

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 397 479**

(51) Int. Cl.:

C12N 9/90

(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.11.2007 E 07834204 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2012 EP 2097521**

(54) Título: **Arabinosa isomerasa termófila de calidad alimentaria expresada a partir de gras, y procedimiento de fabricación de tagatosa mediante el uso de la misma**

(30) Prioridad:

27.11.2006 KR 20060117792

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

07.03.2013

(73) Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
500, NAMDAEMUNRO 5-GA
JUNG-GU SEOUL 100-095, KR**

(72) Inventor/es:

**KIM, SEONG-BO;
LEE, YOUNG-MI;
PARK, SEUNG-WON;
KIM, JUNG-HOON;
SONG, SANG-HOON y
LEE, KANG-PYO**

(74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 397 479 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

Arabinosa isomerasa termófila de calidad alimentaria expresada a partir de gras, y procedimiento de fabricación de tagatosa mediante el uso de la misma

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere a una arabinosa isomerasa termófila y a un procedimiento de fabricación de tagatosa usando la misma, y, más precisamente, un gen que codifica arabinosa isomerasa procedente del termófilo *Geobacillus stearothermophilus* DSM22, un vector de expresión recombinante que contiene el gen, a un procedimiento de preparación de una arabinosa isomerasa termófila de calidad alimentaria a partir de la cepa GRAS (Generalmente Reconocida Como Segura) recombinante transformada con dicho vector de expresión, y a un procedimiento de preparación de tagatosa a 10 partir de galactosa, usando dicha enzima.

Antecedentes de la técnica

Con el creciente interés en el bienestar o en la vida sana, la tagatosa ha sido propuesta como una alternativa al azúcar, ya que tiene menos efectos secundarios y el azúcar es uno de los principales factores causantes de diversas enfermedades en adultos. La tagatosa es el isómero de la galactosa y se sabe que tiene propiedades fisicoquímicas similares a la fructosa. La tagatosa es un azúcar natural bajo en calorías y, recientemente, ha sido aprobado por la FDA en los EE.UU. 15 como GRAS (Generalmente Reconocido Como Seguro), de manera que ahora se permite que sea añadida como edulcorante a alimentos, bebidas, alimentos naturales, aditivos dietéticos, etc.

GRAS indica una sustancia que es reconocida generalmente como segura, a juicio de personas especializadas que tienen 20 la experiencia y habilidades suficientes en el examen y los procedimientos científicos en las condiciones indicadas y en el propósito de su uso. GRAS es un sistema único que se usa sólo en los EE.UU. para evaluar la seguridad de alimentos y sustancias químicas alimenticias (bajo ciertas condiciones), pero es reconocido en todo el mundo.

La tagatosa es producida por isomerización, que es un procedimiento químico que usa un catalizador para producir un isómero, de galactosa o un procedimiento biológico que usa isomerasa para convertir enzimáticamente la galactosa.

25 Uno de los procedimientos biológicos bien conocidos por las personas con conocimientos en la materia es la conversión de aldosa o derivados de aldosa en cetosa o derivados de aldosa usando una enzima. Generalmente, la isomerización de galactosa en tagatosa usando arabinosa isomerasa se lleva a cabo termodinámicamente, a alta temperatura, y exhibe una tasa de conversión proporcionalmente alta. Por lo tanto, el desarrollo de una enzima que trabaje de manera estable a alta 30 temperatura y un procedimiento de preparación de tagatosa que usa la misma son técnicas clave para su aplicación industrial en base a la conversión biológica de tagatosa usando una isomerasa. Mediante el cribado de arabinosa isomerasas derivadas de termófilos, se ha ensayado una isomerasa termófila de aplicación industrial, y muchos equipos de investigación se han esforzado también en establecer un procedimiento de isomerización usando la misma.

35 En Corea, Tong Yang Confectionery Corp. ha desarrollado un procedimiento de isomerización enzimática usando arabinosa isomerasa. Según el procedimiento, un gen de arabinosa isomerasa derivada de *E. coli* fue expresado en masa en *E. coli*, usando tecnología recombinante. Esta isomerasa recombinante se hizo reaccionar a 30°C durante 24 horas para convertir la galactosa en tagatosa y, en este momento, la tasa de conversión fue del 25%, lo que indica que tanto la 40 termoestabilidad como el rendimiento de la transformación eran muy bajos (solicitud de patente coreana No. 99-16118). El profesor Oh y sus colegas (Sejong University) tuvieron éxito en la expresión en masa de arabinosa isomerasa procedente de *Geobacillus stearothermophilus* en *E. coli*, usando tecnología recombinante y, en base a esto, propusieron un procedimiento de isomerización a alta temperatura para convertir galactosa en tagatosa. El equipo de Tong Yang Confectionery Corp separó una isomerasa termófila de una zona de aguas termales mediante cribado de la biblioteca 45 microorganismos termófilos y, a continuación, la expresaron como una forma activa en un huésped *E. coli* recombinante para usar galactosa para el procedimiento de isomerización a alta temperatura. De manera similar, CheBiGen Inc. produjo también isomerasa termófila procedente de *Geobacillus dinitrificans* DBG-A1 en *E. coli* y desarrolló una técnica para producir tagatosa por inmovilización, usando la misma.

50 El nivel de expresión de la isomerasa procedente del microorganismo *Geobacillus* es demasiado bajo para ser aplicado en la industria. La producción de tagatosa usando una arabinosa isomerasa derivada de termófilo todavía depende del procedimiento de uso de una enzima recombinante expresada en masa en *E. coli* recombinante o la isomerización de galactosa en tagatosa usando un huésped que contiene la enzima recombinante. Sin embargo, esta producción biotecnológica de tagatosa usando *E. coli* recombinante no es apropiada para la producción de tagatosa como un material alimenticio. Para producir tagatosa como un aditivo alimenticio, la arabinosa isomerasa expresada en un huésped que es un microorganismo GRAS apropiado para la producción en masa de la misma, es esencial.

Los microorganismos GRAS aplicables industrialmente para la producción de una enzima recombinante pueden ser seleccionados de entre un grupo que consiste en *Bacillus sp.*, *Corynebacterium sp.*, y *Lactobacillus sp.* Es fácil manipular

los genes de cepas de *Bacillus sp.* y *Corynebacterium sp.* para la industrialización y el cultivo en masa, y son altamente estables bajo diversas condiciones. De hecho, entre los microorganismos GRAS, principalmente las cepas *Bacillus sp.* y *Corynebacterium sp.* han sido usadas como un huésped para la producción de una enzima recombinante.

- 5 Los presentes inventores tuvieron éxito en la expresión de arabinosa isomerasa termófila procedente de *Geobacillus* como una forma activa en microorganismos GRAS, tales como cepas de *Bacillus sp.* y *Corynebacterium sp.* Los presentes inventores establecieron también un procedimiento para inducir isomerización de galactosa en tagatosa a alta concentración usando dicha enzima recombinante de GRAS expresada.

Divulgación de la invención

Problema técnico

- 10 Un objeto de la presente invención es expresar arabinosa isomerasa procedente de un termófilo como una forma activa a partir de microorganismos GRAS y proporcionar un procedimiento de preparación de tagatosa de calidad alimentaria mediante la isomerización de galactosa.

Solución técnica

- 15 El objeto anterior y otros objetos de la presente invención pueden conseguirse mediante las realizaciones siguientes de la presente invención.

Para conseguir los objetos anteriores, los presentes inventores produjeron una enzima recombinante de calidad alimentaria mediante la introducción de un gen de arabinosa isomerasa termófila derivada del termófilo *Geobacillus stearothermophilus* en un microorganismo GRAS y, de esta manera, produjeron tagatosa a partir de galactosa.

A continuación, la presente invención se describe en detalle.

- 20 Preferentemente, los microorganismos GRAS (Generalmente Reconocidos Como Seguros) de la presente invención incluyen cepas de *Bacillus sp.* y *Corynebacterium sp.*, y *Corynebacterium glutamicum* KCTC 13032 y *Bacillus subtilis* 168 son más preferentes.

Preferentemente, el gen de arabinosa isomerasa de la presente invención procede de un termófilo y, más preferentemente, de *Geobacillus stearothermophilus* DSM22.

- 25 El gen de arabinosa isomerasa de la presente invención puede ser modificado por las personas con conocimientos en la materia usando cualquier procedimiento de mutagénesis convencional, tal como evolución dirigida y mutagénesis dirigida al sitio. De esta manera, cualquier célula huésped que tenga un cierto nivel de homología con un huésped GRAS, por ejemplo, una homología de al menos el 70%, pero preferentemente de al menos el 80% y, más preferentemente, de al menos el 90% con un huésped GRAS, una enzima recombinante que es expresada como una forma activa en el huésped y cualquiera célula huésped que contiene la enzima, están incluidos todos ellos en los criterios de la presente invención.

30 Las realizaciones de la presente invención proporcionan también un vector que contiene un gen que codifica la arabinosa isomerasa de la presente invención. El vector de la presente invención es un vector típico para la clonación o la expresión. El vector no está limitado a un vector específico y cualquier vector conocido por las personas con conocimientos en la materia es aceptable.

- 35 En la presente invención, se usó un promotor que es activo en *Bacillus* y *Corynebacterium* como el vector para expresar una isomerasa termófila como una forma activa.

40 La secuencia promotora usada para la expresión del gen en *Corynebacterium* no ha sido identificada, a diferencia de otros promotores usados en los microorganismos industriales, tales como *E. coli* o *Bacillus subtilis*. En la presente memoria, se ha desarrollado un promotor fuerte procedente de *Corynebacterium*, un microorganismo industrial popular, y que es capaz de ser expresado en *E. coli*. El promotor tac es conocido por ser uno de los promotores más fuertes. El promotor tac se prepara mediante la fusión de una secuencia de la región 35 del promotor del operón de triptófano de *E. coli* con una secuencia de la región 10 del promotor del operón de lactosa de *E. coli*. Se confirmó que el promotor compuesto de CJ-1 en la presente invención era más eficaz en la expresión de un gen objetivo en células bacterianas *Corynebacterium sp.* que el promotor tac (publicación de patente coreana Nº 10-2006-0068505).

- 45 El promotor de *Bacillus* de la invención exhibe actividad promotora no sólo en microorganismos *Bacillus sp.*, sino también en microorganismos *Lactobacillus sp.*, tales como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. El promotor *Corynebacterium* exhibe también actividad promotora tanto en microorganismos *Corynebacterium sp.* como en bacterias *Escherichia sp.* y en células *E. coli*. Particularmente, el promotor de la presente invención mostró una actividad promotora dos veces más fuerte en células bacterianas *Escherichia sp.* que la mostrada por el promotor tac.

Según la presente invención, se preparó una cepa recombinante mediante la transformación de *Bacillus* y *Corynebacterium* con el vector, el cual fue cultivado, a continuación, para proporcionar arabinosa isomerasa de calidad alimentaria. El medio de cultivo y las condiciones dependían del tipo de huésped.

5 Según la presente invención, puede prepararse tagatosa a partir de galactosa usando la arabinosa isomerasa recombinante.

Breve descripción de los dibujos

La aplicación de las realizaciones preferentes de la presente invención se comprende mejor con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

10 La Fig. 1 es un diagrama esquemático que ilustra la construcción del vector de expresión recombinante pHT01-GSA1 que contiene un gen que codifica la arabinosa isomerasa termófila procedente de la cepa *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22,

La Fig. 2 es un diagrama esquemático que ilustra la construcción del vector de expresión recombinante PCJ-1-GSA1 que contiene un gen que codifica la arabinosa isomerasa termófila procedente de la cepa *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22,

15 La Fig. 3 es un gráfico que ilustra la actividad enzimática de la arabinosa isomerasa termófila generada en las células huésped recombinantes de *Bacillus*. A indica la actividad enzimática medida en una solución de enzima cruda obtenida a partir del cultivo de las células huésped (*Bacillus subtilis* 168) sólo, y B indica la actividad enzimática medida en una solución de enzima cruda obtenida del cultivo de las células huésped recombinantes de *Bacillus* (GSAIB -1) que contenían el vector transportador que alberga el gen de isomerasa arabinosa,

20 La Fig. 4 es un gráfico que ilustra las condiciones óptimas para la expresión de la cepa recombinante GSAIB-1 y las condiciones óptimas para la actividad enzimática,

La Fig. 5 es un gráfico que ilustra el crecimiento de la cepa recombinante GSAIC-1 en el medio óptimo.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

25 Las realizaciones prácticas y actualmente preferentes de la presente invención se ilustran tal como se muestra en los ejemplos siguientes.

Sin embargo, las personas con conocimientos en la materia apreciarán, al considerar la presente divulgación, que pueden hacerse modificaciones y mejoras dentro del espíritu y el alcance de la presente invención.

Ejemplo

30 En la realización preferente de la presente invención, un gen que codifica arabinosa isomerasa termófila procedente del hipertermófilo *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22 se insertó en PCJ-1 (vector transportador *E. coli*-*Corynebacterium*, publicación de patente coreana N° 10-2006-0068505) y pHT10 (vector transportador *E. coli*, *Bacillus*, Mo Bi Tech., Goettingen, Alemania). Se transfecaron *Corynebacterium glutamicum* KCTC 13032 y *Bacillus subtilis* 168 con los vectores anteriores, en los que, finalmente, se sobre-expresó dicha proteína. Se cultivaron las cepas recombinantes de *Corynebacterium glutamicum* GSAIC-1 y *Bacillus subtilis* GSAIB-1 y se obtuvieron extractos celulares de cada etapa del cultivo celular. La actividad de producción de tagatosa se determinó midiendo la cantidad de proteína recombinante activa, etapa por etapa. El cultivo resultante, expresado óptimamente, se separó y se purificó mediante tratamiento térmico, lisis celular. La actividad de producción de tagatosa se confirmó mediante la medición de la actividad de la proteína.

Ejemplo 1: Clonación de la arabinosa isomerasa

40 Se cultivó *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22 bajo condiciones aeróbicas. Se centrifugó a 8.000 x g durante 10 minutos para recuperar las células cultivadas. Se extrajo ADN genómico de las células obtenidas usando un kit ADN Midi de cultivo celular (Qiagen, EE.UU.). Se realizó una reacción en cadena de polimerasa (PCR) con el ADN genómico usando los oligonucleótidos 5'-TCTAGAATGATGCTGTCATTACGTCCTTATGAATTTG-3' (SEQ. ID. NO: 1) y 5'-TCTAGATTACCGCCCCGCCAAACACTTCGTTCC-3' (SEQ. ID. NO: 2) con las secuencias de sitio de enzima de restricción XbaI y BamHI como cebadores. El producto 1 de PCR se obtuvo amplificando el ADN de 1.494 pb que contiene el gen de la arabinosa isomerasa procedente de *Geobacillus stearothermophilus*. Se realizó de nuevo una PCR con el ADN genómico usando los oligonucleótidos 5'-CCCGAT ATCATGCTGT-CATTACGTCCTTATG-3' (SEQ. ID. NO: 3) y 5'-TGCACTGCAGTTACCGCCCCGCCAAACAC-3' (SEQ. D. NO: 4) con la inserción de los sitios de enzima de restricción EcoRV y PstI como cebadores. El producto 2 de PCR se obtuvo amplificando el ADN de 1.512 bp que contiene el gen de arabinosa isomerasa procedente de *Geobacillus stearothermophilus*. Para sobre-expresar la arabinosa isomerasa codificada por los dos genes amplificados

anteriores, se usaron un vector transportador pHT01 procedente de *Bacillus sp.* y un vector transportador PCJ-1 procedente de *Corynebacterium sp.* El vector transportador PCJ-1 se introdujo en DH5alpha de *E. coli*, que fue depositado en el Centro Coreano de Cultivos de Microorganismos (Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM), una Autoridad Depositaria Internacional (IDA), el 6 de Noviembre de 2004 (Nº de acceso: KCCM-10611). El vector transportador pHT01 se obtuvo de Mo Bi Tech Co, (PBS001) (Tabla 1).

Tabla 1

Vector	Promotor	Vector	Nº acceso/distribución	Proteína derivada
PCJ-1	Pcj1	pECCG117	KCCM-10611	Proteína de choque térmico hsp60
pHT01	Pgrac	-	PBS001	-

El producto 1 de PCR, digerido con enzimas de restricción XbaI y BamHI, se insertó en el vector transportador pHT01, que fue digerido con las mismas enzimas, conduciendo a la construcción del vector de expresión recombinante pHT01-GSA1 (véase la Fig. 1). El producto 2 de PCR, digerido con enzimas de restricción EcoRV y PstI, se insertó en el vector transportador pCJ-1, que fue digerido con las mismas enzimas de restricción, dando lugar a la construcción del vector de expresión recombinante pCJ-1-GSA1 (véase la Fig. 2). Se transfecaron *Corynebacterium glutamicum* KCTC 13032 y *Bacillus subtilis* 168 con los vectores de expresión recombinantes pHT01-GSA1 y pCJ-1-GSA1 para preparar cepas recombinantes, que se denominaron '*Corynebacterium glutamicum* GSAIC-1' y '*Bacillus subtilis* GSAIB-1'. Las cepas recombinantes se depositaron en el Centro Coreano de Cultivos de Microorganismos (KCCM), una Autoridad Depositaria Internacional (AIF), con la dirección #361-221, Hongje 1-Dong, Seodaemun-gu, Seúl, Corea, el 18 de Octubre de 2006 (Números de acceso: KCCM10789P y KCCM10788P).

Ejemplo 2: Expresión de la arabinosa isomerasa recombinante en *Bacillus*

La cepa recombinante de *Bacillus subtilis* GSAIB-1 preparada en el Ejemplo 1 anterior (Nº de acceso: KCCM10788P) se inoculó en medio LB (Bacto-triptona 10 g/l, extracto de Bacto-levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l) que contenía 20 µg/ml de cloranfenicol, seguido de agitación-cultivo a 230 rpm y 37°C durante 12 horas, resultando en la solución de pre-cultivo. La solución de pre-cultivo se inoculó en el medio de cultivo principal que tenía la misma composición a la concentración del 0,1%, seguido de agitación-cultivo a 230 rpm y 37°C hasta que la DO₆₀₀ alcanzó un valor de 1 para inducir la expresión de la arabinosa isomerasa recombinante. Para medir la actividad enzimática de la arabinosa isomerasa expresada, la solución de cultivo se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos y se recuperaron las células. Las células se suspendieron de nuevo en 50 mM tampón Tris-HCl (pH 8,2), seguido por tratamiento con ultrasonidos (170 W, con refrigeración con hielo a intervalos de 1 segundo/2 minutos) para lisar las células. Se centrifugó de nuevo a 12.000 x g durante 12 minutos para inducir la isomerización de galactosa usando el sobrenadante como una solución de enzima cruda.

La isomerización de galactosa se realizó con una mezcla de 25 µl de galactosa 100 mM y 100 µl de la solución de enzima cruda como un sustrato a 60°C durante 1 hora. Para medir la actividad de isomerización de galactosa, se mezclaron 100 µl de la solución de enzima cruda, que contenía 40 mM de galactosa como sustrato, con 1 ml de tampón de reacción (50 mM Tris-HCl, pH 7,0), seguido de reacción a 65°C durante 20 minutos. En ese momento, se añadieron 5 mM de MgCl₂ y 1 mM de MnCl₂ a la mezcla de reacción. La actividad de la isomerasa se midió mediante el procedimiento cisteína-carbazol-ácido sulfúrico (Dische, Z., y E. Borenfreund., A New Spectrophotometric Method for the Detection and Determination of Keto Sugars and Trioses, J. Biol. Chem., 192:583-587, 1951). La proteína contenida en la solución de enzima cruda se cuantificó con un kit de ensayo Bradford. (BioRad, EE.UU.). Como resultado, la actividad de isomerasa era de 0,2045 ± 0,0078 (mg de tagatosa/mg de proteína.h), lo que indica que el producto de la isomerización de galactosa, tagatosa, se generó correctamente (Fig. 3).

Para proporcionar condiciones óptimas para la expresión de la enzima según la composición de cada solución de cultivo, se usaron los medios MB (Bacto-triptona 10 g/l, extracto de Bacto-levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l, Soytone 10 g/l) y LB (Bacto-triptona 10 g/l, extracto de Bacto-levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l), que han sido usados, en general, para el cultivo de *Bacillus*, como medios básicos. La cepa recombinante GSAIB-1 se inoculó en medio LB (Bacto-triptona 10 g/l, extracto de Bacto-levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l) que contenía cloranfenicol a la concentración de 20 µg/ml, seguido de agitación-cultivo a 230 rpm y 37°C en un incubador con agitación durante 12 horas. La solución de cultivo se usó como una solución de pre-cultivo. La solución de pre-cultivo se inoculó en medio LB que contenía 10 g/l de fuente de carbono (fructosa, glucosa, succinato, sorbitol o sacarosa) y medio MB (Bacto-triptona 10 g/l, extracto de Bacto-levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l, Soytone 10 g/l) a la concentración de 0,1%, seguido de agitación-cultivo a 230 rpm y 37°C en un incubador con agitación hasta que la DO₆₀₀ alcanzó un valor de 1, lo que sugiere que la expresión de la isomerasa arabinosa recombinante fue inducida. El nivel de expresión de la enzima en el medio MB era un 30% inferior que en medio LB. Se investigaron también los

patrones de expresión de proteína según las diferentes fuentes de carbono añadidas, para lo que se añadieron fuentes de carbono industrialmente aceptables, tales como glucosa, fructosa, succinato, sorbitol y sacarosa al medio LB, respectivamente, por 10 g/l. Se investigó el nivel de expresión de la enzima. Como resultado, la expresión de la enzima aumentó ligeramente con la adición de succinato o sorbitol (Fig. 4).

5 **Ejemplo 3: Expresión de la arabinosa isomerasa recombinante en *Corynebacterium***

La cepa recombinante *Corynebacterium glutamicum* GSAIC-1 (Nº de acceso: KCCM10789P) preparada en el Ejemplo 1 se inoculó en medio MB (Bacto-triptona 10 g/l, extracto de Bacto-levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l, Soytone 5 g/l) que contenía 10 µg/ml de kanamicina, seguido de agitación-cultivo a 200 rpm y 30°C en una incubadora con agitación durante 24 horas para preparar una solución de pre-cultivo. La solución de pre-cultivo obtenida se inoculó en un medio de cultivo principal en la concentración de 1%, seguido de agitación-cultivo a 200 rpm y 30°C en un incubador con agitación hasta que la OD₆₀₀ alcanzó un valor de 0,1 para inducir la expresión de la isomerasa arabinosa recombinante. Para medir la actividad enzimática de la arabinosa isomerasa expresada, la solución de cultivo se centrifugó a 8000 x g durante 10 minutos y se recuperaron las células. Las células se suspendieron de nuevo en solución tampón 50 mM Tris-HCl (pH 7,0), seguido por tratamiento con ultrasonidos para lisar las células. Se centrifugó de nuevo a 8000 x g durante 12 minutos para inducir la isomerización de galactosa usando el sobrenadante como una solución de enzima cruda. La proteína incluida en la solución de enzima cruda se cuantificó con un kit de ensayo Bradford (BioRad, EE.UU.). Como resultado, la actividad de isomerasa fue de 1,387 (mg tagatose/mg proteína.h), lo que indica que el producto de la isomerización de galactosa, tagatosa, se generó correctamente.

10 20 Para optimizar la expresión de la arabinosa isomerasa en la cepa recombinante *Corynebacterium* GSAIC-1, la cepa recombinante se inoculó en medio MB (Bacto-triptona 10 g/l, extracto de Bacto-levadura 5 g/l, NaCl 1,0 g/l, Soytone 5 g/l) que contenía 10 µg/ml de kanamicina a la concentración de OD₆₀₀ = 0,6, resultando en la preparación de una solución de pre-cultivo. Se investigó el crecimiento de la cepa de *Corynebacterium* en los dos medios básicos para el cultivo, medio MB (Bacto-triptona 10 g/l, extracto de Bacto-levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l, Soytone 5 g/l) y el medio modificado (Bacto-peptona 10 g/l, extracto de Bacto-levadura 5 g/l, NaCl 2,5 g/l, extracto de carne de vaca 5 g/l). Se compararon los crecimientos dependientes de la temperatura (25°C, 30°C, 37°C), dependientes del pH, dependientes de la concentración de glucosa, (fuente de carbono) y de la concentración de sacarosa en los dos medios. Además, se compararon también los crecimientos en condiciones estacionarias y aeróbicas. Los crecimientos en las distintas condiciones y los niveles de expresión de la enzima se midieron cada hora para juzgar 15 25 30 las condiciones de expresión óptimas para la producción en masa de la arabinosa isomerasa recombinante (Tablas 2 y 3).

Tabla 2

	Medio modificado	Medio MB				
		Aeróbico	Estacionario	Aeróbico	25°C	30°C
OD ₆₀₀	5,66	9,0		9,34	7,44	9,34
pH	7,6	7,8		7,6	7,5	7,6
Actividad (mU/ml)	21,859	29,008		31,639	30,826	31,639
						25,833

Tabla 3

	0%	Sacarosa				Glucosa
		2,5%	5%	7,5%	10%	10%
OD ₆₀₀	9,68	9,7	11,84	10,36	10,14	5,76
pH	7,6	4,7	4,4	4,4	4,6	4,4
Actividad (mU/ml)	31,6	56,979	41,764	51,198	46,003	23,236
Actividad (mU/ml)	31,6	56,979	41,764	51,198	46,003	23,236

Para medir la actividad enzimática de la arabinosa isomerasa recombinante, la enzima se trató y se cuantificó de la misma manera que se ha descrito en el Ejemplo 2. Cuando las células se cultivaron a 30°C en condiciones aeróbicas, con la adición de 2,5% de sacarosa, la tagatosa mostró aproximadamente 57,0 mU/ml de actividad enzimática, que es 1,8 veces 5 mayor que la observada en el cultivo estándar (31,6 mU/ml), lo que sugiere que la actividad enzimática aumentó con el aumento en el crecimiento de las células. Los resultados de crecimiento celular en el medio óptimo se muestran en la Fig. 5.

Ejemplo 4. Separación y purificación de la arabinosa isomerasa recombinante

Se realizó un cultivo de 2 l de la cepa recombinante bajo las condiciones de cultivo óptimas determinadas en el Ejemplo 3 10 anterior. La solución de cultivo se centrifugó a 8000 x g durante 10 minutos y las células se recuperaron. Las células se suspendieron de nuevo en tampón 50 mM Tris-HCl (pH 7,0), y se usaron para la purificación de proteínas. La suspensión 15 celular progresó a lisis celular usando un homogeneizador de alta presión, serie T (4,0 kW; Constant Systems, UK), seguido de tratamiento térmico a 80°C durante 20 minutos. Se centrifugó a 10.000 x g durante 10 minutos para separar la arabinosa isomerasa termófila recombinante expresada. La solución de enzima recombinante separada se filtró mediante ultrafiltración (MW: 10.000; Sartorius, EE.UU.). El filtrado se usó para los experimentos posteriores.

Aplicabilidad industrial

Tal como se ha explicado anteriormente, los presentes inventores confirmaron que la arabinosa isomerasa procedente del microorganismo termófilo *Geobacillus* en la presente invención fue expresado, de manera exitosa y estable, en microorganismos GRAS cepa *Corynebacterium sp.* y cepa *Bacillus sp.* Consiguientemente, la presente invención 20 proporciona una enzima recombinante activa y un procedimiento de preparación de tagatosa que contiene la etapa de una reacción inmovilizadora continua eficiente que usa la misma. Para un aditivo alimenticio es esencial que sea seguro, particularmente en la producción de alimentos biotecnológicos usando una enzima de microorganismo. Según la presente invención, se confirmó que la arabinosa isomerasa procedente de la cepa *Geobacillus sp* era de una calidad alimentaria segura, de manera que podría expresarse y consecutivamente aplicarse para su industrialización.

25 <110> CJ Corporation

<120> Arabinosa isomerasa termófila de calidad alimentaria expresada a partir de GRAS y procedimiento de fabricación de tagatosa que usa la misma

<130> PA06-0313

<160> 4

30 <170> Kopat ent I n 1.71

<210> 1

<211> 38

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

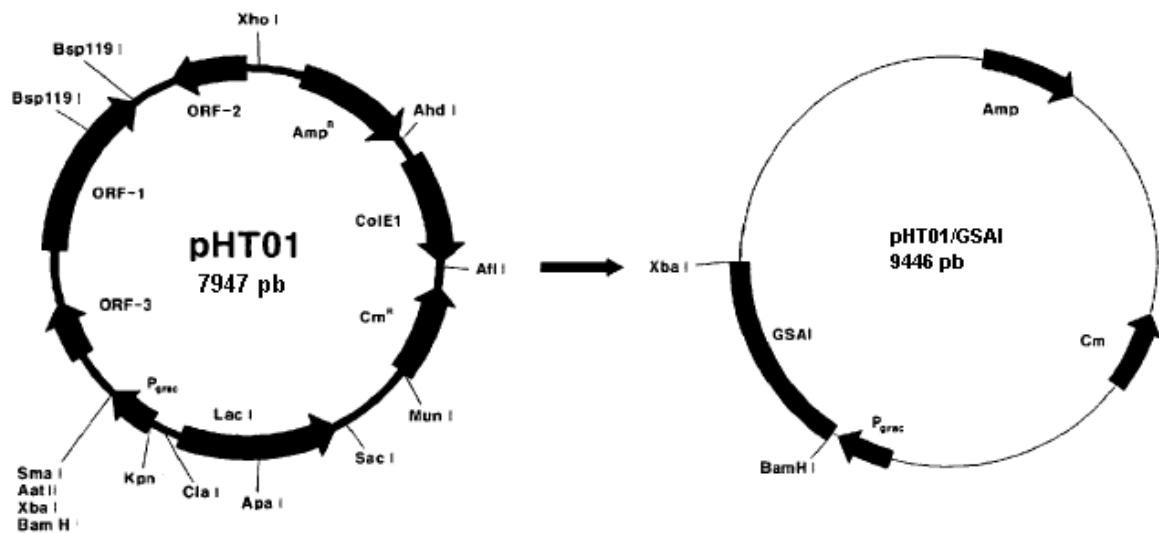
ES 2 397 479 T3

<223> cebador 1
<400> 1
t ct agaat ga t gct gt cat t acgt cct t at gaat t t t g 38
<210> 2
5 <211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador 2
10 <400> 2
t ct agat t ac cgcccccggcc aaaacact t c gt t cc 35
<210> 3
<211> 31
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> cebador 3
<400> 3
cccgat at ca t gct gt cat t acgt cct t at g 31
20 <210> 4
<211> 31
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
25 <223> cebador 4
<400> 4
tgcaactgcag ttaccgcccc cgccaaaaca c 31

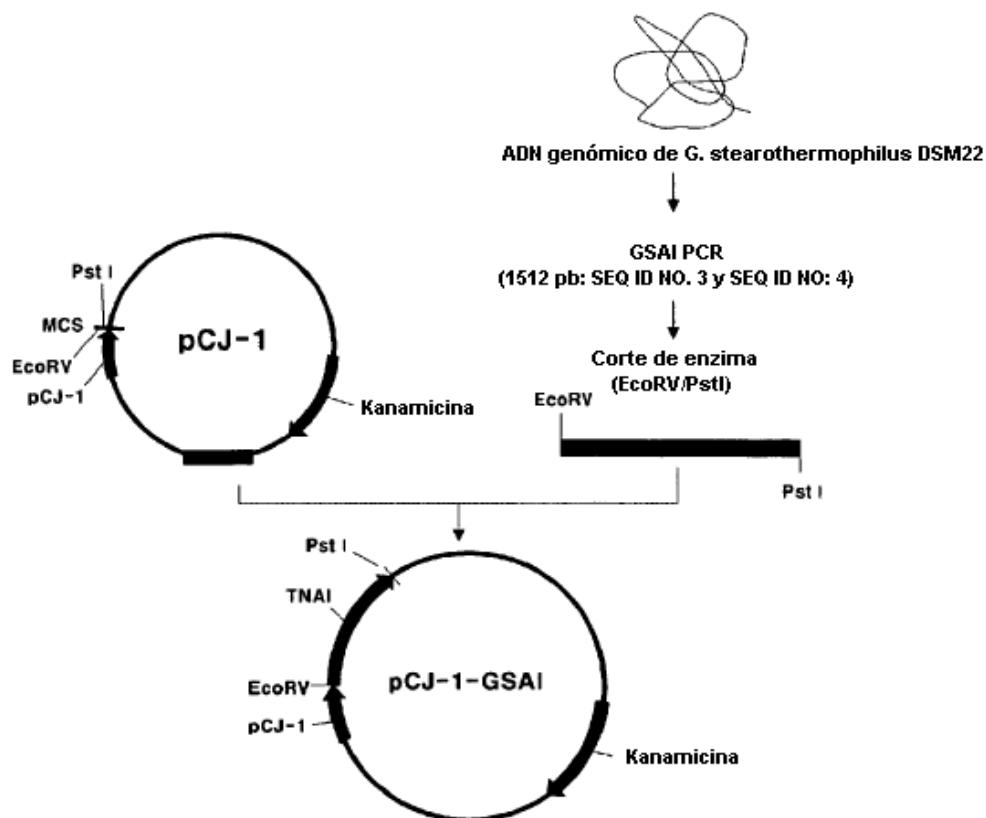
REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de preparación de arabinosa isomerasa termófila, de calidad alimentaria, que comprende las etapas de:
 - 5 preparar un vector recombinante que contiene un gen que codifica arabinosa isomerasa termófila procedente de *Geobacillus stearothermophilus* DSM 22, insertando dicho gen en el vector transportador pCJ-1 o pH01, y produciendo la arabinosa isomerasa termófila a partir de *Corynebacterium* o *Bacillus* que son transfectados con el vector recombinante.
 2. Procedimiento de preparación de arabinosa isomerasa termófila, de calidad alimentaria, según la reivindicación 1, en el que *Bacillus* es *Bacillus subtilis* GSAIB-1 (Nº de acceso KCCM 10788P).
 - 10 3. Procedimiento de preparación de arabinosa isomerasa termófila, de calidad alimentaria, según la reivindicación 1, en el que *Corynebacterium* es *Corynebacterium glutamicum* GSAC-1 (Nº de acceso KCCM 10789P).

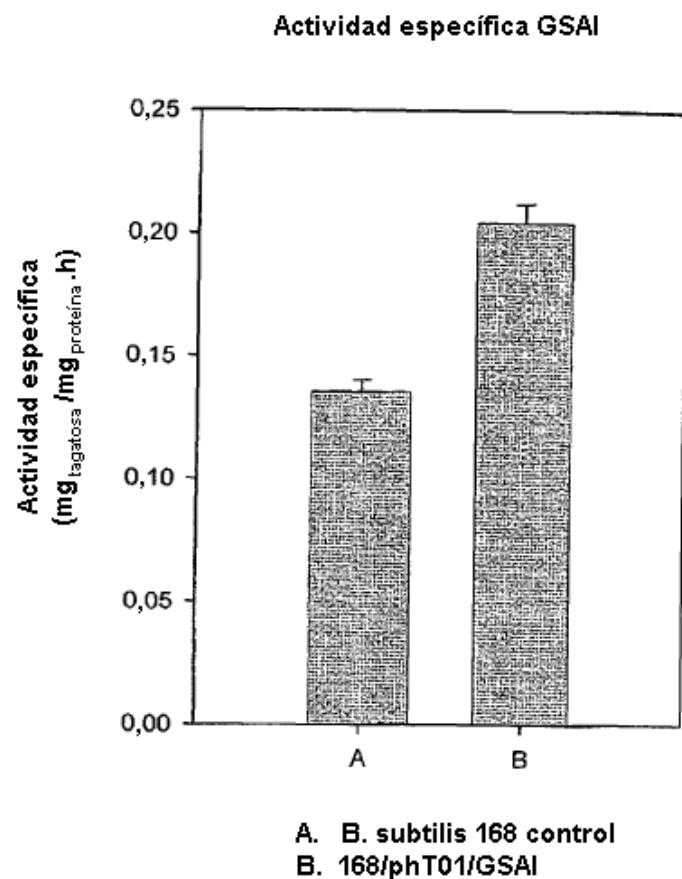
[Fig. 1]



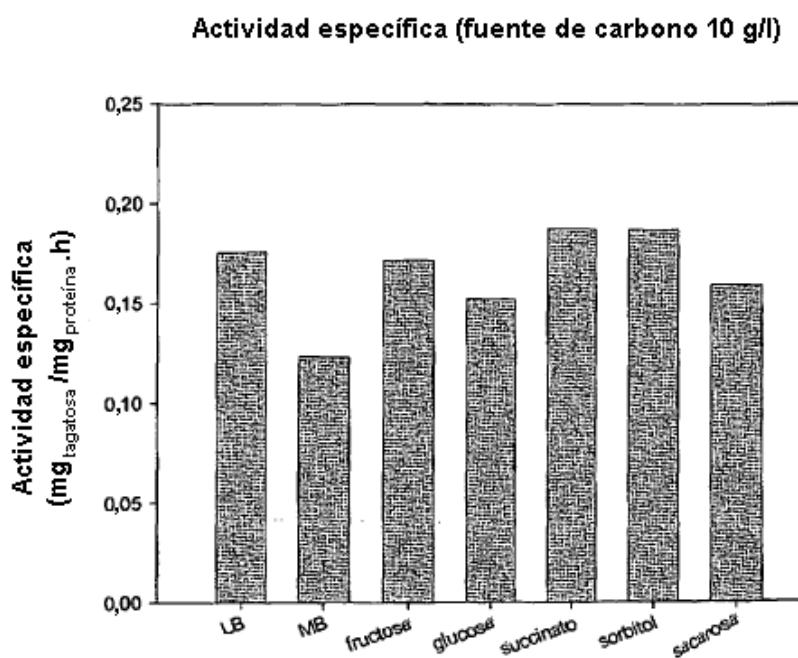
[Fig. 2]



[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 5]

