en comparación con la sacarosa-fosforilasa de tipo salvaje, preferiblemente de *Bifidobacterium adolescentis* de SEQ ID NO: 1, la identidad es preferiblemente de al menos un 81%, o al menos un 82%, o al menos 83%, o al menos 84%, o al menos 85%, o al menos 86%, o al menos 87%, o al menos 88%, o al menos 89 %, o al menos 90%, o al menos 91%, o al menos 92%, o al menos 93%, o al menos 94%, o al menos 95%, o al menos 96%, o al menos 97%, o al menos 98%, o al menos un 99%.
- La fosforilasa del producto glucósido es una celobiosa-fosforilasa. Preferentemente, la celobiosa-fosforilasa es la celobiosa-fosforilasa de tipo salvaje de una bacteria que pertenece al filo *Actinobacteria*, o una celobiosa-fosforilasa que difiere de dicho tipo salvaje pero que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos una identidad del 80% en comparación con la celobiosa-fosforilasa de tipo salvaje de una bacteria que pertenece al filo *Actinobacteria*. Preferiblemente, la bacteria pertenece a la clase *Actinobacteria*, más preferiblemente al orden *Actinomycetales*, aún más preferiblemente al suborden *Micrococcineae*, aún más preferiblemente a la familia *Cellulomonadaceae*, incluso más preferiblemente al género *Cellulomonas* y con total preferencia es *Cellulomonas uda*.
- En realizaciones preferidas, cuando la celobiosa-fosforilasa difiere de la del tipo salvaje pero tiene al menos un 80% de homología (identidad) en comparación con la celobiosa-fosforilasa de tipo salvaje, preferiblemente de *Cellulomonas uda* de SEQ ID NO: 2, la identidad es preferiblemente de al menos un 81%, o al menos un 82%, o al menos 83%, o al menos 84%, o al menos 85%, o al menos 86%, o al menos 87%, o al menos 88%, o al menos 89 %, o al menos 90%, o al menos 91%, o al menos 92%, o al menos 93%, o al menos 94%, o al menos 95%, o al menos 96%, o al menos 97%, o al menos 98%, o al menos un 99%.
- En realizaciones preferidas, cuando la celobiosa-fosforilasa difiere de la de tipo salvaje pero tiene una identidad de al menos un 80% en comparación con la celobiosa-fosforilasa de tipo salvaje, preferentemente con la enzima obtenida por ingeniería derivada de la celobiosa-fosforilasa de *Cellulomonas uda* de SEQ ID NO: 3, la identidad es preferiblemente de al menos un 81%, o al menos un 82%, o al menos 83%, o al menos 84%, o al menos 85%, o al menos 86%, o al menos 87%, o al menos 88 %, o al menos 89%, o al menos 90%, o al menos 91%, o al menos 92%, o al menos 93%, o al menos 94%, o al menos 95%, o al menos 96%, o al menos 97%, o al menos 98%, o al menos un 99%.
- El procedimiento según la invención es un proceso de preparación. Se preparan al menos dos productos de reacción y se obtiene un producto intermedio de forma intermedia. El primer producto de reacción es el coproducto obtenido en la etapa (b), que, de acuerdo con la invención, preferiblemente no reacciona más sino que es aislado como producto en la etapa (e). El producto intermedio es la glucosa-1-fosfato obtenida en la etapa (b), al menos una parte de la cual se hace reaccionar además en la etapa (d). El segundo producto de reacción es el producto glucósido obtenido en la etapa (d), que, de acuerdo con la invención, preferiblemente no reacciona adicionalmente, sino que es aislado como el producto en la etapa opcional (f).
- "Sacáridos" en el sentido de la invención son hidratos de carbono, en particular cualquier compuesto polihidroxicarbonilo de cadena abierta o cíclico monomérico, oligomérico o polimérico. El término "sacárido" en el sentido de la invención incluye en particular monosacáridos, disacáridos, trisacáridos y otros oligosacáridos. Según la invención, el término "oligosacárido" incluye disacáridos, trisacáridos y sacáridos de cadena más larga. Si, en lo que sigue, no se menciona expresamente la forma D- o L-, de acuerdo con la invención es preferible en cada caso la forma D.
- "Glicósido" en el sentido de la invención es cualquier sacárido que tiene un enlace glicosídico en su átomo de carbono anomérico enlazado a un átomo de carbono, nitrógeno, oxígeno o azufre de una aglicona o de otro sacárido. Si el enlace glicosídico del átomo de carbono anomérico une un sacárido al átomo de oxígeno de otro sacárido, el glicósido es en sí mismo un oligosacárido. A este respecto, el término glicósido en el sentido de la invención incluye cualquier oligosacárido.
- "Glucósido" en el sentido de la invención es un glicósido derivado de glucosa, en particular cualquier unidad de glucosa, en forma monomérica o como un constituyente de un oligosacárido, que tiene un enlace glicosídico en su átomo de carbono anomérico enlazado a un átomo de carbono, nitrógeno, oxígeno o azufre de una aglicona o de otro sacárido.
- "Educto glucósido" en el sentido de la invención es el material de partida (sustrato) usado en la etapa (b) del proceso según la invención, cuyo enlace glicosídico se rompe con la catálisis enzimática con fosfato (cosustrato) para formar glucosa-1-fosfato y el coproducto. Si el educto glucósido es sacarosa, es decir beta-D-fructofuranosil-alfa-D-glucopiranosido, y la reacción en la etapa (b) se lleva a cabo con catálisis con sacarosa-fosforilasa, se obtiene fructosa como coproducto .

- 5 "Producto glucósido" en el sentido de la invención es el producto obtenido en la etapa (d) del procedimiento según la invención, cuyo enlace glicosídico se forma por catálisis enzimática mediante la reacción de glucosa-1-fosfato (sustrato) y opcionalmente un reactivo (cosustrato) con la liberación de fosfato. Si el reactivo es glucosa y si la reacción en el paso (d) se lleva a cabo con catálisis con celobiosa-fosforilasa, se obtiene celobiosa, es decir 4-O(beta-D-glucopiranosil) -D-glucopiranos, como producto glucósido.
- "Coprodueto" en el sentido de la invención es el producto obtenido en la etapa (b) del procedimiento según la invención, obteniéndose tal producto junto con glucosa-1-fosfato por la ruptura del enlace glicosídico del educto glucósido con catálisis por la fosforilasa del educto glucósido.
- 10 "Fosforilasa del educto glucósido" en el sentido de la invención es la enzima que se utiliza en la etapa (b) del procedimiento según la invención para la escisión catalizada enzimáticamente de un enlace glicosídico del educto glucósido con fosfato como cosustrato para obtener glucosa-1-fosfato y el coprodueto. Si el educto glucósido es sacarosa, se utiliza una sacarosa-fosforilasa, es decir una enzima que cataliza esta ruptura del enlace glicosídico, como fosforilasa del educto glucósido.
- 15 "Fosforilasa del producto glucósido" en el sentido de la invención es la enzima que se utiliza en la etapa (d) del procedimiento según la invención para la formación catalizada enzimáticamente de un enlace glicosídico entre la glucosa-1-fosfato y otra molécula de glucosa-1-fosfato u opcionalmente el reactivo para la glucosa-1-fosfato. Si el producto glucósido es celobiosa, se utiliza una celobiosa-fosforilasa, es decir una enzima que cataliza esta formación del enlace glicosídico, como la fosforilasa del producto glucósido.
- 20 "Reacción" en el sentido de la invención incluye cualquier tipo de procedimiento de reacción adecuado para permitir la reacción catalizada enzimáticamente a llevarse a cabo. En el caso más sencillo, todas las condiciones que se requieren para la reacción catalizada enzimáticamente ya están establecidos con la provisión de la primera o segunda composición de educto. Sin embargo, también es posible según la invención que, después de la provisión de la primera o segunda composición de educto, la reacción deba iniciarse con medidas particulares, por ejemplo modificando la temperatura, el pH, por la adición de otros componentes, tales como, por ejemplo, sales.
- 25 "Glucosa-1-fosfato" en el sentido de la invención es preferiblemente alfa-D-glucosa-1-fosfato.
- "Reactivo para la glucosa-1-fosfato" (reactivo) en el sentido de la invención es cualquier sustancia que, con catálisis por una fosforilasa de producto glucósido adecuada, es capaz de formar un enlace glicosídico con la glucosa-1-fosfato, liberando el fosfato. Si el reactivo para la glucosa-1-fosfato es glucosa y si se emplea una celobiosa-fosforilasa como la fosforilasa del producto glucósido, se forma celobiosa como producto glucósido a partir de glucosa-1-fosfato y el reactivo para la glucosa-1-fosfato con la liberación de fosfato.
- 30 "Fosfato" en el sentido de la invención es preferiblemente ortofosfato e incluye todas las formas parcial o totalmente protonadas del ion PO_4^{3-} (H_3PO_4 , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}), así como sales fosfato, en particular con cationes seleccionados de NH_4^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} .
- 35 "Aislamiento" en el sentido de la invención incluye cualquier método adecuado para separar un componente de una mezcla de una pluralidad de componentes, siendo separado el componente separado preferiblemente con la mayor pureza posible. Sin embargo, algunas impurezas no pueden ser descartadas por completo por razones termodinámicas, no menos importantes.
- 40 El término "esencialmente" en relación con la definición del contenido de constituyentes (por ejemplo, "que consiste esencialmente en" o "que no contiene esencialmente") significa preferiblemente un contenido de otro constituyente, esto es no especificado, de no más de un 2,5% en peso, más preferiblemente no más de un 1,0% en peso, con especial preferencia no más de un 0,5% en peso y en particular no más de un 0,1% en peso.
- 45 En la etapa (a) del procedimiento según la invención, se proporciona una primera composición de educto que comprende una fosforilasa del educto glucósido, el educto glucósido y fosfato.
- La primera composición de educto es preferiblemente una solución acuosa donde el contenido de iones, el pH, la temperatura, la concentración de la fosforilasa del educto glucósido, la concentración del educto glucósido, la concentración de fosfato, etc. preferiblemente están ajustadas de forma que las condiciones son adecuadas para la reacción en la etapa (b). Las condiciones adecuadas son conocidas para el experto en la técnica y se pueden optimizar mediante experimentos rutinarios simples.
- 50 El educto glucósido puede ser, en principio, cualquier oligosacárido deseado que comprenda al menos una unidad glucosa enlazada con enlace glicosídico. El educto glucósido es un disacárido, esto es sacarosa.

La sacarosa tiene una solubilidad excelente particularmente en las soluciones acuosas relevantes para los procesos enzimáticos, siendo la solubilidad muy superior a la del almidón y la celulosa. Además, las fosforilasas que escinden la sacarosa con una selectividad cercana a 1 y, por tanto, sin formación apreciable de productos secundarios, son capaces de formar glucosa-1-fosfato y el coproducto fructosa con la incorporación de una sustancia auxiliar.

La sacarosa utilizada como educto glucósido puede ser de origen natural o químico. También es posible el uso de una solución que comprende sacarosa, tales como zumo crudo, zumo o melaza concentrado.

El educto glucósido, esto es sacarosa, se proporciona en la primera composición de educto en una concentración de preferiblemente 0,10 mol/l a 5,00 mol/l, más preferiblemente de 0,20 a 4,00 mol/l, aún más preferiblemente de 0,40 a 3,00 mol/l, con especial preferencia de 0,50 a 2,00 mol/l, con especial preferencia de 0,60 a 1,50 mol/l y en particular de 0,70 a 1,00 mol/l, y se alimenta en esta concentración en la etapa (b) del proceso según la invención. Preferentemente, la concentración del educto glucósido en la primera composición de educto proporcionado en la etapa (a) es al menos 0,150 mol/l, más preferiblemente al menos 0,200 mol/l, todavía más preferiblemente al menos 0,300 mol/l, aún más preferiblemente al menos 0,400 mol/l, incluso más preferiblemente al menos 0,500 mol/l, con especial preferencia al menos 0,600 mol/l y en particular al menos 0,700 mol/l.

En una realización preferente, el educto glucósido se suministra continuamente como alimentación por lotes, de modo que no se permite que la concentración del educto glucósido no llegue a ser demasiado alta.

El fosfato se proporciona preferiblemente en la etapa (a) del procedimiento según la invención en una forma tal que es capaz de reaccionar en la ruptura, catalizada por la fosforilasa del educto glucósido, del enlace glicosídico del educto glucósido y en la formación de la glucosa-1-fosfato de la etapa (b) del proceso según la invención.

Para ello, el fosfato preferiblemente está en forma de ortofosfato y puede estar presente en forma de una sal fosfato o en forma de ácido fosfórico o como una mezcla de los mismos. La fuente de fosfato es preferiblemente ácido fosfórico (H_3PO_4), hidrogenofosfato disódico (Na_2HPO_4), dihidrogenofosfato de sodio (NaH_2PO_4), hidrogenofosfato dipotásico (K_2HPO_4) y/o dihidrogenofosfato de potasio (KH_2PO_4).

El fosfato se proporciona en la primera composición de educto en una concentración de preferiblemente desde 0,00001 a 3,00 mol/l o de 0,01 a 3,00 mol/l, más preferiblemente de 0,10 mol/l a 3,00 mol/l, aún más preferiblemente de 0,50 a 2,50 mol/l, todavía más preferiblemente de 0,60 a 2,00 mol/l, con especial preferencia de 0,65 a 1,50 mol/l, con particular preferencia de 0,70 a 1,20 mol/l y en particular de 0,75 mol/l, y se alimenta en dicha concentración en la etapa (b) del procedimiento según la invención. En una realización preferente, el fosfato se proporciona en la primera composición de educto en una concentración de preferentemente como máximo 3,00 mol/l, más preferiblemente de como máximo 1,00 mol/l, todavía más preferiblemente como máximo 0,50 mol/l, todavía más preferiblemente como máximo 0,10 mol/l, con especial preferencia como máximo 0,01 mol/l, más preferiblemente como máximo 0,001 mol/l y en particular como máximo 0,00001 mol/l.

En principio, el coproducto puede ser también cualquier oligosacárido deseado que se acorta en al menos una unidad sacárido en comparación con el educto glucósido mediante la formación de glucosa-1-fosfato. El coproducto es un monosacárido, esto es una cetohexosa, es decir fructosa.

La fosforilasa del educto glucósido se selecciona de acuerdo con la invención de forma que cataliza la ruptura de un enlace glicosídico del educto glucósido con fosfato como cosustrato, con formación de glucosa-1-fosfato y el coproducto.

La fosforilasa del educto glucósido es una disacárido-fosforilasa (EC 2.4.1).

La fosforilasa del educto glucósido es una sacarosa-fosforilasa (EC 2.4.1.7, sacarosa: fosfato de alfa-D-glucosiltransferasa), preferiblemente una sacarosa-fosforilasa de *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium longum*, *Pelomonas saccharophila*, *Streptococcus mutans*, *Pseudobutyrvibrio ruminis*, *Shewanella putrefaciens* o *Leuconostoc mesenteroides*.

Las formas inventivas A^1 y las formas de referencia A^2 a A^3 para el educto glucósido, la fosforilasa del educto glucósido y el coproducto obtenido en cada caso se resumen en la siguiente tabla:

	Educto glucósido	Fosforilasa del educto glucósido	Coproducto
A^1	Sacarosa	Sacarosa-fosforilasa	Fructosa
A^2	Maltosa	Maltosa-fosforilasa	Glucosa
A^3	Lactosa	Lactosa-fosforilasa	Galactosa

La actividad de síntesis de la fosforilasa del educto glucósido preferiblemente está en el intervalo de 0,1 a 25 U/ml, más preferiblemente de 1 a 10 U/ml, aún más preferiblemente de 2 a 8 U/ml, con especial preferencia de 3 a 7 U/ml, más preferiblemente de 4 a 6 U/ml y en particular 5 U/ml.

- 5 La actividad de síntesis de la fosforilasa del educto glucósido preferiblemente está en el intervalo de 0,1 a 25 U glucósido/mmol educto, más preferiblemente de 0,25 a 20 U/mmol de glucósido educto, aún más preferiblemente de 0,5 a 15 U/mmol de glucósido educto, con especial preferencia 0,75 a 10 U/mmol de glucósido educto, con mayor preferencia de 1 a 8 U/mmol de glucósido educto y en particular de 5 U/mmol de glucósido educto.

- 10 La fosforilasa del educto glucósido se puede utilizar como enzima libre en un reactor de vaso agitado, una cascada de vaso agitado o un reactor tubular, o como una enzima inmovilizada en un reactor de vaso agitado, tubular o de lecho fijo, en un proceso en un lote, en lotes repetitivos o en continuo. En una realización preferente, la enzima se separa de la corriente de producto por ultrafiltración después de la reacción.

- 15 En la etapa (b) del procedimiento según la invención, al menos una parte del educto glucósido contenido en la primera composición de educto se hace reaccionar con al menos una parte del fosfato contenido en la primera composición de educto con catálisis con la fosforilasa del educto glucósido, obteniéndose así una primera composición de producto que comprende coproducto y glucosa-1-fosfato.

La reacción enzimática con catálisis con la fosforilasa del educto glucósido, esto es sacarosa-fosforilasa, tiene lugar preferentemente en un rango de temperatura de 15°C a 70°C, más preferiblemente de 20°C a 60°C, con mayor preferencia de 25°C a 50°C, con especial preferencia de 25°C a 40°C y más preferiblemente a 30°C.

- 20 La reacción enzimática con catálisis con la fosforilasa del educto glucósido, esto es sacarosa-fosforilasa, preferentemente se produce a un valor pH de 5 a 8, más preferiblemente de pH 6 a pH 7 y con particular preferencia a pH 6,3 o 6,5.

- 25 La concentración del coproducto y la concentración de la glucosa-1-fosfato en la primera composición producto no están limitados de acuerdo con la invención y pueden ser modificadas por el experto en la técnica, opcionalmente mediante separación selectiva, continua o discontinua, del coproducto y de la glucosa-1-fosfato.

En una realización preferente, la primera composición producto se alimenta en la etapa (c) del procedimiento según la invención como un producto intermedio, sin más elaboración.

Si las etapas (b) y (d) del procedimiento según la invención se llevan a cabo en reactores separados, puede determinarse la concentración de glucosa-1-fosfato y coproducto en la primera composición producto.

- 30 La concentración de glucosa-1-fosfato en la primera composición producto preferiblemente es de 0,10 mol/l a 2,00 mol/l, más preferiblemente de 0,2 a 1,30 mol/l, todavía más preferiblemente de 0,4 a 1,1 mol/l, con particular preferencia de 0,5 a 1,0 mol/l, con mayor preferencia de 0,6 a 0,9 mol/l y en particular de 0,7 a 0,8 mol/l. Preferentemente, la glucosa-1-fosfato se alimenta en esta concentración en la etapa (d) del procedimiento según la invención.

- 35 Preferentemente, la concentración del coproducto en la primera composición producto es de 0,10 mol/l a 5,00 mol/l, más preferiblemente de 0,2 a 4,00 mol/l, todavía más preferiblemente de 0,4 a 3,00 mol/l, con particular preferencia de 0,5 a 2,00 mol/l, más preferiblemente de 0,6 a 1,5 mol/l y en particular de 0,7 a 1,0 mol/l.

En una realización preferente, la etapa (b) del procedimiento según la invención comprende además la etapa subsidiaria

- 40 (b') separación de al menos una parte de la glucosa-1-fosfato resultante, preferentemente durante la reacción del educto glucósido para formar glucosa-1-fosfato.

Esta forma de realización es particularmente preferente cuando los pasos (b) y (d) del procedimiento se llevan a cabo en reactores diferentes.

- 45 En una realización preferente, la glucosa-1-fosfato se separa por electrodiálisis y/o cristalización. Preferiblemente, la glucosa-1-fosfato se separa por electrodiálisis y se purifica posteriormente por cristalización.

Cuando las etapas (b) y (d) del procedimiento según la invención se llevan a cabo en el mismo reactor, preferentemente al menos una parte de la glucosa-1-fosfato resultante no se separa.

En una realización preferente del procedimiento donde los pasos (b) y (d) del procedimiento según la invención se llevan a cabo en el mismo reactor, la etapa (d) del procedimiento según la invención comprende adicionalmente la etapa subsidiaria

- 5 (d') separación de al menos una parte de la glucosa-1-fosfato resultante, preferiblemente después de la reacción de la glucosa-1-fosfato y el reactivo opcional para dar el producto glucósido.

En la etapa (c) del procedimiento según la invención, se proporciona una segunda composición educto que comprende una fosforilasa del producto glucósido y al menos una parte de la glucosa-1-fosfato obtenida en la etapa (b).

- 10 Preferentemente, la segunda composición educto se proporciona en la forma de la primera composición producto de la etapa (b).

La segunda composición educto proporcionada en la etapa (c) del procedimiento según la invención comprende además un reactivo para la glucosa-1-fosfato, que se hace reaccionar entonces con la glucosa-1-fosfato en la etapa (d), con catálisis por la fosforilasa del producto glucósido, para formar el producto glucósido.

- 15 La segunda composición educto preferentemente es una solución acuosa donde el contenido de iones, el valor pH, la temperatura, la concentración de la fosforilasa del producto glucósido, la concentración de la glucosa-1-fosfato, opcionalmente la concentración del reactivo para la glucosa 1-fosfato, etc. preferiblemente se ajustan de forma que las condiciones son adecuadas para la reacción de la etapa (d). Las condiciones adecuadas son conocidas por el experto en la técnica y se pueden optimizar mediante sencillos experimentos rutinarios.

- 20 En la etapa (c) del procedimiento según la invención, la glucosa-1-fosfato y/o el reactivo para la glucosa-1-fosfato preferentemente se añaden a la segunda composición educto independientemente uno de otro, juntos o por separado, de forma continua o por etapas.

En principio, el reactivo para la glucosa-1-fosfato puede ser cualquier sustancia deseada que tenga al menos un grupo funcional nucleofílico adecuado para reaccionar con la glucosa-1-fosfato en la etapa (d) con catálisis enzimática por la fosforilasa del producto. Reactivos adecuados son conocidos del experto en la técnica.

- 25 El reactivo para la glucosa-1-fosfato preferiblemente es diferente del coproducto.

En una realización de referencia, el reactivo es un alcohol, con particular preferencia glicerol, que forma entonces la aglicona del producto glucósido en la etapa (d).

- 30 El reactivo es un sacárido, esto es una aldohexosa, en particular glucosa. En una realización de referencia, el reactivo es una aldohexosa seleccionada del grupo consistente en alosa, altrosa, glucosa, manosa, gulosa, idosa, galactosa y talosa, en cada caso en la configuración D y/o L. En otra realización de referencia, el reactivo es una cetohexosa seleccionada del grupo consistente en alulosa (psicosa), fructosa, sorbosa y tagatosa, en cada caso en la configuración D y/o L. En aun otra realización de referencia, el reactivo es un nucleótido trifosfato, preferiblemente seleccionado del grupo consistente en UTP, TTP, CTP, ATP y GTP.

- 35 En otra realización de referencia, el reactivo es un disacárido, preferiblemente celobiosa. Cuando la glucosa-1-fosfato se hace reaccionar con celobiosa en la etapa (d) con catálisis enzimática por la celodextrina-fosforilasa (celotriosa-fosforilasa) como fosforilasa del producto, el producto glucósido resultante es celotriosa.

- 40 El reactivo se proporciona en la segunda composición educto en una concentración preferente de 0,01 mol/l a 2,00 mol/l, más preferiblemente de 0,10 a 1,30 mol/l, todavía con mayor preferencia de 0,50 a 1,10 mol/l, con particular preferencia de 0,65 a 0,90 mol/l, con especial preferencia de 0,70 a 0,80 mol/l y en particular de 0,75 mol/l, y se alimenta a esta concentración en la etapa (d) del procedimiento según la invención.

- 45 Se ha encontrado que, sorprendentemente, la preparación de celobiosa y fructosa a partir de sacarosa con un cosustrato que comprende fosfato, con catálisis por la sacarosa-fosforilasa y la celobiosa-fosforilasa, también tiene lugar directamente y sin la adición de un reactivo para la glucosa-1-fosfato como cosustrato, por ejemplo glucosa. Dos moléculas de glucosa-1-fosfato reaccionan entonces para dar celobiosa. Así, en una realización preferente del procedimiento según la invención no se añade más reactivo para la glucosa-1-fosfato además de la glucosa-1-fosfato que se forma.

En principio, el producto glucósido puede ser cualquier glucósido deseado, dependiendo del reactivo para la glucosa-1-fosfato. El producto glucósido es un disacárido, esto es celobiosa.

La fosforilasa del producto glucósido se selecciona según la invención de forma que cataliza la formación de un enlace glicosídico entre (i) la glucosa-1-fosfato con glucosa-1-fosfato o preferentemente (ii) la glucosa-1-fosfato y, opcionalmente, el reactivo para la glucosa-1-fosfato con la liberación de fosfato como cosustrato con formación del producto glucósido.

- 5 La fosforilasa del producto glucósido es una disacárido-fosforilasa (EC 2.4.1).

La fosforilasa del producto glucósido es un celobiosa-fosforilasa (CE 2.4.1.20, celobiosa:fosfato-alfa-D-glucosiltransferasa), preferiblemente un celobiosa-fosforilasa de *Cellvibrio gilvus*, *Ruminococcus albus*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Thermogata maritima*, *Thermogata neapolitana*, *Clostridium thermocellum*, *Fomes annosus*, *Cellulomonas sp.* o *Cellulomonas uda*.

- 10 Las formas inventivas B¹ a B² y las formas de referencia B³ a B³⁰ de los reactivos para la glucosa-1-fosfato (D-glucosa-1-fosfato), la fosforilasa del producto glucósido y el producto glucósido obtenido en cada caso se resumen en la siguiente tabla (el tipo de fosfato liberados también se cita en la columna de la derecha):

	Reactivo	Fosforilasa producto glucósido	Producto glucósido	Fosfato
B ¹	Glucosa-1-fosfato	Celobiosa-fosforilasa	Celobiosa	ortofosfato
B ²	D-Glucosa	Celobiosa-fosforilasa	Celobiosa	ortofosfato
B ³	Glicerol	β -Glucosidasa	Glicerol glucósido	ortofosfato
B ⁴	D-Alosa	D-Glucosil-D-alosido- fosforilasa	D-Glucosil-D-alósido	ortofosfato
B ⁵	L-Alosa	D-Glucosil-L-alosido- fosforilasa	D-Glucosil-L-alósido	ortofosfato
B ⁶	D-Altrosa	D-Glucosil-D-altrosido- fosforilasa	D-Glucosil-D-altrósido	ortofosfato
B ⁷	L-Altrosa	D-Glucosil-L-altrosido- fosforilasa	D-Glucosil-L-altrósido	ortofosfato
B ⁸	L-Glucosa	D-Glucosil-L-glucosido- fosforilasa	D-Glucosil-L-glucósido	ortofosfato
B ⁹	D-Manosa	D-Glucosil-D-manosido- fosforilasa	D-Glucosil-D-manósido	ortofosfato
B ¹⁰	L-Manosa	D-Glucosil-L-manosido- fosforilasa	D-Glucosil-L-manósido	ortofosfato
B ¹¹	D-Gulosa	D-Glucosil-D-gulosido- fosforilasa	D-Glucosil-D-gulósido	ortofosfato
B ¹²	L-Gulosa	D-Glucosil-L-gulosido- fosforilasa	D-Glucosil-L-gulósido	ortofosfato
B ¹³	D-Idosa	D-Glucosil-D-idosido- fosforilasa	D-Glucosil-D-idósido	ortofosfato
B ¹⁴	L-Idosa	D-Glucosil-L-idosido- fosforilasa	D-Glucosil-L-idósido	ortofosfato
B ¹⁵	D-Galactosa	D-Glucosil-D-galactosido- fosforilasa	D-Glucosil-D-galactósido	ortofosfato
B ¹⁶	L-Galactosa	D-Glucosil-L-galactosido- fosforilasa	D-Glucosil-L-galactósido	ortofosfato
B ¹⁷	D-Talosa	D-Glucosil-D-talosido- fosforilasa	D-Glucosil-D-talósido	ortofosfato
B ¹⁸	L-Talosa	D-Glucosil-L-talosido- fosforilasa	D-Glucosil-L-talósido	ortofosfato
B ¹⁹	D-Alulosa	D-Glucosil-D-alulosido- fosforilasa*	D-Glucosil-D-alulósido	ortofosfato
B ²⁰	L-Alulosa	D-Glucosil-L-alulósido fosforilasa*	D-Glucosil-L-alulósido	ortofosfato
B ²¹	L-Fructosa	D-Glucosil-L-fructosido- fosforilasa*	D-Glucosil-L-fructósido	ortofosfato
B ²²	D-Sorbosa	D-Glucosil-D-sorbosido- fosforilasa*	D-Glucosil-D-sorbósido	ortofosfato
B ²³	L-Sorbosa	D-Glucosil-L-sorbosido- fosforilasa*	D-Glucosil-L-sorbósido	ortofosfato
B ²⁴	D-Tagatosa	D-Glucosil-D-tagatosido- fosforilasa*	D-Glucosil-D-tagatósido	ortofosfato
B ²⁴	L-Tagatosa	D-Glucosil-L-tagatósido fosforilasa*	D-Glucosil-L-tagatósido	ortofosfato
B ²⁶	Uridina trifosfato (UTP)	UDP-Glucosa-fosforilasa (Glucosa-1-fosfato uridiltransferasa)	UDP-Glucosa	pirofosfato
B ²⁷	Timidina trifosfato (TTP)	TDP-Glucosa-fosforilasa (Glucosa-1-fosfato timidiltransferasa)	TDP-Glucosa	pirofosfato
B ²⁸	Citidina trifosfato	CDP-Glucosa-fosforilasa (Glucosa-1-fosfato citidiltransferasa)	CDP-Glucosa	pirofosfato
B ²⁹	Adenosina trifosfato (ATP)	ADP-Glucosa-fosforilasa (Glucosa-1-fosfato adenililtransferasa)	ADP-Glucosa	fosfato
B ³⁰	Guanosina trifosfato (GTP)	GDP-Glucosa-fosforilasa (Glucosa-1-fosfato guanililtransferasa)	GDP-Glucosa	pitofosfato
B ³¹	Celobiosa	Celodextrina-fosforilasa	Celotriosa	ortofosfato
B ³²	(Glucosa) _n	B-1,2-oligoglucano-fosforilasa	(β -1,2-glucano) _n	ortofosfato

* Se ha reportado que la sacarosa-fosforilasa de, por ejemplo, *Leuconostoc mesenteroides* tiene esta actividad (véase K. Morimoto et al., J Biosc Bioeng 2015, 119(6), 652-656).

- 15 Preferentemente, la actividad hidrolítica de la fosforilasa del producto glucósido está en el intervalo de 0,1 a 25 U/ml, más preferiblemente de 1 a 10 U/ml, aún más preferiblemente de 2 a 8 U/ml, con particular preferencia de 3 a 7 U/ml, más preferiblemente de 4 a 6 U/ml y en particular 5 U/ml.

La actividad hidrolítica de la fosforilasa del producto glucósido está preferiblemente en el intervalo de 0,01 a 25 U/ml, más preferiblemente de 0,05 a 10 U/ml, aún más preferentemente de 0,1 a 5 U/ml, con particular preferencia de 0,5 a 3 U/ml, más preferiblemente de 0,8 a 2 U/ml y en particular de 1 U/ml.

- 5 La fosforilasa del producto glucósido se puede utilizar como enzima libre en un reactor de recipiente agitado, una cascada de recipientes agitados o un reactor tubular, o como una enzima inmovilizada en un reactor de recipiente agitado, tubular o de lecho fijo, en un lote, en lotes repetitivos o en un proceso en continuo. En una realización preferente, la enzima se separa de la corriente de producto por ultrafiltración después de la reacción.

- 10 En la etapa (d) del procedimiento según la invención, al menos una parte de la glucosa-1-fosfato contenida en la segunda composición educto se hace reaccionar con catálisis con la fosforilasa del producto glucósido, obteniéndose una segunda composición producto que comprende el producto glucósido y fosfato.

La reacción enzimática con catálisis con la fosforilasa del producto glucósido, esto es celobiosa-fosforilasa, tiene lugar en un intervalo de temperatura preferente de 15°C a 70°C, más preferiblemente de 20°C a 60°C, todavía más preferiblemente de 25°C a 55°C, con particular preferencia de 30°C a 50°C y con total preferencia de 30°C a 40°C.

- 15 La reacción enzimática con catálisis con la fosforilasa el producto glucósido, esto es celobiosa-fosforilasa, tiene lugar a un valor de pH preferente de pH 5 a pH 8, más preferiblemente de pH 6 a pH 7 y con especial preferencia a pH 6,3 o 6,5.

- 20 La concentración del producto glucósido y la concentración del fosfato en la segunda composición producto no están limitados de acuerdo con la invención y pueden ser modificadas por el experto en la técnica, opcionalmente por separación selectiva, continua o discontinua del producto glucósido y del fosfato.

La concentración del fosfato en la segunda composición producto es preferiblemente de 0,01 mol/l a 2,00 mol/l, más preferiblemente de 0,10 a 1,50 mol/l, todavía más preferiblemente de 0,40 a 1,10 mol/l, con particular preferencia de 0,50 a 1,0 mol/l, más preferiblemente de 0,60 a 0,90 mol/l y en particular de 0,70 a 0,80 mol/l.

- 25 El fosfato se proporciona en la segunda composición educto en una concentración preferente de 0,00001 a 3,00 mol/l o de 0,01 a 3,00 mol/l, más preferiblemente 0,10 mol/l a 3,00 mol/l, todavía más preferiblemente de 0,50 a 2,50 mol/l, todavía más preferentemente de 0,60 a 2,00 mol/l, con especial preferencia de 0,65 a 1,50 mol/l, con mayor preferencia de 0,70 a 1,20 mol/l y en particular 0,75 mol/l, y se alimenta en esa concentración en la etapa (b) del procedimiento según la invención. En una realización preferente, el fosfato se proporciona en la segunda composición educto a una concentración preferente de como máximo 3,00 mol/l, más preferiblemente como máximo 1,00 mol/l, todavía más preferiblemente como máximo 0,50 mol/l, todavía más preferiblemente como máximo 0,10 mol/l, con especial preferencia como máximo 0,01 mol/l, con especial preferencia como máximo 0,001 mol/l y en particular como máximo 0,00001 mol/l.

- 35 La concentración del producto glucósido, esto es celobiosa, en la segunda composición producto es preferiblemente de 0,10 mol/l a 1,50 mol/l, más preferiblemente de 0,15 a 1,30 mol/l, todavía más preferiblemente de 0,20 a 1,10 mol/l, con particular preferencia de 0,25 a 1,00 mol/l, aún más preferiblemente de 0,30 a 0,90 mol/l y en particular de 0,35 a 0,80 mol/l.

- 40 Sorprendentemente, se ha encontrado que se pueden conseguir concentraciones comparativamente altas del producto glucósido, esto es celobiosa, en la segunda composición producto. Preferentemente, la concentración del producto glucósido, esto es celobiosa, en la segunda composición producto es de al menos 0,050 mol/l o al menos 0,055 mol/l, más preferiblemente al menos 0,060 mol/l o al menos 0,065 mol/l, todavía con más preferencia al menos 0,070 mol/l o al menos 0,075 mol/l, aún con mayor preferencia al menos 0,080 mol/l o al menos 0,085 mol/l, incluso más preferiblemente al menos 0,090 mol/l o al menos 0,095 mol/l, más preferiblemente al menos 0,10 mol/l, al menos 0,15 mol/l, al menos 0,20 mol/l, o al menos 0,30 mol/l, y en particular al menos 0,40 mol/l, al menos 0,50 mol/l o al menos 0,60 mol/l.

- 45 En una realización preferente, el coproducto obtenido en la etapa (b) no se retira hasta después de la etapa (d). La concentración del coproducto en la segunda composición producto es entonces preferiblemente de 0,10 mol/l a 2,00 mol/l, más preferiblemente de 0,20 a 1,30 mol/l, todavía más preferiblemente de 0,40 a 1,10 mol/l, con particular preferencia de 0,50 a 1,00 mol/l, con especial preferencia de 0,60 a 0,90 mol/l y en particular de 0,70 a 0,80 mol/l.

- 50 La concentración residual del educto glucósido en la segunda composición producto es preferiblemente no superior a 0,30 mol/l, más preferiblemente no superior a 0,25 mol/l, todavía más preferiblemente no superior a 0,20 mol/l, con especial preferencia no superior a 0,15 mol/l, más preferiblemente no superior a 0,1 mol/l y en

particular no superior a 0,05 mol/l. En una realización preferente, el educto glucósido ya no se puede detectar por análisis.

5 La concentración residual de glucosa-1-fosfato en la segunda composición producto es preferiblemente no superior a 0,9 mol/l, más preferiblemente no superior a 0,8 mol/l, todavía más preferiblemente no superior a 0,7 mol/l, con especial preferencia no superior a 0,6 mol/l, con particular preferencia no superior a 0,5 mol/l y en particular no superior a 0,4 mol/l.

10 La concentración residual del reactivo para la glucosa-1-fosfato, esto es glucosa, en la segunda composición producto es preferiblemente no superior a 0,9 mol/l, más preferiblemente no superior a 0,8 mol/l, todavía más preferiblemente no superior a 0,7 mol/l, con especial preferencia no superior a 0,6 mol/l, con mayor preferencia no superior a 0,5 mol/l y en particular no superior a 0,4 mol/l.

En una realización preferente del procedimiento según la invención, la etapa (e) comprende la etapa (e'), es decir, aislar al menos una parte del coproducto.

En otra realización preferente del procedimiento según la invención, la etapa (e') comprende la etapa (e''), a saber,

- 15 – proporcionar una tercera composición educto que comprende al menos una parte del coproducto obtenido en la etapa (b) y una enzima adicional capaz de catalizar la conversión del coproducto a un coproducto convertido;
- hacer reaccionar al menos una parte del coproducto contenido en la tercera composición educto con catálisis con la enzima adicional, obteniéndose una tercera composición producto que comprende el
- 20 coproducto convertido; y
- aislar al menos una parte del coproducto convertido;

donde la etapa (e'') preferiblemente no comprende la conversión de fructosa en glucosa y/o donde la enzima adicional no es una glucosa-isomerasa.

25 En una realización preferente, el coproducto convertido no reacciona en la etapa (d) como reactivo para la glucosa-1-fosfato con al menos una parte de la glucosa-1-fosfato contenida en la segunda composición educto con catálisis con la fosforilasa del producto glucósido, donde se obtiene una segunda composición producto que comprende el producto glucósido y fosfato.

30 Aunque es principalmente posible que la etapa (e) comprenda tanto la etapa (e') como la etapa (e''), es preferente que la etapa (e) comprenda o bien la etapa (e'), pero no la etapa (e''), o bien la etapa (e''), pero no la etapa (e').

Cuando el procedimiento según la invención comprende las etapas (a), (b), (c), (d) y (e'), es un proceso para la preparación de un producto glucósido y de un coproducto a partir de un educto glucósido.

35 Sin embargo, cuando el procedimiento según la invención comprende las etapas (a), (b), (c), (d) y (e''), el coproducto sólo se obtiene como un producto intermedio y se hace reaccionar adicionalmente para proporcionar un coproducto convertido. Así, este procedimiento también puede considerarse como un proceso para la preparación de un producto glucósido y de un coproducto convertido a partir de un educto glucósido.

40 En la etapa alternativa (e') del procedimiento según la invención, se aísla al menos parte del coproducto. Para ello, el coproducto obtenido en la etapa (b) preferiblemente puede separarse de la primera composición producto o de la segunda composición producto, preferiblemente mediante procesos de membrana y/o de cromatografía, y así se puede purificar y separar del producto glucósido. En una realización particularmente preferente, el coproducto se aísla después de la cristalización del producto glucósido, es decir, el producto glucósido preferiblemente cristaliza primero a partir de una mezcla que comprende el producto glucósido y el coproducto y el coproducto que permanece en el sobrenadante se aísla entonces de la misma mediante los procesos mencionados.

45 En una realización preferente, la etapa (e') del procedimiento según la invención comprende la separación del coproducto por cromatografía o por un proceso de membrana, siendo preferente la nanofiltración como proceso de membrana.

50 Sorprendentemente, se ha encontrado que, mediante el procedimiento según la invención, el coproducto se puede proporcionar en una forma que puede ser utilizado como tal, es decir opcionalmente incluso sin pasos de desarrollo, en la industria alimentaria. Dado que el coproducto es fructosa, puede obtenerse en forma de fructosa pura o en forma de jarabe de fructosa. Preferiblemente, según la invención se obtiene una solución

pura del coproducto, esto es una solución de fructosa, por cromatografía. Esta solución entonces preferentemente se concentra, por ejemplo por ósmosis inversa o evaporación.

La sacarosa se utiliza como educto glucósido y se obtiene fructosa como coproducto.

5 En una realización preferente, la separación del coproducto, esto es fructosa, de la solución de reacción se lleva a cabo después de la primera reacción enzimática (etapa (b)), preferentemente mediante un procedimiento de membrana. En una realización preferente, se emplea una nanofiltración como procedimiento de membrana. En otra realización preferente, el coproducto, esto es fructosa, se separa por cromatografía, preferentemente mediante cromatografía por lotes y/o SMB (cromatografía de lecho móvil simulado).

10 En otra realización preferente, la separación del coproducto, esto es fructosa, de la solución de reacción se lleva a cabo después de la segunda reacción enzimática (etapa (d)), preferentemente mediante un procedimiento de membrana. En una realización preferente, se emplea una nanofiltración como procedimiento de membrana. En otra realización preferente, el coproducto, esto es fructosa, se separa por cromatografía, preferentemente cromatografía por lotes y/o SMB (cromatografía de lecho móvil simulado).

15 En una realización preferente adicional, la pureza y el rendimiento del coproducto, esto es fructosa, se incrementan por la isomerización enzimática de azúcares homólogos tales como, por ejemplo, glucosa a fructosa, o por separación de los coproductos en fracciones de monosacáridos puros mediante un proceso cromatográfico.

20 La cromatografía puede llevarse a cabo en vehículos no iónicos. En una realización preferente, se emplea una resina de intercambio iónico (por ejemplo, Lewatit® MDS 1368 en la forma Ca, Na y K, en un rango de tamaño de partícula de 290-320 µm o DOW Monoshere 99 en forma Ca, Na y K, en un rango de tamaño de partícula de 290 a 320 µm o Purolite PCR642Ca en un rango de tamaño de partícula 295-335 µm, o Purolite PCR642K en un rango de tamaño de partícula 295-335 µm) como fase sólida en la cromatografía.

El procedimiento según la invención puede emplear diversas técnicas de filtración para elaborar, purificar y aislar la composición producto, en particular nanofiltración, ultrafiltración y filtración estéril.

25 La separación de monosacáridos de disacáridos se lleva a cabo preferiblemente por nanofiltración, siendo preferente un tamaño de poro de los filtros utilizados para este propósito en el rango de 0,001 a 0,01 µm y estando la línea de corte preferiblemente en el intervalo de aproximadamente de 0,1 a 2 kDa.

30 La retención o separación de las enzimas no inmovilizadas (la fosforilasa del educto glucósido y/o la fosforilasa del producto glucósido) preferentemente se lleva a cabo por ultrafiltración. Las membranas de ultrafiltración típicamente tienen un rango de tamaño de poro de aproximadamente de 0,01 a 0,1 µm y el punto de corte preferente está en el intervalo de 1 a 500 kDa, preferiblemente de al menos 10 kDa. La ultrafiltración se lleva a cabo preferiblemente a una temperatura en el intervalo de 10 a 70°C, más preferiblemente en el intervalo de 20 a 50°C y en particular a aproximadamente 30°C.

35 Preferentemente, la retención de microorganismos se lleva a cabo mediante filtración estéril, preferente con un tamaño de poro de la membrana de aproximadamente 0,2 µm.

40 La nanofiltración es una posible tecnología de proceso para la separación de productos secundarios y para la purificación de los productos. La nanofiltración es un proceso de separación basado en membranas donde las moléculas atraviesan la membrana dependiendo de su tamaño y del tamaño de poro de la membrana. Así, pueden separarse moléculas unas de otras de diferentes tamaños de soluciones de proceso. La US 6.406.546 describe la obtención de sacarosa por nanofiltración a partir de corrientes de producto que comprenden monosacáridos y sales, que también incluyen, por ejemplo, melazas. La WO 2007/048880 se refiere a la separación de sustancias no polares de sustancias polares por nanofiltración. Aquí, la separación se basa en el efecto de que las sustancias no polares son retenidas en las membranas polares a un mayor grado que las sustancias polares. La CN101376901A describe la separación de monosacáridos, en particular fructosa, de soluciones de di- y fructooligosacáridos por nanofiltración. La US 2009/0281305 describe el aislamiento de celobiosa a partir de una mezcla de azúcares por ultrafiltración con ayuda de una membrana de ósmosis inversa. La separación de monosacáridos a partir de di- y oligo- sacáridos también es conocida, empleándose la nanofiltración en una operación de flujo cruzado o sin salida (A.S. Grandison et al., The use of dead-end and cross-flow nanofiltration to purify prebiotic oligosaccharides from reaction mixtures, en: Songklanakarin J. Sci. Technol., (2002), 24). La US 5.869.297 describe la purificación de la glucosa por nanofiltración, habiéndose producido la glucosa por sacarificación enzimática del almidón.

El procedimiento según la invención preferentemente comprende o bien una nanofiltración o bien una cromatografía; es decir, son etapas de purificación alternativas preferentes. La cromatografía puede ser

preferible dado que, a veces, es más conveniente para purificar mezclas complejas. Dependiendo del educto glucósido y del reactivo utilizados, es decir en función del producto glucósido y del coproducto obtenido, también se puede disponer de membranas de nanofiltración que permitan la purificación eficaz. En este caso, una nanofiltración puede ser económicamente más ventajosa que una cromatografía y, por tanto, puede ser

5 preferible. El experto en la técnica puede determinar cuál de los dos procesos alternativos puede ser mejor para qué eductos/productos mediante sencillos experimentos de rutina.

El uso de métodos cromatográficos para purificar soluciones que comprenden diferentes azúcares también es conocido en la técnica anterior. La cromatografía líquida se utiliza a escala industrial para obtener azúcares, por ejemplo para obtener azúcares a partir de melazas, separando la glucosa y la fructosa, y en la clasificación

10 por tamaño de las moléculas de azúcar. Por una parte, la calidad de la separación de las mezclas de azúcares depende de las propiedades físicas y químicas del material vehículo, por ejemplo estructura, tamaño de partícula, grado de reticulación, capacidad y tipo de iones (por ejemplo, Na^+ , Ca^{2+} , K^+), etc., y, por otra parte, de las interacciones de las moléculas de azúcar con el disolvente. La separación de moléculas de azúcar se lleva a cabo convencionalmente usando resinas de intercambio iónico con tamaños de partícula variables entre

15 290 y 370 μm y zeolitas. Los sistemas cromatográficos para la separación pueden configurarse para el modo por lotes o como sistemas de lecho móvil simulado (P.E. Barker et al., Continuous chromatographic separation of glucose-fructose mixtures using anion-exchange resins, *Chromatographia* 1984, 18, 567-574; M. Heper et al., Sodium, ammonium, calcium, and magnesium forms of zeolite Y for the adsorption of glucose and fructose from aqueous solutions, *J. Colloid Interface Sci.* 2007, 306, 11-15; S.M. Al Eid, Chromatographic separation of fructose from date syrup, *Int. J. Food Sci. Nutr.* 2006, 57, 83-96; y J.D. Sherman et al., Carbohydrate separations using zeolite molecular sieves, *Stud. Surf. Sci. Catal.* 1986, 28, 1025-1032).

20

Hasta ahora no se ha descrito en la literatura la separación cromatográfica de mezclas de azúcares que comprenden celobiosa (la US 2009/0281305 menciona el uso de resinas de intercambio iónico fuertemente ácidas).

25 En el procedimiento según la invención, preferentemente se separa una corriente de producto en sus constituyentes individuales, después de que opcionalmente haya sido pretratada por electrodialisis, sin tratamiento adicional anterior, empleando una cromatografía, siendo preferente el agua como eluyente. Es preferente un pretratamiento por electrodialisis cuando se utilizan resinas de Ca, ya que, en caso contrario, puede formarse fosfato de calcio.

30 En una realización preferente, la etapa (e') del procedimiento según la invención se lleva a cabo en el tiempo después de la etapa (d); es decir, el coproducto se aísla sólo después de que se haya obtenido al menos parte del producto glucósido. Preferentemente, la etapa (e') comprende separar el coproducto de una composición que comprende al menos parte del producto glucósido obtenido en la etapa (d). Esta composición puede ser la segunda composición producto, de manera que la etapa (e') del procedimiento según la invención se lleva a

35 cabo entonces en el tiempo inmediatamente después de la etapa (d) del procedimiento según la invención. Sin embargo, también es posible llevar a cabo otras etapas de desarrollo primero, antes de que se realice la etapa (e').

En una realización preferente, la etapa (e') del procedimiento según la invención lleva al coproducto con una pureza de al menos un 95% en peso DMB (en base materia seca), más preferiblemente de al menos un 97%

40 en peso DMB y en particular de al menos un 99% en peso DMB. En una realización preferente, la etapa (e') del procedimiento según la invención lleva al coproducto con una pureza de al menos un 50% en peso DMB (en base a materia seca), más preferiblemente de al menos un 75% en peso DMB y en particular de al menos un 90% en peso DMB.

En una realización preferente, la etapa (e') del procedimiento según la invención lleva al coproducto en forma

45 de un jarabe con un contenido en educto glucósido y/o en producto glucósido y/o en reactivo para la glucosa-1-fosfato, independientemente uno de otro, en cada caso no superior al 5% en peso, más preferiblemente no superior al 3% en peso y en particular no superior al 1% en peso, en cada caso con respecto al peso total del jarabe. En una realización preferente, la etapa (e') del procedimiento según la invención lleva al coproducto en forma de un jarabe con un contenido en educto glucósido y/o en producto glucósido y/o en reactivo para la

50 glucosa-1-fosfato, independientemente uno de otro, en cada caso no superior a un 50% en peso, más preferiblemente no superior a un 25% en peso y en particular no superior a un 10% en peso, en cada caso con respecto al peso total del jarabe.

En la etapa alternativa (e'') del procedimiento según la invención, se proporciona una tercera composición educto que comprende al menos una parte del coproducto obtenido en la etapa (b) y una enzima adicional capaz de catalizar una conversión del coproducto a coproducto convertido. Preferiblemente, sin embargo, la

55 etapa (e'') no comprende la conversión de fructosa en glucosa.

En una realización preferente, la primera composición producto se alimenta en la etapa (c) y la segunda composición producto se alimenta en la etapa (e") del procedimiento según la invención como un producto intermedio, sin más elaboración. Así, la tercera composición educto se proporciona preferiblemente en forma de la segunda composición producto de la etapa (d), que a su vez se proporciona preferiblemente en forma de la primera composición producto de la etapa (b).

En una realización preferente, la tercera composición educto proporcionada en la etapa (e") del procedimiento según la invención no comprende un reactivo para el coproducto. De acuerdo con esta realización, el coproducto preferentemente se isomeriza en la etapa (e"), con catálisis mediante la enzima adicional, para formar el coproducto convertido. Por ejemplo, cuando el coproducto es fructosa, la fructosa preferentemente se epimeriza a alulosa como coproducto convertido con catálisis mediante D-tagatosa-3-epimerasa como enzima adicional, en calidad de D-fructosa-3-epimerasa.

En otra realización preferente, la tercera composición educto proporcionada en la etapa (e") del procedimiento según la invención comprende adicionalmente un reactivo para el coproducto, que se hace reaccionar entonces con el coproducto en la etapa (e"), con catálisis con la enzima adicional, para formar el coproducto convertido. Por ejemplo, cuando el coproducto es fructosa, el reactivo es preferiblemente otro glucósido basado en fructosa.

La tercera composición educto preferiblemente es una solución acuosa donde el contenido de iones, el valor pH, la temperatura, la concentración de la enzima adicional, la concentración del coproducto, la concentración opcional del reactivo para el coproducto, etc., preferentemente se ajustan de forma que las condiciones sean adecuadas para la reacción en la etapa (e"). Las condiciones adecuadas son conocidas por el experto en la técnica y se pueden optimizar mediante experimentos rutinarios sencillos.

En la etapa (e") del procedimiento según la invención, el coproducto y/u opcionalmente el reactivo para el coproducto preferentemente se añaden a la tercera composición educto independientemente uno de otro, juntos o por separado, de forma continua o por etapas.

En principio, el coproducto convertido puede ser cualquier carbohidrato deseado o un derivado del mismo.

La enzima adicional es preferiblemente un epimerasa. Dado que el coproducto es fructosa, la enzima adicional es preferiblemente una fructosa-epimerasa.

Las formas preferidas C¹ a C³ para el coproducto, los reactivos opcionales para el coproducto, además de la enzima y el coproducto convertido obtenido en cada caso, se resumen en la siguiente tabla:

	Coproducto	Reactivo para el coproducto	Enzima adicional	Coproducto convertido
C ¹	D-Fructosa	-	D-Fructosa-3-epimerasa*	D-Alulosa
C ²	D-Fructosa	Sacarosa	Levansacarosa, β -fructofuranosidasa	6-cestose
C ³	D-Fructosa	Sacarosa	β -Fructofuranosidasa	1-cestose
*Se ha reportado que la D-Tagatosa-3-epimerase tiene esta actividad				

La enzima adicional se puede utilizar como enzima libre en un reactor de recipiente agitado, una cascada de recipiente agitado o un reactor tubular, o como enzima inmovilizada en un reactor de recipiente agitado, tubular o de lecho fijo, en un lote, lotes repetitivos o en un procedimiento en continuo. En una realización preferente, la enzima se separa de la corriente de producto por ultrafiltración después de la reacción.

En la etapa (e") del procedimiento según la invención, al menos una parte del coproducto contenido en la tercera composición educto se hace reaccionar con catálisis con la enzima adicional, obteniéndose una tercera composición producto que comprende un coproducto convertido.

En una realización preferente, se añade la enzima adicional a la primera composición educto o a la segunda composición educto o a la tercera composición educto.

La reacción enzimática con catálisis por la enzima adicional tiene lugar en un intervalo de temperatura preferente de 15°C a 70°C, más preferiblemente de 20°C a 60°C, aún más preferiblemente de 25°C a 55°C, con particular preferencia de 30°C a 50°C y más preferiblemente de 30°C a 40°C.

La reacción enzimática con catálisis por la enzima adicional se lleva a cabo a un valor de pH preferente de pH 5 a pH 8, más preferiblemente de pH 6 a pH 7 y con especial preferencia a pH 6,5.

La concentración del coproducto convertido en la tercera composición producto no está limitada de acuerdo con la invención y puede ser modificada por el experto en la técnica, opcionalmente por separación selectiva, continua o discontinua del coproducto convertido.

- 5 La concentración del coproducto convertido en la tercera composición producto preferentemente es de 0,10 mol/l a 1,50 mol/l, más preferiblemente de 0,15 a 1,30 mol/l, todavía más preferiblemente de 0,20 a 1,10 mol/l, con particular preferencia de 0,25 a 1,00 mol/l, con especial preferencia de 0,30 a 0,90 mol/l y en particular de 0,35 a 0,80 mol/l.

- 10 La concentración residual del coproducto en la tercera composición producto preferentemente no es superior a 0,9 mol/l, más preferiblemente no superior a 0,8 mol/l, todavía más preferiblemente no superior a 0,7 mol/l, con especial preferencia no superior a 0,6 mol/l, con mayor preferencia no superior a 0,5 mol/l y en particular no superior a 0,4 mol/l.

- 15 En la etapa (e'') del procedimiento según la invención, al menos una parte del coproducto convertido entonces se aísla. Los pasos adecuados para aislar el coproducto convertido son conocidos del experto en la materia y se han descrito anteriormente, por ejemplo en relación al aislamiento del coproducto en la etapa (e'). Estos pasos se aplican análogamente al aislamiento del coproducto convertido en la etapa (e'') y, por tanto, no se repiten aquí.

En una realización preferente, el coproducto convertido obtenido en la etapa (e'') se utiliza como reactivo para la glucosa-1-fosfato en la etapa y (d) del procedimiento según la invención.

- 20 Preferentemente, cuando la etapa (e) del procedimiento según la invención comprende la etapa (e''), que a su vez comprende la subetapa de la etapa (e'') de aislar al menos parte del coproducto convertido, dicha subetapa

e₁) comprende separar el coproducto convertido mediante un proceso de cromatografía o de membrana, donde el proceso de membrana, cuando es apropiado, es una nanofiltración; y/o

e₂) se lleva a cabo en el tiempo después de la etapa (d); y/o

- 25 e₃) comprende separar el coproducto convertido de una composición que comprende al menos parte del producto glucósido obtenido en la etapa (d); y/o

- 30 e₄) lleva al coproducto convertido con una pureza de al menos un 0,1% en peso, preferiblemente al menos un 10%, más preferiblemente al menos un 20%, aún más preferiblemente al menos un 30%, aún más preferiblemente al menos un 40%, incluso más preferiblemente al menos un 50%, más preferiblemente al menos un 60% y en particular al menos un 70% en peso con respecto a la materia seca y/o lleva al coproducto convertido en forma de un jarabe que tiene un contenido de educto glucósido y/o de producto glucósido no superior a un 5% en peso con respecto al peso total del jarabe.

En la etapa opcional (f) del procedimiento según la invención, se aísla al menos parte del producto glucósido.

- 35 En el procedimiento según la invención, el producto glucósido preferiblemente se purifica, preferentemente a partir de la segunda composición producto, preferiblemente por procedimientos cromatográficos y/o de membrana, preferiblemente en combinación con procesos de precipitación, cristalización y/o secado. De esta manera, en particular los monosacáridos (productos secundarios o eductos sin reaccionar) preferentemente son separados del producto glucósido. La proporción de producto glucósido cristalino y amorfo preferentemente se ajusta mediante la etapa de proceso de secado, preferiblemente secado por pulverización.

- 40 Sorprendentemente, se ha encontrado que, mediante el procedimiento según la invención, es posible proporcionar el producto glucósido en una forma que puede ser utilizada como tal, es decir sin más etapas de desarrollo, en la industria alimentaria. Dado que el producto glucósido es celobiosa, ésta se puede obtener en forma de un sólido de cristalinidad definida.

- 45 En una realización preferente, la etapa opcional (f) del procedimiento según la invención comprende separar el producto glucósido mediante precipitación con una sustancia auxiliar, comprendiendo opcionalmente la sustancia auxiliar etanol.

La US 2009/0281305 describe la cristalización de celobiosa a partir de soluciones. Aquí, la celobiosa debe contener más del 50% de celobiosa, de forma que el contenido de monosacáridos (glucosa) debe ser inferior al 50%. La pureza de la celobiosa obtenida por este procedimiento era del 93%. Se obtuvo un producto que era lo más blanco posible mediante una etapa de decoloración adicional.

- 5 Se ha encontrado ahora, sorprendentemente, que puede obtenerse la celobiosa con una pureza de más del 95% según la invención a partir de una solución que comprende menos del 50% celobiosa y, por tanto, más del 50% de monosacáridos. Además, se ha encontrado, sorprendentemente, que la cristalización de celobiosa también se puede llevar a cabo sin decoloración previa.

- 10 La separación del producto glucósido preferiblemente se lleva a cabo mediante una etapa de precipitación, preferentemente una etapa de cristalización con posterior separación de las aguas madres por centrifugación. Preferiblemente, la precipitación, más preferiblemente la cristalización del producto glucósido, se logra por adición de un anti-disolvente, preferiblemente etanol.

- 15 En una realización preferente, los cristales del producto glucósido, esto es celobiosa, se separan mediante centrifugación, pudiéndose opcionalmente lavar los cristales con agua en la centrífuga para reducir decoloraciones adherentes. Tales procedimientos son conocidos del experto en la técnica.

- 20 En una realización preferente, la etapa opcional (f) del procedimiento según la invención comprende separar el producto glucósido por secado, obteniéndose así el producto glucósido en forma de un sólido. De esta forma, el producto glucósido se obtiene al menos en parte en forma cristalina. Según la invención, el secado comprende preferiblemente un secado por pulverización, secado en cinta o secado con un secador rotatorio instantáneo.

Una ventaja del secado por pulverización es que la proporción de producto glucósido cristalino y amorfo en el sólido seco por pulverización resultante puede así variarse.

- 25 En una realización preferente, la etapa opcional (f) del procedimiento según la invención comprende separar el producto glucósido por un proceso de membrana, siendo preferiblemente el proceso de membrana una nanofiltración.

En una realización preferente, la etapa opcional (f) del procedimiento según la invención comprende hidrolizar cantidades residuales del educto glucósido no reaccionado antes de separar el producto glucósido.

- 30 En una realización preferente, la etapa opcional (f) del procedimiento según la invención comprende separar el producto glucósido mediante un intercambiador de iones en un soporte sólido, donde el producto glucósido se separa de al menos una parte del fosfato.

En una realización particularmente preferente, la etapa (e) y la etapa opcional (f) del procedimiento según la invención se llevan a cabo juntas, de manera que el aislamiento (purificación) del producto glucósido y el aislamiento (purificación) del coproducto tienen lugar en una acción común, que, de acuerdo con la invención, puede comprender una pluralidad de pasos subsidiarios.

- 35 En una realización preferente, la fosforilasa del educto glucósido y/o la fosforilasa del producto glucósido están inmovilizadas en un soporte sólido y/o encerradas en una matriz independientemente una de otra, juntas o por separada. Esto facilita la separación/retención de las dos enzimas de los componentes residuales, por ejemplo el aislamiento de las dos enzimas de la primera composición producto o de la segunda composición producto.

- 40 Según la invención, la fosforilasa del educto glucósido y/o la fosforilasa del producto glucósido, independientemente una de otra, juntas o por separado, no están ni inmovilizadas en un soporte sólido ni encerradas en una matriz.

- 45 El uso de enzimas inmovilizadas en el procedimiento según la realización de referencia permite reducir el coste de las enzimas. Como resultado de la inmovilización, las enzimas pueden recuperarse y utilizarse repetidamente. La inmovilización de una sacarosa-fosforilasa de *Bifidobacterium adolescentis* con el fin de generar un sistema termoestable es conocida de la técnica anterior (A. Cerdobbel et al., Increasing the thermostability of sucrose phosphorylase by multipoint covalent immobilization, en: J. Biotechnol., (2010), 150). Ha sido posible utilizar sacarosa-fosforilasa de *Bifidobacterium adolescentis* inmovilizada en Sepabeads EC-HFA en concentraciones de hasta 179 g por l⁻¹ a una temperatura de reacción de hasta 60°C (W.K. De et al.,

Operational stability of immobilized sucrose phosphorylase: Continuous production of α -glucose-1-phosphate at elevated temperatures, en: Process Biochem. (Amsterdam, Neth.), (2011), 46). Sin embargo, estos trabajos se llevaron a cabo utilizando una enzima particularmente purificada.

- 5 Por razones de coste, es preferente según la invención el uso de enzimas inmovilizadas que, antes de su inmovilización, no hayan sido purificadas por procesos particulares diferentes a la precipitación y filtración, sino que hayan sido aisladas simplemente por precipitación PEI y filtración.

Se ha encontrado, sorprendentemente, que la inmovilización conduce a una actividad consistente de la enzima durante 40 días. Sorprendentemente, se recupera hasta un 26% de la actividad de la enzima utilizada. Por el contrario, la actividad de la enzima libre que es retenida por una membrana cae continuamente.

- 10 La inmovilización de las enzimas a partir de una solución de enzima no purificada, como es preferente de acuerdo con la invención, permite que las enzimas sean inmovilizadas en un soporte, por lo que las enzimas siguen activas, estables a largo plazo y catalizan selectivamente la reacción deseada.

- 15 Alternativamente, sin embargo, las dos enzimas pueden también aislarse independientemente una de otra mediante procesos de membrana, preferiblemente por ultrafiltración. Estos procedimientos son conocidos por el experto en la técnica.

- 20 Los procesos de membrana también permiten que las enzimas no inmovilizadas sean recuperadas y reutilizadas, como resultado de lo cual igualmente se puede reducir el coste de las enzimas. Así, las enzimas se separan de la corriente de producto. Una ventaja de los procesos de membrana en comparación con la inmovilización de las enzimas es que no hay coste para la inmovilización de las enzimas y se evita la alta pérdida de actividad de la enzima que normalmente provoca la inmovilización. Por otra parte, con frecuencia la estabilidad a largo plazo de las enzimas no inmovilizadas es más baja que la estabilidad a largo plazo de las enzimas inmovilizadas.

- 25 En formas de realización preferentes del procedimiento según la invención, la fosforilasa del educto glucósido y/o la fosforilasa del producto glicósido y/o la enzima adicional se reciclan. Por tanto, preferiblemente, la fosforilasa del educto glucósido y/o la fosforilasa del producto glicósido y/o la enzima adicional no se desactivan, por ejemplo por tratamiento térmico.

- 30 Preferiblemente, el procedimiento según la invención se lleva a cabo en un reactor de membrana. Preferentemente, la fosforilasa del educto glucósido y/ o la fosforilasa del producto glicósido y/o la enzima adicional no pueden atravesar la membrana del reactor de membrana. Preferentemente, la fosforilasa del educto glucósido y/o la fosforilasa del producto glicósido y/o la enzima adicional no están inmovilizados en soportes y no se proporcionan en reactores separados.

- 35 Se ha encontrado sorprendentemente que, realizando los pasos (b) y (d) del procedimiento según la invención en un reactor de membrana o en uno o más reactores de membrana según una realización de referencia y empleando la fosforilasa del educto glucósido, la fosforilasa del producto glicósido y la enzima, en su caso, en forma libre, esto es no inmovilizadas, es posible un uso repetido de las enzimas. Sorprendentemente, se ha encontrado que la retención de las enzimas por la(s) membrana(s) del reactor(es) de membrana no deteriora la actividad enzimática, de modo que se consiguen altas tasas de reciclaje. Así, puede evitarse la inmovilización y la inactivación de las enzimas.

- 40 En realizaciones preferentes del procedimiento según la invención, la primera composición educto y/o la segunda composición educto, independientemente una de otra, están tamponadas con fosfato. Preferiblemente, la primera composición educto consiste esencialmente en fosforilasa del educto glucósido, educto glucósido, fosfato y agua. Preferiblemente, la primera composición producto consiste esencialmente en fosforilasa de educto glucósido, educto glucósido sin reaccionar, glucosa-1-fosfato, coproducto, fosfato sin reaccionar y agua. Independientemente, la segunda composición educto preferiblemente consiste
- 45 esencialmente en fosforilasa de producto glucósido, glucosa-1-fosfato, opcionalmente reactivo para la glucosa-1-fosfato y agua. Preferiblemente, la segunda composición producto consiste esencialmente en fosforilasa de producto glucósido, glucosa-1-fosfato sin reaccionar, reactivo para la glucosa-1-fosfato sin reaccionar, producto glucósido y agua. Dado que las etapas (b) y (d) se llevan a cabo en un único reactor (reactor común), la mezcla de reacción total preferiblemente consiste esencialmente en fosforilasa de educto glucósido, fosforilasa de
- 50 producto glucósido, educto glucósido, glucosa-1-fosfato, reactivo para la glucosa-1-fosfato, producto glucósido, coproducto, fosfato y agua. Preferiblemente, la primera composición educto y/o la segunda composición educto,

independientemente una de otra, no contienen acetato de magnesio, ni ácido 4-morfolinpropanosulfónico (MOPS) ni clorhidrato de imidazol.

- 5 En una realización particularmente preferente, el procedimiento según la invención comprende la etapa adicional (g) de separar el fosfato obtenido en la etapa (d) y, preferiblemente retornar el fosfato que ha sido separado a la etapa (a).

- 10 Una de las dificultades del desarrollo de un proceso enzimático eficaz para la preparación productos glucósidos, en particular celobiosa, a partir de eductos glucósidos, en particular a partir de sacarosa, es que el fosfato se utiliza como cosustrato en la conversión enzimática de la sacarosa a glucosa-1-fosfato en la etapa (b) y luego se libera de nuevo como un producto secundario en la formación enzimática del producto glucósido en la etapa (d). En la formación enzimática del producto glucósido en la etapa (d), se produce la inhibición del producto por el fosfato, mientras que es posible, previamente en la conversión enzimática del educto glucósido a glucosa-1-fosfato en la etapa (b), desplazar el equilibrio de la reacción enzimática positivamente hacia el intermedio glucosa-1-fosfato utilizando una alta concentración de fosfato. Por ello, es deseable el control del balance de fosfato durante la reacción en su conjunto.

- 15 Una posibilidad según la invención para controlar el balance del fosfato es deliberadamente para seleccionar las fosforilasas del educto glucósido que permitan un equilibrio de reacción ventajoso para la formación de glucosa-1-fosfato en la etapa (b), incluso sin una alta concentración de fosfato, y/o para seleccionar las fosforilasas del producto glucósido que tengan una mayor tolerancia al fosfato en la etapa (d).

- 20 Otra posibilidad según una realización preferente de controlar el balance de fosfato consiste en separar el fosfato de la primera composición producto después del paso (b), de modo que la segunda composición educto proporcionada en la etapa (c) tiene un contenido en fosfato más bajo. Sin embargo, esto sólo es posible en el caso de un proceso en dos recipientes; es decir, cuando la etapa (b) y la etapa (d) del procedimiento según la invención se llevan a cabo en diferentes reactores que están espacialmente separados unos de otros. En un proceso de un solo recipiente según la invención, las dos reacciones enzimáticas se llevan a cabo en paralelo en un reactor y preferentemente el fosfato se separa de la composición producto que comprende el producto glucósido y preferiblemente también el coproducto.

En una realización preferente, la etapa (g) del procedimiento según la invención comprende la separación del fosfato mediante un proceso de membrana, en particular por electrodiálisis, o mediante un intercambiador iónico sobre un soporte sólido.

- 30 Sorprendentemente, se ha encontrado que la electrodiálisis no sólo es útil para la eliminación de fosfato, sino, además, para eliminar impurezas coloreadas, es decir, para decolorar el producto, en particular la segunda composición producto. Tales impurezas coloreadas no deseadas se conocen de la técnica anterior y normalmente se forman por autocatálisis.

- 35 Se ha encontrado, sorprendentemente, que el fosfato se puede separar eficazmente del proceso mediante procesos de membrana. En una realización preferente del procedimiento inventivo, el fosfato se separa antes o después de la conversión de la glucosa-1-fosfato al producto glucósido.

En una realización preferente del procedimiento, el fosfato se separa de la solución de proceso después de la conversión de la glucosa-1-fosfato y del reactivo para la glucosa-1-fosfato, esto es glucosa, al producto glucósido.

- 40 En una realización que también es preferente, la conversión del educto glucósido, esto es sacarosa, a glucosa-1-fosfato mediante una sacarosa-fosforilasa se lleva a cabo en primer lugar, a continuación se separa el fosfato mediante un proceso de membrana y, a continuación, la glucosa-1-fosfato se convierte en el producto glucósido mediante la fosforilasa del producto glucósido. El fosfato recién formado se separa entonces a continuación mediante un procedimiento de membrana.

- 45 En una realización preferente del procedimiento inventivo, como proceso de membrana se emplea una electrodiálisis.

En una realización adicional del procedimiento, las dos reacciones enzimáticas tienen lugar en paralelo en un reactor (procedimiento de un recipiente), de modo que el educto glucósido, esto es sacarosa, es convertido por el reactivo para la glucosa-1-fosfato, esto es glucosa, y el fosfato directamente en el producto glucósido, esto

es celobiosa. El fosfato se separa a continuación de una solución de proceso que comprende el producto glucósido, esto es celobiosa, preferentemente reciclándose la solución que comprende fosfato que ha sido separado, es decir retornando a la etapa (a).

- 5 Preferiblemente, al menos el 50%, más preferiblemente al menos el 60%, aún más preferiblemente al menos el 70%, aún más preferiblemente al menos el 80%, incluso más preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 90%, en particular al menos el 95% del fosfato que se separa en la etapa (g) se retorna a la etapa (a) como al menos parte del fosfato que está contenido en la primera composición educto.

- 10 En una realización preferente, el fosfato se obtiene sólo después de la cristalización del producto glucósido, esto es celobiosa, a partir de la segunda composición producto, por electrodiálisis. En este caso, el producto glucósido, esto es celobiosa, se separa primero de la segunda composición producto, que todavía no se ha liberado de sales, mediante cristalización y centrifugación, y luego la descarga de la centrifugadora se libera de las sales por electrodiálisis. Esta variante puede tener ventajas en relación al tamaño del sistema y también mejora la eficiencia de la electrodiálisis.

- 15 Los procedimientos por electrodiálisis son conocidos de la técnica anterior. La US 4.787.790 describe la separación de sales fosfato de una solución que comprende glucosa-1-fosfato en presencia de monosacáridos por electrodiálisis. Aquí, la glucosa-1-fosfato se produce a partir de almidón, por ejemplo almidón de patata. El fosfato se separa después de la reacción. La JP 2005-041784 igualmente describe la purificación de glucosa-1-fosfato por separación de la glucosa-1-fosfato junto con fosfato a partir de una reacción mediante membranas monovalentes no selectivos de iones, o de electrodiálisis, y el aislamiento de la glucosa-1-fosfato a partir de una solución que contiene fosfato por electrodiálisis.
- 20

En una realización preferida del procedimiento inventivo, la electrodiálisis como procedimiento de membrana se realiza con tensiones de 1 V a 40 V, preferiblemente de 10 a 30 V y con particular preferencia de 15 a 25 V y con mayor preferencia a 20 V.

- 25 Preferentemente, la electrodiálisis se lleva a cabo a una temperatura en el intervalo de 10 a 50°C, más preferiblemente de 20 a 40°C y en particular aproximadamente a 30°C.

- 30 En una realización preferente, la etapa opcional pero preferente (g) del procedimiento según la invención se lleva a cabo en el tiempo después de la etapa (d), es decir el fosfato se aísla sólo después de que se haya obtenido al menos parte del producto glucósido. La etapa (g) comprende preferiblemente separar el fosfato de una composición que comprende al menos una parte del producto glucósido obtenido en la etapa (d). Esta composición puede ser la segunda composición, de modo que la etapa (g) del procedimiento según la invención se lleva a cabo entonces en el tiempo inmediatamente después de la etapa (d) del procedimiento según la invención. Sin embargo, también es posible para otras etapas de trabajo llevarlas a cabo antes de realizar la etapa (g).

- 35 En una realización preferente del procedimiento según la invención, la reacción de equilibrio está desplazada hacia el producto glucósido, por ejemplo eliminando el fosfato de la composición producto obtenida en la etapa (d).

- 40 En otra realización preferida del procedimiento según la invención, la reacción de equilibrio no está influenciada por la eliminación de fosfato de la composición producto obtenida en la etapa (d). Se ha encontrado, sorprendentemente, que el educto glucósido se puede hacer reaccionar con un rendimiento en el rango del 60 al 100% incluso en estas condiciones.

- 45 En otra realización preferente del procedimiento según la invención, el rendimiento del producto glucósido obtenido en la etapa (d) con respecto a la cantidad del educto glucósido proporcionado en la etapa (a) es al menos un 60%, más preferiblemente al menos un 65%, aún más preferiblemente al menos un 70%. Preferentemente, la tasa de conversión es tal que, después de 24 horas, se consigue un rendimiento de al menos un 60%. Preferiblemente, la tasa de conversión es tal que, después de 48 horas, se consigue un rendimiento del producto glucósido de al menos un 70%.

- 50 Dado que el procedimiento según la invención se lleva a cabo como un procedimiento en un solo recipiente, la electrodiálisis, equipada con membranas de intercambio iónico heterogéneas, permite que la solución de producto que comprende azúcar a ser liberado de sales y de la glucosa-1-fosfato sin reaccionar sean eliminados de la solución. Mediante una electrodiálisis adicional, equipada con membranas de intercambio iónico

homogéneas selectivos, por ejemplo basadas en copolímeros de estireno-divinilbenceno, la glucosa-1-fosfato se puede separar de las otras sales. De esta manera, en el proceso de un solo recipiente, el azúcar que comprende la solución de producto se libera de sales después de la reacción preferentemente mediante el uso de una electrodialisis, preferiblemente equipada con membranas de intercambio iónico heterogéneas, y la glucosa-1-fosfato no reaccionada se elimina de la solución.

Cuando el proceso según una realización de referencia se lleva a cabo como un proceso de dos recipientes, la electrodialisis, preferiblemente equipada con membranas de intercambio iónico homogéneas selectivas, permite el exceso de sales del tampón a ser separadas después de la primera síntesis catalizada por la enzima (etapa (b)). La glucosa-1-fosfato preferiblemente permanece en la primera composición producto y se alimenta a la segunda síntesis catalizada por enzimas (etapa (d)). El producto de la segunda síntesis catalizada por enzima, es decir el producto glucósido en la segunda composición producto, preferiblemente se libera de sales después de la reacción empleando electrodialisis, preferiblemente equipada con membranas de intercambio iónico heterogéneas, y la glucosa-1-fosfato no reaccionada se elimina de la solución. El concentrado de la electrodialisis preferentemente no se purifica más y se emplea de nuevo para un nuevo proceso de catalizado por enzimas.

En un procedimiento preferido adicional, la electrodialisis se lleva a cabo después de que el producto glucósido ha sido separado por un proceso de cristalización.

Preferiblemente no se emplea una glucosa-isomerasa en el procedimiento según la invención, en particular, preferiblemente, no se utilizan enzimas adicionales aparte de la fosforilasa del educto glucósido y la fosforilasa del producto glucósido. En otra realización preferente, se utiliza una enzima adicional en la etapa (e") con el fin de convertir el coproducto en un coproducto convertido.

Con el fin de aumentar el rendimiento del producto, sin embargo, también es preferente convertir el reactivo sin reaccionar para la glucosa-1-fosfato, esto es glucosa, en coproducto, esto es fructosa, con catálisis enzimática, siempre que sea técnicamente posible y económicamente conveniente. Una enzima que cataliza la isomerización de glucosa a fructosa es la glucosa-isomerasa.

En una realización preferente adicional, se utiliza una precipitación con etanol o una cristalización para obtener el producto glucósido.

El procedimiento según la invención puede llevarse a cabo como un proceso continuo, por lotes o por lotes repetitivo.

En una realización particularmente preferente, el procedimiento según la invención opera de forma continua, preferiblemente vía un sistema de reactor de membrana, donde las enzimas son retenidas por la membrana, donde el producto glucósido y el coproducto son preferentemente eliminados de forma continua del reactor y donde se añaden educto glucósido fresco y opcionalmente reactivo fresco para la glucosa-1-fosfato 1 preferiblemente de forma simultánea o de manera espaciada en el tiempo.

En el procedimiento según la invención, las etapas (b) y (d) se llevan a cabo en un reactor convencional (proceso en un solo recipiente). En esta variante del procedimiento, se proporciona entonces la primera composición producto obtenida en la etapa (b) para la segunda composición educto directamente y sin más elaboración, siendo posible, sin embargo, añadir otros componentes para la reacción según la etapa (d) a la segunda composición educto. La primera composición educto, la primera composición producto y/o la segunda composición educto coinciden y la única composición educto preferiblemente contiene ambas enzimas simultáneamente desde el principio.

El proceso en un único recipiente según la invención puede llevarse a cabo como un proceso en continuo, por lotes o por lotes repetitivos.

En una realización preferente del procedimiento en un solo recipiente según la invención, todos los reactivos, enzimas y condiciones ya están presentes y ajustados en la primera composición de educto proporcionada en la etapa (a), de manera que los pasos (b) a (d) del procedimiento según la invención se suceden espontáneamente, opcionalmente hasta que completarse la reacción. La provisión de la segunda composición educto en la etapa (c) tiene lugar entonces por la reacción en la etapa (b), sirviendo la primera composición producto como segunda composición educto. En el caso de un procedimiento en continuo, el educto glucósido, el fosfato y el reactivo opcional para la glucosa-1-fosfato se dosifican de forma continua, de modo que la

reacción no llega a detenerse; para ello, el producto glucósido, el coproducto y el fosfato se descargan continuamente.

5 En otra realización preferente del procedimiento de un solo recipiente según la invención, los reactivos y/o las enzimas necesarias para la reacción en la etapa (d) no están presentes en la composición educto proporcionada en la etapa (a). En el caso de este procedimiento, después de la provisión de la primera composición educto según la etapa (a), sólo tiene lugar la reacción según la etapa (b) inicialmente en el reactor, formándose la primera composición producto en el reactor. Sin embargo, la glucosa-1-fosfato así formada no sigue reaccionando espontáneamente, ya que los reactivos y/o enzimas (fosforilasa del producto glucósido) que se requieren para la reacción en la etapa (d) no están presentes. En un momento que, en principio, puede elegirse libremente, por ejemplo cuando la reacción según la etapa (b) está completa, se pueden añadir los reactivos y/o enzimas necesarios que faltan para la reacción en la etapa (d) a la primera composición producto contenida en el reactor, con el fin de proporcionar la segunda composición educto a la etapa (c). La reacción según la etapa (d) puede así continuar en el reactor.

15 En una realización de referencia del procedimiento según la invención, las etapas (b) y (d) se llevan a cabo en reactores separados (proceso de dos recipientes). El proceso de dos recipientes según la invención puede llevarse a cabo como un proceso continuo, por lotes o por lotes repetitivos.

20 En este procedimiento, preferentemente se emplean las dos enzimas separadas espacialmente en los dos reactores, de modo que la etapa (b) se desarrolla en el primer reactor y la etapa (d) en el segundo reactor. Por tanto, preferiblemente también se añaden el reactivo para la glucosa-1-fosfato y la fosforilasa del producto glucósido sólo cuando la composición primera producto ha salido del primer reactor.

En realizaciones preferentes, la etapa (e) y la etapa opcional (f) están asimiladas como constituyentes en un proceso de trabajo multietapa, siendo su objetivo último aislar el producto glucósido y el coproducto en forma pura y separar los componentes residuales (productos secundarios, eductos no reaccionados) y opcionalmente devolverlos al proceso en un bucle.

25 En una realización preferente, la glucosa-1-fosfato se descarga del procedimiento según la invención como un coproducto adicional.

30 En una realización preferente, la purificación de la solución de proceso con el fin de obtener el producto glucósido, esto es celobiosa, se lleva a cabo mediante procesos de membrana y aislamiento en forma sólida por precipitación. En este caso, el procedimiento según la invención comprende un total de cuatro secciones, cada una de las cuales puede comprender opcionalmente una pluralidad de etapas del procedimiento según la invención:

- i) En la primera sección tiene lugar la síntesis de la glucosa-1-fosfato a partir del educto glucósido, esto es sacarosa, y del fosfato con catálisis con una fosforilasa del educto glucósido (etapas (a) y (b)).
- 35 ii) En la segunda sección tiene lugar la reacción de la glucosa-1-fosfato con un reactivo para la glucosa-1-fosfato, esto es glucosa, con catálisis con una fosforilasa del producto glucósido, obteniéndose el producto glucósido, esto es celobiosa (etapas (c) y (d)).
- iii) En la tercera sección tiene lugar la separación de monosacáridos (coproducto, esto es fructosa y el reactivo no reaccionado para la glucosa-1-fosfato, esto es glucosa) (etapa (e)). Preferentemente se produce la isomerización del reactivo no reaccionado, esto es glucosa, al coproducto, esto es fructosa, mediante una enzima adecuada, por ejemplo una glucosa-isomerasa.
- 40 iv) En la cuarta sección tiene lugar la purificación del producto glucósido, esto es celobiosa, por precipitación o cromatografía y/o cristalización y posterior secado (etapa opcional (f)).

45 En una realización preferente, después de la etapa (d), la solución concentrada se somete a una electrodiálisis a una tensión de 2 V a 40 V, preferiblemente a 10 a 30 V, separándose una corriente que comprende sal fosfato y glucosa-1-fosfato de la solución de proceso. En una realización preferente, la solución de proceso restante se devuelve al proceso de nuevo, preferiblemente para su mezcla con el educto glucósido. En un proceso de dos recipientes, la glucosa-1-fosfato se puede separar de la solución de proceso que comprende fosfato y glucosa-1-fosfato preferiblemente por electrodiálisis, y la corriente de material que comprende fosfato se puede usar preferiblemente para la mezcla del educto glucósido y la corriente de material que comprende glucosa-1-fosfato puede alimentarse a la segunda reacción enzimática (etapa (d), catálisis por la fosforilasa del producto glucósido).

- 5 En una realización preferente, la solución de proceso, libre de fosfatos, contiene como constituyentes principales reactivo sin reaccionar para la glucosa-1-fosfato, esto es glucosa, coproducto, esto es fructosa, producto glucósido, esto es celobiosa, y, como, como constituyente secundario, educto glucósido sin reaccionar, esto es sacarosa, que se filtra por nanofiltración o se separa en un proceso de separación cromatográfica, siendo separados los monosacáridos tales como glucosa y fructosa de la solución de proceso como una corriente de coproducto.

En una realización que también es preferente, esta corriente de coproducto se hace reaccionar con una enzima, preferiblemente con glucosa-isomerasa, incrementándose así el contenido de fructosa.

- 10 En una realización preferente adicional, esta corriente de coproducto se separa mediante un proceso de separación, tal como, por ejemplo, cromatografía, en tres (u opcionalmente también en solo dos) corrientes, donde una primera corriente comprende el reactivo para la glucosa-1-fosfato no reaccionado, esto es glucosa, una segunda corriente comprende el coproducto, esto es fructosa, y una tercera corriente comprende el producto glucósido, esto es celobiosa. La primera corriente se alimenta en un proceso de un solo recipiente, preferentemente para la mezcla del educto glucósido o, en una realización de referencia, en un proceso de dos
15 recipientes, preferiblemente a la segunda reacción enzimática (etapa (d), catálisis por la fosforilasa del producto glucósido).

- 20 En una realización preferente, la corriente de coproducto se concentra a una concentración del 40% en peso DMB al 90% en peso DMB, más preferiblemente del 60% en peso DMB al 90% en peso DMB, todavía más preferiblemente del 65% en peso DMB al 85 en peso DMB, y se obtiene en forma de un coproducto comercializable, preferentemente en forma de jarabe de fructosa. El contenido de coproducto, esto es fructosa, con respecto a la materia seca (DM) es preferiblemente de al menos el 90% en peso, más preferiblemente de al menos el 95% en peso, con particular preferencia de al menos el 99% en peso, en cada caso con respecto al peso total de la materia seca (pureza). Para ello, puede ser preferente alimentar la corriente de coproducto a un dispositivo de decoloración, de forma que el coproducto es prácticamente incoloro.

- 25 En una realización preferente adicional, la corriente de coproducto se alimenta a un secador por cristalización/pulverización para obtener un producto cristalino.

- 30 En otra realización preferente, una fracción que contiene el producto obtenido por nanofiltración se separa en un proceso de separación, tal como cromatografía, en una fracción que contiene el producto y una fracción que comprende la sustancia auxiliar, por ejemplo H_3PO_4 , NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , coproducto, esto es fructosa, educto glucósido, esto es sacarosa, reactivo para la glucosa-1-fosfato, esto es glucosa, producto secundario, por ejemplo glucosa-6-fosfato, y producto intermedio, por ejemplo glucosa-1-fosfato. La fracción que contiene el producto se seca preferiblemente en un secador por pulverización para dar un sólido. Las otras fracciones que comprenden eductos, producto intermedio, sustancia auxiliar, producto secundario y coproducto
35 preferiblemente se combinan, se concentran por evaporación, opcionalmente en varias etapas, y pueden descargarse desde el proceso como "melaza de productos".

- 40 En una realización alternativa del proceso según la invención, la etapa (f) no implica necesariamente la etapa de aislar al menos parte del producto glucósido (etapa (f)), sino en su lugar la etapa (f'') para proporcionar una cuarta composición educto que comprende al menos parte del producto glucósido obtenido en la etapa (d) y una enzima adicional capaz de catalizar una conversión del producto glucósido a un producto glucósido convertido; hacer reaccionar al menos parte del producto glucósido contenido en la cuarta composición educto con catálisis por la enzima adicional, obteniéndose una cuarta composición producto que comprende el producto glucósido convertido; y aislar al menos parte del producto glucósido convertido.

- 45 Todas las realizaciones preferentes que han sido descritas anteriormente en relación con la etapa (f), es decir el aislamiento de al menos parte del producto glucósido, también se aplican análogamente a la etapa alternativa (f''), en particular a su subetapa de aislar al menos parte del producto glucósido convertido y, por tanto, no se repiten aquí en adelante.

Una forma de realización particularmente preferente del procedimiento según la invención se refiere a un procedimiento para la preparación de un producto glucósido y de un coproducto a partir de un educto glucósido, donde el proceso comprende las siguientes etapas:

- 50 a) proporcionar una primera composición educto que comprende una fosforilasa del educto glucósido, educto glucósido y fosfato; siendo la concentración del educto glucósido en la primera composición educto al menos 0,150 mol/l, preferiblemente al menos 0,200 mol/l, en especial al menos 0,500 mol/l;

- b) hacer reaccionar al menos parte del educto glucósido contenido en la primera composición educto con al menos parte del fosfato contenido en la primera composición educto con catálisis con la fosforilasa del educto glucósido, obteniéndose una primera composición producto que comprende coproducto y glucosa-1-fosfato;
- 5 c) proporcionar una segunda composición educto que comprende una fosforilasa del producto glucósido, al menos parte de la glucosa-1-fosfato obtenida en la etapa (b) y un reactivo para la glucosa-1-fosfato; y
- 10 d) hacer reaccionar al menos parte de la glucosa-1-fosfato contenida en la segunda composición educto, opcionalmente con el reactivo para la glucosa-1-fosfato con catálisis por la fosforilasa del producto glucósido, obteniéndose una segunda composición producto que comprende el producto glucósido y fosfato; donde la concentración del producto glucósido en la segunda composición producto es al menos 0,075 mol/l, preferiblemente al menos 0,150 mol/l, en especial al menos 0,200 mol/l;
- 15 (e') aislar al menos parte del coproducto; donde preferiblemente el coproducto se separa por cromatografía o por un proceso de membrana; donde preferiblemente el proceso de membrana es nanofiltración; donde preferiblemente el coproducto se separa a partir de una composición que comprende al menos una parte del producto glucósido obtenido en la etapa (d);
- 20 (f) aislar al menos parte del producto glucósido, preferiblemente separándose el producto glucósido mediante
- un proceso de membrana; donde preferiblemente el proceso de membrana es una nanofiltración; y/o
 - un intercambiador iónico sobre un soporte sólido, separándose el producto glucósido de al menos parte del fosfato; y/o
 - una etapa de cristalización con posterior separación de los cristales de las aguas madre por centrifugación; donde preferiblemente se añade un antidisolvente; donde el antidisolvente es preferiblemente etanol; y
- 25 (g) separación el fosfato obtenido en la etapa (d), y preferiblemente devolverlo a la etapa (a); donde el fosfato se separa por un proceso de membrana o un intercambiador iónico sobre un soporte sólido; donde el proceso de membrana implica una electrodiálisis; donde preferiblemente al menos el 50% del fosfato que se separa en la etapa (g) se devuelve a la etapa (a) como al menos parte del fosfato
- 30 contenido en la primera composición educto;

donde

- la fosforilasa del educto glucósido es una sacarosa-fosforilasa; preferentemente la sacarosa-fosforilasa de tipo salvaje de *Bifidobacterium adolescentis*, o una sacarosa-fosforilasa que difiere de dicho tipo salvaje, pero que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80%, preferiblemente al menos un 90% de identidad en comparación con la sacarosa-fosforilasa de tipo salvaje de *Bifidobacterium adolescentis*; donde preferiblemente la fosforilasa del educto glucósido no está inmovilizada en un soporte sólido ni encerrada en una matriz;
- la fosforilasa del glucósido producto es una fosforilasa-celobiosa; preferiblemente la fosforilasa-celobiosa de tipo salvaje de *Cellulomonas uda*, o una fosforilasa-celobiosa que difiere de dicho tipo salvaje, pero que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad, preferiblemente al menos un 90%, en comparación con la fosforilasa-celobiosa de tipo salvaje de *Cellulomonas uda*; donde preferiblemente la fosforilasa del producto glucósido no está inmovilizada en un soporte sólido ni encerrada en una matriz;
- el educto glucósido es sacarosa,
- 45 – el reactivo para la glucosa-1-fosfato es glucosa,
- el producto glucósido es celobiosa, y
- el coproducto es fructosa;

donde las etapas (b) y (d) se llevan a cabo al menos parcialmente de forma simultánea en un reactor común; donde preferiblemente el reactor común es un reactor de membrana; donde preferiblemente la fosforilasa del educto glucósido y la fosforilasa del producto glucósido no pueden atravesar la membrana del reactor de membrana.

50

Las realizaciones particularmente preferentes del procedimiento según la invención se describirán en mayor detalle a continuación mediante las figuras 5 y 6. El experto en la técnica apreciará que no todos los dispositivos mostrados en las figuras 5 y 6 deben ser necesariamente proporcionados para llevar a cabo el procedimiento según la invención y que dispositivos adicionales no mostrados también pueden proporcionarse.

55

La Figura 5 muestra el procedimiento según la invención como un proceso en un solo recipiente donde los pasos (b) y (d) se llevan a cabo en el mismo reactor.

El reactivo para la glucosa-1-fosfato, el educto glucósido, el fosfato y el agua se proporcionan preferiblemente a partir de una materia prima depósito para el reactivo de la glucosa-1-fosfato (1), de un depósito de materia prima para el educto glucósido (2), de un depósito de materia prima para el fosfato (3) y de un depósito de agua (4). Opcionalmente, el agua puede tratarse mediante un dispositivo de ablandamiento y tratamiento (5), por ejemplo mediante intercambio iónico y/u ósmosis inversa. El reactivo para la glucosa-1-fosfato, el educto glucósido, el fosfato y el agua se alimentan, preferiblemente a través de líneas separadas, al recipiente de mezcla (8), donde opcionalmente el agua se puede dosificar mediante un dispositivo de ajuste de la concentración del agua (6) y opcionalmente el fosfato se puede dosificar mediante un dispositivo de ajuste de la concentración del fosfato de (7). Esta mezcla, que preferentemente todavía no contiene enzima, posteriormente se puede preparar para la reacción, preferiblemente mediante un dispositivo de filtración estéril, calefacción, desinfección UV (9), o una combinación de dichos procesos. Las dos enzimas preferentemente se proporcionan en una depósito de materia prima para la fosforilasa del educto glucósido y la fosforilasa del producto glucósido (11ab). La mezcla de las enzimas preferiblemente primero se pretrata en un dispositivo de filtración estéril de la fosforilasa del educto glucósido y de la fosforilasa del producto glucósido (12ab) antes ser alimentadas a través de líneas correspondiente al reactor de un solo recipiente, es decir al reactor para la reacción catalizada por la fosforilasa del educto glucósido y para la reacción catalizada por la fosforilasa del producto glucósido (10ab), donde se combina con la mezcla filtrada en condiciones estériles y/o calentada y/o desinfectada por UV de los reactivos (pasos (a) y (c)). En una variante preferida de este procedimiento (indicada por la línea discontinua), el reactivo para la glucosa-1-fosfato no se alimenta al recipiente de mezcla (8), sino al dispositivo de filtración estéril de la fosforilasa del educto glucósido y de la fosforilasa del producto glucósido (12ab) y allí se combina con la enzimas (opción alimentación-lote).

Las dos reacciones de acuerdo con las etapas (b) y (d) tienen lugar entonces simultáneamente en el reactor de un solo recipiente (10ab).

El aislamiento de acuerdo con la etapa (e) y la etapa opcional (f) tiene lugar entonces preferiblemente vía una pluralidad de etapas. La composición producto del reactor de un solo recipiente (10ab) preferiblemente primero se pretrata en un dispositivo de ultrafiltración (13), así se separan los componentes, en particular las enzimas, que preferentemente se devuelven al reactor. La mezcla preferiblemente así pretratada se alimenta entonces preferiblemente a un dispositivo de electrodiálisis (14). A la electrodiálisis (14) se suministra preferiblemente KNO_3 líquido como solución de lavado de electrodo desde un depósito de materia prima de nitrato potásico (16). La fase acuosa de la electrodiálisis (14), que tiene un producto pobre y contenido en fosfato y está opcionalmente enriquecida con glucosa-1-fosfato sin reaccionar, se trata preferiblemente en un dispositivo de decoloración (15) y finalmente se devuelve al dispositivo de ajuste de la concentración de agua (6) y al dispositivo de ajuste de la concentración de fosfato (7). Alternativamente, puede realizarse una electrodiálisis adicional (no mostrada) para obtener glucosa-1-fosfato. La fase rica en producto de la electrodiálisis (14) preferentemente se trata en un dispositivo de cristalización (17) del producto glucósido, de la que la fase vapor preferentemente se hace pasar a un dispositivo de condensación (18). En una prensa centrífuga/filtro (19), el producto glucósido cristalizado preferiblemente se separa de la fase líquida con una pureza > 98% (20) y preferentemente se seca en un dispositivo de secado (21) para dar el producto glucósido puro (22). El licor madre de la prensa centrífuga/filtro (19), es decir la solución que comprende producto glucósido, coproducto y el reactivo para la glucosa-1-fosfato (23), preferentemente se separa en un dispositivo SMB (cromatografía de lecho móvil simulado) (24), produciendo la cromatografía preferiblemente tres corrientes: una corriente que comprende el coproducto, una corriente que comprende el reactivo no reaccionado para la glucosa-1-fosfato y una corriente que comprende producto glucósido. Preferentemente, la corriente que comprende el coproducto del dispositivo SMB (24) se trata en un dispositivo adicional de cristalización (25) y el coproducto cristalizado preferiblemente se seca en un dispositivo de secado (26), obteniéndose un coproducto seco y puro (27). Alternativamente, la corriente que comprende el coproducto se concentra en un evaporador y se decolora, obteniéndose una solución de coproducto líquido concentrado (no mostrado). La fase de vapor del dispositivo adicional de cristalización (25) o del evaporador de concentración se condensa preferiblemente en un dispositivo adicional de condensación (28) y preferentemente se devuelve también al dispositivo de ajuste de la concentración de agua (6) y al dispositivo de ajuste de la concentración de fosfato (7). La corriente que comprende el reactivo para la glucosa-1-fosfato no reaccionado del dispositivo SMB (24) se devuelve preferiblemente al recipiente de mezcla (8). La corriente que comprende el producto glucósido del dispositivo SMB (24) preferentemente se retorna al dispositivo de cristalización (17).

La Figura 6 muestra un procedimiento de referencia como un proceso de dos recipientes, donde las etapas (b) y (d) se llevan a cabo separadas espacialmente una de otra en diferentes reactores. Al contrario que en el procedimiento de acuerdo con la Figura 5, los reactores (10a) y (10b) están separados y se les suministra por separado desde el depósito de materia prima (11a) la fosforilasa del educto glucósido y desde el depósito de materia prima (11b) la fosforilasa del producto glucósido, preferentemente primero se lleva a cabo una filtración estéril en cada caso en el dispositivo de filtración estéril de la fosforilasa del educto glucósido (12a) y en el

dispositivo de filtración estéril de la fosforilasa del producto glucósido (12b). Además, la mezcla de producto que sale del reactor (10b) preferiblemente se alimenta a un dispositivo adicional de ultrafiltración (29).

Lista de números de referencia:

- | | | |
|----|-----|---|
| | 1 | Depósito de materia prima del reactivo para la glucosa-1fosfato |
| 5 | 2 | Depósito de materia prima para el educto glucósido |
| | 3 | Depósito de materia prima para el fosfato |
| | 4 | Tanque de agua |
| | 5 | Dispositivo de ablandamiento, tratamiento (intercambio iónico, ósmosis inversa) |
| | 6 | Dispositivo de ajuste de la concentración de agua |
| 10 | 7 | Dispositivo de ajuste de la concentración de fosfato |
| | 8 | Recipiente de mezclado |
| | 9 | Dispositivo de filtración estéril/calefacción/desinfección UV |
| | 10a | Reactor para la reacción de catálisis por la fosforilasa del educto glucósido |
| | 10b | Reactor para la reacción de catálisis por la fosforilasa del producto glucósido |
| 15 | 11a | Depósito de materia prima para la fosforilasa del educto glucósido |
| | 11b | Depósito de materia prima para la fosforilasa del producto glucósido |
| | 12a | Dispositivo de filtración estéril de la fosforilasa del educto glucósido |
| | 12b | Dispositivo de filtración estéril de la fosforilasa del producto glucósido |
| | 13 | Dispositivo de ultrafiltración |
| 20 | 14 | Dispositivo de electrodiálisis (membrana) |
| | 15 | Depósito de materia prima para el nitrato de potasio (liq.) |
| | 17 | Dispositivo de cristalización |
| | 18 | Dispositivo de condensación |
| | 19 | Centrífuga/filtro prensa |
| 25 | 20 | Producto glucósido pureza <98% |
| | 21 | Dispositivo de secado |
| | 22 | Producto glucósido, puro, seco |
| | 23 | Solución que comprende producto glucósido, coproducto y el reactivo para la glucosa-1-fosfato |
| | 24 | Dispositivo SMB (cromatografía de lecho móvil simulado) |
| 30 | 25 | Dispositivo de cristalización adicional |
| | 26 | Dispositivo de secado |
| | 27 | Coproducto, puro, seco |
| | 28 | Dispositivo adicional de condensación |
| | 29 | Dispositivo adicional de ultrafiltración |
- 35 Un aspecto adicional de la invención se refiere a una composición que comprende un producto glucósido y es obtenible mediante el procedimiento anteriormente descrito de acuerdo con la invención. Preferiblemente, la composición no contiene esencialmente fosfato. Se ha encontrado que, cuando la separación del fosfato de la segunda composición producto, por ejemplo por electrodiálisis, del producto glucósido, esto es celobiosa, se puede cristalizar de manera más eficiente. Además, la separación del fosfato permite su reciclaje cuantitativa o casi cuantitativamente como reactivo para la etapa (b). Sorprendentemente, se ha encontrado que un reciclaje cuantitativo o casi cuantitativo de fosfato por técnicas de membrana, tales como electrodiálisis, es posible incluso en presencia de altas concentraciones de monosacáridos (esto es glucosa sin reaccionar, fructosa y similares).
- 40

Los ejemplos siguientes ilustran la invención, pero no se han de interpretar como limitativos:

45 Ejemplo de Evaluación:

Para evaluar la idoneidad de las fosforilasas del educto glucósido y de las fosforilasas del producto glucósido para el procedimiento según la invención, se clonaron y expresaron diversos candidatos en *E. coli*.

- Los genes se clonaron en el vector pLEIA27 para la expresión nativa en *E. coli* (sin etiqueta de purificación). Para la expresión de los genes de fosforilasa, *E. coli* BL21 (DE3) se transformó con los vectores preparados.
- 50 La expresión se realizó en medio LB en matraces agitados escalados a 25 ml. Una vez que los cultivos alcanzaron una densidad óptica (OD₆₀₀) de 0,6-0,8, se indujo la expresión con IPTG 0,1 mM y se cultivaron las células durante 20 h a 30°C. La biomasa húmeda se trató con ultrasonidos y los fragmentos celulares y los insolubles se separaron del extracto bruto por centrifugación. La cantidad total de enzima producida se determinó por análisis SDS-PAGE. Además, se determinó qué porción estaba activa y disuelta en el lisado celular y qué porción estaba presente en cuerpos de inclusión. Además, se midió la actividad en volumen de la fosforilasa del extracto crudo a temperatura ambiente.
- 55

Los resultados se resumen en la siguiente tabla:

	Organismo	Expresión	Solubilidad	OD ₆₀₀ [20h]	U/l cultivo	U/l relativas a OD ₆₀₀ =1
celobiosa-fosfato ₁	<i>Cellulomonas uda</i>	+++	90%	3.8	3380	890
	<i>Cellvibrio gilvus</i>	++	40%	3.0	390	130
	<i>Thermotoga neapolitana</i>	++	5%	3.9	1290	330
	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	+	30%	4.4	700	160
	<i>Paenibacillus polymyxa</i>	++	40%	4.0	160	40
	<i>Bifidobacterium dentium</i>	+++	60%	4.5	2610	580
	rel. <i>Prevotella</i> sp.	+	30%	2.4	48	20
	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	+	90%	2.0	3800	1900
sacarosa-fosfato	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+++	0%	4.0	0	0
	<i>Pseudomonas saccharophila</i>	++	0%	5.6	0	0
	<i>Clostridium saccharolyticum</i>	++	40%	4.7	240	50
	<i>Streptococcus mutans</i>	++	50%	4.0	4120	1030
	<i>Roseobacter</i> sp.	++	0%	4.4	0	
	rel. <i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	+++	40%	4.0	5160	1290
	rel. <i>Streptococcus mitis</i>	+++	0%	3.3	0	0

Ejemplo 1 (enzimas no inmovilizadas, reacción de dos etapas):

- 256 g de sacarosa se disuelven en 1 litro de agua con 48 g de dihidrogenofosfato de sodio (NaH₂PO₄) y 57 g de hidrogenofosfato disódico (Na₂HPO₄) o 70 g de hidrogenofosfato dipotásico (K₂HPO₄) y 48 g de dihidrogenofosfato de potasio (KH₂PO₄). La solución de proceso se lleva a una temperatura de 30°C en un reactor de recipiente agitado, iniciándose la reacción por la adición de 5 kU de sacarosa-fosforilasa de *Bifidobacterium adolescentis*. El valor pH de la solución de proceso es 6,5 y, si es necesario, se corrige con ácido fosfórico o hidróxido sódico o potásico. La reacción se desarrolla durante 20 horas. La solución de reacción se ultrafiltra a través de una membrana de PES (polietersulfona) con un tamaño de poro de 10 kDa.

Opción 1: Para separar la sacarosa, la solución de proceso ultrafiltrada se filtra con una membrana de nanofiltración y se separa la sacarosa residual.

Opción 2: Para retener sacarosa como educto, se separan por electrodiálisis glucosa-1-fosfato, monosacáridos y sales fosfato.

- Se añade el permeado equimolar a la glucosa-1-fosfato con glucosa como reactivo en un reactor de recipiente agitado y se lleva a una temperatura de reacción de 30°C (concentración final de glucosa-1-fosfato en la primera composición producto: aproximadamente 0,5 M). La reacción se inicia por adición de 3 kU de celobiosa-fosforilasa de *Cellulomonas uda*. La reacción transcurre a pH 6,5 durante 20 horas. Cuando se ha alcanzado un rendimiento de al menos el 50%, la solución de reacción se somete a nanofiltración (opcionalmente multietapa) con membranas de tipo GE Desal NF-DL3840-30D o tipo Koch Membrane Systems NF-3839 SR3D-NYV o por cromatografía, y se separan así los monosacáridos, como glucosa y fructosa, contenidos en la solución de proceso.

- Se añade etanol se añade a la corriente de producto que comprende celobiosa en un reactor de recipiente agitado, precipitando la celobiosa de la solución en forma de un sólido amorfo. El sólido se seca en un secador flash de cinta/giro. Alternativamente, la corriente de producto que comprende celobiosa se alimenta a la cristalización sin separación previa de los monosacáridos, y se obtiene celobiosa en forma cristalina. Los cristales se secan entonces con aire caliente.

- Para algunas aplicaciones, el sólido se disuelve en agua y se purifica en columna de cromatografía y se decolora. La solución producto que comprende celobiosa se seca en un secador por pulverización. Para otras aplicaciones, el sólido secado en el secador flash de giro puede utilizarse sin procesamiento adicional o se puede convertir en un producto comprimido estable al almacenamiento por compactación.

Ejemplo 2 de referencia (enzima inmovilizada):

- 10 g de un portador amino-funcionalizado comercial (por ejemplo de Purolite o Resindion) se suspenden con un 1% (v/v) de glutadialdehído en 40 ml de un tampón fosfato de potasio 20 mM (pH 8,0) y se incuban durante 2 horas con agitación a temperatura ambiente. Los soportes activados se lavan a continuación 2 veces con 40 ml de un tampón fosfato de potasio 20 mM (pH 8,0) y una vez con 40 ml de un tampón fosfato de potasio 50 mM (pH 7,0). Se completan 29 kU de la sacarosa-fosforilasa de *Bifidobacterium adolescentis* o 0,6-1,2 kU de celobiosa-fosforilasa de *Cellulomonas uda* hasta 40 ml en tampón fosfato de potasio 30 mM (pH 7,0). Esta solución enzima-tampón se incuba durante 20 horas con agitación a temperatura ambiente. Los inmovilizados se lavan a continuación 3 veces con tampón fosfato 750 mM (pH 6,5) y finalmente 1x con tampón fosfato 50 mM. Se determina la actividad de los inmovilizados, y se emplean 5 kU de sacarosa-fosforilasa inmovilizada de *Bifidobacterium adolescentis* y 3 kU de celobiosa-fosforilasa de *Cellulomonas uda* por litro de solución de sustrato respectivo de forma análoga al Ejemplo 1 para la primera etapa de reacción. Los inmovilizados se recuperan por sedimentación o filtración. El procesamiento de las corrientes de producto y del producto final se lleva también de manera análoga al Ejemplo 1.

Ejemplo 3: Reacción "un-recipiente" (enzimas no inmovilizadas, reacción de una sola etapa)

- 256 g de sacarosa se disponen en un recipiente de reacción con 60 g de dihidrogenofosfato de potasio (K_2HPO_4), 98 g de hidrogenofosfato dipotásico (KH_2PO_4) y 90 g de glucosa, y la mezcla se completa hasta 1 litro con agua (735 ml) y se disuelve. La solución de proceso se lleva a una temperatura de reacción de 30° C en un reactor de recipiente agitado, iniciándose la reacción por adición de 5 kU de sacarosa-fosforilasa de *Bifidobacterium adolescentis* y 3 kU de celobiosa-fosforilasa de *Cellulomonas uda* por litro. El valor pH de la solución de proceso es 6,5 y se corrige, si es necesario, con ácido fosfórico o hidróxido sódico o potásico. La reacción se desarrolla durante aproximadamente 20 horas. La solución de reacción se ultrafiltra a través de una membrana de PES (polietersulfona) con un tamaño de poro de 10 kDa. El procesamiento de las corrientes de producto y del producto final se lleva también de manera análoga al Ejemplo 1.

Listado de secuencias

<110> Pfeifer & Langen GmbH & Co. KG

<120> Procedimiento para la preparación enzimática de un producto glucósido y de un coproducto a partir de un educto glucósido

5 <130> PFL0003-WO

<150> EP14184301 <151> 2014-09-10

<150> EP14190891 <151> 2014-10-29

<160> 3

<170> PatentIn version 3.5

10 <210> 1

<211> 504

<212> PRT

<213> Bifidobacterium adolescentes

<400> 1

Met Lys Asn Lys Val Gln Leu Ile Thr Tyr Ala Asp Arg Leu Gly Asp
1 5 10 15

Gly Thr Ile Lys Ser Met Thr Asp Ile Leu Arg Thr Arg Phe Asp Gly
20 25 30

Val Tyr Asp Gly Val His Ile Leu Pro Phe Phe Thr Pro Phe Asp Gly
35 40 45

Ala Asp Ala Gly Phe Asp Pro Ile Asp His Thr Lys Val Asp Glu Arg
50 55 60

Leu Gly Ser Trp Asp Asp Val Ala Glu Leu Ser Lys Thr His Asn Ile
65 70 75 80

Met Val Asp Ala Ile Val Asn His Met Ser Trp Glu Ser Lys Gln Phe
85 90 95

Gln Asp Val Leu Ala Lys Gly Glu Glu Ser Glu Tyr Tyr Pro Met Phe
100 105 110

Leu Thr Met Ser Ser Val Phe Pro Asn Gly Ala Thr Glu Glu Asp Leu
115 120 125

Ala Gly Ile Tyr Arg Pro Arg Pro Gly Leu Pro Phe Thr His Tyr Lys
130 135 140

15 Phe Ala Gly Lys Thr Arg Leu Val Trp Val Ser Phe Thr Pro Gln Gln
145 150 155 160

Val Asp Ile Asp Thr Asp Ser Asp Lys Gly Trp Glu Tyr Leu Met Ser
165 170 175

Ile Phe Asp Gln Met Ala Ala Ser His Val Ser Tyr Ile Arg Leu Asp
180 185 190

ES 2 745 449 T3

Ala Val Gly Tyr Gly Ala Lys Glu Ala Gly Thr Ser Cys Phe Met Thr
195 200 205

Pro Lys Thr Phe Lys Leu Ile Ser Arg Leu Arg Glu Glu Gly Val Lys
210 215 220

Arg Gly Leu Glu Ile Leu Ile Glu Val His Ser Tyr Tyr Lys Lys Gln
225 230 235 240

Val Glu Ile Ala Ser Lys Val Asp Arg Val Tyr Asp Phe Ala Leu Pro
245 250 255

Pro Leu Leu Leu His Ala Leu Ser Thr Gly His Val Glu Pro Val Ala
260 265 270

His Trp Thr Asp Ile Arg Pro Asn Asn Ala Val Thr Val Leu Asp Thr
275 280 285

His Asp Gly Ile Gly Val Ile Asp Ile Gly Ser Asp Gln Leu Asp Arg
290 295 300

Ser Leu Lys Gly Leu Val Pro Asp Glu Asp Val Asp Asn Leu Val Asn
305 310 315 320

Thr Ile His Ala Asn Thr His Gly Glu Ser Gln Ala Ala Thr Gly Ala
325 330 335

Ala Ala Ser Asn Leu Asp Leu Tyr Gln Val Asn Ser Thr Tyr Tyr Ser
340 345 350

Ala Leu Gly Cys Asn Asp Gln His Tyr Ile Ala Ala Arg Ala Val Gln
355 360 365

Phe Phe Leu Pro Gly Val Pro Gln Val Tyr Tyr Val Gly Ala Leu Ala
370 375 380

Gly Lys Asn Asp Met Glu Leu Leu Arg Lys Thr Asn Asn Gly Arg Asp
385 390 395 400

Ile Asn Arg His Tyr Tyr Ser Thr Ala Glu Ile Asp Glu Asn Leu Lys
405 410 415

Arg Pro Val Val Lys Ala Leu Asn Ala Leu Ala Lys Phe Arg Asn Glu
420 425 430

Leu Asp Ala Phe Asp Gly Thr Phe Ser Tyr Thr Thr Asp Asp Asp Thr
435 440 445

Ser Ile Ser Phe Thr Trp Arg Gly Glu Thr Ser Gln Ala Thr Leu Thr
450 455 460

Phe Glu Pro Lys Arg Gly Leu Gly Val Asp Asn Thr Thr Pro Val Ala
465 470 475 480

ES 2 745 449 T3

Met Leu Glu Trp Glu Asp Ser Ala Gly Asp His Arg Ser Asp Asp Leu
485 490 495

Ile Ala Asn Pro Pro Val Val Ala
500

<210> 2
<211> 822
<212> PRT
5 <213> Cellulomonas uda

<400> 2

Met Arg Tyr Gly His Phe Asp Asp Glu Ala Arg Glu Tyr Val Ile Thr
1 5 10 15

Thr Pro His Thr Pro Tyr Pro Trp Ile Asn Tyr Leu Gly Ser Glu Gln
20 25 30

Phe Phe Ser Leu Leu Ser His Gln Ala Gly Gly Tyr Ser Phe Tyr Arg
35 40 45

Asp Ala Lys Met Arg Arg Leu Thr Arg Tyr Arg Tyr Asn Asn Ile Pro
50 55 60

Ala Asp Ala Gly Gly Arg Tyr Leu Tyr Val Asn Asp Gly Gly Asp Val
65 70 75 80

Trp Thr Pro Ser Trp Leu Pro Val Lys Ala Asp Leu Asp His Phe Glu
85 90 95

Ala Arg His Gly Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Thr Gly Glu Arg Asn Gly
100 105 110

Val Arg Val Glu Thr Leu Phe Phe Val Pro Val Gly Glu Asn Ala Glu
115 120 125

Val Gln Lys Val Thr Val Thr Asn Thr Ser Asp Ser Tyr Lys Ser Leu
130 135 140

Thr Leu Phe Ser Phe Val Glu Phe Cys Leu Trp Asn Ala Gln Asp Asp
145 150 155 160

Gln Thr Asn Tyr Gln Arg Asn Leu Ser Ile Gly Glu Val Glu Val Glu
165 170 175

Gln Glu Ser Pro His Gly Ser Ala Ile Tyr His Arg Thr Glu Tyr Arg
180 185 190

Glu Arg Arg Asp His Tyr Ala Val Phe Ala Val Asn Thr Gln Ala Glu
195 200 205

Gly Phe Asp Thr Asp Arg Asp Thr Phe Val Gly Ala Tyr Asn Ser Leu
210 215 220

ES 2 745 449 T3

Gly Glu Ala Ala Val Pro Leu Lys Gly Glu Ser Ala Asn Ser Val Ala
 225 230 235 240
 Ser Gly Trp Tyr Pro Ile Gly Ser His Ser Val Ala Val Ser Leu Ala
 245 250 255
 Pro Gly Glu Ser Arg Glu Leu Val Tyr Val Leu Gly Tyr Val Glu Asn
 260 265 270
 Pro Asp Glu Glu Lys Trp Ala Asp Asp Ala Lys Gln Val Val Asn Lys
 275 280 285
 Glu Arg Ala His Ala Leu Leu Ser Arg Phe Ala Thr Ser Glu Gln Thr
 290 295 300
 Asp Ala Ala Phe Ala Ala Leu Lys Asp Tyr Trp Thr Asp Leu Leu Ser
 305 310 315 320
 Thr Tyr Ser Val Ser Ser Asn Asp Glu Lys Leu Asp Arg Met Val Asn
 325 330 335
 Ile Trp Asn Gln Tyr Gln Cys Met Val Thr Phe Asn Met Ser Arg Ser
 340 345 350
 Ala Ser Phe Phe Glu Thr Gly Ile Gly Arg Gly Met Gly Phe Arg Asp
 355 360 365
 Ser Asn Gln Asp Leu Leu Gly Phe Val His Leu Ile Pro Glu Arg Ala
 370 375 380
 Arg Glu Arg Ile Ile Asp Ile Ala Ser Thr Gln Phe Ala Asp Gly Ser
 385 390 395 400
 Ala Tyr His Gln Tyr Gln Pro Leu Thr Lys Arg Gly Asn Asn Asp Ile
 405 410 415
 Gly Ser Gly Phe Asn Asp Asp Pro Leu Trp Leu Ile Ala Gly Thr Ala
 420 425 430
 Ala Tyr Ile Lys Glu Thr Gly Asp Phe Ser Ile Leu Asp Glu Pro Val
 435 440 445
 Pro Phe Asp Asn Glu Pro Gly Ser Glu Val Pro Leu Phe Glu His Leu
 450 455 460
 Thr Arg Ser Phe Glu Phe Thr Val Thr His Arg Gly Pro His Gly Leu
 465 470 475 480
 Pro Leu Ile Gly Arg Ala Asp Trp Asn Asp Cys Leu Asn Leu Asn Cys
 485 490 495
 Phe Ser Thr Thr Pro Gly Glu Ser Phe Gln Thr Thr Glu Asn Gln Ala
 500 505 510

ES 2 745 449 T3

Gly Gly Val Ala Glu Ser Thr Phe Ile Ala Ala Gln Phe Val Leu Tyr
 515 520 525
 Gly Glu Gln Tyr Ala Glu Leu Ala Ala Arg Arg Gly Leu Ala Asp Val
 530 535 540
 Ala Asp Arg Ala Arg Gly His Val Ala Glu Met Arg Asp Ala Leu Leu
 545 550 555 560
 Thr Asp Gly Trp Asp Gly Ser Trp Phe Leu Arg Ala Tyr Asp Tyr Tyr
 565 570 575
 Gly Asn Pro Ile Gly Thr Asp Ala His Asp Glu Gly Lys Ile Trp Ile
 580 585 590
 Glu Pro Gln Gly Phe Ala Val Met Ala Gly Val Gly Val Gly Glu Gly
 595 600 605
 Pro Gln Asp Thr Asp Ala Pro Ala Ile Lys Ala Leu Asp Ser Val Asn
 610 615 620
 Glu Met Leu Ala Thr Asp His Gly Met Val Leu Gln Tyr Pro Ala Tyr
 625 630 635 640
 Thr Thr Tyr Gln Val His Met Gly Glu Val Ser Thr Tyr Pro Pro Gly
 645 650 655
 Tyr Lys Glu Asn Gly Gly Ile Phe Cys His Asn Asn Pro Trp Val Ile
 660 665 670
 Ile Ala Glu Thr Val Val Gly Arg Gly Gly Arg Ala Phe Asp Tyr Tyr
 675 680 685
 Lys Arg Ile Thr Pro Ala Tyr Arg Glu Asp Ile Ser Asp Val His Arg
 690 695 700
 Leu Glu Pro Tyr Val Tyr Ala Gln Met Ile Ala Gly Lys Glu Ala Val
 705 710 715 720
 Arg His Gly Glu Ala Lys Asn Ser Trp Leu Thr Gly Thr Ala Ala Trp
 725 730 735
 Asn Phe Val Thr Val Ser Gln Tyr Leu Leu Gly Val Arg Pro Glu Tyr
 740 745 750
 Asp Gly Leu Val Val Asp Pro Gln Ile Gly Pro Asp Val Pro Ser Phe
 755 760 765
 Thr Val Thr Arg Val Ala Arg Gly Ala Thr Tyr Glu Ile Thr Val Thr
 770 775 780
 Asn Ser Gly Thr Asp Gly Ser Arg Gly Arg Leu Val Val Asp Gly Thr
 785 790 795 800

ES 2 745 449 T3

Pro Val Glu Gly Asn Leu Val Pro Tyr Ala Pro Ala Gly Ser Thr Val
805 810 815

Arg Val Asp Val Thr Leu
820

<210> 3
<211> 822
<212> PRT
5 <213> artificial

<220>

<223> secuencia modificada tipo salvaje

<400> 3

Met Arg Tyr Gly His Phe Asp Asp Glu Ala Arg Glu Tyr Val Ile Thr
1 5 10 15

Thr Pro His Thr Pro Tyr Pro Trp Ile Asn Tyr Leu Gly Ser Glu Gln
20 25 30

Phe Phe Ser Leu Leu Ser His Gln Ala Gly Gly Tyr Ser Phe Tyr Arg
35 40 45

Asp Ala Lys Met Arg Arg Leu Thr Arg Tyr Arg Tyr Asn Asn Ile Pro
50 55 60

Ala Asp Ala Gly Gly Arg Tyr Leu Tyr Val Asn Asp Gly Gly Asp Val
65 70 75 80

Trp Thr Pro Ser Trp Leu Pro Val Lys Ala Asp Leu Asp His Phe Glu
85 90 95

Ala Arg His Gly Leu Gly Tyr Ser Thr Ile Thr Gly Glu Arg Asn Gly
100 105 110

Val Arg Val Glu Thr Leu Phe Phe Val Pro Val Gly Glu Asn Ala Glu
115 120 125

Val Gln Lys Val Thr Val Thr Asn Thr Ser Asp Ser Tyr Lys Ser Leu
130 135 140

Thr Leu Phe Ser Phe Val Glu Phe Cys Leu Trp Asn Ala Gln Asp Asp
145 150 155 160

Met Thr Asn Tyr Gln Arg Asn Leu Val Ile Gly Glu Val Glu Val Glu
165 170 175

Gln Glu Ser Pro His Gly Ser Ala Ile Tyr His Lys Thr Glu Tyr Arg
180 185 190

Glu Arg Arg Asn His Tyr Ala Val Phe Ala Val Asn Thr Gln Ala Glu
195 200 205

ES 2 745 449 T3

Gly Phe Asp Thr Asp Arg Asp Thr Phe Val Gly Leu Tyr Asn Ser Leu
 210 215 220
 Gly Glu Ala Ala Val Pro Leu Lys Gly Glu Ser Ala Asn Ser Val Ala
 225 230 235 240
 Ser Gly Trp Tyr Pro Ile Gly Ser His Ser Val Ala Val Ser Leu Ala
 245 250 255
 Pro Gly Glu Ser Arg Glu Leu Val Tyr Val Leu Gly Tyr Val Glu Asn
 260 265 270
 Pro Asp Glu Glu Lys Trp Ala Asp Asp Ala Ala Gln Val Val Asn Lys
 275 280 285
 Glu Arg Ala His Ala Leu Leu Ser Arg Phe Ala Thr Ser Glu Gln Thr
 290 295 300
 Asp Ala Ala Phe Ala Ala Leu Lys Asp Tyr Trp Thr Asp Leu Leu Ser
 305 310 315 320
 Thr Tyr Ser Val Ser Ser Asn Asp Glu Lys Leu Asp Arg Met Val Asn
 325 330 335
 Ile Trp Asn Gln Tyr Gln Cys Met Val Thr Phe Asn Met Ser Arg Ser
 340 345 350
 Ala Ser Phe Phe Glu Thr Gly Ile Gly Arg Gly Met Gly Phe Arg Asp
 355 360 365
 Ser Asn Gln Asp Leu Leu Gly Phe Val His Leu Ile Pro Glu Arg Ala
 370 375 380
 Arg Glu Arg Ile Ile Asp Ile Ala Ser Thr Gln Phe Ala Asp Gly Ser
 385 390 395 400
 Ala Tyr His Gln Tyr Gln Pro Leu Thr Lys Arg Gly Asn Asn Asp Ile
 405 410 415
 Gly Ser Gly Phe Asn Asp Asp Pro Leu Trp Leu Ile Ala Gly Thr Ala
 420 425 430
 Ala Tyr Ile Lys Glu Thr Gly Asp Phe Ser Ile Leu Asp Glu Pro Val
 435 440 445
 Pro Phe Asp Asn Glu Pro Gly Ser Glu Val Pro Leu Phe Glu His Leu
 450 455 460
 Thr Arg Ser Phe Glu Phe Thr Val Thr His Arg Gly Pro His Gly Leu
 465 470 475 480
 Pro Leu Ile Gly Arg Ala Asp Trp Asn Asp Cys Leu Asn Leu Asn Cys
 485 490 495
 Phe Ser Thr Thr Pro Gly Glu Ser Phe Gln Thr Thr Glu Asn Gln Val

ES 2 745 449 T3

500										505										510										
Gly	Gly	Val	Ala	Glu	Ser	Thr	Phe	Ile	Ala	Ala	Gln	Phe	Val	Leu	Tyr															
		515					520					525																		
Gly	Glu	Gln	Tyr	Ala	Glu	Leu	Ala	Ala	Arg	Arg	Gly	Leu	Ala	Asp	Val															
	530					535					540																			
Ala	Asp	Arg	Ala	Arg	Gly	His	Val	Ala	Glu	Met	Arg	Asp	Ala	Leu	Leu															
545					550					555				560																
Thr	Asp	Gly	Trp	Asp	Gly	Ser	Trp	Phe	Leu	Arg	Ala	Tyr	Asp	Tyr	Tyr															
				565					570					575																
Gly	Asn	Pro	Ile	Gly	Thr	Asp	Ala	His	Asp	Glu	Gly	Lys	Ile	Trp	Ile															
			580					585					590																	
Glu	Pro	Gln	Gly	Phe	Ala	Val	Met	Ala	Gly	Val	Gly	Val	Gly	Glu	Gly															
		595					600					605																		
Pro	Gln	Asp	Thr	Asp	Ala	Pro	Ala	Ile	Lys	Ala	Leu	Asp	Ser	Val	Asn															
	610					615					620																			
Glu	Met	Leu	Ala	Thr	Asp	His	Gly	Met	Val	Leu	Gln	Tyr	Pro	Ala	Tyr															
625					630					635				640																
Thr	Thr	Tyr	Gln	Val	His	Met	Gly	Glu	Val	Ser	Thr	Tyr	Pro	Pro	Gly															
				645					650					655																
Tyr	Lys	Glu	Asn	Gly	Gly	Ile	Phe	Cys	His	Asn	Asn	Pro	Trp	Val	Ile															
			660					665					670																	
Ile	Ala	Glu	Thr	Val	Val	Gly	Arg	Gly	Gly	Arg	Ala	Phe	Asp	Tyr	Tyr															
		675					680					685																		
Lys	Arg	Ile	Thr	Pro	Ala	Tyr	Arg	Glu	Asp	Ile	Ser	Asp	Val	His	Arg															
	690					695					700																			
Thr	Glu	Pro	Tyr	Val	Tyr	Ala	Gln	Met	Ile	Ala	Gly	Lys	Glu	Ala	Val															
705					710					715				720																
Arg	His	Gly	Glu	Ala	Lys	Asn	Ser	Trp	Leu	Thr	Gly	Thr	Ala	Ala	Trp															
				725					730					735																
Asn	Phe	Val	Thr	Val	Ser	Gln	Tyr	Leu	Leu	Gly	Val	Arg	Pro	Glu	Tyr															
			740					745					750																	

ES 2 745 449 T3

Asp Gly Leu Val Val Asp Pro Gln Ile Gly Pro Asp Val Pro Ser Phe
755 760 765

Thr Val Thr Arg Val Ala Arg Gly Ala Thr Tyr Glu Ile Thr Val Thr
770 775 780

Asn Ser Gly Val Asp Gly Ser Arg Gly Arg Leu Val Val Asp Gly Thr
785 790 795 800

Pro Val Glu Gly Asn Leu Val Pro Tyr Ala Pro Ala Gly Ser Thr Val
805 810 815

Arg Val Asp Val Thr Leu
820

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento enzimático para la preparación de celobiosa y de fructosa a partir de sacarosa, donde el proceso comprende las etapas:
 - 5 a) proporcionar una primera composición educto que comprende una sacarosa-fosforilasa, sacarosa y fosfato;
 - b) hacer reaccionar al menos parte de la sacarosa contenida en la primera composición educto con al menos parte del fosfato contenido en la primera composición educto, con catálisis mediante la sacarosa-fosforilasa, obteniéndose aquí una primera composición producto que comprende fructosa y glucosa-1-fosfato;
 - 10 c) proporcionar una segunda composición educto que comprende celobiosa-fosforilasa, glucosa y al menos parte de la glucosa-1-fosfato obtenida en la etapa (b), y
 - d) hacer reaccionar la glucosa con al menos parte de la glucosa-1-fosfato contenida en la segunda composición educto con catálisis mediante la celobiosa-fosforilasa, obteniéndose una segunda composición producto que comprende celobiosa y fosfato;
 - 15 donde los pasos (b) y (d) se llevan a cabo en un reactor común; y
donde la sacarosa-fosforilasa y la celobiosa-fosforilasa no están inmovilizadas en un soporte sólido ni encerradas en una matriz.
- 20 2. Procedimiento según la reivindicación 1, donde la sacarosa-fosforilasa y/o la celobiosa-fosforilasa se reciclan.
3. Procedimiento según la reivindicación 1 o 2, que se lleva a cabo en un reactor de membrana.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, donde la sacarosa-fosforilasa y/o la celobiosa-fosforilasa no pueden atravesar la membrana del reactor de membrana.
- 25 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las etapas (b) y (d) se llevan a cabo, al menos en parte, simultáneamente.
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la sacarosa-fosforilasa es sacarosa-fosforilasa de tipo salvaje de una bacteria que pertenece al filo *Actinobacteria*, o una sacarosa-fosforilasa que difiere de dicho tipo salvaje pero que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad en comparación con la sacarosa-fosforilasa de tipo salvaje de una bacteria que pertenece al filo *Actinobacteria*.
- 30 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la celobiosa-fosforilasa es celobiosa-fosforilasa de tipo salvaje de una bacteria que pertenece al filo *Actinobacteria*, o una celobiosa-fosforilasa que difiere de dicho tipo salvaje pero que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80% de identidad en comparación con la celobiosa-fosforilasa de tipo salvaje de una bacteria que pertenece al filo *Actinobacteria*.
- 35 8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la concentración de sacarosa en la primera composición educto proporcionada en la etapa (a) es al menos 0,150 mol/l, preferentemente al menos 0,200 mol/l, en especial al menos 0,500 mol/l.
- 40 9. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la concentración de celobiosa en la segunda composición producto obtenida en la etapa (d) es al menos 0,075 mol/l, preferentemente al menos 0,150 mol/l, en especial al menos 0,200 mol/l.
10. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la etapa (b) comprende además el paso subsidiario (b') de separar al menos parte de la glucosa-1-fosfato resultante durante la reacción de sacarosa a glucosa-1-fosfato.
- 45 11. Procedimiento según la reivindicación 10, donde en la etapa (b') la glucosa-1-fosfato se separa mediante electrodiálisis y/o cristalización.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la etapa adicional:
(g) separar el fosfato obtenido en la etapa (d) y opcionalmente retornarlo a la etapa (a).
- 50 13. Procedimiento según la reivindicación 12, donde el fosfato se separa mediante electrodiálisis.

14. Procedimiento según la reivindicación 12 o 13, donde al menos el 50% del fosfato que se ha separado en la etapa (g) es retornado a la etapa (a) como al menos parte del fosfato que está contenido en la primera composición educto.
- 5 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, donde la etapa (g) se lleva a cabo en el tiempo después de la etapa (d).

Figura 1

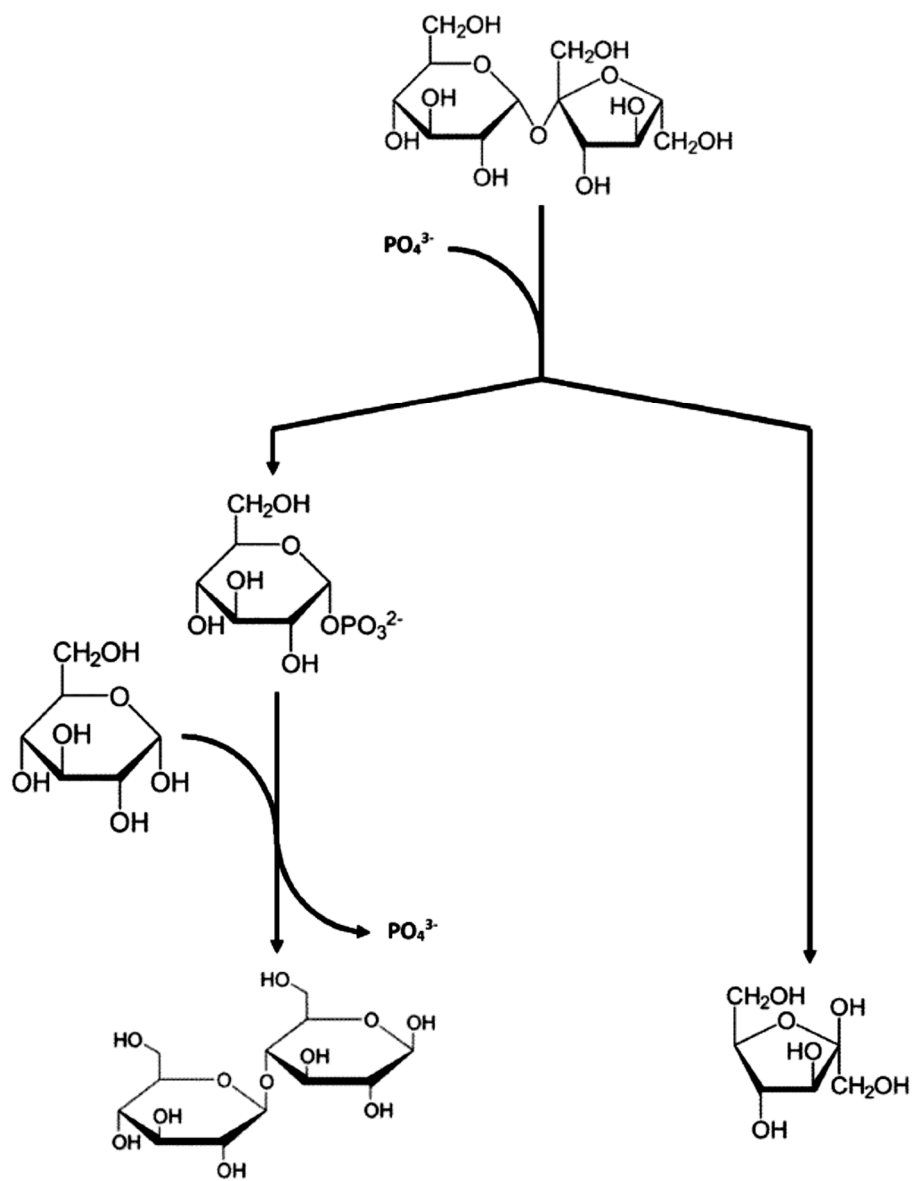


Figura 2

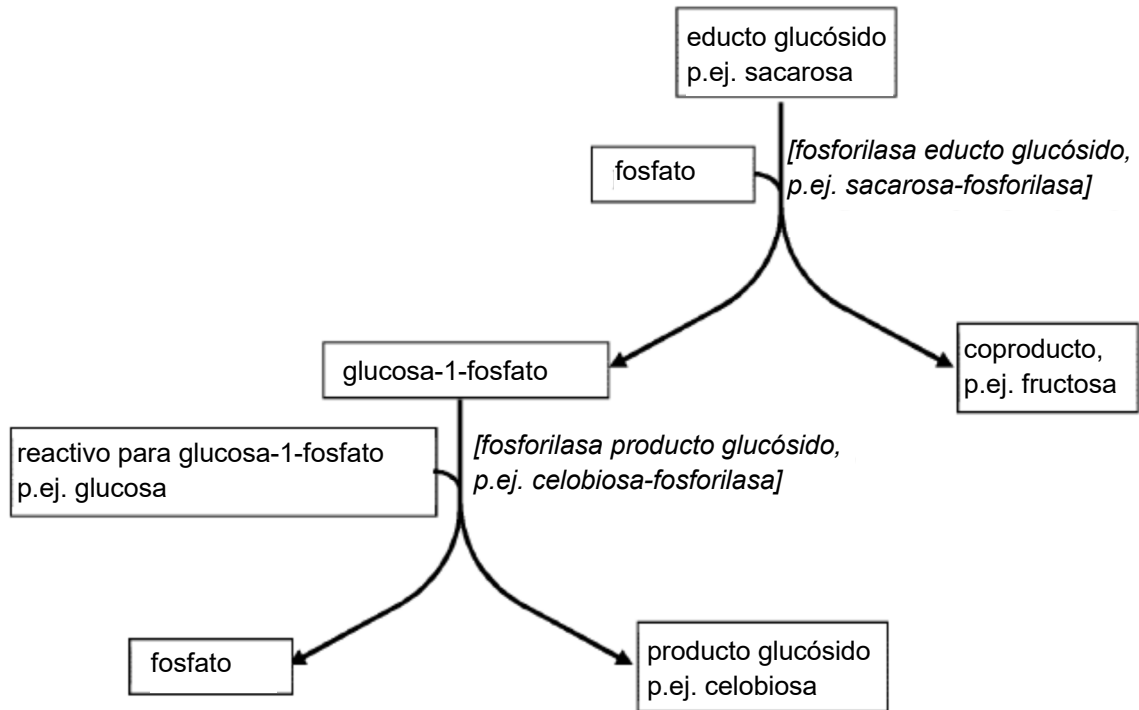


Figura 3

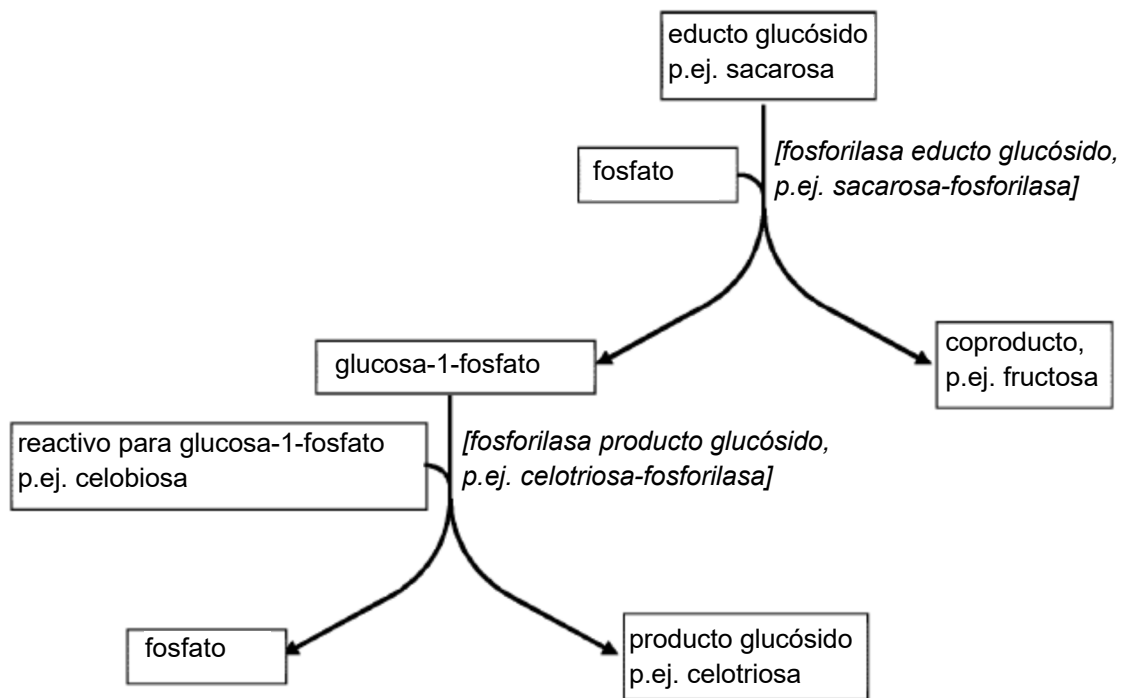


Figura 4

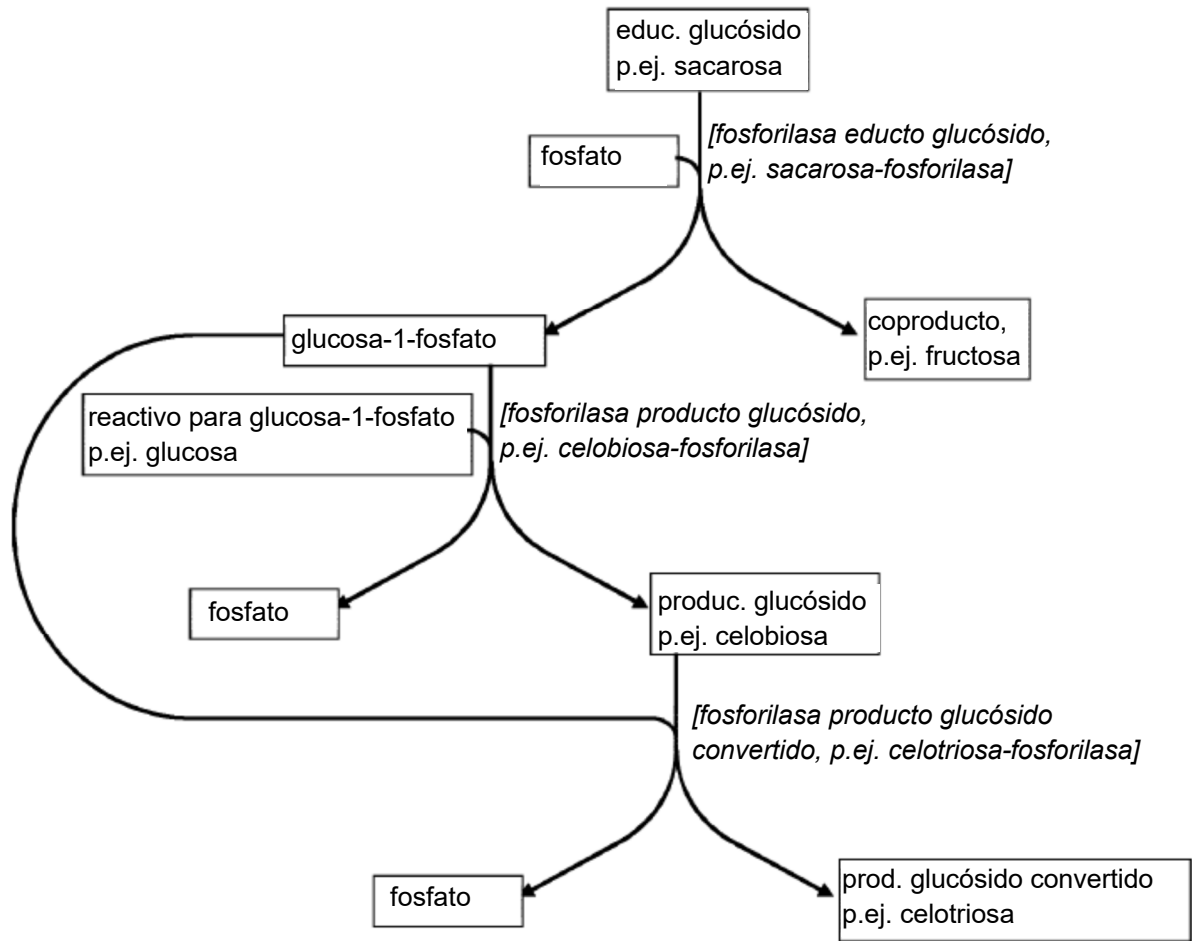


Figura 5

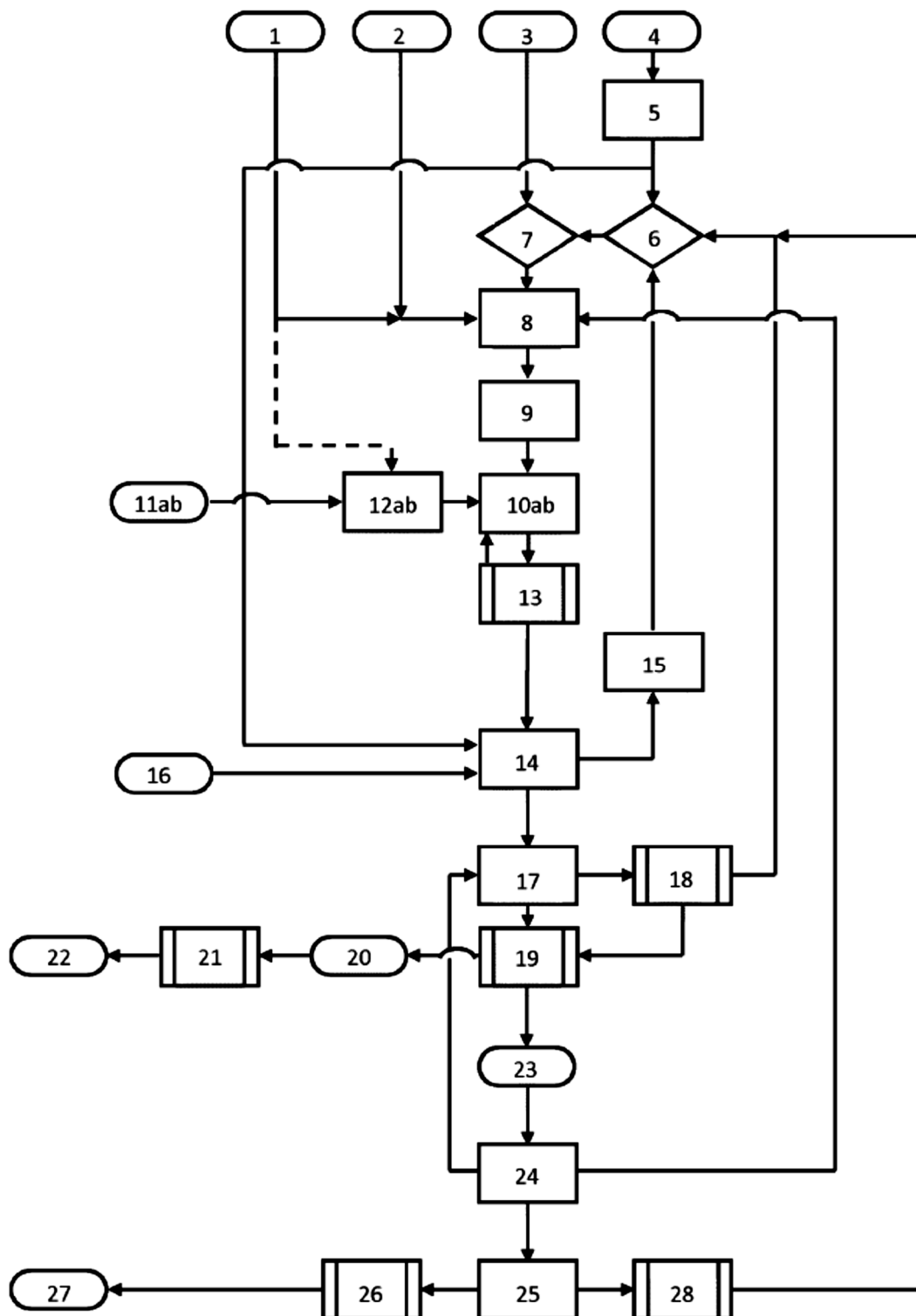


Figura 6

