(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 721 309**

(51) Int. Cl.:

C12N 9/90 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12P 19/02 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.10.2015 PCT/KR2015/011007**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2016 WO16064146**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2015 E 15852026 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.03.2019 EP 3211078**

(54) Título: **Composición para preparar tagatosa y método para preparar tagatosa a partir de fructosa**

(30) Prioridad:

22.10.2014 KR 20140143703

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.07.2019

(73) Titular/es:

CJ CHEILJEDANG CORPORATION (100.0%)
CJ Cheiljedang Center, 330, Dongho-ro, Jung-gu
Seoul 04560, KR

(72) Inventor/es:

KIM, YANG HEE;
YANG, SUNG JAE;
LEE, YOUNG MI;
PARK, IL HYANG;
KIM, SEONG BO;
CHO, HYUN KUG y
PARK, SEUNG WON

(74) Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

ES 2 721 309 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición para preparar tagatosa y método para preparar tagatosa a partir de fructosa

[Campo técnico]

La presente invención se refiere a una composición para preparar tagatosa y a un método para preparar tagatosa a partir de fructosa, y más particularmente, a un gen que codifica una fructosa 4-epimerasa termófila derivada de microorganismos termófilos y a un método para preparar tagatosa a partir de fructosa utilizando la enzima.

[Técnica antecedente]

La tagatosa es un epímero de D-fructosa, y tiene un sabor dulce natural difícilmente distinguible de la sacarosa y propiedades físicas similares a la sacarosa. Tagatosa es un edulcorante natural, que está presente en una pequeña cantidad en alimentos como la leche, el queso, el cacao y similares, y en frutas dulces tal como manzanas y mandarina. La tagatosa tiene un valor calórico de 1,5 kcal/g, que es un tercio del de la sacarosa, y un índice glucémico (IG) de 3, que es el 5% del de la sacarosa. La tagatosa tiene un sabor dulce similar al de la sacarosa y tiene diversos beneficios para la salud. En este sentido, la tagatosa se puede utilizar como un edulcorante alternativo capaz de satisfacer tanto el sabor como la salud cuando se aplica a una amplia diversidad de productos.

Se sabe que la tagatosa se puede producir a partir de galactosa mediante un método químico (reacción catalítica) o un método biológico (reacción enzimática de isomerización) (publicación de patente de coreana abierta a inspección pública N.º 2009-0082774, publicada el 31 de julio de 2009).

Deok-Kun Oh "Tagatose: properties, applications, and biotechnological processes" (Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 76, n.º 1, 10 de mayo de 2007, página 1-8) describe la producción biológica de tagatosa utilizando varias fuentes de biocatalizador.

Pil Kim "Current studies on biological tagatose production using L-arabinose isomerase: a review and future perspective" (Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 65, 1 de enero de 2004, páginas 243-249) describen la producción biológica de tagatosa usando L-arabinosa isomerasa.

Kim, Hye-Jung et al. "Novel activity of UDP-galactose-4-epimerase for free monosaccharide and activity improvement by active site-saturation mutagenesis" (Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 163, n.º 3, 2011, página 444-451), describe la conversión de fructosa en tagatosa por la GalE-galactosa-4-epimerasa de E. coli.

Para producir económicamente galactosa como materia prima para las reacciones anteriores, se han realizado estudios para desarrollar diversas materias primas que contienen galactosa, un método para obtener galactosa y un método para producir tagatosa utilizando las materias primas. La lactosa se ha utilizado como la materia prima más representativa de la galactosa. Sin embargo, el precio de la lactosa o los productos que contienen lactosa era inestable, dependiendo de las cantidades producidas, la oferta y la demanda de leche cruda y lactosa en los mercados mundiales, y similares. Dichas fluctuaciones en los precios alteran el suministro estable de materias primas para producir tagatosa.

Específicamente, alrededor de 2012, el fuerte aumento en el precio global de la lactosa fue causado principalmente por la rápida demanda de leche desnatada en polvo y leche entera en polvo que contenía lactosa debido al rápido crecimiento económico en China y la disminución de la producción anual de leche en los países productores de lácteos debido a calentamiento global. Dichas fluctuaciones de precios en el precio de las materias primas hacen que la producción estable de tagatosa sea difícil. Por consiguiente, existe la necesidad de un nuevo método para preparar tagatosa usando sacáridos comunes (sacarosa, glucosa, fructosa y similares).

[Descripción]

[Problema técnico]

En el pasado, la tagatosa se producía utilizando galactosa descompuesta a partir de diversos recursos biológicos, tal como permeado de suero de leche, que es un subproducto soluble como materia prima alimentaria, excepto la lactosa, y el alerce que es biomasa vegetal.

Sin embargo, no hay materias primas adecuadas que puedan producirse comercialmente o aproximarse a la comercialización en términos de suministro estable de materias primas y eficiencia de inversión.

Un objeto de la presente invención es proporcionar una composición para preparar tagatosa a partir de sacáridos comunes más adecuada para aplicaciones industriales que los métodos anteriores para preparar tagatosa a partir de galactosa, y un método para preparar tagatosa.

Específicamente, la presente invención tiene el objetivo de proporcionar una nueva proteína enzimática, cuya función no se aclara en la técnica anterior, y que tiene actividad de D-fructosa 4-epimerasa y es capaz de preparar tagatosa con alto rendimiento a partir de fructosa, un gen que codifica la misma, una composición para preparar tagatosa usando la misma, y un método para preparar tagatosa a partir de fructosa.

[Solución técnica]

La presente invención proporciona un método para preparar tagatosa a partir de fructosa, que incluye: hacer reaccionar una composición que comprende una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NOs: 1 a 7 o un microorganismo que expresa la proteína con fructosa.

[Efectos ventajosos]

La presente invención proporciona un método para producir tagatosa, que es económico y tiene un alto rendimiento utilizando una materia prima común, fructosa, desarrollando una nueva D-fructosa 4-epimerasa que tiene una actividad para producir tagatosa al epimerizar fructosa en el carbono número 4.

Además, la presente invención proporciona un método para producir tagatosa, que es económico y tiene un alto rendimiento utilizando una materia prima común, fructosa, en lugar de lactosa con fluctuaciones violentas de precios, reduciendo de este modo los costes de producción.

En general, como es bien sabido en la técnica que la fructosa se puede producir industrialmente a partir de glucosa o sacarosa, las materias primas sugeridas en el presente documento abarcan, no solo la fructosa, sino también materias primas que contienen fructosa total o parcialmente, de tal forma que se puede garantizar una producción más económica. Concretamente, la presente descripción abarca la producción de tagatosa a través de la conversión enzimática de almidón, azúcar en bruto o sacarosa.

Además, la presente invención puede producir tagatosa a partir de fructosa, lo que garantiza una producción en masa eficiente de tagatosa que llama la atención como un importante material alimenticio en la actualidad.

[Descripción de los dibujos]

La Figura 1a a la Figura 1g muestran mapas de escisión de vectores recombinantes para expresar siete D-fructosa 4-epimerasas derivadas de cada uno de los microorganismos termófilos.
La Figura 2a a la Figura 2g muestran gráficos de HPLC que representan siete rutas de preparación de tagatosa derivadas de cada uno de los microorganismos termófilos a través de reacciones de D-fructosa 4-epimerasa utilizando fructosa como sustrato.
La Figura 3a a la Figura 3g muestran gráficos que representan la actividad de siete D-fructosa 4-epimerasas derivadas de cada uno de los microorganismos termófilos, dependiendo de la temperatura.
La Figura 4a a la Figura 4g muestran gráficos que representan la actividad de siete D-fructosa 4-epimerasas derivadas de cada uno de los microorganismos termófilos, dependiendo del cambio del pH.
La Figura 5a a la Figura 5g muestran gráficos que representan la actividad de siete D-fructosa 4-epimerasas derivadas de cada uno de los microorganismos termófilos, dependiendo de los tipos de iones metálicos.
La Figura 6a a la Figura 6g muestran las secuencias de aminoácidos de las proteínas expuestas en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 7 derivadas de cada uno de los siete microorganismos termófilos.

[Mejor modo]

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con más detalle basándose en formas de realización concretas. La presente invención no pretende ser una limitación por las formas de realización. Las descripciones de los detalles evidentes para los expertos en la técnica que tienen conocimientos ordinarios en este

campo técnico o campo relevante se omitirán en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "carbono en la posición n (en lo sucesivo en el presente documento denominado Cn)" se refiere a una posición del carbono definida de acuerdo con la nomenclatura IUPAC, en la que n es un número entero de 1 o más. Por ejemplo, la "epimerización en la posición 4 del carbono 4" se expresa como "epimerización C4".

La presente descripción proporciona una composición para preparar tagatosa a partir de fructosa, que incluye: una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 7 o un microorganismo que expresa la proteína.

En general, los monosacáridos se pueden clasificar en aldohexosas y cetohexosas. Una aldohexosa se refiere a una aldosa que tiene seis átomos de carbono y un grupo aldehído en un extremo de la misma. Los ejemplos de la aldohexosa incluyen glucosa, galactosa, alosa, gulosa, altrosa, manosa, talosa e idosa, sin limitarse a las mismas.

Además, una cetohexosa se refiere a un monosacárido que tiene seis átomos de carbono y un grupo cetona. Los ejemplos de la cetohexosa incluyen fructosa, tagatosa, psicosa y sorbosa, sin limitarse a las mismas. Específicamente, la fructosa se utiliza como cetohexosa. Como se usa en el presente documento, tanto la fructosa como la tagatosa se refieren a D-fructosa y D-tagatosa, a menos que se especifique lo contrario.

Una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7 puede ser una enzima que tiene una actividad para producir tagatosa mediante la epimerización de fructosa en el número de carbono 4.

Específicamente, los presentes inventores utilizaron microorganismos que pertenecen al género termófilo *Rhodothermus*, al género *Thermoanaerobacter*, al género *Thermotoga*, y al género *Dictyoglomus.* Dado que las enzimas producidas a partir de microorganismos termófilos tienen las mismas funciones que las producidas a partir de microorganismos mesófilos, pueden llevar a cabo una reacción estable en condiciones extremas (alta temperatura, o similares), pueden prevenir la contaminación por microorganismos mesófilos, pueden aumentar la solubilidad de los materiales que tienen baja solubilidad en sustratos, y pueden aumentar la velocidad de reacción, las enzimas producidas a partir de microorganismos termófilos pueden superar las desventajas industriales de las enzimas mesófilas. Los presentes inventores cribaron las fructosa 4-epimerasas a partir de los microorganismos termófilos mencionados anteriormente y después, entre sus genes nativos, finalmente identificaron polinucleótidos novedosos, que expresaban enzimas capaces de convertir fructosa en tagatosa. La presente descripción proporciona una enzima que convierte la fructosa en tagatosa sintetizando una secuencia de polinucleótidos optimizada para sobreexpresar eficazmente una proteína, insertando el polinucleótido en un vector recombinante, y expresando una enzima.

Una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 7 puede transformarse mediante un vector recombinante que incluye un gen que codifica una proteína que tiene la secuencia anterior.

Los ejemplos de microorganismos para la transformación incluyen *Escherichia. coli*, (denominada en lo sucesivo en el presente documento *E. coli*), *Corynebacterum glutamicum*, *Aspergillus oryzae*, o *Bacillus subtilis*, y similares. Los ejemplos de microorganismos transformados por *E. coli* pueden incluir *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET21a-RM(número de acceso: KCCM11576P), *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET21a-TAM(número de acceso: KCCM11577P), *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET21a-TAS(número de acceso: KCCM11578P), *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET21a-TAX(número de acceso: KCCM11579P), *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET21a-TP(número de acceso: KCCM11580P), *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET21a-TL(número de acceso: KCCM11581P), y *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET21a-DT(número de acceso: KCCM11582P), que se depositaron en el Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM)(361-221 Hongje 1-dong, Seodaemun-gu, Seul, Corea) el 6 de octubre de 2014 como los números de acceso KCCM11576P, KCCM11577P, KCCM11578P, KCCM11579P, KCCM11580P, KCCM11581P, y KCCM11582P, respectivamente.

Específicamente, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1 puede ser una enzima derivada de *Rhodothermus marinus.*

La proteína puede tener un peso molecular de 55 kDa a 60 kDa, una temperatura de actividad óptima de 50 °C a 90 °C, y un pH de actividad óptimo de 6,0 a 9,0.

Más específicamente, la temperatura de actividad óptima puede ser de 60 °C a 80 °C, y el pH de actividad óptimo

puede ser de 7,0 a 9,0.

Específicamente, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 puede ser una enzima derivada de *Thermotoga petrophila.*

La proteína puede tener un peso molecular de 55 kDa a 58 kDa, una temperatura de actividad óptima de 50°C a 90°C, y un pH de actividad óptimo de 7,0 a 9,0.

Más específicamente, la temperatura de actividad óptima puede ser de 70 °C a 90 °C.

Específicamente, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 3 puede ser una enzima derivada de *Thermotoga lettingae.*

La proteína puede tener un peso molecular de 55 kDa a 58 kDa, una temperatura de actividad óptima de 50 °C a 90 °C, y un pH de actividad óptimo de 7,0 a 9,0.

Más específicamente, la temperatura de actividad óptima puede ser de 60 °C a 80 °C.

Específicamente, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 4 puede ser una enzima derivada de *Thermoanaerobacter mathranii.*

La proteína puede tener un peso molecular de 55 kDa a 58 kDa, una temperatura de actividad óptima de 50 °C a 90 °C, y un pH de actividad óptimo de 7,0 a 10,0.

Más específicamente, la temperatura de actividad óptima puede ser de 70 °C a 90 °C y el pH de actividad óptimo puede ser de 8,0 a 10,0.

Específicamente, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5 puede ser una enzima derivada de *Dictyoglomus turgidum.*

La proteína puede tener un peso molecular de 55 kDa a 58 kDa, una temperatura de actividad óptima de 50 °C a 90 °C, y un pH de actividad óptimo de 7,0 a 9,0.

Más específicamente, la temperatura de actividad óptima puede ser de 60 °C a 80 °C.

Específicamente, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 6 puede ser una enzima derivada de *Thermoanaerobacterium xylanolyticum.*

La proteína puede tener un peso molecular de 53 kDa a 58 kDa, una temperatura de actividad óptima de 50 °C a 90 °C, y un pH de actividad óptimo de 6,0 a 9,0.

Más específicamente, la temperatura de actividad óptima puede ser de 60 °C a 80 °C y el pH de actividad óptimo puede ser de 6,0 a 8,0.

Específicamente, una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 7 puede ser una enzima derivada de *Thermoanaerobacter siderophilus.*

La proteína puede tener un peso molecular de 55 kDa a 58 kDa, una temperatura de actividad óptima de 50 °C a 80 °C, y un pH de actividad óptimo de 7,0 a 10,0.

Más específicamente, la temperatura de actividad óptima puede ser de 60 °C a 80 °C y el pH de actividad óptimo puede ser de 8,0 a 10,0.

La presente invención proporciona un método para preparar tagatosa a partir de fructosa, que incluye: hacer reaccionar una composición que comprende una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NOs: 1 a 7 o un microorganismo que expresa la proteína con fructosa.

Específicamente, la reacción puede llevarse a cabo de 50 °C a 80 °C.

Además, la reacción puede llevarse a cabo a pH 6,0 a 9,0.

Además, la reacción puede llevar a cabo añadiendo además iones de magnesio, iones de cinc, iones de níquel, iones de cobalto, iones de hierro, iones de manganeso, o una mezcla de los mismos.

Además, como un sustrato, la fructosa puede estar presente en una concentración del 5% (p/v) al 60% (p/v).

De acuerdo con una forma de realización, la fructosa se puede obtener a partir de sacarosa o glucosa. Como resultado, la presente invención puede proporcionar un método para producir tagatosa con alto rendimiento utilizando materias primas comunes y económicas tales como glucosa, fructosa, sacarosa y similares, que permiten la producción en masa de tagatosa.

Por consiguiente, el método puede incluir además hidrolizar sacarosa o isomerizar glucosa para producir fructosa antes de la reacción de la composición de acuerdo con una cualquiera de las formas de realización de la presente invención con fructosa.

Las enzimas utilizadas en la hidrólisis pueden ser al menos una seleccionada del grupo que consiste en β-D-fructosidasa que incluye β-fructofuranosidasa, invertasa, sacarasa y similares; sucrasa, α-glucosidasa y α-D-glucohidrolasa, sin limitarse a las mismas.

Los ejemplos de la enzima que isomeriza glucosa pueden incluir glucosa isomerasa y fosfogluco isomerasa, sin limitarse a las mismas.

Ejemplo

Ejemplo 1. Preparación de un microorganismo recombinante que produce D-fructosa 4-epimerasa

Los polinucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos expuestas en la SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 7 (Figura 6a a Figura 6g) mostradas en la Tabla 1 derivadas de siete microorganismos termófilos se insertaron en un sitio de restricción en un vector de expresión pET21a (Novagen) utilizando las enzimas de restricción NdeI y XhoI, preparando de este modo los vectores recombinantes pET21a-RM, pET21a-TAM, pET21a-TAS, pET21a-TAX, pET21a-TP, pET21a-TL, y pET21a-DT (Figura 1a a Figura 1g). Los vectores recombinantes se sometieron a un método de choque térmico (Sambrook y Russell: Molecular Cloning.) para transformar BL21 de *E. coli* (DE3) (Invitrogen), preparando de este modo un microorganismo recombinante.

TABLA 1

Lista de microorganismos termófilos	
RM	*Rhodothermus marinus*
TAM	*Thermoanaerobacter mathranii*
TAS	*Thermoanaerobacter siderophilus SR4*
TAX	*Thermoanaerobacterium xylanolyticum*
TP	*Thermotoga petrophila*
TL	*Thermotoga lettingae*
DT	*Dictyoglomus turgidum*

El microorganismo recombinante transformado se inoculó en 5 ml de medio de LB-ampicilina (Difco), se cultivó por agitación a 37 °C y 180 rpm hasta que la absorbancia (DO) alcanzó 1,5 nm, y después se inoculó en un medio de LB-ampicilina de 500 ml. Después, se añadió lactosa 5 mM a la masa resultante para inducir la sobreexpresión de la enzima diana seguido de cultivo en una incubadora de agitación a 37 °C. Las condiciones de cultivo se mantuvieron a 37 °C y 180 rpm durante 16 horas. Posteriormente, la masa resultante se centrifugó en una centrífuga a 4.000 rpm durante 20 minutos para recoger solamente microorganismos recombinantes.

Por lo tanto, los microorganismos recombinantes preparados se nombraron *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET21a-RM(número de acceso: KCCM11576P), *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET21a-TAM(número de acceso: KCCM11577P), *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET21a-TAS(número de acceso: KCCM11578P), *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET21a-TAX(número de acceso: KCCM11579P), *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET21a-TP(número de acceso: KCCM11580P), *Escherichia coli* BL21(DE3)-pET21a-TL(número de acceso: KCCM11581P), y *Escherichia*

coli BL21(DE3)-pET21a-DT(número de acceso: KCCM11582P), que se depositaron en el Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM)(361-221 Hongje 1-dong, Seodaemun-gu, Seúl, Corea) el 6 de octubre de 2014 como los números de acceso KCCM11576P, KCCM11577P, KCCM11578P, KCCM11579P, KCCM11580P, KCCM11581P, y KCCM11582P, respectivamente.

Ejemplo 2. Purificación e identificación de propiedades de la D-fructosa 4-epimerasa

2-1. Purificación de D-fructosa 4-epimerasa

Siete microorganismos recogidos en el Ejemplo 1 se disolvieron en un tampón de lisis (K-fosfato 50 mM) y después se alteraron utilizando un procesador ultrasónico a 4 °C durante 10 minutos. El líquido alterado se sometió a tratamiento térmico en una incubadora de agitación a 60 °C durante 30 minutos, seguido de centrifugación a 13.000 rpm durante 10 minutos para obtener los sobrenadantes. Los sobrenadantes obtenidos se aplicaron a DEAE de Q-Sefarosa equilibrada con el tampón de lisis, seguido de K-fosfato 50 mM de flujo secuencial y una solución de tampón que contenía NaCl 200 mM, purificando de este modo las proteínas deseadas. Las proteínas eluidas se dializaron con una solución tampón para la evaluación de la actividad enzimática (K-fosfato 50 mM, pH 7), que después se usó en el siguiente experimento. Además, siete D-fructosa-4-epimerasas purificadas, RM, TAM, TAS, TAX, TP, TL y DT se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y se encontró que tenían un peso molecular de aproximadamente 58 kDa, 56 kDa, 56 kDa, 55 kDa, 56 kDa, 57 kDa, y 57kDa, respectivamente.

2-2. Análisis de actividad de la D-fructosa 4-epimerasa dependiendo de los cambios en la temperatura y el pH

Para identificar la actividad de siete D-fructosa 4-epimerasas purificadas en el Ejemplo 2-1 dependiendo de los cambios en el pH y la temperatura, las enzimas se hicieron reaccionar con el sustrato de fructosa a un pH y temperatura variables.

La medición de la actividad se realizó haciendo reaccionar fructosa 50 mM, 1 mg/ml de enzimas y $NiSO_4$ 0,1 mM a cada pH e intervalo de temperatura, seguido de la inactivación del producto de reacción con hielo, y después se analizó mediante HPLC. El análisis de HPLC se realizó utilizando una columna SUGAR SP0810 (Shodex) a 80 °C mientras el agua fluía como una fase móvil a un caudal de 0,6 ml/min, seguido de la detección de tagatosa utilizando un detector de índice de refracción diferencial para analizar la productividad de la tagatosa.

En primer lugar, para evaluar la actividad de las enzimas a pH 7 dependiendo del cambio de temperatura, se midió la productividad de la tagatosa de 40 °C a 90 °C. Como resultado, entre las siete enzimas, dos enzimas TAM y TP mostraron una tasa de conversión máxima a 80 °C, mientras que cinco enzimas RM, TAS, TAX, TL y DT mostraron una tasa de conversión máxima a 70°C (Figura 3a a Figura 3g).

Además, para evaluar la actividad de las enzimas dependiendo del cambio de pH, se midió la productividad de la tagatosa a 70 °C utilizando soluciones tampón de acetato de sodio 50 mM a pH 4-6, K-fosfato 50 mM a pH 6-8 y Tris-HCl 50 mM de pH 7 a pH 9, respectivamente. Como resultado, se confirmó que las enzimas demostraron una actividad máxima a diferentes valores de pH, específicamente una actividad alta de pH 7 a pH 9.

Específicamente, TAX presentó alta actividad a pH 7, TP, TL, RM y DT presentaron alta actividad a pH 8, y TAS y TAM presentaron alta actividad a pH 9. Además, entre las soluciones tampón correspondientes a los valores de pH anteriores, se confirmó que la solución tampón Tris-HCl presentó la actividad máxima (Figura 4a a Figura 4g).

Como se ve a partir de la Figura 5a a la Figura 5g, se confirmó que las enzimas del Ejemplo 2-1 podrían producir tagatosa a partir de fructosa.

[2-3. Análisis de la demanda de iones metálicos de D-fructosa 4-epimerasa

Se sabe que las epimerasas conocidas previamente (psicosa 3-epimerasa) e isomerasas (glucosa isomerasa, arabionosa isomerasa) requieren iones metálicos. La evaluación se realizó para determinar si los iones metálicos influyen en las D-fructosa 4-epimerasas obtenidas en el Ejemplo 2-1.

Se trataron siete proteínas purificadas en el Ejemplo 2-1 con iones metálicos a través de 1 mM de $NiSO_4$, $NiCl_2$, $CuCl_2$, $MnCl_2$, $CaCl_2$, $ZnSO_4$, $MgSO_4$, $MgCl_2$, $FeSO_4$, NaCl, LiCl, KCl o $CoCl_2$, midiendo de este modo la actividad

enzimática. Como grupo de control, siete enzimas no se trataron con iones metálicos. La comparación de la actividad enzimática entre las enzimas tratadas con iones metálicos y las enzimas no tratadas se muestra en la Figura 5a a la Figura 5g.

Como se muestra en la Figura 5a a la Figura 5g, se confirmó que las enzimas del Ejemplo 2-1 inhibían el aumento de la actividad debido a la adición de iones de níquel e iones de cobalto, lo que indica el requisito de ión metálico. Específicamente, se confirmó que $NiSO_4$ proporcionaba la máxima actividad.

Ejemplo 3. Preparación de tagatosa a partir de fructosa

La productividad de la tagatosa se midió en condiciones de reacción enzimática óptimas seleccionadas en el Ejemplo 2. Específicamente, se hizo reaccionar 1 mg/ml de D-fructosa 4-epimerasas purificadas en el Ejemplo 2-1 con 20 g/l (en una concentración de aproximadamente 110 mM) de fructosa a una temperatura de reacción, por ejemplo, a 80 °C para dos enzimas TAM y TP, a 70°C para cinco enzimas RM, TAS, TAX, TL y DT en sulfato de níquel 0,1 mM, y a pH 7 para TAX, pH 8 para TP, TL, RM y DT, y a pH 9 para TAS y TAM, utilizando una solución tampón Tris-HCl 50 mM preparada correspondiente a cada uno de los valores de pH.

El análisis de HPLC se realizó por el mismo método que en el Ejemplo 2-2 (Figura 2a a Figura 2g). La tasa de conversión de fructosa en tagatosa se determinó a partir de la cantidad de tagatosa producida a partir de la reacción. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2

	Concentración de fructosa (g/l)	Concentración de tagatosa (g/l)	Tasa de conversión (%)
RM	20	3,8	19,0
TAX	20	1,7	8,6
TAM	20	3,3	16,7
TAS	20	2,5	12,4
TP	20	3,6	18,1
TL	20	3,9	19,4
DT	20	2,5	12,6

La solución después de la reacción anterior (una solución mixta de tagatosa y fructosa) se sometió a decoloración (utilizando carbono activado), purificación de intercambio iónico, cromatografía y procesos de cristalización, recogiendo de este modo la tagatosa cristalina final.

<110> CJ CHEILJEDANG CORPORATION

<120> Composición para la preparación de tagatosa y método de fabricación para tagatosa a partir de fructosa

<130> P15-5068

<150> KR 10/20140143703
<151> 22/10/2014

<160> 7

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1
<211> 519
<212> PRT
<213> Rhodothermus marinus

<400> 1

Met Val Thr Val Leu Gln Thr Leu Leu Gln Arg Pro Arg Pro Leu Ala
1 5 10 15

Glu Ile Asp Arg Ala Ala Leu Ala Arg Phe Leu Thr Asp Leu Ile Arg
20 25 30

Gln Gln Val Tyr Pro Ala Ser Leu Glu Pro Thr Ser Glu Gly Val Phe
35 40 45

Phe Leu Ala Arg Asp Gly Arg Glu Lys Arg Leu Gly Ile Leu Ser Glu
50 55 60

Ala Gly Leu His Asp Phe Glu Gly Ala Arg His Gln Leu Ser Leu Asp
65 70 75 80

Gly Arg Thr Leu Ile Phe Gln Ser Cys Pro Leu Thr Ala Ala Asn Ala
85 90 95

Arg Ala Leu Arg Gln His Leu Ala Trp Thr Ala Pro Arg Pro Leu Gly
100 105 110

Leu Arg Ala Ser Val Gly Cys Gly Asp Arg Leu Gly Leu Ala Thr Pro
115 120 125

Gly His Val Arg Ala Val Arg Lys His Lys Leu Ala Pro Val Phe Ala
130 135 140

Gln Gln Ser Ile Arg Glu Met Thr Arg Thr Gly Arg Thr Pro Gln Gln
145 150 155 160

Val Leu Asp Glu Ala Met Trp Gly Val Phe Gln Glu Gly Trp Arg Gln
165 170 175

Gly Tyr Gly Ala Asp Ala Asp His Leu Lys Thr Glu Glu Asp Ala Asp
180 185 190

Arg Cys Ile Glu Ala Gly Phe Thr Phe Phe Thr Ile Asp Pro Ser Ala
195 200 205

Tyr Val Asp Asn Glu Val Asp Thr Ala Asp Ala Ala Thr Leu Glu Ala
210 215 220

Lys Val Ala Ala Leu Pro Trp Asp Ala Leu Glu Thr Thr Leu Ala Asp

225 230 235 240

Leu Arg Arg Ala Tyr Leu Gly Gln His Phe Gln Val Gly Pro Tyr Glu
245 250 255

Leu Ser Phe Glu Glu Arg Thr Leu Leu Gln Ala Leu Ala Lys Tyr Gly
260 265 270

Gly Ala Ile Ala His Thr Ala Arg Val Tyr Arg His Ile Ala Gly Arg
275 280 285

Met Gly Asn Arg Pro Phe Glu Leu Glu Met Ser Val Asp Glu Thr Glu
290 295 300

Val Pro Thr Ser Pro Ala Glu His Phe Phe Val Ala Arg Glu Leu Gln
305 310 315 320

Arg Leu Gly Val Arg Trp Ile Ser Leu Ala Pro Arg Phe Val Gly Arg
325 330 335

Leu Glu Lys Gly Val Asp Tyr Ile Gly Asp Leu Glu Glu Phe Glu Ala
340 345 350

His Leu Lys Leu His Val Ala Ile Ala Arg Thr Leu Gly Pro Tyr Lys
355 360 365

Leu Ser Leu His Ser Gly Ser Asp Lys Phe Ala Leu Tyr Pro Leu Phe
370 375 380

Ala Arg His Ala Gly Glu Leu Phe His Leu Lys Thr Ala Gly Thr Ser
385 390 395 400

Tyr Leu Glu Ala Leu Arg Ala Val Ala Glu Leu Asp Pro Pro Leu Phe
405 410 415

Arg Glu Ile Leu Asp Phe Ala Arg Asp Arg Tyr Glu Thr Asp Arg Ala
420 425 430

Thr Tyr His Val Ser Ala Leu Leu Glu Arg Val Pro Lys Ala Ser Asp
435 440 445

Val Pro Asp Asp Ala Leu Pro Ala Leu Leu Glu Gln Phe Asp Thr Arg
450 455 460

Gln Val Leu His Val Thr Phe Gly Ser Val Leu Thr Ala Thr Asp Ala
465 470 475 480

Asp Gly Arg Pro Arg Phe Arg Asp Arg Leu Leu Ala Val Leu Gln Glu
485 490 495

Asn Glu Glu Thr Tyr Tyr Arg Leu Leu Glu Ala His Phe Asp Arg His
500 505 510

Leu Ala Pro Phe Asp Ala Lys
515

<210> 2
<211> 481
<212> PRT
<213> Thermotoga petrophila

<400> 2

Met Val Leu Lys Val Phe Lys Asp His Phe Gly Arg Gly Tyr Glu Val
1 5 10 15

Tyr Glu Lys Ser Tyr Arg Glu Lys Asp Ser Leu Ser Phe Phe Leu Thr
20 25 30

Lys Gly Glu Glu Gly Lys Ile Leu Val Val Ala Gly Glu Lys Ala Pro
35 40 45

Glu Gly Leu Ser Phe Phe Lys Lys Gln Arg Val Glu Gly Val Ser Phe
50 55 60

Phe Phe Cys Glu Arg Asn His Glu Asn Leu Glu Val Leu Arg Lys Tyr
65 70 75 80

Phe Pro Asp Leu Lys Pro Val Arg Ala Gly Leu Arg Ala Ser Phe Gly
85 90 95

Thr Gly Asp Arg Leu Gly Ile Thr Thr Pro Ala His Val Arg Ala Leu
100 105 110

Lys Asp Ser Gly Leu Phe Pro Ile Phe Ala Gln Gln Ser Val Arg Glu
115 120 125

Asn Glu Arg Thr Gly Arg Thr Trp Arg Asp Val Leu Asp Asp Ala Thr
130 135 140

Trp Gly Val Phe Gln Glu Gly Tyr Ser Glu Gly Phe Gly Ala Asp Ala
145 150 155 160

Asp His Val Lys Arg Pro Glu Asp Leu Val Ser Ala Ala Arg Glu Gly
165 170 175

Phe Thr Met Phe Thr Ile Asp Pro Ser Asp His Val Arg Asn Leu Ser
180 185 190

Lys Leu Thr Glu Lys Glu Arg Asn Glu Lys Phe Glu Glu Ile Leu Arg
195 200 205

Lys Glu Arg Ile Asp Arg Ile Tyr Leu Gly Lys Lys Tyr Ser Val Leu
210 215 220

Gly Glu Lys Ile Glu Phe Asp Glu Lys Asn Leu Arg Asp Ala Ala Leu
225 230 235 240

Val Tyr Tyr Asp Ala Ile Ala His Val Asp Met Met Tyr Gln Ile Leu
245 250 255

Lys Asp Glu Thr Pro Asp Phe Asp Phe Glu Val Ser Val Asp Glu Thr
260 265 270

Glu Thr Pro Thr Ser Pro Leu Phe His Ile Phe Val Val Glu Glu Leu
275 280 285

Arg Arg Arg Gly Val Glu Phe Thr Asn Leu Ala Leu Arg Phe Ile Gly
290 295 300

Glu Trp Glu Lys Gly Ile Asp Tyr Lys Gly Asp Leu Ala Gln Phe Glu
305 310 315 320

Arg Glu Ile Lys Met His Ala Glu Ile Ala Arg Met Phe Glu Gly Tyr
325 330 335

Lys Ile Ser Leu His Ser Gly Ser Asp Lys Phe Ser Val Tyr Pro Ala
340 345 350

Phe Ala Ser Ala Thr Gly Gly Leu Phe His Val Lys Thr Ala Gly Thr
355 360 365

Ser Tyr Leu Glu Ala Val Lys Val Ile Ser Met Val Asn Pro Glu Leu
370 375 380

Phe Arg Glu Ile Tyr Arg Cys Ala Leu Asp His Phe Glu Glu Asp Arg
385 390 395 400

Lys Ser Tyr His Ile Ser Ala Asp Leu Ser Lys Val Pro Glu Val Glu
405 410 415

Lys Val Lys Asp Glu Asp Leu Pro Gly Leu Phe Glu Asp Ile Asn Val
420 425 430

Arg Gln Leu Ile His Val Thr Tyr Gly Ser Val Leu Lys Asp Ala Ser
435 440 445

Leu Lys Glu Arg Leu Phe Lys Thr Leu Glu Gln Asn Glu Glu Leu Phe
450 455 460

Tyr Glu Thr Val Ala Lys His Ile Lys Arg His Val Asp Leu Leu Lys
465 470 475 480

Gly

<210> 3
<211> 489
<212> PRT
<213> Thermotoga lettingae

<400> 3
Met Ala Glu Asn Ile Val Glu Lys Phe Glu Lys Leu Phe Lys Gly Lys
1 5 10 15

Tyr Lys Ile Tyr Tyr Ser Ser Ile Arg Lys Leu Glu Lys Ser Phe Phe
20 25 30

Phe Met Ile Arg Asp Gln Lys Gln Lys Tyr Leu Ile Ser Ile Ala Lys
35 40 45

Lys Arg Ile Cys Glu Lys Phe Glu Gly Lys Lys Ile Gly Arg Ile Asn
50 55 60

Asp Leu Asp Ile Leu Met Cys Pro Thr Asn Asp Tyr Asn Cys Lys Val
65 70 75 80

Ile Arg Thr Leu Phe Asn Ile Asn Pro Ser Val Cys Lys Lys Asn Thr
85 90 95

Ser Phe Gly Phe Gly Asp Arg Leu Gly Leu Ala Thr Pro Ala His Thr
100 105 110

Thr Leu Ile Asn Lys Tyr Asp Val Phe Pro Val Leu Ala Gln Gln Ser
115 120 125

Val Arg Glu Leu Ser Arg Thr His Arg Asn Phe Lys Asp Val Leu Asp
130 135 140

Ser Ala Ile Trp Gly Ile Phe Glu Ser Gly Tyr Glu Gly Glu Phe Gly
145 150 155 160

Ala Asp Ala Asp His Val Lys Asp Ile Asn Asp Leu Met Gln Ala Ala
165 170 175

Tyr Glu Gly Tyr Ser Met Tyr Thr Val Asp Pro Ser Asp His Val Lys
180 185 190

Asn Ile Asp Lys Ile Asn Gln Gly Glu Leu Val Glu Phe Tyr Lys Ser
195 200 205

His Pro Leu Arg Lys Glu Ile Glu Met Ile Tyr Ser Gly Lys Val Phe
210 215 220

Ser Phe Glu Lys Ser Lys Phe Thr Met Glu Asp Lys Glu Leu Phe Arg
225 230 235 240

Ile Phe Val Thr Tyr Val Asp Ala Ile Glu His Val Val Lys Cys Tyr
245 250 255

Glu Ala Ile Lys Asn Thr Lys Lys Asn Phe Asp Phe Glu Val Ser Ile
260 265 270

Asp Glu Thr Ser Ile Pro Thr Ser Pro Leu Ala His Ile Phe Ile Val
275 280 285

His Glu Leu Arg Arg Arg Gly Val Asp Phe Gln Thr Leu Ala Leu Arg
290 295 300

Phe Val Gly Gln Trp Gln Lys Ala Ile Asp Tyr Ile Gly Asp Leu Ser
305 310 315 320

Val Leu Glu Ser Glu Leu Ser Met His Cys Glu Ile Val Lys Ser Leu
325 330 335

Ser Gly Tyr Arg Leu Ser Leu His Ser Gly Ser Asp Lys Phe Ser Val
340 345 350

Tyr Arg Ile Phe Thr His Tyr Cys Asp Gly Lys Leu His Val Lys Thr
355 360 365

Ala Gly Thr Ser Tyr Leu Glu Ala Ile Arg Thr Val Ala Glu Ala Ser
370 375 380

Pro Ser Leu Tyr Arg Asn Ile His Lys Tyr Ala Leu Thr Cys Phe Glu
385 390 395 400

Lys Asp Asn Thr Ser Tyr His Val Thr Ala Asp Ile Asn Lys Ile Pro
405 410 415

Asp Val Asp Asn Val Glu Asp Ser Lys Val Val Asn Leu Leu Asp Ile
420 425 430

Pro Glu Val Arg Gln Leu Ile His Ile Thr Tyr Gly Ser Val Leu Thr
435 440 445

Glu Lys Ile Asn Gly Lys Tyr Leu Phe Arg Asp Glu Ile Tyr Arg Ile
450 455 460

Leu His Glu Asn Glu Phe Leu His Tyr Lys Arg Ile Arg Asp His Leu
465 470 475 480

Gly Lys His Leu Glu Leu Leu Lys Asn
485

<210> 4
<211> 482
<212> PRT
<213> Thermoanaerobacter mathranii

<400> 4
Met Val Glu Lys Ser Ile Leu Glu Lys Leu Thr Asp Phe Leu Leu Asn
1 5 10 15

His Ser Phe Val Leu Tyr Pro Asn Ser Leu Arg Lys Leu Lys Glu Asp
20 25 30

Thr Tyr Ile Phe Val Ala Lys Lys Asp Ala Asp Lys Lys Ile Gly Ile
35 40 45

Leu Thr Lys Glu Asn Phe Lys Leu Thr Ser Pro Tyr Phe Val Glu Asp
50 55 60

Lys Asn Val Lys Glu Ile Asp Phe Tyr Leu Asn Leu Tyr Pro Leu Ser
65 70 75 80

Phe Glu Asn Tyr Leu Ile Leu Lys Asn Phe Gly Ile Ser Pro Thr Pro
85 90 95

Cys Arg Gln Lys Ser Ser Phe Gly Thr Gly Asp Arg Leu Gly Leu Val
100 105 110

Thr Pro Ala His Ile Val Ala Leu Lys Glu Tyr Pro Val Phe Pro Val
115 120 125

Leu Ala Gln Gln Ser Pro Arg Glu Leu Glu Lys Thr His Arg Asp Phe
130 135 140

Lys Asp Ala Leu Leu Lys Val Ile Leu Gly Val Leu Glu Ala Gly Tyr
145 150 155 160

Thr Gly Glu Phe Gly Ala Asp Ala Asp His Ile Lys Asp Glu Lys Tyr
165 170 175

Leu Leu Arg Ala Ile Glu Ala Gly Tyr Thr Met Tyr Thr Leu Asp Val
180 185 190

Ser Glu Leu Leu Thr Lys Ile Leu Asp Ile Ser Ser Asn Gln Val Met
195 200 205

Gln Ile Ser Pro Gln Ser Lys Glu Ile Ile Glu Ala Phe Lys Gly Lys
210 215 220

Lys Ile Ser Ile Ser Glu Glu Glu Tyr Thr Ile Arg Glu Asp Glu Leu
225 230 235 240

Tyr Lys Ser Ala Leu Ile Tyr Glu Lys Ala Met Asn Phe Val Glu Lys
245 250 255

Val Tyr Ser Ile Leu Lys Glu Lys Val Lys Asp Phe Asp Leu Glu Ile
260 265 270

Ser Ile Asp Glu Gly Glu Lys Asp Thr Thr Val Glu Asp His Ile Phe

```
        275                 280                 285

Val Ala Glu Tyr Leu His Lys Lys Gly Ile Asp Phe Trp Ser Leu Ala
    290                 295                 300

Pro Lys Phe Pro Gly Glu Phe Gln Lys Ala Ile Asp Tyr Lys Gly Asp
305                 310                 315                 320

Ile Asn Lys Phe Ala Val Glu Leu Lys Lys His Tyr Ala Ile Ser Gln
                325                 330                 335

Gln Leu Gly Gly Tyr Lys Leu Ser Leu His Ser Gly Ser Asp Lys Phe
            340                 345                 350

Ser Ile Tyr Glu Ile Phe Ser Glu Val Thr Gln His Ser Phe His Ile
        355                 360                 365

Lys Thr Ser Gly Thr Ser Trp Leu Gln Ala Val Asn Leu Ile Phe Glu
    370                 375                 380

Lys Asn Lys Lys Leu Phe Tyr Glu Leu Tyr Lys Ile Ala Leu Asn Asn
385                 390                 395                 400

Leu Glu Glu Ser Lys Lys Ala Tyr Lys Val Leu Ile Asp Lys Asp Asp
                405                 410                 415

Phe Ala Glu Glu Pro Asn Leu Glu Asn Val Gln Ile Leu Ser Gln Pro
            420                 425                 430

Glu Ile Lys Gln Leu Phe His Ile Ser Tyr Gly Val Leu Leu Asp Glu
        435                 440                 445

Lys Lys Glu Glu Ile Tyr Asp Val Leu Asp Lys Tyr Glu Glu Glu His
    450                 455                 460

Tyr Gln Phe Val Ser Ala Asn Ile Lys Asn His Leu Gly Lys Ile Phe
465                 470                 475                 480

Asn Asn
```

<210> 5
<211> 485
<212> PRT
<213> Dictyoglomus turgidum

<400> 5

```
Met Leu Lys Leu Leu Asn Glu Ser Leu Lys Pro Leu Ser Ile Phe Ile
  1               5                  10                  15

Tyr Ser Glu Ser Leu Arg Lys Ile Asn Asp Asp Leu Tyr Ile Phe Val
            20                  25                  30

Ala Lys Ile Lys Asp Leu Lys Lys Ile Gly Ile Val Lys Gln Asn Gln
        35                  40                  45

Ile Leu Tyr Phe Ser Ser Pro Tyr Phe Ser Glu Asp Lys Lys Ile Glu
    50                  55                  60

Gly Thr Asn Phe Leu Val Asn Leu Tyr Pro Leu Asn Phe Glu Asn Tyr
65                  70                  75                  80
```

Gln Lys Leu Lys Glu Ile Ile Pro Ile Ser Pro Lys Val Cys Asp Lys
85 90 95

Lys Ile Ser Phe Gly Thr Gly Asp Arg Leu Gly Leu Ile Thr Ser Ala
100 105 110

Gln Leu Ser Ala Leu Lys Glu Tyr Asp Leu Phe Pro Ile Leu Ala Gln
115 120 125

Gln Ser Pro Arg Glu Leu Ile Lys Thr Lys Arg Asp Phe Lys Asp Val
130 135 140

Leu Leu Lys Ser Ala Met Gly Val Leu Glu Thr Gly Tyr Thr Gly Lys
145 150 155 160

Tyr Gly Ala Asp Ala Asp His Ile Lys Asp Glu Lys Tyr Leu Met Glu
165 170 175

Ala Ile Asp Ala Gly Tyr Thr Met Tyr Thr Leu Asp Ile Ser Asp Phe
180 185 190

Ile Glu Lys Ile Lys Asp Leu Ser Glu Lys Ala Leu Lys Glu Lys Tyr
195 200 205

Glu Lys Val Ser Ser Phe Ser Lys Lys Ile Ile Asp Lys Tyr Ala Gly
210 215 220

Lys Arg Val Lys Ile Ser Asp Glu Glu Tyr Phe Glu Leu Ser Tyr Asn
225 230 235 240

Glu Leu Cys Lys Ser Ala Ile Val Tyr Glu Lys Ala Leu Ser Phe Val
245 250 255

Glu Met Val Tyr Glu Ile Leu Lys Ser Lys Leu Ser Glu Phe Asp Ile
260 265 270

Glu Val Ser Ile Asp Glu Gly Glu Arg Asp Thr Thr Pro Glu Asp His
275 280 285

Phe Phe Val Ala Gln Phe Leu His Asp Lys Gly Ile Asp Phe Lys Ser
290 295 300

Leu Ala Pro Lys Phe Pro Gly Glu Phe Gln Lys Gly Ile Asp Tyr Ile
305 310 315 320

Gly Asp Ile Lys Glu Phe Glu Arg Ala Leu Lys Lys His Tyr Ala Leu
325 330 335

Thr Lys Ala Leu Glu Gly Tyr Arg Leu Ser Leu His Ser Gly Ser Asp
340 345 350

Lys Phe Ser Ile Tyr Lys Ile Phe Tyr Lys Ile Thr Glu Gly Asn Phe
355 360 365

His Ile Lys Thr Ser Gly Thr Ser Trp Leu Glu Ala Val Lys Val Ile
370 375 380

Ala Lys Phe Phe Pro Asp Leu Phe Val Glu Leu Tyr Gln Ile Ala Leu
385 390 395 400

Glu Asn Leu Glu Glu Ser Lys Lys Ala Tyr Lys Val Asn Ile Thr Lys
405 410 415

Glu Glu Phe Pro Lys Glu Ile Lys Glu Asp Tyr Met Glu Phe Leu His
420 425 430

Lys Asp Asn Val Arg Gln Leu Phe His Ile Ser Tyr Gly Val Leu Leu
435 440 445

Asp Glu Lys Arg Lys Glu Ile Tyr Asp Leu Leu Asn Gln Lys Glu Lys
450 455 460

Glu His Tyr Gln Tyr Val Ser Glu Asn Ile Lys Lys His Leu Lys Asn
465 470 475 480

Leu Phe Glu Glu Glu
485

<210> 6
<211> 482
<212> PRT
<213> Thermoanaerobacterium xylanolyticum

<400> 6
Met Val Gly Asn Val Ser Ser Val Leu Lys Glu Ser Gly Phe Gln Ile
1 5 10 15

Tyr Pro Asp Ser Leu Arg Lys Leu Gly Glu Asn Thr Tyr Ile Phe Val
20 25 30

Val Lys Lys Gln Lys Glu Lys Met Ile Gly Ile Leu Ser Asn Asp Glu
35 40 45

Leu Lys Leu Lys Glu Pro Tyr Phe Ser Glu Asn Lys Lys Ile Ser Asp
50 55 60

Asn Leu Gln Phe Asn Val Tyr Ser Phe Thr Phe Asp Asn Tyr Val Thr
65 70 75 80

Leu Asn Gly Arg Phe His Ile Gly Pro Thr Ile Cys Arg Glu Asn Ala
85 90 95

Ser Phe Gly Thr Gly Asp Arg Leu Gly Leu Ala Thr Ala Ala Gln Leu
100 105 110

Asp Ala Leu Lys Lys Phe Asn Val Phe Pro Ile Leu Ala Gln Gln Ser
115 120 125

Pro Arg Glu Leu Val Lys Thr Asn Arg Asp Phe Lys Asp Val Leu Leu
130 135 140

Lys Val Val Leu Gly Val Leu Glu Thr Gly Tyr Ile Gly His Tyr Gly
145 150 155 160

Ala Asp Ala Asp His Ile Lys Asp Glu Lys Tyr Leu Leu Glu Gly Ile
165 170 175

Asp Ala Gly Tyr Thr Met Tyr Thr Leu Asp Leu Ser Glu Gln Leu Phe
180 185 190

Asp Val Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Ile Lys Glu Lys Ala Lys Thr
195 200 205

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

Leu Asn Val Gly Phe Gly Gly His Leu Val Ser Glu Asp Glu Leu Leu
225 230 235 240

Lys Ser Ala Val Ala Tyr Glu Ala Ala Met Lys Phe Val Glu Lys Val
245 250 255

Asn Asp Ile Leu Lys Glu Lys Leu Asn Asp Phe Asp Leu Glu Ile Ser
260 265 270

Ile Asp Glu Gly Gly Lys Val Thr Thr Leu Glu Asp His Leu Phe Val
275 280 285

Ala Glu Tyr Leu His Arg Asn Gly Ile Asp Phe Phe Ser Ile Ala Pro
290 295 300

Lys Phe Pro Gly Glu Phe Glu Lys Ala Ile Asp Tyr Val Gly Asp Val
305 310 315 320

Asn Glu Phe Glu Arg Glu Leu Lys Lys His Tyr Asp Leu Thr Lys Leu
325 330 335

Ile Gly Gly Tyr Lys Leu Ser Leu His Ser Gly Ser Asp Lys Phe Ser
340 345 350

Ile Tyr Lys Ile Phe Ser Gln Thr Thr Glu Lys Asn Phe His Ile Lys
355 360 365

Thr Ser Gly Thr Ser Trp Leu Gln Ala Val Asn Leu Ile Tyr Lys Ser
370 375 380

Asp Lys Glu Phe Tyr Arg Glu Leu Tyr Lys Ile Ala Leu Ser Asn Leu
385 390 395 400

Glu Glu Ser Lys Lys Ser Tyr Lys Val Leu Ile Lys Lys Asp Asp Phe
405 410 415

Lys Asp Glu Pro Glu Leu Asp Asn Ser Glu Phe Ile Ile Arg Pro Glu
420 425 430

Ile Lys Gln Leu Phe His Ile Ser Phe Gly Val Leu Leu Asp Leu Lys
435 440 445

Gly Lys Glu Ile Lys Asp Met Leu Tyr Asp Tyr Glu Glu Glu His Tyr
450 455 460

Lys Met Val Ser Asp Asn Ile Glu Asn His Leu Lys Glu Ile Phe Tyr
465 470 475 480

Glu Lys

<210> 7
<211> 483
<212> PRT
<213> Thermoanaerobacter siderophilus

<400> 7
Met Lys Glu Glu Leu Ser Asp Tyr Leu Leu Lys Asn Ser Phe Leu Leu
1 5 10 15

Tyr Pro Asp Ser Phe Arg Arg Leu Arg Glu Asp Val Tyr Ile Phe Val

20 25 30

Ala Lys Lys Asp Ser Asp Lys Lys Ile Gly Leu Leu Thr Asn Gly Asn
35 40 45

Phe Lys Leu Ser Ser Pro His Phe Ala Glu Asp Lys Tyr Val Glu Glu
50 55 60

Leu Gly Phe Tyr Ile Asn Leu Tyr Pro Leu Thr Tyr Glu Asn Tyr Leu
65 70 75 80

Ile Leu Lys Asp Asn Phe Gly Ile Ser Pro Val Thr Cys Lys Glu Lys
85 90 95

Ala Ser Phe Gly Thr Gly Asp Arg Leu Gly Leu Ala Thr Pro Ala His
100 105 110

Ile Lys Ala Leu Lys Asn Tyr Asn Val Phe Pro Val Leu Ala Gln Gln
115 120 125

Ser Pro Arg Glu Leu Val Lys Thr His Arg Asp Phe Lys Asp Val Phe
130 135 140

Leu Lys Val Ile Leu Gly Val Leu Glu Ala Gly Tyr Ala Gly Gly Tyr
145 150 155 160

Gly Ala Asp Ala Asp His Ile Lys Asp Glu Lys Tyr Leu Ile Glu Ala
165 170 175

Ile Asp Ala Gly Tyr Thr Met Tyr Thr Leu Asp Leu Ser Asp Leu Leu
180 185 190

Val Lys Ile Ser Asp Met Pro Lys Ser Gln Leu Lys Glu Lys Ala Gln
195 200 205

Ser Leu Ser Ser Gln Ser Arg Glu Ile Ile Asp Arg Phe Lys Gly Lys
210 215 220

Lys Phe Ser Ile Ser Thr Asp Glu Asp Phe Ala Val Ser Glu Asp Glu
225 230 235 240

Leu Tyr Lys Ser Ala Leu Thr Tyr Glu Lys Ala Met Lys Phe Val Glu
245 250 255

Lys Val Tyr Gly Ile Leu Lys Asp Arg Leu Gln His Phe Asp Leu Glu
260 265 270

Ile Ser Ile Asp Glu Gly Glu Lys Asp Thr Thr Val Glu Asp His Ile
275 280 285

Phe Val Ala Glu Tyr Leu His Arg Lys Gly Ile Asp Phe Trp Ser Leu
290 295 300

Ala Pro Lys Phe Pro Gly Glu Phe Gln Lys Ala Ile Asp Tyr Lys Gly
305 310 315 320

Asp Ile Lys Lys Phe Thr Ser Gly Leu Lys Lys His Tyr Phe Leu Ser
325 330 335

Lys Lys Leu Gly Gly Tyr Lys Leu Ser Leu His Ser Gly Ser Asp Lys
340 345 350

Phe Ser Ile Tyr Lys Ile Phe Asn Glu Ile Thr Glu Gly Asn Phe His

```
        355                 360                 365

Ile Lys Thr Ser Gly Thr Ser Trp Leu Gln Ala Ile Asn Ile Ile Phe
    370                 375                 380

Glu Arg Asp Lys Asp Leu Phe Asn Asp Leu Tyr Lys Ile Ala Leu Asp
385                 390                 395                 400

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

Asp Phe Pro Gln Thr Ile Gln Thr Glu Asp Ser Gln Ile Leu Leu Lys
            420                 425                 430

Pro Glu Ile Lys Gln Leu Phe His Ile Ser Tyr Gly Val Leu Leu Asp
        435                 440                 445

Glu Arg Arg Lys Glu Ile Tyr Glu Val Leu Asn Lys Tyr Glu Glu Glu
    450                 455                 460

His Tyr Glu Phe Val Ser Lys Asn Ile Glu Asn His Leu Lys Glu Ile
465                 470                 475                 480

Phe Asn Ile
```

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar tagatosa a partir de fructosa, que comprende: hacer reaccionar una composición que comprende una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NOs: 1 a 7 o un microorganismo que expresa la proteína con fructosa.

2. El método para preparar tagatosa a partir de fructosa de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la reacción se realiza en cualquiera de las siguientes condiciones:

a) una temperatura de reacción de 50 °C a 80 °C,
b) un pH de reacción de 6,0 a 9,0, y
c) una concentración de fructosa del 5% (p/v) al 60% (p/v).

3. El método para preparar tagatosa a partir de fructosa de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende, además: añadir iones de magnesio, iones de cinc, iones de níquel, iones de cobalto, iones de hierro, iones de manganeso, o una mezcla de los mismos.

4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteína es una proteína enzimática que convierte la fructosa en tagatosa a través de la epimerización en la posición carbono-4 de la fructosa.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el microorganismo se transforma con un vector recombinante que comprende un gen que codifica la proteína que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en cualquiera de las SEQ ID NOs: 1 a 7.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteína que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:1 se deriva de *Rhodothermus marinus.*

7. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteína que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:2 se deriva de *Thermotoga petrophila.*

8. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteína que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:3 se deriva de *Thermotoga lettingae.*

9. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteína que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:4 se deriva de *Thermoanaerobacter mathranii.*

10. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteína que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:5 se deriva de *Dictyoglomu sturgidum.*

11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteína que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:6 se deriva de *Thermoanaerobacterium xylanolyticum.*

12. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteína que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO:7 se deriva de *Thermoanaerobacter siderophilus.*

Fig. 1a

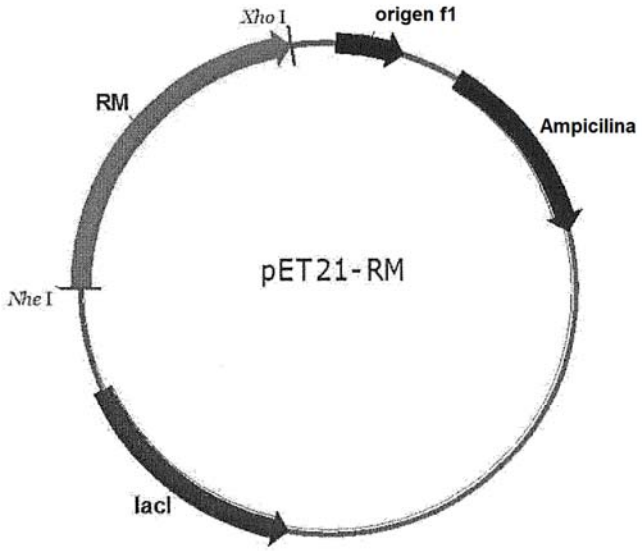
Xho I
origen f1
RM
Ampicilina
pET21-RM
Nhe I
lacI

Fig. 1b

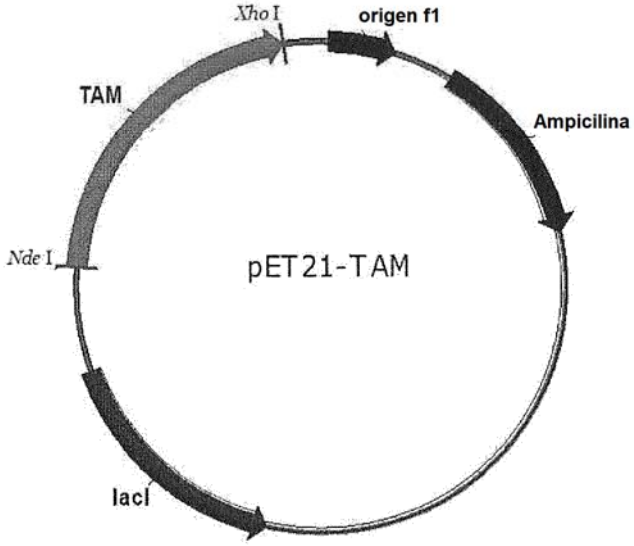
Xho I
origen f1
TAM
Ampicilina
Nde I
pET21-TAM
lacI

Fig. 1c

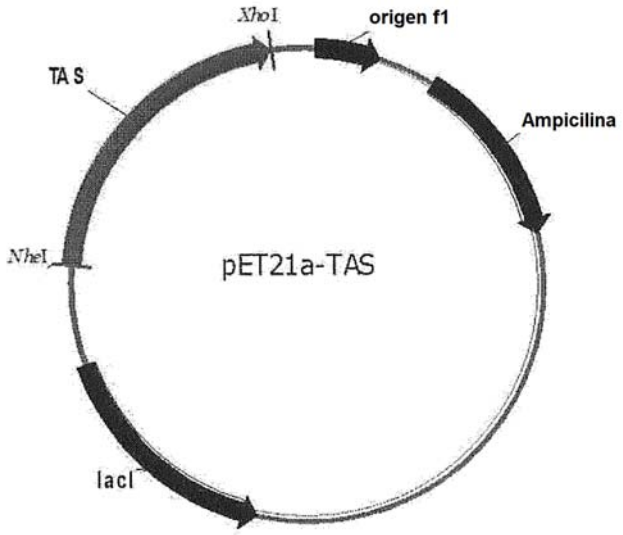
XhoI
origen f1
TAS
Ampicilina
NheI
pET21a-TAS
lacI

Fig. 1d

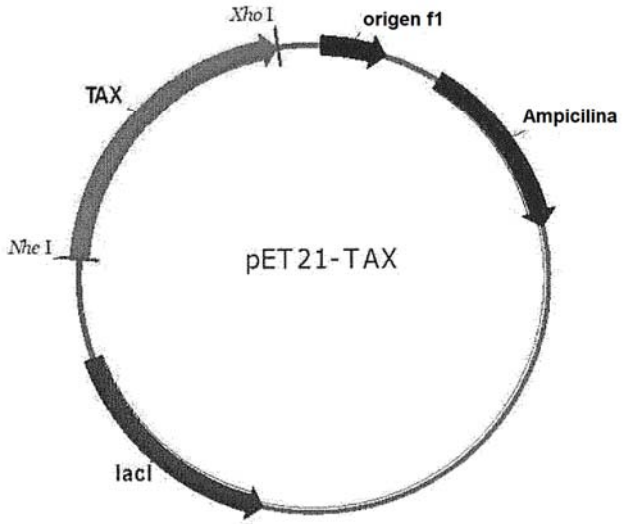
Xho I
origen f1
TAX
Ampicilina
Nhe I
pET21-TAX
lacI

Fig. 1e

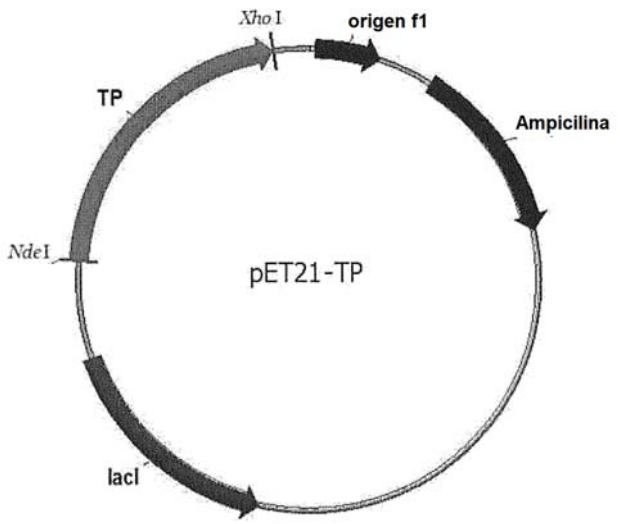
Xho I
origen f1
TP
Ampicilina
Nde I
pET21-TP
lacI

Fig. 1f

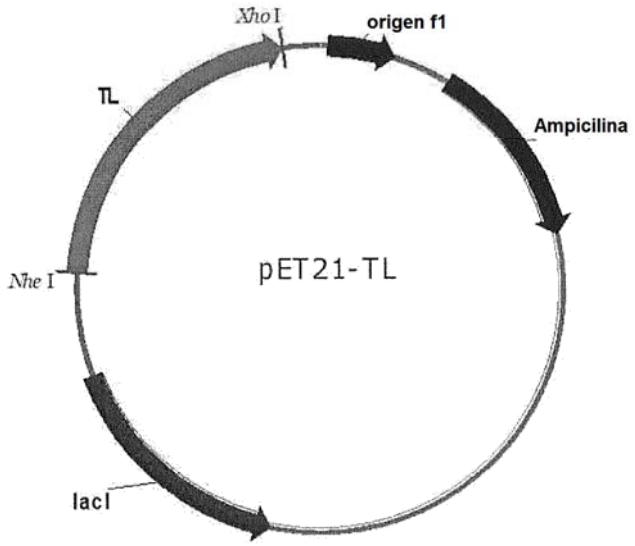
Xho I
origen f1
TL
Ampicilina
Nhe I
pET21-TL
lacI

Fig. 1g

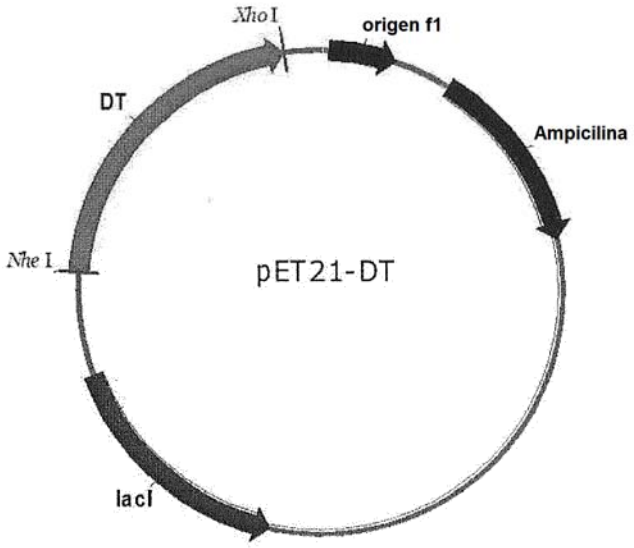
Xho I
origen f1
DT
Ampicilina
Nhe I
pET21-DT
lacI

Fig. 2a

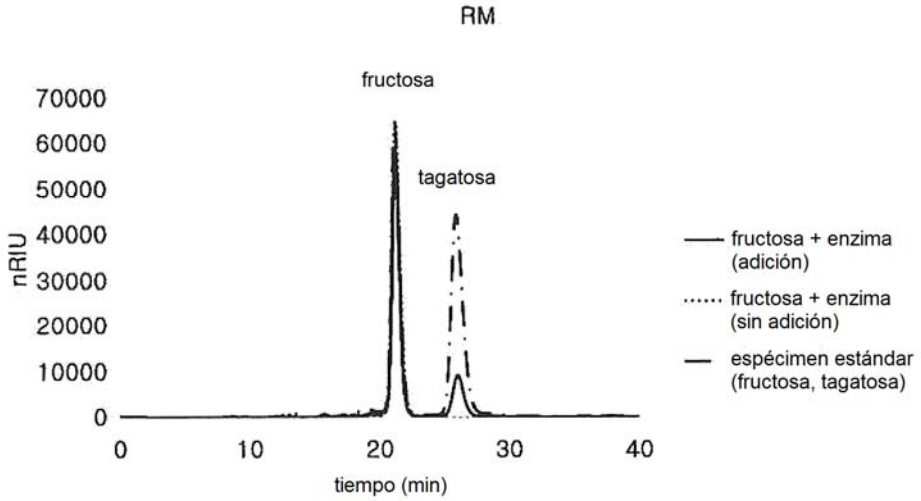
RM
fructosa
tagatosa
70000
60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
nRIU
0
10
20
30
40
tiempo (min)
fructosa + enzima (adición)
fructosa + enzima (sin adición)
espécimen estándar (fructosa, tagatosa)

Fig. 2b

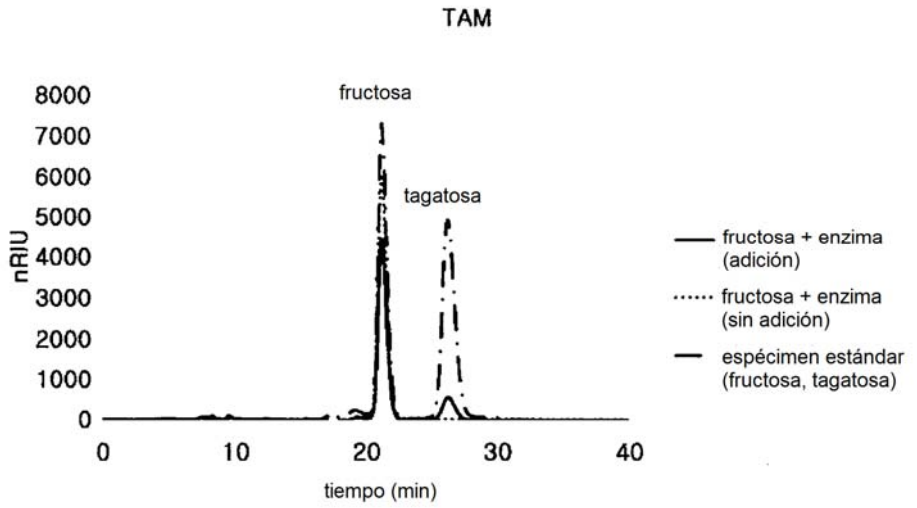
TAM
fructosa
tagatosa
nRIU
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
40
tiempo (min)
fructosa + enzima (adición)
fructosa + enzima (sin adición)
espécimen estándar (fructosa, tagatosa)

Fig. 2c

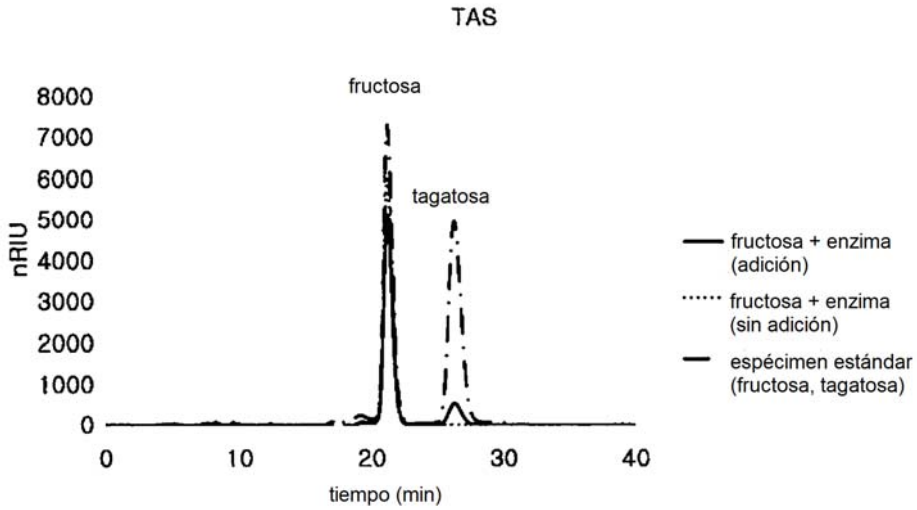
TAS
fructosa
tagatosa
nRIU
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
40
tiempo (min)
fructosa + enzima (adición)
fructosa + enzima (sin adición)
espécimen estándar (fructosa, tagatosa)

Fig. 2d

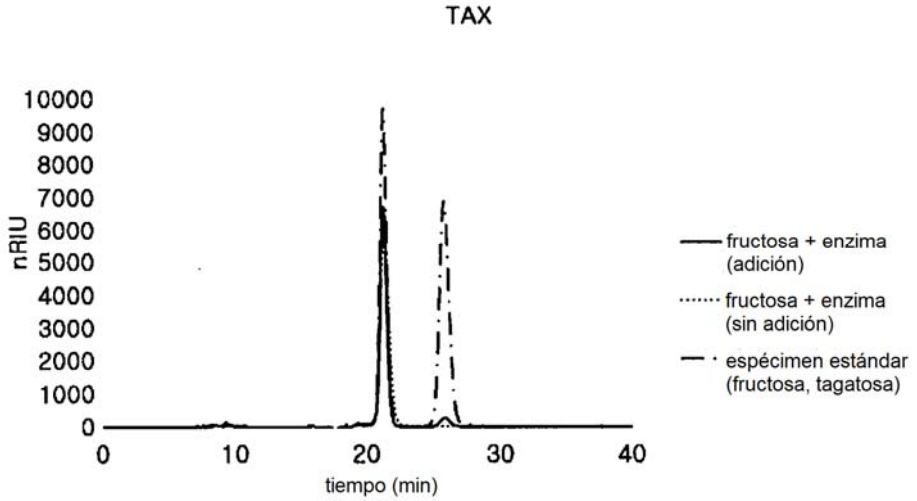
TAX
10000
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
nRIU
0
10
20
30
40
tiempo (min)
fructosa + enzima (adición)
fructosa + enzima (sin adición)
espécimen estándar (fructosa, tagatosa)

Fig. 2e

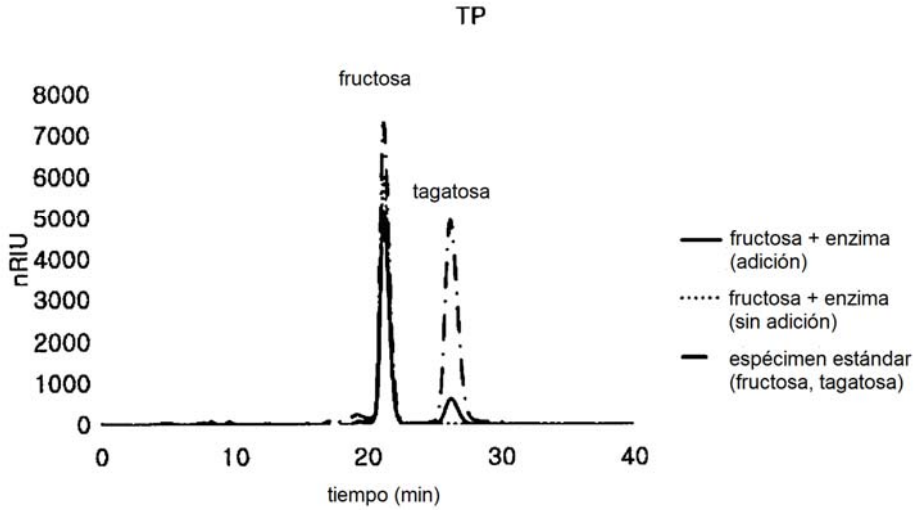
TP
fructosa
tagatosa
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
nRIU
0
10
20
30
40
tiempo (min)
fructosa + enzima (adición)
fructosa + enzima (sin adición)
espécimen estándar (fructosa, tagatosa)

Fig. 2f

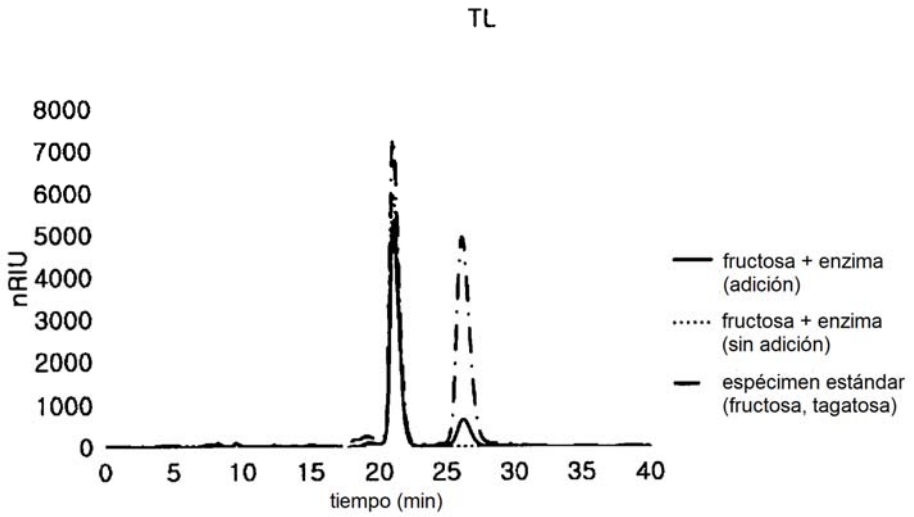
TL
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
nRIU
0
5
10
15
20
25
30
35
40
tiempo (min)
fructosa + enzima (adición)
fructosa + enzima (sin adición)
espécimen estándar (fructosa, tagatosa)

Fig. 2g

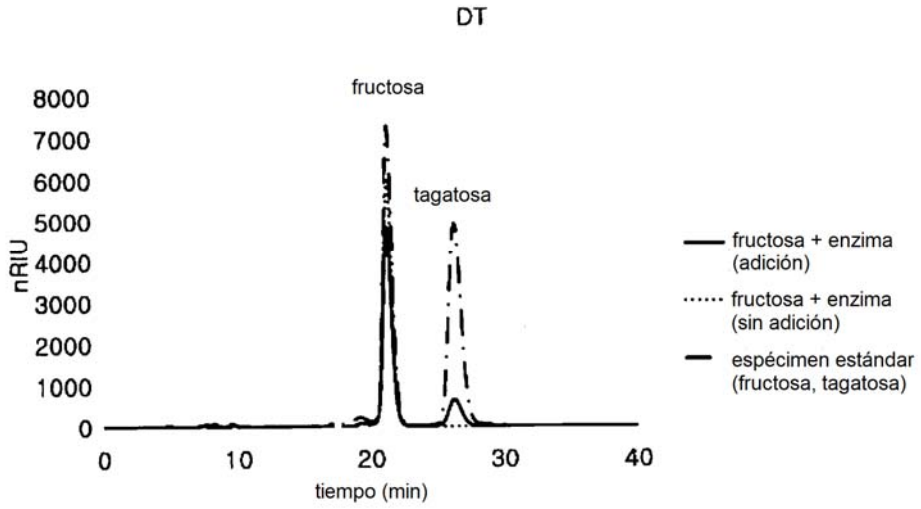
DT
fructosa
tagatosa
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
nRIU
0
10
20
30
40
tiempo (min)
fructosa + enzima (adición)
fructosa + enzima (sin adición)
espécimen estándar (fructosa, tagatosa)

Fig. 3a

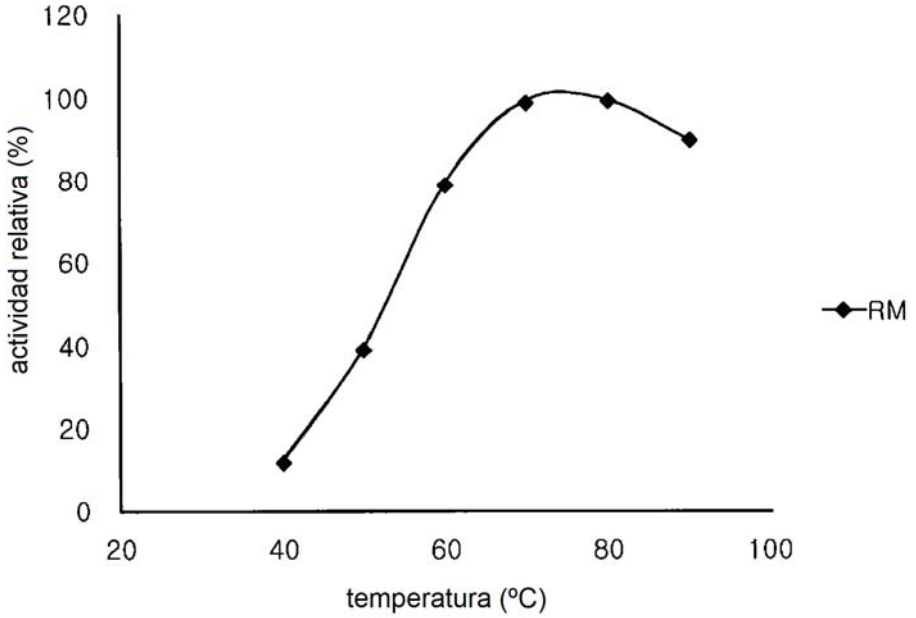
120
100
80
60
40
20
0
actividad relativa (%)
20
40
60
80
100
temperatura (ºC)
RM

Fig. 3b

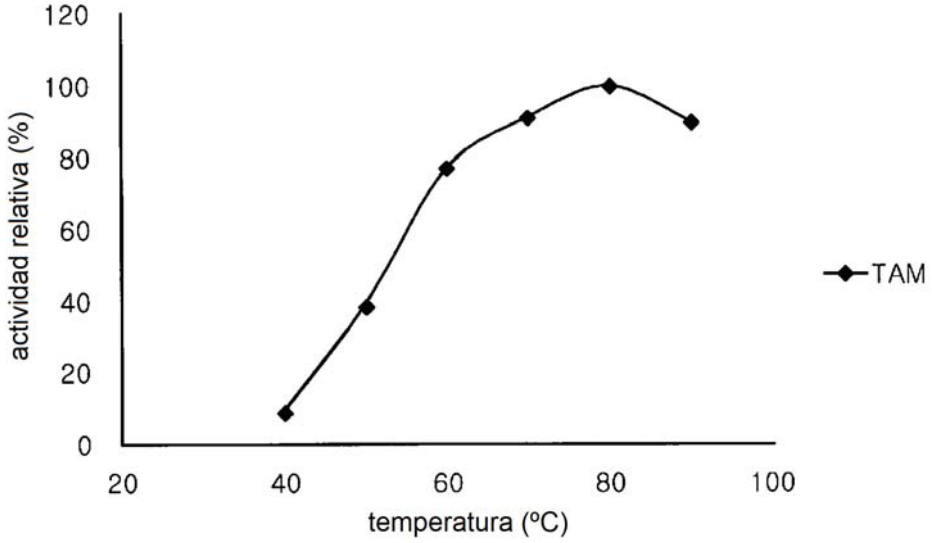
120
100
80
60
40
20
0
actividad relativa (%)
20
40
60
80
100
temperatura (ºC)
TAM

Fig. 3c

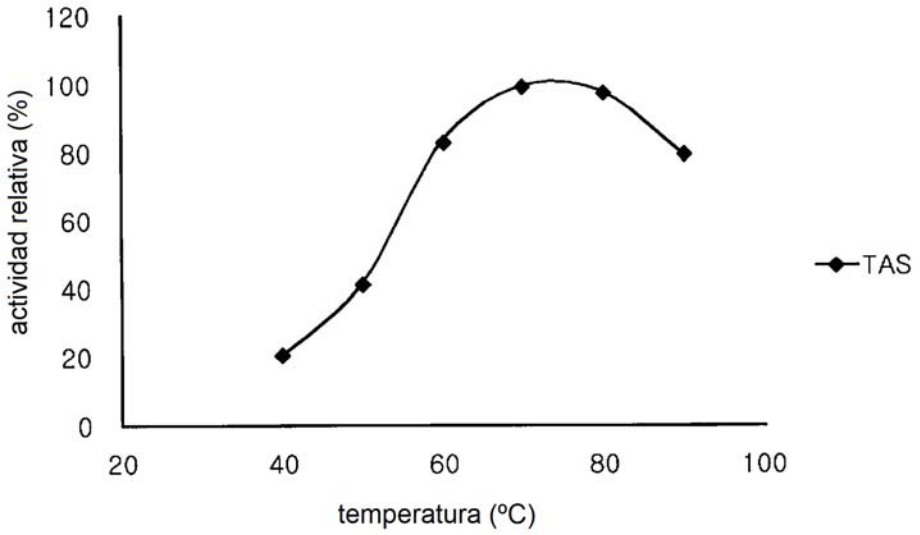
120
100
80
60
40
20
0
actividad relativa (%)
20
40
60
80
100
temperatura (ºC)
TAS

Fig. 3d

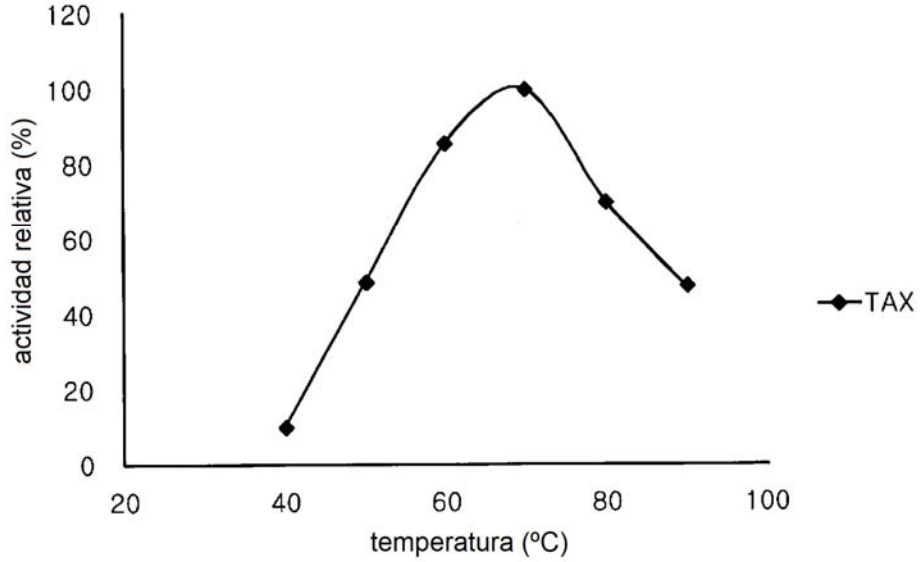
120
100
80
60
40
20
0
actividad relativa (%)
20
40
60
80
100
temperatura (ºC)
TAX

Fig. 3e

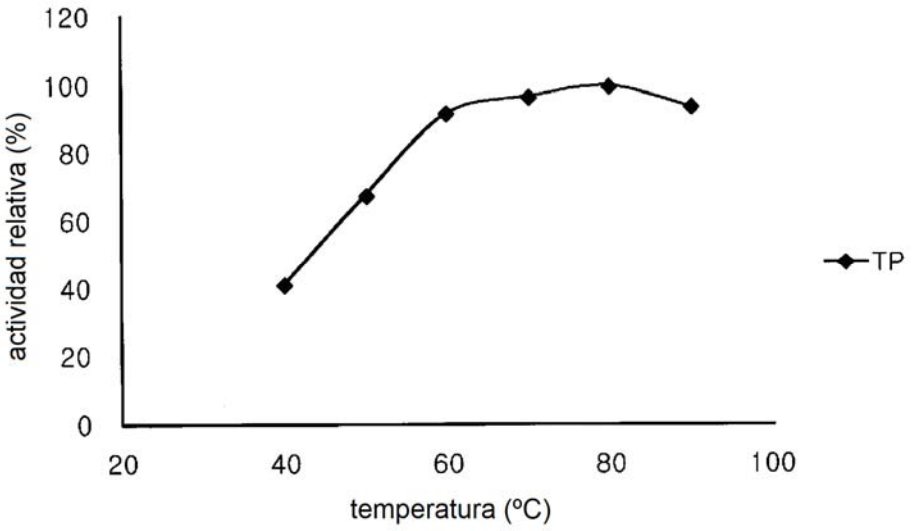
120
100
80
60
40
20
0
actividad relativa (%)
20
40
60
80
100
temperatura (ºC)
TP

Fig. 3f

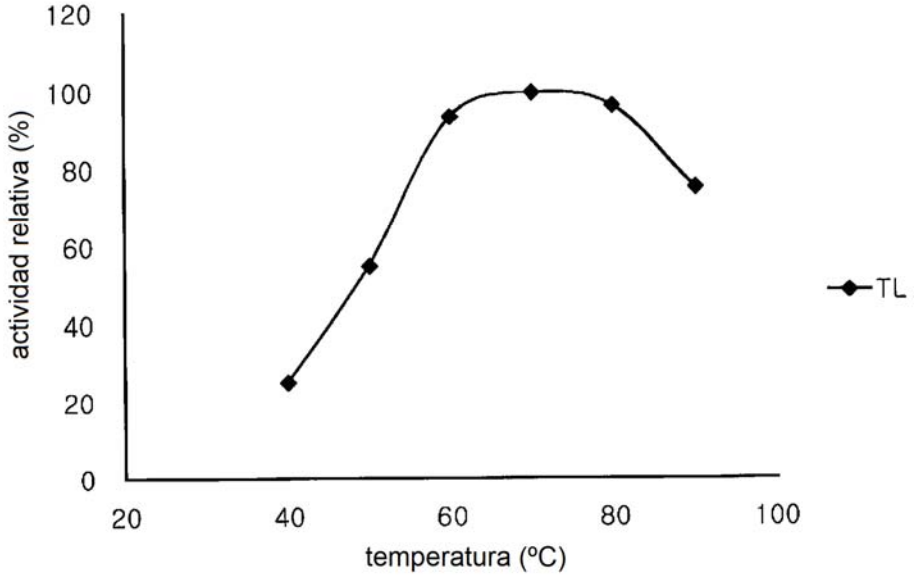
120
100
80
60
40
20
0
actividad relativa (%)
20
40
60
80
100
temperatura (ºC)
TL

Fig. 3g

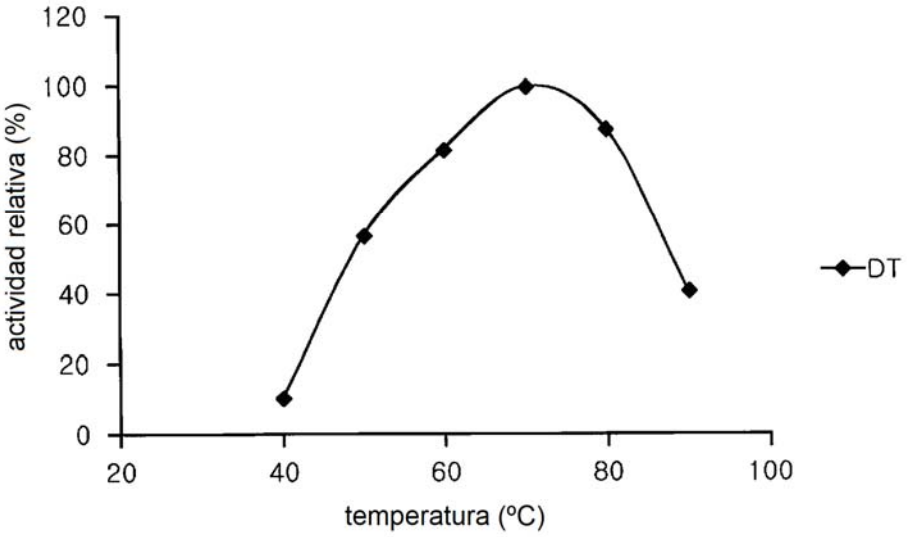
120
100
80
60
40
20
0
actividad relativa (%)
20
40
60
80
100
temperatura (ºC)
DT

Fig. 4a

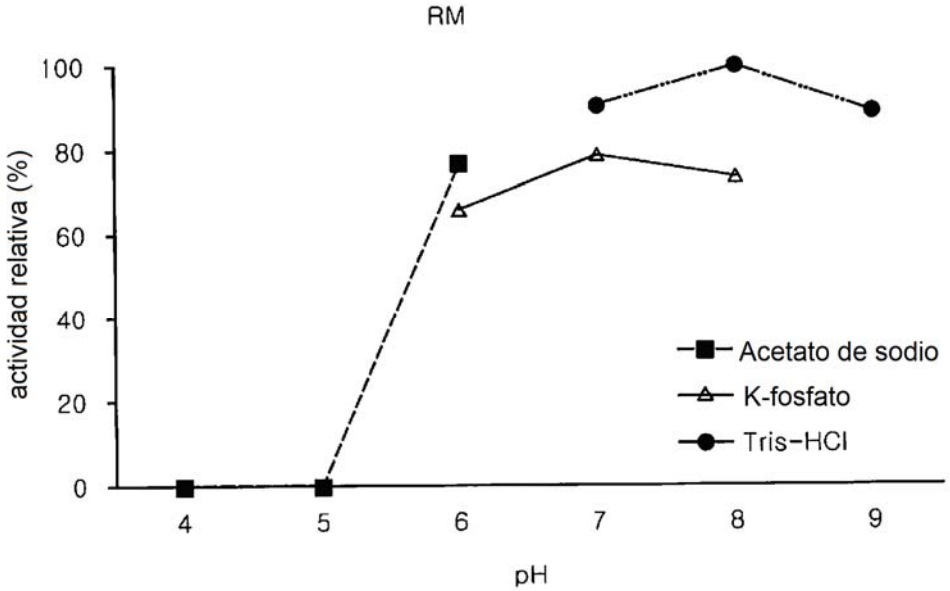
RM
100
80
60
40
20
0
actividad relativa (%)
4
5
6
7
8
9
pH
Acetato de sodio
K-fosfato
Tris-HCl

Fig. 4b

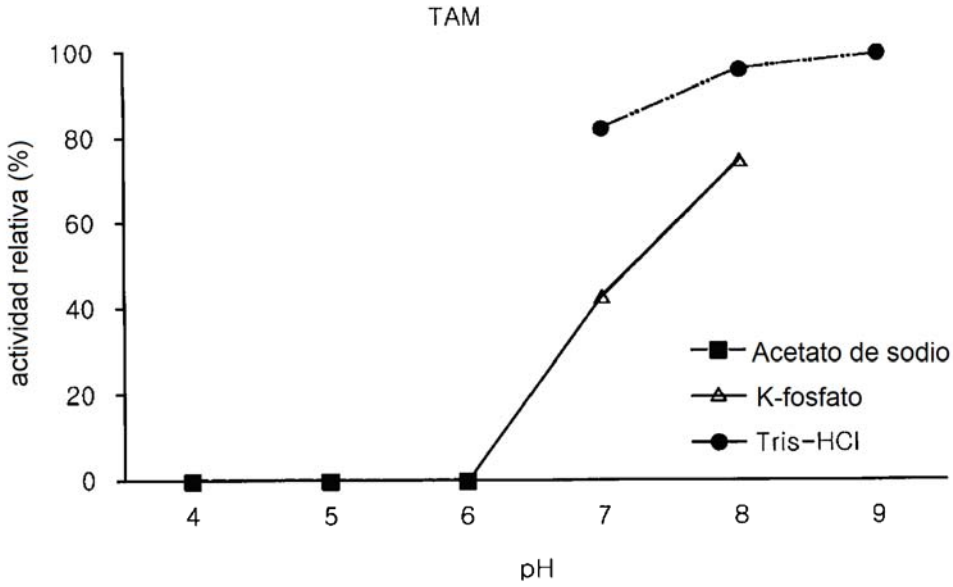
TAM
100
80
60
40
20
0
actividad relativa (%)
4
5
6
7
8
9
pH
Acetato de sodio
K-fosfato
Tris-HCl

Fig. 4c

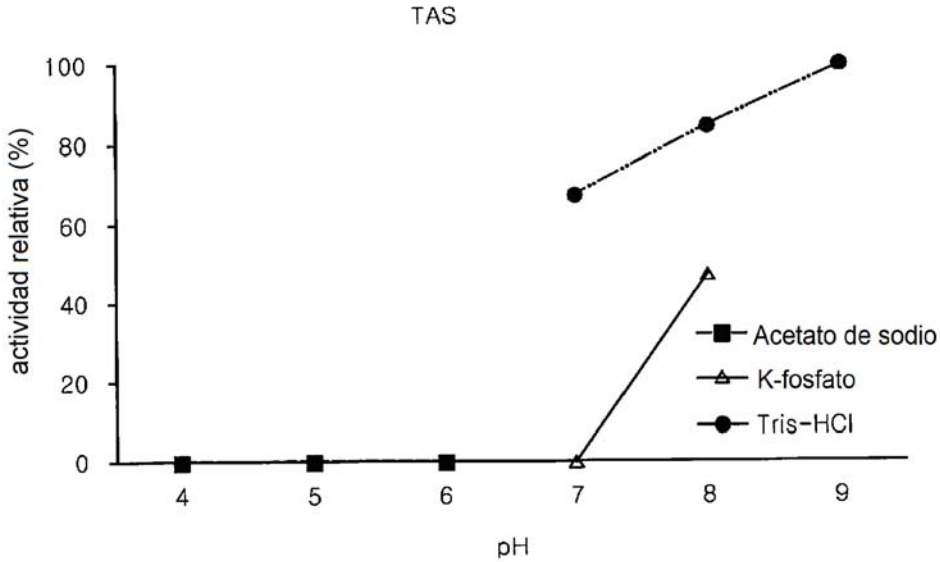
TAS
100
80
60
40
20
0
actividad relativa (%)
4
5
6
7
8
9
pH
Acetato de sodio
K-fosfato
Tris-HCl

Fig. 4d

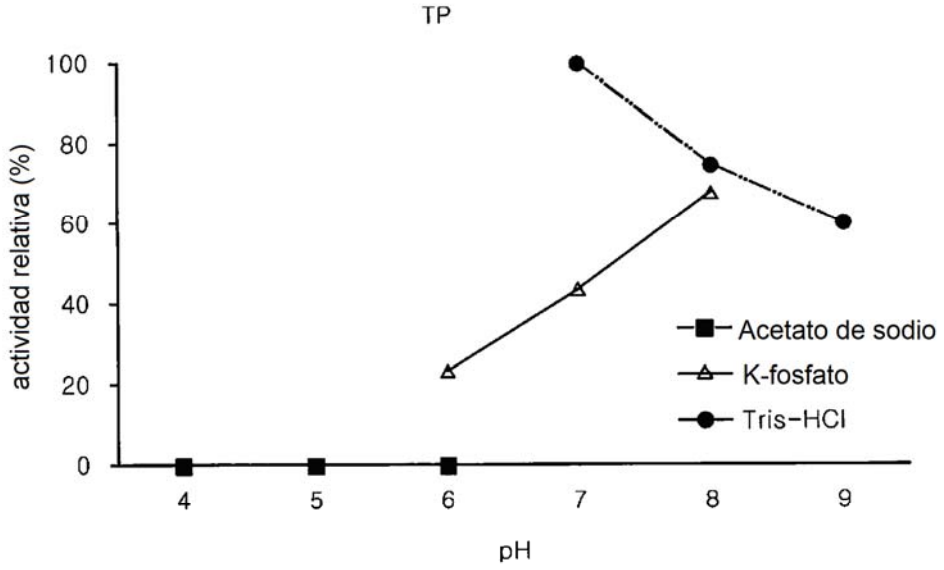
TP
100
80
60
40
20
0
actividad relativa (%)
4
5
6
7
8
9
pH
Acetato de sodio
K-fosfato
Tris-HCl

Fig. 4e

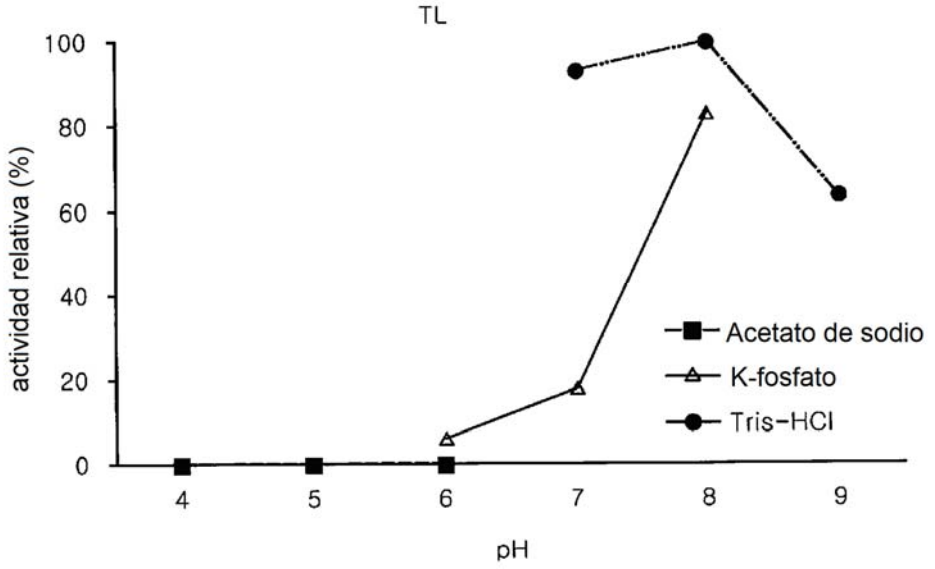
TL
100
80
60
40
20
0
actividad relativa (%)
4
5
6
7
8
9
pH
Acetato de sodio
K-fosfato
Tris-HCl

Fig. 4f

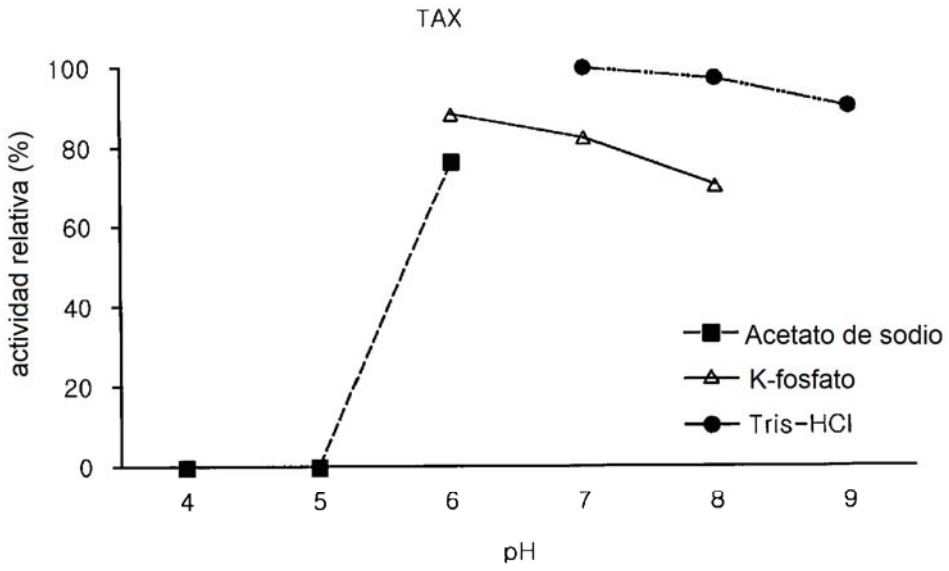
TAX
100
80
60
40
20
0
actividad relativa (%)
4
5
6
7
8
9
pH
Acetato de sodio
K-fosfato
Tris-HCl

Fig. 4g

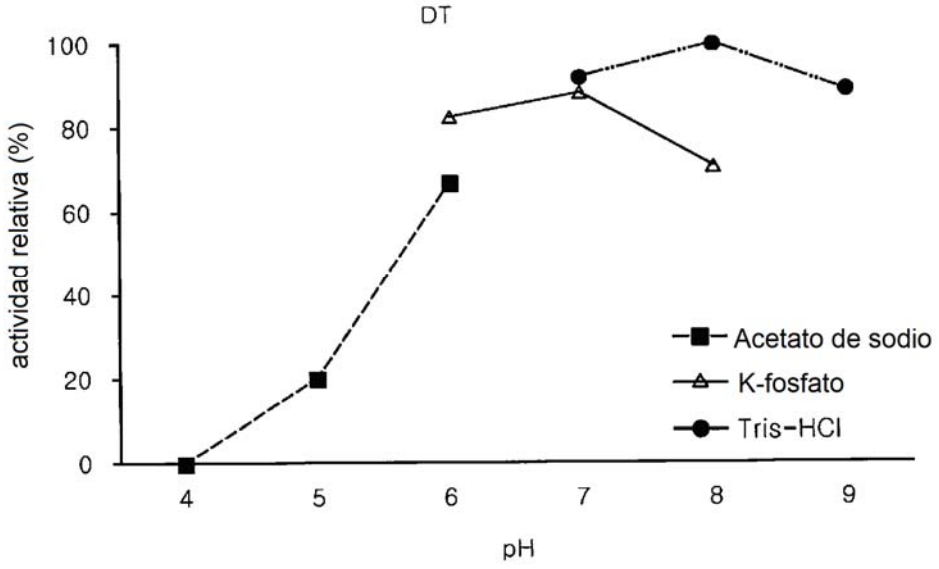
DT
100
80
60
40
20
0
actividad relativa (%)
4
5
6
7
8
9
pH
Acetato de sodio
K-fosfato
Tris-HCl

Fig. 5a

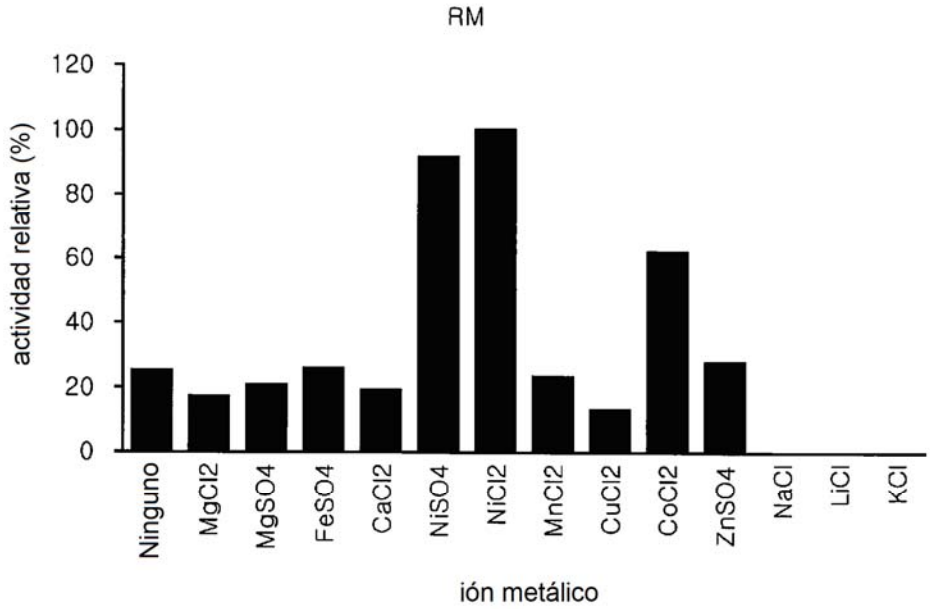
RM
actividad relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
Ninguno
MgCl2
MgSO4
FeSO4
CaCl2
NiSO4
NiCl2
MnCl2
CuCl2
CoCl2
ZnSO4
NaCl
LiCl
KCl
ión metálico

Fig. 5b

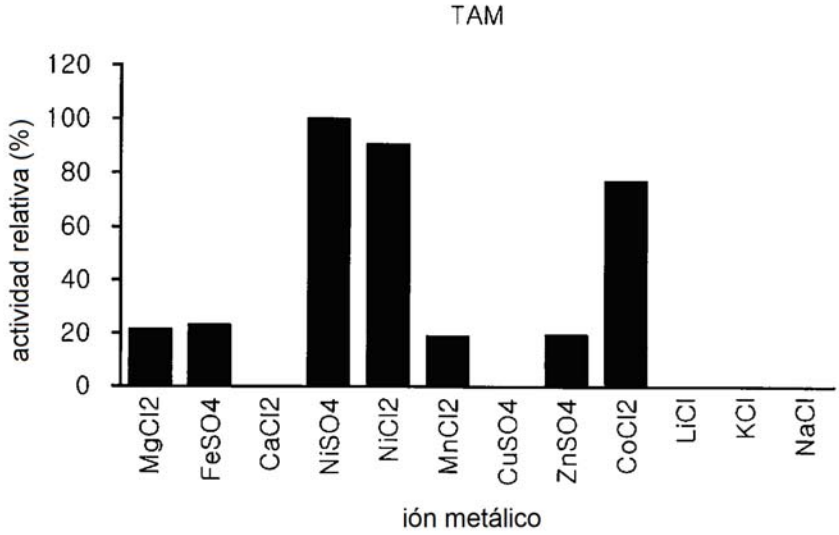
TAM
actividad relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
MgCl2
FeSO4
CaCl2
NiSO4
NiCl2
MnCl2
CuSO4
ZnSO4
CoCl2
LiCl
KCl
NaCl
ión metálico

Fig. 5c

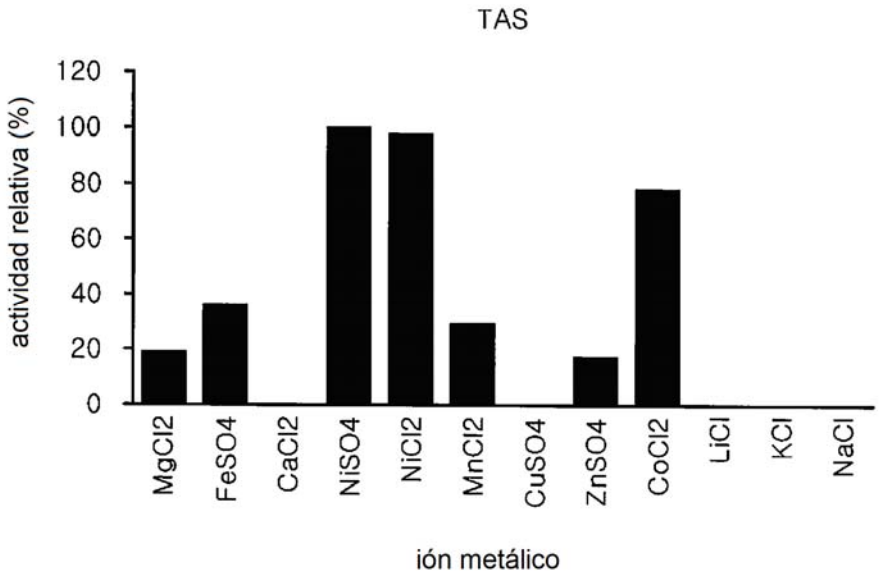
TAS
actividad relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
MgCl2
FeSO4
CaCl2
NiSO4
NiCl2
MnCl2
CuSO4
ZnSO4
CoCl2
LiCl
KCl
NaCl
ión metálico

Fig. 5d

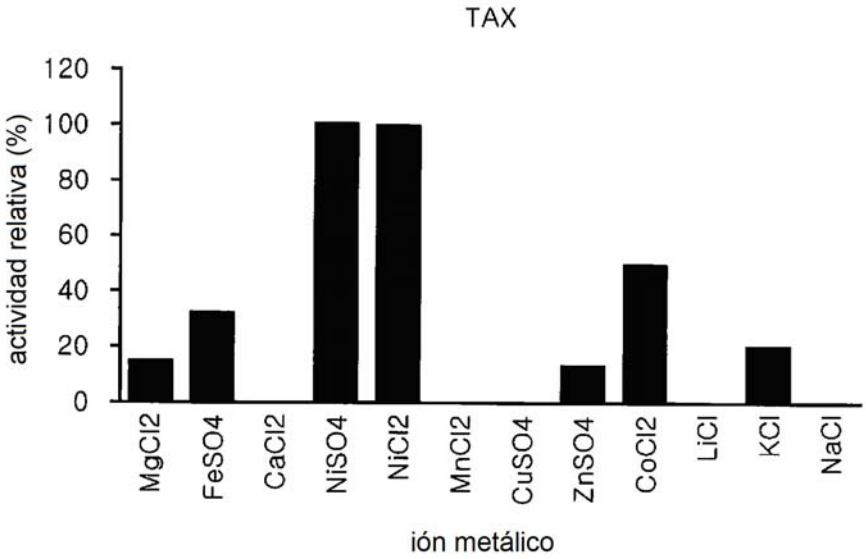
TAX
actividad relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
MgCl2
FeSO4
CaCl2
NiSO4
NiCl2
MnCl2
CuSO4
ZnSO4
CoCl2
LiCl
KCl
NaCl
ión metálico

Fig. 5e

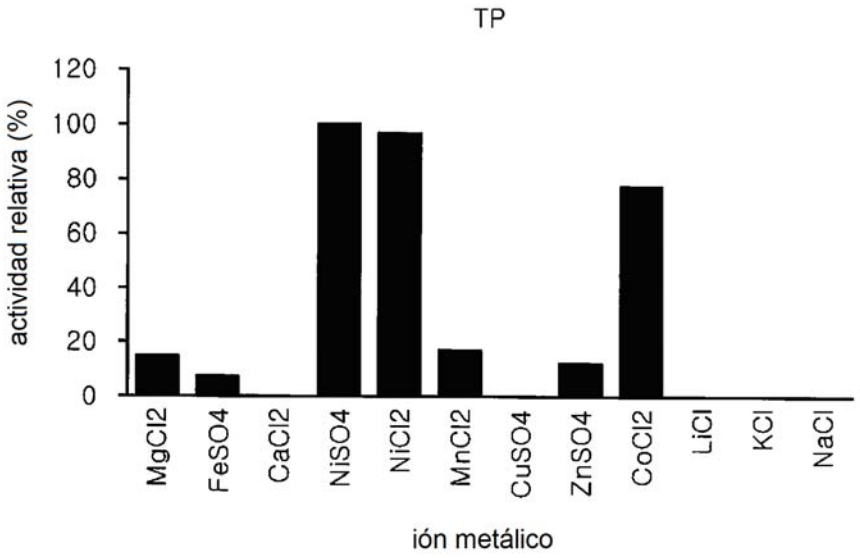
TP
actividad relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
MgCl2
FeSO4
CaCl2
NiSO4
NiCl2
MnCl2
CuSO4
ZnSO4
CoCl2
LiCl
KCl
NaCl
ión metálico

Fig. 5f

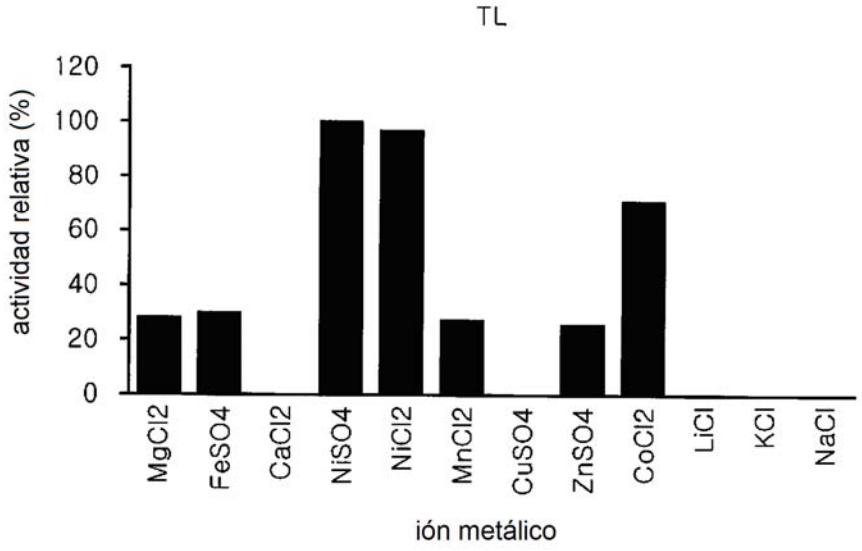
TL
actividad relativa (%)
120
100
80
60
40
20
0
MgCl2
FeSO4
CaCl2
NiSO4
NiCl2
MnCl2
CuSO4
ZnSO4
CoCl2
LiCl
KCl
NaCl
ión metálico

Fig. 5g

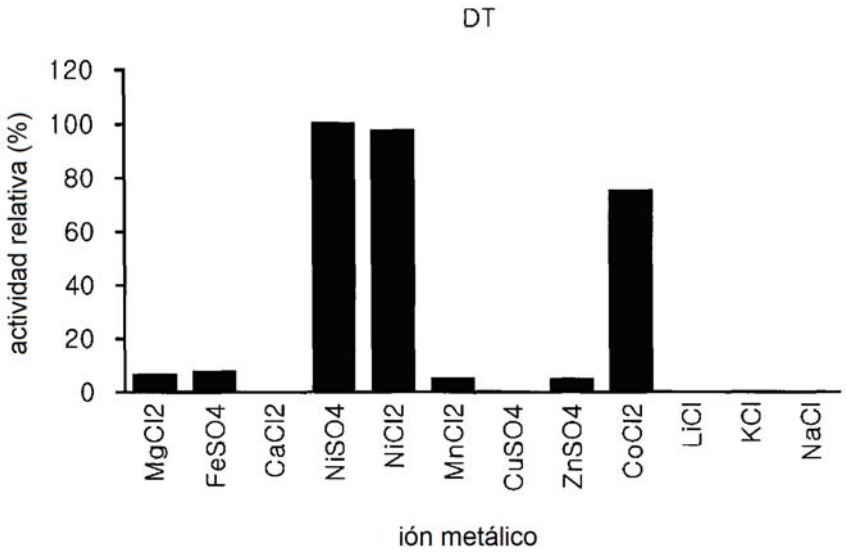

Fig. 6a: Una secuencia de aminoácidos de proteína derivada de *Rhodothermus marinus*

M V T V L Q T L L Q R P R P L A E I D R A A L A R F L T D L I R Q Q V Y P A S L
E P T S E G V F F L A R D G R E K R L G I L S E A G L H D F E G A R H Q L S L D
G R T L I F Q S C P L T A A N A R A L R Q H L A W T A P R P L G L R A S V G C
G D R L G L A T P G H V R A V R K H K L A P V F A Q Q S I R E **M** T R T G R T P
Q Q V L D E A **M** W G V F Q E G W R Q G Y G A D A D H L K T E E D A D R C I
E A G F T F F T I D P S A Y V D N E V D T A D A A T L E A K V A A L P W D A L
E T T L A D L R R A Y L G Q H F Q V G P Y E L S F E E R T L L Q A L A K Y G G A
I A H T A R V Y R H I A G R **M** G N R P F E L E **M** S V D E T E V P T S P A E H F
F V A R E L Q R L G V R W I S L A P R F V G R L E K G V D Y I G D L E E F E A H
L K L H V A I A R T L G P Y K L S L H S G S D K F A L Y P L F A R H A G E L F H
L K T A G T S Y L E A L R A V A E L D P P L F R E I L D F A R D R Y E T D R A T Y
H V S A L L E R V P K A S D V P D D A L P A L L E Q F D T R Q V L H V T F G S
V L T A T D A D G R P R F R D R L L A V L Q E N E E T Y Y R L L E A H F D R H L
A P F D A K

Fig. 6b: Una secuencia de aminoácidos de proteína derivada de *Thermotoga petrophila*

M V L K V F K D H F G R G Y E V Y E K S Y R E K D S L S F F L T K G E E G K I L
V V A G E K A P E G L S F F K K Q R V E G V S F F F C E R N H E N L E V L R K Y
F P D L K P V R A G L R A S F G T G D R L G I T T P A H V R A L K D S G L F P I
F A Q Q S V R E N E R T G R T W R D V L D D A T W G V F Q E G Y S E G F G A
D A D H V K R P E D L V S A A R E G F T **M** F T I D P S D H V R N L S K L T E K
E R N E K F E E I L R K E R I D R I Y L G K K Y S V L G E K I E F D E K N L R D A
A L V Y Y D A I A H V D **M** **M** Y Q I L K D E T P D F D F E V S V D E T E T P T S
P L F H I F V V E E L R R R G V E F T N L A L R F I G E W E K G I D Y K G D L A
Q F E R E I K **M** H A E I A R **M** F E G Y K I S L H S G S D K F S V Y P A F A S A T
G G L F H V K T A G T S Y L E A V K V I S **M** V N P E L F R E I Y R C A L D H F E
E D R K S Y H I S A D L S K V P E V E K V K D E D L P G L F E D I N V R Q L I H
V T Y G S V L K D A S L K E R L F K T L E Q N E E L F Y E T V A K H I K R H V D
L L K G

Fig. 6c: Una secuencia de aminoácidos de proteína derivada de *Thermotoga lettingae*

M A E N I V E K F E K L F K G K Y K I Y Y S S I R K L E K S F F F **M** I R D Q K Q K
Y L I S I A K K R I C E K F E G K K I G R I N D L D I L **M** C P T N D Y N C K V I R
T L F N I N P S V C K K N T S F G F G D R L G L A T P A H T T L I N K Y D V F P
V L A Q Q S V R E L S R T H R N F K D V L D S A I W G I F E S G Y E G E F G A
D A D H V K D I N D L **M** Q A A Y E G Y S **M** Y T V D P S D H V K N I D K I N Q
G E L V E F Y K S H P L R K E I E **M** I Y S G K V F S F E K S K F T **M** E D K E L F R
I F V T Y V D A I E H V V K C Y E A I K N T K K N F D F E V S I D E T S I P T S P
L A H I F I V H E L R R R G V D F Q T L A L R F V G Q W Q K A I D Y I G D L S V
L E S E L S **M** H C E I V K S L S G Y R L S L H S G S D K F S V Y R I F T H Y C D
G K L H V K T A G T S Y L E A I R T V A E A S P S L Y R N I H K Y A L T C F E K
D N T S Y H V T A D I N K I P D V D N V E D S K V V N L L D I P E V R Q L I H I
T Y G S V L T E K I N G K Y L F R D E I Y R I L H E N E F L H Y K R I R D H L G K
H L E L L K N

Fig. 6d: Una secuencia de aminoácidos de proteína derivada de *Thermoanaerobacter mathranii*

M V E K S I L E K L T D F L L N H S F V L Y P N S L R K L K E D T Y I F V A K K D
A D K K I G I L T K E N F K L T S P Y F V E D K N V K E I D F Y L N L Y P L S F E
N Y L I L K N F G I S P T P C R Q K S S F G T G D R L G L V T P A H I V A L K E
Y P V F P V L A Q Q S P R E L E K T H R D F K D A L L K V I L G V L E A G Y T G
E F G A D A D H I K D E K Y L L R A I E A G Y T **M** Y T L D V S E L L T K I L D I S
S N Q V **M** Q I S P Q S K E I I E A F K G K K I S I S E E E Y T I R E D E L Y K S A L
I Y E K A **M** N F V E K V Y S I L K E K V K D F D L E I S I D E G E K D T T V E D H
I F V A E Y L H K K G I D F W S L A P K F P G E F Q K A I D Y K G D I N K F A V
E L K K H Y A I S Q Q L G G Y K L S L H S G S D K F S I Y E I F S E V T Q H S F H
I K T S G T S W L Q A V N L I F E K N K K L F Y E L Y K I A L N N L E E S K K A Y
K V L I D K D D F A E E P N L E N V Q I L S Q P E I K Q L F H I S Y G V L L D E K
K E E I Y D V L D K Y E E E H Y Q F V S A N I K N H L G K I F N N

Fig. 6e: Una secuencia de aminoácidos de proteína derivada de *Dictyoglomus turgidum*

M L K L L N E S L K P L S I F I Y S E S L R K I N D D L Y I F V A K I K D L K K I G
I V K Q N Q I L Y F S S P Y F S E D K K I E G T N F L V N L Y P L N F E N Y Q K L
K E I I P I S P K V C D K K I S F G T G D R L G L I T S A Q L S A L K E Y D L F P I
L A Q Q S P R E L I K T K R D F K D V L L K S A **M** G V L E T G Y T G K Y G A D
A D H I K D E K Y L **M** E A I D A G Y T **M** Y T L D I S D F I E K I K D L S E K A L
K E K Y E K V S S F S K K I I D K Y A G K R V K I S D E E Y F E L S Y N E L C K S
A I V Y E K A L S F V E **M** V Y E I L K S K L S E F D I E V S I D E G E R D T T P E
D H F F V A Q F L H D K G I D F K S L A P K F P G E F Q K G I D Y I G D I K E F
E R A L K K H Y A L T K A L E G Y R L S L H S G S D K F S I Y K I F Y K I T E G N
F H I K T S G T S W L E A V K V I A K F F P D L F V E L Y Q I A L E N L E E S K K
A Y K V N I T K E E F P K E I K E D Y **M** E F L H K D N V R Q L F H I S Y G V L L
D E K R K E I Y D L L N Q K E K E H Y Q Y V S E N I K K H L K N L F E E E

Fig. 6f: Una secuencia de aminoácidos de proteína derivada de *Thermoanaerobacterium xylanolyticum*

M V G N V S S V L K E S G F Q I Y P D S L R K L G E N T Y I F V V K K Q K E K
M I G I L S N D E L K L K E P Y F S E N K K I S D N L Q F N V Y S F T F D N Y V
T L N G R F H I G P T I C R E N A S F G T G D R L G L A T A A Q L D A L K K F N
V F P I L A Q Q S P R E L V K T N R D F K D V L L K V V L G V L E T G Y I G H Y
G A D A D H I K D E K Y L L E G I D A G Y T **M** Y T L D L S E Q L F D V S G A T
S L E I K E K A K T L S D V S R K I V E D F S G K S L N V G F G G H L V S E D E L
L K S A V A Y E A A **M** K F V E K V N D I L K E K L N D F D L E I S I D E G G K V
T T L E D H L F V A E Y L H R N G I D F F S I A P K F P G E F E K A I D Y V G D
V N E F E R E L K K H Y D L T K L I G G Y K L S L H S G S D K F S I Y K I F S Q T
T E K N F H I K T S G T S W L Q A V N L I Y K S D K E F Y R E L Y K I A L S N L E
E S K K S Y K V L I K K D D F K D E P E L D N S E F I I R P E I K Q L F H I S F G V
L L D L K G K E I K D **M** L Y D Y E E E H Y K **M** V S D N I E N H L K E I F Y E K

Fig. 6g: Una secuencia de aminoácidos de proteína derivada de *Thermoanaerobacter siderophilus*

M K E E L S D Y L L K N S F L L Y P D S F R R L R E D V Y I F V A K K D S D K K I
G L L T N G N F K L S S P H F A E D K Y V E E L G F Y I N L Y P L T Y E N Y L I L
K D N F G I S P V T C K E K A S F G T G D R L G L A T P A H I K A L K N Y N V F
P V L A Q Q S P R E L V K T H R D F K D V F L K V I L G V L E A G Y A G G Y G
A D A D H I K D E K Y L I E A I D A G Y T **M** Y T L D L S D L L V K I S D **M** P K S
Q L K E K A Q S L S S Q S R E I I D R F K G K K F S I S T D E D F A V S E D E L Y
K S A L T Y E K A **M** K F V E K V Y G I L K D R L Q H F D L E I S I D E G E K D T
T V E D H I F V A E Y L H R K G I D F W S L A P K F P G E F Q K A I D Y K G D I
K K F T S G L K K H Y F L S K K L G G Y K L S L H S G S D K F S I Y K I F N E I T
E G N F H I K T S G T S W L Q A I N I I F E R D K D L F N D L Y K I A L D N L E E
S K K A Y K V L I D R D D F P Q T I Q T E D S Q I L L K P E I K Q L F H I S Y G V
L L D E R R K E I Y E V L N K Y E E E H Y E F V S K N I E N H L K E I F N I