

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 174**

51 Int. Cl.:

C07H 1/08 (2006.01)

C12P 19/24 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

A23L 27/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2009 PCT/KR2009/000392**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.08.2009 WO09096693**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2009 E 09705280 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017 EP 2264041**

54 Título: **Proceso de fabricación de tagatosa usando oligosacárido de soja**

30 Prioridad:

28.01.2008 KR 20080008717

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

03.07.2017

73 Titular/es:

**CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
CJ Cheiljedang Center, 330 Dongho-ro, Jung-gu
Seoul, KR**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 621 174 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proceso de fabricación de tagatosa usando oligosacárido de soja

5 [Campo técnico]

La presente invención se refiere a un método de producción de tagatosa usando oligosacárido de soja o solución de azúcar soluble que contiene el mismo, más precisamente, un método de producción de tagatosa usando galactosa que se recupera por hidrólisis selectiva de oligosacárido soluble en soja.

10 [Técnica anterior]

La tagatosa tiene el dulzor natural que es difícilmente distinguido de aquél de la sacarosa. Las propiedades físicas de la tagatosa también son muy similares a aquellas de la sacarosa. Sin embargo, la tagatosa ingerida es difícil de ser absorbida en el intestino delgado, sugiriendo que no afecta el nivel de azúcar en sangre. La tagatosa también es un edulcorante bajo en calorías cuya caloría es solo aproximadamente el 30 % de aquella de la sacarosa. La tagatosa tiene un efecto prebiótico, acelerando la proliferación de lactobacillus beneficioso mediante fermentación por microorganismos del rumen.

20 Sin embargo, esta tagatosa beneficiosa es un azúcar raro que no está distribuido en la naturaleza, pero incluido en productos lácteos o algunas plantas a una concentración muy baja. Para usar la tagatosa como edulcorante funcional bajo en calorías, se requiere una técnica novedosa para producir en masa tagatosa a partir de un material de partida barato.

25 Las patentes de EE.UU. N.º 5002612 y N.º 5078796 describen un método de producción de D-tagatosa, en el que lactosa o un material que contiene lactosa se hidroliza en la mezcla de galactosa y glucosa usando lactasa y entonces la glucosa se elimina al azar, seguido de isomerización química de galactosa en tagatosa.

30 La patente de EE.UU. N.º 6057135 describe un método de producción de tagatosa que comprende las siguientes etapas: obtener galactosa y glucosa hidrolizando suero de leche del queso o leche; isomerizar la galactosa obtenida por L-arabinosa isomerasa; y recircular los compuestos no convertidos después de la separación de los productos y compuestos no convertidos por cromatografía.

35 Los principales materiales de partida que se han usado para la producción de tagatosa hasta la fecha son los subproductos del procesamiento de la leche tales como la lactosa o materiales que contienen lactosa. En el proceso de bioconversión que usa lactosa o materiales que contienen lactosa como material de partida, la producción de tagatosa debe ser básicamente realizada por reacción de dos etapas (lactosa → galactosa → tagatosa).

40 [Divulgación]

[Problema técnico]

45 Basándose en los hechos anteriores, los presentes inventores estudiaron e investigaron materiales de partida, excepto lactosa, que contenían galactosa a un alto nivel entre madera y subproductos de proceso que podían ser proporcionados de la naturaleza con un bajo precio. Entonces, los presentes inventores confirmaron que los subproductos de proteína de soja aislada contenían una alta concentración de galactosa, en comparación con otros materiales, y entonces se seleccionaron aquellos apropiados para la cromatografía. Como resultado, los presentes inventores completaron la presente invención confirmando que el oligosacárido de soja obtenido del suero de leche de la proteína de soja aislada era el material de partida que podría ser en realidad industrializado.

50 Por tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un método de producción de galactosa por hidrólisis selectiva de oligosacárido de soja o solución de azúcar soluble que contiene el mismo.

55 Es otro objetivo de la presente invención proporcionar un método de producción de tagatosa que comprenda las siguientes etapas: obtener un producto isomerizado por isomerización de galactosa en la solución de azúcar hidrolizada mediante isomerización enzimática; y obtener tagatosa por cromatografía.

[Solución técnica]

60 Realizaciones de la presente invención se definen en las reivindicaciones. En particular, la presente invención se refiere a un método de producción de tagatosa que comprende las siguientes etapas:

- a. separar oligosacárido de soja de subproductos de suero de leche de semilla de soja;
- b. hidrolizar el oligosacárido de soja usando α -galactosidasa libre de invertasa;
- 65 c. isomerizar la solución de azúcar hidrolizada usando arabinosa isomerasa para obtener el producto isomerizado que comprende azúcar mixto que contiene sacarosa, galactosa y tagatosa como componentes

principales; y
d. separar la solución isomerizada por cromatografía.

5 La presente invención también se refiere a un método de producción de tagatosa que comprende las siguientes etapas;

- 10 a. separar oligosacárido de soja de subproductos de suero de leche de semilla de soja;
b. hidrolizar el oligosacárido de soja usando α -galactosidasa libre de invertasa;
c. separar la sacarosa y la galactosa de la solución de azúcar hidrolizada por cromatografía;
10 d. isomerizar la solución de separación por cromatografía que contiene galactosa como componente principal usando arabinosa isomerasa; y
e. obtener tagatosa separando el producto isomerizado usando cromatografía.

15 En el presente documento se desvela un método de producción de galactosa por hidrólisis selectiva de oligosacárido de soja o solución de azúcar soluble que contiene el mismo como componente principal usando alfa-galactosidasa.

También en el presente documento se desvela un método de producción de tagatosa que comprende las siguientes etapas:

- 20 1) hidrolizar oligosacárido de soja o solución de azúcar soluble que contiene el mismo como componente principal selectivamente usando alfa-galactosidasa;
2) isomerizar galactosa en la solución de azúcar hidrolizada usando arabinosa isomerasa; y
25 3) obtener tagatosa por separación en serie del producto isomerizado usando cromatografía, y recircular la galactosa.

También en el presente documento se desvela un método de producción de tagatosa, en que dicha etapa 1) y etapa 3) se realizan simultáneamente en el mismo reactor.

[Efecto ventajoso]

30 Los presentes inventores desarrollaron un método eficiente de producción de tagatosa considerando el equilibrio de materiales en cada etapa e inversión de equipo. Particularmente, para facilitar la separación por cromatografía, se ha establecido un novedoso proceso económico usando hidrólisis selectiva. Por tanto, la presente invención es útil para la eficiente producción de tagatosa, según las siguientes etapas: obtener galactosa no de la lactosa convencional, sino de oligosacárido de soja y solución de azúcar soluble que contiene el mismo como componente principal por hidrólisis selectiva; y producir tagatosa por cromatografía única de la solución de azúcar que contiene al menos 3 azúcares diferentes (sacarosa, galactosa y tagatosa) obtenidos por isomerización de la galactosa anterior.

[Descripción de los dibujos]

40 Los objetivos, características y ventajas anteriores y otros de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción de realizaciones preferidas dadas conjuntamente con los dibujos adjuntos, en los que:

45 La Fig. 1 y Fig. 2 son diagramas esquemáticos que ilustran el método de separación por cromatografía pura de la solución de azúcar mixto.

La Fig. 3 es un gráfico que muestra el perfil de HPLC que analiza el contenido de azúcar en oligosacárido de soja.

La Fig. 4 es un gráfico que muestra el resultado del análisis de componentes de oligosacárido de soja y el resultado de la hidrólisis de los mismos.

50 Las Fig. 5 y Fig. 6 ilustran los resultados del análisis del contenido de azúcar en oligosacárido de soja tratado con α -galactosidasa libre de invertasa.

Las Fig. 7 y Fig. 8 ilustran el análisis del patrón de separación por cromatografía con monosacárido mixto previamente hidrolizado.

55 Las Fig. 9 y Fig. 10 ilustran la comparación de forma y tamaño entre el cristal de tagatosa producido y la sacarosa comercial bajo microscopio (a: sacarosa, b: tagatosa).

La Fig. 11 ilustra el proceso de producción de tagatosa usando subproducto de suero de leche de semilla de soja u oligosacárido de soja como material de partida.

La Fig. 12 ilustra la curva de elución obtenida de la prueba de 1 pase.

La Fig. 13 ilustra el dibujo en detalle de la simulación del caso 9 (separación de 3 fases).

60 Las Fig. 14, Fig. 15 y Fig. 16 ilustran los contenidos de azúcar del producto isomerizado en solución de monosacárido mixto analizada por HPLC.

La Fig. 17 es un diagrama simple que ilustra el proceso de producción de tagatosa usando una única cromatografía.

65 La Fig. 18 es un diagrama simple que ilustra el proceso de producción de tagatosa usando una única cromatografía que contiene la etapa de cristalización de sacarosa como etapa de pretratamiento.

[Mejor modo]

En el presente documento se desvela un método de producción de tagatosa que comprende las siguientes etapas:

- 5 1) hidrolizar oligosacárido de soja o solución de azúcar soluble que contiene el mismo como componente principal selectivamente usando alfa-galactosidasa;
- 2) isomerizar galactosa en la solución de azúcar hidrolizada usando arabinosa isomerasa; y
- 3) obtener tagatosa por separación en serie del producto isomerizado usando cromatografía, y recircular la galactosa.

10 El material de partida de la presente invención es oligosacárido de soja separado de subproductos de suero de leche de semilla de soja.

15 El azúcar incluido en el suero de leche de semilla de soja es principalmente sacarosa, rafinosa y estaquiosa, y la rafinosa y la estaquiosa están compuestas de un polímero en el que la sacarosa y la galactosa se combinan mediante enlace alfa-1,4. Los componentes de hidrato de carbono de dichos azúcares se muestran en la Tabla 1. Cada componente unitario del suero de leche de semilla de soja u oligosacárido de soja es sacarosa y galactosa, o más específicamente entendido como monosacárido mixto que comprende glucosa, fructosa y galactosa.

20 Tabla 1

Nombre del hidrato de carbono	N.º de glucógenos	Contenido de galactosa	Relación molar de contenido de azúcar
Rafinosa	3	33,3	Sac:D-Gal = 1:1
Estaquiosa	4	50	Sac:D-Gal = 1:2
Sacarosa	2	0	-

25 En la mayoría de los materiales vegetales encontrados en la naturaleza, que incluyen el suero de leche de semilla de soja usado en la presente invención, la mayor parte de la galactosa existe en forma de oligosacárido o hidrato de carbono con glucosa o fructosa. Así, la solución de azúcar obtenida a partir de la misma por hidrólisis también comprende monosacárido mixto en el que están incluidos al menos tres azúcares diferentes.

30 El subproducto convencional derivado de la leche principalmente está compuesto por lactosa sola. Por tanto, cuando se hidroliza este producto, el monosacárido mixto que comprende glucosa y galactosa puede ser fácilmente obtenido inicialmente, que puede ser separado económicamente por cromatografía avanzada.

35 Sin embargo, la solución de azúcar que contiene al menos tres azúcares diferentes como la producida en los métodos de la presente invención no es fácil de separar por cromatografía, a menos que se cumplan condiciones selectivas. Es decir, es muy difícil de producir galactosa o tagatosa económicamente a partir de materiales de partida distintos de la lactosa.

40 En general, la separación de azúcar por cromatografía se realiza aprovechando la diferencia en la fuerza de unión débil entre iones metálicos unidos sobre el azúcar y resina iónica. Particularmente, los residuos de ión metálico aplicables a la cromatografía para alimentos están limitados a K, Na, Ca y Mg.

45 La glucosa y la galactosa son muy similares en sus estructuras físicas compuestas de la forma aldosa. La fructosa es el azúcar compuesto de la forma de cetosa. En general, la separación del azúcar mixto compuesto de la forma aldosa y la forma cetosa se realiza económicamente por cromatografía usando la resina que tiene residuos catiónicos, que en realidad se usa ampliamente en el proceso de azúcar de almidón. Sin embargo, para separar la glucosa y la galactosa que tienen la misma forma de aldosa y estructura física similar, es necesaria una resina específica que tiene K y Na. Es decir, la galactosa solo se separa pura usando dos equipos de cromatografía diferentes en serie. Este proceso se muestra en la Fig. 1. La separación de azúcar mixto por cromatografía usa una gran cantidad de agua, sugiriendo que el coste para la concentración aumenta y se requiere equipo de alto precio.

50 La enzima usada para la hidrólisis de la presente invención es α -galactosidasa libre de invertasa.

55 Dicha α -galactosidasa es una de las enzimas glucolíticas naturales, que puede digerir selectivamente el enlace alfa-1,4 entre sacarosa y galactosa que compone la rafinosa o la estaquiosa. Por tanto, puede usarse para la preparación de solución de azúcar compuesta de sacarosa y galactosa como componentes principales de suero de leche de semilla de soja u oligosacárido de soja.

60 Sin embargo, para producir una enzima que sea industrialmente aplicable, es general obtener sobrenadante cultivando un microorganismo que produce la enzima o micelios del mismo, que entonces se usa además como material de partida para la producción de la enzima. En la mayoría de los casos, el material incluye la enzima glucolítica más representativa, la invertasa. En la presente invención, la hidrólisis selectiva para sacarosa y galactosa es necesaria para la conveniencia de la cromatografía. Por tanto, la α -galactosidasa libre de invertasa facilita la cromatografía.

Dicha α -galactosidasa se origina de la cepa que no tiene el gen invertasa dentro. Más preferentemente, la α -galactosidasa puede originarse de *Mortierella vinaceae* var. *raffinoseutilizer* ATCC 20034 o *Absidia griseola* ATCC 20431.

5 En una realización preferida de la presente invención, el oligosacárido de soja se hidrolizó con α -galactosidasa para obtener la solución de azúcar que contenía sacarosa y galactosa, y se realizó pretratamiento de cristalización de sacarosa selectiva para obtener la solución de azúcar que tenía contenido de sacarosa reducido. El oligosacárido de soja contuvo excesiva sacarosa, de manera que hubo desventajas para la cromatografía producidas por el aumento de volumen de solución de azúcar, elevada escala del equipo y aumento de la cantidad de agua purificada. Así, dicho proceso de pretratamiento de cristalización de sacarosa podría reducir la utilidad del proceso.

10 Según la presente invención, se ha establecido una técnica novedosa para producir galactosa o tagatosa económicamente usando la solución de azúcar selectivamente hidrolizada con α -galactosidasa. Para convertir la galactosa obtenida en la presente invención a tagatosa, puede usarse arabinosa isomerasa.

15 Preferentemente, puede usarse arabinosa isomerasa termófila originada de *Sulfurobus* sp., *Thermotoga* sp., o *Geobacillus* sp.. Más preferentemente, puede usarse arabinosa isomerasa termófila originada de *Thermotoga neapolitana* DSM5068.

20 En la presente invención, la solución de azúcar compuesta de azúcar mixto que comprende sacarosa, galactosa y tagatosa obtenida mediante hidrólisis e isomerización se separa por cromatografía. Más preferentemente, se usa separación de tres fases de cromatografía.

25 En general, el equilibrio de fases se presenta teóricamente en la reacción reversible tal como isomerización bajo la condición de proceso económica, y es teóricamente imposible convertir cada sustrato en un producto. Por tanto, en el proceso como el proceso del azúcar, son necesarias separación y recirculación eficientes de materiales no reaccionados usando cromatografía. El otro punto clave de esta técnica de producción radica en la ejecución económica de la cromatografía.

30 En la separación con cromatografía, la resina que tiene residuo de Ca puede usarse como la resina para la separación de solución de azúcar.

35 En la separación con cromatografía, el método de recirculación de materiales no reaccionados puede ser aleatoriamente seleccionado por aquellos en la materia que consideran el tipo de solución de azúcar.

La solución de azúcar que contiene tagatosa como componente principal (al menos 90 %) puede dirigirse a cristalización, si fuera necesario, después de la concentración de tagatosa.

40 La solución de azúcar que contiene galactosa como componente principal puede recircularse selectivamente antes de la cristalización o la isomerización considerando la relación de composición de la solución de azúcar.

La solución de azúcar que contiene sacarosa como componente principal puede procesarse mediante concentración o cristalización, y entonces usarse además como solución de azúcar o como un material de partida para otras producciones.

45 Realizaciones prácticas y actualmente preferidas de la presente invención son ilustrativas como se muestra en los siguientes ejemplos.

50 En una realización preferida de la presente invención, para obtener posibles materiales de partida para la producción económica de galactosa o tagatosa por cromatografía, se analizaron constituyentes de azúcar de subproductos industriales y se evaluaron. Entonces, se realizó hidrólisis selectiva con el suero de leche de semilla de soja seleccionado u oligosacárido de soja usando α -galactosidasa para preparar hidrolizado. Y al fin, los presentes inventores desarrollaron una técnica novedosa para la producción económica de galactosa o tagatosa a partir del hidrolizado. En particular, la presente invención introdujo la recirculación continua para el procedimiento de producción anterior, conduciendo a la avanzada técnica de producción económica de alto rendimiento.

60 En la presente invención, se seleccionó el material que estuvo compuesto en gran parte por hidrato de carbono y podría ser fácilmente obtenido de los subproductos del procesamiento de material como el material de partida primario para la producción económica de tagatosa. Y entonces se analizaron minuciosamente componentes de hidrato de carbono, particularmente componentes de azúcar solubles (incluyendo monosacárido, disacárido y oligosacárido) y contenidos en el material. A partir de lo cual los presentes inventores confirmaron la utilidad como composición adecuada para cromatografía después de hidrólisis selectiva usando una enzima.

65 Basándose en los resultados de los análisis anteriores, se confirmó que el suero de leche de semilla de soja, el subproducto de proteína de soja aislada y la solución de azúcar soluble u oligosacárido de soja originado a partir de la misma tenían una composición excelente apropiada para la separación pura y económica de galactosa o

tagatosa. Por tanto, los presentes inventores completaron la presente invención estableciendo los procesos de producción de tagatosa usando dicho material de partida.

<Ejemplos>

5

Ejemplo 1: Análisis de la composición de azúcar de subproducto industrial

10

Se obtuvo el oligosacárido de soja comercial del mercado chino, que se usó como muestra. Se realizó HPLC para analizar la composición y el contenido de hidratos de carbono incluido en el oligosacárido de soja obtenido. La columna usada en el presente documento fue la columna de separación de azúcares Supelco-PB (SUPELCO), y se usó agua purificada (0,5 ml/min) como fase móvil. Se usó reactivo de calidad para HPLC (Sigma) como solución patrón. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

15

Tabla 2
Composición de oligosacárido de soja

Azúcar	Tiempo de retención (min)	Composición (base de sólidos secos, % en peso)
Estaquiosa	12,549	51,7
Rafinosa	13,441	21,8
Sacarosa	14,384	11,9
Glucosa	16,919	3,7
Galactosa	19,783	6,3
Fructosa	23,206	4,6

20

En la composición de hidratos de carbono del oligosacárido de soja, la relación de contenido de rafinosa y estaquiosa supuso el 73,5 % por hidrato de carbono total, y la sacarosa y la fructosa supusieron el 26,5 %. La Fig. 2 ilustra el cromatograma de HPLC de este experimento.

Ejemplo 2: Análisis del contenido de azúcar en oligosacárido de soja e hidrólisis enzimática

25

Se trató el oligosacárido de soja del Ejemplo 1 con α -galactosidasa para su uso como una fuente de galactosa. La enzima usada en este momento fue validasa (Validase AGS; Valley Research, EE.UU.) y la concentración de la enzima fue del 0,15 % (peso/peso) por el volumen total del sustrato, oligosacárido de soja. La hidrólisis se realizó a 50 °C con agitación a la velocidad de 150 rpm. La producción de galactosa dependiente del tiempo mediante hidrólisis con α -galactosidasa y los cambios de la composición de azúcar se ilustran en la Fig. 3.

30

La validasa descompuso el oligosacárido de soja, estaquiosa, en rafinosa y galactosa. La rafinosa producida se descompuso otra vez en sacarosa y galactosa. El principal componente de la validasa fue α -galactosidasa. Se añade a piensos, debido a que cuando se añade descompone el oligosacárido de soja, de manera que reduce la diarrea, dolor abdominal y otros efectos secundarios producidos por la ingesta de oligosacárido de soja.

35

Como se muestra en la Fig. 3, la α -galactosidasa en el producto estuvo sirviendo para hidrolizar selectivamente el enlace galactosa/galactosa y el enlace galactosa/sacarosa en el oligosacárido de soja. Sin embargo, también se confirmó la actividad de invertasa que sirve para descomponer la sacarosa en glucosa y fructosa.

40

Se descompuso toda la sacarosa en 24 horas, pero se generaron continuamente glucosa y fructosa. Esto fue supuestamente debido a que aquella sacarosa producida por la descomposición de estaquiosa y rafinosa fue continuamente descompuesta por invertasa en validasa con producción de glucosa y fructosa. Después de 50 horas de hidrólisis, ya no se generaron más galactosa, fructosa y glucosa y la composición de azúcar en ese momento se muestra en la Tabla 3.

45

Tabla 3
Composición de oligosacárido de soja tratado con validasa

Azúcar	Composición (base de sólidos secos, % en peso)
Estaquiosa	0
Rafinosa	3,8
Sacarosa	0
Glucosa	28,4
Galactosa	45
Fructosa	22,8

Ejemplo 3: α -Galactosidasa libre de invertasa

50

Como se describe anteriormente en este documento, la hidrólisis selectiva de rafinosa o estaquiosa a sacarosa y galactosa usando una enzima es esencial no solo para la conveniencia de la cromatografía, sino también para la producción económica de tagatosa. Por tanto, se necesita una técnica que facilite la escisión selectiva del enlace

alfa-1,4 entre sacarosa y galactosa que componen la rafinosa o estaquiosa usando α -galactosidasa.

Sin embargo, para producir una enzima que sea industrialmente aplicable, es general obtener sobrenadante cultivando un microorganismo que produce la enzima o micelios del mismo, que entonces se usa además como material de partida para la producción de la enzima. La α -galactosidasa comercializada en el mercado también se prepara usando el sobrenadante cultivado de micelios de *Aspergillus niger* como material de partida y así la mayoría de la enzima producida incluye invertasa en su solución de enzima.

La invertasa, la enzima glucolítica más representativa que tienen la mayoría de las criaturas vivas en el sistema natural, es capaz de descomponer fácilmente la sacarosa. Así, la invertasa incluida en una solución enzimática puede hidrolizar rápidamente la sacarosa contenida en la solución de azúcar en glucosa y fructosa, que llegar a ser un obstáculo importante para la eficiente producción de tagatosa.

Por tanto, los presentes inventores investigaron si aquellas células que producen α -galactosidasa, en muchos microorganismos o micelios encontrados en la naturaleza, también podrían producir o no invertasa, y el resultado se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4
Producción de invertasa

	α -Galactosidasa	Invertasa
<i>Aspergillus niger</i>	0	0
<i>Aspergillus oryzae</i>	0	
<i>Aspergillus oryzae</i> d- <i>Aspergillus niger</i>	0	
<i>Mortierella vinacea</i> var. <i>Raffinose utilizer</i>	0	
<i>Absidia griseola</i>	0	
<i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	0	0
Semilla de d-guar de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	0
<i>Bacillus subtilis</i>		0
<i>Kluyveromyces fragilis</i>		0

En la presente invención, se usaron micelios cultivados de *Mortierella vinaceae* var. *Raffinose utilizer* o *Absidia griseola* que no produjeron invertasa, pero sí α -galactosidasa sola, como hidrolasa.

La α -galactosidasa libre de invertasa usada en la presente invención se originó del hongo distribuido de ATCC, *Mortierella vinaceae* var. *Raffinose utilizer* ATCC20034 o *Absidia griseola* ATCC20431.

El medio de cultivo para la cepa seleccionada estuvo compuesto por tampón fosfato 0,1 M (pH 6,0), 10 g/l de lactosa, 3 g/l de peptona, 3 g/l de extracto de levadura, 0,5 g/l de cloruro de potasio, 0,5 g/l de sulfato de magnesio y una pequeña cantidad de sulfato ferroso. Las células se cultivaron a 30 °C durante 3 días, seguido de recogida de las células usando un sistema de filtro (CORNING, BOTELLA y FILTROS SUPERIORES DE BOTELLA). Las células recogidas se pusieron en hielo, seguido de lisis usando un homogeneizador durante 10 minutos. La centrifugación se realizó a 10.000 rpm durante 10 minutos para obtener el sobrenadante, la solución de enzima final.

Se hidrolizó el oligosacárido de soja usando la solución de enzima obtenida anteriormente. La reacción se indujo a 40 °C durante 7 horas. Se realizó HPLC (SUPELCO, columna de HPLC SUPELCOGEL Pb) para analizar el contenido de azúcar. Como resultado, se confirmó que el oligosacárido de soja era selectivamente hidrolizado a sacarosa y galactosa por la α -galactosidasa libre de invertasa, que se presenta en la Fig. 5 y Fig. 6.

Ejemplo 4: Isomerización de galactosa a tagatosa usando L-arabinosa isomerasa

La isomerización de galactosa a tagatosa en la presente invención se realizó usando arabinosa isomerasa termófila originada de *Thermotoga neapolitana* DSM 5068 hipertermófila, obtenida expresando arabinosa isomerasa derivada de hipertermófilo en huésped de *Corynebacterium*.

Se insertó el gen que codifica la arabinosa isomerasa en los vectores lanzadera de *E. coli-Corynebacterium* pCJ-1 y pCJ-7 (patente coreana N.º 10-2006-0068505) y finalmente se obtuvo el huésped *Corynebacterium glutamicum* KCTC 13032. La cepa en la que se expresó la enzima termostable se mezcló con 2,0 % de solución de alginato de sodio a la concentración de 20 % (peso/volumen), seguido de agitación para preparar una suspensión. La suspensión se añadió gota a gota en solución de CaCl₂ 0,1 M por caída libre para inducir la reacción de curado. Se usó la perla de curado de alginato capturada por la célula obtenida para la inmovilización. La solución de azúcar obtenida de la reacción se añadió a tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,5) para regular el pH de la misma, que se usó como solución de sustrato.

La arabinosa isomerasa preparada se usó para la isomerización para obtener el producto isomerizado.

Ejemplo 5: Análisis del patrón de separación por cromatografía de monosacárido mixto hidrolizado

Para diseñar un método de separación por cromatografía de galactosa usando el producto isomerizado (monosacárido mixto) obtenido del ejemplo anterior, se realizó análisis del patrón de separación por cromatografía.

Para la separación por cromatografía del monosacárido mixto, el experimento se realizó con los siguientes materiales y equipos. La resina para la separación de azúcar fue FINEX MFG220 Ca⁺⁺ (FINEX). La fase móvil fue agua ultrapura purificada (11 ml/min a 60 °C). Se conectaron dos columnas XK50/100 (Amersham Bioscience, EE.UU.) en serie. La resina de cada columna se cargó con 1900 ml. El azúcar mixto usado para la separación se preparó como una solución de azúcar a la concentración de 50 Bx, que fue usada por 160 ml de una vez. La composición del monosacárido mixto primario fue sacarosa:galactosa (80:20) y la composición del monosacárido mixto secundario fue galactosa:tagatosa (50:50), seguido del análisis de patrones de separación. Como resultado, se confirmó que la sacarosa, galactosa, y tagatosa se separaron fácilmente en un intervalo regular, que se muestra en las Fig. 7 y Fig. 8.

Ejemplo 6: Cristalización de tagatosa

La cristalización de tagatosa se realizó usando la solución recuperada de la separación por cromatografía en el Ejemplo 5. Se recuperó la fracción que incluye 90 % de contenido de tagatosa final. La fracción se concentró en un cristizador con vacío y condición de calentamiento para hacer el contenido de azúcar 70 Bx. Entonces, la temperatura se redujo a 50 °C, lentamente 2 grados por hora. Se añadió semilla de tagatosa a la temperatura de 40 °C para hacer crecer los cristales.

A medida que avanzó la cristalización de tagatosa, la concentración de azúcar en el sobrenadante se diluyó comparativamente. Para mantener la concentración del sobrenadante diluido, se realizó continuamente concentración a vacío durante la cristalización. Es decir, la concentración del sobrenadante de reacción se mantuvo a al menos 65 Bx durante la cristalización y el crecimiento de cristales.

La cristalización se detuvo 20 horas después. Se realizó centrifugación para separar el sobrenadante y los cristales. La tasa de recuperación de tagatosa de la solución de cristalización primaria fue del 71 %. La tagatosa producida tuvo al menos 90 - 98 % de pureza. La tagatosa separada por centrifugación se secó en una secadora a vacío a 50 °C durante 1 hora. Se observó bajo microscopio el cristal de tagatosa generado, que se muestra en las Fig. 9 y Fig. 10. Se comparó la forma y el tamaño del cristal de tagatosa generado con los de la sacarosa comercial.

Ejemplo 7: Diseño del proceso de recirculación continua de la producción de tagatosa a partir de hidrolizado de suero de leche de semilla de soja usando la técnica de separación por cromatografía

Se diseñó el proceso de producción de tagatosa usando suero de leche de semilla de soja u oligosacárido de soja como material de partida del siguiente modo, que se muestra en la Fig. 11. Las etapas necesarias para la mejora de la calidad de un producto final tales como la decoloración y la desalinización no se incluyen por separado, debido a que estas etapas pueden incluirse o excluirse durante el proceso de producción, considerando los cambios de calidad del producto.

1. Separar oligosacárido de soja de subproductos de suero de leche de semilla de soja después del pretratamiento por ultrafiltración o microfiltración;
2. Hidrolizar la solución de oligosacárido de soja (concentración: 10-50 %) a una temperatura alta o baja (cuando se usó la enzima originada de bacterias termófilas u hongos);
3. Separar la sacarosa y la galactosa hidrolizadas por cromatografía; Puede incluirse o excluirse una etapa de concentración según el contenido de azúcar durante el proceso.
4. Producir tagatosa pasando la solución de separación por cromatografía que contiene galactosa como componente principal (al menos 50 %) a través de reactor de L-arabinosa isomerasa (o L-galactosa isomerasa);
5. Separar el producto isomerizado que comprende galactosa, tagatosa, y una pequeña cantidad de azúcar mixto por cromatografía; Puede incluirse o excluirse una etapa de concentración según el contenido de azúcar durante el proceso.
6. Concentrar y cristalizar (si fuera necesario) la solución de separación por cromatografía que contiene tagatosa como componente principal (al menos 70 %);
7. Recircular la solución de cromatografía restante que contiene galactosa como componente principal en el reactor de isomerización; y
8. Recircular la solución no cristalizada obtenida en la etapa de cristalización de tagatosa de nuevo a la etapa de pre-cristalización o etapa de pre-isomerización, considerando la composición de la solución de azúcar.

Ejemplo 8: Separación de tres fases de monosacárido mixto

Se realizó una prueba de 1 pase con los azúcares incluidos en el proceso completo como un paquete. El resultado se usó para diseñar la simulación del proceso de producción de recirculación continua usando la técnica de separación por cromatografía.

Se realizó la prueba de 1 pase con azúcar mixto, y se calcularon parámetros básicos a partir del resultado. Se usó el nuevo sistema de lecho en movimiento simulado (Organo, Japón) y se realizó la prueba de simulación con perfil de concentración de cada componente usando un ordenador. Entonces, se calcularon la pureza de cada componente y la tasa de recuperación de cada fracción. Se separó el líquido efluente de cada fracción. Cada fracción se analizó por HPLC. Del resultado, se hizo la curva de elución de cada componente. Se examinó cada patrón de elución y se calcularon parámetros básicos de cada componente. Las condiciones durante la prueba de 1 pase se muestran en la Tabla 5. El método de análisis de cada fracción se ilustra en la Tabla 6. Las condiciones para HPLC se muestran en la Tabla 7.

10

Tabla 5
Condiciones para la prueba de 1 pase

Muestra	Muestra de monosacárido mixto sacarosa: 73,93 %, otros-2: 0,51 % galactosa: 12,62 %, otros-3: 0,39 % Tagatosa: 12,56 %
Conc. de jarabe de aplicación	Bx. 60 %
Absorbente	Amberlite (Amberlite CR-1310; tipo Ca, resina nueva)
Tamaño de columna	20 mm x 1000 mm (314 ml)
Desorbente	H ₂ O
Volumen de aplicación	15 ml
Caudal	26 ml/min (LV 5 m/h)
Temperatura	60 °C

Tabla 6

Método de análisis	
Brix: concentración (g/100 g)	Refractómetro: RA-50 (Kyoto Electronics)
Composición de monosacárido	HPLC: serie VP (Shimadzu Corp.)

15

Tabla 7

Condición de HPLC	
Columna	TSK-GEL SCX-Ca (columna 6,0 x L150 x 5)
Desorbente	H ₂ O
Caudal	0,8 ml/min
Volumen de aplicación	10 µl
Temperatura	70 °C
Concentración del dispositivo de medición	Diferente medidor del índice de refracción

La curva de elución obtenida de la prueba de 1 pase se muestra en la Fig. 12.

20

Se calcularon parámetros básicos a partir de la curva de elución y se realizó simulación por ordenador para calcular el rendimiento de separación. Las condiciones para la simulación se muestran en la Tabla 8. Para obtener rendimiento de separación óptimo, los inventores analizaron la composición de azúcar de la solución total cambiando la relación de la solución de azúcar con respecto a la fase móvil, agua (desorbente/volumen de aplicación). La tasa de recuperación de cada azúcar y la pureza del mismo se midieron a partir del análisis. El resultado de la simulación se resume en la Tabla 9. Como se muestra en la Tabla 9, los casos N.º 6, N.º 7, N.º y N.º 9 son hojas en equilibrio de masa obtenidas del resultado de la simulación. La tagatosa demostró al menos el 90 % de pureza como se deseaba en cada simulación. El diagrama detallado del resultado de la simulación del caso N.º 9 se muestra en la Fig. 13.

25

Tabla 8
Condición de simulación

Condición	separación de 3 fases			
Conc. de jarabe de aplicación	Bx 60			
Pureza objetivo	Pureza de tagatosa: al menos 90 %			
Resultado	Caso 6	Caso 7	Caso 8	Caso 9

30

Tabla 9
Resumen de los resultados de simulación

Condición	Caso 6	Caso 7	Caso 8	Caso 9
Caudal (L/L-R/h)	0,0464	0,0469	0,0469	0,0446
Desorbente/volumen de aplicación	4,93	4,91	5,31	5,13
Pureza de tagatosa (%)	95,2	93,6	96,0	97,2
Tasa de recuperación de tagatosa (%)	87,8	91,1	81,7	93,0
Pureza de galactosa (%)	74,3	76,3	63,7	77,8

Condición	Caso 6	Caso 7	Caso 8	Caso 9
Tasa de recuperación de galactosa (%)	88,5	86,0	98,3	92,7

El rendimiento explicado en este ejemplo se calculó por simulación por ordenador de Organo.

Ejemplo 9: Estabilidad a la reacción de L-arabinosa isomerasa en monosacárido mixto

5 En el proceso de producción de tagatosa económico usando cromatografía de tres fases propuesto en la presente invención, la solución de sustrato está principalmente compuesta de otros azúcares distintos de galactosa, por ejemplo glucosa, fructosa y sacarosa, a diferencia de la isomerización convencional de galactosa a tagatosa. Así, es una condición importante para la introducción de la técnica de la presente invención si aquellos azúcares diferentes podrían inhibir o no la isomerización usando enzimas. En este ejemplo, los presentes inventores intentaron desvelar la especificidad por sustrato de la isomerización de galactosa en la solución de monosacárido mixto cuando se usó la isomerasa seleccionada por los inventores.

10 Cada solución de sustrato se preparó añadiendo sacarosa, glucosa y fructosa a 100 g/l de solución de galactosa a una cierta relación. La relación de composición de cada azúcar fue del siguiente modo: (a) Sac : Glu : Gal : Fru = 0 : 0 : 1 : 0, (b) Sac : Glu : Gal : Fru = 3 : 1 : 1 : 1, (c) Sac : Glu : Gal : Fru = 0 : 3 : 1 : 2. Cada relación de azúcar se reguló como similar a aquella de (a) el grupo de control que contiene galactosa solo, (b) el grupo en el que el enlace 1,4 de galactosa en el oligosacárido fue selectivamente hidrolizado, y (c) el grupo en el que los azúcares fueron completamente hidrolizados a monosacáridos.

15 Para la isomerización de galactosa, se añadió el sedimento de la cepa depositada (CJ-1-TNAI, N.º de acceso: KCCM10786P) cultivado en el medio de expresión a la solución de sustrato a la concentración de 10 % (peso/volumen), seguido de reacción a 70 °C durante 1 hora. Tras completarse la reacción, la solución mixta se enfrió a 4 °C durante 15 minutos, seguido de centrifugación a 12.000 rpm durante 15 minutos para obtener el sobrenadante. El sobrenadante obtenido se diluyó 5 veces con agua purificada, que pasó a través de un filtro de jeringa de 0,45 µm (Millipore, EE.UU.), seguido de análisis de HPLC.

20 La concentración de azúcar en el producto isomerizado en la solución de monosacárido mixto se analizó por HPLC. Los resultados se muestran en las Fig. 14 y Fig. 16. La concentración de cada azúcar se cuantificó con cada solución patrón y los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10

	Sacarosa	Glucosa	Galactosa	Fructosa	Tagatosa
	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(g/l)	(g/l)
(a) Grupo de control	0	0	13,4	0	5,9
(b) Condición 1	54,7	21,3	13,5	0	6,0
(c) Condición 2	0	60,4	13,7	37,2	6,0

25 Como resultado, se confirmó que la isomerización de galactosa en la solución de azúcar mixta que comprende una gran cantidad de sacarosa, glucosa y fructosa no estuvo afectada y la velocidad de reacción siguió siendo la misma dando la velocidad de conversión coherente (llegó a la misma velocidad de conversión, 30,8 %). Por tanto, se confirmó que la glucosa, fructosa y sacarosa obtenidas mediante hidrólisis de los materiales de partida originados de oligosacárido de soja no actuaron de obstáculo para la isomerización de la galactosa.

Ejemplo 10: Diseño del proceso de producción de tagatosa de recirculación continua a partir de hidrolizado de suero de leche de semilla de soja usando la técnica de separación de tres de fases

30 El proceso de producción de tagatosa diseñado en el Ejemplo 6 se caracteriza por dos veces de cromatografía que requiere una enorme cantidad de agua purificada y concentración. En la presente invención, para vencer dicho inconveniente, los presentes inventores diseñaron un nuevo método de producción de tagatosa que solo requería una vez cromatografía, que podría realizarse por el diseño de cromatografía avanzada. Esto ha sido demostrado e ilustrado en detalle en el ejemplo anterior.

35 El proceso de producción de tagatosa usando una única cromatografía se diseñó del siguiente modo, que se ilustra brevemente en la Fig. 17. Las etapas necesarias para la mejora de la calidad de un producto final tales como la decoloración y la desalinización no se incluyen por separado, debido a que estas etapas pueden incluirse o excluirse durante el proceso de producción, considerando los cambios de calidad del producto.

- 40
1. Separar oligosacárido de soja de subproductos de suero de leche de semilla de soja después del pretratamiento por ultrafiltración o microfiltración;
 2. Hidrolizar la solución de oligosacárido de soja (concentración: 10-50 %) a una temperatura alta o baja (si se usó la enzima originada de bacterias termófilas u hongos);
- 45

3. Isomerizar la galactosa a tagatosa pasando la solución de azúcar hidrolizada que contiene sacarosa y galactosa como componentes principales (al menos 90 %) a través de reactor de L-arabinosa isomerasa (o L-galactosa isomerasa);

4. Separar la solución isomerizada compuesta del azúcar mixto que contiene sacarosa, galactosa y tagatosa como componentes principales (al menos 90 %) por cromatografía de tres fases;

Puede incluirse o excluirse una etapa de concentración según el contenido de azúcar durante el proceso. Las soluciones de separación de azúcar obtenidas de la cromatografía anterior fueron las tres siguientes soluciones:

A. Solución de separación por cromatografía que comprende tagatosa como componente principal (al menos 90 %), que puede dirigirse a concentración (si fuera necesario) y cristalización.

B. Solución restante de cromatografía que comprende galactosa como componente principal, que puede recircularse a la etapa de pre-isomerización o etapa de pre-cristalización, considerando la composición de la solución de azúcar.

C. Solución restante de cromatografía que comprende sacarosa como componente principal, que pueden dirigirse a concentración y cristalización, además de procesarse como solución de sacarosa, o puede usarse como material de partida avanzado para la producción de otro producto.

5. Recircular la solución no cristalizada obtenida en la etapa de cristalización de tagatosa de nuevo a la etapa de pre-cristalización o etapa de pre-isomerización, considerando la composición de la solución de azúcar.

Ejemplo 11: Diseño del proceso de producción de tagatosa de recirculación continua a partir de hidrolizado de suero de leche de semilla de soja usando el pretratamiento de cristalización de sacarosa

Usando una etapa adicional del método de producción de tagatosa avanzado usando una única cromatografía explicada anteriormente, los presentes inventores diseñaron reducir la utilidad del proceso reduciendo el contenido de sacarosa en la solución de azúcar mediante la cristalización de sacarosa.

El oligosacárido de soja contiene excesiva sacarosa, que aumenta el volumen de solución de azúcar para la separación por cromatografía, aumenta la escala del equipo y aumenta el agua purificada consumida.

Así, los presentes inventores diseñaron el proceso de producción de tagatosa usando una única cromatografía que incluyó cristalización de sacarosa como etapa de pretratamiento del siguiente modo. Este proceso se ilustra en la Fig. 18 brevemente. Las etapas necesarias para la mejora de la calidad de un producto final tales como la decoloración y la desalinización no se incluyen por separado, debido a que estas etapas pueden incluirse o excluirse durante el proceso de producción, considerando los cambios de calidad del producto.

1. Separar oligosacárido de soja de subproductos de suero de leche de semilla de soja después del pretratamiento por ultrafiltración o microfiltración;

2. Hidrolizar la solución de oligosacárido de soja (concentración: 10-50 %) a una temperatura alta o baja (si se usó enzima originada de bacterias termófilas u hongos);

3. Obtener solución de azúcar que contiene elevada galactosa por cristalización de sacarosa en la solución de oligosacárido hidrolizado;

4. Isomerizar la galactosa a tagatosa pasando la solución de azúcar hidrolizada que contiene sacarosa y galactosa como componentes principales (al menos 90 %) a través de reactor de L-arabinosa isomerasa (o L-galactosa isomerasa);

5. Separar la solución isomerizada compuesta del azúcar mixto que comprende sacarosa, galactosa y tagatosa como componentes principales (al menos 90 %) por cromatografía de tres fases;

Puede incluirse o excluirse una etapa de concentración según el contenido de azúcar durante el proceso. Las soluciones de separación de azúcar obtenidas de la cromatografía anterior fueron las tres siguientes soluciones:

A. Solución de separación por cromatografía que comprende tagatosa como componente principal (al menos 90 %), que puede dirigirse a concentración (si fuera necesario) y cristalización.

B. Solución restante de cromatografía que comprende galactosa como componente principal, que puede recircularse a la etapa de pre-isomerización o etapa de pre-cristalización, considerando la composición de la solución de azúcar.

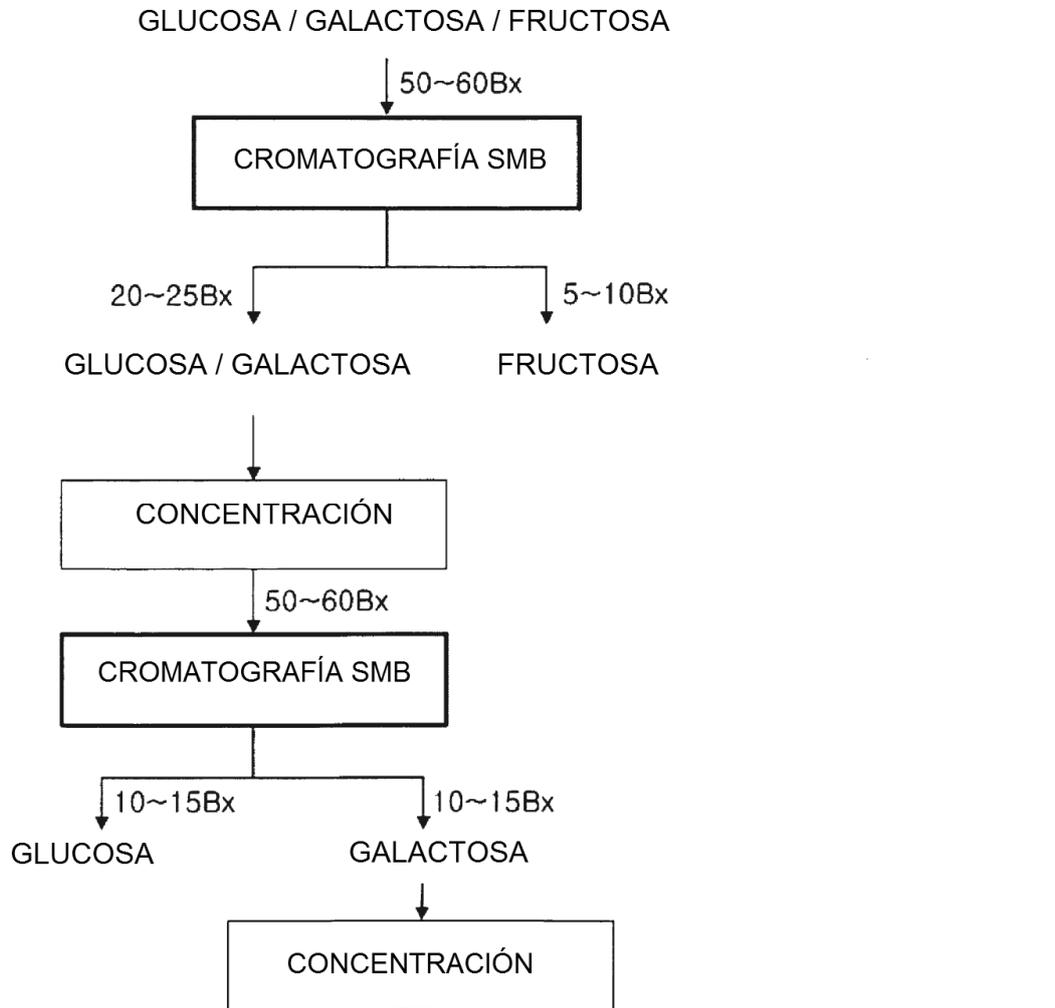
C. Solución restante de cromatografía que comprende sacarosa como componente principal, que puede dirigirse a concentración y cristalización, además de procesarse como solución de sacarosa, o puede usarse como material de partida avanzado para la producción de otro producto.

6. Recircular la solución no cristalizada obtenida en la etapa de cristalización de tagatosa de nuevo a la etapa de pre-cristalización o etapa de pre-isomerización, considerando la composición de la solución de azúcar.

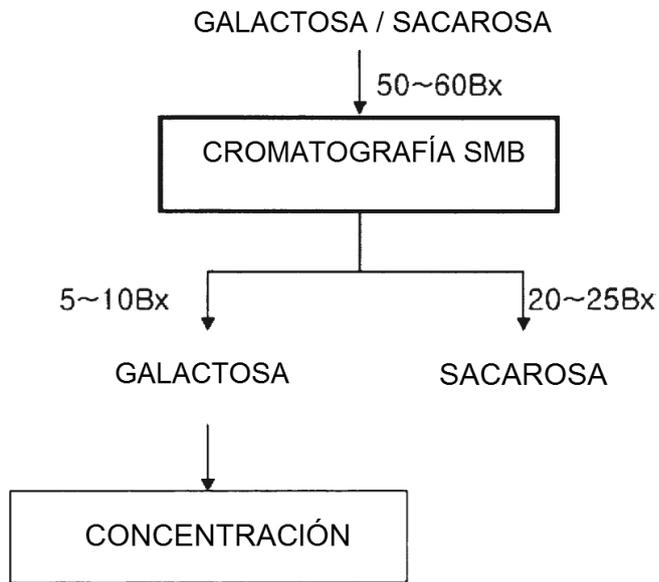
REIVINDICACIONES

1. Un método de producción de tagatosa que comprende las siguientes etapas:
- 5 a. separar oligosacárido de soja de subproductos de suero de leche de semilla de soja;
 b. hidrolizar el oligosacárido de soja usando α -galactosidasa libre de invertasa;
 c. isomerizar la solución de azúcar hidrolizada usando arabinosa isomerasa para obtener el producto isomerizado que comprende azúcar mixto que contiene sacarosa, galactosa y tagatosa como componentes principales; y
 10 d. separar la solución isomerizada por cromatografía.
2. El método de producción de tagatosa según la reivindicación 1, en el que después de la etapa b) el método comprende además la etapa de obtener del oligosacárido de soja hidrolizado una solución de azúcar en la que el contenido de sacarosa se reduce por la cristalización de sacarosa.
- 15 3. El método de producción de tagatosa según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que después de la etapa d) el método comprende además la etapa de recircular la galactosa no reaccionada.
4. El método de producción de tagatosa según la reivindicación 3, en el que la galactosa no reaccionada se separa por cromatografía y entonces se recircula en la etapa b) o etapa c).
- 20 5. El método de producción de tagatosa según la reivindicación 1, en el que el subproducto de suero de leche de semilla de soja se pretrata por ultrafiltración o microfiltración.
- 25 6. El método de producción de tagatosa según la reivindicación 1, en el que la concentración del oligosacárido de soja es del 10-50 %.
7. El método de producción de tagatosa según la reivindicación 1, en el que la hidrólisis se realiza a 40 °C - 80 °C.
- 30 8. El método de producción de tagatosa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la α -galactosidasa se origina de *Mortierella vinaceae* var. *rafinoseutilizer* ATCC 20034 o *Absidia griseola* ATCC 20431.
9. El método de producción de tagatosa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la α -galactosidasa es capaz de digerir selectivamente el enlace alfa 1,4 entre sacarosa y galactosa.
- 35 10. El método de producción de tagatosa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la sacarosa y la galactosa se obtienen por la hidrólisis de la etapa b).
- 40 11. El método de producción de tagatosa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que la arabinosa isomerasa se origina de *Thermotoga neapolitana* DSM 5068 termófila.
12. El método de producción de tagatosa según la reivindicación 1, en el que la sacarosa, galactosa y tagatosa comprenden juntos al menos el 90 % de la solución isomerizada.
- 45 13. El método de producción de tagatosa según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la cromatografía de la etapa d) es una cromatografía única.
14. El método de producción de tagatosa según la reivindicación 13, en el que la cromatografía de la etapa d) usa una resina que contiene residuo de Ca.
- 50 15. El método de producción de tagatosa según la reivindicación 1, en el que las reacciones de la etapa b) y la etapa c) se realizan en el mismo reactor simultáneamente.
- 55 16. Un método de producción de tagatosa que comprende las siguientes etapas;
- a. separar oligosacárido de soja de subproductos de suero de leche de semilla de soja;
 b. hidrolizar el oligosacárido de soja usando α -galactosidasa libre de invertasa;
 c. separar la sacarosa y la galactosa de la solución de azúcar hidrolizada por cromatografía;
 d. isomerizar la solución de separación por cromatografía que contiene galactosa como componente principal usando arabinosa isomerasa; y
 60 e. obtener tagatosa separando el producto isomerizado usando cromatografía.
17. El método de producción de tagatosa según la reivindicación 16, en el que el método comprende además la etapa de recircular la galactosa no reaccionada obtenida después de la etapa d) en la etapa d).
- 65

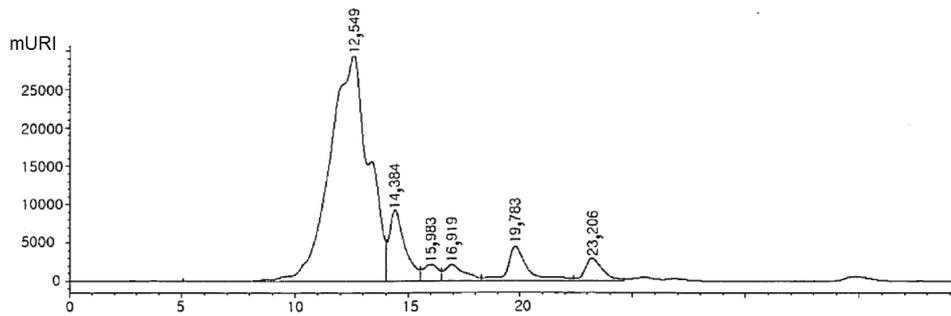
【FIG. 1】



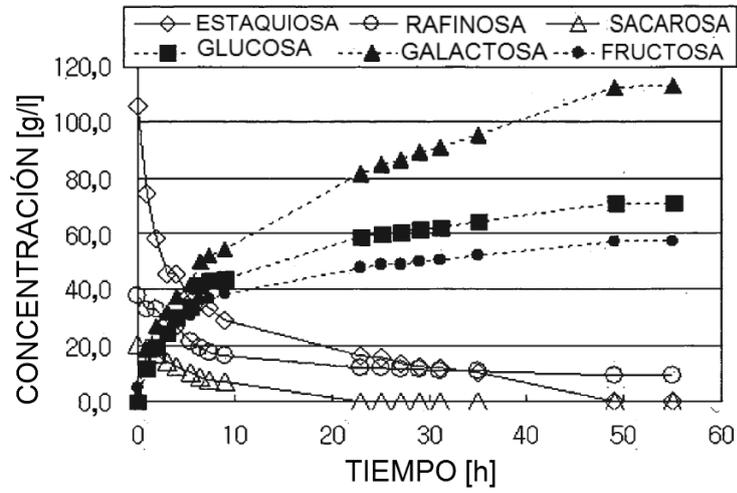
【FIG. 2】



【FIG. 3】

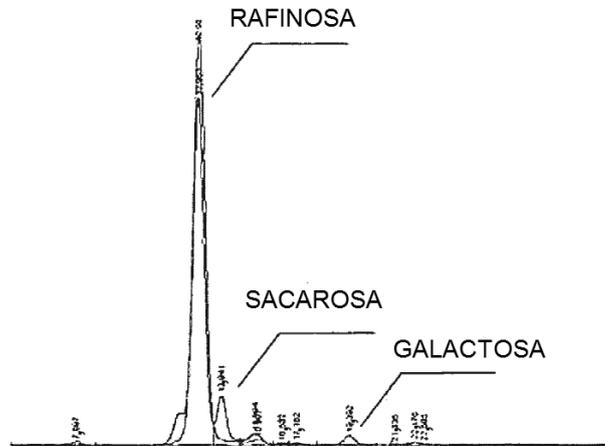


【FIG. 4】

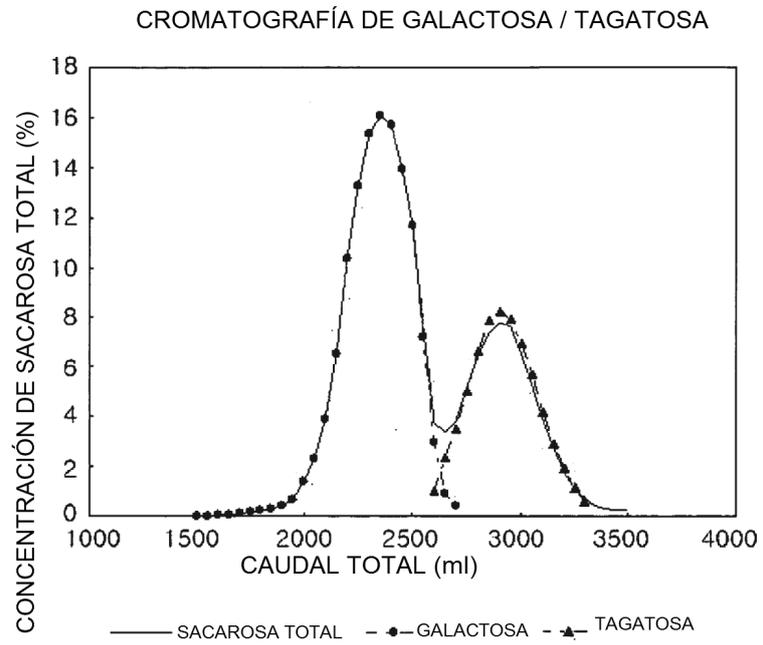


【FIG. 5】

ORIGINADA DE MORTIERELLA VINACEAE



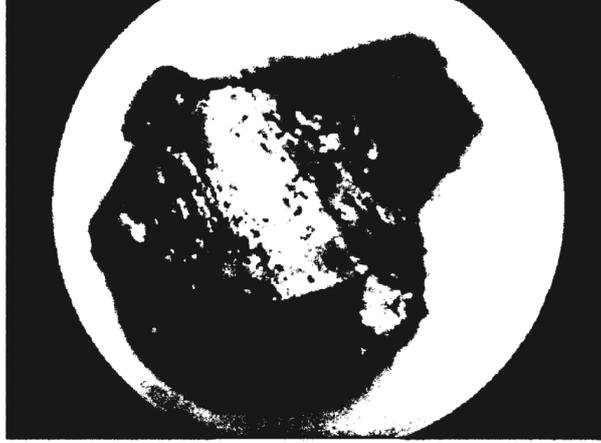
【FIG. 8】



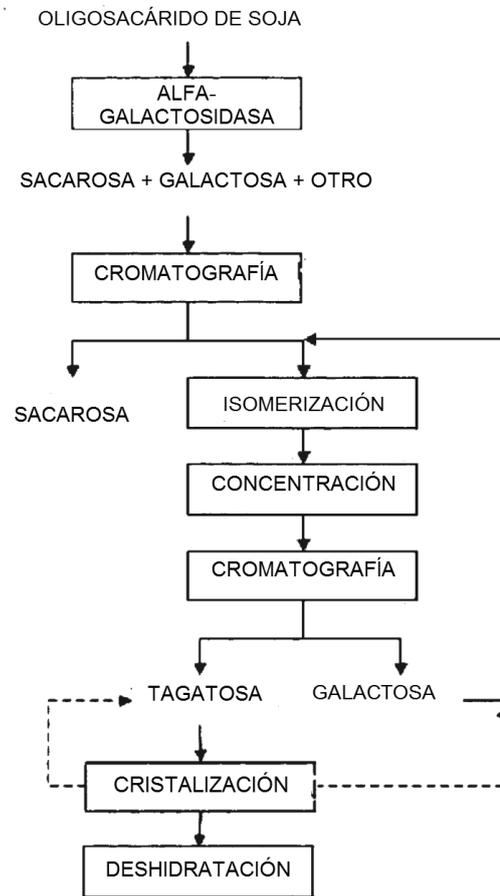
[FIG. 9]



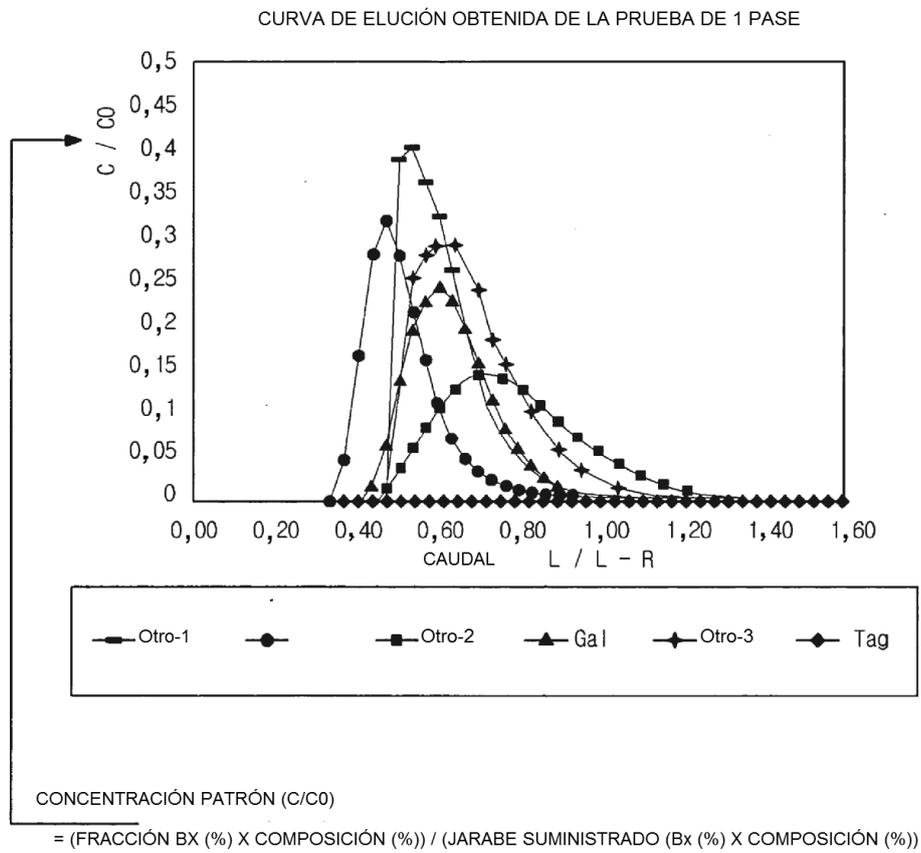
【FIG. 10】



【FIG. 11】



【FIG. 12】



[FIG. 13]

CJ Corporation

Tabla 9

Operación en el sistema de lecho en movimiento simulado nuevo
 Jarabe alimentado : 15,6 T de sólido/d
 Muestra: Solución de tagatosa

Experimento y

Gravedad específica		Jarabe alimentado	
Bx	%	1,2859	Conc. [g/l]
Sólido	t/d	60	771,57
Vol.	m ³ /d	15,55	
Vol.	m ³ /d	20,15	
		Purity	
Sacarosa	t/d	11,49	73,9%
Otros-2	t/d	0,08	0,5%
Galactosa	t/d	1,96	12,6%
Otros-3	t/d	0,06	0,4%
Tagatosa	t/d	1,95	12,6%

Fracción		1/1-R/h	
f			0,0446

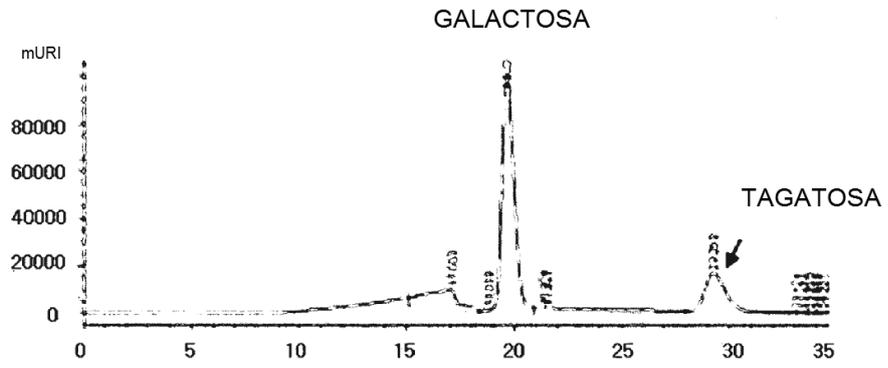
Vol. ENTRADA		m ³ /día	
			123,4
Vol. SALIDA		m ³ /día	
			123,4

		Fracción de sac		Fracción de gala	
Gravedad específica		1,0969	Conc. [g/l]	1,0339	Conc. [g/l]
Bx	%	23,6	258,34	9,0	92,74
Sólido	t/d	11,34		2,34	
Vol.	m ³ /d	43,91		25,19	
		Pureza		Pureza	
Sacarosa	t/d	11,16	98,4%	0,31	13,5%
Otros-2	t/d	0,03	0,3%	0,05	2,1%
Galactosa	t/d	0,13	1,1%	1,82	77,8%
Otros-3	t/d	0,00	0,0%	0,04	1,7%
Tagatosa	t/d	0,02	0,2%	0,11	4,9%
	t/d	0,00	0,0%	0,00	0,0%
		% de rec.		% de rec.	
			97,1%		38,8%
			0,3%		6,6%
			0,0%		0,0%
			1,1%		1,1%
			0,0%		0,0%

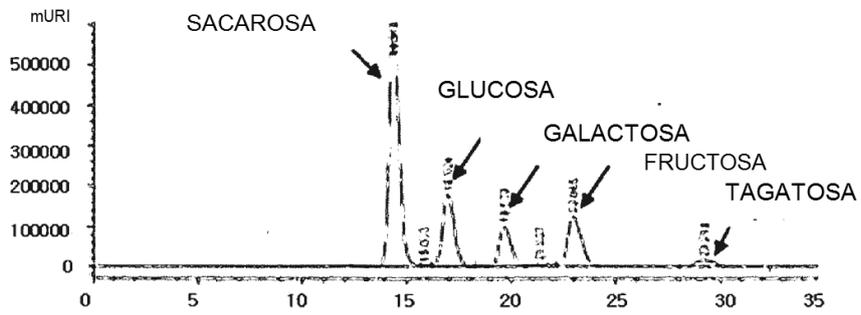
Fracción		1/1-R/h	
A: Fracción de sac			0,0972
A/f			2,1789
B: Fracción de gala			0,0558
B/f			1,2500

Nota
 El rendimiento mencionado en esta tabla no es el rendimiento garantizado sino el cálculo por el

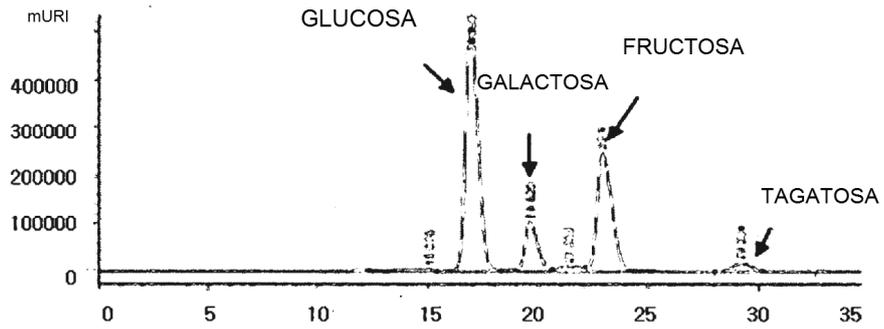
【FIG. 14】



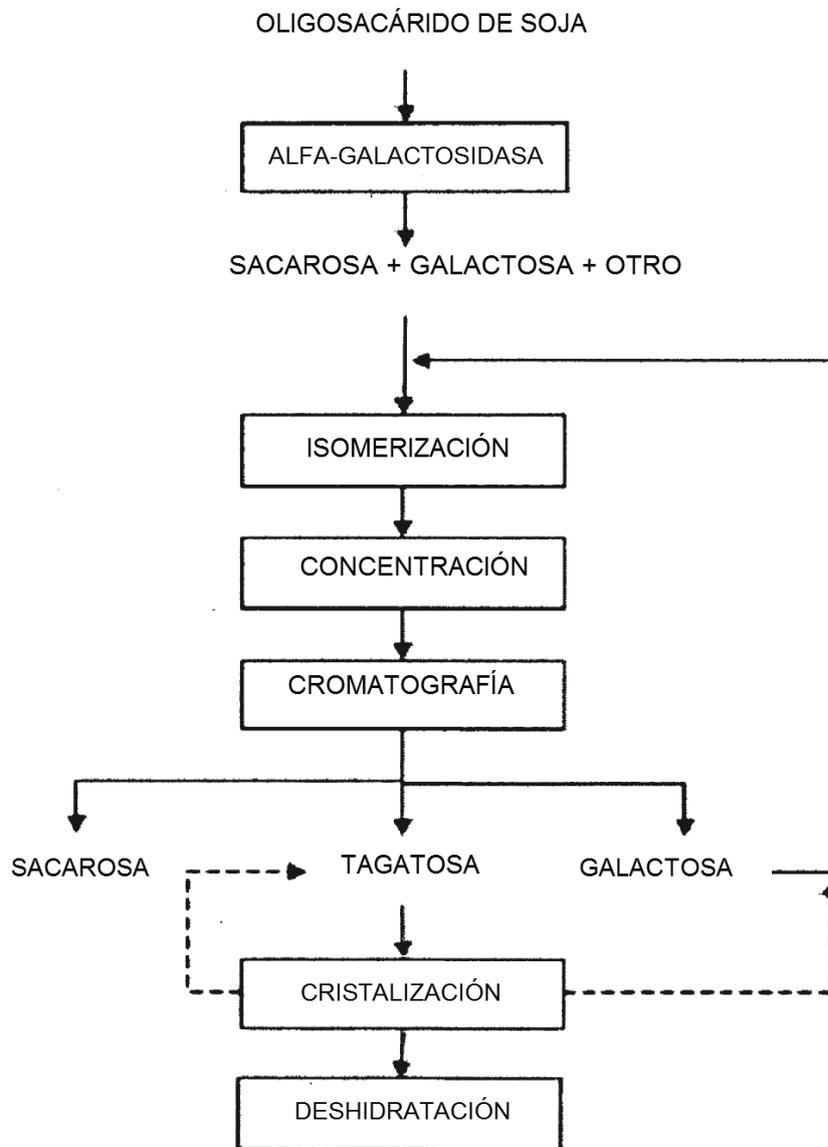
【FIG. 15】



【FIG. 16】



【FIG. 17】



【FIG. 18】

